



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월23일  
(11) 등록번호 10-2823833  
(24) 등록일자 2025년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)  
A61P 27/00 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/86 (2013.01)  
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7018108
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월29일  
심사청구일자 2021년11월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월23일
- (65) 공개번호 10-2020-0104307
- (43) 공개일자 2020년09월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/063168
- (87) 국제공개번호 WO 2019/108857  
국제공개일자 2019년06월06일
- (30) 우선권주장  
62/593,081 2017년11월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2013531490 A\*  
EP02492347 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아  
미국 펜실베이니아주 19104 필라델피아 씨빅 센터  
블러바드 3600, 9플로어
- (72) 발명자  
윌슨 제임스 엠.  
미국 펜실베이니아 19103 필라델피아 델란시 스트리트 1831  
카츠 네이션  
미국 코네티컷 06907 스탬포드 호프 스트리트  
1111 유닛 3  
호르도 줄리에트  
미국 펜실베이니아 19147 필라델피아 사우스 밀드레드 스트리트 712
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 15 항

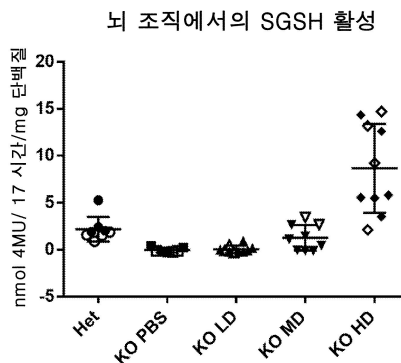
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 **류코다당류중 IIIA형에 대한 유전자 요법**

(57) 요약

AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)가 본원에 제공되며, 여기서 벡터 게놈은 AAV 5' 도립된 말단 반복부(ITR), 작용성 hSGSH를 암호화하는 조작된 핵산 서열, 표적 세포에서 hSGSH의 발현을 지시하는 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 또한 제형 완충액 중 본원에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물, 및 MPS IIIA로 진단된 인간 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 48/005* (2013.01)

*A61P 19/00* (2018.01)

*A61P 27/00* (2018.01)

*C12N 9/14* (2013.01)

*C12Y 310/01001* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)로서, 여기서 벡터 게놈은 AAV 5' 도립된 말단 반복부(ITR), 작용성 N-술포글루코사민 술포하이드롤라제(hSGSH)를 암호화하는 조작된 핵산 서열, 표적 세포에서 hSGSH의 발현을 지시하는 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함하며, 여기서 hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1인, rAAV.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조절 서열이 프로모터를 포함하는, rAAV.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조절 서열이 인헨서, 인트론, 및/또는 폴리 A를 추가로 포함하는, rAAV.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 AAV 벡터 게놈이 서열번호: 4의 서열(AAV.CB7.CI.hSGSHco.RBG)을 포함하는, rAAV.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 AAV 캡시드가 AAV9 캡시드인, rAAV.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 뮤코다당류증 IIIA형(MPS IIIA)의 치료 및/또는 이를 필요로 하는 대상체에서 보행 또는 이동성을 개선시키거나, 떨림을 감소시키거나, 경련을 감소시키거나, 자세를 개선시키거나, 또는 시력 상실의 진행을 감소시키는데 사용되는, rAAV.

#### 청구항 7

제형 완충액 중 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 뮤코다당류증 IIIA형(MPS IIIA) 치료를 위한 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

- (a) 작용성 hSGSH 단백질 또는 작용성 술파타제-변형 인자 1(SUMF1)과의 공동-투여되고;
- (b) 뇌실내(ICV), 척수강내(IT), 수조내 또는 정맥내(IV) 주사를 통해 전달하도록 제형화되고;
- (c) 뇌 질량의 그램 당  $1 \times 10^9$  GC 내지 뇌 질량의 그램 당  $1 \times 10^{13}$  GC의 용량으로 투여가능하고; 및/또는
- (d) 7.28 내지 7.32의 pH를 갖도록 제형화된, 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

MPS IIIA로 진단된 인간 대상체를 치료하고/하거나 이를 필요로 하는 대상체에서 보행 또는 이동성을 개선시키거나, 떨림을 감소시키거나, 경련을 감소시키거나, 자세를 개선시키거나, 또는 시력 상실의 진행을 감소시키는데 사용하기 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 rAAV의 현탁액으로서, 여기서 rAAV의 현탁액은 제형 완충액 중에서 뇌 질량의 그램 당  $1 \times 10^9$  GC 내지 뇌 질량의 그램 당  $1 \times 10^{13}$  GC의 용량으로 대상체에 투여되는, rAAV의 현탁액.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

- (a) 상기 치료가 건강한 대조군의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 혈청 SGSH 활성을 초래하거나;
- (b) 상기 현탁액이 적어도  $1 \times 10^9$  게놈 카피(GC)/mL의 rAAV를 갖거나;
- (c) 상기 현탁액이 작용성 hSGSH 단백질 또는 작용성 SUMF1 단백질과의 공동-투여되거나;
- (d) 상기 현탁액이 필요로 하는 대상체에 뇌실내로, 척수강내로, 또는 정맥내로 전달되거나;
- (e) 상기 현탁액이 7.28 내지 7.32의 pH를 갖거나;
- (f) 상기 rAAV가 필요로 하는 대상체에게 1회 투여되거나; 또는
- (g) 상기 rAAV가 필요로 하는 대상체에게 1회 초과로 투여되는, rAAV의 현탁액.

**청구항 11**

제9항에 있어서,

- (a) 대상체가 효소 대체 요법 단독을 통한 표준 치료와 비교하여 감소된 투여량 또는 더 낮은 빈도로 효소 대체 요법을 받고/받거나;
- (b) 대상체가 MPS IIIA과 관련된 바이오마커의 개선을 입증하는, rAAV의 현탁액.

**청구항 12**

작용성 hSGSH를 암호화하는 조작된 핵산 서열 및 표적 세포에서 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 벡터로서, 여기서 hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1인, 벡터.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

- (a) 상기 벡터가 재조합 바이러스, 플라스미드, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스, 덴드리머, 세포 투과 펩티드(CPP) 접합체, 자성 입자, 또는 나노 입자이고;
- (b) 상기 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 보카바이러스, 하이브리드 AAV/보카바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 렌티바이러스이고; 및/또는
- (c) 상기 표적 세포가 단리된 세포, 배양된 세포, 세포주, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 비포유류 세포, 곤충 세포, HEK-293 세포, 간 세포, 신장 세포, 중추 신경계의 세포, 뉴런, 교질 세포, 또는 줄기 세포인, 벡터.

**청구항 14**

MPS IIIA를 치료하고/하거나 이를 필요로 하는 대상체에서 보행 또는 이동성을 개선시키거나, 떨림을 감소시키거나, 경련을 감소시키거나, 자세를 개선시키거나, 또는 시력 상실의 진행을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 rAAV.

**청구항 15**

MPS IIIA를 치료하고/하거나 이를 필요로 하는 대상체에서 보행 또는 이동성을 개선시키거나, 떨림을 감소시키거나, 경련을 감소시키거나, 자세를 개선시키거나, 또는 시력 상실의 진행을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 제12항 또는 제13항의 벡터.

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 전자 형식으로 제출된 자료에 대한 문헌의 인용

[0002] 본 출원인은 본 명세서에 전자 형태로 제출된 서열 목록 자료를 참조로 포함한다. 이 파일은 "18-8476PCT\_ST25.txt"로 표지되어 있다.

### 배경 기술

[0003] 뮤코다당류증 IIIa형(MPS IIIa, MPS IIIA, 또는 산필리포 증후군 A형)은, 글리코사미노글리칸(GAG) 헤파란 술페이트의 리소좀 이화작용에 수반되는 효소 N-술폴글루코사민 술폴하이드롤라제(SGSH)의 결핍에 의해 야기되는 상염색체성 열성 유전 질환이다. 이 결핍은 분해되지 않은 헤파란 술페이트 뿐만 아니라 뉴런의 기능장애 및 신경염증을 야기하는 중추 신경계 내 강글리오시드 GM2 및 GM3의 세포내 축적을 초래한다. 상기 질환은 먼저 대략 3세 가량의 인지 지연으로 나타나며 이상 과잉행동 및 공격적인 행동이 뒤따른다. 이어서 상기 질환의 진행은 15세 중위 연령에서의 사망과 함께 첫 10년 동안 운동 및 신경학적 기능의 상실을 초래한다.

[0004] 현재 MPS IIIA가 있는 사람들을 위한 치유법 또는 표준 치료는 없다. 의약은 증상을 완화하고(예컨대 발작에 대한 항경련제) 삶의 질을 개선시키는데 사용된다. 조혈 줄기 세포 이식은 신경심리학적 악화를 상당히 개선시키지 않는 것으로 보인다. MPS III의 결핍에 대해 재조합 효소가 이용가능하지만, 효소는 중추 신경계에 들어갈 수 없기 때문에 효소 대체 요법(ERT)의 시험은 예후를 개선시키는데 있어서 유리하지 않았다. 예를 들어, Germaine L Defendi. Genetics of Mucopolysaccharidosis Type III. Medscape. March 21, 2014 참조. 식이요법에 대한 변화는 질환 진행을 막지 않지만, 우유, 당, 및 유제품을 제한하는 것은 과도한 점액이 있는 일부 사람들에게 도움이 되었다.

[0005] MPS IIIA의 효율적인 치료를 위한 조성물 및 방법에 대해 당업계의 요구가 계속되고 있다.

**발명의 내용**

[0006] 일 측면에서, 작용성 인간 N-술폴글루코사민 술폴하이드롤라제(hSGSH)를 암호화하는 조작된 핵산 서열 및 표적 세포에서 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 벡터가 제공된다. 일 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1과 적어도 96% 동일하다. 추가의 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1이다.

[0007] 다른 측면에서, AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 계놈을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)가 제공되며, 여기서 벡터 계놈은 AAV 5' 도립된 말단 반복부(ITR), 작용성 hSGSH를 암호화하는 조작된 핵산 서열, 표적 세포에서 hSGSH의 발현을 지시하는 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 일 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1과 적어도 95% 동일하다. 추가의 구현예에서, AAV 벡터 계놈은 서열번호: 4의 서열(AAV.CB7.CI.hSGSHco.RBG)을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드이다. 일 구현예에서, rAAV(AAV9.CB7.CI.hSGSHco.RBG)는 AAV9 캡시드 및 서열번호: 4의 서열을 포함하는 벡터 계놈을 포함한다.

[0008] 제형 완충액 중 본원에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 추가로 제공된다.

[0009] 또 다른 측면에서, 제형 완충액 중 본원에 기재된 바와 같은 rAAV의 현탁액을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, MPS IIIA로 진단된 인간 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0010] 추가의 측면에서, 작용성 hSGSH를 암호화하는 조작된 핵산 서열, 및 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일 구현예에서, 발현 카세트에서 hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1과 적어도 96% 동일하다.

[0011] 본 발명의 다른 측면 및 이점은 본 발명의 하기 상세한 설명으로부터 용이하게 명백해질 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0012] 도 1a 내지 1e는 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG의 뇌실내 투여 6개월 후 뇌(도 1a), 척수(도 1b), 간(도 1c)에서의 SGSH 활성, 및 심장(도 1d) 및 뇌(도 1e)에서의 총 GAG 저장을 제공한다. SGSH 활성의 용량 의존적 증가는 뇌, 척수, 및 간에서 관찰되었다. 총 GAG는 심장에서 고용량에서만 감소되었다. GAG는 KO MPS IIIA 마우스의 뇌에서 증가되고 처리에 의해 중간 용량(MD) 및 고용량(HD)으로 정규화되었다. 도 1a 내지 1c에서 열린 기호는 수컷을 나타내는 반면 채워진 기호는 암컷을 나타낸다. LD는 저용량을 지칭한다.

도 2a 및 2b는 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG의 뇌실내 투여 6개월 후 LIMP2 면역염색(도 2b) 및 정량화(도 2a)에 의해 평가된 리소좀 저장을 도시한다. 리소좀 막의 LIMP2 면역염색은 중간 용량 및 고용량에서 저장 부담의 감소를 제시하였다. 도 2a에서 열린 기호는 수컷을 나타내는 반면 채워진 기호는 암컷을 나타낸다.

도 3a 및 3b는 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG의 ICV 투여 6개월 후 뇌(도 3a) 및 척수(도 3b)에서의 조직병리학 누적 점수를 제공한다. 뇌 점수는 뇌에서의 교질 세포 공포 형성, 대뇌에서의 뉴런 공포 형성, 뇌간에서의 뉴런 공포 형성, 뇌에서의 GFAP 강도 점수, 및 단핵 세포 침윤의 3등급 심각도 점수의 누적 합계이다(최대 점수 15). 척수 점수는 뉴런 공포 형성(운동 뉴런에서 보다 두드러짐), 교질 세포 공포 형성, 및 GFAP 강도의 3-등급 심각

도 점수의 누적 합계이다(최대 점수 9). 저용량 MPS IIIa 마우스는 비히클-처리된 것과 유사한 반면 중간 용량 및 고용량 처리된 마우스는 뇌 및 척수에서 감소된 신경병리학 점수를 가졌다. 신경병리학의 교정은 고용량 처리된 동물 그룹에서 통계적으로 유의하다(일방향 Anova Kruskal Wallis 검정과 함께 사후 Dunn의 다중 비교 검정, 알파 0.05). 열린 기호는 수컷을 나타내는 반면 채워진 기호는 암컷을 나타낸다.

도 4는 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG의 ICV 투여 6개월 후 로킹 로타로드(rotating rotarod)에 의해 평가된 신경학적 기능을 제공한다. 마우스를 각각의 회전 후 회전 방향의 역전으로 회전 로드(분당 10회 회전) 상에 위치시켰다. 3회 연속 검정 동안 300초의 최대 기간에 걸쳐 낙하 대기 시간을 측정하였다. 3회 검정의 평균 대기 시간을 균형 및 조정의 지표로 보고하였다. \* Mann-Whitney 검정 p<0.05. 비히클-처리된 MPS IIIa 마우스는 이형접합 마우스 이전에 회전 로드로부터 낙하하게 하는 신경학적 결함을 제시하였다. 중간 용량 및 고용량 처리된 마우스 둘 다는 처리되지 않은 마우스보다 상당히 더 잘 수행되었으며 이형접합 마우스와 유사하였다. 그러나 저용량 MPS IIIa 마우스는 비히클-처리된 것과 같이 수행되었다.

도 5는 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG 처리의 장기간 효과를 결정하기 위한 연구에 사용되는 마우스의 임상 건강을 평가하는데 사용되는 등급화 척도를 제공한다.

도 6a 및 6b는 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG 투여 후 장기간 연구에서 마우스에 대한 임상 점수를 제공한다. 고용량의 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG(9x10<sup>10</sup> GC, ICV)를 2개월령 마우스에 주사하고 매주 평가하였다. 수컷(도 6a) 및 암컷(도 6b) 마우스에 대한 점수가 제시되어 있다. 야생형(WT) 및 MPS IIIa(KO) 마우스의 대조군은 PBS 주사를 받았다.

도 7은 MPS IIIa(KO) 마우스에 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG의 고용량 투여 후 개방 필드 움직임(빔 차단 활성화에 의해 평가)의 측정 결과를 제공한다. PBS 주사를 받은 야생형(WT) 및 MPS IIIa(KO) 마우스의 대조군을 또한 평가하였다.

도 8a 및 8b는 고용량의 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG를 받은 MPS IIIa 마우스로 수행된 고가 미로 검정 결과를 제공한다. 개방 측(open arm) 활성을 지속시간(도 8a) 및 빈도(도 8b)에 관하여 측정하였다. PBS 주사를 받은 야생형(WT) 및 MPS IIIa(KO) 마우스의 대조군을 또한 평가하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0013] 뮤코다당류증 IIIa형(MPS IIIA)의 치료 및/또는 MPSIIIA의 증상을 완화시키는데 유용한 조성물이 본원에 제공된다. 이들 조성물은 작용성 인간 N-술폴글루코사민 술포하이드롤라제(hSGSH)를 암호화하는 핵산 서열 및 표적 세포에서 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하며, 여기서 hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1과 적어도 96% 동일하다.

[0014] 일 구현예에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 작용성 인간 SGSH의 발현을 위한 핵산 서열, 발현 카세트, 벡터, 재조합 바이러스, 다른 조성물 및 방법을 수반한다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 작용성 인간 SGSH를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 조성물의 생산을 위한 핵산 서열, 발현 카세트, 벡터, 재조합 바이러스, 숙주 세포, 다른 조성물 및 방법을 수반한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 MPS IIIA의 치료를 위해 대상체에 작용성 인간 SGSH를 암호화하는 핵산 서열의 전달을 위한 핵산 서열, 발현 카세트, 벡터, 재조합 바이러스, 다른 조성물 및 방법을 수반한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 치료 수준의 SGSH를 중추 신경계(CNS)에 제공하는데 유용하다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 치료 수준의 SGSH를 예를 들어, 혈액, 간, 신장, 또는 말초 신경계와 같은 주변부에 제공하는데 유용하다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터-기반 방법은 필요로 하는 대상체에서 SGSH 단백질의 발현을 제공함으로써 SGSH의 바람직한 기능을 회복시키거나, MPS IIIA와 연관된 증상을 완화시키거나, MPS IIIA-관련 바이오마커를 개선시키거나, 또는 MPS IIIA에 대한 다른 치료(들)를 촉진하도록 도움을 주는 새로운 치료 옵션을 제공한다.

[0015] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료 수준"은 건강한 대조군의 적어도 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 100% 초과, 약 2-배, 약 3-배, 또는 약 5-배의 효소 활성을 의미한다. SGSH 효소적 활성을 측정하는데 적합한 검정이 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 이러한 치료 수준의 SGSH는 MPS III-A 관련 증상의 완화; 질환의 MPS IIIA-관련 바이오마커의 개선; 또는 MPS IIIA에 대한 다른 치료(들)의 촉진, 예를 들어, 뇌척수액(CSF), 혈청, 소변 및/또는 다른 생물학적 샘플에서의 GAG 수준; 신경인지 저하의 예방; 특정 MPS IIIA-관련 증상의 역전 및/또는 MPS IIIA-관련 특정 증상 진행의 예방; 또는 이들의 임의의 조합을 초래할 수

있다.

- [0016] 본원에 사용된 바와 같이, "건강한 대조군"은 대상체 또는 그로부터의 생물학적 샘플을 지칭하며, 여기서 대상체는 MPS 장애를 갖지 않는다. 건강한 대조군은 하나의 대상체일 수 있다. 다른 구현예에서, 건강한 대조군은 다수의 대상체의 풀이다.
- [0017] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플"은 임의의 세포, 생물학적 유체 또는 조직을 지칭한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 샘플은, 비제한적으로, 진혈, 백혈구, 섬유아세포, 혈청, 소변, 혈장, 타액, 골수, 뇌척수액, 양수, 및 피부 세포를 포함할 수 있다. 이러한 샘플은 식염수, 완충액 또는 생리학적으로 허용되는 희석제로 추가로 희석될 수 있다. 대안적으로, 이러한 샘플은 통상적인 수단에 의해 농축된다.
- [0018] 본 발명의 설명과 관련하여, 본원에 기재된 각각의 조성물이, 다른 구현예에서, 본 발명의 방법에 유용하다는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명의 방법에 유용한 것으로 본원에 기재된 각각의 조성물이, 다른 구현예에서, 그 자체가 본 발명의 구현예인 것으로 또한 의도된다.
- [0019] 달리 본 명세서에서 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 공개된 텍스트를 참조하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미는 가지며, 당업자에게 본 출원에 사용되는 많은 용어에 대한 일반적인 지침을 제공한다.
- [0020] 본원에 사용된 바와 같이, "질환", "장애" 및 "병태"는 뮤코다당류증 IIIa형(MPS IIIA, MPS IIIa, 또한 산필리포 증후군 A형 또는 산필리포 A형 질환으로도 알려짐)이다.
- [0021] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "MPS IIIA-관련 증상(들)" 또는 "증상(들)"은 MPS IIIA 환자 뿐만 아니라 MPS IIIA 동물 모델에서 발견되는 증상(들)을 지칭한다. 이러한 증상은 언어 지체; 사회적 상호작용 및 의사소통에 어려움; 수면 장애; 진행성 지적 장애 및 이전에 획득한 기술의 상실(발달적 퇴행); 발작 및 움직임 장애; 큰 머리; 약간 확대된 간(가벼운 간 비대); 배꼽(배꼽 탈장) 또는 하복부(서혜 탈장) 주위의 부드러운 낭상돌출; 짧은 신장, 관절 경직, 가벼운 다발성골 이상증, 다발성 골격 이상; 만성 설사; 재발성 상부 호흡기 감염; 재발성 이염; 청각 장애; 시력 문제; 비대칭 중격 비대; 거친 얼굴 특징; 거친 모발; 조밀한 두개관; 다발성골 이상증; 성장 이상; 소변으로 헤파란 술페이트 배설; 뇌척수액(CSF), 혈청, 소변 및/또는 임의의 다른 생물학적 샘플에서의 GAG 축적; N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(NAGLU) 또는 N-술폴글루코사민 술포하이드롤라제(IDUA)의 이상 발현 및/또는 효소 활성; GM2 및 GM3의 축적; 리소좀 효소에서의 활성 변화; CNS에서의 유리 에스테르 화되지 않은 콜레스테롤의 축적; CNS 및 골격 조직에서의 염증성 반응; 과다한 모발 성장(다모증); 과잉활동; 난형 흉요 척추골; 비장 비대증; 일짜눈썹; 비후된 늑골; 탈장; 및 흔들리고 변덕스러운 보행을 포함하나 이로 제한되지 않는다.
- [0022] 본원에 사용된 바와 같은 "환자" 또는 "대상체"는 임상 연구에 사용되는 남성 또는 여성 인간, 개, 및 동물 모델을 의미한다. 일 구현예에서, 이들 방법 및 조성물의 대상체는 MPS IIIA로 진단된 인간이다. 특정 구현예에서, 이들 방법 및 조성물의 인간 대상체는 태아, 신생아, 영아, 유아, 미취학 아동, 초등학교생, 십대, 청소년 또는 성인이다. 추가의 구현예에서, 이들 방법 및 조성물의 대상체는 소아 MPS IIIA 환자이다.
- [0023] 임상 검사 및 소변 검사(과다한 뮤코다당류가 소변으로 배설됨)는 MPS 질환 진단의 제1 단계이다. 혈액, 피부 세포 또는 다양한 세포에서 효소 활성의 수준을 측정하는 효소 검정이 또한 MPS IIIA의 최종적인 진단을 제공하는데 사용된다. MPS IIIA와 연관된 SGSH의 돌연변이를 검출하는 다양한 유전자 검사가 이용가능하다. 예를 들어, [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/conditions/-C0086647/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/conditions/-C0086647/); [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086647\[DISCUI\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086647[DISCUI]) 참조. 양수천자 및 융모막 생검 채취법을 사용한 태아 진단은 태아에게 장애가 발생했는지 검증할 수 있다. 유전 상담은 뮤코다당류증의 가족력이 있는 부모가 장애를 유발하는 돌연변이된 유전자를 보유하고 있는지 여부를 결정하는데 도움을 줄 수 있다. 예를 들어, A Guide to Understanding MPS III, National MPS Society, 2008, [mpssociety.org/learn/diseases/mps-iii/](http://mpssociety.org/learn/diseases/mps-iii/) 참조.
- [0024] "포함하는"은 다른 구성요소 또는 방법 단계의 포함을 의미하는 용어이다. "포함하는"이 사용되는 경우, 관련 구현예가 다른 구성요소 또는 방법 단계를 배제하는 "로 이루어진" 용어들, 및 구현예 또는 본 발명의 본질을 실질적으로 변화시키는 임의의 구성요소 또는 방법 단계를 배제하는 "로 본질적으로 이루어진" 용어들을 사용한 설명을 포함함이 이해되어야 한다. 본 명세서의 다양한 구현예가 "포함하는" 언어를 사용하여 제시되지만, 다양한 구현예 하에, 관련 구현예가 또한 "로 이루어진" 또는 "로 본질적으로 이루어진" 언어를 사용하여 기재됨이 이해되어야 한다.

- [0025] 용어 단수형은 하나 이상을 지칭하며, 예를 들어 "벡터"는 하나 이상의 벡터(들)을 나타내는 것으로 이해됨을 유의해야 한다. 이와 같이, 용어 단수형, "하나 이상", 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0026] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 참조로부터 플러스 또는 마이너스 10%의 가변성을 의미한다.
- [0027] 1. N-술포글루코사민 술포하이드롤라제(SGSH)
- [0028] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "N-술포글루코사민 술포하이드롤라제" 및 "SGSH"는 헤파란-N-술포타제, HNS와 상호교환가능하게 사용된다. 본 발명은 본원에 제공된 핵산 서열로부터 발현되는 SGSH 단백질의 임의의 변이체, 또는 그의 작용성 단편을 포함하며, 본원에 제공된 바와 같은 조성물 또는 방법으로 전달된 경우 바람직한 기능을 회복시키거나, 증상을 완화시키거나, MPS IIIA-관련 바이오마커와 연관된 증상을 개선시키거나, 또는 MPS IIIA에 대한 다른 치료(들)를 촉진시킨다. MPSIII에 적합한 바이오마커의 예는 WO 2017/136533에 기재된 것을 포함하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.
- [0029] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "작용성 SGSH"는 전장 야생형(네이티브) 인간 SGSH의 아미노산 서열(서열번호: 2 및 UniProtKB 수탁 번호: P51688에 제시된 바와 같음)을 갖는 효소, 그의 변이체, 보존적 아미노산 대체를 갖는 그의 돌연변이체, 그의 단편, 변이체 및 보존적 아미노산 대체를 갖는 돌연변이체의 임의의 조합의 전장 또는 단편을 의미하며, 정상 인간 SGSH의 생물학적 활성의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%, 또는 100% 초과를 제공한다. 일부 구현예에서, 작용성 SGSH는 서열번호: 2의 서열을 갖는 야생형 단백질을 지칭한다.
- [0030] SGSH 변이체의 예는 야생형에서 발린(Val, V) 대신에 361번째 아미노산에서 이소류신(Ile, I)을 갖는 서열번호: 2의 아미노산 서열로 이루어진 V361I; 야생형에서 메티오닌(Met, M) 대신에 372번째 아미노산에서 이소류신(Ile, I)을 갖는 서열번호: 2의 아미노산 서열로 이루어진 M372I; 야생형에서 발린(Val, V) 대신에 387번째 아미노산에서 메티오닌(Met, M)을 갖는 서열번호: 2의 아미노산 서열로 이루어진 V387M; 야생형에서 메티오닌(Met, M) 대신에 394번째 아미노산에서 이소류신(Ile, I)을 갖는 서열번호: 2의 아미노산 서열로 이루어진 M394I; 및 야생형에서 아르기닌(Arg, R) 대신에 456번째 아미노산에서 히스티딘(His, H)을 갖는 서열번호: 2의 아미노산 서열로 이루어진 R456H를 포함하나 이로 제한되지 않는다. SGSH 변이체는 또한 상기 확인된 위치에서 아미노산의 돌연변이체 중 임의의 2개, 임의의 3개, 임의의 4개 또는 5개 모두를 포함할 수 있다. SGSH 변이체의 추가적인 예는 당업자에게 이용가능한 생물정보학 도구에 의해 예측된 것들을 포함할 수 있다. 예를 들어, Ugrinov KG et al. A multiparametric computational algorithm for comprehensive assessment of genetic mutations in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo syndrome). PLoS One. 2015 Mar 25;10(3):e0121511.doi: 10.1371/journal.pone.0121511. eCollection 2015를 참조하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0031] 본원에 사용된 바와 같이, "보존적 아미노산 대체" 또는 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산을 당업자에 의해 알려진 유사한 생화학적 특성(예를 들어, 전하, 소수성 및 크기)을 갖는 다른 아미노산으로 변화, 대체 또는 치환하는 것을 지칭한다. 또한, 예를 들어 FRENCH et al. What is a conservative substitution? Journal of Molecular Evolution, March 1983, Volume 19, Issue 2, pp 171-175 및 YAMPOLSKY et al. The Exchangeability of Amino Acids in Proteins, Genetics. 2005 Aug; 170(4): 1459-1472를 참조하며, 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0032] 통상적인 방법에 의해 SGSH 발현 및 활성 수준을 측정하기 위한 다양한 검정이 존재한다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 실시예 1; [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086647\[DISCU1\]&filter=method:1\\_2;testtype:clinical](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086647[DISCU1]&filter=method:1_2;testtype:clinical); Karpova EA et al, A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A(MPS IIIA). J Inherit Metab Dis. 1996;19(3):278-85; Tardieu M et al, Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. Hum Gene Ther. 2014 Jun;25(6):506-16. doi: 10.1089/hum.2013.238. Epub 2014 May 5; Whyte LS et al, Variables influencing fluorimetric N-sulfolglucosamine sulfohydrolase(SGSH) activity measurement in brain homogenates. Mol Genet Metab Rep. 2015 Oct 22;5:60-62. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.10.005. eCollection 2015 Dec; Hopwood

JJ et al. Diagnosis of Sanfilippo type A syndrome by estimation of sulfamidase activity using a radiolabelled tetrasaccharide substrate. Clin Chim Acta. 1982 Aug 18;123(3):241-50을 참조하며; 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0033] 일 측면에서, 작용성 SGSH 단백질질을 암호화하는 핵산 서열이 제공된다. 일 구현예에서, 핵산 서열은 서열번호: 3에서 복제된 야생형 코딩 서열이다. 일 구현예에서, 핵산 서열은 서열번호: 3의 야생형 hSGSH 서열과 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80% 동일하다. 일 구현예에서, 핵산 서열은 서열번호: 3의 야생형 hSGSH 서열과 83.3% 미만으로 동일하다.
- [0034] 핵산은 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭하며 RNA, mRNA, cDNA, 게놈 DNA, 펩티드 핵산(PNA) 및 상기의 합성 형태 및 혼합된 중합체를 포함한다. 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시뉴클레오티드 또는 어느 한 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태(예를 들어, 펩티드 핵산 올리고머)를 지칭한다. 상기 용어는 또한 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 DNA를 포함한다. 당업자는 이들 핵산 분자의 작용성 변이체가 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도됨을 이해할 것이다. 작용성 변이체는 모체 핵산 분자로부터 번역된 것과 동일한 아미노산 서열을 제공하도록 표준 유전자 코드를 사용하여 직접적으로 번역될 수 있는 핵산 서열이다.
- [0035] 특정 구현예에서, 작용성 인간 SGSH(hSGSH)를 암호화하는 핵산 분자, 및 본 발명에 포함되고 발현 카세트 및 벡터 게놈을 생성하는데 유용한 다른 작제물은 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유류 세포, 예컨대 인간 세포에서의 발현을 위해 조작될 수 있다. 방법은 알려져 있고 이전에 기재된 바 있다(예를 들어 WO 96/09378). 서열은 야생형 서열과 비교하여 적어도 하나의 바람직하지 않은 코돈이 보다 바람직한 코돈으로 대체되는 경우 조작된 것으로 간주된다. 여기서, 바람직하지 않은 코돈은 동일한 아미노산을 코딩하는 또 다른 코돈보다 유기체에서 덜 빈번하게 사용되는 코돈이며, 및 더 바람직한 코돈은 바람직하지 않은 코돈보다 유기체에서 더 빈번하게 사용되는 코돈이다. 특이적 유기체에 대한 코돈 사용의 빈도는 코돈 빈도 표, 예컨대 [www.kazusa.jp/codon](http://www.kazusa.jp/codon)에서 찾을 수 있다. 바람직하게는 하나 초과와 바람직하지 않은 코돈, 바람직하게는 대부분 또는 모든 바람직하지 않은 코돈이 더 바람직한 코돈으로 대체된다. 바람직하게는 유기체에서 가장 빈번하게 사용되는 코돈이 조작된 서열에서 사용된다. 바람직한 코돈에 의한 대체는 일반적으로 더 높은 발현을 초래한다. 또한 많은 상이한 핵산 분자가 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서 동일한 폴리펩티드를 암호화할 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한 당업자가 일상적인 기술을 사용하여 폴리펩티드가 발현될 임의의 특정한 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영하기 위해 핵산 분자에 의해 암호화된 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오티드 치환을 만들 수 있음이 이해된다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열"은 서로의 축퇴성 버전이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 핵산 서열은 일상적인 분자 생물학 기술을 사용하여 클로닝되거나, 또는 DNA 합성에 의해 드 노보(de novo) 생성될 수 있으며, 이는 DNA 합성 및/또는 분자 클로닝 분야에서 사업하는 서비스 회사(예를 들어 GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins)에 의해 일상적인 절차를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0036] 일 측면에서, SGSH 코딩 서열은 조작된 서열이다. 일 구현예에서, 조작된 서열은 대상체에서 생산, 전사, 발현 또는 안전성을 개선시키는데 유용하다. 다른 구현예에서, 조작된 서열은 생성된 치료 조성물 또는 치료의 효능을 개선시키는데 유용하다. 추가의 구현예에서, 조작된 서열은 발현되는 작용성 SGSH 단백질질의 효능을 증가시키는데 유용하지만, 또한 안전성을 증가시키기 위해 작용성 단백질을 전달하는 더 적은 용량의 치료 시약을 허용할 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 조작된 SGSH 코딩 서열은 야생형 SGSH 코딩 서열과 비교하여 개선된 번역 속도를 특징으로 한다. 일 구현예에서, SGSH 코딩 서열은 서열번호: 3의 야생형 hSGSH 서열과 83.3% 미만으로 동일하다. 일 구현예에서, SGSH 코딩 서열은 야생형 SGSH 코딩 서열에 대해 약 99% 미만, 약 98% 미만, 약 97% 미만, 약 96% 미만, 약 95% 미만, 약 94% 미만, 약 93% 미만, 약 92% 미만, 약 91% 미만, 약 90% 미만, 약 89% 미만, 약 88% 미만, 약 87% 미만, 약 86% 미만, 약 85% 미만, 약 84% 미만, 약 83% 미만, 약 82% 미만, 약 81% 미만, 약 80% 미만, 약 79% 미만, 약 78% 미만, 약 77% 미만, 약 76% 미만, 약 75% 미만, 약 74% 미만, 약 73% 미만, 약 72% 미만, 약 71% 미만, 약 70% 미만, 약 69% 미만, 약 68% 미만, 약 67% 미만, 약 66% 미만, 약 65% 미만, 약 64% 미만, 약 63% 미만, 약 62% 미만, 약 61% 또는 그 이하의 동일성을 공유한다. 다른 구현예에서, SGSH 코딩 서열은 야생형 SGSH 코딩 서열에 대해 약 99%, 약 98%, 약 97%, 약 96%, 약 95%, 약 94%, 약 93%, 약 92%, 약 91%, 약 90%, 약 89%, 약 88%, 약 87%, 약 86%, 약 85%, 약 84%, 약 83%, 약 82%, 약 81%, 약 80%, 약 79%, 약 78%, 약 77%, 약 76%, 약 75%, 약 74%, 약 73%, 약 72%, 약 71%, 약 70%, 약 69%, 약 68%, 약 67%, 약 66%, 약 65%, 약 64%, 약 63%, 약 62%, 약 61% 또는 그 이하의 동일성을 공유한다. 일 구현예에서, 서열번호: 1의 서열을 포함하는 조작된 핵산 서열이 제공되며, 여기서 서열은 작용성 hSGSH를 암호화한다. 일 구현예에서, 작용성

hSGSH를 암호화하는, 서열번호: 1의 조작된 핵산 서열, 또는 그와 적어도 약 95% 동일한 핵산 서열이 제공된다. 다른 구현예에서, SGSH 코딩 서열은 서열번호: 1에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 동일성이 있으며, 여기서 서열은 작용성 hSGSH를 암호화한다.

[0038] "조작된"이란 본원에 기재된 작용성 SGSH 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 임의의 적합한 유전 요소, 예를 들어, 네이키드 DNA, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜 등에 어셈블리되고 배치되어, 예를 들어, 비-바이러스 전달 시스템(예를 들어, RNA-기반 시스템, 네이키드 DNA 등)을 생성하기 위해, 또는 패키징 숙주 세포에서 바이러스 벡터를 생성하기 위해, 및/또는 대상체에서 숙주 세포에 전달하기 위해 그 위에 운반된 SGSH 서열을 숙주 세포에 전달하는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 유전 요소는 벡터이다. 일 구현예에서, 유전 요소는 플라스미드이다. 이러한 조작된 작제물을 제조하는데 사용되는 방법은 핵산 조작의 당업자에게 알려져 있고 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) 참조.

[0039] 핵산 서열의 맥락에서 용어 "퍼센트(%) 동일성", "서열 동일성", "퍼센트 서열 동일성", 또는 "동일한 퍼센트"는 동일한 2개의 서열에서의 잔기가 상응하게 정렬된 경우 동일함을 지칭한다. 서열 동일성 비교의 길이는 게놈의 전장에 걸쳐 있을 수 있으며, 유전자 코딩 서열의 전장, 또는 적어도 약 500 내지 5000개 뉴클레오티드의 단편이 바람직하다. 그러나, 예를 들어, 적어도 약 9개 뉴클레오티드, 일반적으로 적어도 약 20 내지 24개 뉴클레오티드, 적어도 약 28 내지 32개 뉴클레오티드, 적어도 약 36개 또는 그 이상의 뉴클레오티드의 더 작은 단편 사이의 동일성이 또한 바람직할 수 있다.

[0040] 다수의 서열 정렬 프로그램이 또한 핵산 서열에 대해 이용가능하다. 이러한 프로그램의 예는 "Clustal Omega", "Clustal W", "CAP 서열 Assembly", "BLAST", "MAP", 및 "MEME"를 포함하며, 인터넷 상의 웹 서버를 통해 접근 가능하다. 이러한 프로그램에 대한 다른 공급원은 당업자에게 알려져 있다. 대안적으로, 벡터 NTI 유틸리티가 또한 사용된다. 또한 상기 기재된 프로그램에 함유된 것들을 포함하여, 뉴클레오티드 서열 동일성을 측정하는데 사용될 수 있는 당업계에 알려진 다수의 알고리즘이 있다. 다른 예로써, 폴리뉴클레오티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 Fasta™를 사용하여 비교될 수 있다. Fasta™은 질의 및 검색 서열 사이의 최상의 중첩 영역의 정렬 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다. 예를 들어, 핵산 서열 사이의 퍼센트 서열 동일성은 본원에 참조로 포함된, GCG 버전 6.1로 제공된 바와 같은 디폴트 파라미터(글자 크기 6 및 점수 행렬에 대한 NOPAM 인자)를 갖는 Fasta™을 사용하여 결정될 수 있다.

[0041] 퍼센트 동일성은 단백질, 폴리펩티드, 약 32개 아미노산, 약 330개 아미노산, 또는 그의 펩티드 단편 또는 상응하는 핵산 서열 코딩 서열의 전장에 걸친 아미노산 서열에 대해 용이하게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 적어도 약 8개 아미노산 길이일 수 있고, 최대 약 700개 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 서열 사이의 "동일성", "상동성", 또는 "유사성"을 언급할 때, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열을 참조하여 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 종종 참조 서열과 비교하여 염기 또는 아미노산의 누락 또는 부가를 위한 교정을 함유하는 다수의 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다.

[0042] 동일성은 서열의 정렬을 준비하고 당업계에 알려져 있거나 또는 상업적으로 입수가 가능한 다양한 알고리즘 및/또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, BLAST, ExPASy; Clustal Omega; FASTA; 예를 들어, Needleman-Wunsch 알고리즘, Smith-Waterman 알고리즘 사용)의 사용을 통해 결정될 수 있다. 정렬은 임의의 다양한 공개적으로 또는 상업적으로 입수가 가능한 다수의 서열 정렬 프로그램을 사용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램, 예를 들어, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME", 및 "Match-Box" 프로그램이 아미노산 서열에 이용가능하다. 일반적으로, 임의의 이들 프로그램은 디폴트 설정으로 사용되지만, 당업자는 필요에 따라 이들 설정을 변경할 수 있다. 대안적으로, 당업자는 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공된 것처럼 적어도 동일성 또는 정렬의 수준을 제공하는 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 활용할 수 있다. 예를 들어, J. D. Thomson et al, *Nucl. Acids. Res.*, "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690(1999) 참조.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이, "바람직한 기능"은 건강한 대조군의 적어도 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100%의 SGSH 효소 활성을 지칭한다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "증상을 완화시키다", "증상을 개선시키다" 또는 그들의 임의의 문법적 변이는,

MPS IIIA-관련 증상의 역전, MPS IIIA-관련 증상 진행의 둔화 또는 예방을 지칭한다. 일 구현예에서, 완화 또는 개선은 기재된 조성물(들)의 투여 또는 기재된 방법의 사용 후 환자에서 증상의 총 수가 투여 또는 사용 전과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%만큼 감소된 것을 지칭한다. 다른 구현예에서, 완화 또는 개선은 기재된 조성물(들)의 투여 또는 기재된 방법의 사용 후 증상의 심각도 또는 진행이 투여 또는 사용 전과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%만큼 감소되는 것을 지칭한다.

[0045] 본원에 기재된 SGSH 작용성 단백질 및 SGSH 코딩 서열 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.

[0046] 2. 발현 카세트

[0047] 일 측면에서, 작용성 hSGSH를 암호화하는 조작된 핵산 서열, 및 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일 구현예에서, 작용성 hSGSH를 암호화하는 본원에 기재된 바와 같은 조작된 핵산 서열, 및 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현" 또는 "유전자 발현"은 유전자로부터의 정보에 의한 과정이 작용성 유전자 생성물의 합성에 사용되는 것을 지칭한다. 유전자 생성은 단백질, 펩티드, 또는 핵산 중합체(예컨대 RNA, DNA 또는 PNA)일 수 있다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, "발현 카세트"는 작용성 SGSH, 프로모터에 대한 코딩 서열을 포함하고, 그에 대한 다른 조절 서열을 포함할 수 있으며, 카세트가 벡터로 패키징될 수 있는 핵산 중합체를 지칭한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절 서열", 또는 "발현 제어 서열"은 작동가능하게 연결된 단백질 암호화 핵산 서열의 전사를 유도, 억제, 또는 달리 제어하는 핵산 서열, 예컨대 개시제 서열, 인핸서 서열, 및 프로모터 서열을 지칭한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 작용성 hSGSH를 암호화하는 핵산 서열과 인접한 발현 제어 서열 및/또는 그의 전사 및 발현을 제어하기 위해 트랜스 내에서 또는 떨어져서 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 지칭한다.

[0052] 핵산 서열 또는 단백질을 기재하는데 사용된 바와 같은 용어 "외인성"은 핵산 또는 단백질이 염색체, 또는 숙주 세포에 존재하는 위치에서 자연적으로 발생하지 않은 것을 의미한다. 외인성 핵산 서열은 또한 동일한 숙주 세포 또는 대상체로부터 유래되고 그에 삽입되지만, 비-자연 상태로, 예를 들어 상이한 카피 수로, 또는 상이한 조절 요소의 제어 하에 존재하는 서열을 지칭한다.

[0053] 핵산 서열 또는 단백질을 기재하는데 사용된 바와 같은 용어 "이종"은 핵산 또는 단백질이 발현되는 숙주 세포 또는 대상체와 상이한 유기체 또는 동일한 유기체의 상이한 종으로부터 유래된 것을 의미한다. 용어 "이종"은 플라스미드, 발현 카세트, 또는 벡터에서 단백질 또는 핵산에 관하여 사용될 때 단백질 또는 핵산이 다른 서열 또는 하위서열과 존재하며 해당 단백질 또는 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 것을 나타낸다.

[0054] 일 구현예에서, 조절 서열은 프로모터를 포함한다. 일 구현예에서, 프로모터는 닭 β-액틴 프로모터이다. 추가의 구현예에서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스 급초기 인핸서 및 닭 β-액틴 프로모터(CB7 프로모터)의 하이브리드이다. 다른 구현예에서, 적합한 프로모터는 비제한적으로, 신장 인자 1 알파(EF1 알파) 프로모터(예를 들어, Kim DW et al, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene. 1990 Jul 16;91(2):217-23 참조), 시냅신 1 프로모터(예를 들어, Kugler S et al, Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther. 2003 Feb;10(4):337-47 참조), 뉴런-특이적 에놀라제(NSE) 프로모터(예를 들어, Kim J et al, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. Endocrinology. 2004 Feb;145(2):613-9. Epub 2003 Oct 16 참조), 또는 CB6 프로모터(예를 들어, Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, Mol Biotechnol. 2016 Jan;58(1):30-6. doi: 10.1007/s12033-015-9899-5 참조)를 포함할 수 있다.

[0055] 일 구현예에서, 발현 카세트는 인간 대상체에서의 발현 및 분비를 위해 고안된다. 일 구현예에서, 발현 카세트

는 뇌 척수액 및 뇌를 포함한 중추 신경계(CNS)에서의 발현을 위해 고안된다. 추가의 구현예에서, 발현 카세트는 CNS 및 간 둘 다에서의 발현에 유용하다. 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 유도성/조절 프로모터를 포함하나 이로 제한되지 않는 적합한 프로모터가 선택될 수 있다. 구성적 프로모터의 예는 닭 베타-액틴 프로모터이다. 다양한 닭 베타-액틴 프로모터는 단독으로, 또는 다양한 인핸서 요소와 조합하여 기재된 바 있다(예를 들어, CB7은 사이토메갈로바이러스 인핸서 요소를 갖는 닭 베타-액틴 프로모터; 프로모터, 닭 베타 액틴의 제1 엑손 및 제1 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체를 포함하는 CAG 프로모터; CBh 프로모터이다, SJ Gray et al, *Hu Gene Ther*, 2011 Sep; 22(9): 1143-1153). 조직-특이적 프로모터의 예는 간 (알부민, Miyatake et al.,(1997) *J. Virol.*, 71:5124-32; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, Sandig et al.,(1996) *Gene Ther.*, 3:1002-9; 알파-태아단백질(AFP), Arbutnot et al.,(1996) *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14), 뉴런(예컨대 뉴런-특이적 에놀라제(NSE) 프로모터, Andersen et al.,(1993) *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15; 신경필라멘트 경쇄 유전자, Piccioli et al.,(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5; 및 뉴런-특이적 vgf 유전자, Piccioli et al.,(1995) *Neuron*, 15:373-84), 및 다른 조직에 대해 널리 알려져 있다. 대안적으로, 조절가능한 프로모터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함된, WO 2011/126808B2 참조.

[0056] 일 구현예에서, 조절 서열은 인핸서를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 조절 서열은 하나의 인핸서를 포함한다. 다른 구현예에서, 조절 서열은 2개 이상의 발현 인핸서를 함유한다. 이들 인핸서는 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서 또는 CMV 인핸서를 포함할 수 있다. 이러한 인핸서는 서로 인접하여 위치한 2개의 카피로 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 카피는 하나 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0057] 일 구현예에서, 조절 서열은 인트론을 추가로 포함한다. 추가의 구현예에서, 인트론은 닭 베타-액틴 인트론이다. 다른 적합한 인트론은 인간  $\beta$ -글로불린 인트론, 및/또는 상업적으로 입수가 가능한 Promega® 인트론에 의해 당업계에서 알려진 것들, 및 WO 2011/126808에 기재된 것들을 포함한다.

[0058] 일 구현예에서, 조절 서열은 폴리아데닐화 신호(폴리A)를 추가로 포함한다. 추가의 구현예에서, 폴리A는 토끼 글로빈 폴리 A이다. 예를 들어, WO 2014/151341 참조. 대안적으로, 다른 폴리A, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열, SV40 폴리A, 또는 합성 폴리A가 발현 카세트에 포함될 수 있다.

[0059] 본원에 기재된 발현 카세트 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.

[0060] 3. 벡터

[0061] 일 측면에서, 작용성 인간 N-술폴글루코사민 술포하이드롤라제(hSGSH)를 암호화하는 조작된 핵산 서열 및 표적 세포에서 그의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 벡터가 본원에 제공된다. 일 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1과 적어도 96% 동일하다. 추가의 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1이다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같은 "벡터"는 핵산 서열의 복제 또는 발현을 위해 적절한 표적 세포로 도입될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 생물학적 또는 화학적 모이어티이다. 벡터의 예는 재조합 바이러스, 플라스미드, 리포플렉스, 폴리머쥬, 폴리플렉스, 덴드리머, 세포 투과 펩티드(CPP) 접합체, 자성 입자, 또는 나노 입자를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 벡터는 작용성 SGSH를 암호화하는 외인성 또는 이중 또는 조작된 핵산이 삽입된 다음, 적절한 표적 세포로 도입될 수 있는 핵산 분자이다. 이러한 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 복제 기원, 및 재조합 DNA가 삽입될 수 있는 하나 이상의 부위를 갖는다. 벡터는 종종 벡터를 갖는 세포가, 예를 들어, 약물 내성 유전자를 암호화하지 않는 것들로부터 선택될 수 있는 수단을 갖는다. 공통의 벡터는 플라스미드, 바이러스 계통, 및 "인공 염색체"를 포함한다. 벡터의 생성, 생산, 특징화 또는 정량화의 통상적인 방법은 당업자에게 이용가능하다.

[0063] 일 구현예에서, 벡터는 그의 기재된 발현 카세트, 예를 들어, "네이키드 DNA", "네이키드 플라스미드 DNA", RNA, 및 mRNA를 포함하며; 예를 들어, 미셀, 리포솜, 양이온성 지질 - 핵산 조성물, 폴리-글리칸 조성물 및 다른 중합체, 지질 및/또는 콜레스테롤-기반 - 핵산 접합체, 및 본원에 기재된 바와 같은 다른 작제물을 포함한, 다양한 조성물 및 나노 입자와 커플링된 비-바이러스 플라스미드이다. 예를 들어, X. Su et al, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, 8(3), pp 774-787; 웹 공개: March 21, 2011; WO2013/182683, WO 2010/053572 및 WO 2012/170930을 참조하며, 모두 본원에 참조로 포함된다.

[0064] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 벡터는 "복제-결함 바이러스" 또는 SGSH를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는

발현 카세트가 바이러스 캡시드 또는 외피에 패키징된 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하는 "바이러스 벡터"이며, 여기서 또한 바이러스 캡시드 또는 외피 내에 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열은 복제-결핍이며; 즉, 이들은 자손 비리온을 생성할 수는 없지만 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 구현예에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제하는데 필요한 효소를 암호화하는 유전자를 포함하지 않지만(인공 게놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호에 의해 플랭킹된 SGSH를 암호화하는 핵산 서열만을 함유하는 게놈이 "무기능"하도록 조작될 수 있음), 이들 유전자는 생산 동안 공급될 수 있다. 따라서, 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재를 제외하고는 자손 비리온에 의한 복제 및 감염이 발생할 수 없으므로 유전자 요법에 사용하기에 안전한 것으로 간주된다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같이, 재조합 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 보카바이러스, 하이브리드 AAV/보카바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 렌티바이러스이다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 벡터(예를 들어, 재조합 AAV)가 생산되는 패키징 세포주를 지칭할 수 있다. 숙주 세포는 임의의 수단, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전, 미세주사, 형질전환, 바이러스 감염, 형질감염, 리포솜 전달, 막 융합 기술, 고속 DNA-코팅된 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합에 의해 세포로 도입된 외인성 또는 이중 DNA를 함유하는 원핵 또는 진핵 세포(예를 들어, 인간, 곤충, 또는 효모)일 수 있다. 숙주 세포의 예는 단리된 세포, 세포 배양물, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 비포유류 세포, 곤충 세포, HEK-293 세포, 간 세포, 신장 세포, 중추 신경계의 세포, 뉴런, 교질 세포, 또는 줄기 세포를 포함할 수 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 세포"는 작용성 SGSH의 발현이 바람직한 임의의 표적 세포를 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "표적 세포"는 MPS IIIA에 대해 치료받는 대상체의 세포를 참조하도록 의도된다. 표적 세포의 예는 간 세포, 신장 세포, 중추 신경계의 세포, 뉴런, 교질 세포, 및 줄기 세포를 포함할 수 있으나 이로 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 벡터는 생체의 표적 세포로 전달된다. 특정 구현예에서, 벡터는 생체 내 표적 세포로 전달된다.

[0068] 본원에 기재된 벡터 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.

[0069] 4. 아데노-연관 바이러스(AAV)

[0070] 일 측면에서, AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)가 본원에 제공된다. rAAV는 뮤코다당류증 IIIA형(MPS IIIA)의 치료에 사용하기 위한 것이다. 벡터 게놈은 AAV 5' 도립된 말단 반복부(ITR), 본원에 기재된 바와 같은 작용성 hSGSH를 암호화하는 조작된 핵산 서열, 표적 세포에서 hSGSH의 발현을 지시하는 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 일 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1과 적어도 95% 동일하다. 추가의 구현예에서, hSGSH 코딩 서열은 서열번호: 1이다.

[0071] 일 구현예에서, 조절 서열은 상기 기재된 바와 같다. 일 구현예에서, 벡터 게놈은 AAV 5' 도립된 말단 반복부(ITR), 본원에 기재된 바와 같은 발현 카세트, 및 AAV 3' ITR을 포함한다.

[0072] 일 구현예에서, AAV 혈청형 9(AAV9) 캡시드 및 토끼 베타-글로빈(rBG) 폴리A 서열을 갖는 인간 N-술폴글루코사민 술포하이드롤라제(hSGSH)의 조작된 버전을 발현하는 CB7 프로모터를 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 rAAV가 제공된다. 추가의 구현예에서, rAAV 벡터 게놈은 서열번호: 4의 서열(AAV.CB7.CI.hSGSHco.RBG)을 포함한다. 일 구현예에서, rAAV는 AAV9 캡시드 및 서열번호: 4의 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 rAAV는 AAV9.CB7.CI.hSGSHco.RBG로서 나타난다. 일 구현예에서, rAAV는 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 hSGSH의 조작된 버전을 발현한다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같이, "벡터 게놈"은 벡터 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 벡터 게놈은 rAAV 벡터를 형성하는 rAAV 캡시드 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 이러한 핵산 서열은 AAV 도립된 말단 반복부(ITR) 서열을 함유한다. 일 구현예에서, ITR은 캡시드를 공급하는 것과 상이한 AAV로부터의 것이다. 바람직한 구현예에서, AAV2로부터의 ITR 서열, 또는 그의 결실된 버전( $\Delta$  ITR)은 편의성 및 규제 승인을 가속화하기 위해 사용될 수 있다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터의 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2로부터의 것이고 AAV 캡시드가 다른 AAV 공급원으로부터의 것인 경우, 생성된 벡터는 위형(pseudotyped)이라고 명명될 수 있다. 전형적으로, AAV 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, SGSH 코딩 서열 및 임의의 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 그러나, 이들 요소의 다른 구성이 적합할 수 있다. D-서열 및 말단 분해 부위(trs)가 결실된,  $\Delta$  ITR이라고 명명되는 5' ITR의 단축된 버전이 기재된 바 있다. 다른 구현예에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "AAV"는 자연적으로 발생하는 아데노-연관 바이러스, 당업자에게 이용가능하고/하거나 본원에 기재된 조성물(들) 및 방법(들)을 고려한 아데노-연관 바이러스, 뿐만 아니라 인공 AAV를 지칭한다. 아데노-연관 바이러스(AAV) 바이러스 벡터는 표적 세포에 전달하기 위해 AAV 도립된 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹된 발현 카세트에 패키징된 AAV 단백질 캡시드를 갖는 AAV DNase-내성 입자이다. AAV 캡시드는 선택된 AAV에 따라, 대략 1:1:10 내지 1:1:20의 비로 정이십면체 대칭으로 배열된, 60개 캡시드(cap) 단백질 서브유닛, VP1, VP2, 및 VP3으로 구성된다. 상기 확인된 바와 같은 AAV 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 공급원으로서 다양한 AAV가 선택될 수 있다. 예를 들어, US 공개 특허 출원 번호 제2007-0036760-A1호; US 공개 특허 출원 번호 제2009-0197338-A1호; EP 1310571 참조. 또한, WO 2003/042397(AAV7 및 다른 유인원 AAV), US 특허 제7790449호 및 US 특허 제7282199호(AAV8), WO 2005/033321 및 US 7,906,111(AAV9), 및 WO 2006/110689, 및 WO 2003/042397(rh.10) 참조. 이들 문헌은 또한 AAV를 생성하기 위해 선택될 수 있는 다른 AAV를 기재하고 있으며 참조로 포함된다. 인간 또는 비인간 영장류(NHP)로부터 단리 또는 조작되고 널리 특성화된 AAV 중에서, 인간 AAV2는 유전자 전달 벡터로서 개발된 최초의 AAV이며; 상이한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험을 위해 널리 사용된 바 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 기재된 AAV 캡시드, ITR, 다른 선택된 AAV 구성요소는, 비제한적으로, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAV7M8 및 AAVAnc80으로서 공통으로 확인된 AAV, 임의의 알려지지거나 언급된 AAV의 변이체 또는 아직 발견되지 않은 AAV 또는 그의 변이체 또는 혼합물을 포함하는, 임의의 AAV 중에서 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, WO 2005/033321을 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 일 구현예에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드 또는 그의 변이체이다. 특정 구현예에서, 캡시드 단백질은 rAAV 벡터의 명칭에서 용어 "AAV" 다음에 나오는 숫자 또는 숫자 및 문자의 조합에 의해 지정된다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, AAV와 관련하여, 용어 "변이체"는 보존적 아미노산 대체를 갖는 것들, 및 아미노산 또는 핵산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 공유하는 것들을 포함한, 알려진 AAV 서열로부터 유래된 임의의 AAV 서열을 의미한다. 다른 구현예에서, AAV 캡시드는 임의의 기재된 또는 알려진 AAV 캡시드 서열로부터 최대 약 10% 변이를 포함할 수 있는 변이체를 포함한다. 즉, AAV 캡시드는 본원에 제공되고/되거나 당업계에 알려진 AAV 캡시드에 대해 약 90% 동일성 내지 약 99.9% 동일성, 약 95% 내지 약 99% 동일성 또는 약 97% 내지 약 98% 동일성을 공유한다. 일 구현예에서, AAV 캡시드는 AAV 캡시드와 적어도 95% 동일성을 공유한다. AAV 캡시드의 퍼센트 동일성을 결정할 때, 임의의 가변 단백질(예를 들어, vp1, vp2, 또는 vp3)에 대한 비교가 이루어질 수 있다.

[0076] ITR 또는 다른 AAV 구성요소는 당업자에게 이용가능한 기술을 사용하여 AAV로부터 용이하게 단리 또는 조작될 수 있다. 이러한 AAV는 학술적, 상업적, 또는 공공 공급원(예를 들어, American Type Culture Collection, 버지니아주 머내서스 소재)으로부터 단리, 조작, 또는 수득될 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 문헌 또는 예를 들어, GenBank, PubMed 등과 같은 데이터베이스에서 이용가능한 것과 같은 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 다른 적합한 수단을 통해 조작될 수 있다. AAV 바이러스는 통상적인 분자 생물학 기술에 의해 조작되어, 핵산 서열의 세포 특이적 전달, 면역원성 최소화, 안정성 및 입자 수명 조정, 효율적 분해, 핵으로의 정확한 전달 등을 위해 이들 입자를 최적화하는 것을 가능하게 만든다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, 상호교환가능하게 사용되는 용어 "rAAV" 및 "인공 AAV"는, 비제한적으로, 캡시드 단백질 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 AAV를 의미하며, 여기서 벡터 게놈은 AAV와 이종인 핵산을 포함한다. 일 구현예에서, 캡시드 단백질은 자연적으로 발생하지 않는 캡시드이다. 이러한 인공 캡시드는 선택된 AAV 서열(예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 동일한 AAV의 인접하지 않은 부분안 상이하게 선택된 AAV, 비-AAV 바이러스 공급원, 또는 비-바이러스 공급원으로부터 수득될 수 있는 이종 서열과 조합하여 사용하는, 임의의 적합한 기술에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV는, 비제한적으로, 위형 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드, 또는 "인간화" AAV 캡시드일 수 있다. 하나의 AAV의 캡시드가 이종 캡시드 단백질로 대체된 위형 벡터가 본 발명에 유용하다. 일 구현예에서, AAV2/5 및 AAV2/8은 예시적인 위형 벡터이다. 선택된 유전 요소는 형질감염, 전기천공, 리포솜 전달, 막 융합 기술, 고속 DNA-코팅된 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합을 포함한 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 이러한 작제물을 제조하는데 사용되는 방법은 핵산 조작 당업자에게 알려져 있고 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) 참조.

[0078] 본원에 사용된 바와 같이, "AAV9 캡시드"는 (a) 본원에 참조로 포함되고 AAV vp1 캡시드 단백질이 서열번호: 6

에 복제된, GenBank 수탁 번호: AAS99264의 아미노산 서열, 및/또는 (b) GenBank 수탁 번호: AY530579.1: (nt 1..2211)의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열(서열번호: 7에 복제됨)을 갖는 AAV9를 지칭한다. 이 암호화된 서열로부터의 일부 변이가 본 발명에 포함되며, GenBank 수탁 번호: AAS99264 및 US7906111(또한 WO 2005/033321)의 참조 아미노산에 대해 약 99% 동일성(즉, 참조 서열로부터 약 1% 미만 변이)을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 AAV는, 예를 들어, 자연적 단리물(예를 들어, hu68("신규 아데노-연관 바이러스(AAV) 클레이드 F 벡터 및 그의 용도"라는 발명의 명칭으로 동시계류중인 2017년 2월 28일자로 출원된 US 특허 출원 번호 제62/464,748호 및 2019년 11월 27일자로 출원된 US 특허 출원 번호 제62/591,002호, 및 WO 2018/160582에 기재됨), hu31 또는 hu32), 또는 예를 들어, US 9,102,949, US 8,927,514, US2015/349911; WO 2016/049230A11; US 9,623,120; US 9,585,971에 기재된 바와 같이, 예를 들어, AAV9 캡시드와 정렬된 임의의 다른 AAV 캡시드에서의 상응하는 위치로부터 "보충된" 대체 잔기로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하나 이로 제한되지 않는 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 AAV9의 변이체를 포함할 수 있다. 그러나, 다른 구현예에서, AAV9의 다른 변이체, 또는 상기 참조 서열에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 AAV9 캡시드가 선택될 수 있다. 예를 들어, US 공개 특허 출원 번호 제2015/0079038호 참조. 캡시드를 생성하는 방법, 그에 따른 코딩 서열, 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법이 기재된 바 있다. 예를 들어, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 및 US 2013/0045186A1 참조.

[0079] 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV는 자기-상보성 AAV이다. "자기-상보성 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열에 의해 운반되는 코딩 영역이 분자내 이중-가닥 DNA 주형을 형성하도록 고안된 작제물을 지칭한다. 감염 시, 제2 가닥의 세포 매개 합성을 기다리기 보다는, scAAV의 2개의 상보성 반쪽은 복제 및 전사를 매개할 준비가 된 1개의 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 형성하도록 회합될 것이다. 예를 들어, 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 참조. 자기-상보성 AAV는, 예를 들어, U.S. 특허 번호 제6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기재되어 있으며, 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0080] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 rAAV는 뉴클레아제-내성이다. 이러한 뉴클레아제는 단일 뉴클레아제, 또는 뉴클레아제의 혼합물일 수 있고, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다. 뉴클레아제-내성 rAAV는 AAV 캡시드가 완전히 어셈블리되고 이들 패키징된 게놈 서열을 생산 과정으로부터 존재할 수 있는 오염 핵산을 제거하도록 고안된 뉴클레아제 인큐베이션 단계 동안 분해(소화)로부터 보호함을 나타낸다. 많은 경우에, 본원에 기재된 rAAV는 DNase 내성이다.

[0081] 본원에 기재된 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)는 알려진 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2 참조. 이러한 방법은 AAV 캡시드를 암호화하는 핵산 서열; 작용성 rep 유전자; AAV 도립된 말단 반복부(ITR)에 의해 플랭킹된 본원에 기재된 바와 같은 발현 카세트; 및 발현 카세트를 AAV 캡시드 단백질로 패키징하도록 하는데 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 수반한다. 또한 AAV 캡시드를 암호화하는 핵산 서열; 작용성 rep 유전자; 기재된 바와 같은 벡터 게놈; 및 벡터 게놈을 AAV 캡시드 단백질로 패키징하도록 하는데 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포가 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 HEK 293 세포이다. 이들 방법은 WO2017160360 A2에 보다 상세하게 기재되어 있으며, 본원에 참조로 포함된다.

[0082] 당업자에게 이용가능한 rAAV를 생산하는 다른 방법이 활용될 수 있다. 적합한 방법은 비제한적으로, 배클로바 이러스 발현 시스템 또는 효모를 통한 생산을 포함할 수 있다. 예를 들어, Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15; 20(R1): R2-R6. 2011년 4월 29일 온라인 공개됨. doi: 10.1093/hmg/ddr141; Aucoin MG et al., Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. Biotechnol Bioeng. 2006 Dec 20;95(6):1081-92; SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. Thesis presented to the Graduate School of the University of Florida, 2012; Kondratov O et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, Mol Ther. 2017 Aug 10. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003.[인쇄 전 Epub]; Mietzsch M et al, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsulation of Foreign DNA. Hum Gene Ther Methods. 2017 Feb;28(1):15-22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.; Li L et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic

source of DNA for gene transfer. PLoS One. 2013 Aug 1;8(8):e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013; Galibert L et al, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. J Invertebr Pathol. 2011 Jul;107 Suppl:S80-93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008; 및 Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15;20(R1):R2-6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub 2011 Apr 29 참조.

[0083] 벡터 약물 생성물을 정제하고 빈 캡시드를 제거하기 위해 고염 농도에서의 2-단계 친화성 크로마토그래피 정제 이어서 음이온 교환 수지 크로마토그래피가 사용된다. 이들 방법은 "AAV9에 대한 확장가능한 정제 방법"이라는 발명의 명칭의 WO 2017/160360에 보다 상세하게 기재되어 있으며, 본원에 참조로 포함된다. 요약하면, 패키징된 게놈 서열을 갖는 rAAV9 입자를 게놈-결합 AAV9 중간체로부터 분리하는 방법은 재조합 AAV9 바이러스 입자 및 AAV 9 캡시드 중간체를 포함하는 현탁액을 고속 성능 액체 크로마토그래피에 적용하는 단계를 수반하며, 여기서 AAV9 바이러스 입자 및 AAV9 중간체는 10.2의 pH에서 평형화된 강한 음이온 교환 수지에 결합되고, 약 260 및 약 280에서 자외선 흡광도에 대해 용리액을 모니터링하면서 염 구배에 적용된다. rAAV9에 대해 덜 최적이지만, pH는 약 10.0 내지 10.4의 범위일 수 있다. 이 방법에서, AAV9 가득한 캡시드는 A260/A280의 비가 변곡점에 도달할 때 용리된 분획으로부터 수집된다. 일 예에서, 친화성 크로마토그래피 단계의 경우, 투석여과된 생성물은 AAV2/9 혈청형을 효율적으로 포획하는 Capture Select™ Poros-AAV2/9 친화성 수지(Life Technologies)에 적용될 수 있다. 이들 이온성 조건 하에, 상당한 백분율의 잔류 세포 DNA 및 단백질이 칼럼을 통해 유동하는 동안, AAV 입자는 효율적으로 포획된다.

[0084] rAAV의 특징화 또는 정량화를 위한 통상적인 방법은 당업자에게 이용가능하다. 빈 입자 함량 및 가득한 입자 함량을 계산하기 위해, 선택된 샘플에 대한 VP3 밴드 부피(예를 들어 본원의 예에서 요오딕사놀 구배-정제된 제제 여기서 GC의 # = 입자의 #)는 로딩된 GC 입자에 대해 플롯팅된다. 생성된 선형 방정식( $y = mx+c$ )을 사용하여 시험군 피크의 밴드 부피 중 입자의 수를 계산한다. 이어서 로딩된 20  $\mu$ L 당 입자(pt)의 수에 50을 곱하여 입자(pt)/mL를 제공한다. Pt/mL를 GC/mL로 나누어 입자 대 게놈 카피의 비(pt/GC)를 제공한다. Pt/mL-GC/mL는 빈 pt/mL를 제공한다. 빈 pt/mL을 pt/mL로 나누고 100을 곱하여 빈 입자의 백분율을 제공한다. 일반적으로, 빈 캡시드 및 패키징된 게놈을 갖는 AAV 벡터 입자를 검정하는 방법은 당업계에 알려진 바 있다. 예를 들어, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128 참조. 변성된 캡시드를 시험하기 위해, 상기 방법은 처리된 AAV 스톱을 3개의 캡시드 단백질을 분리할 수 있는 임의의 겔, 예를 들어, 완충액 중 3-8% Tris-아세테이트를 함유하는 구배 겔로 이루어진 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 적용한 다음, 샘플 물질이 분리될 때까지 겔을 영동시키고, 상기 겔을 나일론 또는 니트로셀룰로스 막, 바람직하게는 나일론 위에 블롯팅하는 단계를 포함한다. 이어서 변성된 캡시드 단백질에 결합하는 1차 항체로서 항-AAV 캡시드 항체, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단클론 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단클론 항체가 사용된다(Wobus et al., *J. Virol.*(2000) 74:9281-9293). 이어서 1차 항체에 결합하고 1차 항체와의 결합을 검출하기 위한 수단을 함유하는 2차 항체, 보다 바람직하게는 공유적으로 결합된 검출 분자를 함유하는 항-IgG 항체, 가장 바람직하게는 서양고추냉이 퍼옥시다제에 공유적으로 연결된 양 항-마우스 IgG 항체가 사용된다. 1차 항체와 2차 항체 사이의 결합을 반정량적으로 결정하기 위해 결합을 검출하는 방법, 바람직하게는 방사성 동위원소 방출, 전자기 방사선, 또는 비색 변화를 검출할 수 있는 검출 방법, 가장 바람직하게는 화학발광 검출 키트가 사용된다. 예를 들어, SDS-PAGE의 경우, 칼럼 분획으로부터의 샘플을 취하여 환원제(예를 들어, DTT)를 함유하는 SDS-PAGE 로딩 완충액에서 가열될 수 있고, 캡시드 단백질은 사전 주조형 구배 폴리아크릴아미드 겔(예를 들어, Novex) 상에서 분해되었다. 은 염색은 제조업체의 설명서에 따른 SilverXpress(Invitrogen, 캘리포니아주 소재) 또는 다른 적합한 염색 방법, 즉, SYPRO 루비 또는 코마시 염색을 사용하여 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 칼럼 분획 중 AAV 벡터 게놈(vg)의 농도는 정량적 실시간 PCR(Q-PCR)에 의해 측정될 수 있다. 샘플을 희석하고 DNase I(또는 다른 적합한 뉴클레아제)로 소화시켜 외인성 DNA를 제거한다. 뉴클레아제의 불활성화 후, 샘플을 추가로 희석시키고 프라이머 및 프라이머 사이의 DNA 서열에 특이적인 TaqMan™ 플루오로제닉 프로브를 사용하여 증폭시킨다. 정의된 형광 수준에 도달하는데 필요한 주기 수(임계값 주기, Ct)는 각각의 샘플에 대해 Applied Biosystems Prism 7700 서열 검출 시스템 상에서 측정한다. AAV 벡터에 함유된 것과 동일한 서열을 함유하는 플라스미드 DNA를 이용하여 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성한다. 샘플로부터 수득된 주기 임계값(Ct)을 사용하여 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값에 정규화함으로써 벡터 게놈 역가를 결정한다. 디지털 PCR에 기초한 중점 검정이 또한 사용될 수 있다.

[0085] 일 측면에서, 광범위 스펙트럼 세린 프로테아제, 예를 들어, 프로테이나제 K(예컨대 Qiagen으로부터 상업적으로 입수가가능함)를 활용하는 최적화된 q-PCR 방법이 사용된다. 보다 특히, 최적화된 qPCR 게놈 역가 검정은 DNase

I 소화 후, 샘플을 프로테이나제 K 완충액으로 희석하고 프로테이나제 K로 처리한 다음 열 불활성화시킨다는 점을 제외하고는, 표준 검정과 유사하다. 적합하게 샘플을 샘플 크기와 동일한 양의 프로테이나제 K 완충액으로 희석한다. 프로테이나제 K 완충액은 2배 이상으로 농축될 수 있다. 전형적으로, 프로테이나제 K 처리는 약 0.2 mg/mL이지만, 0.1 mg/mL 내지 약 1 mg/mL로 달라질 수 있다. 처리 단계는 일반적으로 약 55°C에서 약 15분 동안 수행되지만, 더 낮은 온도(예를 들어, 약 37°C 내지 약 50°C)에서 더 긴 시간(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분)에 걸쳐, 또는 더 높은 온도(예를 들어, 최대 약 60°C)에서 더 짧은 시간(예를 들어, 약 5 내지 10분) 동안 수행될 수 있다. 유사하게, 열 불활성화는 일반적으로 약 95°C에서 약 15분 동안이지만, 온도는 더 낮아지고(예를 들어, 약 70 내지 약 90°C) 시간은 연장될 수 있다(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분). 이어서 샘플을 희석하고(예를 들어, 1000배) 표준 검정에 기재된 바와 같은 TaqMan 분석에 적용한다.

[0086] 추가적으로, 또는 대안적으로, 액적 디지털 PCR(ddPCR)이 사용될 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의한 단일-가닥 및 자기-상보성 AAV 벡터 계층 역가를 결정하는 방법이 기재된 바 있다. 예를 들어, M. Lock et al, *Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14 참조.

[0087] 캡시드 단백질의 vp1, vp2 및 vp3 사이의 비를 결정하는 방법이 또한 이용가능하다. 예를 들어, Vamseedhar Rayaprolu et al, *Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol*. 2013 Dec; 87(24): 13150-13160; Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J. Virol.* 25:331-338; 및 Rose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J. Virol.* 8:766-770 참조.

[0088] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 MPS IIIA의 하나 이상의 증상의 완화, SGSH의 바람직한 기능의 회복, 또는 질환 바이오마커의 개선을 목적으로 하는 조성물(들) 및/또는 방법(들)을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 본원에 나타난 목적을 위해 본원에 기재된 하나 이상의 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하여 정의된다. 따라서 "치료"는 주어진 대상체에서 MPS IIIA의 발병 또는 진행 감소, 질환 예방, 질환 증상의 심각도 감소, 질환 증상의 진행 지연, 질환 증상 제거, 질환 진행 지연, 또는 요법의 효능 증가 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0089] 본원에 기재된 rAAV 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.

[0090] 5. 약제학적 조성물

[0091] 일 측면에서, 제형 완충액 중 본원에 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 작용성 hSGSH 단백질 또는 작용성 슬파타제-변형 인자 1(SUMF1)과의 공동-투여에 적합하다. 일 구현예에서, 제형 완충액 중 본원에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, rAAV는 약  $1 \times 10^9$  게놈 카피(GC)/mL 내지 약  $1 \times 10^{14}$  GC/mL로 제형화된다. 추가의 구현예에서, rAAV는 약  $3 \times 10^9$  GC/mL 내지 약  $3 \times 10^{13}$  GC/mL로 제형화된다. 또한 추가의 구현예에서, rAAV는 약  $1 \times 10^9$  GC/mL 내지 약  $1 \times 10^{13}$  GC/mL로 제형화된다. 일 구현예에서, rAAV는 적어도 약  $1 \times 10^{11}$  GC/mL로 제형화된다.

[0092] 일 구현예에서, 제형은 수성 현탁 액체에 용해된 계면활성제, 방부제, 부형제, 및/또는 완충액을 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 완충액은 PBS이다. 다른 구현예에서, 완충액은 인공 뇌척수액(aCSF), 예를 들어, 엘리엇 제형 완충액; 또는 하버드 장치 관류액(최종 이온 농도(mM): Na 150; K 3.0; Ca 1.4; Mg 0.8; P 1.0; Cl 155를 갖는 인공 CSF)이다. 완충 염수, 계면활성제, 및 약 100 mM 염화나트륨(NaCl) 내지 약 250 mM 염화나트륨에 동등한 이온 강도로 조정된 생리학적으로 적합한 염 또는 염의 혼합물, 또는 동등한 이온 농도로 조정된 생리학적으로 적합한 염 중 하나 이상을 포함하는 것들을 포함한 다양한 적합한 용액이 알려져 있다.

[0093] 적합하게는, 제형은 생리학적으로 허용되는 pH, 예를 들어, pH 6 내지 8, 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7, 또는 pH 7.2 내지 7.8의 범위로 조정된다. 뇌척수액의 pH가 약 7.28 내지 약 7.32이므로, 척수강내 전달을 위해, 이 범위 내에서의 pH가 바람직할 수 있는 반면; 정맥내 전달을 위해, 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이들 하위 범위 내에서의 다른 pH가 다른 전달 경로를 위해 선택될 수 있다.

[0094] 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합은 무독성인 비이온성 계면활성제 중에서 선택될 수 있다. 일 구현

예에서, 1차 하이드록실 기에서 중결되는 이작용성 블록 공중합체 계면활성제, 예를 들어, 중성 pH를 가지며 8400의 평균 분자량을 갖는 폴록사머 188로도 알려진 예컨대 Pluronic® F68[BASF]이 선택된다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇠에 의해 플랭킹된 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇠, SOLUTOL HS 15(마크로골-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(폴리옥시 카프릴산 글리세리드), 폴리옥시 10 올레일 에테르, TWEEN(폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성된 비이온성 트리블록 공중합체가 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 공중합체는 공통적으로 문자 "P"(폴록사머의 경우) 다음에 나오는 3자리로 명명된다: 처음 2자리 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자 질량을 제공하고, 마지막 자리 x 10은 백분율 폴리옥시에틸렌 함량을 제공한다. 일 구현예에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005% 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다.

[0095] 일 예에서, 제형은, 예를 들어, 물 중에 염화나트륨, 중탄산나트륨, 텍스트로스, 황산마그네슘(예를 들어, 황산 마그네슘 · 7H<sub>2</sub>O), 염화칼륨, 염화칼슘(예를 들어, 염화칼슘 · 2H<sub>2</sub>O), 이염기성 인산나트륨, 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함하는 완충 식염수 용액을 함유할 수 있다. 적합하게는, 척수강내 전달을 위해, 삼투압 농도는 뇌척수액과 적합한 범위(예를 들어, 약 275 내지 약 290) 내에 있으며; 예를 들어, [emedicine.medscape.com/article/2093316-overview](http://emedicine.medscape.com/article/2093316-overview)를 참조한다. 임의적으로, 척수강내 전달을 위해, 상업적으로 입수가 가능한 희석제가 현탁제로서, 또는 다른 현탁제 및 다른 임의적인 부형제와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, Elliotts B® 용액[Lukare Medical] 참조.

[0096] 다른 구현예에서, 제형은 하나 이상의 투과 증진제를 함유할 수 있다. 적합한 투과 증진제의 예는, 예를 들어, 만니톨, 나트륨 글리코콜레이트, 나트륨 타우로콜레이트, 나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 살리실레이트, 나트륨 카프릴레이트, 나트륨 카프레이트, 나트륨 라우릴 술페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 또는 EDTA를 포함할 수 있다.

[0097] 약제학적으로 허용되는 담체 및 본원에 기재된 바와 같은 작용성 SGSH를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물이 추가적으로 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 향미생물제 및 향진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 널리 알려져 있다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 혼입될 수 있다. 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 미세구체, 지질 입자, 소포 등과 같은 전달 비히클은 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포 내로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 전달을 위해 지질 입자, 리포솜, 소포, 나노구체, 또는 나노 입자 등에 캡슐화된 rAAV 벡터가 전달되도록 제형화될 수 있다. 일 구현예에서, 치료 유효량의 상기 벡터가 약제학적 조성물에 포함된다. 담체의 선택은 본 발명의 제한이 아니다. 방부제, 또는 화학적 안정화제와 같은 다른 통상적인 약제학적으로 허용되는 담체. 적합한 예시적인 방부제는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀, 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0098] 어구 "약제학적으로 허용되는"은 숙주에 투여될 때 알레르기 또는 유사한 유해 반응을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "투여량" 또는 "양"은 치료 과정에서 대상체에 전달되는 총 투여량 또는 양, 또는 단일 단위(또는 다중 단위 또는 분할 투여량) 투여로 전달되는 투여량 또는 양을 지칭할 수 있다.

[0100] 또한, 복제-결합 바이러스 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 약  $1.0 \times 10^9$  GC 내지 약  $1.0 \times 10^{16}$  GC(체중 70 kg의 평균 대상체를 치료하기 위함), 및 인간 환자의 경우 바람직하게는  $1.0 \times 10^{12}$  GC 내지  $1.0 \times 10^{14}$  GC의 범위에 있는 복제-결합 바이러스의 양을 함유하도록 투여량 단위로 제형화될 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ , 또는  $9 \times 10^9$  GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ , 또는  $9 \times 10^{10}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ , 또는  $9 \times 10^{11}$  GC를 함유하

도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ , 또는  $9 \times 10^{12}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ , 또는  $9 \times 10^{13}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ , 또는  $9 \times 10^{14}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당 적어도  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ , 또는  $9 \times 10^{15}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 일 구현예에서, 인간 적용을 위해 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량 당  $1 \times 10^{10}$  내지 약  $1 \times 10^{12}$  GC 범위일 수 있다.

[0101] 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물은 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^9$  GC 내지 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^{14}$  GC의 용량으로 투여가능하다.

[0102] 수성 현탁액 또는 본원에 기재된 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 전달되도록 고안된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 뇌실내(ICV), 척수강내(IT), 또는 수조내 주사를 통해 전달되도록 제형화된다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에 정맥내 주사에 의해 전달되도록 고안된다. 대안적으로, 다른 투여 경로가 선택될 수 있다(예를 들어, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안구내, 근육내, 및 다른 비경구 경로).

[0103] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "척수강내 전달" 또는 "척수강내 투여"는 뇌척수액(CSF)에 도달하도록 척추관, 보다 구체적으로 지주막하 공간으로 주사를 통한 약물의 투여 경로를 지칭한다. 척수강내 전달은 요추 천자, 뇌실내, 후두하/수조내, 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 물질은 요추 천자에 의해 지주막하 공간 전체에 확산하도록 도입될 수 있다. 다른 예에서, 대수조로 주사될 수 있다. 수조내 전달은 백터 확산을 증가시키고/시키거나 투여에 의해 야기되는 독성 및 염증을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, Christian Hinderer et al, Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna, Mol Ther Methods Clin Dev. 2014; 1: 14051. Published online 2014 Dec 10. doi: 10.1038/mtm.2014.51 참조.

[0104] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "수조내 전달" 또는 "수조내 투여"는 뇌 심실의 뇌척수액으로 또는 소뇌숨뇌 대수조 내에 직접적으로, 보다 구체적으로 후두하 천자를 통해 또는 대수조에 직접 주사에 의해 또는 영구적으로 위치한 튜브를 통해 약물을 투여하는 경로를 지칭한다. 도 6은 수조내 주사가 어떻게 이루어질 것인지에 대한 예시를 제공한다.

[0105] 본원에 기재된 약제학적 조성물 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지펜, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.

[0106] 6. 치료 방법

[0107] 일 측면에서, MPS IIIA로 진단된 인간 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 현재, MPS III의 임상 의심이 있을 때, 제1 단계는 디메틸메틸렌 블루(DMB)를 사용하는 분광광도 방법을 통해 소변에서 GAG의 존재를 검출하는 정량 검사의 요청이다. DMB 검사는 디메틸메틸렌 블루에 대한 GAG의 결합 및 분광광도계를 사용한 GAG-DMB 복합체의 정량화에 기초한다. 이 검사의 민감도는 100%이며, 특이도는 75-100%이다. 소변에서 GAG를 검출할 때 부정적인 결과는 질환의 약화된 형태를 갖는 일부 환자에서, GAG 배설 수준이 건강한 대조군과 중첩될 수 있고 MPS III에서 헤파란 술페이트의 증가된 배설이 무시될 수 있다는 사실로 인해 MPS III의 존재를 배제하지 않는다. 진단을 위한 현재의 금 표준 기술은 배양된 피부 섬유아세포, 백혈구, 혈장 또는 혈청에서 효소 활성을 결정하는 것이다. MPS IIIA의 특이적 진단은 환자의 백혈구 또는 섬유아세포에서 헤파란 술페이트의 분해에 수반되는 SGSH 효소적 활성 중 하나의 감소 또는 부재를 제시함으로써 확인되며; 감소는 다른 술포타제에서 정상상태인 건강한 개인에서의 활성과 비교할 때 10% 미만이어야 한다. 다수의 술포타제의 결핍으로 인한 질환이 또한 헤파란 N-술포타제, N-아세틸글루코사민 6-술포타제 및 다른 술포타제의 활성에서의 감소를 제시하기 때문에, MPS III의 진단을 확인하고 따라서 다수의 술포타제 결핍을 배제하기 위해 적어도 다른 술포타제의 생화학적 분석이 요구된다. 그러나, 진단 방법은 본 발명의 제한이 아니며 다른 적합한 방법이 선택될 수 있다.

- [0108] 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 벡터의 현탁액을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 방법은 제형 완충액 중 본원에 기재된 바와 같은 rAAV의 현탁액을 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^9$  GC 내지 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^{14}$  GC의 용량으로 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0109] 본원에 제공된 조성물(들) 및 방법(들)은 MPS IIIA가 있는 필요로 하는 대상체를 치료하는데 효능을 달성한다. 대상체에서 방법의 효능은 (a) SGSH 효소적 활성의 증가; (b) MPS IIIA 증상의 완화; (c) MPS IIIA-관련 바이오마커, 예를 들어, 뇌척수액(CSF), 혈청, 소변 및/또는 다른 생물학적 샘플에서 GAG 수준 폴리아민(예를 들어, 스페르민) 수준의 개선; 또는 (e) MPS IIIA에 대한 임의의 치료(들)의 촉진을 평가함으로써 제시될 수 있다. 특정 구현예에서, 효능은 인지 개선 및/또는 불안 교정, 보행 및/또는 이동성 개선, 떨림 빈도 및/또는 심각도의 감소, 움켜잡기/경련의 감소, 자세 개선, 각막 불투명도 개선을 모니터링함으로써 결정될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 방법의 효능은 동물 모델에 기초하여 예측될 수 있다. 적합한 뮤린 모델의 일 예는 실시예 1에 기재되어 있다. 다른 구현예에서, 다중과라미터 등급화 척도를 개발하여 동물 모델에서 본원에 기재된 MPSIIIA 벡터 요법에 대한 질환 교정 및 반응을 평가하였다. 본원에 참조로 포함된 도 5 참조. 동물은 떨림, 자세, 모피 품질, 움켜잡기, 각막 혼탁, 및 보행/이동성의 조합 평가에 기초하여 점수를 부여받는다. 특정 구현예에서, 이들 인자 중 하나 이상의 임의의 조합을 단독으로 또는 다른 인자와 조합하여 사용하여 효능을 입증할 수 있다. 예를 들어, Burkholder et al. *Curr Protoc Mouse Biol.* June 2012, 2:145-65; Tumpey et al. *J Virol.* May 1998, 3705-10; 및 Guyenet et al. *J Vis Exp*, May 2010, 39; 1787 참조. 처리된 동물의 인지 개선 및 불안 교정은 개방 필드(즉, 예를 들어, Tatem et al. *J Vis Exp*, 2014,(91):51785에 기재된 바와 같은 빔 차단 측정) 및 고가 플러스 미로 검정(예를 들어, Walf and Frye, *Nat Protoc*, 2007, 2(2): 322-328에 기재된 바와 같음)에서의 움직임을 평가함으로써 평가된다.
- [0110] 본원에 사용된 바와 같이, "MPS IIIA에 대한 임의의 치료(들)의 촉진" 또는 그의 임의의 문법적 변이는 기재된 조성물(들)의 투여 및 기재된 방법(들)의 사용이 없는 표준 치료의 것과 비교하여, 본 발명에 처음으로 개시된 조성물(들) 또는 방법(들) 이외에 대상체에서 MPS IIIA의 치료의 감소된 투여량 또는 더 낮은 빈도를 지칭한다. 본원에 기재된 조성물(들) 또는 방법(들)에 의해 촉진된 적합한 치료의 예는 증상(예컨대 발작 및 수면 장애)을 완화시키고 삶의 질을 개선시키는데 사용되는 의약; 조절 줄기 세포 이식, 예컨대 골수 이식 또는 체대혈 이식; 정맥내 투여 또는 뇌실내 주입을 통한 효소 대체 요법(ERT); 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으나 이로 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 기재된 방법은 대상체가 MPS IIIA와 관련된 바이오마커의 개선을 입증하는 것을 초래한다.
- [0111] "SGSH 효소적 활성의 증가"는 용어 "바람직한 SGSH 작용의 증가"와 상호교환가능하게 사용되며, 건강한 환자에 대한 SGSH 효소 범위의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100%의 SGSH 활성을 지칭한다. SGSH 효소적 활성은 본원에 기재된 바와 같은 검정에 의해 측정될 수 있다. 일 구현예에서, SGSH 효소적 활성은 혈청, 혈장, 혈액, 소변, CSF, 또는 다른 생물학적 샘플에서 측정될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 투여, 또는 본원에 기재된 바와 같은 방법의 사용은 혈청, 혈장, 타액, 소변 또는 다른 생물학적 샘플에서 SGSH 효소적 활성의 증가를 초래한다. 대안적으로, CSF GAG 수준 및 다른 CSF 바이오마커 예컨대 스페르민 수준을 측정하여 치료 효과를 결정할 수 있다. 예를 들어, WO 2017/136533 참조.
- [0112] 신경인지는 통상적인 방법에 의해 결정될 수 있으며, 예를 들어, WO 2017/136500 A1을 참조한다. 신경인지 저하의 예방은 본원에 기재된 조성물이 투여되고 본원에 기재된 방법을 받은 대상체의 신경인지 저하가 MPS IIIA 환자의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 20%, 적어도 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100%만큼 둔화되는 것을 지칭한다.
- [0113] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "바이오마커" 또는 "MPS IIIA-관련 바이오마커"는 긍정적인 또는 부정적인 문제에서 MPS IIIA의 진행 또는 발달과 상관관계가 있는 대상체의 생물학적 샘플에서 생물학적 또는 화학적 분자의 존재, 농도, 발현 수준 또는 활성을 지칭한다. 일 구현예에서, 바이오마커는 뇌척수액(CSF), 혈청, 소변, 피부 섬유아세포, 백혈구, 혈장, 또는 임의의 다른 생물학적 샘플에서의 GAG 수준이다. 다른 구현예에서, 바이오마커는 임상 화학을 사용하여 평가된다. 또 다른 구현예에서, 바이오마커는 간 또는 비장 부피이다. 일 구현예에서, 바이오마커는 헤파란 N-sulphataze, N-아세틸글루코사민 6-sulphataze 및 다른 sulphataze의 활성이다. 다른 구현예에서, 바이오마커는 CSF, 혈청, 또는 다른 생물학적 샘플에서의 스페르민 수준이다. 또 다른 구현예에서, 바이오마커는 혈청, CSF, 또는 다른 생물학적 샘플에서의 리소좀 효소 활성이다. 일 구현예에서,

바이오마커는 뇌의 자기 공명 영상(MRI)을 통해 평가된다. 다른 구현예에서, 바이오마커는 신경인지 발달 검정에 의해 측정된 신경인지 점수이다. 본원에 사용된 바와 같은 어구 "바이오마커의 개선"은 질환의 진행과 긍정적으로 상관관계가 있는 바이오마커의 감소, 또는 질환의 진행과 부정적으로 상관관계가 있는 바이오마커의 증가를 의미하며, 여기서 감소 또는 증가는 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 투여 또는 본원에 기재된 바와 같은 방법의 사용 전과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 20%, 적어도 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100%이다.

[0114] 일 구현예에서, 상기 방법은 본원에 제공된 요법으로 요법의 개시 전에 대상체에서 MPS IIIA와 관련된 바이오마커를 검출 또는 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 샘플에서 폴리아민(예컨대 스페르민)인 바이오마커의 검출을 포함한다(WO/2017/136533 참조, 본원에 참조로 포함됨). 특정 구현예에서, 환자 샘플에서의 스페르민 농도 수준을 검출하여 본원에 기재된 바와 같은 벡터를 사용하는 MPSIII에 대한 치료의 효과를 모니터링한다.

[0115] 현재, MPSIII가 있는 환자는 골수 이식(BMT), 기질 감소 요법(SRT) 또는 효소 대체 요법(ERT)을 위한 후보로 간주되지 않는다. 그러나, 특정 구현예에서, 본원에 기재된 SGSH를 발현하는 벡터로 치료된 유전자 요법 환자는 임의의 정상 이하 범위의 효소 수준이 ERT 또는 SRT로 치료될 수 있는 최소한의 충분한 효소 발현 수준을 갖는다. 이러한 ERT는 ERT의 용량이 벡터 투약 후 수개월 또는 수년 동안 모니터링되고 조절되는 공동-요법일 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, SRT는 SRT의 용량이 벡터 투약 후 수개월 또는 수년 동안 모니터링되고 조절되는 공동-요법일 수 있다.

[0116] 따라서, 일 구현예에서, 현탁액은 작용성 hSGSH 단백질 또는 작용성 SUMF1 단백질과의 공동-투여에 적합하다.

[0117] 일 구현예에서, 현탁액은 필요로 하는 대상체에 뇌실내로, 척수강내로, 수조내로 또는 정맥내로 전달된다.

[0118] 일 구현예에서, 현탁액은 약 7.28 내지 약 7.32의 pH를 갖는다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같이, 효소 대체 요법(ERT)은 특정 효소가 결핍되거나 또는 부재하는 경우 환자에서 효소를 대체하는 것으로 이루어진 의학적 치료이다. 효소는 일반적으로 재조합 단백질로서 생산되고 환자에 투여된다. 일 구현예에서, 효소는 작용성 SGSH이다. 다른 구현예에서, 효소는 작용성 SGSH를 포함하는 재조합 단백질이다. 전신, 척수강내, 뇌실내 또는 수조내 전달은 ERT를 사용하여 달성될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 기질 감소 요법(SRT)은 소분자 약물을 사용하여 SGSH의 부재 하에 축적되는 화합물의 생합성을 부분적으로 억제하는 요법을 지칭한다. 일 구현예에서, SRT는 제니스테인을 통한 요법이다. 예를 들어, Ritva Tikkanen et al, Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul; 17(7): 1065. 2016년 7월 4일 온라인 공개됨. doi: 10.3390/ijms17071065; Delgadillo V et al, Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis.* 2011 Oct;34(5):1039-44. doi: 10.1007/s10545-011-9342-4. Epub 2011 May 10; 및 de Ruijter J et al, Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Ann Neurol.* 2012 Jan;71(1):110-20. doi: 10.1002/ana.22643 참조.

[0120] 이들 용량 및 농도의 전달에 적합한 부피는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 1  $\mu$ L 내지 150 mL의 부피가 선택될 수 있으며, 성인의 경우 더 높은 부피가 선택된다. 전형적으로, 신생아 영아의 경우 적합한 부피는 약 0.5 mL 내지 약 10 mL이며, 소아의 경우, 약 0.5 mL 내지 약 15 mL가 선택될 수 있다. 유아의 경우, 약 0.5 mL 내지 약 20 mL의 부피가 선택될 수 있다. 어린이의 경우, 최대 약 30 mL의 부피가 선택될 수 있다. 십대 초반 및 십대의 경우, 최대 약 50 mL의 부피가 선택될 수 있다. 또한 다른 구현예에서, 환자는 약 5 mL 내지 약 15 mL가 선택되거나, 또는 약 7.5 mL 내지 약 10 mL의 부피로 척수강내 투여를 받을 수 있다. 다른 적합한 부피 및 투여량이 결정될 수 있다. 투여량을 조정하여 임의의 부작용에 대한 치료 이점의 균형을 맞출 것이며, 이러한 투여량은 재조합 벡터가 이용되는 경우 치료 적용에 따라 달라질 수 있다.

[0121] 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV는 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^9$  GC 내지 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^{14}$  GC의 용량으로 투여가능하다. 특정 구현예에서, rAAV는 kg 체중 당 약  $1 \times 10^9$  GC 내지 kg 체중 당 약  $1 \times 10^{13}$  GC의 용량으로 전신으로 공동-투여된다.

[0122] 일 구현예에서, 대상체는 본원에 기재된 치료 유효량의 벡터가 전달된다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료 유효량"은 표적 세포에서 효능을 달성하기에 충분한 효소의 양을 전달 및 발현하는 hSGSH를 암호화하는 핵산 서열

을 포함하는 조성물의 양을 지칭한다. 일 구현예에서, 벡터의 투여량은 범위 및 중점 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^9$  GC 내지 뇌 질량의 그램(g) 당 약  $1 \times 10^{13}$  게놈 카피(GC)이다. 다른 구현예에서, 투여량은 뇌 질량의 그램 당  $1 \times 10^{10}$  GC 내지 뇌 질량의 그램 당 약  $1 \times 10^{13}$  GC이다. 특정 구현예에서, 환자에 투여되는 벡터의 용량은 적어도 약  $1.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $1.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $2.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $2.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $3.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $3.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $4.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $4.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $5.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $5.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $6.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $6.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $7.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $7.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $8.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $8.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $9.0 \times 10^9$  GC/g, 약  $9.5 \times 10^9$  GC/g, 약  $1.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $1.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $2.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $2.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $3.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $3.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $4.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $4.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $5.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $5.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $6.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $6.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $7.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $7.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $8.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $8.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $9.0 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $9.5 \times 10^{10}$  GC/g, 약  $1.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $1.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $2.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $2.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $3.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $3.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $4.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $4.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $5.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $5.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $6.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $6.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $7.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $7.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $8.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $8.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $9.0 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $9.5 \times 10^{11}$  GC/g, 약  $1.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $1.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $2.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $2.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $3.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $3.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $4.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $4.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $5.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $5.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $6.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $6.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $7.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $7.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $8.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $8.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $9.0 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $9.5 \times 10^{12}$  GC/g, 약  $1.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $1.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $2.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $2.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $3.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $3.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $4.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $4.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $5.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $5.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $6.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $6.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $7.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $7.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $8.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $8.5 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $9.0 \times 10^{13}$  GC/g, 약  $9.5 \times 10^{13}$  GC/g, 또는 약  $1.0 \times 10^{14}$  GC/g 뇌 질량이다.

[0123] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체가 면역억제 공동-요법을 받는 것을 추가로 포함한다. 이러한 공동-요법을 위한 면역억제제는 글루코코르티코이드, 스테로이드, 항대사물, T-세포 억제제, 매크롤라이드(예를 들어, 라파마이신 또는 라파로그), 및 세포증식 억제제 예컨대 알킬화제, 항대사물, 세포독성 항생제, 항체, 또는 이뮤노필린에 활성인 제제를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 면역 억제제는 질소 머스타드, 니트로소우레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 머캅토피린, 플루오로우라실, 닥티노마이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오마이신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-지시된 항체, 항-IL-2 항체, 시클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , 오피오이드, 또는 TNF- $\alpha$  (중양 피사 인자-알파) 결합제를 포함할 수 있다.

[0124] 특정 구현예에서, 면역억제 요법은 유전자 요법 투여전 0, 1, 2, 7일, 또는 그 이상에 개시될 수 있다. 이러한 요법은 동일한 날에 2개 이상의 약물(예를 들어, 프레드니솔론, 미코페놀레이트 모페틸(MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 공동-투여를 수반할 수 있다. 이들 약물 중 하나 이상은 유전자 요법 투여 후에, 동일한 용량 또는 조정된 용량으로 계속될 수 있다. 이러한 요법은 필요에 따라 약 1주(7일), 약 60일, 또는 그 이상 동안일 수 있다. 특정 구현예에서, 타크롤리무스-프리 레지멘이 선택된다.

[0125] 특정 구현예에서, 상기 방법은 혈청 항-hSGSH 항체의 측정을 포함한다. 항-hSGSH 항체를 측정하는데 적합한 검정이 이용가능하며, 예를 들어, 실시예 1을 참조한다.

[0126] 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV는 필요로 하는 대상체에 1회 투여된다. 다른 구현예에서, rAAV는 필요로 하는 대상체에 1회 초과로 투여된다.

[0127] 본원에 기재된 방법 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.

[0128] 7. 키트

- [0129] 특정 구현예에서, 제형 중 현탁된 농축 벡터(임의적으로 동결), 임의적인 희석 완충액, 및 척수강내, 뇌실내 또는 수조내 투여에 필요한 장치 및 구성요소를 포함하는 키트가 제공된다. 다른 구현예에서, 키트는 추가적으로 또는 대안적으로 정맥내 전달을 위한 구성요소를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 키트는 주사를 허용하기에 충분한 완충액을 제공한다. 이러한 완충액은 농축 벡터의 약 1:1 내지 1:5 희석, 또는 그 이상을 허용할 수 있다. 다른 구현예에서, 치료 임상예에 의한 용량 적정 및 다른 조정을 허용하기 위해 더 많거나 더 적은 양의 완충액 또는 멸균수가 포함된다. 또한 다른 구현예에서, 장치의 하나 이상의 구성요소가 키트에 포함된다. 식염수, 포스페이트 완충 식염수(PBS) 또는 글리세롤/PBS와 같은 적합한 희석 완충액이 이용가능하다.
- [0130] 본원에 기재된 키트 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.
- [0131] 8. 장치
- [0132] 일 측면에서, 본원에 제공된 벡터는 예를 들어, WO 2017/136500에 기재된 방법 및/또는 장치를 통해 척수강내로 투여될 수 있으며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 대안적으로, 다른 장치 및 방법이 선택될 수 있다. 요약하면, 상기 방법은 척추 바늘을 환자의 대수조로 전진시키는 단계, 상기 척추 바늘의 근위 중심에 유연한 관의 길이를 연결하고 유연한 관의 근위 말단에 밸브의 출력 포트를 연결하는 단계, 및 상기 전진 및 연결 단계 후 및 관이 환자의 뇌척수액으로 자가-프라이밍되도록 한 후, 등장성 용액의 양을 함유하는 제1 용기를 밸브의 플러시 입력 포트에 연결하고 그 후에 약제학적 조성물의 양을 함유하는 제2 용기를 밸브의 벡터 입력 포트에 연결하는 단계를 포함한다. 제1 및 제2 용기를 밸브에 연결한 후, 밸브의 벡터 입력 포트와 출력 포트 사이에 유체 유동을 위한 경로가 개방되고, 약제학적 조성물은 척추 바늘을 통해 환자에 주사되고, 약제학적 조성물을 주사한 후, 밸브의 플러시 입력 포트 및 출력 포트를 통해 유체 유동을 위한 경로가 개방되고, 등장성 용액은 척추 바늘로 주입되어 약제학적 조성물을 환자로 플러시한다. 이 방법 및 이 장치는 각각 임의적으로 본원에 제공된 조성물의 척수강내 전달을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 다른 방법 및 장치가 이러한 척수강내 전달을 위해 사용될 수 있다..
- [0133] 본원에 기재된 장치 내의 조성물은 명세서에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 레지멘, 측면, 구현예 및 방법에 적용되도록 의도됨이 이해되어야 한다.
- [0134] **실시예**
- [0135] 본 발명은 이제 하기 실시예를 참조하여 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적을 위해 제공되고 본 발명은 이들 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 분명하게 되는 임의의 및 모든 변이를 포함하도록 해석되어야 한다.
- [0136] **실시예 1: 방법**
- [0137] **A. 벡터 - AAV9.CB7.CI.hSGSHco.rBG**
- [0138] 서열번호: 1에 제시된 바와 같은 hSGSH(MPS IIIA) 조작된 서열을 CB7 프로모터(사이토메갈로바이러스 급초기 인핸서 및 닭 β-액틴 프로모터의 하이브리드), 닭 β-액틴 인트론(CI), 및 토끼 베타 글로빈(rBG) 폴리아데닐화 서열을 함유하는 발현 작제물로 클로닝하였다. 발현 작제물을 AAV2 도립된 말단 반복부에 의해 플랭킹하였고 캡슐화를 위해 AAV9 트랜스 플라스미드를 사용하였다.
- [0139] 요오디사놀 구배 방법을 사용하여 펜 벡터 코어(Penn Vector Core)에 의해 AAV 벡터를 제조하였다. Lock, M., et al., Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. Human Gene Therapy, 2010. 21(10): p. 1259-1271 참조. 정제된 벡터를 MPS IIIA에 대해 액적 디지털 PCR(Lock, M., et al., Absolute Determination of Single-Stranded and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vector Genome Titers by Droplet Digital PCR. Human Gene Therapy Methods, 2014. 25(2): p. 115-125)로 적정하였다.
- [0140] 칼슘 및 마그네슘을 함유하지 않는 돌베코 포스페이트 완충 식염수(dPBS)를 벡터에 대한 대조군(비히클 대조군) 및 희석제로 사용하였다. 시험군을 멸균 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 사용하여 각각의 용량 그룹에 적절한 농도로 희석하였다. 희석된 벡터를 젖은 얼음에서 유지하고 희석 후 4시간 이내에 동물에 주사하였다.
- [0141] **B. 동물 절차**
- [0142] 모든 동물 프로토콜은 펜시베니아 대학의 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다. 자발적 무린 SGSH

돌연변이체가 있는 마우스 콜로니를 펜실베이니아 대학의 유전자 요법 프로그램 동물 사육장에서 유지하였다. 자동화 시스템(Transnetyx Inc, 8110 Cordova Road Suite 119 Cordova, TN 38016 소재)을 사용하여 잘린 꼬리 DNA의 PCR 분석에 의해 모든 새끼의 유전자형을 분석하였다. 마우스를 젓떼기 후 그들의 유전자형에 기초하여 그룹으로 나누고 그 후 싸움을 방지하기 위해 섞지 않았으며, 주어진 케이지 안에 있는 모든 동물은 동일한 치료를 받았다. 케이지를 그들의 각각의 치료에 무작위 배정하였다(www.randomizer.org).

[0143] 동물을 30-70%의 습도로 자동 타이머를 통해 제어되는 12-시간 명/암 주기 하에 1-5마리 동물/케이지의 표준 케이지에서 사육하였다. 온도를 64-79 °F(18-26°C)의 범위 내에서 유지하였다. 가압멸균된 설치류 사료를 임의로 제공하였다. 물은 각각의 케이지에 개별적으로 배치된 물병을 통해 모든 동물이 임의로 접근할 수 있었다. 최소한, 물병은 매주 케이지 교환 중에 주당 1회 교체하였다. 물 공급은 필라델피아시로부터 취했으며 Getinge 정수기를 사용하여 정제하였다. 수질은 염소 수준에 대해서는 매일 및 pH 및 경도에 대해서는 분기별로 ULAR에 의해 검사한다. 등지 물질(Nestlet®)은 각각의 교환 후 각각의 케이지에 제공하였다. 동물은 GTP 직원 및 ULAR 수의과 직원에 의해 매일 모니터링하였다.

[0144] **C. 벡터 및 비히클 투여**

[0145] MPS IIIA 마우스는 마우스 당  $9 \times 10^8$  GC(저용량) 또는 마우스 당  $9 \times 10^9$  GC(중간 용량) 또는  $9 \times 10^{10}$  GC(고용량)의 벡터 또는 PBS 5  $\mu$ L를 평균 14주령에 우측 중뇌실에 받았다. 마우스를 이소플루란으로 마취시켰다. 각각의 마취된 마우스를 머리 뒤쪽의 늘어진 피부를 단단히 움켜잡고 27-게이지 바늘이 장착된 해밀턴 주사기로 정수리점에 자유 재량으로 전면 및 측면으로 주사하였으며, 3 mm 깊이로 삽입되도록 조정하였다.

[0146] **D. 신경행동 평가**

[0147] 4 개월 pi(MPS IIIA)의 조정 및 균형을 평가하기 위해 로킹 로타로드를 수행하였다. 마우스를 120초 동안 일정한 저속(5 rpm)으로 2회 시험 동안 로타로드에 걸들었다. 2분 휴식 후, 마우스를 로타로드에 다시 놓고 로킹 패러다임을 제출했는데, 로드는 다른 회전마다 회전 방향이 역전되면서 10 rpm의 일정한 속도로 회전한다. 2분의 시험간 휴식으로 3회 시험을 수행하였다. 결과는 로드로부터의 평균 낙하 대기 시간으로 나타냈으며; 대기 시간이 길수록 조정이 더 좋다.

[0148] **E. 조직학**

[0149] 마우스를 주사 5.5개월 후 케타민/크실라진 마취 하에 심장 천자 전체혈에 의해 안락사시켰다. 조직을 즉시 수집하고, 절반은 드라이아이스에 순간 동결시키고(효소 활성), 절반은 10% 중성 포르말린에 침지 고정시키고 조직학을 위해 파라핀에 포매시켰다. 수집된 조직은 뇌, 척수, 간, 및 심장이었다.

[0150] 파라핀 절편에서 표준 프로토콜에 따라 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 수행하였다. 치료를 알지 못하는 면허가 있는 수의과 병리학자에 의해 뇌 및 척수에서의 조직병리학을 점수매겼다. 뇌 점수는 뇌에서의 교질 세포 공포 형성, 대뇌에서의 뉴런 공포 형성, 뇌간에서의 뉴런 공포 형성, 뇌에서의 GFAP 강도 점수, 및 단핵 세포 침윤의 3-등급 심각도 점수의 누적 합계였다(최대 점수 15). 척수 점수는 뉴런 공포 형성(운동 뉴런에서 보다 두드러짐), 교질 세포 공포 형성, 및 GFAP 강도의 3-등급 심각도 점수의 누적 합계였다(최대 점수 9). 누적 점수는 일방향 Anova Kruskal Wallis 검정과 함께 사후 Dunn의 다중 비교 검정, 알파 0.05에 의해 분석하였다.

[0151] 리소솜 저장은 LIMP2 면역염색 및 정량화에 의해 평가하였다. LIMP2 면역염색을 포르말린-고정된 파라핀-포매된 뇌 조직으로부터의 6  $\mu$ m 절편에서 수행하였다. 절편을 에탄올 및 크실렌 계열을 통해 탈파라핀화하고, 항원 회수를 위해 10 mmol/L 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에서 6분 동안 전자레인지에서 끓이고, PBS 중 1% 당나귀 혈청 + 0.2% 트리톤으로 15분 동안 차단시킨 다음 차단 완충액에 희석된 1차 항체(1시간) 및 표지된 2차 항체(45분)로 순차적 인큐베이션하였다. 1차 항체는 토끼 항-LIMP2(Novus Biologicals, 콜로라도주 리틀턴 소재, 1:200)였고 2차 항체는 FITC- 또는 TRITC-표지된 당나귀 항-토끼(Jackson ImmunoResearch)였다. LIMP2에 대해 양성으로 염색된 세포의 수를 훈련된 GTP 형태학 핵심 인력에 의해 각각의 동물(제90일 해부)로부터의 2-4개 뇌 절편에서 정량화하였다.

[0152] **F. 효소 활성 및 글리코사미노글리칸 저장**

[0153] 효소 활성 검정 및 GAG 함량을 위해, 단백질을 산성 용리 용액(0.2% 트리톤, 0.9% NaCl, pH 4로 조정됨)에서 기계적 균질화(Qiagen TissueLizer)에 의해 추출하였다. 샘플을 동결-해동시키고 원심분리에 의해 정화하였다. 단백질을 BCA 검정에 의해 정량화하였다.

- [0154] 10  $\mu$ L 샘플을 나트륨 아세테이트 14.3 mM pH 5.5 + 0.7% NaCl + 납 아세테이트 0.01M에 용해된 20  $\mu$ L의 5mM 4-메틸롬벨리페릴 2-술폰피노-2-테옥시- $\alpha$ -D-글루코피라노시드 나트륨 염(Toronto Research Chemicals)과 함께 인큐베이션함으로써 SGSH 활성을 측정하였다. 37°C에서 17시간 동안 인큐베이션한 후, 6  $\mu$ L의 포스페이트/시트레이트 McIlvain 완충액 pH 6.7 및 10  $\mu$ L의 효모로부터의 10 U/ml 알파-글루코시다제(sigma)를 반응 혼합물에 첨가하고 37°C에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 혼합물을 글리신 NaOH 완충액, pH 10.6으로 희석하고, 방출된 4-MU를 유리 4-MU의 표준 희석과 비교하여 형광(여기 365 nm, 방출 450 nm)에 의해 정량화하고 단백질 함량에 의해 정규화하였다.
- [0155] MPS IIIA 동물로부터의 조직 추출물 내 GAG 함량을 제조업체의 권고에 따라 사용되는 상업적 키트(Blyscan Biocolor GAG 키트)로 염료-결합 방법을 사용하여 측정하였다.
- [0156] **G. 항-이식유전자 항체**
- [0157] 혈청 항-hSGSH 항체의 측정을 위한 혈액을 턱밑 채혈에 의한 여러 생체내 시점 뿐만 아니라 심장 천자에 의한 해부 완료시 수집하였다. 혈청을 분리하고 드라이 아이스로 동결시키고 분석할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 폴리스티렌 플레이트를 pH 5.8로 적정된, PBS 중 5  $\mu$ g/mL의 재조합 인간 SGSH(R&D Systems)로 밤새도록 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 중성 PBS 중 2% 소 혈청 알부민(BSA)으로 1시간 동안 차단하였다. 이어서 플레이트를 PBS 중 1:1000으로 희석된 혈청 샘플과 함께 인큐베이션하였다. 결합된 항체를 2% BSA를 함유하는 PBS 중 1:10,000으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)-접합된 염소 항-마우스 항체(Abcam)로 검출하였다. 테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 검정을 현상하고 450 nm에서 흡광도를 측정하기 전에 2N 황산으로 중지시켰다.
- [0158] **실시에 2: MPSIIIa의 뮤린 모델에서 최소 유효량(MED)의 결정**
- [0159] MPSIIIa의 뮤린 모델에서 인간 SGSH를 발현하는 AAV9 벡터인 AAV9.CB7.CI.hSGSHco.rBG의 단일 뇌실내(ICV) 투여의 발현, 생체활성, 및 최소 유효량(MED)을 평가하기 위해 실험을 수행하였다.
- [0160] AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG를 6개월 주사후(pi) 관찰 기간으로 제0일에 마우스 당  $9 \times 10^8$  GC 또는  $9 \times 10^9$  GC 또는  $9 \times 10^{10}$  GC의 용량(벡터의 ddPCR 역가에 의해 결정됨)으로 3개월령 MOS IIIa 마우스(그룹 당 n=10)에 ICV 경로를 통해 투여하였다. 비히클 처리된 MPS IIIa 및 이형접합 한배 새끼를 대조군으로서 제공하였다(그룹 당 n=7-8).
- [0161] 14일 및 56일 pi에 혈청 및 6개월 pi에 뇌, 척수, 간 및 심장에서의 SGSH 활성을 측정함으로써 생체활성을 평가하였다. 4개월 pi에 로킹 로타로드에서의 수행 뿐만 아니라 6개월 pi에 뇌 리소좀 저장 및 신경염증을 측정함으로써 효능 및 MED를 결정하였다.
- [0162] MPS IIIa 마우스에 마우스 당 최대  $9 \times 10^{10}$  GC로 AAV9.CB7.CI.hSGSHco.rBG의 ICV 투여는 치료 관련된 임상 징후 또는 사망률없이 효과적이었으며, 전체 중추 신경계(CNS, 뇌 및 척수) 뿐만 아니라 말초 조직(간 및 혈청)에서 SGSH 발현을 초래하였다.
- [0163] 중간 용량에서 이형접합 수준에 근접하고 고용량에서 이형접합 수준을 초과하는 효소적 활성과 함께 6개월 pi에 뇌, 척수 및 간에서의 SGSH 활성의 용량 의존적 증가가 있었다(도 1a 내지 1c). 심장에서의 총 글리코사미노글리칸 저장이 고용량에서 감소되었던 동안(도 1d) 뇌 조직에서의 총 글리코사미노글리칸 저장을 조사한다. 중간 - 및 고용량 6개월 pi에 뇌에서의 LIMP2 염색의 감소에 의해 제시된 바와 같이, 리소좀 구획의 용량 의존적 정규화가 있었다(도 2a 및 2b). 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색된 뇌 절편에서, 리소좀 저장의 지표인 교질 및 뉴런 공포 형성의 양 및 빈도의 용량 의존적 감소가 관찰되었다(도 3a). GFAP 면역염색은 또한 뇌에서의 모든 용량 및 척수에서의 고용량에서만 신경염증의 감소를 나타내었다(도 3b). CNS 리소좀 함량의 변화 및 H&E 염색된 절편에서 질환-관련 형태학의 개선에 상응하여, 중간 용량 및 고용량에서 통계적으로 유의한 개선과 함께 4개월 pi에 로킹 로타로드 검정에 의해 평가된 균형 및 조정에서 개선이 있었다(도 4).
- [0164] 시험군 및 주사 절차는 효과적이었다. MPS IIIa 표현형 관련 징후 이외에 마우스에서 임상적 이상은 나타나지 않았다. 한 마리를 제외한 모든 마우스는 예정된 안락사까지 생존하였다. 죽은 마우스는 중간 용량 처리된 MPS IIIa 수컷이며 심각한 싸움 상처로 인해 ICV 주사 4일 후 안락사시켜야 했다. 이는 케이지 메이트 공격과 관련된 것으로 치료 또는 절차와는 관련이 없었다. ICV 투여 절차 자체와 관련된 변화가 일부 마우스에서 관찰되었지만(뇌실주위 실질 조직 및 뇌척수막에서 혈소판 및 단색 세포 침윤), 조직병리학에 대한 뇌에서의 시험군 관련 독성의 증거는 없었다.
- [0165] 결론적으로, AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG는 모든 용량 수준에서 MPS IIIa 마우스에 효과적이었으며 신경행동 표현형

의 교정과 함께 MPS IIIa의 CNS 및 말초 파라미터 둘 다에서의 개선과 연관된 SGSH 수준(발현 및 효소적 활성)에서 용량 의존적 증가를 초래하였다. 투여된 중간 용량인  $9 \times 10^9$  GC가 이 연구에서 최소 유효량이었다.

[0166] **실시예 3: AAV.hSGSH 투여의 장기적 효과**

[0167] MPS IIIa 마우스에 대한 AAV.hSGSH의 장기적 효과를 조사하기 위해 실험을 수행하였다. 20마리의 MPS IIIa 마우스는 2개월령에 고용량의 AAV9.CB7.CI.hSGSH.rBG( $9 \times 10^{10}$  GC, ICV)를 받았다. 추가 20마리의 MPS IIIa 마우스 및 20마리의 야생형 마우스는 PBS 대조군 주사를 받았다. 마우스를 주사 후 7개월 동안 모니터링하였으며, 이 기간 동안 매주 임상 점수를 부여하고 행동 및 인지 검사를 수행하였다.

[0168] 다중파라미터 등급화 척도를 개발하여 연구의 지속시간 동안 질환 교정 및 치료에 대한 반응을 평가하였다. 마우스는 떨림, 자세, 모피 품질, 움켜잡기, 각막 혼탁, 및 보행/이동성의 비교 평가에 기초하여 점수를 부여받았다(도 5). 임상 점수 시스템은 이전에 기재된 방법에 기초하여 맞추었다(예를 들어, Burkholder et al. Curr Protoc Mouse Biol. June 2012, 2:145-65; Tumpey et al. J Virol. May 1998, 3705-10; 및 Guyenet et al. J Vis Exp, May 2010, 39; 1787 참조). 임상 점수는 AAV.hSGSH가 투여된 수컷(도 6a) 및 암컷(도 6b) MPS IIIa 마우스 둘 다에 대해 개선되었다.

[0169] 상기 연구에서 MPS IIIa 마우스의 인지 개선 및 불안 교정은 개방 필드(즉, 예를 들어, Tatem et al. J Vis Exp, 2014,(91):51785에 기재된 바와 같은 빔 차단 측정) 및 고가 플러스 미로 검정(예를 들어, Walf and Frye, Nat Protoc, 2007, 2(2): 322-328에 기재된 바와 같음)에서의 움직임의 평가함으로써 평가하였다. 빔 차단 검정의 결과는 AAV.hSGSH를 받은 MPS IIIa 마우스가 30분 후 대조군 마우스와 필적할만한 활성 수준을 가짐을 나타내었다(도 7). 고가 미로 검정의 결과는 AAV.hSGSH가 투여된 MPS IIIa 마우스에서 개방 공간 및 높이에 의해 유도되는 두려움에 대한 민감도/불안이 감소됨을 나타내었다(도 8a). 추가로, 개방 축으로 진입하는 빈도의 측정은 AAV.hSGSH가 투여된 MPS IIIa 마우스가 탐험에 대한 온전한 호기심 및 운동성(motricity)을 가짐을 시사한다(도 8b).

[0170] 신경 행동 검사 후, 마우스를 안락사시키고 그들의 기관을 샘플링하여 뇌에서의 효소적 활성 및 리소좀 저장 교정을 조사한다.

[0171] 전반적으로, 이러한 장기적 연구의 결과는 AAV.hSGSH 처리가 MPS IIIa 마우스에서 건강을 개선시키고 정상 인지 행동을 회복시킬 수 있음을 시사한다.

[0172] **실시예 4: 레서스 마카크에서의 약리학/독성학 연구**

[0173] 2가지 용량의 AAV.hSGSH의 척수강내 투여의 안전성 및 주변-면역억제의 효과를 평가하기 위해 실험을 수행하였다.

[0174] 그룹 1에서 2마리의 마카크(수컷 1마리 및 암컷 1마리)에 턱밑 천자를 통해 대조군을 투여하였다. 그룹 2-5에 무작위 배정된 12마리의 레서스 마카크에 턱밑 천자를 통해 시험군(AAV.hSGSH)을 투여하였다. 그룹 2의 마카크는 AAV.hSGSH를 고용량으로 받고(N=3); 그룹 3의 마카크는 AAV.hSGSH를 저용량으로 받고(N=3); 그룹 4 및 5의 마카크는 면역억제 레지멘에 배치되고 각각 고용량 또는 저용량의 AAV.hSGSH를 받았다(N=3/그룹). 일반적인 안전 패널의 일부로서 혈액 및 뇌척수액이 수집된다. 혈청 및 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 수집하여 캡시드 및 이식유전자에 대한 체액 및 세포 면역 반응을 조사한다.

[0175] 벡터 투여 후 90 ± 3일에 이들 연구의 생전 단계를 완료한 후, 마카크를 포괄적인 조직병리학 검사를 위해 수거된 조직으로 해부한다. 림프절을 비장 및 골수로부터 수거하여 해부시 이들 기관에서 CTL의 존재를 조사한다.

[0176] (서열 목록 자유 텍스트)

[0177] 숫자 식별자 <223> 하에 자유 텍스트를 함유하는 서열에 대해 하기 정보가 제공된다.

서열번호: (자유 텍스트 함유)	<223> 하에 자유 텍스트
1	<223> 인간 N-술포글리코사민 술포하이드롤라제(hSGSH)를 암호화하는 조작된 핵산 서열
4	<223> rAAV 벡터 게놈 AAV.CB7.C1hSGSHco.rBG  <220> <221> 반복_영역 <222> (1)..(130) <223> AAV2 5'ITR  <220> <221> 프로모터 <222> (198)..(579) <223> CMV IE 프로모터  <220> <221> 프로모터 <222> (582)..(863) <223> CB 프로모터  <220> <221> TATA_신호 <222> (836)..(839)  <220> <221> 인트론

[0178]

	<222> (958)..(1930) <223> 닭 베타-액틴  <220> <221> CDS <222> (1948)..(3459) <223> 인간 N-술포글리코사민 술포하이드롤라제(hSGSH)를 암호화하는 조작된 핵산 서열  <220> <221> 폴리A_신호 <222> (3493)..(3619) <223> 토끼 글로빈 폴리 A(rBG, RBG)  <220> <221> 반복_영역 <222> (3708)..(3837) <223> AAV2 3'ITR
5	<223> 합성 작제물
6	<223> 아데노-연관 바이러스 9의 캡시드 단백질 VP1
7	<223> 아데노-연관 바이러스 9의 캡시드 단백질 VP1을 암호화하는 핵산 서열

[0179]

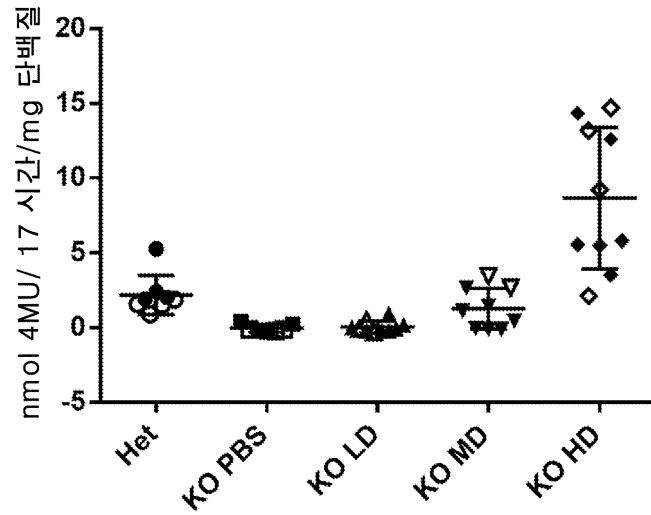
[0180]

본 명세서에 인용된 모든 공개물은 2017년 11월 30일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 제62/593,081호와 같이 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 유사하게, 본원에 참조되고 첨부된 서열 목록에 나타난 서열번호는 참조로 포함된다. 본 발명은 특정 구현예를 참조하여 기재되었지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않고 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범위 내에 속하도록 의도된다.

도면

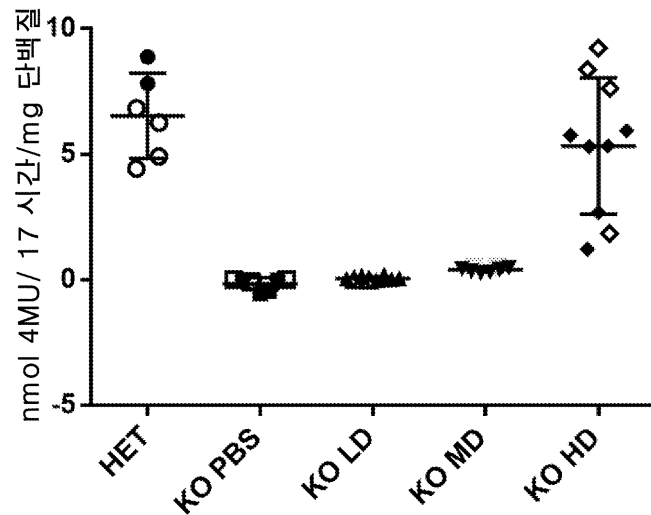
도면1a

뇌 조직에서의 SGSH 활성

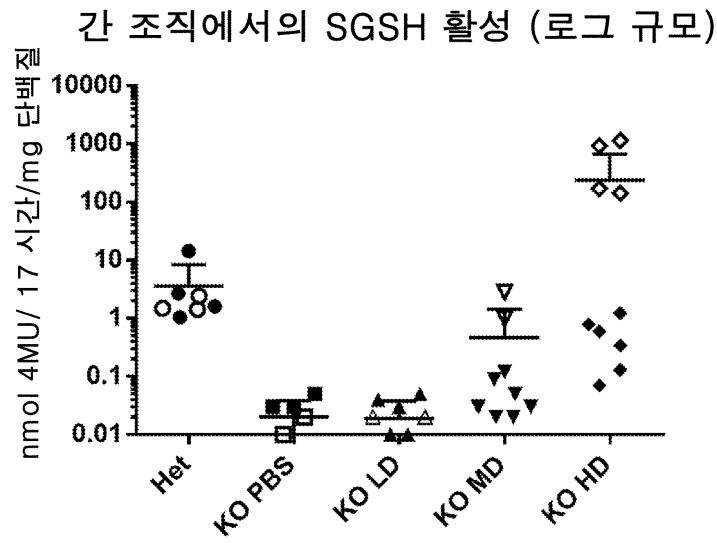


도면1b

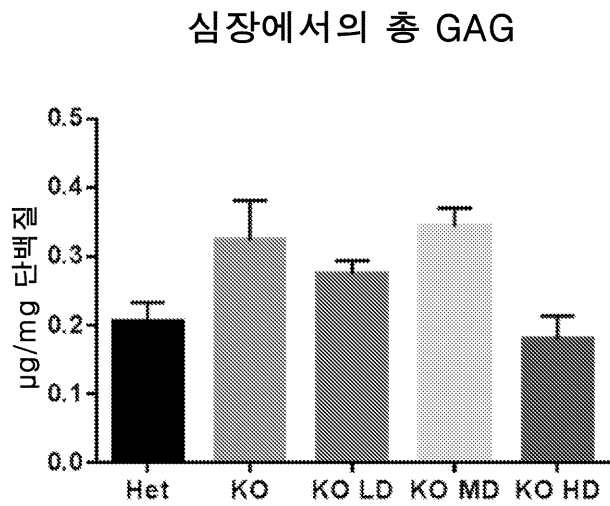
척수에서의 SGSH 활성



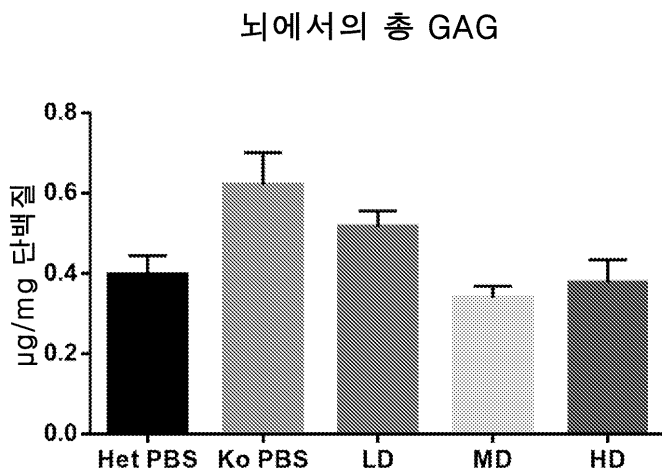
도면1c



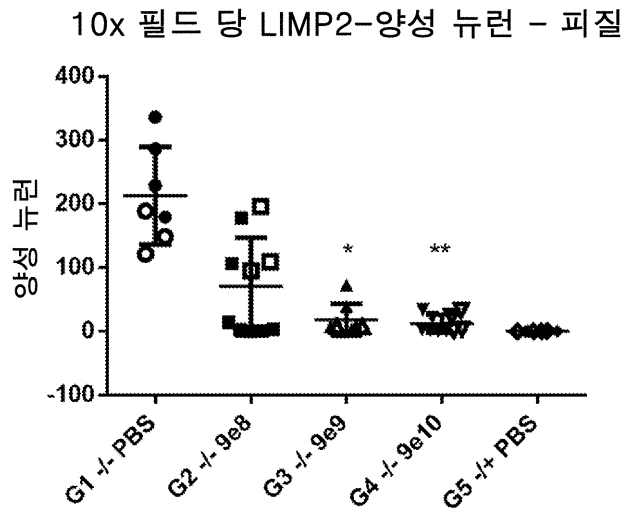
도면1d



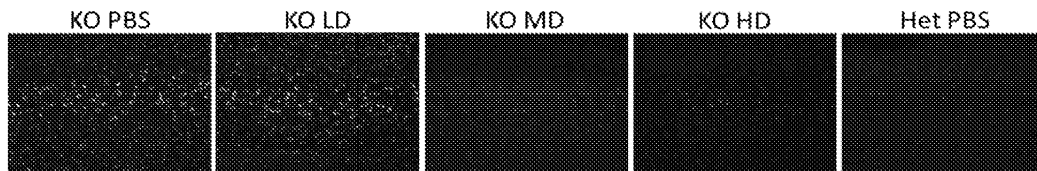
도면1e



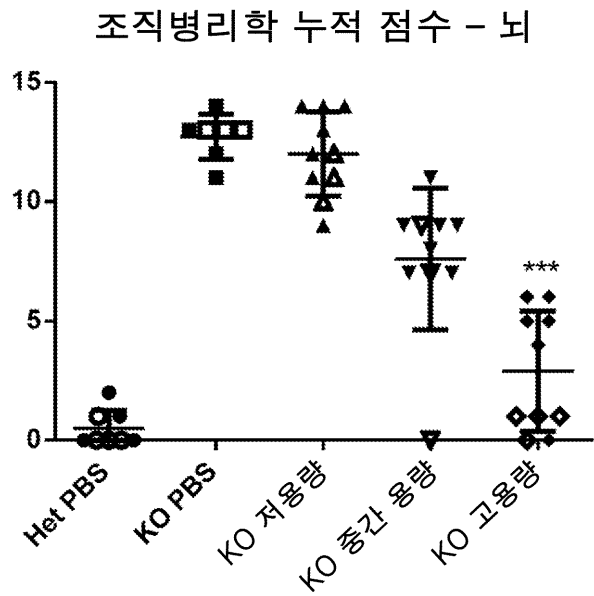
도면2a



도면2b

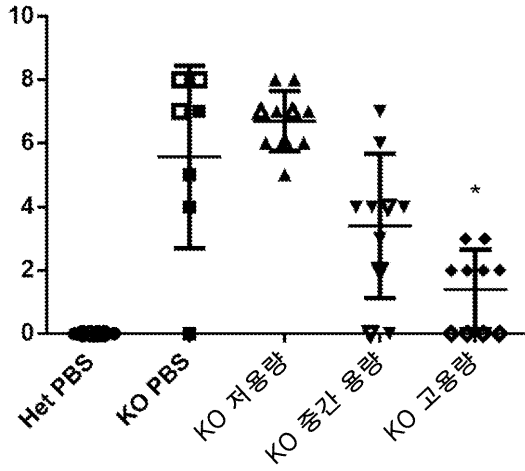


도면3a



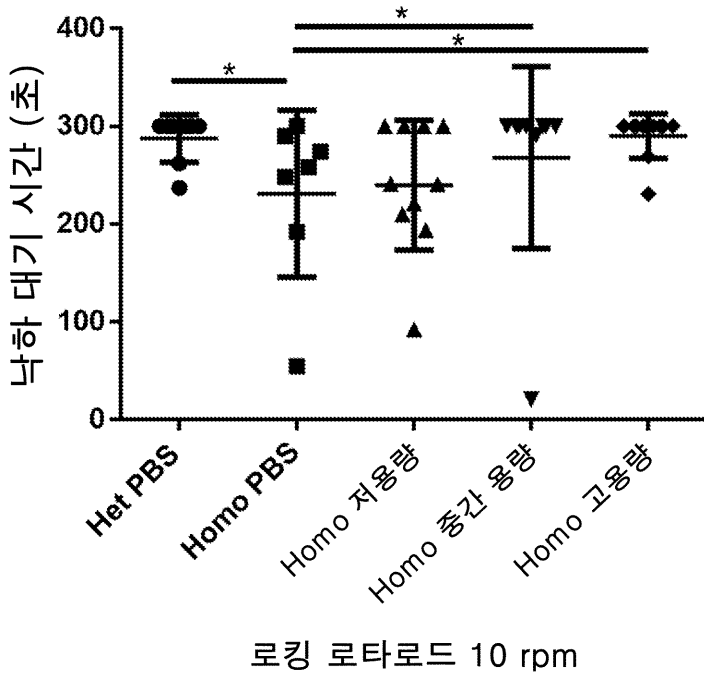
도면3b

조직병리학 누적 점수 - 척수



도면4

d120 로타로드 300 초

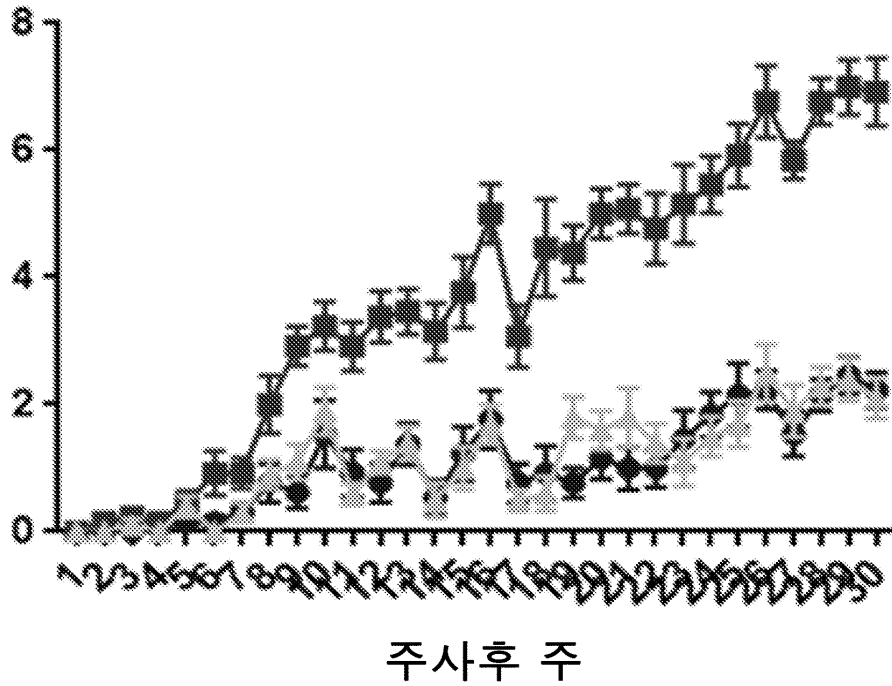


도면5

모피 품질	
0	반짝이는 털, 부드러운 모피, 손질이 잘 됨, 깨끗한 털
1	손질이 잘 되지 않음, 약간 기름지거나 거친 털
2	거친 머리 털 - 머리털이 기름지고, 더럽고, 거칠게 일어남
3	매우 거친 머리 털, 탈수화
보행/이동성	
0	활동적, 활기참
1	달릴 수 있지만, 느릿하게 움직임
2	움직이기를 주저하지만, 짜르면 반응할 것임
3	수동적으로 짤 때만 최소한으로 움직임
떨림	
0	떨림 징후 없음
1	매우 약간 떨림, 비영구적
2	가볍게 떨림, WT와 비교하여 보임
3	중간 정도 떨림, 비교 없이도 분명하게 보임
4	심각하게 떨림, 이동성에 영향을 끼침
움켜잡기	
0	들었을 때 다리가 밖으로 벌어짐
1	한쪽 다리를 당김, 영구적이지 않음
2	한쪽 다리가 영구적으로 또는 양쪽 다리가 비영구적으로 안쪽으로 당겨짐
3	한쪽 다리가 영구적으로 및 한쪽 다리가 비영구적으로 안쪽으로 당겨짐
4	양쪽 다리를 당김, 영구적
자세	
0	정상, 반듯한 등
1	일시적인 구부림, 쉬거나 꼬리로만 들어올릴 때 분명한
2	등을 구부린 상태에서 똑바로 섰, 움직일 때 등을 구부린 상태를 유지
3	거의 항상 구부림
각막 불투명도	
0	깨끗한 각막
1	약간 흐릿한 각막
2	중간 정도 각막 불투명도
3	심각한 각막 불투명도 - 홍채 보임
4	심각한 각막 불투명도 - 홍채 보이지 않음

도면6a

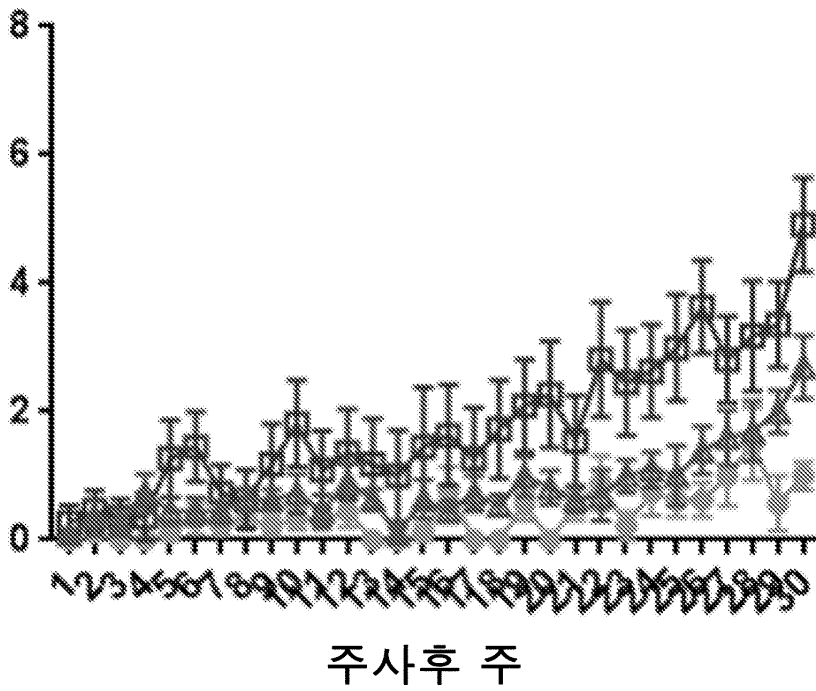
### 임상 점수 (0-21)



- ◆ WT - PBS (M)
- KO - PBS (M)
- ▲ KO - AAV 9e10 gc (M)

도면6b

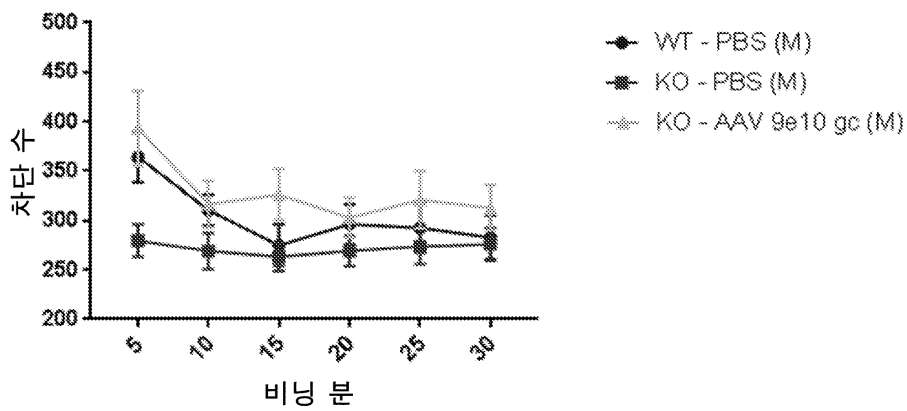
임상 점수 (0-21)



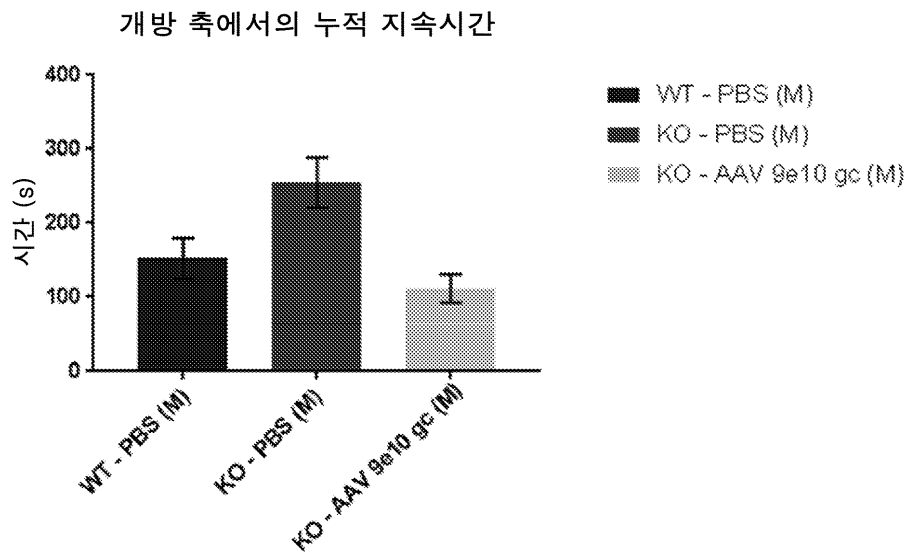
- ◆ WT - PBS (F)
- KO - PBS (F)
- ▲ KO - AAV 9e10 gc (F)

도면7

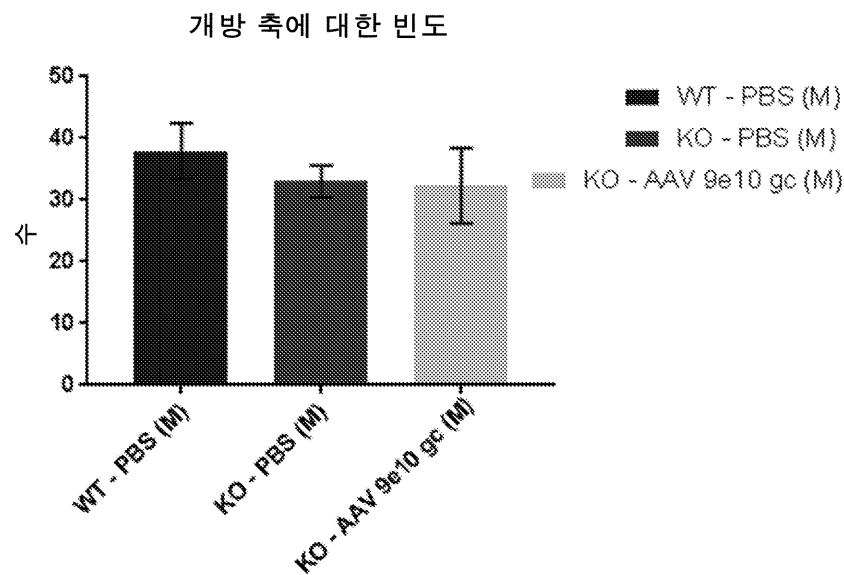
빔 차단 활성



도면8a



도면8b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> GENE THERAPY FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS III A

<130> UPN-18-8476PCT

<150> US 62/593,081

<151> 2017-11-30

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered nucleic acid sequence encoding human

N-sulfoglycosamine sulfohydrolase (hSGSH)

<400> 1

```

atgagctgcc ctgtgcctgc ctgtttgtcc ctgctgctgg tgctgggact gtgcagagcc      60

agaccagaa acgctctgct gctgctggcc gacgatggcg gctttgagag cggcgcctac      120
aacaacagcg ccattgccac ccttcacctg gacgccctgg ccagaagaag cctgctgttc      180
agaaacgcct tcaccagcgt gtccagctgc agccctagca gagcctctct getgaccgga      240
ctgcctcagc accagaacgg gatgtacggc ctgcaccagg acgtgcacca cttcaacagc      300
ttcgacaaag tgcggagcct gccactgctg ctgtctcagg ctggcgtgcg gacaggcac      360
atcggcaaga aacacgtggg ccccagaca gtgtaccct tcgacttcgc ctacaccgaa      420
gagaacggca gcgtgctgca agtgggccgg aacatcacc ggatcaaact gctcgtgcgg      480

aagttctgc agaccagga cgaccggccc ttcttctgt acgtggcctt ccacgacccc      540
cacagatgtg gccactcca gcctcagtac ggcaccttct gcgagaagtt cggcaacggc      600
gagagcggca tgggcagaat cctgattgg acccccagg cctacgacc cctggatgtg      660
ctggtgccct acttcgtgcc caacacctt gccgccagag ccgatctggc cgcccagtat      720
acaacgtgg gcaggatgga tcagggcgtg ggactggtgc tgcaggaact gagggacgcc      780
ggcgtgctga acgacacct cgtgatctt accagcgaca acggcatccc attccccagc      840
ggccggacca atctgtactg gcctggaaca gccgagcccc tgctggtgtc tagcctgag      900

cacctaaga gatggggcca ggtgtccgag gcctacgtgt cctgctgga tctgaccccc      960
accatcctgg actggttcag cateccctac cccagctacg ccatcttcgg ctccaagacc     1020
atccacctga ccggcagatc tctgctgcct gcctggaag ccgaacctct gtgggccaca     1080
gtgtttggca gccagagcca ccacgaagtg accatgtcct accccatcgc gagcgtgcag     1140
caccggcact tcagactggt gcacaacctg aactteaaga tgccttccc aatcgaccag     1200
gacttctatg tgtecccaac cttccaggac ctgctgaaca gaaccacagc cggccagcct     1260
accggctggt acaaggacct gcggcactac tactaccggg ccagatggga gctgtacgac     1320

agaagcaggg acccccacga gacacagaac ctggccaccg accctagatt cgcccagctg     1380
ctggaatgct tgcgggacca gctggccaag tggcagtggg agacacacga cccttgggtg     1440

```

```

tgcgctcctg acgggggtgct ggaagagaag ctgagccctc agtgccagcc cctgcacaac    1500
gagctgtga                                                                    1509
<210> 2
<211> 502
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Ser Cys Pro Val Pro Ala Cys Cys Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly
1           5           10           15
Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp
           20           25           30
Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro
           35           40           45
His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe
           50           55           60
Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly
65           70           75           80
Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gln Asp Val His
           85           90           95
His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser
           100          105          110
Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys His Val Gly Pro
           115          120          125
Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser
           130          135          140
Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg
           145          150          155          160
Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala
           165          170          175
Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr
           180          185          190
Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro

```



Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu  
 450 455 460

Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val

465 470 475 480

Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln

485 490 495

Pro Leu His Asn Glu Leu

500

<210> 3

<211> 1509

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgagctgcc ccgtgccgcg ctgctgcgcg ctgctgctag tcttggggct ctgccgggcg 60

cgccccgga acgcactgct gctcctcgcg gatgacggag gctttgagag tggcgctac 120

aacaacacgc ccatcgccac cccgcacctg gacgccttgg cccgccgag cctcctcttt 180

cgcaatgcct teacctcggg cagcagctgc tctcccagcc ggcaccagct cctcaactggc 240

ctgccccagc atcagaatgg gatgtacggg ctgcaccagg acgtgcacca cttcaactcc 300

ttcgacaagg tgcggagcct gccgctgctg ctcagccaag ctggtgtgcg cacaggcatc 360

atcgggaaga agcacgtggg gccggagacc gtgtaccctg ttgactttgc gtacacggag 420

gagaatggct ccgtcctcca ggtggggcgg aacatcacta gaattaagct gctcgtccgg 480

aaattcctgc agactcagga tgaccggcct ttcttctct acgtgcctt ccacgacccc 540

caccgctgtg ggcactccca gccccagtac ggaaccttct gtgagaagtt tggcaacgga 600

gagagcggca tgggtcgtat cccagactgg accccccagg cctacgacce actggacgtg 660

ctggtgcctt acttcgtccc caacaccccg gcagcccag cccacctggc cgctcagtac 720

accaccgtcg gccgcatgga ccaaggagtt ggactggtgc tccaggagct gcgtgacgcc 780

ggtgtcctga acgacacact ggtgatcttc acgtccgaca acgggatccc ctccccagc 840

ggcaggacca acctgtactg gccgggcaact gctgaaccct tactggtgic atccccggag 900

cacccaaaac gctggggcca agtcagcgag gcctacgtga gcctcctaga cctcacgccc 960

accatcttgg attggttctc gatcccgtac cccagctacg ccatctttgg ctggaagacc 1020

atccacctca ctggccggtc cctcctgccg gcgctggagg cccagcccct ctgggccacc 1080

gtccttggca gccagagcca ccacgaggtc accatgtcct accccatgcg ctccgtgcag 1140  
 caccggcact tccgcctcgt gcacaacctc aacttcaaga tgcctttcc catcgaccag 1200  
 gacttctacg tctcaccacac cttccaggac ctctgaacc gcaccacagc tggtcagccc 1260  
 acgggctggt acaaggacct ccgtcattac tactaccggg cgcgctggga gctctacgac 1320  
 cggagccggg acccccacga gaccagaac ctggccaccg acccgcgctt tgctcagctt 1380  
 ctggagatgc ttcgggacca gctggccaag tggcagtggg agaccacga cccctgggtg 1440  
  
 tgcgccccg acggcgtcct ggaggagaag ctctctccc agtgccagcc cctccacaat 1500  
 gagctgtga 1509  
  
 <210> 4  
 <211> 3837  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> rAAV vector genome AAV.CB7.CI.hSGSHco.rBG  
 <220><221> repeat\_region  
 <222> (1)..(130)  
 <223> AAV2 5' ITR  
 <220><221> promoter  
 <222> (198)..(579)  
 <223> CMV IE promoter  
 <220><221> promoter  
 <222> (582)..(863)  
 <223> CB promoter  
 <220><221> TATA\_signal  
 <222> (836)..(839)  
  
 <220><221> Intron  
 <222> (958)..(1930)  
 <223> chicken beta-actin  
 <220><221> CDS  
 <222> (1948)..(3459)  
 <223> Engineered nucleic acid sequence encoding human  
           N-sulfoglycosamine sulfohydrolase (hSGSH)  
 <220><221> polyA\_signal  
 <222> (3493)..(3619)

<223> Rabbit globin poly A (rBG, RBG)

<220><221> repeat\_region

<222> (3708)..(3837)

<223> AAV2 3' ITR

<400> 4

```

ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt      60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact      120

aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg      180
atcctctaga aciatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat      240
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa      300
tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt      360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggtta      420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtaccccc ctattgacgt      480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc      540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac      600
gttctgcttc actctcccca tctcccccc cccccacc ccaattttgt atttatttat      660
tttttaatta ttttgtcagc cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg      720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca      780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttcttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggcctataa      840
aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgcccgcg      900
tccgcccgcg cctcgcgcgg cccgccccgg ctctgactga ccgcttact cccacaggtg      960

agcgggcggg acggcccttc tctcgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt      1020
gtttcttttc tgggctcgc tgaagcctt gaggggctcc gggagggcc tttgtcggg      1080
gggagcggct cgggggtgct gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcggc gtgcggctcc      1140
gcgctgcccc gggctgtga gcgctgcggg cgcggcggcg ggctttgtgc getccgcagt      1200
gtgcgcgagg ggagcgggc cgggggcggt gccccgggt gcgggggggg ctgcgagggg      1260
aacaaggt gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag caggggtgt gggcgcgtcg      1320
gtcgggctgc aaacccccct gacccccct cccgagttg ctgagcacgg cccggettgc      1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg ggctcggc tgccgggcgg ggggtggcgg      1440
caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggcgg gggagggtc gggggagggg      1500
cgcgcgggcc cccggagcgc cggcggtgt cgagggcgg cgagccgag ccattgcctt      1560

```

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcagggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620  
 aaatctggga ggcgcccgcc caccctct agcgggcgcg ggcgaagcg gtgcggcgcc 1680  
 ggaggaagg aaatggcggg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgcccgcc tccccttctc 1740  
 cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg acggggcagg 1800  
  
 gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860  
 gccttcttct ttttctaca gctctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920  
 tttggcaaag aattcacgcg tgccacc atg agc tgc cct gtg cct gcc tgt tgt 1974  
  
 Met Ser Cys Pro Val Pro Ala Cys Cys  
 1 5  
 gcc ctg ctg ctg gtg ctg gga ctg tgc aga gcc aga ccc aga aac gct 2022  
 Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala  
  
 10 15 20 25  
 ctg ctg ctg ctg gcc gac gat ggc ggc ttt gag agc ggc gcc tac aac 2070  
 Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn  
 30 35 40  
 aac agc gcc att gcc acc cct cac ctg gac gcc ctg gcc aga aga agc 2118  
 Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser  
 45 50 55  
  
 ctg ctg ttc aga aac gcc ttc acc agc gtg tcc agc tgc agc cct agc 2166  
 Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser  
 60 65 70  
 aga gcc tet ctg ctg acc gga ctg cct cag cac cag aac ggg atg tac 2214  
 Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr  
 75 80 85  
 ggc ctg cac cag gac gtg cac cac ttc aac agc ttc gac aaa gtg cgg 2262  
  
 Gly Leu His Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg  
 90 95 100 105  
 agc ctg cca ctg ctg ctg tct cag gct ggc gtg cgg aca ggc atc atc 2310  
 Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile  
 110 115 120  
 ggc aag aaa cac gtg ggc ccc gag aca gtg tac ccc ttc gac ttc gcc 2358

Gly Lys Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala  
 125 130 135  
 tac acc gaa gag aac ggc agc gtg ctg caa gtg ggc cgg aac atc acc 2406  
 Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr  
 140 145 150  
 cgg atc aaa ctg ctc gtg cgg aag ttc ctg cag acc cag gac gac cgg 2454  
 Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg  
 155 160 165  
 ccc ttc ttc ctg tac gtg gcc ttc cac gac ccc cac aga tgt ggc cac 2502  
 Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His  
 170 175 180 185  
 tcc cag cct cag tac ggc acc ttc tgc gag aag ttc ggc aac ggc gag 2550  
 Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu  
 190 195 200  
 agc ggc atg ggc aga atc cct gat tgg acc ccc cag gcc tac gac ccc 2598  
 Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro  
 205 210 215  
 ctg gat gtg ctg gtg ccc tac ttc gtg ccc aac acc cct gcc gcc aga 2646  
 Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg  
 220 225 230  
 gcc gat ctg gcc gcc cag tat aca acc gtg ggc agg atg gat cag ggc 2694  
 Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly  
 235 240 245  
 gtg gga ctg gtg ctg cag gaa ctg agg gac gcc ggc gtg ctg aac gac 2742  
 Val Gly Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp  
 250 255 260 265  
 acc ctc gtg atc ttt acc agc gac aac ggc atc cca ttc ccc agc ggc 2790  
 Thr Leu Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly  
 270 275 280

cgg acc aat ctg tac tgg cct gga aca gcc gag ccc ctg ctg gtg tct 2838  
 Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser  
                   285                  290                  295  
 agc cct gag cac cct aag aga tgg ggc cag gtg tcc gag gcc tac gtg 2886  
 Ser Pro Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val  
                   300                  305                  310  
 tcc ctg ctg gat ctg acc ccc acc atc ctg gac tgg ttc agc atc ccc 2934  
  
 Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro  
                   315                  320                  325  
 tac ccc agc tac gcc atc ttc ggc tcc aag acc atc cac ctg acc gcc 2982  
 Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly  
 330                  335                  340                  345  
 aga tct ctg ctg cct gcc ctg gaa gcc gaa cct ctg tgg gcc aca gtg 3030  
 Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val  
  
                   350                  355                  360  
 ttt ggc agc cag agc cac cac gaa gtg acc atg tcc tac ccc atg cgg 3078  
 Phe Gly Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg  
                   365                  370                  375  
 agc gtg cag cac cgg cac ttc aga ctg gtg cac aac ctg aac ttc aag 3126  
 Ser Val Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys  
                   380                  385                  390  
  
 atg ccc ttc cca atc gac cag gac ttc tat gtg tcc cca acc ttc cag 3174  
 Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln  
                   395                  400                  405  
 gac ctg ctg aac aga acc aca gcc ggc cag cct acc ggc tgg tac aag 3222  
 Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys  
 410                  415                  420                  425  
 gac ctg cgg cac tac tac tac cgg gcc aga tgg gag ctg tac gac aga 3270  
  
 Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg  
                   430                  435                  440  
 agc agg gac ccc cac gag aca cag aac ctg gcc acc gac cct aga ttc 3318

Ser Arg Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe  
 445 450 455  
 gcc cag ctg ctg gaa atg ctg cgg gac cag ctg gcc aag tgg cag tgg 3366  
 Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp  
 460 465 470  
 gag aca cac gac cct tgg gtg tgc gct cct gac ggg gtg ctg gaa gag 3414  
 Glu Thr His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu  
 475 480 485  
 aag ctg agc cct cag tgc cag ccc ctg cac aac gag ctg tga tga 3459  
 Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu  
 490 495 500  
  
 ctcgaggacg gggatgaacta cgcctgagga tccgatcttt ttcctctgc caaaaattat 3519  
 ggggacatca tgaagcccct tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttattttc 3579  
 attgcaatag tgtgttggaa ttttttgtgt ctctcaactcg gaagcaattc gttgatctga 3639  
 atttcgacca ccataatac ccattaccct ggtagataag tagcatggcg ggttaatcat 3699  
 taactacaag gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctgctcgcct 3759  
 cactgaggcc gggcgaccaa aggtgccecg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt 3819  
 gagcgagcga gcgcgcag 3837

<210> 5

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Met Ser Cys Pro Val Pro Ala Cys Cys Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp  
 20 25 30  
 Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro  
 35 40 45  
 His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe



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

305                      310                      315                      320

Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe

325                      330                      335

Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu

340                      345                      350

Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His

355                      360                      365

Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe

370                      375                      380

Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln

385                      390                      395                      400

Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr

405                      410                      415

Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr

420                      425                      430

Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr

435                      440                      445

Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu

450                      455                      460

Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val

465                      470                      475                      480

Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln

485                      490                      495

Pro Leu His Asn Glu Leu

500

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> capsid protein VP1 of adeno-associated virus 9

<400> 6

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

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



<210> 7

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence encoding capsid protein VP1 of

adeno-associated virus 9

<400> 7

```

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc      60
gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac      120
aacgctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gaccgcaaa cggactcgac      180
aagggggagc cggtaaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggctacgac      240
cagcagctca aggccggaga caacccttac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc      300
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag      360
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct      420

ggaaaagaaga ggctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc ggtattggc      480
aaatcgggtg cacagcccgc taaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag      540
tcagtccag acctcaacc aatcggagaa cctcccag cccctcagg tgtgggatct      600
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga      660
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac      720
accaccagca cccgaacctg ggccctgcc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc      780
tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgct acttcggcta cagcaccccc      840

tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga      900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt      960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccage      1020
acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggetcac      1080
gagggctgcc tcccgcgtt cccagcggac gtttcatga ttcctcagta cgggtatctg      1140
acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc      1200
ccgtcgcaaa tgetaagaac gggtaacaac ttccagtca gctacagatt tgagaacgta      1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcacc      1320
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg      1380
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct      1440

```

ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500  
 ttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560  
 ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gctctggatct 1620  
 ttaatTTTTg gcaaacaaagg aactggaaga gacaacgtgg atgctggacaa agtcatgata 1680  
  
 accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtecta tggacaagtg 1740  
 gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gctgagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800  
 atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860  
 aaaattcttc acacggacgg caactttcac ctttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920  
 aagcaccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tctccaacg 1980  
 gccttcaaca aggacaagct gaactcttc atcaccagt attctactgg ccaagtcagc 2040  
 gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaacc ggagatccag 2100  
  
 tacactcca actattaca gtctaataat gttgaattg ctgttaatac tgaagtgta 2160  
 tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211