



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월04일  
(11) 등록번호 10-2346455  
(24) 등록일자 2021년12월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/86 (2006.01) A61K 35/76 (2015.01)  
A61K 38/47 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 9/00 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)  
C12N 9/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/86 (2013.01)  
A61K 35/76 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7022504  
(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일  
심사청구일자 2019년03월13일  
(85) 번역문제출일자 2015년08월20일  
(65) 공개번호 10-2015-0129678  
(43) 공개일자 2015년11월20일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/025509  
(87) 국제공개번호 WO 2014/151341  
국제공개일자 2014년09월25일
- (30) 우선권주장  
61/788,724 2013년03월15일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020130138778 A
- (73) 특허권자  
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아  
미국 펜실베이니아 필라델피아 (우편번호 19104) 월  
넷 스트리트 3451 7플로어
- (72) 발명자  
윌슨 제임스 엠.  
미국 펜실베이니아 19342 글렌 밀스 폴브룩 레인 7  
거다 브리트니 엘.  
미국 펜실베이니아 19426 컬리지빌 크리에벨 밀 로  
드 1152
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 23 항

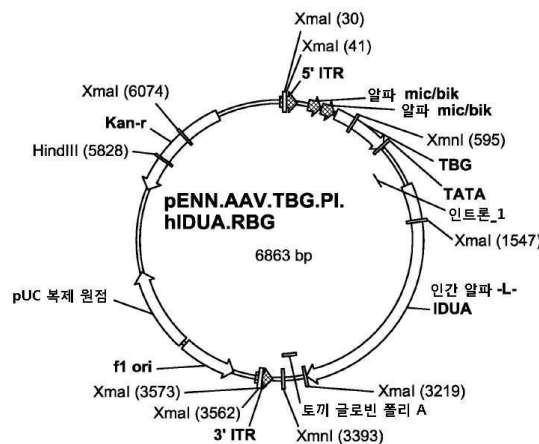
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 MPSI 치료를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

서열 번호 1의 서열, 또는 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는 hIDUA 유전자를 함유하는 발현 카세트를 갖는 벡터가 제공된다. 이 벡터는 생산 벡터 또는 rAAV8일 수 있다. 이 벡터를 함유하는 조성물 및 MPSI과, 헐러(Hurler) 증후군, 헐러-샤이에(Scheie) 증후군 및 샤이에 증후군과 연관된 증상을 치료하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

*A61K 38/47* (2013.01)

*A61K 48/0058* (2013.01)

*A61K 9/0019* (2013.01)

*C12N 7/00* (2013.01)

*C12N 9/2402* (2013.01)

*C12Y 302/01076* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제의 아미노산 서열을 코딩하는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자를 포함하는 발현 카세트를 갖는 재조합 벡터로서,

상기 발현 카세트는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제의 발현을 유도하는 조절 제어 서열로서 간 특이적 프로모터를 포함하는 조절 제어 서열을 추가로 포함하는, 재조합 벡터.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 프로모터는 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터인 재조합 벡터.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 1개 이상의 인헨서를 추가로 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 인헨서는 동일하거나 상이한 재조합 벡터.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 인헨서는 인트론, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV) 인헨서 및 알파 mic/bik 인헨서로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

#### 청구항 6

제3항에 있어서, 선택된 인헨서의 1개 초과 카피(copy)가 벡터에 존재하는 재조합 벡터.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 인헨서의 상기 1개 초과 카피는 탠덤(tandem)으로 위치하는 재조합 벡터.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 발현 카세트는 폴리 A를 추가로 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 벡터는 플라스미드 pENN.TBG.hIDUA.nRBG이고, 플라스미드 pENN.TBG.hIDUA.nRBG는 알파 mic/bic 인헨서의 탠덤(tandem) 반복부, TBG 프로모터, 인트론 서열, 서열 번호 1의 인간 IDUA 유전자 및 폴리 A를 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 10

아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus; AAV) 캡시드(capsid)를 갖고, 상기 캡시드 내에 패키징된(packaged) 5' 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat; ITR), 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자 및 AAV 3' ITR을 갖는 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자로서,

상기 hIDUA 유전자는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제의 아미노산 서열을 코딩하는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 변형 hIDUA 유전자는 간 특이적 프로모터의 제어 하에 발현되는 rAAV 입자.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 프로모터는 TBG 프로모터인 rAAV 입자.

**청구항 13**

제10항에 있어서, 벡터는 1개 이상의 인헨서를 추가로 포함하는 rAAV 입자.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 인헨서는 동일하거나 상이한 rAAV 입자.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 인헨서는 인트론, CMV 인헨서 및 알파 mic/bik 인헨서로 이루어진 군으로부터 선택되는 rAAV 입자.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 선택된 인헨서의 1개 초과 카피가 벡터에 존재하는 rAAV 입자.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 인헨서의 상기 1개 초과 카피는 탠덤으로 위치하는 rAAV 입자.

**청구항 18**

제10항에 있어서, rAAV 입자는 AAV8 및 AAV9로부터 선택되는 AAV 캡시드를 포함하는 rAAV 입자.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 위형인(pseudotyped) rAAV 입자.

**청구항 20**

제19항에 있어서, ITR은 AAV2 유래인 rAAV 입자.

**청구항 21**

AAV2 5' ITR, 알파 mic/bic 인헨서, TBG 프로모터, 인트론 서열, 서열 번호 1의 변형된 인간 IDUA 유전자, 폴리 A 및 AAV2 3' ITR을 포함하는 핵산 서열 및 AAV8 캡시드를 포함하는, 재조합 아데노 연관 바이러스 입자 AAV2/8.TBG.hIDUA.co.

**청구항 22**

제10항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 rAAV 입자 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 제I형 점액다당류 증(MPS I) 치료에 유용한 조성물.

**청구항 23**

제22항에 있어서, rAAV 입자의  $3 \times 10^9$  내지  $3 \times 10^{12}$  개의 게놈 카피를 포함하는 조성물.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

## 청구항 27

삭제

## 청구항 28

삭제

## 청구항 29

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

## 배경 기술

- [0001] 점액다당류증은 뮤코다당류로도 칭해지는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan; GAG)의 분해에 연루된 특정 리소좀 효소의 결여에 의해 야기되는 일군의 유전성 질환이다. 부분 분해된 GAG의 축적은 세포, 조직 및 기관의 기능의 방해를 야기한다. 시간이 지남에 따라, GAG는 세포, 혈액 및 결합 조직 내에서 축적되어 세포 및 기관 손상을 증가시킨다. 가장 심각한 점액다당류증(MPS) 질환인 MPS I은  $\alpha$ -L-이두로니다아제(IDUA) 효소의 결함에 의해 야기된다. 이는 중증도 순으로 헐러(Hurler) 증후군, 헐러-샤이에(Scheie) 증후군 및 샤이에 증후군인 3가지의 임상 증후군에 이르게 된다. 각각은 효소 결함이 임상 표현형의 중증도에 직접적으로 관련되는 정도에 의해 상염색체 열성 방식으로 유전된다.
- [0002] IDUA 유전자는 글리코사미노글리칸(GAG)으로 칭해지는 큰 당 분자의 분해에 필수적인  $\alpha$ -L-이두로니다아제로 칭해지는 효소의 생성을 위한 지시를 제공하는 것으로 보고되었다. 구체적으로,  $\alpha$ -L-이두로니다아제는 헤파란 술페이트 및 더마탄 술페이트로 칭해지는 2가지 GAG에 존재하는 술페이트화(sulfated)  $\alpha$ -L-이두론산으로 공지된 분자로부터 술페이트를 제거하는 것으로 보고되어 있다.  $\alpha$ -L-이두로니다아제는 상이한 유형의 분자를 소화시키고 재활용하는 세포 내의 구획인 리소좀에 위치한다. IDUA 유전자 내에서의 100개 초과 돌연변이가 제I형 점액다당류증(MPS I)을 야기하는 것으로 밝혀졌다. 하나의 DNA 빌딩 블록(building block)(뉴클레오타이드)을 변화시키는 돌연변이가 가장 일반적이다. MPS I을 야기하는 돌연변이는  $\alpha$ -L-이두로니다아제의 기능을 감소시키거나 또는 완전히 제거한다.
- [0003] 임상 증후군과 관련하여, 헐러 증후군의 현재의 관리 표준으로는 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation; HSCT), 예컨대 골수 이식(bone marrow transplantation; BMT) 또는 제대혈 이식(umbilical cord blood transplantation; UCBT)이 있다. 당해 절차는 상기 질병의 체성(somatic) 측면 및 CNS 측면 둘 모두에 영향을 주기 위하여 가능한 한 빨리, 2세 이전에 행해진다. 그러나, MPS I을 위한 HSCT는 상당한 양의 이환율 및 20%의 사망률과 연관된 채로 있다. 이식이 옵션(option)이 아니라면, 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy; ERT)이 시작될 수 있는데, 이는 환자의 일생 동안 효소의 매주 주입을 필요로 한다. ERT는 CNS 질환의 진행에 영향을 주지 않지만, 체성 소견을 부분적으로 개선시킨다. 장기종대(Organomegaly)가 유의하게 개선되지만, 골격계, 눈 및 심장에서의 상기 질병의 측면은 단지 부분적으로 개선된다. 환자는 둔부 및 무릎을 안정화시키기 위하여 그리고 수근관 증후군 및 손가락 수축을 치료하기 위하여 수술을 필요로 할 수 있다. 심장 질환은 의학적으로 치료되지만, 수술이 결국 필요해질 수 있다.
- [0004] MPS I을 위한 ERT는 GAG의 리소좀 내로의 흡수 및 이화작용의 증가를 위한 외인성 효소를 제공한다. 리소좀 효소가 내부적으로 기능하지만, 세포 표면 만노스-6-포스페이트 수용체는 이러한 효소를 리소좀에 결합시키고, 내부화하고, 전달하는 것이 가능하다. 제조합 IDUA (알두라자임(Aldurazyme)<sup>®</sup>, 바이오마린(BioMarin))는 헐러형 및 헐러-샤이에형의 MPS I을 갖는 환자용으로, 그리고 중증도 내지 중증도 증상을 갖는, 샤이에형을 갖는 환자용으로 FDA에 의해 승인되어 있으며, 이는 폐기능 및 보행 능력을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 ERT는 MPS I 환자에 있어서 간비대를 감소시키고, 이외에도 소변 중 GAG의 수준을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 그러나, 정맥내 효소는 뇌 내로 용이하게 가로질러 들어가지 못하기 때문에, ERT는 현재 일부 MPS I 환자가 경험하는 신경학적 증상에 대처하지 못한다.

[0005] ERT의 합병증은 국소 및 전신 감염과 같은 평생 말초 접근의 합병증 뿐만 아니라 경도 내지 말기 아나필락시스의 범위일 수 있는, 재조합 효소에 대한 면역 반응을 중심으로 돌아간다. 알두라자임을 받은 환자의 91% 이하의 상기 효소에 대한 항체를 발달시키지만, 이것이 효능에 얼마나 많은 영향을 주는지는 명확하지 않다. 더욱이, ERT는 병원 시설에서 3 내지 8시간의 기간에 걸쳐 투여되는 매주 정맥내(i.v.) 주입을 필요로 하는데, 이는 환자의 삶의 질에 유익하게 영향을 주며, 높은 비용으로 인해 건강 관리 보상 시스템에 관한 주요한 부담이다.

[0006] 이러한 제한을 고려하면, MPS I과 연관된 이환율을 더 효과적으로 바로잡을 수 있는 치료법은 여전히 충족되지 않은 의학적 필요성이다.

### 발명의 내용

[0007] 일 측면에서, 본 발명은 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열 또는 인간 세포에서의 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자를 포함하는 발현 카세트를 제공하며, 여기서, 상기 발현 카세트는 인간 세포에서 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제의 발현을 유도하는 조절 제어 서열을 추가로 포함하고, 상기 조절 제어 서열은 간 특이적 프로모터를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 이 발현 카세트를 함유하는 벡터를 제공한다. 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 시스(cis) 플라스미드 상에 위치한다. 또 다른 실시 양태에서, 발현 카세트는 pENN.TBG.hIDUA.nRBG 상에 위치한다.

[0008] 또 다른 측면에서, 본 발명은 아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus; AAV) 캡시드(capsid)를 갖고, 상기 캡시드 내에 패키징된(packaged) 좌측 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat; ITR), 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자 및 AAV 우측 ITR을 갖는 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자를 제공하며, 여기서, 상기 hIDUA 유전자는 서열 번호 1로 나타낸 서열 (도 1), 또는 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는다. 일 실시 형태에서, 기능성 hIDUA 유전자는 간 특이적 프로모터의 제어 하에 발현된다. 이러한 프로모터는 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터일 수 있다.

[0009] 추가의 측면에서, 본 발명은 재조합 아데노 연관 바이러스 입자 AAV2/8.TBG.hIDUA.co를 제공한다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 발현 카세트를 포함하는 rAAV 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 제I형 점액다당류증(MPS I)의 치료에 유용한 조성물을 제공한다.

[0011] 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 제약상 허용가능한 담체 및 본원에 기술된 rAAV를 포함하는 유효량의 조성물을 전달하는 단계를 포함하는, 제I형 점액다당류증의 치료 방법을 제공한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 혈러, 혈러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군의 증상을 치료하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면 및 이점은 [발명을 실시하기 위한 구체적인 내용]으로부터 자명해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a 내지 도 1d는 본원에 기술된 pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.nRBG 플라스미드의 서열 [서열 번호 3]을 제공하며, 이는 기능성 인간 IDUA 유전자의 핵산 서열을 포함한다. 도 1의 위치 1251-3213에 위치한 기능성 IDUA의 유전자 및 그의 코딩된 효소 서열이 서열 번호 1 및 2에 또한 제공되어 있다. 서열에는 추가로, 알파 mic/bik 인핸서, 인트론 1, 토끼 글로빈 폴리 A, ITR, 복제 원점의 서열이 확인되도록 주석을 단다.

도 2는 pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.nRBG의 원형 지도를 제공한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본원에 기술된 조성물은 인간 대상체에서 치료적 유효량의 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제 효소를 발현하는 인간 IDUA 유전자를 갖는 발현 카세트를 제공한다.

[0016] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"은 표적 세포에서 혈러, 혈러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군, 및/또는 MPS I의 증상을 개선시키거나 치료하기에 충분한 양의 효소를 전달 및 발현하는 조성물의 양을 나타낸다. "치료"는 상기 증후군 중 1가지 (또는 MPS I)의 증상의 악화의 방지 및 가능하게는 이의 증상 중 1가지 이상의 역전을 포함할 수 있다.

- [0017] 본원에서 사용되는 바와 같이, "기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제"는 MPS1 또는 연관 증후군, 예컨대 혈리, 혈리-샤이에 및/또는 샤이에 증후군 없이 인간에 있어서 정상적으로 기능하는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제 효소를 나타낸다. 역으로, 이들 증후군 중 1가지 또는 MPS1을 야기하는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제 효소 변이체는 비기능성으로 간주된다. 일 실시 양태에서, 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제는 서열 번호 2 (653개 아미노산)에 제한되어 있는, NCBI 기준 서열 NP\_000194.2, 문헌[Bremer et al., Mol. Genet. Metab. 104 (3): 289-294 (2011)]에 기술된 야생형 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제의 아미노산 서열을 갖는다. 그러나, 이 서열의 몇몇 자연 발생 기능성 다형성 (변이체)이 기술되었으며, 이는 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다. 이들 변이체는 서열 번호 2를 참조하면, 위치 110에서 N-결합형 글리코실화(문헌[Chen et al., J Proteome Res., 8:651-661 (2009)]), 아미노산 위치 33에서 H에서 Q로의 변화 [서열 번호 7, VAR\_003350; 문헌[Scott, HS, et al., Proc Natl Acad. Sci., 88:9695-9699 (1991)]; 문헌[Scott, HS, et al., Genomics, 12: 1311-1313 (1992)]; 문헌[Scott HS, et al., Hum Genet, 90:327-327 (1992)]; 문헌[Bertola F., et al., Hum Mutat, 32: E2189-E2210 (2011)]], 아미노산 위치 82에서 H의 Q로의 환원 [서열 번호 8, VAR\_020976; 상기에 인용된 문헌[Scott, HS, Hum Genet]], 위치 105에서 R에서 Q로의 변화 [서열 번호 9, VAR\_003356; 상기에 인용된 문헌[Scott, HS, Hum Genet]; 상기에 인용된 베톨라(Bertola) 등의 문헌], 위치 116에서 G에서 R로의 변화 [서열 번호 10, VAR\_003367], 위치 279에서 V에서 A로의 변화 [서열 번호 11, VAR\_003359], 위치 346에서 L에서 R로의 변화 [서열 번호 12, VAR\_017436, 문헌[Teng, YN, et al., Clin. Genet, 57: 131-136 (2000)]], 위치 361에서 A에서 T로의 변화 [서열 번호 13, VAR\_003364; 문헌[Scott, HS, et al., Hum Mol Genet, 2: 1471-1473 (1993)]; 문헌[Yogalingam et al., Hum Mutat, 24: 199-207 (2004)]; 상기에 인용된 베톨라 등의 문헌], 위치 449에서 H에서 N으로의 변화 [서열 번호 14, VAR\_066228, 상기에 인용된 베톨라 등의 문헌], 위치 454에서 V에서 I로의 변화 [서열 번호 15, VAR\_003372; 상기에 인용된 요갈링엄(Yogalingam) 등의 문헌; 상기에 인용된 베톨라 등의 문헌], 위치 591에서 A에서 T로의 변화 [서열 번호 16, VAR\_0066231, 상기에 인용된 베톨라 등의 문헌], 및 위치 622에서 A에서 T로의 변화 [서열 번호 17, 상기에 인용된 문헌[Scott et al., Genomics]]를 포함한다. 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot; [www.uniprot.org/uniprot/P35475](http://www.uniprot.org/uniprot/P35475)를 참조한다. 또 다른 실시 양태에서, 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제는 리더 (시그널) 펩티드에 상응하는, 서열 번호 2의 처음 26개 아미노산의 전부 또는 일부분이 이중성 리더 펩티드로 대체된 합성 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 효소를 그의 분비 경로를 통하여 세포의 외부로 순환계 내로 수송하는 데 책임이 있는 이러한 리더 펩티드는 예를 들어 인터류킨-2(IL-2) 또는 온코스타틴(oncostatin) 유래의 리더 펩티드와 같은 또 다른 적합한 리더 펩티드로 치환될 수 있다. 적합한 리더 펩티드는, 반드시 그러할 필요는 없지만, 바람직하게는 인간 기원의 것이다. 적합한 리더 펩티드는 본원에 참고로 포함된 <http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/zhang270.htm>으로부터 선택될 수 있거나, 선택된 단백질에서 리더 (시그널) 펩티드를 결정하기 위한 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 한정되는 것은 아니지만, 이러한 서열은 길이가 약 15개 내지 약 50개 아미노산이거나, 길이가 약 20개 내지 약 28개 아미노산일 수 있거나, 필요할 경우 이보다 더 크거나 더 작을 수 있다. 게다가, 1가지 이상의 시험관내(in vitro) 검정법이 IDUA 효소의 효소 활성의 평가에 유용한 것으로 기술되었다 [예를 들어, 문헌[Kakkis et al., Mol Genet Metabol, 2001 Mar; 72(3): 199-208] 참조].
- [0018] 적합하게는, 본원에 기술된 조성물 및 방법은 치료적 용량의 장기적인 반복된 매주 주사를 필요로 하지 않는다. 이론에 의해 구제되고자 함이 없이, 본원에 기술된 방법은 MPSI 질환과 연관된 체성 증상에 더하여 중추 신경계 표현형을 바로잡는 데 유용한 것으로 생각된다.
- [0019] 발현 카세트
- [0020] 발현 카세트는 최소한 유전자 및 그의 조절 서열로 구성된다. 카세트가 재조합 아데노 연관 바이러스로부터 발현되도록 설계될 경우, 발현 카세트는 5' 및 3' AAV 반전 말단 반복부(ITR)를 추가로 함유한다. 이들 ITR은 전장 ITR일 수 있거나, ITR 중 하나 또는 둘 모두의 ITR은 절두형(truncated)일 수 있다. 예를 들어, D 서열의 결실 및 말단 분리 부위(terminal resolution site; trs) 결실을 함유하는 절두형 5' ITR이 예를 들어 자기 상보성 AAV용으로 사용될 수 있다. 일 실시 양태에서, rAAV는 위형이며(pseudotyped), 즉, AAV 캡시드는 ITR을 제공하는 AAV와는 상이한 소스(source) AAV로부터 유래된다. 일 실시 양태에서, AAV 혈청형 2형의 ITR이 사용된다. 그러나, 다른 적합한 소스 유래의 ITR이 선택될 수 있다.
- [0021] 본원에 기술된 바와 같이, 본원에 기술된 병태 중 1가지를 앓고 있는 환자에게는 세포에 있어서 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제 효소의 발현을 유도하는 조절 서열의 제어 하의 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자를 갖는 발현 카세트가 전달된다.
- [0022] 본 발현 카세트는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 hIDUA 유전자를 함유한다. 본



발명자에 의해 개발된 이 서열은 서열 번호 2의 서열을 코딩하는 젠뱅크(Genbank) NP000194.2의 공개된 유전자 서열과의 동일성이 약 83%이다. 또 다른 실시 양태에서, 발현 카세트는 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 80% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 hIDUA 유전자를 함유하며, 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩한다. 또 다른 실시 양태에서, 이 서열은 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 85% 이상 동일하거나 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 90% 이상 동일하며, 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩한다. 일 실시 양태에서, 이 서열은 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일하거나, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 97% 이상 동일하거나, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 99% 이상 동일하며, 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩한다. 일 실시 양태에서, 이것은 서열 번호 1의 약 1 내지 약 78에 상응하는 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제 (즉, 서열 번호 2의 대략 아미노산 26, 또는 대략 아미노산 27에서 대략 아미노산 653까지를 코딩함)의 리더 펩티드 서열을 포함하는 전장 hIDUA 유전자를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, hIDUA 유전자는 기능성  $\alpha$ -L-이두로니다아제 효소의 분비 부분에 융합된 이종성 리더 서열을 포함하는 합성 펩티드인 기능성 합성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제 효소, 즉, 서열 번호 2의 대략 아미노산 27 내지 대략 아미노산 653 또는 이의 기능성 변이체 - 이는 본원에서 확인됨 - 중 1가지를 코딩한다.

[0023] 본원에서 서열과 관련하여 동일성 또는 유사성은, 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하도록 서열들을 정렬하고, 필요할 경우 갭(gap)을 도입한 후, 본원에 제공된 펩티드 및 폴리펩티드 영역과 동일하거나 (즉, 동일한 잔기) 유사한(즉, 공통 측쇄 특성을 기반으로 하여 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기, 하기 참조), 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 동일성 퍼센트 (%)는 두 폴리뉴클레오티드 또는 두 폴리펩티드 사이의 관계의 척도이며, 이는 각각 이들의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 비교함으로써 결정되는 바와 같다. 일반적으로, 비교될 두 서열은 상기 서열들 사이의 최대 상관성을 제공하도록 정렬된다. 두 서열의 정렬을 조사하고, 상기 두 서열 사이의 정확한 아미노산 또는 뉴클레오티드 관련성을 제공하는 위치의 수를 결정하고, 이를 전체 정렬 길이로 나누고, 이것에 100을 곱하여 동일성 % 수치를 제공한다. 이러한 동일성 % 수치는 비교될 서열들의 전 길이에 걸쳐 - 이는 동일하거나 매우 유사한 길이의, 그리고 고도로 상동성인 서열에 특히 적합함 - 또는 더 짧은 규정된 길이에 걸쳐 - 이는 동일하지 않은 길이의 서열 또는 더 낮은 수준의 상동성을 갖는 서열에 더 적합함 - 결정될 수 있다. 정렬 및 동일성 퍼센트의 수행을 위하여 문헌에서 및/또는 공개적으로 또는 상업적으로 이용가능한, 이용이 가능한 다수의 알고리즘 및 이를 기반으로 하는 컴퓨터 프로그램이 있다. 상기 알고리즘 또는 프로그램의 선택은 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0024] 적합한 정렬 프로그램의 예는 예를 들어 유닉스(Unix) 하의 그리고 이후에 바이오에디트(Bioedit) 프로그램으로 임포트되는(imported) 소프트웨어 CLUSTALW (문헌[Hall, T. A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98]); 위스콘신 서열 분석 패키지(Wisconsin Sequence Analysis Package), 버전(version) 9.1 (문헌[Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984], 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)으로부터 입수가가능함)를 포함한다. BESTFIT 및 GAP 프로그램을 이용하여 두 폴리뉴클레오티드 사이의 동일성 % 및 두 폴리펩티드 서열 사이의 동일성 %를 결정할 수 있다.

[0025] 서열들 사이의 동일성 및/또는 유사성의 결정을 위한 다른 프로그램은 예를 들어 미국 메릴랜드주 베데스다 소재의 미국 국립 생물 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information; NCB)로부터 입수가가능한, 그리고 NCBI의 홈페이지 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)를 통하여 접근가능한 BLAST 패밀리 프로그램, GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)을 포함한다. 아미노산 서열들의 비교를 위하여 ALIGN 프로그램을 이용할 때, PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티(penalty), 및 4의 갭 페널티가 이용될 수 있으며; FASTA (문헌[Pearson W. R. and Lipman D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988], 위스콘신 서열 분석 패키지의 일부로서 입수가가능함)가 이용될 수 있다. SeqWeb 소프트웨어 (GCG 위스콘신 패키지로의 웹 기반의 인터페이스: Gap 프로그램).

[0026] 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "포함하는" 및 "포함하고 있는"이라는 용어는 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 포함한다. 역으로, "이루어진"이라는 용어 및 그의 변이형은 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 배제한다. "약"이라는 용어는 달리 특정되지 않으면  $\pm 10\%$ 를 포함하여  $\pm 10\%$  내의 변동을 포함한다.

[0027] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 인간 간 유도된 발현용으로 설계된다. 따라서, 간 특이적 프로모터가 본 발현 카세트에 특히 적합하다. 일 실시 양태에서, 티록신 결합 글로불린 프로모터가 선택된다. 일 실시 양태에서, TBG 프로모터는 도 1의 뉴클레오티드 442 내지 901의 서열을 갖는다. 대안적으로, 또 다른 간 특이적 프로모터가 선택될 수 있다. 특히, 조직 특이적인 프로모터의 예가 간 및 다른 조직에 대하여 공지되어 있다 (알부민,



문헌[Miyatake et al., (1997) J. Virol, 71:5124-32]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, 문헌[Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002-9]; 알파-태아단백질(AFP), 문헌[Arbuthnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14]), 뼈 오스테오칼신 (문헌[Stein et al., (1997) Mol. Biol. Rep., 24:185-96]); 뼈 시알로 단백질 (문헌[Chen et al., (1996) J. Bone Miner. Res., 11:654-64]), 림프구 (CD2, 문헌[Hansal et al., (1998) J. Immunol, 161: 1063-8]; 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런 특이적 엔올라아제(neuron-specific enolase; NSE) 프로모터와 같은 뉴런 프로모터 (문헌[Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol, 13:503-15]), 신경필라멘트 경쇄 유전자 (문헌[Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5]), 및 뉴런 특이적 vgf 유전자 (문헌[Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84]). 다른 프로모터 (간 특이적이 아닌 것)가 선택될 수 있지만, 이를 함유하는 발현 카세트는 TBG 또는 또 다른 간 특이적 프로모터를 포함하는 것의 이점 전부를 갖는 것이 아닐 수 있다. 대안적으로, 조절가능한 프로모터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 국제 특허 공개 WO 2011/126808B2호를 참조한다.

[0028] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 1개 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 2개 이상의 발현 인핸서를 함유한다. 이들 인핸서는 동일할 수 있거나 서로와는 상이한 것일 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서를 포함할 수 있다. 이 인핸서는 2개의 카피(copy)로 존재할 수 있으며, 상기 두 카피는 서로에게 인접하여 위치한다. 대안적으로, 상기 인핸서의 이중 카피는 1개 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 발현 카세트는 인트론, 예를 들어 프로메가(Promega) 인트론을 추가로 함유한다. 다른 적합한 인트론은 당업계에 공지된 것, 예를 들어 국제 특허 공개 WO 2011/126808호에 기술된 것을 포함한다.

[0029] 또한, 본 발명의 발현 카세트에는 적합한 폴리아데닐화 시그널이 제공되어 있다. 일 실시 양태에서, 폴리A 서열은 토끼 글로빈 폴리 A이다. 일 실시 양태에서, 폴리A 서열은 도 1의 뉴클레오타이드 3261-3387의 것을 특징으로 한다. 대안적으로, 또 다른 폴리A, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(human growth hormone; hGH) 폴리아데닐화 서열, SV40 폴리A, 또는 합성 폴리A. 또 다른 통상적인 조절 요소가 발현 카세트 내에 추가로 또는 선택적으로 포함될 수 있다.

[0030] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 적합한 벡터, 예를 들어 플라스미드 벡터 상에 엔지니어링된다(engineered). 선택적으로, 본 발명의 조성물은 변형 인간 IDUA 유전자를 포함하는 제1 발현 카세트 및 상이한 유전자를 포함하는 제2 발현 카세트를 함유할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 기능성 인간 IDUA는 1가지 초과 발현 카세트로부터 발현될 수 있는데, 이는 예를 들어 국제 특허 공개 WO 2011/126808호에 기술된 바와 같이 다수의 벡터 상에 위치할 수 있다.

[0031] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 pENN.TBG.hIDUA.nRBG가 지니고 있는데, 상기 플라스미드는 발현 카세트를 지니고 있는 재조합 아데노 연관 바이러스의 생성에 사용된다.

[0032] AAV 바이러스 입자의 생성

[0033] 일 실시 양태에서, 본 발명은 AAV 캡시드를 갖고, 상기 캡시드 내에 패키징된 5' 반전 말단 반복부(ITR), 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자 및 AAV 3' ITR을 갖는 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자를 제공하며, 여기서, 상기 hIDUA 유전자는 서열 번호 1로 나타낸 서열 (도 1), 또는 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는다. 1가지의 특히 바람직한 rAAV로는 AAV2/8.TBG.hIDUA.co가 있다.

[0034] AAV 기반의 벡터의 제조 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제 2007/0036760호 (2007년 2월 15일)를 참조한다. AAV8의 AAV 캡시드의 사용이 본원에 기술된 조성물 및 방법에 특히 적합하다. AAV8의 서열 및 AAV8 캡시드를 기반으로 한 벡터의 생성 방법이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,282,199 B2호, 미국 특허 제7,790,449호, 및 미국 특허 제8,318,480호에 기술되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 또한 적합한 것은 AAV9 캡시드이다. AAV9의 서열 및 AAV9 캡시드를 기반으로 한 벡터의 생성 방법이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,906,111호에 기술되어 있다. 그러나, 다른 AAV 캡시드가 본 발명에서 사용하기 위해 선택되거나 생성될 수 있다. 다수의 그러한 AAV의 서열이 상기에 인용된 미국 특허 제7,282,199 B2호, 미국 특허 제7,790,449호, 미국 특허 제8,318,480호, 및 미국 특허 제7,906,111호에 제공되어 있고/있거나 젠뱅크로부터 입수가능하다. AAV 캡시드 중 임의의 것의 서열은 합성에 의해 또는 다양한 분자 생물학 및 유전 공학 기술을 이용하여 쉽게 생성될 수 있다. 적합한 생성 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다. 대안적으로, 펩티드 (예를 들어, CDR)를 코딩하는 올리고뉴클레오타이드 또는 펩티드

그 자체가 합성에 의해, 예를 들어, 공지된 고체상 펩티드 합성법에 의해 생성될 수 있다 (문헌[Merrifield, (1962) J. Am. Chem. Soc, 85:2149]; 문헌[Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62]). 또한, 문헌[D M McCarty et al., "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254]을 참조한다. 자기 상보성 AAV가 예를 들어 미국 특허 제6,596,535호; 미국 특허 제7,125,717호; 및 미국 특허 제7,456,683호에 기술되어 있는데, 상기 미국 특허 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 이러한 생성 방법 및 다른 적합한 생성 방법은 당업자의 지식 이내이며, 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0035] 본원에 기술된 재조합 아데노 연관 바이러스(AAV)는 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 방법은 AAV 캡시드를 코딩하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 최소한, AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 트랜스진(transgene)으로 구성된 발현 카세트; 및 발현 카세트가 AAV 캡시드 단백질 내로 패키징되는 것을 가능케 하는 것에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0036] AAV 캡시드 내에 AAV 발현 카세트를 패키징하기 위하여 숙주 세포에서 배양되는 데 필요한 구성요소는 트랜스로(in trans) 숙주 세포에게 제공될 수 있다. 대안적으로, 임의의 1가지 이상의 필요한 구성요소 (예를 들어, 발현 카세트, rep 서열, cap 서열 및/또는 헬퍼 기능)가 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 상기 필요한 구성요소 중 1가지 이상을 함유하도록 엔지니어링된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게는, 그러한 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하의 상기 필요한 구성요소(들)를 함유한다. 그러나, 상기 필요한 구성요소(들)는 구성적 프로모터(constitutive promoter)의 제어 하에 있을 수 있다. 적합한 유도성 및 구성적 프로모터의 예가 본원에서 트랜스진과 함께 사용하기에 적합한 조절 요소의 논의에 제공되어 있다. 또 다른 대안에서, 선택된 안정한 숙주 세포는 구성적 프로모터의 제어 하의 선택된 구성요소(들) 및 1개 이상의 유도성 프로모터의 제어 하의 다른 선택된 구성요소(들)를 함유할 수 있다. 예를 들어, 293 세포 (이는 구성적 프로모터의 제어 하의 E1 헬퍼 기능을 함유함)로부터 유래되지만 유도성 프로모터의 제어 하의 rep 단백질 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 또 다른 안정한 숙주 세포가 당업자에 의해 생성될 수 있다.

[0037] 본 발명의 rAAV의 생성에 필요한 발현 카세트, rep 서열, cap 서열 및 헬퍼 기능은, 보유한 서열들을 이전시키는 임의의 유전 요소의 형태로 패키징 숙주 세포에 전달될 수 있다. 선택된 유전 요소는 본원에 기술된 것을 비롯한 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 임의의 실시 양태의 제작에 사용되는 방법은 핵산 조작에 있어서의 숙련자에게 공지되어 있으며, 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다. 이와 유사하게, rAAV 비리온의 생성 방법은 공지되어 있으며, 적합한 방법의 선택은 본 발명을 한정하는 것이 아니다. 예를 들어, 문헌[K. Fisher et al., (1993) J. Virol, 70:520-532] 및 미국 특허 제5,478,745호를 참조한다.

[0038] 달리 특정되지 않으면, AAV ITR, 및 본원에 기술된 다른 선택된 AAV 구성요소는 임의의 AAV 중에서 쉽게 선택될 수 있다. 이러한 ITR 또는 다른 AAV 구성요소는 당업자가 이용가능한 기술을 이용하여 AAV 서열로부터 쉽게 분리될 수 있다. 그러한 AAV는 학술적 소스, 상업적 소스 또는 공공적 소스(예를 들어, 미국 버지니아주 머내서스 소재의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection))로부터 분리되거나 취득될 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 문헌에서 또는 예를 들어 젠뱅크®, 펙메드(PubMed)® 등과 같은 데이터베이스에서 입수가 가능한 바와 같은 공개된 서열을 참고하여 합성 수단 또는 다른 적합한 수단을 통하여 취득될 수 있다.

[0039] A. 발현 카세트

[0040] 발현 카세트는 본원에서 정의된 바와 같다. 게다가, 본원에 기술된 발현 카세트 및/또는 벡터는 추가의 트랜스진 또는 조절 서열을 함유할 수 있다. 발현 카세트는 캡시드 단백질 내에 패키징되며, 선택된 숙주 세포에 전달된다.

[0041] 1. 트랜스진

[0042] 본 발명은 다수의 트랜스진의 사용을 포함할 수 있다. 적합한 트랜스진은 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 트랜스진의 선택은 본 발명을 한정하는 것으로 간주되지 않는다.

[0043] 2. 조절 요소

- [0044] 발현 카세트에 대하여 상기에 확인된 주요 요소에 더하여, 벡터는 본 발명에 의해 생성된 바이러스로 감염되거나 플라스미드 벡터로 형질감염된 세포에서 트랜스진의 전사, 번역 및/또는 발현을 가능케 하는 방식으로 트랜스진에 작동가능하게 연결된 통상적인 제어 요소를 또한 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 서열은 관심대상의 유전자와 연결한 발현 제어 서열 및 관심대상의 유전자를 제어하기 위하여 트랜스로 작용하거나 소정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 모두를 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시 서열, 종결 서열, 프로모터 서열 및 인핸서 서열을 포함하며, 효율적인 RNA 프로세싱(processing) 시그널, 예컨대 스플라이싱(splicing) 및 폴리아데닐화(폴리A) 시그널; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작(Kozak) 콘센서스(consensus) 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 요구될 경우, 코딩된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 천연 프로모터, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 및/또는 조직 특이적 프로모터인 프로모터를 비롯한 다수의 발현 제어 서열이 당업계에 공지되어 있으며, 이용될 수 있다.
- [0045] 구성적 프로모터의 예는, 제한 없이, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus; RSV) LTR 프로모터(선택적으로, RSV 인핸서를 포함함), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV) 프로모터(선택적으로, CMV 인핸서를 포함함)(예를 들어, 문헌[Boshart et al., (1985) Cell, 41:521-530] 참조), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타아제 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나아제(phosphoglycerol kinase; PGK) 프로모터, 및 EF 1 프로모터 [인비트로젠(Invitrogen)]를 포함한다. 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하며, 외부에서 공급된 화합물, 환경 인자, 예컨대 온도, 또는 특정한 생리학적 상태, 예를 들어 급성기의 존재, 세포의 특정한 분화 상태에 의해, 또는 단지 복제 세포에서 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 제한 없이, 인비트로젠, 클론테크(Clontech) 및 아리어드(Ariad)를 비롯한 다양한 상업적 공급처로부터 입수가능하다. 많은 다른 시스템이 기술되었으며, 이는 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 외부에서 공급된 화합물에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연 유도성 양 메탈로티오닌(metallothioneine; MT) 프로모터, 텍사메타손(Dex) 유도성 생쥐 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus; MMTV) 프로모터, T7 폴리머라아제 프로모터 시스템 [국제 특허 공개 WO 98/10088호]; 엑디손 곤충 프로모터(문헌[No et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351]), 테트라사이클린 억제성(tetracycline-repressible) 시스템(문헌[Gossen et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551]), 테트라사이클린 유도성 시스템(문헌[Gossen et al., (1995) Science, 268:1766-1769], 또한 문헌[Harvey et al., (1998) Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518] 참조), RU486 유도성 시스템(문헌[Wang et al., (1997) Nat. Biotech., 15:239-243] 및 문헌[Wang et al., (1997) Gene Ther., 4:432-441]) 및 예를 들어 아리어드로부터 입수가능한 아르젠트(Argent)<sup>TM</sup> 시스템을 포함하는 라파마이신 유도성 시스템(문헌[Magari et al., (1997) J. Clin. Invest., 100:2865-2872])을 포함한다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 다른 유형의 유도성 프로모터로는 특정한 생리학적 상태, 예를 들어 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 단지 복제 세포에서 조절되는 것이 있다.
- [0046] 트랜스진의 또 다른 실시 양태는 조직 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 포함한다. 예를 들어, 골격근에서의 발현이 요구될 경우, 근육에서 활성을 갖는 프로모터가 사용되어야 한다. 이는 골격  $\beta$ -액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀(dystrophin), 테스민, MHC, 근육 크레아틴 키나아제를 코딩하는 유전자 유래의 프로모터와, 천연 발생 프로모터보다 더 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터를 포함한다(문헌[Li et al., (1999) Nat. Biotech., 17:241-245] 참조). 조직 특이적인 프로모터의 예가 CNS/뉴런에 대하여 공지되어 있으며, 이는 특히 예를 들어 뉴런 특이적 엔올라아제(neuron-specific enolase; NSE) 프로모터(문헌[Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15]), 신경필라멘트 경쇄 유전자(문헌[Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5]), 및 뉴런 특이적 vgf 유전자(문헌[Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84])를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 트랜스진에 대한 천연 프로모터가 사용된다. 천연 프로모터는, 트랜스진의 발현이 천연 발현을 모방해야 하는 것이 요구될 때 바람직할 수 있다. 트랜스진의 발현이 일시적으로 또는 발생학적으로(developmentally), 또는 조직 특이적인 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 할 때 천연 프로모터가 사용될 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 다른 천연 발현 제어 요소, 예컨대 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작 콘센서스 서열이 천연 발현의 모방에 또한 사용될 수 있다.
- [0047] 본원에서 참고의 용이함을 위하여 트랜스진, 프로모터/인핸서 및 5' 및 3' AAV ITR의 조합이 발현 카세트로 지칭된다. 본 발명의 교시가 제공되면, 그러한 발현 카세트의 설계는 통상적인 기술에 의지해서 이루어질 수 있다.
- [0048] 3. 발현 카세트의 AAV 패키징 숙주 세포로의 전달
- [0049] 발현 카세트는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어 플라스미드 상에 지니질 수 있으며, 이는 숙주 세포로 전달된다.

본 발명에서 유용한 플라스미드는 플라스미드가 복제, 및 선택적으로, 원핵 세포, 포유류 세포 또는 이들 둘 모두에서의 통합에 적합하도록 엔지니어링될 수 있다. 이러한 플라스미드 (또는 발현 카세트를 갖고 있는 다른 벡터)는 진핵생물 및/또는 원핵생물에서의 발현 카세트의 복제를 가능케 하는 서열 및 이들 시스템에 대한 선발 마커를 함유한다. 선발가능한 마커 또는 리포터(reporter) 유전자는 특히 카나마이신, 제네티신, 하이그로마이신 또는 푸리마이신 내성을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 또한 플라스미드는 압피실린 내성과 같이 박테리아 세포에서 그 벡터의 존재를 시그널링하는 데 사용될 수 있는 특정한 선발가능 리포터 또는 마커 유전자를 함유할 수 있다. 플라스미드의 다른 구성요소는 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 핵 항원을 이용하는 앰플리콘(amplicon) 시스템과 같이, 복제 원점 및 앰플리콘을 포함할 수 있다. 이러한 앰플리콘 시스템, 또는 다른 유사한 앰플리콘 구성요소는 세포에서 고 카피 에피솜 복제를 가능케 한다. 바람직하게는, 발현 카세트를 갖고 있는 분자로 세포를 형질감염시키는데, 여기서 이것은 일시적으로 존재할 수 있다. 대안적으로, 발현 카세트는 염색체로, 또는 에피솜으로서, 숙주 세포의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 발현 카세트는 다수의 카피로, 선택적으로 헤드투헤드(head-to-head), 헤드투테일(head-to-tail) 또는 테일투테일(tail-to-tail) 콘카타머(concatamer)로 존재할 수 있다. 적합한 형질감염 기술은 공지되어 있으며, 발현 카세트를 숙주 세포로 전달하는 데 쉽게 이용될 수 있다.

[0050] 일반적으로, 발현 카세트를 포함하는 벡터를 형질감염에 의해 전달할 때, 벡터는 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 100  $\mu\text{g}$ 의 DNA, 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 DNA에서 약  $1 \times 10^4$ 개의 세포 내지 약  $1 \times 10^{13}$ 개의 세포, 또는 약  $1 \times 10^5$ 개의 세포까지의 양으로 전달된다. 그러나, 숙주 세포에 대한 벡터 DNA의 상대적인 양은, 선택된 벡터, 전달 방법 및 선택된 숙주 세포와 같은 요인을 고려하여 조정될 수 있다.

[0051] B. 패키징 숙주 세포

[0052] 발현 카세트에 더하여, 숙주 세포는 숙주 세포에서의 본 발명의 AAV 캡시드 단백질의 발현을 유도하는 서열 및 발현 카세트에서 발견되는 AAV ITR의 소스와 동일한 소스, 또는 교차 상보 소스의 rep 서열을 함유한다. 또한 패키징 숙주 세포는 본 발명의 rAAV를 패키징하기 위하여 헬퍼 기능을 필요로 한다. 그러한 헬퍼 기능은 당업계에 공지되어 있으며, 본원에서 중복되지 않는다. 이와 유사하게, AAV 캡시드를 갖는 적합한 벡터의 제조 방법이 공지되어 있다 [예를 들어, 미국 특허 공개 제2007/0036760호 참조].

[0053] 본원에 기술된 상기 발현 카세트를 코딩하는 rAAV의 구성물은 생리학적 상용성 담체 중에 현탁될 수 있고, 대상 체에게 투여될 수 있다. 일 실시 양태에서, 담체는 살균 염수 단독이거나, 선택적으로, 임의의 다수의 완충액 (예를 들어, 인산염 완충 염수)을 포함한다. 다른 예시적인 담체는 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 한천, 펙틴, 참깨유, 및 물을 포함한다. 담체의 선택은 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0054] 선택적으로, 본 발명의 조성물은 rAAV 및 담체(들)에 더하여, 다른 통상적인 제약 성분, 예컨대 보존제 또는 화학 안정제를 함유할 수 있다. 일 실시 양태에서, 전달은 정맥내 전달을 통한 것이다. 그러나, 또 다른 투여 경로가 선택될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 투여 경로는 요구될 경우 조합될 수 있다.

[0055] 일 실시 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 rAAV를 함유하는 동결건조된 조성물, 또는 동결건조된 형태의 rAAV의 혼합물을 포함한다. 선택적으로, 1가지 이상의 안정제 또는 보존제가 이 조성물에 존재한다. 적합하게는, 사용을 위하여, 동결건조된 조성물은 적합한 희석제, 예를 들어 살균 염수 또는 완충 염수로 재구성된다.

[0056] 바이러스 벡터의 투여량은 주로 치료되는 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 요인에 의존하며, 따라서 환자들 간에 달라질 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 치료적 유효 투여량은 일반적으로, 수성 현탁제 1 mL당 약  $3 \times 10^9$  내지  $3 \times 10^{13}$ 개의 게놈의 농도의 바이러스 벡터 (입자)를 함유하는 용액 약 0.1 mL 내지 약 100 mL, 또는 약 0.1 mL 내지 약 10 mL, 또는 약 0.1 mL 내지 약 5 mL, 또는 약 0.5 mL 내지 약 1 mL의 범위이다. 또 다른 예시적인 투여량으로는 1 kg당 약  $3 \times 10^9$  내지  $3 \times 10^{13}$ 개의 AAV 게놈이 있다. 1가지의 적합한 체적으로서는 약 1 mL이 있다. 또 다른 실시 양태에서, rAAV 구성물의 치료적 유효 용량은 70 kg의 동물당 약 0.001 ng 내지 약 1000 mg의 범위이며, 이는 단위 투여량으로 또는 일련의 2회 이상의 투약에 걸쳐 전달될 수 있다. 다른 적합한 투여량이 결정될 수 있다. 투여량은 치료 효과와 임의의 부작용과의 밸런스를 맞추기 위하여 조정되며, 그러한 투여량은 제조할 벡터가 이용되는 치료적 응용에 따라 달라질 수 있다.

[0057] 치료 방법

[0058] 본 발명의 조성물은 국소 및 전신 감염과 같은 평생 말초 접근의 합병증 뿐만 아니라 경도 내지 말기 아나필락시스의 범위일 수 있는, 제조할 효소에 대한 면역 반응과 관련된 효소 대체 요법의 합병증을 회피한다. 또한,



ERT와는 대조적으로, 본 발명의 조성물은 장기간의 반복된 매주 주사를 필요로 하지 않는다. 이론에 의해 구해 되고자 함이 없이, 본원에 기술된 간 지향성 치료법(liver-directed therapeutic method)은 높은 형질도입 효율을 갖는 벡터에 의해 제공되는 효율적인 장기간의 유전자 전달을 제공함으로써 MPSI 질환과 연관된 중추신경계 표현형을 바로잡는 데 유용한 것으로 생각되는데, 이는 혈액 뇌 장벽을 가로질러 치료적 영향력을 제공하는 계속적인 상승된 순환 IDUA 수준을 제공할 수 있다. 게다가, AAV 간 유전자 전달은 장기 효소에 대하여 활성 관용을 제공하고 항체 형성을 방지할 수 있다.

[0059] 본원에 기술된 변형 hIDUA 발현 카세트의 치료적 유효량을 전달하는 단계를 포함하는 제I형 점액다당류증의 치료 방법이 제공된다. 또한, 혈터 증후군, 혈터-샤이에 증후군 및 샤이에 증후군의 증상의 치료 및/또는 개선 방법이 제공된다.

[0060] 일 실시 양태에서, rAAV는 정맥내로 전달된다.

[0061] 또 다른 실시 양태에서, rAAV는 약  $3 \times 10^9$  내지 약  $3 \times 10^{12}$ 이 대상체에게 전달되는 양으로 전달된다. rAAV의 단위 투여가 효과적인 것으로 예상되지만, 간은 재생성 기관이기 때문에, 투여는 반복된다 (예를 들어, 연 4회, 연 2회, 연 1회, 또는 달리 필요할 경우). 선택적으로, 치료적 유효량의 처음 용량은 대상체의 연령 및 주입 용인 능력을 고려하여 분할 주입 기간에 걸쳐 전달될 수 있다. 그러나, 전체 치료 용량의 반복된 매주 주사는 필요하지 않으며, 이는 편안함 및 치료 결과 둘 모두의 면에서 환자에게 이점을 제공한다.

[0062] 하기 실시예는 단지 예시적인 것으로서, 본원에 기술된 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0063] 실시예 1 - 트랜스진 및 벡터의 생성

[0064] 기능성 인간  $\alpha$ -L-이두로니다아제를 코딩하는 변형 뉴클레오타이드 서열을 합성하였다. 생성된 서열은 인간 발현에 특히 적합하며, 기능성 인간 IDUA 유전자 (hIDUA; ژ뱅크 NP000194.2)에 대한 동일성이 약 90% 미만이다. 그 후, 생성된 트랜스진을 엔지니어링된 MluI 및 SalI 부위를 이용하여 유펜 벡터 코어(UPenn Vector Core)로부터 입수가능한 AAV 벡터로의 패키징에 필요한 시스(cis) 요소를 함유하는 플라스미드 내에 삽입시켰다. 유전자 발현을 인간 갑상선 결합 글로불린(TBG, 문헌[Hayashi Y, Mori Y, Janssen OE, et al. Human thyroxine-binding globulin gene: complete sequence and transcriptional regulation. Mol Endocrinol 1993; 7: 1049-1060])에 의해 유도하였다. 도 2에 예시한 생성된 플라스미드, pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.nRBG는 간 특이적 TBG 프로모터를 포함하는 발현 제어 서열의 제어 하의 변형 hIDUA 유전자를 함유한다. 이 플라스미드는 AAV2 5' ITR, 알파 mic/bic 인핸서의 탠덤(tandem) 반복부, TBG 프로모터, 프로메가 인트론 서열, 서열 번호 1의 변형 인간 IDUA 유전자, 토끼 글로빈 폴리 A, 및 AAV2 - 3' ITR을 추가로 함유한다.

[0065] 본질적으로 문헌[Lock et al., Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. Hum Gene Ther 21(10): 1259-1271. (2010)]에 기술된 바와 같이 대규모 벡터 제조를 행하였다. PEI 기반의 형질감염을 HEK293 세포의 75% 융합 단층을 함유하는 10개 층 세포 적층체에 서 수행하였다. 상기 세포 적층체로부터의 공급원료 배양 배지 10 L를 청정시키고, 그 후 접선 유동 여과(tangential flow filtration)에 의해 농축시켰다. 상기 농축 청정 공급원료를 요오덱사놀 (옵티프렙 (Optiprep); 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 케미칼 컴퍼니(Sigma Chemical Co.)) 구배로 정제하였다. 가시적 오염 단백질 밴드 바로 아래의 모든 분획물을 수집하고 풀링하였다(pooled). 풀링된 분획물을 PBS/35 mM NaCl에 대하여 투석여과하고, 아미콘 울트라(Amicon Ultra) 15 스핀 농축기 (밀리포어(Millipore))를 사용하여 농축시켰다. 글리세롤을 상기 투석여과 농축 생성물에 최종 5%가 되도록 첨가하고, 상기 체제를 분취하고, -80°C에서 보관하였다. 생성된 벡터를 본원에서 AAV8.TBG.hIDUA 또는 AAV2/8.TBG.hIDUA로 칭한다. 특정 위치에서, 제조할 AAV 입자를 AAV8.TBG.hIDUAco 또는 AAV2/8.TBG.hIDUAco로 지칭한다. 상기 플라스미드는 AAV2 5' ITR, 알파 mic/bic 인핸서의 탠덤 반복부, TBG 프로모터, 프로메가 인트론 서열, 서열 번호 1의 변형 인간 IDUA 유전자, 토끼 글로빈 폴리 A, 및 AAV2 - 3' ITR을 추가로 함유한다.

[0066] 실시예 2 -

[0067] A. 세포 기반 검정법

[0068] HEK 293 세포는 5% 소 태아 혈청(FBS; XXX), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (p/s: 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies)™)을 포함하는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; 킵코(Gibco)®, 라이프 테크놀로지즈™)를 함유하는 성장 배지에서 유지시켰다. 제조업자의 권고에 따라 리포펙타민(Lipofectamine)™ 2000 (인비트로젠™, 라이프 테크놀로지즈™)을 사용하여 플라스미드 DNA 형질감염을 실시하

였다. 간략하게는, 세포를 형질감염용 배지 (DMEM + 5% FBS, p/s 없음)에서 6웰 조직 배양 디쉬(dish)에서 5 x 10<sup>5</sup>개의 세포/웰의 밀도로 도달하고, 5% CO<sub>2</sub>에서 37° 에서 하룻밤 부착시켰다. 그 다음날에, 세포를 90 내지 95% 융합도에 대하여 점검하고, 배지를 새롭게 하였다. 플라스미드 DNA 및 리포펙타민™ 2000을 1:2.5 (DNA:리포펙타민™ 2000)의 최종 비를 위하여 옵티-MEM(Opti-MEM) I<sup>®</sup> 혈청 감소 배지 (혈청을 포함하지 않음)로 희석시켰다. 리포펙타민™ 2000 형질감염용 용액을 22℃에서 5분 동안 인큐베이션한 후 상기 DNA 용액과 혼합하였다. 상기 DNA:리포펙타민™ 2000 용액을 함유하는 이러한 최종 형질감염 혼합물을 추가로 20분 동안 (22℃) 인큐베이션한 후 세포 및 배지를 포함하는 웰에 첨가하였다. 모의 세포(mock cell)는 플라스미드 DNA를 받지 않았으며, eGFP를 코딩하는 플라스미드를 형질감염 대조구로서 사용하였다. 시험한 각각의 구성물에 대하여 3개의 웰을 형질감염시켰다. 세포를 5% CO<sub>2</sub>에서 37° 에서 인큐베이션하고, 4시간 후에 배지를 성장 배지로 교체하였다. 각각의 웰의 내용물을 72시간 후에 수확하고, 4℃에서 4000 rpm에서 15분 동안 수집하였다. 세포를 웰당 100  $\mu$ l의 용해 완충액 (0.2%의 트리톤(Triton) X-100, 0.9% NaCl, pH4.0)에 재현탁시키고, 와동시키면서 3회 냉동/해동시켰다. 게다가, 용해물을 37℃에서 30분 동안 벤조나아제(Benzonase)로 처리한 후 최종적으로 냉동/해동시켰다. 세포 잔사를 10 000 rpm (4℃)에서 10분 동안 펠렛화하고(pelleted), 최종 청정 세포 용해물을 얼음 상에 두고, 효소 활성화에 대하여 즉시 검정하였다.

[0069] B. 조직 용해 및 단백질 추출

[0070] 냉동된 조직을 드라이아이스 베드(bed) 상의 박스에서 반해동시키고(semi-thawed), 습성 조직의 작은 조각을 작은 페트리 디쉬(petri dish)에서 절단하였다 (대략 20 mg, 대략 10 mg의 비장). 그 후, 상기 사전 프로세싱된(pre-processed) 조직을 5 mm 강철 비드 및 1 ml 용해 완충액 (0.2% 트리톤 X-100, 0.9% NaCl, pH 4.0)을 이용하여 2 ml 에펜도르프(ependorph)에서 함침시켰다. 샘플을 조직 분쇄기(tissue-lyzer)에서 30 Hz에서 2분 동안 균질화하였다. 균질화된 샘플을 6000 rpm에서 30초 동안 잠시 스핀시키고, 5 mm 강철 비드를 제거하였다. 조직 용해물을 추가로 1-1/16" 직경의 마이크로혼(microhorn)을 사용하여 초음파 처리함으로써 파쇄시키고 -80℃에서 하룻밤 냉동시켰다. 프로세싱된 샘플을 그 다음날에 22℃에서 해동시키고, 원심분리 (10 000 rpm/10분/4℃)에 의해 청정시켰다. 부유성의 뇌 유래 지질 층, 또는 기타 지방 조직을 검정 전에 흡인하였다. 그 후 샘플을 습성 얼음 상에서 보관하고, 효소 활성화에 대하여 즉시 검정하였다.

[0071] C. 단백질 평가

[0072] 전체 단백질을 제조업자의 프로토콜에 따라 쿠마시 기반의 브래드포드 검정법(Coomassie based Bradford assay; 서모 사이언티픽(Thermo Scientific))을 이용하여 평가하였다. 간략하게는, 1 내지 25  $\mu$ g/ml의 작동 범위(working range)를 생성하는 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA), 및 BSA를 포함하지 않는 단백질 희석 완충액을 설명하는 블랭크(blank)를 사용하여 표준 곡선을 셋업하였다(set up). 샘플을 1/300 내지 1/1200으로 2배 희석시키고, 96웰 편평 바닥 디쉬에서 1:1의 희석 단백질:브래드포드 시약의 비로 혼합하였다. 샘플을 22℃에서 15분 동안 평형시키고, 흡광도 값을 595 nm의 제안된 파장에서 플레이트 판독기에 수집하였다. 원시 값은 블랭크 보정을 이용하여 표준 곡선을 사용하여  $\mu$ g/ml 농도로 환산하였다. 그 후, 마이크로그램의 양을 환산하여 밀리그램 단위로 보고하였다.

[0073] D. 효소 활성화 검정

[0074] 이전에 공개된 방법 (문헌[Kakkis et al., Mol Genet Metab, 2001 Mar; 72(3): 199-208])에 따라 4-메틸옵렐리페릴 알파-L-이도피라노시딘론산, 시클로헥실암모늄염 (4-MU-이도(Ido); 토론토 리서치 케미칼즈, 인크.(Toronto Research Chemicals, Inc.))을 기질로서 이용하여 IDUA 효소 활성을 검정하였다. 간략하게는, 5 내지 15  $\mu$ l의 용해물, 또는 혈청을 이중 증류수(ddH<sub>2</sub>O)를 이용하여 100  $\mu$ l까지 되게 하고, 반응 완충액 (0.1 M 아세트산나트륨 - pH 3.5 - , 0.15 M NaCl, 0.05% 트리톤 X-100)으로 희석시킨 100  $\mu$  M 4-MU-이도 기질 100  $\mu$ l를 메틸아크릴레이트 큐벳 (서모 사이언티픽)에서 합하였다. 반응물을 37℃ 수조에서 1 내지 3시간 동안 인큐베이션하고, 1x 중지 완충액 (290 mM 글리신, 180 mM 탄산나트륨, pH 10.5)의 첨가에 의해 반응을 종료하였다. 생성물을 UV 채널 (흡광: 365 nm, 발광: 440 내지 470 nm)을 통하여 퀀티플루오르(Quant iFluor)<sup>TM</sup>-ST (프로메가)에서 판독하였다. 원시 형광 값을 기록하고, 공지된 양의 4-메틸옵렐리페론 (M-5410; 바이오신스(Biosynth)<sup>®</sup>)의 표준 곡선을 이용하여 nmol/ml/hr로 환산하였다. 세포 및 조직 용해물을 개산 단백질 값 (nmol/mg/hr; 표제가 "단백질의 평가"인 방법 섹션을 참조)으로 정규화하였다.

[0075] E. DNA 추출 및 계층 카피 분석



- [0076] 이배체 세포에서 벡터 DNA 로드를 결정하기 위하여 탁맨(Taqman) PCR을 이용하였다. 실시간 PCR에 의한 벡터 게놈의 검출 및 정량화를 위하여, 퀴아엠프 DNA 미니 키트(QIAamp DNA Mini Kit) (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 전체 세포 DNA를 조직으로부터 추출하였다. 프라이머 및 프로브 세트는 하기 서열을 이용하여 벡터의 nRBG 폴리A 영역을 표적화하도록 설계하였다: 정방향 프라이머: GCCAAAAATTATGGGGACAT, 역방향 프라이머: ATTCCAACACACTATTGCAATG, 프로브: 6FAM- ATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCT-TAMRA. 벡터 게놈 정량화를 위한 표준 곡선을 상응하는 벡터의 생성에 사용한 시스 플라스미드를 이용하여 확립하였다. 주형으로서 200 ng의 전체 세포 DNA, 각각 300 nM의 프라이머 및 200 nM의 프로브를 포함하는 탁맨 범용 PCR 마스터 믹스(TaqMan Universal PCR Master Mix) (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 이용하여 PCR을 수행하였다. 사이클은 50℃, 2분; 95℃, 10분; 95℃, 15초, 40 사이클; 및 60℃, 1분이었다.
- [0077] F. 면역블로팅(immunoblotting)
- [0078] 표준 방법에 따라 면역블로팅을 수행하였다. 간략하게는, NuPAGE 젤 시스템 (라이프 테크놀로지스), 4 내지 12% 비스-트리스 겔을 사용하였다. 20 V에서 30분 후에 PVDF 막으로 이전되었다. 블로킹은 T-PBS 중 10% NFDM이었다 (하룻밤). 일차 MAb는 1:300의 생쥐 항-인간 IDUA (1.5시간)이었음; T-PBS 중 1% NFDM. 이차: 1:3000의 HRP-결합 토끼 항-생쥐; T-PBS 중 1% NFDM. 검출은 수퍼시그널 웨스트 듀라 화학발광 기질(SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate) (서모 사이언티픽), x선 필름 상에서의 30초 노출에 의한 것이었다.
- [0079] 실시예 3 - 생쥐 및 개에서의 생체내(in vivo) 연구
- [0080] IDUA 결함을 개에서 발견할 수 있으며, 이는 대동물에서의 상기 질환 및 치료법의 연구를 허용한다. MPS I 개는 IDUA 유전자 내에 열성 (널(null)) 돌연변이를 갖고 있으며, 여기서, 인트론 1의 공여 스플라이스 부위(donor splice site)에서의 G>A 돌연변이는 엑손-인트론 접합부에서 조기 종결 코돈을 생성한다 (문헌[Menon, K.P., P.T. Tieu, and E.F. Neufeld, Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. Genomics, 1992. 14(3): p. 763-8.]). 개에서의 질환 경과와 혈러-샤이에 증후군과 유사하며; 질병 소견은 흉부 변형을 포함하는 중대한 골격 질환을 포함한다.
- [0081] 소변중 GAG의 분석은 임상 환경에서 MPS I의 치료제의 효능을 결정하는 데 사용되는 생화학적 마커이다.
- [0082] 글리코사미노글리칸(GAG)의 축적을 파라핀 절편의 알시안 블루(Alcian Blue) (pH 1) 염색에 의해 주요 기관에서 평가하였다. 세포 내에서의 비프로세싱된 GAG의 축적은 톨루이딘 블루(Toluidine Blue)로 염색된 플라스틱 매립된 조직으로부터의 1 μm의 얇은 절편에서 특히 잘 가시화된다. 에폰 매립된 조직의 얇은 절편 (1 μm)을 톨루이딘 블루로 염색하였다. 이는 저장 물질을 함유하는 세포 ("포말 해면 세포")를 나타낸다.
- [0083] 뇌에서 강글리오시드 GM3에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학적 방법을 수행하였다. 이는 뉴런에서의 GM3의 비정상적인 저장을 나타낸다. 피질을 개에서 평가하고 피질 및 시상하부를 생쥐에서 평가하였다. 간에서의 인간 IDUA의 발현을 면역형광에 의해 평가하였다.
- [0084] A. 생쥐 연구
- [0085] 실시예 1에 설명한 바와 같이 AAV8.TBG.modified hIDUA를 제조하였다. 생쥐 (약 3개월령)는 약  $1 \times 10^{11}$  GC,  $3 \times 10^{10}$  GC,  $3 \times 10^9$  GC,  $1 \times 10^9$  GC의 용량으로 정맥내 주사하고, 주사한지 대략 2주 후에 평가하였다.
- [0086] 그 결과는,  $1 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{10}$ , 및  $3 \times 10^9$ 으로 투약한 동물에서 GAG 염색의 감소 또는 완전한 부재를 나타냈다. 이들 동물에서, 저장 병변의 감소 또는 완전한 부재가 얇은 절편에서 관찰되었다.
- [0087]  $1 \times 10^9$ 으로 투약된 동물에서 GAG 저장은 비처리 생쥐에서와 같이 다소 보이며 저장 병변이 비처리 생쥐에서와 같이 다소 보인다.
- [0088] GM3 저장에 있어서,  $1 \times 10^{11}$  GC 및  $3 \times 10^{10}$  GC로 투약된 동물만을 평가하였으며, 뉴런에서의 GM3 저장의 매우 약한 개선이 관찰되었다.
- [0089] IDUA의 강한 발현 (100%의 간세포)이  $1 \times 10^{11}$  GC로 투약된 동물에서 관찰되었다. 이는 더 낮은 용량에 의해 감소하며, 이때 단지 매우 약간의 양성 간세포가  $1 \times 10^9$  GC에서 보인다.

- [0090] B. 개 연구
- [0091] 실시예 1에서 설명한 바와 같이 AAV8.TBG.modified hIDUA를 제조하였다. 개 (약 8개월령)는  $1 \times 10^{11}$  GC의 용량으로 정맥내 주사하고, 주사 후 4개월 후에 (즉, 1년령) 평가하였다.
- [0092] 이 연구는 저장 병변의 역전을 나타낸다. 더욱 특히는, 모든 주요 기관에서의 GAG 저장의 사실상 완전한 제거가 알시안 블루 염색에 의해 보여진다. 저장 병변은 심장, 신장 또는 간의 얇은 절편에서 전혀 관찰되지 않는다. GM3 축적의 감소 또는 완전한 제거가 뉴런에서 관찰된다. 간에서의 IDUA의 발현이 95% 초과인 간세포에서 면역형광에 의해 관찰된다.
- [0093] 실시예 4 - AAV2/8.TBG.hIDUA를 이용한 혈러-샤이에의 치료
- [0094] IDUA의 AAV8 매개 유전자 전달을 혈러-샤이에 환자에서 평가한다. 대상체는 말초 정맥 내로의 벡터의 단회 주입을 받는데, 이는 전임상 데이터를 기반으로 하여 정상 대상체에서 수득되는 것과 가까운 수준으로 상기 효소를 안정하게 생성하여야 한다. 상기 실험은 상이한 용량의 벡터, 예를 들어  $3 \times 10^{11}$  GC/kg;  $1 \times 10^{12}$  GC/kg;  $3 \times 10^{12}$  GC/kg을 포함할 수 있으며, 용량 범위를 첨가한다. 효능의 가장 비침습적인 평가는 상기 질환에서 상승하고 ERT 후에 부분적으로 바로잡아지는 소변중 GAG의 수준이다. 트랜스진의 접목(engraftment) 및 그의 발현 수준은 혈청중 IDUA의 측정에 의해 결정된다. 소변중 GAG를 유전자 요법 전 및 유전자 요법 후에 또한 측정한다.
- [0095] (서열목록 자유텍스트)

[0096] 식별 기호 <223> 하의 자유텍스트를 포함하는 서열에 대한 하기 정보가 제공된다.

서열 번호 (자유텍스트를 포함함)	<223> 하의 자유텍스트
서열 번호 3	<220> <221> repeat_region <222> (1)..(130) <223> 5' ITR  <220> <221> enhancer <222> (221)..(320) <223> Alpha mic/bik  <220> <221> enhancer <222> (327)..(426) <223> Alpha mic/bik  <220> <221> promoter <222> (442)..(901) <223> TBG promoter  <220> <221> TATA_signal <222> (885)..(888)  <220> <221> Intron <222> (1027)..(1159) <223> intron 1  <220> <221> CDS <222> (1251)..(3212) <223> human alpha-L-IDUE  <220> <221> polyA_signal <222> (3261)..(3387)  <220> <221> repeat_region <222> (3476)..(3605) <223> 3' ITR (located on complement)  <220> <221> rep_origin

[0097]

서열 번호 (자유텍스트를 포함함)	<223> 하의 자유텍스트
	<222> (3782)..(4220) <223> f1\ori (located on complement)  <220> <221> rep_origin <222> (4249)..(4891) <223> pUC\origin of replication\  <220> <221> misc_feature <222> (5566)..(6381) <223> kanamycin resistance located on complementary strand

[0098]

[0099]

"Z6622PCT\_ST25.txt"로 라벨링된 서열 목록은 전자 형태로 본 출원과 함께 출원되어 있으며; 이 서열 목록은 본원에 참고로 포함된다. 2013년 3월 15일자로 출원된 우선권 주장 출원 미국 특허 출원 제61/788,724호를 비롯하여 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 지시되는 것처럼 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 전술한 발명은 예시로서 그리고 이해의 명확함을 위한 예로서 약간 상세하게 기술되었지만, 본 발명의 교시를 고려하면 첨부된 청구범위의 사상 또는 범주로부터 벗어나지 않고서도 특정한 변화 및 변경이 본 발명에 대하여 이루어질 수 있음이 당업자에게 쉽게 자명해질 것이다.

도면

도면1a

pENN.AAV.TBG.PI. 6863 bp DNA 원형

특징	위치/정성자(qualifier)
misc_structure	complement(5566..6381) /vntifkey="88" /label=Kan-r
rep_origin	4249..4891 /vntifkey="33" /label=pUC\origin\of\replication
promoter	442..901 /vntifkey="29" /label=TBG
TATA_signal	885..888 /vntifkey="41" /label=TATA
enhancer	221..320 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
enhancer	327..426 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
intron	1027..1159 /vntifkey="15" /label=Intron_1 /note="chimeric intron"
polyA_signal	3261..3387 /vntifkey="25" /label=Rabbit\globin\poly\A
repeat_region	1..130 /vntifkey="34" /label=5'\ITR
repeat_region	complement(3476..3605) /vntifkey="34" /label=3'\ITR
rep_origin	complement(3782..4220) /vntifkey="33" /label=f1\ori
CDS	1251..3212 /vntifkey="4" /label=Human\alpha-L-IDUA

도면 1b

염기 카운트(count) 1584 a 1971 c 1702 g 1606 t  
기원

```

1 ctgcgcgcctc gctcgcctcac tgagggccgcc cgggcaaagc ccggggcgctcg ggcgaaccttt
61 ggtcgccccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggtgccaa ctccatcact
121 aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg
181 atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca
241 gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataaat
301 ctccaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtc aagttccaa
361 tggcccttgg cagcattttac tctctctgtt tgctctgggt aataatctca ggagcacaaa
421 cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg acatcatttc cctcgcgaa
481 gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaa
541 ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagttag aactttttcc
601 tgctgcctct tgggtgctttt gctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc
661 agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag
721 ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcattttttg ctttgttcct
781 cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataaccatc ccagggttaa tgctgggggt
841 aatttataac taagagtgcct ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga
901 tgttgctttc tgagagacag ctttattgct gtagttttatc acagttaa at tgctaaccga
961 gtccagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgggtc gtgaggcact
1021 gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg
1081 tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctt ttgggtcttac tgacatccac
1141 tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt
1201 acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atgcggcccc
1261 tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagtct gctggctgcc cctcctgtgg
1321 cccctgccga agccctctac ctgggtgatg tggatgccgc cagagccctg tggcctctgc
1381 ggagattctg cgggagcacc ggcttttgcc ccccaactgc tcacagccag gccgaccagt
1441 acgtgctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctacgt gggcgccgtg cccacagag
1501 gcatcaaaaca ggtgagaacc cactggctgc tggaaactgt gacaaccggg ggctccaccg
1561 gcagaggcct gagctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg ctgagagaga
1621 accagctgct gcccggcttc gagctgatgg gcagcgccag cggccacttc accgacttcg
1681 aggacaagca gcaagtcttt gagtgggaagg acctggtgtc cagcctggcc agacggtaca
1741 tcggcagata cggactggcc cactgttcca agtggaactt cgagacatgg aacgagcccg
1801 accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac tactacgacg
1861 cctgctccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actggggcga cccggcgata
1921 gcttccacac cccccccaga agccccctga gctggggcct gctgagacac tgccacgacg
1981 gcaccaattt cttcacccgc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc ctgcaccgga
2041 agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgcc cagcagatcc
2101 ggcagctggt ccccaagttc gccgacaccc ccatctacaa cgacgaggcc gacccccctg
2161 tgggatggtc actgcctcag ccttgagag cgcagctgac ctacgcccgt atgggtgtga
2221 aagtgtatcg ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgcc ttccttacg
2281 cctgctgag caacgacaac gccttctctg gctaccaccc ccaccccttc gccagagaa
2341 cctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagaccccc ccacgtgcag ctgctgagaa
2401 agcccgctgt gaccgctatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaaacag ctgtgggccc
2461 aagtgtccca ggccggcacc gtgctggaca gcaatcatac agtgggcgtg ctggcctccg
2521 cccacagacc tcagggaccc gccgatgctt ggcgggctgc cgtgctgac tacgccagcg
2581 acgataccag agccaccccc aacagatccg tggccgtgac cctgcggctg agaggcgtgc
2641 caccagcccc tggactgggt tacgtgacca gatacctgga caacggcctg tcagcccccg
2701 acggcgaaat gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgccgagcag ttcggcgga
2761 tgagagccgc tgaggatcct gtggctgctg cccctagacc tctgcctgct ggcggcagac

```



도면1c

```

2821 tgaccctgag gcccgctctg agaetgccta gtctgtctgt ggtgcaegtg tgcgccaggg
2881 ccgagaagcc tcccgccag gtgacaagac tgagagccct gcccttgacc cagggccagc
2941 tgggtgctggt gtggtccgat gagcacgtgg gcagcaagtg cctgtggacc tacgagatcc
3001 agttcagcca ggacggcaag gcctacaccc ccgtgtcccg gaagcccagc accttcaacc
3061 tgttcgtggt cagccccgat acaggcgccg tgtccggtct ttatagagtg cgggcccttg
3121 actactgggc cagacccggc cctttcagcg acccgtgccc ctacctggaa gtgccctg
3181 ctagaggccc cccctagccc ggcaaccctt gagtgcagcc ggccggccctc gaggacgggg
3241 tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttt cctctgccc aaattatggg gacatcatga
3301 agcccttga gcatctgact tctggcta ataaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt
3361 gttggaattt tttgtgtctc tcaactcgaa gcaattcggt gatctgaatt tcgaccaccc
3421 ataataccca ttaccctggt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa
3481 cccctagtga tggagtggc cactccctct ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg
3541 cgaccaaagg tcgcccagc cccgggcttt gccggggcgg cctcagttag cgagcgagcg
3601 cgcagcctta attaacctaa ttcactggcc gtgcttttac aacgtcgtga ctgggaaaac
3661 cctggcgctta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttgcgcag ctggcgtaat
3721 agcgaagagg cccgcaccca tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgatgg
3781 gacgcgccct gtacggcgcc attaaagcgg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc
3841 gctacacttg ccagccgctt ccgttgcgtt cctttcgttc tcttcccttc ctttctcgcc
3901 acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt
3961 agtgctttac ggcacctgca ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc acgtagtggg
4021 ccatcgccgt gatagcgggt ttttcgccc ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt
4081 ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct cggctctatc ttttgattta
4141 taagggtatt tgccgatttc ggccctattg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaaatt
4201 aacgcgaatt ttaacaaaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa
4261 aaggcccgct tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat
4321 cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
4381 cctggaagct cctcgtgccc ctctcctggt ccgacctgac cgcttaccgg atacctgtcc
4441 gcctttctcc cttcggaagg cgtggcgctt tctcatagct cagcgtgtag gtatctcagt
4501 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac
4561 cgtcgccct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgaactatcg
4621 ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca
4681 gaggttcttg agtggtggcc taactacggc taaactagaa gaacagttat tggtatctgc
4741 gctctgtctg agccagttac cttcggaaaa agagtgtgta gctcttgatc cggcaaaaca
4801 accaccgctg gtacgggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa
4861 ggatctcaag aagatccctt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac
4921 tcacgttaag ggtttttgtt catgagatta tcaaaaaagg tcttcacctg gatccttttg
4981 atcctccggc gttcagcctg tgccacagcc gacaggatgg tgaccaccat ttgcccata
5041 tcaccgctcg tactgatccc gtcgtcaata aaccgaaccg ctacaccctg agcatcaaac
5101 tcttttatca gttggatcat gtcggcggtg tcggcgccaa gacggtcgag cttottcacc
5161 agaatgacat caccctcttc caccctcacc ctcagcaaat ccagcccttc ccgatctgtt
5221 gaactgcggc atgcttctgc ggtaaagatg cgttagctt ttaccctgac atctttgagc
5281 gctgaggtct gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga atcgcccat
5341 catccagcca gaaagttagg gagccacggg tgatgagagc tttgttgtag gtggaccagt
5401 tgggtatttt gaacttttgc tttgccacgg aacggtctgc gttgtcgga agatgctga
5461 tctgatcctt caactcagca aaagtctgat ttattcaaca aagcgcgcgt cccgtcaagt
5521 cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcacc
5581 gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa
5641 aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc

```

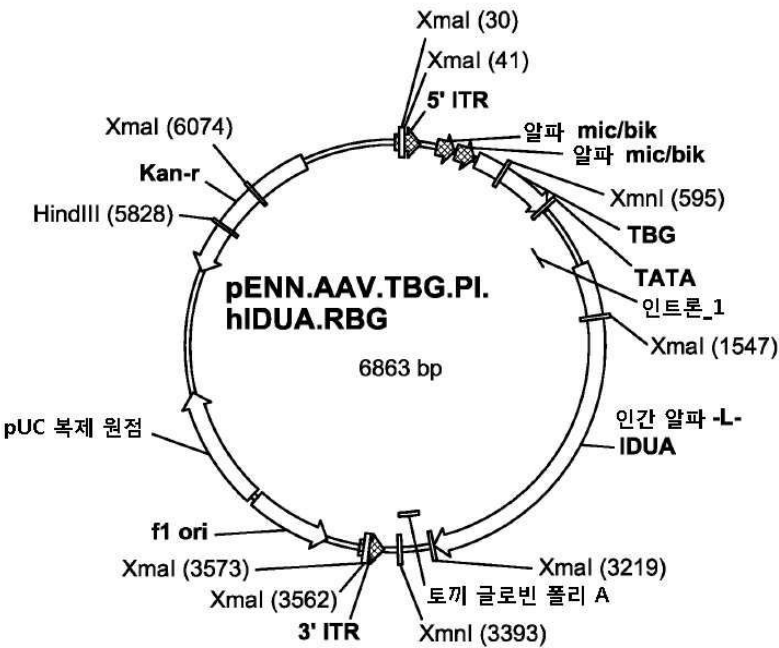
도면1d

```

5701 ctgggtatcg tctgcgattc cgaactcgcc aacatcaata caacctatta atttccctc
5761 gtcaaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa
5821 tggcaaaagc ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctogtc
5881 atcaaaaatca ctcgcatcaa ccaaaccgtt attcattcgt gattgcccct gagcgagacg
5941 aaatacgcga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgagc
6001 gaacactgccc agcgcaccaa caatatcttc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg
6061 gaatgctgtt ttcccgggga tcgcagtggt gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat
6121 aaaatgcttg atggtcgga gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc
6181 atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcatc
6241 gggcttccca tacaatcgat agattgtgccc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca
6301 tttataccca tataaatcag catccatgtt ggaatttaat cgcggcctcg agcaagacgt
6361 ttcccggttg atatggctca taacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt
6421 tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac
6481 catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagt
6541 agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgagc gagtcaagtga gcgagggaagc
6601 ggaagagcgc ccaatacgcg aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgagc
6661 ctggcacgac aggtttcccg actggaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag
6721 ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg
6781 tgggaattgt agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacctag attacgccag
6841 atttaattaa ggccttaatt agg

```

도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Compositions and Methods for Treating MPS1

<130> UPN-Z6622PCT

<140> PCT/US2014/025509

<141> 2014-03-13

<150> 61/788724

<151> 2013-03-15

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1971

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcggcccc tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagtct gctggctgcc 60

cctctgtggt cccctgccga agccccctac ctggtgcatg tggatgccgc cagagccctg 120

tggcctctgc ggagattctg gcgagacc ggcctttgcc cccactgcc tcacagccag 180  
  
 gccgaccagt acgtgctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctacgt gggcgccgtg 240  
 cccacagag gcatcaaaca ggtgagaacc cactggctgc tggaaactggt gacaacccgg 300  
 ggctccaccg gcagaggcct gagctacaac ttcaccacc tggacggcta cctggacctg 360  
 ctgagagaga accagctgct gcccggcttc gagctgatgg gcagcgccag cggccacttc 420  
 accgacttcg aggacaagca gcaagtcttt gagggaagg acctgggtgc cagcctggcc 480  
 agacgttaca tggcagata cggactggcc cagctgtcca agtggaaactt cgagacatgg 540  
 aacgagcccg accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac 600  
  
 tactacgacg cctgctccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actgggcgga 660  
 cccggcgata gcttccacac cccccccaga agccccctga gctggggcct gctgagacac 720  
 tgccacgacg gcaccaatit cttcaccggc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc 780  
 ctgcaccgga agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgcc 840  
 cagcagatcc ggcagctgtt cccaagtgc gccgacaccc ccatctacaa cgacgagggc 900  
 gacccccctgg tgggatggtc actgcctcag ccttggagag ccgacgtgac ctacgccgt 960  
 atggtggtga aagtgatcgc ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgcc 1020  
  
 ttcccttacg cctgctgag caacgacaac gccttctga gctaccaccc ccaccccttc 1080  
 gccagagaa cctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagaccccc ccacgtgcag 1140  
 ctgctgagaa agcccgtgct gaccgctatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaacag 1200  
 ctgtgggccc aagtgtccca ggccggcacc gtgctggaca gcaatcatac agtgggcgtg 1260  
 ctggcctccg cccacagacc tcagggaccc gccgatgctt ggccgggtgc cgtgctgac 1320  
 tacgccagcg acgataccag agcccccccc aacagatccg tggccgtgac cctgcggctg 1380  
 agaggcgtgc caccaggccc tggactggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg 1440  
  
 tcagaccccc acggcgaatg gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgccgagcag 1500  
 ttccggcgga tgagagccgc tgaggatcct gtggctgctg ccctagacc tetgctgct 1560  
 ggccgagac tgacctgag gcccgctctg agactgccta gtctgctgct ggtgcacgtg 1620  
 tgcgccaggc ccgagaagcc tcccggccag gtgacaagac tgagagccct gccctgacc 1680  
 cagggccagc tgggtgctgt gtgggccgat gacacgtgg gcagcaagt cctgtggacc 1740  
 tacgagatcc agttcagcca ggacggcaag gcctacaccc ccgtgtcccg gaagcccagc 1800  
 accttcaacc tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgtccggctc ttatagagt 1860  
  
 cgggccctgg actactgggc cagacccggc cctttcagcg acccctgcc ctacctgaa 1920

gtgcccggtgc cttagaggccc ccctagcccc ggcaaccctt gactcgaccc g 1971

<210> 2

<211> 653

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
 210 215 220  
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
  
 225 230 235 240  
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
 245 250 255  
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
 260 265 270  
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
 275 280 285  
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
  
 290 295 300  
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
 325 330 335  
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
 340 345 350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
  
 355 360 365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
 370 375 380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385 390 395 400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
 405 410 415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
  
 420 425 430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
 435 440 445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460  
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
465 470 475 480  
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495  
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
500 505 510  
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
515 520 525  
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
530 535 540  
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr

545 550 555 560  
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
565 570 575  
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
580 585 590  
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
595 600 605  
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620  
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
625 630 635 640  
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650  
<210> 3  
<211> 6863  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220><223> Synthetic (plasmid carrying hIDUA)  
<220><221> repeat\_region  
<222> (1)..(130)



```

<223> 5' ITR
<220><221> enhancer
<222>
> (221)..(320)
<223> Alpha mic/bik
<220><221> enhancer
<222> (327)..(426)
<223> Alpha mic/bik
<220><221> promoter
<222> (442)..(901)
<223> TBG promoter
<220><221> TATA_signal
<222> (885)..(888)
<220><221> Intron
<222> (1027)..(1159)
<223> intron 1
<220><221> CDS
<222> (1251)..(3212)
<223> human alpha-L-IDUE
<220><221> polyA_signal
<222> (3261)..(3387)
<220><221> repeat_region
<222> (3476)..(3605)
<223> 3' ITR (located on complement)
<220><221> rep_origin

<222> (3782)..(4220)
<223> flWori (located on complement)
<220><221> rep_origin
<222> (4249)..(4891)
<223> pUCWorigin of replicationW
<220><221> misc_feature
<222> (5566)..(6381)
<223> kanamycin resistance located on complementary strand
<400> 3

```

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cgggcgctcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctccatcact	120
aggggttccct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga aciatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt taaaaagca	240
gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataat	300
ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtc aaagtccaag	360
tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctgggt aataatctca ggagcacaaa	420
cattccagat cggcgcgccc agggctggaa gctaccttg acatcatttc ctctgcgaat	480
gcatgtataa ttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc tttgtacaa	540
ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagttag aactttttcc	600
tgctgctctt tgggtgcttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc	660
agcatggact taaaccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag	720
ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcattttttg ctttgttccct	780
cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctgggggtt	840
aatttataac taagagtgtc ctagtcttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga	900
tgttgctttc tgagagacag ctttattgcg gtagtttata acagttaaat tgctaacgca	960
gtcagtgtct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgggtc gtgaggcact	1020
gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gttaaggag accaatagaa actgggcttg	1080
tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac	1140
tttgcccttc tctccacagg tgctcactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt	1200
acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atg cgg	1256
Met Arg	
1	
ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt ctg ctg	1304
Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu	
5 10 15	
gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg cat gtg	1352
Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val	
20 25 30	
gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg agc acc	1400
Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr	

35	40	45	50	
ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac gtg ctg				1448
Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu				
55	60	65		
agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc gcc gtg ccc cac				1496
Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His				
70	75	80		
aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg gtg aca				1544
Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr				
85	90	95		
acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac ttc acc cac ctg				1592
Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu				
100	105	110		
gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc ggc ttc				1640
Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe				
115	120	125	130	
gag ctg atg ggc agc gcc agc ggc cac ttc acc gac ttc gag gac aag				1688
Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys				
135	140	145		
cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc ctg gcc aga cgg				1736
Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg				
150	155	160		
tac atc ggc aga tac gga ctg gcc cac gtg tcc aag tgg aac ttc gag				1784
Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu				
165	170	175		
aca tgg aac gag ccc gac cac cac gac ttc gac aac gtg tca atg acc				1832
Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr				
180	185	190		
atg cag ggc ttt ctg aac tac tac gac gcc tgc tcc gag ggc ctg aga				1880

Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg  
195                      200                      205                      210  
gcc gcc agt cct gcc ctg aga ctg ggc gga ccc ggc gat agc ttc cac                      1928  
Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His  
                                 215                      220                      225  
acc ccc ccc aga agc ccc ctg agc tgg ggc ctg ctg aga cac tgc cac                      1976  
Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His  
  
                                 230                      235                      240  
gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc gag gcc ggc gtg cgg ctg gac tac                      2024  
Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr  
                                 245                      250                      255  
atc agc ctg cac cgg aag ggc gcc aga agc agc atc agc atc ctg gaa                      2072  
Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu  
                                 260                      265                      270  
  
cag gaa aag gtc gtc gcc cag cag atc cgg cag ctg ttc ccc aag ttc                      2120  
Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe  
275                      280                      285                      290  
gcc gac acc ccc atc tac aac gac gag gcc gac ccc ctg gtg gga tgg                      2168  
Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp  
                                 295                      300                      305  
tca ctg cct cag cct tgg aga gcc gac gtg acc tac gcc gct atg gtg                      2216  
  
Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val  
                                 310                      315                      320  
gtg aaa gtg atc gcc cag cat cag aac ctg ctg ctg gcc aac acc acc                      2264  
Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr  
                                 325                      330                      335  
agc gcc ttc cct tac gcc ctg ctg agc aac gac aac gcc ttc ctg agc                      2312  
Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser  
  
                                 340                      345                      350  
tac cac ccc cac ccc ttc gcc cag aga acc ctg acc gcc cgg ttc cag                      2360  
Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln

355	360	365	370	
gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg aga aag ccc gtg				2408
Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val				
	375	380	385	
ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag gaa cag ctg tgg				2456
Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp				
	390	395	400	
gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat aca gtg				2504
Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val				
	405	410	415	
ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat gct tgg				2552
Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp				
	420	425	430	
cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc cac ccc				2600
Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro				
	435	440	445	450
aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca cca ggc				2648
Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly				
	455	460	465	
cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg tgc agc				2696
Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser				
	470	475	480	
ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc acc gcc				2744
Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala				
	485	490	495	
gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct gct gcc				2792
Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala				
	500	505	510	
cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc gct ctg				2840
Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu				
	515	520	525	530

aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc gag aag	2888
Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys	
535 540 545	
cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc cag ggc	2936
Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly	
550 555 560	
cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag tgc ctg	2984
Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu	
565 570 575	
tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac acc ccc	3032
Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro	
580 585 590	
gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc ccc gat	3080
Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp	
595 600 605 610	
aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac tac tgg	3128
Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp	
615 620 625	
gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa gtg ccc	3176
Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro	
630 635 640	
gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtcgacccgg	3222
Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro	
645 650	
gcggcctcga ggacggggtg aactacgcct gaggatccga tctttttccc tctgccaaaa	3282
attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta	3342
ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagc aattcgttga	3402
tctgaatttc gaccacccat aataccatt accctggtag ataagtagca tggcgggtta	3462
atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctcctctctc gcgcgctcgc	3522



tcgtcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgcgcgc cgggctttgc cggggcggcc	3582
tcagtgcgcg agcgagcgcg cagccttaat taacctaat cactggccgt cgttttacia	3642
cgctcgtact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatccccct	3702
ttcgccagct ggcgtaatat cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc	3762
agcctgaatg gcgaatggga cgcgcctgt agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtgtg	3822
gttacgcga gcgtgaccgc tacacttgc agcgccctag cggccgtcc ttctcgtttc	3882
ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc ttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc	3942
cctttagggt tccgatttag tgccttacgg cacctcgacc caaaaaact tgattagggt	4002
gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttgag	4062
tccacgttct ttaatatggg actcttgttc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg	4122
gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag	4182
ctgatttaac aaaaatttaa cgcaatttt aacaaaatca tgtgagcaaa aggccagcaa	4242
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct	4302
gacgagcatc aaaaaatcg acgtcaagt cagagggtgc gaaacccgac aggactataa	4362
agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgt ctctgttcc gacctgccg	4422
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca	4482
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa	4542
cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg	4602
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg	4662
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaaga	4722
acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc	4782
tcttgatccg gcaaacaaac caccgtggt agcgtgggt tttttgttg caagcagcag	4842
attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac	4902
gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc	4962
ttcacctaga tcttttgat cctccggcgt tcagcctgtg ccacagccga caggatggtg	5022
accaccattt gcccataatc accgtcggta ctgatccgt cgtcaataaa ccgaaccgt	5082
acacctgag catcaaactc ttttatcagt tggatcatgt cggcggtgtc gcggccaaga	5142
cggtcgagct tcttcaccag aatgacatca ccttctcca cttcatcct cagcaaatcc	5202
agcccttccc gatctgttga actgccgat gccttgcgg taaagatgcg gttagctttt	5262
acccctgcat ctttgagcgc tgaggtctgc ctctgaaga aggtgttct gactcatacc	5322
aggcctgaat cgccccatca tccagccaga aagtgaggga gccacggttg atgagagctt	5382

tgtttaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt tgccacggaa cggctcgcgt 5442  
 tgcgggaag atgcgtgac tgatccttca actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa 5502  
 gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc 5562  
 tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat ttattcatat caggattatc 5622  
  
 aataccatat ttttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt 5682  
 ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg actcgtccaa catcaataca 5742  
 acctattaat ttccccctgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac catgagtgac 5802  
 gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt atgcatttct ttccagactt gttcaacagg 5862  
 ccagccatta cgctcgcat caaaatcact cgcatacaac aaaccgttat tcattcgtga 5922  
 ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgatc gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat 5982  
 cgaatgcaac cggcgcagga acactgccag cgcatacaac atattttcac ctgaatcagg 6042  
  
 atattcttct aatacctgga atgctgtttt cccggggatc gcagtggtga gtaacatgc 6102  
 atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcgggaaga ggcataaatt ccgtcagcca 6162  
 gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc attggcaacg ctacctttgc catgtttcag 6222  
 aaacaactct ggcgcacatcg gcttccata caatcgatag attgtcgac ctgattgccc 6282  
 gacattatcg cgagccatt tataccata taaatcagca tccatgttgg aatttaacg 6342  
 cggcctcag caagacgttt cccgttgaat atggctcata acacccttg tattactgtt 6402  
 tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatatattt ttatcttgtg caatgtaaca 6462  
  
 tcagagattt tgagacacca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 6522  
 tattaccgcc ttigagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga 6582  
 gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgcgc aatagcaaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 6642  
 gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg 6702  
 caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct 6762  
 tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa ttacacacag gaaacagcta 6822  
 tgacatgat tacgccagat ttaattaagg ccttaattag g 6863

<210> 4

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
20 25 30  
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
35 40 45  
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
50 55 60  
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
65 70 75 80  
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
85 90 95  
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
100 105 110  
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
115 120 125  
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
130 135 140  
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
145 150 155 160  
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
165 170 175  
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
180 185 190  
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
195 200 205  
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
210 215 220  
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
225 230 235 240  
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu

245                      250                      255  
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
 260                      265                      270  
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
 275                      280                      285  
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
 290                      295                      300  
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
  
 305                      310                      315                      320  
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
 325                      330                      335  
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
 340                      345                      350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
 355                      360                      365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
  
 370                      375                      380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
 405                      410                      415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
 420                      425                      430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
  
 435                      440                      445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
 450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
 465                      470                      475                      480  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
 485                      490                      495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (forward primer)

<400> 5

gccaaaaatt atggggacat

20

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic (probe)

<400> 6

atgaagcccc ttgagcatct gacttct

27

<210> 7

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic hIDUA variant

<400> 7

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

Gln Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180	185	190	
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly			
195	200	205	
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser			
210	215	220	
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His			
225	230	235	240
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu			
245	250	255	
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile			
260	265	270	
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro			
275	280	285	
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val			
290	295	300	
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala			
305	310	315	320
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn			
325	330	335	
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe			
340	345	350	
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg			
355	360	365	
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys			
370	375	380	
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln			
385	390	395	400
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His			
405	410	415	
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp			
420	425	430	



Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 8

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic hIDUA variant 020976

<400> 8

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

Pro Gln Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225                      230                      235                      240  
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
                          245                      250                      255  
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
                          260                      265                      270  
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
  
                          275                      280                      285  
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
                          290                      295                      300  
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
                          325                      330                      335  
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
  
                          340                      345                      350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
                          355                      360                      365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
                          370                      375                      380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
  
                          405                      410                      415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
                          420                      425                      430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
                          435                      440                      445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
                          450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
  
 465                      470                      475                      480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
485 490 495  
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
500 505 510  
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
515 520 525  
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540  
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
545 550 555 560  
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
565 570 575  
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
580 585 590  
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605  
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
610 615 620  
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
625 630 635 640  
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
645 650

<210> 9

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><

223> Synthetic (hIDUA variant 003356)

<400> 9

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
 35 40 45  
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
 50 55 60  
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
 65 70 75 80  
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
 85 90 95  
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Gln Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
 100 105 110  
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
 115 120 125  
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
 130 135 140  
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
 165 170 175  
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
 180 185 190  
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
 195 200 205  
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
 210 215 220  
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
 225 230 235 240  
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
 245 250 255  
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
 260 265 270  
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275                      280                      285  
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
 290                      295                      300  
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
  
 305                      310                      315                      320  
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
 325                      330                      335  
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
 340                      345                      350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
 355                      360                      365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
  
 370                      375                      380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
 405                      410                      415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
 420                      425                      430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
  
 435                      440                      445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
 450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
 465                      470                      475                      480  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
 485                      490                      495  
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
  
 500                      505                      510  
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
 515                      520                      525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
530 535 540  
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
545 550 555 560  
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
565 570 575  
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
580 585 590  
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
595 600 605  
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
610 615 620  
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
625 630 635 640  
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
645 650  
<210> 10  
<211> 653  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220><223> Synthetic (hIDUA variant 003367)  
<400> 10  
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
20 25 30  
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
35 40 45  
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
50 55 60  
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
65 70 75 80



Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
100 105 110

His Leu Asp Arg Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

				325				330				335			
Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe
340				345				350							
Leu	Ser	Tyr	His	Pro	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg
355				360				365							
Phe	Gln	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	His	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys
370				375				380							
Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Gln
385				390				395				400			
Leu	Trp	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	His
405				410				415							
Thr	Val	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	His	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp
420				425				430							
Ala	Trp	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Arg	Ala
435				440				445							
His	Pro	Asn	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Val	Pro
450				455				460							
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu
465				470				475				480			
Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro
485				490				495							
Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala
500				505				510							
Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro
515				520				525							
Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro
530				535				540							
Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr
545				550				555				560			
Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys
565				570				575							

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
645 650

<210> 11

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (hIDUA variant 003359)

<400> 11

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30  
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45  
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60  
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80  
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95  
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110  
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130

135

140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145

150

155

160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165

170

175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180

185

190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly

195

200

205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210

215

220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225

230

235

240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu

245

250

255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260

265

270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Ala Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275

280

285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val

290

295

300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305

310

315

320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325

330

335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340

345

350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg

355

360

365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370                      375                      380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
                          405                      410                      415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
                          420                      425                      430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
                          435                      440                      445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
  
 450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
 465                      470                      475                      480  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
                          485                      490                      495  
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
                          500                      505                      510  
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
  
 515                      520                      525  
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
 530                      535                      540  
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
 545                      550                      555                      560  
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
                          565                      570                      575  
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
  
 580                      585                      590  
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
                          595                      600                      605  
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
 610                      615                      620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
 625                      630                      635                      640  
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645                      650

<210> 12

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence (hIDAU variant 017436)

<400> 12

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1                      5                      10                      15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20                      25                      30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35                      40                      45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50                      55                      60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65                      70                      75                      80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85                      90                      95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100                      105                      110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115                      120                      125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130                      135                      140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145                      150                      155                      160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165	170	175	
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser			
180	185	190	
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly			
195	200	205	
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser			
210	215	220	
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His			
225	230	235	240
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu			
245	250	255	
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile			
260	265	270	
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro			
275	280	285	
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val			
290	295	300	
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala			
305	310	315	320
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn			
325	330	335	
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Arg Ser Asn Asp Asn Ala Phe			
340	345	350	
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg			
355	360	365	
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys			
370	375	380	
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln			
385	390	395	400
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His			
405	410	415	



Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 13

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence (hIDUA variant 003364)

<400> 13

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
 210 215 220  
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
 225 230 235 240  
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
 245 250 255  
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
 260 265 270  
  
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
 275 280 285  
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
 290 295 300  
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
 325 330 335  
  
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
 340 345 350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Thr Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
 355 360 365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
 370 375 380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385 390 395 400  
  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
 405 410 415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
 420 425 430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
 435 440 445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
 465                      470                      475                      480  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
                     485                      490                      495  
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
                     500                      505                      510  
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
                     515                      520                      525  
  
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
                     530                      535                      540  
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
 545                      550                      555                      560  
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
                     565                      570                      575  
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
                     580                      585                      590  
  
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
                     595                      600                      605  
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
                     610                      615                      620  
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
 625                      630                      635                      640  
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
                     645                      650

<210> 14

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (hIDUA variant 066228)

<400> 14

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
20 25 30  
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
35 40 45  
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
50 55 60  
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
65 70 75 80  
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
85 90 95  
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
100 105 110  
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
115 120 125  
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
130 135 140  
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
145 150 155 160  
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
165 170 175  
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
180 185 190  
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
195 200 205  
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
210 215 220  
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
225 230 235 240  
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu

245	250	255
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile		
260	265	270
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro		
275	280	285
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val		
290	295	300
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala		
305	310	315
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn		
325	330	335
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe		
340	345	350
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg		
355	360	365
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys		
370	375	380
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln		
385	390	395
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His		
405	410	415
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp		
420	425	430
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala		
435	440	445
Asn Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro		
450	455	460
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu		
465	470	475
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro		
485	490	495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
500 505 510  
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
515 520 525  
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
530 535 540  
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
565 570 575  
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
580 585 590  
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
595 600 605  
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
625 630 635 640  
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
645 650

<210> 15

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence (hIDUA 003372)

<400> 15

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
1 5 10 15  
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
20 25 30  
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
35 40 45



Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
 50 55 60  
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
 65 70 75 80  
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
 85 90 95  
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
 100 105 110  
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
 115 120 125  
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
 130 135 140  
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
 165 170 175  
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
 180 185 190  
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
 195 200 205  
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
 210 215 220  
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
 225 230 235 240  
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
 245 250 255  
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
 260 265 270  
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
 275 280 285  
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val

290                      295                      300  
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
                          325                      330                      335  
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
  
                          340                      345                      350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
                          355                      360                      365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
                          370                      375                      380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
  
                          405                      410                      415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
                          420                      425                      430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
                          435                      440                      445  
 His Pro Asn Arg Ser Ile Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
                          450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
  
 465                      470                      475                      480  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
                          485                      490                      495  
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
                          500                      505                      510  
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
                          515                      520                      525  
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
  
 530                      535                      540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
 545                      550                      555                      560  
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
                          565                      570                      575  
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
                          580                      585                      590  
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
  
                          595                      600                      605  
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
                          610                      615                      620  
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
 625                      630                      635                      640  
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
                          645                      650  
  
 <210> 16  
 <211> 653  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic sequence (hIDUA variant 0066231)  
 <400> 16  
  
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
                          20                      25                      30  
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
                          35                      40                      45  
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
  
                          50                      55                      60  
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
 65                      70                      75                      80  
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
                          85                      90                      95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
100 105 110  
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
115 120 125  
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
130 135 140  
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
145 150 155 160  
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
165 170 175  
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
180 185 190  
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
195 200 205  
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
210 215 220  
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
225 230 235 240  
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
245 250 255  
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
260 265 270  
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
275 280 285  
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
290 295 300  
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
305 310 315 320  
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
325 330 335  
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350  
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
 355 360 365  
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380  
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln  
 385 390 395 400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
 405 410 415  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
 420 425 430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
 450 455 460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
 465 470 475 480  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
 485 490 495  
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510  
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
 515 520 525  
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
 530 535 540  
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
 545 550 555 560  
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575  
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Thr Tyr  
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp  
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
645 650

<210> 17

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (hIDUA variant A622T)

<400> 17

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser  
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val  
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg  
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr  
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val  
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu  
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr  
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro  
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu  
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala  
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn  
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser  
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly  
195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser  
210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His  
225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu  
245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile  
260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro  
275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val  
290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala  
305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn  
325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe  
340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg  
355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys  
370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385                      390                      395                      400  
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His  
                          405                      410                      415  
  
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp  
                          420                      425                      430  
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala  
                          435                      440                      445  
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro  
                          450                      455                      460  
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu  
 465                      470                      475                      480  
  
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro  
                          485                      490                      495  
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala  
                          500                      505                      510  
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro  
                          515                      520                      525  
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro  
                          530                      535                      540  
  
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr  
 545                      550                      555                      560  
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys  
                          565                      570                      575  
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr  
                          580                      585                      590  
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser  
                          595                      600                      605  
  
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Thr Leu Asp  
                          610                      615                      620  
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu  
 625                      630                      635                      640



Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro  
645 650