



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0079751

(43) 공개일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/0058 (2013.01)

A61K 38/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7013541

(22) 출원일자(국제) 2013년11월04일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년05월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/068242

(87) 국제공개번호 WO 2014/071282

국제공개일자 2014년05월08일

(30) 우선권주장

61/722,434 2012년11월05일 미국(US)

(71) 출원인

젠자임 코포레이션

미국, 메사추세츠주 02142, 캠브리지, 500 켄돌 스트리트

(72) 발명자

사르디, 세르지오 파블로

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에 이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

쉬하부딘, 람야

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에 이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

쎈, 생

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에 이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

(74) 대리인

양영준, 김영

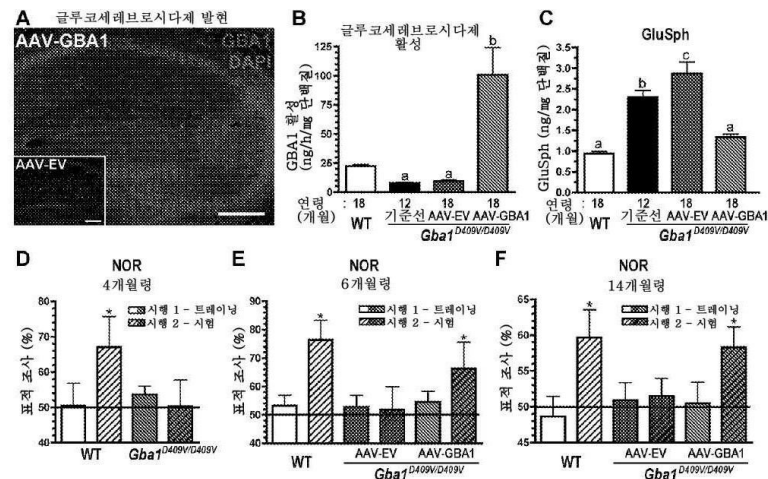
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 단백질병을 치료하기 위한 조성물 및 방법

## (57) 요약

본 발명의 개시는 포유동물에서 글루코세레브로시다제(glucoocerebrosidase) 활성을 증가시키는 작용제를 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 신경 기능을 개선시키기 위한 방법에 관한 것이다. 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 독성 지질을 감소시키고/시킴거나,  $\alpha$ -시누클레인을 감소시키고/시킴거나, 단백질 응집체의 축적을 억제하기 위한 방법이 또한 개시된다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 38/47* (2013.01)

*A61K 39/395* (2013.01)

*A61K 48/0075* (2013.01)

*C07K 16/18* (2013.01)

*C12Y 302/01045* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

치료적 유효량의, 포유동물에서 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase) 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병(proteinopathy)을 갖는 포유동물에서 신경 기능을 개선시키기 위한 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 포유동물이 단백질병으로 인해 감소된 신경 기능을 갖는 방법.

#### 청구항 3

치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 신경 기능의 상실을 예방할 필요가 있는 포유동물에서 신경 기능의 상실을 예방하기 위한 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 포유동물이 단백질병을 갖는 방법.

#### 청구항 5

치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 독성 지질을 감소시키거나,  $\alpha$ -시누클레인( $\alpha$ -synuclein)을 감소시키거나, 타우(tau)를 감소시키거나, 단백질 응집체의 축적을 억제하기 위한 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 작용제의 투여 전 감소된 글루코세레브로시다제 활성을 갖는 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 글루코세레브로시다제 1 (GBA1) 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 돌연변이가 D409V 돌연변이인 방법.

#### 청구항 9

제5항에 있어서, 방법이 타우를 감소시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제5항에 있어서, 방법이  $\alpha$ -시누클레인을 감소시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 11

제5항에 있어서, 방법이 독성 지질을 감소시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 독성 지질이 글루코실스핑고신인 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 독성 글루코실스핑고신이 적어도 약 30% 감소되는 방법.

#### 청구항 14

제12항에 있어서, 독성 글루코실스핑고신이 적어도 약 50% 감소되는 방법.

#### 청구항 15

제12항에 있어서, 독성 글루코실스핑고신이 단백질병이 없는 포유동물과 유의하게 상이하지 않은 수준까지 감소되는 방법.

#### 청구항 16

제5항에 있어서, 방법이 단백질 응집체의 축적을 억제하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 단백질 응집체가 유비퀴틴, 타우, 및  $\alpha$ -시누클레인으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 포함하는 방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 알츠하이머병, 고셔병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상마비, 파킨슨증, 파킨슨병, 라이티코-보딕병(Lytico-Bodig disease), 레비소체치매, 매듭-우세 치매(tangle-predominant dementia), 권투선수치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 은친화입자병(Argyrophilic grain disease), 신경절신경아교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할러포르텐-스파츠병, 및 지방갈색소증으로 구성된 군으로부터 선택된 질병으로 진단된 적이 있는 방법.

#### 청구항 19

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질병이 단백질 응집체를 포함하는 방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 단백질 응집체가 유비퀴틴, 타우, 및  $\alpha$ -시누클레인으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 포함하는 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 단백질병이 타우병증(tauopathy)인 방법.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 타우병증이 알츠하이머병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상마비, 파킨슨증, 파킨슨병, 라이티코-보딕병, 레비소체치매, 매듭-우세 치매, 권투선수치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 은친화입자병, 신경절신경아교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할러포르텐-스파츠병, 및 지방갈색소증으로 구성된 군으로부터 선택된 질병인 방법.

#### 청구항 23

제20항에 있어서, 단백질병이 시누클레인병(synucleinopathy)인 방법.

#### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제가 소분자, 항체, 핵산 분자, 또는 폴리펩티드를 포함하는 방법.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 작용제가 GBA1 유전자 또는 이의 동등물을 인코딩하는 핵산인 방법.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 작용제가 GBA1 폴리펩티드 또는 이의 동등물인 방법.

**청구항 27**

제24항에 있어서, 작용제가 GBA1에 특이적으로 결합하는 항체인 방법.

**청구항 28**

제24항에 있어서, 작용제가 소분자인 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 소분자가 글루코세레브로시다제 활성의 소분자 활성제인 방법.

**청구항 30**

제24항에 있어서, 작용제가 바이러스인 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 바이러스가 GBA1 유전자 또는 이의 동등물을 인코딩하는 핵산을 포함하는 방법.

**청구항 32**

제25항 또는 제31항에 있어서, GBA1 유전자 또는 이의 동등물이 GBA1 단백질의 발현을 조절하는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것인 방법.

**청구항 33**

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 신경 세포를 감염시키는 방법.

**청구항 34**

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 아데노-관련 바이러스(AAV)인 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, AAV가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, 또는 AAV12 혈청형 캡시드를 포함하는 방법.

**청구항 36**

제34항 또는 제35항에 있어서, AAV가 클레이드(Clades) A 내지 F로부터의 AAV 혈청형 캡시드를 포함하는 방법.

**청구항 37**

제34항에 있어서, AAV가 AAV 혈청형 1 캡시드를 포함하는 방법.

**청구항 38**

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, AAV가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, 또는 AAV12 역방위 말단 반복(ITR)을 포함하는 방법.

**청구항 39**

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, AAV가 클레이드 A 내지 F로부터의 AAV ITR을 포함하는 방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, AAV가 AAV 혈청형 2 ITR을 포함하는 방법.

**청구항 41**

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, ITR 및 캡시드가 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된 것인 방법.

**청구항 42**

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, ITR 및 캡시드가 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된 것인 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서, AAV가 AAV1 캡시드 및 AAV2 ITR을 포함하는 방법.

**청구항 44**

제34항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, AAV가 자기-상보성 AAV인 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 핵산이 GBA1 트랜스진(transgene)을 인코딩하는 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 및 GBA1 트랜스진의 상보체를 인코딩하는 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열이 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 동종가닥간(intrastrand) 염기쌍을 형성할 수 있는 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열이 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결된 것인 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 돌연변이된 AAV ITR이 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열(terminal resolution sequence)의 돌연변이를 포함하는 방법.

**청구항 48**

제32항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터가 중추신경계(CNS)의 뉴런에서 GBA1 유전자 또는 이의 동등물을 발현시킬 수 있는 방법.

**청구항 49**

제32항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터가 인간  $\beta$ -글루쿠로니다제 프로모터 또는 닭  $\beta$ -액틴 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함하는 방법.

**청구항 50**

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제가 약학적 조성물 내에 존재하는 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 약학적 조성물이 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 52**

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제 또는 약학적 조성물이 주사에 의해 투여되는 방법.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 작용제 또는 약학적 조성물이 CNS로 투여되는 방법.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 작용제 또는 약학적 조성물이 척수로의 직접 주사, 수막강내 주사, 뇌혈관내 주사, 또는 해마 내 주사를 통해 투여되는 방법.

#### 청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 포유동물의 뉴런에서 기준선 수준 위로 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 56

제55항에 있어서, 방법이 포유동물의 뉴런에서 기준선 수준 위로 적어도 약 2배까지 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 57

제55항에 있어서, 방법이 포유동물의 뉴런에서 기준선 수준 위로 적어도 약 3배까지 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것을 포함하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

##### 관련 출원

본 출원은 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 2012년 11월 5일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/722,434호의 우선권의 이익을 주장한다.

#### 배경 기술

##### 발명의 설명

의약에서, 단백질병(proteinopathy)은 특정 단백질이 구조적으로 비정상인 되고, 이에 의해 신체의 세포, 조직 및 기관의 기능을 파괴시키는 질병의 한 부류를 나타낸다. 종종, 단백질은 이의 정상 형태로 폴딩되는데 실패한다. 이러한 미스 폴딩된 상태에서, 단백질은 어떤 방식(독성 기능의 획득)으로 독성이 될 수 있거나, 이들은 이들의 정상적 기능을 상실할 수 있다. 단백질병은 알츠하이머병, 파킨슨병, 프리온 질병, 타입 2 당뇨병, 아밀로이드증, 및 광범위한 다른 장애와 같은 질병을 포함한다.

단백질병은 집단 전체에 걸쳐 만연되어 있다. 예를 들어, 미국에서 거의 백만 명의 사람이 파킨슨병을 갖고 살아가며, 오백십만 명에 달하는 많은 미국인이 알츠하이머병을 갖고 있다. 현재 상기 질병에 대해서는 치료법이 없으며, 상기 질병 및 질병의 진행에 기초가 되는 분자 메커니즘 중 많은 분자 메커니즘이 공지되어 있지 않다.

이들 파괴적인 질병에 대한 치료법이 없으나, 특정 증상이 경감될 수 있는 것으로 생각된다. 단백질병과 관련된 증상을 경감시키거나 관리하는데 있어서 효과적인 치료제를 개발하는 것이 당 분야에서 필요하다.

#### 발명의 내용

##### 개요

본 발명의 개시는 단백질병을 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 한 양태는 치료적 유효량의, 포유동물에서 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase) 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 신경 기능을 개선시키기 위한 방법에 관한 것이다. 단백질병은 기형의 단백질 및/또는 단백질의 축적에 의해 야기되는 질병(예를 들어, 신경변성 질병)을 나타낸다. 상기 부류의 질병은 독성이 될 수 있고/있거나, 단백질의 정상적인 기능을 상실하고/하거나, 세포의 기능을 파괴시킬 수 있는, 구조적으로 비정상 단백질 특징으로 한다. 추가 양태는 치료적 유효량의, 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병으로 고통받거나 단백질병으로부터 고통받을 위험이 있는 포유동물에서 신경 기능을 개선시키기 위한 방법에 관한 것이다.

중추신경계에 존재시 단백질병은 인지 기능의 장애를 발생시킬 수 있다. 인지 기능 또는 신경 기능은 기억 능력, 주의력, 언어, 결단, 문제 해결 등을 나타낸다. 양태에서, 본 발명의 방법은 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시킴으로써 인지 기능, 예를 들어, 기억 기능을 개선시키는 것을 나타낸다.

또 다른 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는,

단백질병을 갖는 포유동물에서 독성 지질(예를 들어, 글루코실스핑고신)을 감소시키거나,  $\alpha$ -시누클레인을 감소시키거나, 타우를 감소시키거나, 단백질 응집체의 축적을 억제/감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 추가 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 타우병증으로 고통받거나 타우병증으로 고통받을 위험이 있는 포유동물에서 독성 지질(예를 들어, 글루코실스핑고신)을 감소시키거나,  $\alpha$ -시누클레인을 감소시키거나, 타우를 감소시키거나, 단백질 응집체의 축적을 억제하기 위한 방법에 관한 것이다. 포유동물에서의 글루코세레브로시다제 활성의 증가는 이로운 조직학적 변화를 발생시킬 수 있다. 특히, 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 단백질을 갖는 대상체에서 독성 단백질 중을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 독성 지질, 예를 들어, 글루코실스핑고신은 CNS에 축적되고, 신경독으로 작용할 수 있다.  $\alpha$ -시누클레인은 인간에서 SNCA 유전자에 의해 인코딩된 단백질이다.  $\alpha$ -시누클레인은 응집하여 레비소체를 특징으로 하는 병리학적 장애에서 불용성 원섬유를 형성할 수 있다. 시누클레인병으로 공지된 이들 장애는, 예를 들어, 파킨슨병 및 레비소체치매를 포함한다. 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 또한 세포 내의 다른 단백질 응집체, 예를 들어, 타우 및 유비퀴틴을 감소시킬 수 있다. 각각의 경우에서, 단백질의 비정상적 형태는 포유동물의 질병 상태에 적어도 부분적으로 기여한다.

[0011] 본 발명의 개시의 다른 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 신타제(synthase)의 소분자 억제제 또는 글루코세레브로시다제의 양성 조절인자를 투여하는 것을 포함하는, 단백질을 갖는 포유동물에서 글루코세레브로시다제 지질 수준을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 추가 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 신타제의 소분자 억제제 또는 글루코세레브로시다제의 양성 조절인자를 투여하는 것을 포함하는, 타우병증으로 고통받거나 타우병증으로 고통받을 위험이 있는 포유동물에서 글루코세레브로시다제 지질 수준을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 지질 감소 요법은 이전에 기재된 적이 있다(예를 들어, 각각의 전체내용이 참조로서 포함되는 문헌[McEachern KA et al. (2007) Mol. Genet. Metab. 91:259-67; Cabrera-Salazar MA et al. (2012) PLoS One 7:e43310; 및 U.S. Patent No.: 8168587호 참조). 신경 기능을 개선시킬 필요가 있는 포유동물(예를 들어, 단백질을 고통받거나 단백질을 고통받을 위험이 있는 포유동물)에서 신경 기능을 개선시키기 위한 방법, 및 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 신타제의 소분자 억제제 또는 글루코세레브로시다제의 양성 조절인자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 신경 기능의 상실을 예방하거나, 억제하거나, 감소시킬 필요가 있는 포유동물에서 신경 기능의 상실을 예방하거나, 억제하거나, 감소시키기 위한 방법이 또한 개시된다.

[0012] 추가 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 신경 기능의 상실을 예방할 필요가 있는 포유동물에서 신경 기능의 상실을 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 한 구현예에서, 포유동물은 타우병증으로 고통받거나 타우병증으로 고통받을 위험이 있는 포유동물이다. 단백질을 고통받거나 단백질을 고통받을 위험이 있는 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 질병과 관련된 인지 장애, 예를 들어, 기억 상실 및 신경 기능에서의 감소를 예방할 수 있다. 구현예에서, 상기 방법은 단백질을 진단되었을 수 있으나, 상기 질병 상태와 관련된 인지 장애의 통상적 징후를 아직 겪지 않은 대상체에 이롭다. 또한, 예를 들어, 단백질을 야기시키는 것으로 공지된 대상체 또는 대상체의 가계 계통에서 돌연변이로 인한 위험이 있는 대상체가 또한 상기 치료 방법으로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0013] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이다.

[0014] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 포유동물은 알츠하이머병, 고셔병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상마비, 파킨슨증, 파킨슨병, 라이티코-보디병(Lytico-Bodig disease), 레비소체치매, 매듭-우세 치매(tangle-predominant dementia), 권투선수치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 은친화입자병(Argyrophilic grain disease), 신경절신경아교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할리포르텐-스파츠병, 및 지방갈색소증으로 구성된 군으로부터 선택된 질병으로 진단된 포유동물이다.

[0015] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 포유동물은 작용제의 투여 전에 감소된 글루코세레브로시다제 활성을 가질 수 있다.

[0016] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 포유동물은 글루코세레브로시다제 1 (GBA1) 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. GBA1 돌연변이는 당 분야에 널리 공지되어 있고, 비제한적인 예가 본원에 기재되어 있다(예를 들어, D409V 돌연변이).

[0017] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 방법은 타우,  $\alpha$ -시누클레인, 및/또는 독성 지질(예를 들어, 글루코실스핑고신)을 감소시킨다. 관련 구현예에서, 독성 글루코실스핑고신은 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 초과만큼 감소된다. 관련 구현예에서, 독성 글루코실스핑고신은 단백질을 갖는 포유동물과 유의하게 상이하지 않은 수준까지 감소된다.



- [0018] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 단백질병은 단백질 응집체(예를 들어, 유비퀴틴, 타우, 및/또는  $\alpha$ -시누클레인)와 관련된다. 관련 구현예에서, 상기 방법은 단백질 응집체(예를 들어, 유비퀴틴, 타우, 및/또는  $\alpha$ -시누클레인을 포함하는 단백질 응집체)의 축적을 억제하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질병은 타우병증(예를 들어, 알츠하이머병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상마비, 파킨슨증, 파킨슨병, 라이티코-보디병, 레비소체치매, 매듭-우세 치매, 권투선수치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 은친화입자병, 신경절신경아교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할리포르텐-스파츠병, 및 지방갈색소증)이다. 일부 구현예에서, 단백질병은 시누클레인병이다.
- [0019] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 작용제는 소분자, 항체, 핵산 분자, 또는 폴리펩티드이다(또는 이들을 함유한다). 구현예에서, 상기 작용제는 GBA1 유전자 또는 이의 동등물(예를 들어, 글루코세레브로시드의 분해를 촉매하는 폴리펩티드를 인코딩하는 GBA1 유전자의 단편, 유사체, 또는 유도체)을 인코딩하는 핵산이다. 다른 구현예에서, 상기 작용제는 GBA1 폴리펩티드 또는 이의 동등물(예를 들어, 글루코세레브로시드의 분해를 촉매하는 GBA1 폴리펩티드의 단편, 유사체, 또는 유도체)이다. 구현예에서, 상기 작용제는 GBA1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 구현예에서, 상기 작용제는 소분자(예를 들어, 소분자 활성제)이다. 구현예에서, 상기 작용제는 사페론이다. 구현예에서, 상기 방법은 단백질병, 시누클레인병, 타우병증 등과 관련된 증상을 치료하는데 이로운 제2 작용제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0020] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 작용제는 바이러스/바이러스 벡터이다. 구현예에서, 바이러스는 GBA1 유전자 또는 이의 동등물을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 관련 구현예에서, GBA1 유전자 또는 이의 동등물은 GBA1 단백질의 발현을 조절하는 프로모터(예를 들어, 인간  $\beta$ -글루쿠로니다제 프로모터 또는 닭  $\beta$ -액틴 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함하나, 이에 제한되지 않는 프로모터가 중추신경계의 뉴런에서 GBA1 유전자 또는 이의 동등물을 발현시킬 수 있음)에 작동 가능하게 연결된다.
- [0021] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 작용제는 아데노-관련 바이러스(AAV)이다. 구현예에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, 또는 AAV12 혈청형 캡시드를 포함한다. 구현예에서, AAV는 클레이드(Clade) A 내지 F로부터의 AAV 혈청형 캡시드를 포함한다. 구현예에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, 또는 AAV12 역방위 말단 반복(ITR)을 포함한다. 구현예에서, AAV는 클레이드 A-F로부터의 AAV ITR을 포함한다.
- [0022] 일부 구현예에서, ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, ITR 및 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다.
- [0023] 일부 구현예에서, AAV는 자기-상보성 AAV이다.
- [0024] 한 구현예에서, 핵산은 GBA1 트랜스진(transgene)을 인코딩하는 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 및 GBA1 트랜스진의 상보체를 인코딩하는 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 상기 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 동중가닥간(intrastrand) 염기쌍을 형성할 수 있다. 관련 구현예에서, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결된다(예를 들어, 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열의 돌연변이를 포함한다).
- [0025] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 작용제는 약학적 조성물 내에 존재한다. 관련 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.
- [0026] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 작용제 또는 약학적 조성물은 경구 경로, 혈관내 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 점막 조직(예를 들어, 코, 입, 질, 직장 등)을 통한 직접 흡수, 경피 경로, 피내 경로, 중추신경계(CNS), 척수, 두개내 경로, 뇌실내 경로, 수막강내 경로, 또는 뇌내 경로를 통해 투여된다.
- [0027] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 작용제 또는 약학적 조성물은 주사에 의해 투여된다. 구현예에서, 상기 작용제 또는 약학적 조성물은 CNS로 투여(예를 들어, 척수로의 직접 주사, 수막강내 주사, 뇌혈관내 주사, 또는 해마내 주사를 포함)된다.
- [0028] 상기 구현예 중 일부 구현예에서, 상기 방법은 뉴런에서 기준선 수준 위로 글루코세레브로시다제 활성을 증가(예를 들어, 뉴런에서 기준선 수준 위로 적어도 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 또는 그 초과까지 증가)시키는 것을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 추가 목적 및 장점은 후속되는 설명에서 부분적으로 기재될 것이고, 부분적으로 상기 설명으로부터

명백해질 것이거나, 본 발명의 실시예에 의해 습득될 수 있다. 본 발명의 목적 및 장점은 첨부된 청구항에 기재된 것을 포함하는 본원에 개시된 요소 및 조합에 의해 실현되고 달성될 것이다. 상기 일반적 설명 및 하기 상세한 설명 둘 모두는 단지 예시 및 설명이며, 청구된 본 발명을 제한하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 본 명세서에 포함되고 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 여러 구현예를 예시하며, 상기 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하기 위해 제공한다.

[0030] **도면의 간단한 설명**

[0031] **도 1a 내지 도 1c**는  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스의 뇌에서의 타우 응집체의 점진적 축적을 도시한다. (a) 이미지는 2개월령, 6개월령 및 12개월령  $Gba1^{D409V/D409V}$  및 연령-매치된 야생형(WT) 마우스의 해마에서의 항-타우 혈청을 이용한 면역염색(녹색) 및 핵 염색(DAPI, 청색)을 도시한다(축적 막대, 500  $\mu$ m). (b) 2개월, 6개월, 및 12개월에서의 WT 및  $Gba1^{D409V/D409V}$  해마에서의 Tau-5 면역반응성의 정량은 나이가 들에 따른 응집체의 점진적 축적을 도시한다(그룹 당  $n \geq 5$ ). (c) AT8, AT180, AT270, Tau-5 및  $\beta$ -튜불린에 대한 18개월령  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스 및 연령-매치된 대조군으로부터의 해마 용해질의 대표적 면역블롯이 도시된다. 각각의 레인은 독립적 마우스 뇌를 나타낸다. 클론 AT8 항체는 나이가 든  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스에서 증가된 타우 인산화(S202/T205)를 나타낸다. 전체 타우 수준(Tau-5) 또는 다른 인산화된 종(AT180 또는 AT270)에서 돌연변이와 야생형 마우스 사이에 차이가 관찰되지 않았다. 결과는 평균  $\pm$  SEM으로 표현된다. 상이한 문자로 표시된 막대는 서로 유의하게 상이한 것이다 ( $p < 0.05$ ).

[0032] **도 2a 내지 도 2f**는 AAV-GBA1의 CNS 투여가 글루코실스핑고신 수준을 감소시키고, 기억 결핍을 역전시키는 것을 도시한다. 4개월령 및 12개월령  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스에 AAV-EV 또는 AAV-GBA1의 양측 해마 주사를 제공하였다. 주사되지 않은  $Gba1^{D409V/D409V}$  한배새끼(littermate)는 생화학적 및 조직학적 종점에 대한 기준선으로서 수술시에 안락사시켰다( $n=8$ ). 연령 매치된 주사되지 않은 야생형(WT,  $n=9$ ) 마우스를 양성 대조군으로 사용하였다. 둘 모두의 코호트에서, 주사 6개월 후에 생화학적 및 병리학적 분석을 위해 조직을 수거하였다. (a) 정위 주사(stereotaxic injection) 6개월 후의 재조합 효소의 해마 발현. 이미지는 AAV-GBA1-주사된  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스에서의 글루코세레브로시다제 면역반응성(적색) 및 핵(DAPI, 청색) 염색을 도시한다(축적 막대, 400  $\mu$ m). 삽입물은 AAV-EV-주사된 마우스에서의 글루코세레브로시다제 및 핵 염색을 도시한다.  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스로의 AAV-GBA1의 해마 투여는 글루코세레브로시다제 활성을 증가시켰고(b, 적색 막대,  $n=11$ ,  $p < 0.05$ ), 글루코실스핑고신(GlcSph)의 청소를 WT 수준으로 촉진시킨 반면(c; 적색 막대,  $n=11$ ,  $p < 0.05$ ), AAV-EV 처리된  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스는 글루코세레브로시다제 활성에서 변화를 나타내지 않았고(b, 청색 막대,  $n=12$ ,  $p > 0.05$ ), 기준선 수준에 비해 지속적으로 GlcSph를 축적하였다(c, 흑색 막대,  $n=8$ ,  $p < 0.05$ ). (d) 4개월령 야생형(WT) 및  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스의 수술전 평가는 2개의 동일한 대상에 노출되는 경우 대상 선호(object preference)를 나타내지 않았다. 시행 1(트레이닝)로부터의 결과는 백색(WT) 및 자색( $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스)의 속이 채워진 막대로 제시된다. 24시간의 정제 기간 후, 마우스에 새로운 대상을 제공하였다. 시행 2(시험, 해치 막대(hatched bar))에서, WT 마우스는 새로운 대상을 현저히 더욱 빈번하게 조사하였다( $n=9$ ,  $p < 0.05$ ). 대조적으로,  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스( $n=11$ , 청색 해치 막대)는 새로운 대상에 대한 선호를 나타내지 않았고, 이는 인지 장애를 나타낸다. (e) 주사 2개월 후에, 마우스에 새로운 대상 인지(NOR) 시험을 제공하였다. AAV-GBA1-처리된  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스( $n=10$ , 청색 해치 막대)는 시험 시행 동안 새로운 대상이 제시되는 경우 이들의 기억 결핍의 역전을 나타내었으나, AAV-EV-처리된 동물( $n=9$ , 적색 해치 막대)은 그렇지 않았다. (f) 12개월령의  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스의 개별적 코호트에 AAV-EV( $n=12$ ) 또는 AAV-GBA1( $n=12$ )을 주사하였다. 4개월령 코호트와 유사하게, 상기 동물을 주사 2개월 후(14개월령)에 시험하는 경우에 기억 기능 이상의 역전이 관찰되었다. 결과는 평균  $\pm$  SEM으로 표시된다. (d 내지 f) 수평선은 50% 표적 조사의 경계를 정하며, 이는 어느 한 대상에 대한 선호가 없는 것을 나타낸다(\*, 50%와 유의하게 상이함,  $p < 0.05$ ); (b, c). 상이한 문자를 갖는 막대는 서로 유의하게 상이하다( $p < 0.05$ ).

[0033] **도 3a 내지 도 3c**는 증상  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스 해마에서의 글루코세레브로시다제의 발현이, 응집된  $\alpha$ -시누클레인 및 타우의 축적을 늦추는 것을 도시한다.  $Gba1^{D409V/D409V}$  마우스의 2개의 코호트에 4개월령 또는 12개월령에서 해마에 양측으로 AAV-EV 또는 AAV-GBA1을 주사하였다. 연령-매치된 주사되지 않은 WT 마우스는 양성 대조군으로

서 미처리된 채로 두었다. *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 한배새끼를 기준선 그룹으로서 주사시에 수거하였다. 주사된 동물을 수술 6개월 후에 희생시켰다. 그래프는 4개월령(좌측) 또는 12개월령(우측)에서 주사된 코호트에 대한 유비퀴틴(a), 단백질분해효소 K-내성 α-시누클레인(b) 및 타우 면역반응성(c)의 해마 정량을 제공한다. 증상 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서의 글루코세레브로시다제 증가는 응집된 단백질의 수준을 감소시켰으나, 이러한 처리는 더 나은 동물에서 덜 효과적이었다. 이미지는 AAV-EV 또는 AAV-GBA1으로 처리된 18개월령 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 해마에서의 유비퀴틴(a, 녹색), 단백질분해효소 K-내성 α-시누클레인(b, 적색) 및 타우(c, 녹색) 면역반응성을 제시한다. DAPI 핵 염색은 청색으로 제시된다(축척 막대, 100 μm). 결과는 그룹 당 n≥8로 평균 ± SEM으로 표시된다. 상이한 문자를 갖는 막대는 서로 유의하게 상이하다(p<0.05).

[0034]

**도 4a 내지 도 4c**는 A53T α-시누클레인 마우스 뇌에서의 글루코세레브로시다제 증가가 α-시누클레인 수준을 감소시키는 것을 입증한다. A53T α-시누클레인 트랜스제닉 마우스는 감소된 뇌 글루코세레브로시다제 활성을 나타낸다. (a) 다양한 리소좀 효소의 활성을 동형집합(n=9) 및 이형집합(n=8) α-시누클레인 트랜스제닉 및 야생형 한배새끼(n=9)로부터의 피질 균질액에서 결정하였다. 글루코세레브로시다제 활성은 α-시누클레인 수준과 역으로 관련되었고, 동형집합 마우스는 가수분해효소 활성의 큰 감소를 나타냈다. 2개의 다른 리소좀 가수분해효소인 헥소사미니다제(hexosaminidase) 및 β-갈락토시다제의 효소 활성은 A53T-α-시누클레인의 발현에 의해 변경되지 않고 유지되었다. (b) 4개월령의 A53T α-시누클레인 마우스 우측 선조체에 편측으로 AAV-GFP (n=6) 또는 AAV-GBA1 (n=5)을 각각 주사하였다. 좌측 선조체를 대상체 사이의 α-시누클레인 수준에서의 변동성을 감소시키기 위해 각각의 동물에 대한 주사되지 않는 대조군으로 사용하였다. 4개월 후, 마우스를 안락사시키고, 둘 모두의 선조체를 수거하였다. AAV-GBA1-주사된 선조체에서 강한 글루코세레브로시다제 활성(주사되지 않은 대측에 비해 7배)이 관찰되었다. 글루코세레브로시다제의 발현은 세포질 분획(Tris-가용성, 막-회합되지 않음; p<0.05)에서 감소된 α-시누클레인 수준을 촉진시켰다. (c) 신생아 (P0) A53T-α-시누클레인 마우스에 허리 척수에 AAV-GFP 또는 AAV-GBA1을 주사하였다. 예상된 바와 같이, AAV-GBA1-주사된 마우스에서 강한 글루코세레브로시다제 활성(대조군에 비해 3배)이 나타났다. 선조체에서와 같이, 글루코세레브로시다제의 발현은 세포질 분획(Tris-가용성, 막-회합되지 않음; 그룹 당 n=7, p<0.05)에서 α-시누클레인 수준을 감소시켰다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. \*는 p<0.05에서 통계적 유의성을 나타낸다.

[0035]

**도 5a 내지 도 5b**는 감소된 글루코세레브로시다제 활성이 α-시누클레인 축적을 발생시키는 것을 도시한다. (a) *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 고서 마우스에서의 해마 α-시누클레인 및 유비퀴틴 응집체를 나타내는 면역조직화학 이미지가 도시된다. (b) α-시누클레인 면역반응성의 백분율이 WT 및 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스에 대해 정량된다. PK = 단백질분해효소 K.

[0036]

**도 6a 내지 도 6d**는 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 고서 마우스 모델 시누클레인병의 특징을 도시한다. 이들 마우스는 유비퀴틴(a) 및 α-시누클레인 응집체(b) 및 글루코실스핑고신 축적(d)의 점진적 축적을 나타내었다. 또한, 이들 마우스는 새로운 대상 인지 시험(c)에서 기억 결핍을 나타내었다.

[0037]

**도 7**은 GBA1 증가가 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 병리를 개선시키는 것을 나타낸다(예방 연구). 새로운 대상 인지 시험은 증상발현전(2개월령 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup>) 마우스의 해마로의 글루코세레브로시다제의 AAV-매개 전달이 기억 결핍을 교정하는 것을 나타낸다.

[0038]

**도 8**은 A53T α-시누클레인 마우스 뇌에서의 글루코세레브로시다제의 발현이 Tau 응집체의 축적을 감소시키는 것을 도시한다. A53T-α-시누클레인 트랜스제닉 마우스에 P0에서 AAV-대조군 또는 AAV-GBA1을 가쪽뇌실로 양측 주사하였다. 연령 매치된 주사되지 않은 WT 마우스를 음성 대조군으로서 미처리된 채로 두었다. 이미지는 야생형(WT) 및 A53T-α-시누클레인 과발현 마우스의 해마에서의 항-타우 혈청을 이용한 면역염색(녹색) 및 핵 염색(DAPI, 청색)을 도시한다(축척 막대, 500 μm).

[0039]

**도 9a 내지 도 9b**는 타우 트랜스제닉 마우스의 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것이 기억 기능이상을 예방하는 것을 도시한다. (a) 2개월령 Tau 트랜스제닉에 AAV-EV 또는 AAV-GBA1의 양측 해마 주사를 제공하였다. 연령-매치된 주사되지 않은 야생형(WT; n = 8) 마우스를 시험을 위한 양성 대조군으로 사용하였다. 시행 1(트레이닝)으로부터의 결과는 백색(WT), 녹색(TAU + AAV-EV) 또는 적색(TAU + AAV-GBA1)으로 채워진 막대로 제시된다. 24시간의 체류 기간 후, 마우스에게 새로운 대상을 제공하였다. 시행 2(시험, 해치 막대)에서, WT 마우스는 4개월령 또는 8개월령 둘 모두 새로운 대상을 현저히 더 빈번하게 조사하였다. 대조적으로, 대조군

바이러스가 주사된 Thy1-TAU22 트랜스제닉 마우스(n = 9; 녹색 해치 막대)는 새로운 대상에 대한 선호를 나타내지 않았고, 이는 검정된 둘 모두의 시점에서 인지 장애를 나타낸다. AAV-GBA1-처리된 Thy1-TAU22 마우스(n = 13; 적색 해치 막대)는 처리 2개월 후에 기억 기능 개선의 경향을 나타내었고, 이는 처리 6개월 후에 시험한 경우에 현저하였다. 결과는 평균  $\pm$  SEM으로 표시된다. 수평선은 50% 표적 조사의 경계를 정하며, 이는 어느 한 대상에 대한 선호가 없는 것을 나타낸다(\*, 50%와 유의하게 상이함,  $P < 0.05$ ).

[0040] 상세한 설명

[0041] 정의

[0042] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명의 개시가 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 이용될 수 있으나, 예시적 방법, 장치, 및 물질이 이제 기재된다. 본원에서 인용된 모든 기술 및 특허 간행물은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 본 발명에서는 종래 발명에 의해 상기 개시를 예견하여 본 발명이 권리가 없는 것을 인정하는 것으로 해석되어선 안 된다.

[0043] 본 발명의 개시의 실시는 달리 표시하지 않는 한 당 분야의 기술에 속하는 통상적인 조직 배양, 면역학, 분자생물학, 미생물학, 세포생물학 및 재조합 DNA의 기술을 이용할 것이다. 예를 들어, 문헌[Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning (4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012); the series Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5<sup>th</sup> edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; U.S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)); Sohail (ed.) (2004) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC Press)]을 참조하라.

[0044] 범위를 포함하는 모든 숫자 지정, 예를 들어, pH, 온도, 시간, 농도, 및 분자량은 적절한 경우 0.1 또는 1.0의 증분까지 (+) 또는 (-)로 변경되는 근사치이다. 항상 명백히 언급되는 것은 아니지만, 모든 숫자 지정은 용어 "약"이 선행하는 것이 이해되어야 한다. 항상 명백히 언급되는 것은 아니나, 본원에 기재된 시약이 단지 예시이고, 이의 동등물이 당 분야에 공지되어 있는 것이 또한 이해되어야 한다.

[0045] 명세서 및 청구항에서 사용되는 단수 형태는 문맥이 명백히 달리 지정하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "세포"는 세포의 혼합물을 포함하는 복수의 세포를 포함한다.

[0046] 특별히 언급되거나 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 "또는"은 일체를 포함하는 것으로 이해된다.

[0047] 용어 "포함하는"은 "포함하나, 이에 제한되지는 않는"을 의미하는 것으로 본원에서 사용되고, "포함하나, 이에 제한되지는 않는"과 상호교환적으로 사용된다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "포함하는" 또는 "포함하다"는 조성물 및 방법이 언급된 요소를 포함하나, 다른 구성요소를 배제하지는 않는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 조성물 및 방법을 규정하기 위해 사용되는 경우 "~로 본질적으로 구성되는"은 언급된 목적을 위한 조합에 대한 임의의 본질적 유의성의 다른 요소를 배제하는 것을 의미한다. 따라서, 본원에 규정된 바와 같은 요소로 본질적으로 구성되는 조성물은 분리 및 정제 방법으로부터의 미량의 오염물질 및 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 인산염 완충 염수, 보존제 등을 배제하지 않을 것이다. "~로 구성되는"은 다른 성분의 미량을 초과하는 요소 및 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 실질적 방법의 단계 또는 조성물을 생성시키거나 의도된 결과를 달성하기 위한 방법의 단계를 배제하는 것을 의미한다. 상기



변이 용어 각각에 의해 규정된 구현에는 본 발명의 범위 내이다.

- [0049] 용어 "글루코세레브로시다제 1" 및 "GBA1" 및 "GBA1 폴리펩티드"는 글리코스핑고지질 글루코세레브로시드(글루코실세라미드, GlcCer)의 글루코스 및 세라미드로의 베타-글루코시드 결합의 분해를 촉매하는  $\beta$ -글루코세레브로시다제 단백질을 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. GBA1은 또한 산  $\beta$ -글루코시다제; D-글루코실-N-아실스핑고신 글루코하이드롤라제; GCase; 및 글루코시다제, 베타, 산, 및 전사물 변이체 1으로 공지되어 있다.
- [0050] 용어 "글루코세레브로시다제 1 유전자" 및 "GBA1 유전자" 및 "GBA1"은  $\beta$ -글루코세레브로시다제 단백질을 인코딩하는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 유전자에서의 돌연변이는 글루코세레브로시드 및 글루코실스핑고신의 축적을 특징으로 하는 리소좀 축적 질환인 고셔병을 야기시킬 수 있다. GBA에 관한 정보는 Entrez Gene 데이터베이스에서 GeneID: 2629로 발견될 수 있다.
- [0051] 용어 "글루코세레브로시다제 활성"은 글루코세레브로시드의 분해를 나타낸다.
- [0052] 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 "올리뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 다형태, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 이들의 유사체를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 공지되거나 공지되지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 하기는 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편(예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재시, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 폴리뉴클레오티드의 어셈블리 전 또는 후에 제공될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 표지화 성분과의 컨주게이션에 의해 중합반응 후에 추가로 변형될 수 있다. 상기 용어는 또한 이중-가닥 및 단일-가닥 분자 둘 모두를 나타낸다. 달리 특정되거나 필요하지 않는 한, 폴리뉴클레오티드인 본 발명의 임의의 구현에는 이중-가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 예측된 2개의 상보적 단일-가닥 형태 각각 둘 모두를 포함한다.
- [0053] 폴리뉴클레오티드는 4개의 뉴클레오티드 염기인 아데닌 (A); 시토신 (C); 구아닌 (G); 티민 (T); 및 폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우 티미딘에 대해 우라실 (U)의 특정 서열로 구성된다. 따라서, 용어 "폴리뉴클레오티드 서열"은 폴리뉴클레오티드 분자의 알파벳 표시이다. 이러한 알파벳 표시는 중앙 처리 장치를 갖는 컴퓨터의 데이터베이스 내로 입력될 수 있고, 기능 유전체학 및 상동성 검색과 같은 생물정보학 응용분야에 이용될 수 있다.
- [0054] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이에 제한되지는 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 중합체는 자연 또는 비-자연 아미노산 잔기를 함유할 수 있으며, 아미노산 잔기의 펩티드, 올리고펩티드, 이합체, 삼합체, 및 다합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편 둘 모두가 상기 정의에 의해 포함된다. 상기 용어는 또한 폴리펩티드의 발현-후 변형, 예를 들어, 당화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적상, "폴리펩티드"는 단백질이 요망되는 활성을 유지하는 한 자연 서열에 대한 변형, 예를 들어, 결실, 첨가, 및 치환(일반적으로, 사실상 보존성)을 포함하는 단백질을 나타낸다. 이들 변형은 부위-특이적 돌연변이유발과 같이 심사숙고된 것일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류와 같이 우발적인 것일 수 있다.
- [0055] "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개의 펩티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 나타낸다. 상동성은 비교 목적상 정렬될 수 있는 각각의 서열 내의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교된 서열 내의 위치가 동일 염기 또는 아미노산에 의해 점유된 경우, 분자는 상기 위치에서 상동성이 있다. 서열 사이의 상동성 정도는 서열에 의해 공유된 일치하거나 상동성인 위치의 수의 함수이다. "관련되지 않은" 또는 "비-상동성" 서열은 본 발명의 서열 중 하나와 40% 미만의 동일성 또는 대안적으로 25% 미만의 동일성을 공유한다.
- [0056] 다른 서열과 특정 백분율(예를 들어, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%)의 "서열 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 영역(또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역)은 정렬되는 경우 2개의 서열을 비교하여 상기 백분율의 염기(또는 아미노산)가 동일한 것을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 서열 동일성은 당 분야에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어, 문헌[Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology]에 기재된 소프트웨어 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 디폴트

파라미터가 정렬을 위해 사용될 수 있다. 한 정렬 프로그램은 디폴트 파라미터를 이용하는 BLAST이다. 예시적 프로그램은 유전 부호 = 표준; 필터 = 없음; 가닥 = 양가닥; 컷오프 = 60; 기대치 = 10; 매트릭스 = BLOSUM62; 기재 = 50 서열; 분류 = 높은 스코어(HIGH SCORE); 데이터베이스 = 비-중복, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 번역 + SwissProtein + SPupdate + PIR의 디폴트 파라미터를 이용하는 BLASTN 및 BLASTP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 프로그램의 세부사항은 인터넷 주소 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>에서 발견될 수 있다.

- [0057] 동등한 핵산, 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 참조 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 또는 올리고뉴클레오타이드에 대해 적어도 80%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 85%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 90%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 92%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 95%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 97%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 핵산, 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0058] "유전자"는 전사되고 번역된 후에 특정 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩할 수 있는 적어도 하나의 열린해독틀(ORF)을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다.
- [0059] 용어 "발현하다"는 유전자 생성물의 생성을 나타낸다.
- [0060] 본원에서 사용되는 용어 "발현"은 폴리뉴클레오타이드가 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA가 이후에 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드가 유전체 DNA로부터 유래되는 경우, 발현은 진핵생물 세포에서의 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.
- [0061] "유전자 생성물" 또는 대안적으로 "유전자 발현 생성물"은 유전자가 전사되고 번역되는 경우에 발생하는 아미노산(예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드)을 나타낸다.
- [0062] "이종성"은 비교되거나, 도입되거나 통합되는 존재물의 나머지의 것과 유전자형적으로 다른 존재물로부터 유래되는 것을 의미한다. 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 다양한 세포 유형으로 도입된 폴리뉴클레오타이드는 이종성 폴리뉴클레오타이드(발현되는 경우, 이종성 폴리펩티드를 인코딩할 수 있음)이다. 유사하게, 바이러스 벡터로 통합된 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 일부)은 벡터와 관련하여 이종성 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0063] 용어 "트랜스진"은 세포로 도입되는 폴리뉴클레오타이드를 나타내고, RNA로 전사될 수 있고, 임의로, 적절한 조건 하에서 번역되고/되거나 발현될 수 있다. 양태에서, 이는 도입된 세포에 요망되는 특성을 부여하거나, 그렇지 않은 경우는 요망되는 치료 또는 진단 결과를 발생시킨다.
- [0064] "~의 발현을 조절하다"는 당 분야에서 잘 이해된 용어이며, 폴리뉴클레오타이드 서열, 일반적으로 DNA 서열의 전사가 전사의 개시에 기여하거나 전사를 촉진시키는 요소에 작동 가능하게 연결되는 것에 좌우되는 것을 나타낸다. "작동 가능하게 연결된"은 폴리뉴클레오타이드가 이들이 세포에서 기능하도록 하는 방식으로 배열되는 것으로 의도된다. 한 양태에서, 본 발명은 다운스트림 서열, 예를 들어, 글루코세레브로시다제 1(GBA1)에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 제공한다.
- [0065] 폴리뉴클레오타이드에 적용되는 바에 따른 용어 "인코딩하다"는 자연 상태이거나 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 조작되는 경우에 폴리펩티드 및/또는 이의 단편에 대한 mRNA를 생성시키기 위해 전사되고/되거나 번역될 수 있는 경우에 폴리펩티드를 "인코딩"하는 것으로 언급되는 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다. 안티센스 가닥은 상기 핵산의 상보체이며, 인코딩 서열은 이로부터 추론될 수 있다.
- [0066] "검출가능한 표지" 또는 "마커"는 방사성동위원소, 형광색소, 화학발광 화합물, 염료, 및 단백질, 예를 들어, 효소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 검출가능한 표지는 또한 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩티드, 항체 또는 조성물에 부착될 수 있다.
- [0067] "하이브리드화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드가 반응하여, 뉴클레오타이드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 나타낸다. 수소 결합은 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성, 호스테인 결합(Hoogsteen binding), 또는 임의의 다른 서열-특이적 방식에 의해 발생할 수 있다. 복합체는 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 가닥, 다중-가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일한 자가-하이브리드화 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 하이브리드화 반응은 더욱 광범위한 과정 내의 단계, 예를 들어, PCR 반응의 개시, 또는 리보자임에 의한 폴리뉴클레오타이드의 효소적 분해를 구성할 수 있다.
- [0068] 하이브리드화 반응은 다양한 "엄격성" 조건하에서 수행될 수 있다. 일반적으로, 낮은 엄격성 하이브리드화 반응은 10 x SSC 또는 동등한 이온 강도/온도의 용액 중에서 약 40℃에서 수행된다. 중간 엄격성의 하이브리드화는

통상적으로 6 x SSC 중 약 50℃에서 수행되고, 높은 엄격성의 하이브리드화 반응은 일반적으로 1 x SSC 중 약 60℃에서 수행된다. 하이브리드화 반응은 또한 당업자에게 널리 공지된 "생리학적 조건" 하에서 수행될 수 있다. 생리학적 조건의 비제한적인 예는 세포에서 일반적으로 발견되는 온도, 이온 강도, pH 및  $Mg^{2+}$ 의 농도이다.

[0069] 하이브리드화가 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 사이에 역평행 형태로 발생하는 경우, 상기 반응은 "어닐링 (annealing)"으로 언급되며, 상기 폴리뉴클레오티드는 "상보적"인 것으로 기재된다. 제1 폴리뉴클레오티드의 가닥 중 하나와 제2 폴리뉴클레오티드 사이에 하이브리드화가 발생할 수 있는 경우, 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 대해 "상보적" 또는 "상동성"일 수 있다. "상보적" 또는 "상동성"(하나의 폴리뉴클레오티드가 또 다른 폴리뉴클레오티드에 상보적인 정도)은 일반적으로 인정되는 염기쌍 형성 규칙에 따라서 수소 결합을 형성할 것으로 예상되는 반대 가닥 내의 염기의 비율과 관련하여 정량가능하다.

[0070] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는, 예를 들어, 형질전환의 과정에 의해 세포 내에 배치되는 경우, 벡터가 복제될 수 있도록 하는 온전한 레플리콘을 포함하는 비-염색체 핵산을 나타낸다. 벡터는 바이러스 또는 비-바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 배칼로바이러스, 변형된 배칼로바이러스, 파코바이러스(papovirus), 또는 달리 변형된 자연 발생 바이러스를 포함한다. 핵산을 전달하기 위한 예시적인 비-바이러스 벡터는 네이키드 DNA; 단독이거나 양이온성 중합체와 조합된 양이온성 지질과 복합체화된 DNA; 음이온성 및 양이온성 리포솜; 일부 경우에 리포솜에 함유된 이중성 폴리리신, 규정된-길이의 올리고펩티드, 및 폴리에틸렌 이민과 같은 양이온성 중합체와 함께 축합된 DNA를 포함하는 DNA-단백질 복합체 및 입자; 및 바이러스 및 폴리리신-DNA를 포함하는 3성분 복합체의 사용을 포함한다.

[0071] "바이러스 벡터"는 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내에서 숙주 세포로 전달되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합적으로 생성된 바이러스 또는 바이러스 입자로 정의된다. 바이러스 벡터의 예는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터 등을 포함한다. 알파바이러스 벡터, 예를 들어, 쉼리키 삼립 바이러스-기반 벡터 및 신드비스 바이러스-기반 벡터가 또한 유전자 요법 및 면역요법에서 사용하기 위해 개발되었다. 문헌[Schlesinger and Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439 및 Ying et al. (1999) Nat. Med. 5(7):823-827]을 참조하라.

[0072] 당업자에게 공지된 바와 같이, 6개 클래스의 바이러스가 존재한다. DNA 바이러스는 클래스 I 및 II를 구성한다. RNA 바이러스 및 레트로바이러스는 나머지 클래스를 구성한다. 클래스 III 바이러스는 이중-가닥 RNA 유전체를 갖는다. 클래스 IV 바이러스는 양성 단일-가닥 RNA 유전체를 가지며, mRNA 클래스 V 바이러스로 작용하는 유전체 자체는 mRNA 합성을 위한 주형으로 사용되는 음성 단일-가닥 RNA 유전체를 갖는다. 클래스 VI 바이러스는 양성 단일-가닥 RNA 유전체를 갖지만, 복제 뿐만 아니라 mRNA 합성에서도 DNA 중간체를 갖는다. 레트로바이러스는 RNA 형태로 이의 유전 정보를 갖지만, 바이러스가 세포를 감염시킨 후, RNA는 감염된 세포의 유전체 DNA로 통합되는 DNA 형태로 역전사된다. 통합된 DNA 형태는 프로바이러스로 언급된다.

[0073] 본 발명에 따른 벡터 입자가 특정 바이러스를 "기초로 한다"는 것은 벡터가 상기 특정 바이러스로부터 유래되는 것을 의미한다. 벡터 입자의 유전체는 백본으로서 상기 바이러스로부터의 성분을 포함한다. 벡터 입자는 바이러스 유전체에 적합한 필수 벡터 성분을 함유한다. 벡터 입자의 구조 성분 중 일부는 일반적으로 상기 바이러스로부터 유래될 것이나, 특정 성분(예를 들어, 벡터 입자에 다양한 특이성을 제공하는 구조 성분)은 다양한 바이러스로부터 발생될 수 있다.

[0074] 용어 "프로모터"는 특정 유전자의 전사를 개시시키는 DNA의 영역을 나타낸다. 프로모터는 전사를 적절하게 개시시키는데 필요한 프로모터의 최소 부분인 코어 프로모터를 포함하며, 또한 조절 요소, 예를 들어, 전사 인자 결합 부위를 포함할 수 있다. 조절 요소는 전사를 촉진하거나 억제할 수 있다. 프로모터 내의 조절 요소는 전사 활성화제 또는 전사 억제자에 대한 결합 부위일 수 있다. 프로모터는 항시성 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 항시성 프로모터는 항상 활성이고/이거나 전사의 기본 수준을 초과로 유전자의 전사를 항상 유도하는 프로모터를 나타낸다. 유도성 프로모터는 세포에 첨가되거나 세포에서 발현된 분자 또는 인자에 의해 유도될 수 있는 프로모터이다. 유도성 프로모터는 유도의 부재하에서 전사의 기본 수준을 여전히 발생시킬 수 있으나, 유도는 통상적으로 단백질의 현저히 더 많은 발생을 초래한다. 프로모터는 또한 조직 특이적일 수 있다. 조직 특이적 프로모터는 프로모터를 활성화시키는 적절한 전사 인자를 갖는 세포의 특정 집단에서 단백질의 생성을 가능케 한다.

[0075] "역방위 말단 반복" 또는 "ITR" 서열은 당 분야에서 잘 이해되어 있는 용어이며, 바이러스 유전체의 말단에서 발견되는 반대 배향인 비교적 짧은 서열을 나타낸다.

- [0076] 당 분야에서 잘 이해되어 있는 용어 "아데노-관련 바이러스(AAV) 역방위 말단 반복(ITR)" 서열은 자연 단일-가닥 AAV 유전체의 양 말단에 존재하는 약 145개의 뉴클레오타이드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오타이드는 2개의 양자 택일적 배향 중 하나로 제공될 수 있어, 다양한 AAV 유전체 사이 및 단일 AAV 유전체의 2개의 말단 사이에서 이질성을 발생시킨다. 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오타이드는 또한 자기-상보성의 여러 짧은 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 지정됨)을 함유하며, 이는 동족가닥간 염기쌍 형성이 ITR의 상기 부분 내에서 발생하는 것을 가능케 한다.
- [0077] "말단 분해 서열" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 동안 AAV rep 단백질에 의해 분해되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 분해에 저항성이 있다.
- [0078] 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내의 적어도 하나의 항원 인지 부위를 통해 표적, 예를 들어, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 이들의 조합을 인지하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 온전한 폴리클로날 항체, 온전한 모노클로날 항체, 항체 단편(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, 및 Fv 단편), 단쇄 Fv (scFv) 돌연변이, 다중 특이성 항체, 예를 들어, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 생성된 이특이성 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항체가 요망되는 생물학적 활성을 나타내는 항원 인지 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 항체는 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 각각 언급되는 중쇄 불변 도메인의 정체를 기초로 하여 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 면역글로불린의 임의의 5개의 주요 클래스, 또는 이들의 서브클래스(아이소형(isotype))(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)의 항체일 수 있다. 다양한 클래스의 면역글로불린은 다양하고 널리 공지된 서브유닛 구조 및 3차원 형태를 갖는다. 항체는 네이키드 항체이거나, 독소, 방사성동위원소 등과 같은 다른 분자에 컨쥬게이션된 항체일 수 있다.
- [0079] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 나타내고, 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 나타낸다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, 및 Fv 단편, 선형 항체, 단쇄 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0080] "모노클로날 항체"는 매우 특이적 인지 및 단일 항원 결정인자 또는 에피토프의 결합과 관련된 동종성 항체 집단을 나타낸다. 이는 다양한 항원 결정인자에 대해 특이적인 다양한 항체를 통상적으로 포함하는 폴리클로날 항체와 대조적이다. 용어 "모노클로날 항체"는 온전한 전장 모노클로날 항체뿐만 아니라 항체 단편(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv), 단쇄(scFv) 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인지 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자 모두를 포함한다. 또한, "모노클로날 항체"는 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 및 트랜스제닉 동물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 임의의 수의 방식으로 제조된 상기 항체를 나타낸다.
- [0081] 용어 "인간화 항체"는 최소의 비-인간(예를 들어, 뮤린) 서열을 함유하는 특이적 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린, 또는 이들의 단편인 비-인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 형태를 나타낸다. 통상적으로, 인간화 항체는 상보성 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 요망되는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비-인간 중(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린이다(문헌[Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; 및 Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536] 참조). 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 요망되는 특이성, 친화성, 및 능력을 갖는 비-인간 중으로부터의 항체 내의 상응하는 잔기로 대체된다. 인간화 항체는 항체 특이성, 친화성, 및/또는 능력을 정교화시키고 최적화시키기 위해 Fv 프레임워크 영역 내 및/또는 대체되는 비-인간 잔기 내의 추가 잔기의 치환에 의해 추가로 변형될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린에 상응하는 CDR 영역 모두 또는 실질적으로 모두를 함유하는 적어도 1개, 통상적으로 2개 또는 3개의 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함할 것인 반면, FR 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 FR 영역이다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc), 통상적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 인간화된 항체를 생성시키기 위해 사용되는 방법의 예는 미국 특허 5,225,539호에 기재되어 있다.
- [0082] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체 또는 당 분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여 제조된 인간에 의해 생성되는 항체에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체의 이러한 정의는 온전한 항체 또는 전장 항체, 이들의 단편, 및/또는 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체, 예를 들어, 뮤린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다.



- [0083] 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2개 이상의 종으로부터 유래되는 항체를 나타낸다. 통상적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 가변 영역은 요망되는 특이성, 친화성, 및 능력을 갖는 포유동물의 한 종(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 등)으로부터 유래된 항체의 가변 영역에 해당하는 한편, 불변 영역은 상기 종에서 면역 반응을 유도하는 것을 피하기 위해 또 다른 종(일반적으로, 인간)으로부터 유래된 항체 내의 서열과 상동성이다.
- [0084] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정인자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정 항체에 의해 인지되고 특이적으로 결합될 수 있는 항원의 부분을 나타낸다. 항원이 폴리펩티드인 경우, 에피토프는 단백질의 삼차 폴딩에 의해 병렬된 연속 아미노산 및 비연속 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 단백질 변성시에 유지되는 반면, 삼차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 단백질 변성시에 통상적으로 상실된다. 에피토프는 통상적으로 독특한 공간적 형태 내에 적어도 3개, 적어도 5개, 또는 적어도 8 내지 10개의 아미노산을 포함한다.
- [0085] 에피토프 또는 항원 분자에 "특이적으로 결합하는" 항체는 상기 항체가 관련되지 않은 단백질을 포함하는 다른 물질보다 에피토프 또는 항원 분자에 더욱 빈번히, 더욱 신속히, 더 긴 기간 동안, 더 큰 친화성으로, 또는 이들 중 일부의 조합으로 반응하거나 회합하는 것을 의미한다. 구현예에서, "특이적으로 결합하다"는, 예를 들어, 항체가 약 0.1 mM 또는 그 미만, 더욱 일반적으로는 약 1  $\mu$ M 미만의 KD로 단백질에 결합하는 것을 의미한다. 구현예에서, "특이적으로 결합하다"는 항체가 때때로 적어도 약 0.1  $\mu$ M 또는 그 미만, 다른 때는 적어도 약 0.01  $\mu$ M 또는 그 미만의 KD로 단백질에 결합하는 것을 의미한다. 다양한 종의 상동성 단백질 사이의 서열 정렬로 인해, 특이적 결합은 하나 초과 종의 특정 단백질을 인지하는 항체를 포함할 수 있다. 제1 표적에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 모이어티는 제2 표적에 특이적으로 결합할 수 있거나 특이적으로 결합하지 않을 수 있는 것이 이해된다. 이와 같이, "특이적 결합"은 한정된 결합, 예를 들어, 단일 표적으로의 결합을 반드시 필요로 하지 않는다(그러나, 한정된 결합, 예를 들어, 단일 표적으로의 결합을 포함할 수 있다). 일반적으로, 반드시 그러한 것은 아니지만, 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미한다.
- [0086] 용어 "단백질병"은 특정 단백질이 구조적으로 비정상인 되고/되거나 독성 방식으로 축적됨으로써, 신체의 세포, 조직 및 기관의 기능을 파괴하는 질병을 나타낸다. 종종, 단백질은 이의 정상적 형태로 폴딩되는데 실패한다. 상기 미스폴딩된 상태에서, 단백질은 독성이 되거나, 이의 일반적인 기능을 상실할 수 있다. 단백질병의 비제한적인 예는 알츠하이머병, 고셔병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상마비, 권투선수치매, 파킨슨증, 파킨슨병, 레비 소체치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 은친화입자병, 신경절신경아교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할리포르텐-스파츠병, 및 지방갈색소증, 뇌  $\beta$ -아밀로이드 혈관병증, 늑내장에서의 망막 신경절 세포 변성, 프리온 질병, 근육위축가쪽경화증(ALS), 헌팅턴병 및 다른 삼염기 반복 장애, 알렉산더병, 세이피노병증(seipinopathies), 아밀로이드 신경병증, 노인 전신 아밀로이드증, 서피노병증(serpinoopathies), 아밀로이드증, 붕입체 근염/근육병증, 맬로리소체, 폐포단백증, 및 중환자 근육병증(critical illness myopathy)(CIM)을 포함한다.
- [0087] "피검체", "개체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 척추동물, 예를 들어, 포유동물을 나타낸다. 포유동물은 무린, 래트, 토끼, 유인원, 소과 동물, 양과 동물, 돼지와 동물, 개과 동물, 고양이과 동물, 농장 동물, 스포츠 동물, 애완동물, 말과 동물, 영장류, 및 인간을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 구현예에서, 포유동물은 말, 개, 및 고양이를 포함한다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 포유동물은 인간 환자이다.
- [0088] "투여하는"은 대상체의 신체 내부에 작용제가 존재하도록 만드는 방식으로 대상체에 작용제 또는 작용제를 함유하는 조성물을 제공하는 수단으로 본원에서 정의된다. 이러한 투여는 경구, 경피(예를 들어, 질, 직장, 경구 점막), 주사(예를 들어, 피하, 정맥내, 비경구, 복막내, CNS 내), 또는 흡입(예를 들어, 경구 또는 비내)을 포함하는 이에 제한되지는 않는 임의의 경로에 의해 이루어질 수 있다. 약학적 제조물은 물론 각각의 투여 경로에 적합한 형태에 의해 제공된다.
- [0089] 질병을 "치료하는" 또는 질병의 "치료"는 (1) 질병을 예방하거나, 즉, 질병에 걸리기 쉬울 수 있으나, 질병의 증상을 아직 경험하지 않았거나 나타내지 않은 환자에서 질병의 임상적 증상이 발생하지 않도록 하거나; (2) 질병을 억제하거나, 즉, 질병 또는 이의 임상적 증상의 발생을 억제하거나 감소시키거나; (3) 질병을 경감시키는, 즉, 질병 또는 이의 임상적 증상의 회귀를 야기시키는 것을 포함한다.
- [0090] 용어 "치료"와 관련된 용어 "고통받는"은 질병으로 진단되었거나 질병에 걸리기 쉬운 환자 또는 개체를 나타낸다. 환자는 또한 환자의 가족 혈통에서의 병력 또는 질병과 관련된 유전적 돌연변이의 존재로 인해 질병으로 "고통받을 위험이 있는" 것으로 언급될 수 있다. 이러한 환자는 특징적인 질병 병리의 전부 또는 일부가 아직 발

생하지 않은 환자이다.

[0091] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 이롭거나 요망되는 결과를 달성하기에 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 투여될 수 있다. 상기 전달은 개별적 투여량 단위가 사용되는 기간, 치료제의 생체 이용률, 투여 경로 등을 포함하는 다수의 요인에 좌우된다. 그러나, 임의의 특정 대상체에 대한 본 발명의 치료제의 특정 용량 수준은 사용되는 특정 화합물의 활성, 대상체의 연령, 체중, 전반적 건강, 성별, 및 식이, 투여 시간, 배출 속도, 약물 조합, 및 치료되는 특정 장애의 중증도 및 투여 형태를 포함하는 다양한 요인에 좌우되는 것이 이해된다. 치료 투여량은 일반적으로 안정성 및 효능을 최적화시키기 위해 적정될 수 있다. 통상적으로, 시험관 내 및/또는 생체 내 시험으로부터의 투여량-효과 상관관계는 환자 투여를 위한 적절한 용량에 대한 유용한 지침을 초기에 제공할 수 있다. 일반적으로, 시험관 내에서 효과적인 것으로 밝혀진 농도와 상응하는 혈청 수준을 달성하는데 효과적인 화합물의 양을 투여하는 것이 요망될 것이다. 상기 파라미터의 결정은 충분히 당 분야의 기술 내이다. 상기 고려사항뿐만 아니라 효과적인 제형 및 투여 절차가 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 표준 교과서에 기재되어 있다. 상기 정의와 일치하는, 본원에서 사용되는 용어 "치료적 유효량"은 단백질병과 관련된 하나 이상의 증상 또는 생체 외, 시험관 내 또는 생체 내에서의 독성 지질,  $\alpha$ -시누클레인, 타우, 또는 단백질 응집체의 이상/증가된 수준을 치료(예를 들어, 개선)하는 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키기에 충분한 양이다.

[0092] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 표준 약학적 담체, 예를 들어, 인산염 완충 염수 용액, 물, 및 에멀전, 예를 들어, 오일/물 또는 물/오일 에멀전, 및 다양한 유형의 습윤제 중 임의의 것을 포함한다. 조성물은 또한 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있다. 담체, 안정화제 및 에뮤버트의 예에 대해, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (20th ed., Mack Publishing Co. 2000)]을 참조하라.

[0093] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 값 모두에 대한 속기인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50으로 구성되는 군으로부터의 임의의 수, 수의 조합, 또는 하위-범위를 포함하는 것이 이해된다.

[0094] 본원의 변수의 임의의 정의에서의 화학적 그룹의 목록의 언급은 나열된 그룹의 임의의 단일한 그룹 또는 조합으로서의 상기 변수의 정의를 포함한다. 본원의 변수 또는 양태에 대한 구현예의 언급은 임의의 단일한 구현예 또는 임의의 다른 구현예 또는 이의 일부와의 조합으로서의 상기 구현예를 포함한다.

[0095] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에 제공된 다른 조성물 및 방법 중 임의의 조성물 및 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.

#### [0096] 설명적 구현예

[0097] 본 발명의 개시는 단백질병을 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 포유동물에서 글루코세레브로시다제를 증가시키는 것은 치료적으로 이로운 결과, 예를 들어, 신경 기능 개선, 기억 기능 개선, 기억 또는 신경 기능의 상실 예방, 독성 지질(예를 들어, 글루코실스핑고신) 감소,  $\alpha$ -시누클레인 감소, 타우 감소, 및 단백질 응집체 축적의 억제에 이바지한다. 한 구현예에서, 신경 기능의 개선은 단백질병으로 인한 기억 기능의 감소를 나타내는 대상체에서 관찰된다. 인지 장애의 진단은 의료 진료의 일상적인 기술 내이다. 인지 시험은 당 분야에 공지되어 있으며, 단축 지능 측정 스코어(abbreviated mental test score)(AMTS), 간이 정신 상태 검사(mini mental state examination)(MMSE), 노인에서의 인지 저하에 대한 정보제공자 설문지(informant questionnaire on cognitive decline in the elderly)(IQCODE), 및 인지 장애에 대해 시험하는 인지의 일반 진료의 평가(General Practitioner Assessment of Cognition)와 같은 시험을 포함할 수 있다. 이들 시험은, 예를 들어, 기억, 추리 기술, 문제 해결 기술, 의사결정 기술, 주의집중기간, 및 언어 기술에서의 장애를 평가할 수 있다. 영상화 방법은 또한 인지 저하를 진단하는데 이용가능하다. 예를 들어, 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영술(SPECT) 및 양전자 방출 단층촬영술(PET)의 기능적 뇌영상 양식이 인지 기능 이상을 평가하는데 유용하다. 일부 양태에서, 신경 기능의 개선은 환자의 기억 기능 또는 인지 기능을 평가함으로써 측정된다.

[0098] 인지 저하, 예를 들어, 기억 상실을 예방하기 위한 방법과 관련하여, 방사성추적자로서 탄소-11 피츠버그 화합물 B를 이용한 PET 영상화(PIB-PET)가 다양한 종류의 단백질병의 예측 진단에 유용하였다. 예를 들어, 가벼운 인지 장애를 갖는 환자가 2년 이내에 알츠하이머병이 발생하는 것을 예측하는데 있어서 PIB-PET는 86% 정확한 것으로 연구에서 밝혀졌다. 또 다른 연구에서, PIB 또는 또 다른 방사성추적자 탄소-11 디하이드로테트라베나진(DTBZ)을 이용하는 것은 인지 장애 또는 가벼운 치매를 갖는 환자의 1/4 초과에 대해 더욱 정확한 진단을 발생

시켰다.

[0099] 본원에 기재된 방법의 특정 구현예에서, 포유동물은 치료 전에 감소된 글루코세레브로시다제 활성을 갖는다. 글루코세레브로시다제 활성은 당 분야에 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 글루코세레브로시다제 활성은 포유동물의 뇌 척수액으로부터 측정될 수 있다.

[0100] 일부 구현예에서, 포유동물은 GBA1 유전자에 대해 "야생형"이다. 용어 "야생형"은 단백질의 효소 활성에 영향을 미치는 것으로 공지된 검출가능한 서열 돌연변이가 없는 유전자 또는 단백질을 나타낸다. 이러한 서열은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 비제한적인 예가 GenBank 등록 번호 NM\_000157.3(mRNA) 및 NP\_000148.2(단백질)에서 발견될 수 있다. 성숙 GBA1 단백질에 대한 예시적 서열은 하기와 같다:

```
ARPCIPKSGFYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRMELSMGPIQANH
TGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIR
VPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSLASPTW
SPTWLKLTNGAVNGKSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFVAVTAENEPSAGL
LSGYPFQCLGFTPEHQDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPE
AAKYVHGIADVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVSGSKFQSVRLGSDWRG
MQYSHSIIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPWVRNFDSPDIVDITKDTFYKQPMFYHL
GHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAAVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGVFL
ETISPGYSIHTYLWRRQ (SEQ ID NO:1)
```

[0101]

[0102] 유전자가 야생형인 것으로 밝혀졌으나, 글루코세레브로시다제 활성에서 감소가 관찰되는 경우, 활성의 감소는 단백질의 활성의 억제 또는 유전자/단백질의 전사 또는 번역의 억제로 인한 것일 수 있다. 이들 메커니즘은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 단백질의 생성은 이상 세포 메커니즘에 의해 억제될 수 있다. 대안적으로, 단백질은 세포 내에서 변형될 수 있고, 이는 감소된 효소 활성 또는 효소 활성의 상실을 야기시킨다.

[0103] 일부 구현예에서, 포유동물은 글루코세레브로시다제 1(GBA1) 유전자 내에 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 단백질의 활성에 영향을 미칠 수 있는 GBA1 내의 특정 돌연변이는 L444P, D409H, D409V, E235A, 및 E340A(예를 들어, 모든 목적상 참조로서 포함되는 문헌[Cullen et al. (2011) Annals of Neurology 69:940-953] 참조)를 포함한다. 특정 구현예에서, 돌연변이는 D409V 돌연변이이다.

[0104] 본원에 개시된 방법은 단백질을 갖는 포유동물을 치료하는데 유용하다. 특정 구현예에서, 단백질병은 단백질 응집체를 포함한다. "단백질 응집체"는 미스폴딩된 단백질이 세포내 또는 세포외에서 응집하는 생물학적 현상을 나타낸다. 이들 단백질 응집체는 독성일 수 있다. 특정 구현예에서, 단백질 응집체는 유비퀴틴, 타우, 및  $\alpha$ -시누클레인으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 포함한다. 유비퀴틴은 진핵생물 유기체의 거의 모든 조직에서 발견되는 작은 단백질이다. 이는 기질 단백질에 부착될 수 있는 76개의 아미노산 단백질이다. 유비퀴틴의 첨가는 단백질 분해; 전사, 번역, 및 단백질 국소화의 조절; 또는 단백질 활성/상호작용의 조절을 발생시킬 수 있다.

[0105] 용어 "타우"는 미세관을 안정화시키는 작용을 하는 타우 단백질을 나타낸다. 이들은 중추신경계의 뉴런 및 별아교세포 및 희소돌기아교세포에서 풍부하다. 타우 단백질(타우 봉입체, pTau)의 과인산화는 알츠하이머병 및 다른 타우병증의 발병기전과 관련된 쌍을 이룬 나선형 필라멘트 및 곧은 필라멘트의 매듭의 자기-어셈블리를 발생시킬 수 있다.

[0106] 본 발명의 특정 양태는 치료적 유효량의, 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 타우병증을 치료하거나 예방(예를 들어, 타우병증을 갖는 포유동물에서 신경 기능을 개선)하기 위한 방법에 관한 것이다. 타우병증은 타우의 축적을 특징으로 하는 신경변성 장애이다. 예시적 타우병증은 알츠하이머병, 진행성 핵상마비, 권투선수치매, 파킨슨병, 염색체 17과 관련된 파킨슨증, 라이티코-보딕병, 매듭-우세 치매, 은친화입자병, 신경절신경아교종, 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할러포르텐-스파츠병, 지방갈색소증, 레비소체치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 전두측두엽 치매, 및 전두측두엽 변성을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 6개의 타우 아이소형 모두는 알츠하이머병 뇌로부터의 쌍을 이룬 나선형 필라멘트에서 종종 과인산화된 상태로 존재한다. 다른 신경변성 질병에서, 특정 타우 아이소형이 강화된 응집체의 침착이 보고된 적이 있다. 미스폴딩되는 경우, 그렇지 않은 경우에는 매우 가용성인 상기 단백질은 다수의 신경변성 질병에 기여하는 극도로 불용성인 응집체를 형성할 수 있다.

[0107] " $\alpha$ -시누클레인"은 인간에서 SNCA 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. 상기 단백질은 신경 조직에서 발견되며, 신경퇴행, 해마, 흑색질, 시상, 및 소뇌에서 주로 발견된다. 뉴런 외에, 상기 단백질은 또한 신경아교세포 및 멜라닌 세포에서 발견될 수 있다.  $\alpha$ -시누클레인은 응집되어 일부 예에서 레비소체를 특징으로 하는 병리학적

질환에서 불용성 원섬유를 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, 단백질병은 시누클레인병이다. 시누클레인병의 비제한적인 예는 파킨슨병, 다계통위축, 및 레비소체 치매를 포함한다. 시누클레인병으로 분류된 일부 질병은 또한 타우 단백질의 축적을 가질 수 있으며, 타우병증으로 분류된 일부 질병은 또한  $\alpha$ -시누클레인 단백질의 축적을 가질 수 있다.

[0108] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법에서 언급된 단백질병은 알츠하이머병, 고셔병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상마비, 파킨슨증, 파킨슨병, 라이티코-보디병, 레비소체치매, 매듭-우세 치매, 권투선수치매, 픽병, 피질기저핵 변성, 은친화입자병, 신경절신경아교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성경화범뇌염, 납중독뇌병증, 결절경화증, 할리포르텐-스파츠병, 및 지방갈색소증으로 구성된 군으로부터 선택된 질병이다.

[0109] 본원에 기재된 방법에서 사용되는 작용제는 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제일 수 있다. 예를 들어, 상기 작용제는 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 임의의 소분자 화합물, 항체, 핵산 분자, 폴리펩티드, 또는 이들의 생물학적 동등물일 수 있다.

[0110] 양태에서, 상기 작용제는 GBA1 유전자를 인코딩하는 핵산 또는 이의 생물학적 동등물(예를 들어, 글루코세레브로시다제의 분해를 촉매하는 폴리펩티드를 인코딩하는 상기 핵산의 단편, 유사체, 또는 유도체)을 포함한다. 핵산의 생물학적 동등물은 폴리뉴클레오티드의 자연 발생 대립유전자 변이체 또는 폴리뉴클레오티드의 비-자연 발생 변이체일 수 있다. 특정 구현예에서, 핵산은 본원에 개시된 GBA1 폴리펩티드의 코딩 서열의 대립유전자 변이체인 코딩 서열을 가질 수 있다. 당 분야에 공지된 바와 같이, 대립유전자 변이체는, 예를 들어, 인코딩된 폴리펩티드의 기능을 실질적으로 변경시키지 않는 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 결실, 또는 첨가를 갖는 폴리뉴클레오티드 서열의 대안적 형태이다.

[0111] 구현예에서, GBA1의 생물학적 동등물은 글루코세레브로시다제 효소 활성에 필요한 최소 서열을 포함하는 것이다. 또 다른 구현예에서, GBA1의 생물학적 동등물은 높은 엄격성의 조건하에서 본원에 기재된 GBA1 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 개시된 GBA1 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드)의 상보체에 하이브리드화되는 핵산을 포함한다. 또 다른 구현예에서, GBA1의 생물학적 동등물은 본원에 기재된 GBA1 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 개시된 GBA1 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드)와 적어도 80%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 85%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 90%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 92%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 95%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 97%의 서열 동일성, 또는 대안적으로 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함한다.

[0112] 구현예에서, 핵산은, 예를 들어, 숙주 세포로부터의 폴리펩티드의 발현 및 분비를 돕는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 세포로부터의 폴리펩티드의 운반을 조절하기 위한 분비 서열로 작용하는 선도 서열)에 동일 해독틀로 융합된 성숙 GBA1 폴리펩티드 또는 이의 생물학적 동등물에 대한 코딩 서열을 함유한다. 선도 서열을 갖는 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 분해되어 폴리펩티드의 성숙 형태를 발생시키는 프레단백질(preprotein)이다. 폴리뉴클레오티드는 추가적인 5' 아미노산 잔기가 더해진 성숙 단백질인 프로단백질(proprotein)을 또한 인코딩할 수 있다. 프로서열을 갖는 성숙 단백질은 프로단백질이며, 단백질의 비활성 형태이다. 프로서열이 분해된 후, 활성 성숙 단백질이 남겨진다.

[0113] 구현예에서, 핵산은, 예를 들어, 인코딩된 폴리펩티드의 검출 또는 정제를 가능케 하는 마커 서열을 함유한다. 이러한 마커는 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 예시적 마커의 개관은 문헌[Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning (4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012)]에서 발견될 수 있다. 예시적 마커는 히스티딘 태그; 헤마글루티닌(HA) 태그; 칼모듈린 태그; FLAG 태그; Myc 태그; S 태그; SBP 태그; Softag 1; Softag 3; V5 태그; Xpress 태그; Isopeptag; SpyTag; 비오틴 카르복실 담체 단백질(BCCP) 태그; GST 태그; 형광 단백질 태그, 예를 들어, 증강된 녹색 형광 단백질(EGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 녹색 형광 단백질(GFP), 황색 형광 단백질(YFP) 등, 말토스 결합 단백질 태그, Nus 태그, Strep-태그, 타이오레독신 태그, TC 태그, 및 Ty 태그를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0114] 본원에 기재된 핵산은 당 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다. 구현예에서, 핵산은 올리고뉴클레오티드 합성기를 이용한 화학적 합성에 의해 작제된다. 구현예에서, 특정 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 올리고머는 합성된 후 라이게이션될 수 있다. 개별적 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 상보적 어셈블리를 위해 5' 또는 3' 오버행을 함유한다.

[0115] 어셈블리된 후, 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 벡터로 삽입될 수 있고, 임의로 요망되는 숙주에서 단백질의 발현에 적절한 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 비-벡터 기반 전달 방



법을 이용하여 세포로 전달(예를 들어, 생체 내 또는 시험관 내 전달)될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Yuan, Non-Viral Gene Therapy (InTech 2011)]을 참조하라. 적절한 어셈블리는 뉴클레오타이드 서열분석, 제한 맵핑(restriction mapping), 적합한 숙주에서의 생물학적 활성 폴리펩티드의 발현 등에 의해 확인될 수 있다.

[0116] 핵산은 당업자에게 일반적으로 공지된 다양한 메커니즘에 의해 세포로 전달될 수 있다. 바이러스 작제물은 적합한 숙주 세포에서의 바이러스의 생성을 통해 전달될 수 있다. 이후, 바이러스는 숙주 세포로부터 수거되고, 표적 세포와 접촉된다. 관심 유전자를 발현시킬 수 있는 바이러스 및 비-바이러스 벡터는 DNA/리포솜 복합체, 마이셀 및 표적화된 바이러스 단백질-DNA 복합체를 통해 표적화된 세포로 전달될 수 있다. 표적화 항체 또는 이의 단편을 또한 포함하는 리포솜이 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 세포 또는 세포 집단으로의 폴리뉴클레오타이드의 전달에 더하여, 세포 또는 세포 집단으로의 본원에 기재된 단백질의 직접적 도입은 단백질 트랜스펙션의 비제한적인 기술에 의해 수행될 수 있으며, 본 발명의 단백질의 발현을 향상시킬 수 있고/있거나 본 발명의 단백질의 활성을 촉진시킬 수 있는 대안적 배양 조건이 다른 비제한적인 기술이다.

[0117] 본 발명의 유전자를 인코딩하는 벡터를 전달하는 다른 방법은 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, DEAE-텍스트란 트랜스펙션, 전기천공, 미세주사, 원형질체 융합, 또는 리포솜-매개 트랜스펙션을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 벡터로 트랜스펙션되는 숙주 세포는 E. 콜리(*E. coli*) 또는 다른 박테리아, 효모, 진균, 곤충 세포(예를 들어, SF9 곤충 세포에서의 발현을 위한 배콜로바이러스 벡터), 또는 마우스, 인간, 또는 다른 동물(예를 들어, 포유동물)로부터 유래된 세포를 포함(이에 제한되지는 않음)할 수 있다. 클로닝된 DNA에 의해 인코딩되는 단백질, 융합체, 폴리펩티드 단편, 또는 돌연변이의 시험관 내 발현이 또한 이용될 수 있다. 분자생물학의 당업자는 제조할 단백질 및 이의 단편을 생성시키기 위해 매우 다양한 발현 시스템 및 정제 시스템이 이용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0118] 양태에서, 상기 작용제는 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외에서 표적 세포로 전달될 수 있는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 비-바이러스 벡터이다. 이중성 폴리뉴클레오타이드는 관심 서열을 포함할 수 있고, 하나 이상의 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있고, 관심 핵산 서열의 전사를 조절할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 벡터는 궁극적 표적 세포 또는 대상체에서 복제될 수 있을 필요는 없다. 용어 벡터는 발현 벡터 및 클로닝 벡터를 포함할 수 있다.

[0119] GBA1 유전자 또는 이의 동등물을 인코딩하는 핵산의 발현을 조절하는 프로모터는 항시성, 유도성, 또는 조직 특이적 프로모터일 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터를 작제하는 경우 유도성 시스템이 이용될 수 있다. 유도성 시스템의 비제한적인 예는 테트라사이클린, 탈피호르몬, 에스트로젠, 프로게스테론, 이합체화의 화학적 유도인자, 및 이소프로필-베타-D1-티오갈락토피라노시드(PTG)에 의한 조절을 포함한다.

[0120] 본 발명의 개시에서 유용한 프로모터는 항시성 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 프로모터의 일부 예는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유암 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 단순 헤르페스 바이러스 프로모터, 및 CMV 프로모터를 포함한다.

[0121] 양태에서, 상기 작용제는 관심 유전자를 인코딩하는 핵산(예를 들어, GBA1 또는 이의 생물학적 동등물)을 포함하는 바이러스 벡터이다. 바이러스 유전자 전달은 포유동물에서의 유전자의 치료 유전자 전달을 위한 효과적인 방법이다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 바이러스 벡터는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 구현예에서, 바이러스 벡터는 항신경 바이러스(또는 항신경 바이러스의 조합물)로부터 유래되거나, 항신경 바이러스(또는 항신경 바이러스의 조합물)를 기초로 한다. 항신경 바이러스의 예는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV), 단순 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 바이러스 벡터를 제조하고 이용하기 위한 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 각각의 전체내용이 참조로서 포함되는 문헌[Carol Shoskes Reiss, Neurotropic Viral Infections (Cambridge University Press, 2008); Michael G. Kaplitt and Matthew J. During, Gene Therapy of the Central Nervous System: From Bench to Bedside (Gulf Professional Publishing 2006); Jean-Michel H. Vos, Viruses in Human Gene Therapy (Springer 1995); Andres M. Lozano et al., Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery (Springer 2009); 및 Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning (4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012)]에 기재되어 있다.

[0122] 구현예에서, 바이러스 벡터는 야생형 바이러스로부터 유래되거나 야생형 바이러스를 기초로 한다. 상기 바이러스의 예는 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV), 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV) 및 고양이 면역결핍 바이러스(FIV)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 대안적으로, 무린 백혈병 바이러스(MLV)와 같은 벡터 백본을 위한 기초로서 다른 레트로바이러스가 사용될 수 있는 것이 고려된다. 본 발명에 따른 바

이러스 벡터가 특정 바이러스의 성분으로 제한될 필요가 없는 것이 명백할 것이다. 바이러스 벡터는 2개 이상의 상이한 바이러스로부터 유래된 성분을 포함할 수 있으며, 이는 또한 합성 성분을 포함할 수 있다. 벡터 성분은 요망되는 특징, 예를 들어, 표적 세포 특이성을 수득하기 위해 조작될 수 있다.

[0123] 미국 특허 번호 6,924,123호에는 특정 레트로바이러스 서열이 표적 세포 유전체로의 통합을 촉진하는 것이 개시되어 있다. 상기 특허에는 각각의 레트로바이러스 유전체가 비리온 단백질 및 효소를 코딩하는 gag, pol 및 env로 언급되는 유전자를 포함하는 것이 교시되어 있다. 이들 유전자는 긴 말단 반복(LTR)으로 언급되는 영역의 양 말단에 플랭킹(flanking)된다. LTR은 프로바이러스 통합, 및 전사를 담당한다. 이들은 또한 인핸서-프로모터 서열로 작용한다. 즉, LTR은 바이러스 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 레트로바이러스 RNA의 캡시드화(encapsidation)는 바이러스 유전체의 5' 말단에 위치된 psi 서열에 의해 발생한다. LTR 자신은 U3, R 및 U5로 언급되는 3개의 요소로 나뉘어질 수 있는 동일한 서열이다. U3는 RNA의 3' 말단에 독특한 서열로부터 유래된다. R은 RNA의 양 말단에서 반복된 서열로부터 유래되고, U5는 RNA의 5' 말단에 독특한 서열로부터 유래된다. 3개의 요소의 크기는 다양한 레트로바이러스 사이에서 매우 다양할 수 있다. 바이러스 유전체에 대해, 폴리(A) 첨가(종료) 부위는 우측 LTR에서 R과 U5 사이의 경계에 있다. U3는 프로바이러스의 전사 조절 요소 대부분을 함유하며, 이는 세포 및 일부 경우에서 바이러스 전사 활성화 단백질에 반응하는 프로모터 및 다수의 인핸서 서열을 포함한다.

[0124] 구조 유전자 gag, pol 및 env 자신과 관련하여, gag는 바이러스의 내부 구조 단백질을 인코딩한다. Gag 단백질은 성숙 단백질 MA(기질), CA(캡시드) 및 NC(뉴클레오패시드)로 단백질분해적으로 가공된다. pol 유전자는 역전사효소(RT)를 인코딩하며, 이는 유전체의 복제를 매개하는 DNA 중합효소, 관련 RNase H 및 인테그라제(IN)를 함유한다.

[0125] 바이러스 벡터 입자의 생성을 위해, 벡터 RNA 유전체는 숙주 세포에서 이를 인코딩하는 DNA 작제물로부터 발현될 수 있다. 벡터 유전체에 의해 인코딩되지 않는 입자의 성분은 숙주 세포에서 발현된 추가 핵산 서열(gag/pol 및 env 유전자 중 하나 또는 둘 모두를 일반적으로 포함하는 "패키징 시스템")에 의해 트랜스(trans)로 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 입자의 생성에 필요한 서열의 세트는 일시적 트랜스팩션에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있거나, 이들은 숙주 세포 유전체로 통합될 수 있거나, 이들은 방식들의 혼합으로 제공될 수 있다. 관련된 기술은 당업자에게 공지되어 있다.

[0126] 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스로부터 유래되거나 아데노바이러스를 기초로 한다. 아데노바이러스는 50개 초과 혈청형을 포함하는 비교적 널리 특성규명된 동종성 바이러스 그룹이다. 예를 들어, 국제 PCT 출원 번호 WO 95/27071호를 참조하라. 아데노바이러스는 성장시기에 용이하고, 숙주 세포 유전체로의 통합을 필요로 하지 않는다. 재조합 아데노바이러스 유래 벡터, 예를 들어, 야생형 바이러스의 재조합 및 생성에 대한 잠재성을 감소시키는 벡터가 또한 작제되었다. 예를 들어, 국제 PCT 출원 번호 WO 95/00655호 및 WO 95/11984호를 참조하라.

[0127] 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV)로부터 유래되거나 아데노-관련 바이러스(AAV)를 기초로 한다. 재조합 AAV(rAAV) 시스템에서, 관심 단백질(예를 들어, GBA1 단백질)을 인코딩하는 핵산 서열은 AAV 바이러스 입자로 패키징된다. 재조합 바이러스 유전체는 단백질의 발현을 확립시키는 임의의 요소, 예를 들어, 프로모터, 트랜스진(예를 들어, GBA1 트랜스진), ITR, 리보솜 결합 요소, 종료자, 인핸서, 선택 마커, 인트론, 폴리A 신호, 및/또는 복제 기점을 포함할 수 있다.

[0128] 양태에서, 본 발명의 재조합 AAV 입자는 1개 또는 2개의 ITR에 플랭킹된 GBA1을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 함유할 수 있다. 핵산은 AAV 입자 내에 캡시드화된다. AAV 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 전사 방향으로 구성요소에 작동 가능하게 연결된 관심 단백질 코딩 서열(들)(예를 들어, GBA1 단백질을 인코딩하는 트랜스진), 전사 개시 및 종료 서열을 포함하는 조절 서열을 포함함으로써 발현 카세트 형성을 한다. 발현 카세트는 5' 및 3' 말단 상에서 적어도 하나의 기능성 AAV ITR 서열에 플랭킹된다. "기능성 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 구조, 복제 및 패키징에 대해 의도된 바와 같이 작용하는 것을 의미한다. 예를 들어, 모두 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Davidson et al. (2000) *PNAS* 97:3428-32; Passini et al. (2003) *J. Virol.* 77:7034-40; 및 Pechan et al. (2009) *Gene Ther.* 16:10-16]을 참조하라. 본 발명의 일부 양태를 실시하기 위해, 재조합 벡터는 적어도 캡시드화에 필수적인 AAV의 서열 및 rAAV에 의한 감염을 위한 물리적 구조 모두를 포함한다. 본 발명의 벡터에서 사용하기 위한 AAV ITR은 야생형 뉴클레오타이드 서열을 가질 필요는 없으며(예를 들어, 문헌[Kotin *Hum. Gene Ther.* (1994) 5:793-801]에 기재되어 있음), 이는 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나, AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의

의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다.

[0129] AAV의 40개 초과 혈청형이 현재 공지되어 있으며, 새로운 혈청형 및 현존하는 혈청형의 변이체가 계속 확인되고 있다. 문헌[Gao et al. (2002) *PNAS* 99: 11854-6; Gao et al. (2003) *PNAS* 100:6081-6; 및 Bossis et al. (2003) *J. Virol.* 77:6799-810]을 참조하라. 임의의 AAV 혈청형의 사용이 본 발명의 범위 내에서 고려된다. rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AA6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh.10, AAV11, 또는 AAV12 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터일 수 있다. AAV 내의 핵산은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AA6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh.10, AAV11, AAV12 등의 ITR을 함유할 수 있고, rAAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AA6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh.10, AAV11, AAV12 등의 캡시드 단백질을 함유할 수 있다. rAAV 입자는 또한 클레이드 A 내지 F로부터의 임의의 AAV 혈청형으로부터의 ITR 또는 캡시드 단백질을 함유할 수 있다(Gao et al. (2004) *J. Virol.* 78(12):6381).

[0130] 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화시키거나, 특정 표적 조직(예를 들어, 병든 조직) 내의 특정 세포 유형을 표적화하는데 다양한 AAV 혈청형이 사용될 수 있다. rAAV 입자는 동일 혈청형 또는 혼합된 혈청형(즉, 슈도타입(pseudotype) AAV)의 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 슈도타입 AAV 벡터는 한 AAV 혈청형의 역방위 말단 반복(ITR) 및 두번째 AAV 혈청형의 캡시드를 함유하는 것이다. 예를 들어, rAAV 입자는 AAV1 캡시드 단백질 및 적어도 하나의 AAV2 ITR을 포함할 수 있거나, 이는 AAV2 캡시드 단백질 및 적어도 하나의 AAV1 ITR을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, rAAV 입자는 AAV1 및 적어도 하나의 추가 AAV 혈청형 둘 모두로부터의 캡시드 단백질을 포함할 수 있고, 적어도 하나의 AAV2 ITR을 추가로 포함할 수 있다. rAAV 입자의 생성을 위한 AAV 혈청형의 임의의 조합은 각각의 조합이 명백히 본원에 언급된 것처럼 본원에 제공된다.

[0131] 본 발명의 AAV 입자는 또한 재조합 자기-상보성 유전체를 포함하는 바이러스 입자일 수 있다. 자기-상보성 유전체를 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자기-상보성 AAV 유전체의 사용 방법은 각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 6,596,535호; 7,125,717호; 7,765,583호; 7,785,888호; 7,790,154호; 7,846,729호; 8,093,054호; 및 8,361,457호; 및 문헌[Wang Z. et al. (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기재되어 있다. 자기-상보성 유전체를 포함하는 rAAV는 이의 부분적 상보성 서열(예를 들어, 트랜스진의 상보성 코딩 및/또는 비-코딩 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 구현예에서, 본 발명은 AAV 유전체를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공하며, 상기 rAAV 유전체는 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, GBA1 코딩 가닥) 및 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, GBA1 비코딩 또는 안티센스 가닥)을 포함하고, 상기 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 이의 길이의 일부 또는 대부분/전부에 대해 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 동종가닥간 염기쌍을 형성할 수 있다. 구현예에서, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 동종가닥간 염기쌍 형성(예를 들어, 헤어핀 DNA 구조)을 촉진하는 서열에 의해 연결된다. 구현예에서, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 관련 구현예에서, 돌연변이된 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과로서, AAV 바이러스 유전체 복제에 대해, rep 단백질은 돌연변이된 ITR에서 바이러스 유전체를 분해하지 않을 것이며, 이와 같이 AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이된 AAV ITR, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드와 역 배향의 제2 이중성 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR을 5'에서 3' 순서로 포함하는 재조합 바이러스 유전체가 바이러스 캡시드 내에 패키징될 것이다.

[0132] rAAV 입자를 생성시키기 위해 AAV 벡터를 이용하기 위한 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,566,118호; 6,989,264호; 및 6,995,006호를 참조하라. 본 발명을 실시하는데 있어서, rAAV 입자를 생성하기 위한 숙주 세포는 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 미생물 및 효모를 포함한다. 숙주 세포는 또한 AAV rep 및 cap 유전자가 숙주 세포 내에서 안정적으로 유지되는 패키징 세포 또는 AAV 벡터 유전체가 안정적으로 유지되는 생산자 세포일 수 있다. 예시적 패키징 및 생산자 세포는 293, A549 또는 HeLa 세포로부터 유래된다. AAV 벡터는 당 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 정제되고 제형화된다.

[0133] rAAV 입자가 정제되는 양태에서, 본원에서 사용되는 용어 "정제된"은 rAAV 입자가 자연 발생하거나 이로부터 최초로 제조되는 경우에 또한 존재할 수 있는 다른 성분의 적어도 일부가 결여된 rAAV 입자의 제조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 분리된 rAAV 입자는 공급원 혼합물, 예를 들어, 배양 용해질 또는 생성 배양물 상층액으로부터 이를 농축시키기 위한 정제 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 농축은, 예를 들어, 용액에 존재하는 DNase-내성 입자(DRP) 또는 유전체 카피(gc)의 비율, 또는 감염력에 의해 다양한 방식으로 측정될 수 있거나, 이는 공급원 혼합물에 존재하는 제2의 잠재적 간섭 물질, 예를 들어, 오염물질, 예를 들어, 생성 배양물 오염물질 또는 제조 과정 중의 오염물질, 예를 들어, 헬퍼 바이러스, 배지 성분 등과 관련하여 측정될 수 있다. 구현예에서, 바이러스는 포유동물에서 신경 세포를 감염시킨다. 용어 "신경 세포" 또는 "뉴런"은 중추신경계 및 말초신경계

를 구성하는 전기적 흥분성 세포를 나타낸다. 뉴런은 동물의 신체 내의 세포 또는 동물의 신체 외부에서 배양된 세포일 수 있다. 용어 "신경 세포" 또는 "뉴런"은 또한 포유동물로부터의 신경 세포로부터 유래된 확립된 조직 배양 세포주 또는 일차 조직 배양 세포주 또는 뉴런으로 분화하기 시작하는 조직 배양 세포주를 나타낸다. "뉴런" 또는 "신경 세포"는 또한 염색체 외 또는 염색체 내에서 특정 단백질을 발현시키기 위해 또한 변형된 상기 유형의 세포 중 임의의 유형의 세포를 나타내며, 이는 또한 형질전환된 뉴런, 예를 들어, 신경모세포종 세포 및 뇌 내의 지지 세포, 예를 들어, 아교세포를 나타낸다. 신경 세포의 감염은 당 분야에 공지된 다양한 메커니즘에 의해 달성될 수 있다. 한 구현예에서, 바이러스는 CNS에 국소적으로 투여된다. 관련 구현예에서, 바이러스는 헤마내 주사, 또는 대안적으로 수막강내 주사에 의해 투여된다.

[0134]

양태에서, 상기 작용제는 GBA1 단백질 또는 이의 생물학적 동등물(예를 들어, 글루코세레브로시드의 분해를 촉매하는 GBA1 단백질의 단편, 유사체, 또는 유도체)을 포함한다. GBA1 단백질은 당 분야에 공지되고 특정규명되어 있으며, 예시적 서열이 본원에 제공되어 있다. 구현예에서, 상기 작용제는 글루코세레브로시다제 활성을 갖고, 본원에 개시된 GBA1 폴리펩티드와 적어도 80%의 서열 동일성, 적어도 85%의 서열 동일성, 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 91%의 서열 동일성, 적어도 92%의 서열 동일성, 적어도 93%의 서열 동일성, 적어도 94%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 생물학적 동등물은 요망되는 글루코세레브로시다제 활성(예를 들어, 야생형 글루코세레브로시다제 활성)을 유지하는 폴리펩티드일 수 있다.

[0135]

본원에 기재된 폴리펩티드는 당 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다. 구현예에서, 직접적 단백질 합성 방법이 이용된다. 다른 구현예에서, 관심 단백질(예를 들어, GBA1 단백질 또는 이의 생물학적 동등물)을 인코딩하는 DNA를 증폭시키고 발현시키기 위해 재조합 발현 벡터가 이용될 수 있다. 문헌[Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012)]을 참조하라. 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 관심 단백질을 인코딩하는 합성 또는 cDNA-유래 DNA 단편을 갖는 복제가 능한 DNA 작제물이다. 전사 단위는 일반적으로 하기에 상세히 기재되는 바와 같은 (1) 유전자 발현에서 조절 역할을 하는 유전 요소 또는 요소들, 예를 들어, 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조 또는 코딩 서열, 및 (3) 적절한 전사 및 번역 개시 및 종료 서열의 어셈블리를 포함한다. 이러한 조절 요소는 전사를 조절하는 작동자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로 복제 기점에 의해 부여되는 숙주에서 복제하는 능력, 및 형질전환주의 인지를 촉진하기 위한 선택 유전자가 추가로 통합될 수 있다. DNA 영역은 이들이 서로 기능적으로 관련되는 경우에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 신호 펩티드(분비 선도)에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전구체로서 발현되는 경우 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동 가능하게 연결된 것이거나; 프로모터는 서열의 전사를 조절하는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이거나; 리보솜 결합 부위는 번역을 가능케 하도록 위치되는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 것은 연속적인 것을 의미하고, 분비 선도의 경우에는 연속적이고 해독틀 내에 있는 것을 의미한다. 효모 발현 시스템에서 사용하기 위해 의도된 구조 요소는 숙주 세포에 의한 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능하게 하는 선도 서열을 포함한다. 대안적으로, 재조합 단백질이 선도 또는 운반 서열 없이 발현되는 경우, 이는 N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 잔기는 발현된 재조합 단백질로부터 임의로 이후에 분해되어 최종 생성물을 제공할 수 있다.

[0136]

발현 조절 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 좌우될 것이다. 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합물이 이용될 수 있다. 진핵생물 숙주에 대해 유용한 발현 벡터는, 예를 들어, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 박테리아 숙주에 대해 유용한 발현 벡터는 공지된 박테리아 플라스미드, 예를 들어, 에스케리키아 콜리로부터의 플라스미드, 예를 들어, pCR 1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체, 광범위 숙주 범위 플라스미드, 예를 들어, M1 3 및 필라멘트형 단일-가닥 DNA 파지를 포함한다.

[0137]

폴리펩티드의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 적절한 프로모터의 조절하에 있는 원핵생물, 효모, 곤충 또는 더 고등한 진핵생물 세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, E. 콜리 또는 바실루스를 포함한다. 더 고등한 진핵생물 세포는 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 세포-비합유 번역 시스템이 또한 이용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모, 및 포유동물 세포 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터가 당 분야에 널리 공지되어 있다. 문헌[Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual (Elsevier Science 1985)]을 참조하라.

[0138]

다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 또한 재조합 단백질을 발현시키기 위해 유리하게 이용된다. 포



유동물 세포에서의 재조합 단백질의 발현이 수행될 수 있는데, 이는 상기 단백질이 일반적으로 정확히 폴딩되고, 적절히 변형되고, 완전히 기능성이기 때문이다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 문헌[Gluzman (1981) Cell 23:175]에 기재된 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주, 및 적절한 벡터를 발현시킬 수 있는 다른 세포주, 예를 들어, L 세포, C127, 3T3, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO), HeLa 및 BHK 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는 비전사 요소, 예를 들어, 복제 기점, 발현되는 유전자에 연결된 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 플랭킹 비전사 서열, 및 5' 또는 3' 비전사 서열, 예를 들어, 필요한 리보솜 결합 부위, 아데닐 중합체형성 부위, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위, 및 전사 종료 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이중성 단백질의 생성을 위한 배칼로바이러스 시스템은 문헌[Luckow and Summers (1988) Bio/Technology 6:47]에 개관되어 있다.

[0139]

형질전환된 숙주에 의해 생성된 단백질은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 표준 방법은 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성 및 크기조절 컬럼(sizing column) 크로마토그래피 등), 원심분리, 차별적 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술을 포함한다. 적절한 친화성 컬럼 상에서의 통과에 의한 용이한 정제를 가능케 하기 위해 친화성 태그, 예를 들어, 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트 서열, 글루타티온-S-트랜스페라제 등이 단백질에 부착될 수 있다. 분리된 단백질은 또한 단백질분해, 핵 자기 공명 및 x-선 결정학과 같은 기술을 이용하여 물리적으로 특성결정될 수 있다. 예를 들어, 배양 배지로 재조합 단백질을 분비하는 시스템으로부터의 상층액은 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유닛을 이용하여 농축될 수 있다. 농축 단계 후, 농축물은 적합한 정제 매트릭스에 적용될 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들어, 펜던트 디에틸아미노에틸(DEAE) 기를 갖는 매트릭스 또는 기질이 이용될 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로스 또는 단백질 정제에서 일반적으로 사용되는 다른 유형의 매트릭스일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계가 이용될 수 있다. 적합한 양이온 교환체는 설포프로필 또는 카르복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 최종적으로, 소수성 RP-HPLC 매질, 예를 들어, 펜던트 메틸 또는 다른 지방족 기를 갖는 실리카 겔을 이용하는 하나 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 단계가 이용될 수 있다. 다양한 조합의 상기 정제 단계 중 일부 또는 전부가 또한 동종성 재조합 단백질을 제공하기 위해 이용될 수 있다. 박테리아 배양에서 생성된 재조합 단백질은, 예를 들어, 세포 펠렛으로부터의 최초 추출 후, 하나 이상의 농축, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 분리될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 최종 정제 단계에 이용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에 이용되는 미생물 세포는 동결-해동 주기, 음과처리, 기계적 파열, 또는 세포 용해제의 사용을 포함하는 임의의 편리한 방법에 의해 파열될 수 있다.

[0140]

양태에서, 상기 작용제는 GBA1에 특이적으로 결합하고 GBA1의 활성을 향상시키는 항체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0141]

용어 "항체"는 전장-크기 항체뿐만 아니라 상기 항체의 항원-결합 단편, 변이체, 유사체, 또는 유도체, 예를 들어, 자연 발생 항체 또는 면역글로불린 분자 또는 조작된 항체 분자와 유사한 방식으로 항원에 결합하는 단편을 포함한다.

[0142]

항체는 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 일반적으로 적어도 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 척추동물 시스템에서의 기본 면역글로불린 구조는 잘 이해되어 있다. 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988)]을 참조하라.

[0143]

본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, 디설파이드-결합 Fvs(sdFv), VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 및 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. ScFv 분자는 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 5,892,019호에 기재되어 있다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스일 수 있다.

[0144]

항원-결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 이의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 항원, 예를 들어, 항원-결합 분자, 예를 들어, 항체, 또는 이의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체가 인지하거나 특이적으로 결합하는 항원, 예를 들어, 표적 폴리펩티드의 에피토프(들) 또는 부분(들)에 의해 기재되거나 특정될 수 있다. 항체의 항원 결합 도메인과 특이적으로 상호작용하는 표적 폴리펩티드의 부분은 "에피토프" 또는 "항원 결정인자"이

다. 표적 폴리펩티드는 단일 에피토프를 포함할 수 있으나, 통상적으로 적어도 2개의 에피토프를 포함하며, 항원의 크기, 형태, 및 유형에 따라 임의의 수의 에피토프를 포함할 수 있다. 또한, 표적 폴리펩티드 상의 "에피토프"는 비-폴리펩티드 요소일 수 있거나 비-폴리펩티드 요소를 포함할 수 있고, 예를 들어, 에피토프는 탄수화물 측쇄를 포함할 수 있음이 인지되어야 한다.

[0145] 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다.

[0146] 폴리클로날 항체는 임의의 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 폴리클로날 항체는 키홀 림프 헤모시아닌(KLH), 혈청 알부민 등에 임의로 컨쥬게이션되고, 멸균 염수에 희석되고, 애주번트(예를 들어, 완전 또는 불완전 프로인트 애주번트)와 조합되어 안정적인 에멀전을 형성한 관련 항원(정제된 펩티드 단편, 전장 재조합 단백질, 융합 단백질 등)의 다수의 피하 또는 복막내 주사에 의해 동물(예를 들어, 토끼, 래트, 마우스, 원숭이 등)을 면역화시킴으로써 발생된다. 이후, 폴리클로날 항체는 상기와 같이 면역화된 동물의 혈액, 복수 등으로부터 회수된다. 수거된 혈액은 응고되고, 혈청이 옮겨지고, 원심분리에 의해 정화되고, 항체 역가에 대해 검정된다. 폴리클로날 항체는 친화성 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 등을 포함하는 당 분야의 표준 방법에 따라 혈청 또는 복수로부터 정제될 수 있다.

[0147] 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495]에 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법을 이용하여, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 면역 항원에 특이적으로 결합하게 되는 항체의 림프구에 의한 생성을 유도하기 위해 상기 기재된 바와 같이 면역화된다. 림프구는 또한 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 면역화 후, 림프구는 분리되고, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 적합한 골수종 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성하고, 이는 이후에 융합되지 않은 림프구 및 골수종 세포로부터 분리되어 선택될 수 있다. 면역침전, 면역블로팅, 또는 시험관 내 결합 검정(예를 들어, 방사면역측정법(RIA) 및 효소결합면역흡착측정법(ELISA))에 의해 결정된 바와 같은 선택 항원에 대해 특이적으로 유도된 모노클로날 항체를 생성시키는 하이브리도마는 이후 표준 방법(전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986])을 이용한 시험관 내 배양으로 또는 동물에서의 복수 종양과 같이 생체 내에서 증식될 수 있다. 이후, 모노클로날 항체는 상기 폴리클로날 항체에 대해 기재된 바와 같이 배양 배지 또는 복수로부터 정제될 수 있다.

[0148] 대안적으로, 모노클로날 항체는 또한 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 4,816,567호에 기재된 바와 같이 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해 성숙 B-세포 또는 하이브리도마 세포로부터 분리되며, 이들의 서열은 통상적인 절차를 이용하여 결정된다. 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드는 이후 적합한 발현 벡터로 클로닝되며, 이는 달리 면역글로불린 단백질을 생성시키지 않는 숙주 세포, 예를 들어, E. 콜리 세포, 원숭이 COS 세포, 차이 니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포로 트랜스펙션되는 경우, 모노클로날 항체가 숙주 세포에 의해 생성된다. 또한, 요망되는 종의 재조합 모노클로날 항체 또는 이의 단편은 기재(각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; 및 Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597])된 바와 같이 요망되는 종의 CDR을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

[0149] 모노클로날 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 대안적 항체를 생성시키기 위해 재조합 DNA 기술을 이용한 다수의 다양한 방식으로 추가로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 마우스 모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인은 1) 키메라 항체를 생성시키기 위해, 예를 들어, 인간 항체의 영역, 또는 2) 융합 항체를 생성시키기 위해 비-면역글로불린 폴리펩티드로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 불변 영역은 모노클로날 항체의 요망되는 항체 단편을 생성시키기 위해 트렁케이션되거나 제거된다. 가변 영역의 부위-특이적 또는 고밀도 돌연변이유발이 모노클로날 항체의 특이성, 친화성 등을 최적화시키기 위해 이용될 수 있다.

[0150] 따라서, 구현예에서, 항체는 인간화 항체이다. 구현예에서, 항체는 키메라 항체이다.

[0151] 인간 항체는 당 분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 직접 제조될 수 있다. 시험관 내 면역화되거나 표적 항원에 특이적인 항체를 생성하는 면역화된 개체로부터 분리된 무한증식 인간 B 림프구가 생성될 수 있다(예를 들어, 각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77 (Alan R. Liss 1985); Boemer et al. (1991) J. Immunol. 147:86-95; 및 U.S. Patent 5,750,373호 참조). 또한, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택될 수 있으며, 상기 파지 라이브러리는, 예

를 들어, 각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Vaughan et al. (1996) Nat. Biotech. 14:309-314, Sheets et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter (1991) J. Mol. Biol. 227:381, 및 Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581]에 기재된 바와 같이 인간 항체를 발현한다. 항체 파지 라이브러리의 생성 및 사용을 위한 기술은 또한 각각의 전체내용이 참조로서 포함되는 미국 특허 번호 5,969,108호, 6,172,197호, 5,885,793호, 6,521,404호; 6,544,731호; 6,555,313호; 6,582,915호; 6,593,081호; 6,300,064호; 6,653,068호; 6,706,484호; 및 7,264,963호; 및 문헌[Rothe et al. (2007) J. Mol. Bio. 376:1182-1200]에 기재되어 있다. 친화성 성숙 전략, 예를 들어, 사슬 셔플링(chain shuffling)(전체내용이 참조로서 포함되는 문헌[Marks et al. (1992) Bio/Technology 10:779-783])이 당 분야에 공지되어 있으며, 고친화성 인간 항체를 생성시키는데 사용될 수 있다.

[0152] 인간화 항체는 또한 면역화시 내인성 면역글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생성시킬 수 있는 인간 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 트랜스제닉 마우스에서 제조될 수 있다. 이러한 접근법은 각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 5,545,807호; 5,545,806호; 5,569,825호; 5,625,126호; 5,633,425호; 및 5,661,016호에 기재되어 있다.

[0153] 본 발명은 또한 이특이적 항체를 포함한다. 이특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프를 특이적으로 인지하고 이에 결합할 수 있는 항체이다. 다양한 에피토프는 동일 분자(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드) 내에 존재할 수 있거나, 모두가 상이한 분자 상에 존재할 수 있다. 이특이적 항체는 온전한 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0154] 항체의 혈형 반감기를 증가시키기 위해 항체를 변형시키는 것이 특히 항체 단편의 경우에서 추가로 요망될 수 있다. 이는, 예를 들어, 항체 단편 내의 적절한 영역의 돌연변이에 의한 항체 단편으로의 구조 수용체 결합 에피토프의 통합에 의하거나, 어느 한 말단 또는 중간에서 항체 단편에 이후에 융합(예를 들어, DNA 또는 펩티드 합성에 의함)되는 펩티드 태그로 에피토프를 통합시킴으로써 달성될 수 있다.

[0155] 헤테로컨주게이트 항체가 또한 본 발명의 범위 내이다. 헤테로컨주게이트 항체는 2개의 공유적으로 연결된 항체로 구성된다. 상기 항체는, 예를 들어, 원치않는 세포에 면역 세포를 표적화시키는 것으로 제안되었다(전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 4,676,980호). 항체는 가교제를 수반하는 방법을 포함하는 합성 단백질 화학에서 공지된 방법을 이용하여 시험관 내에서 제조될 수 있는 것이 고려된다. 예를 들어, 면역독소는 디설파이드 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성시킴으로써 작제될 수 있다. 상기 목적상 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트를 포함한다.

[0156] 본 발명은 본원에 기재된 키메라, 인간화 및 인간 항체, 또는 이들의 항체 단편에 실질적으로 상동성인 변이체 및 동등물을 추가로 포함한다. 이들은, 예를 들어, 보존성 치환 돌연변이, 예를 들어, 유사한 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 보존성 치환은 아미노산의 동일 일반 클래스 내의 또 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 한 산성 아미노산의 또 다른 산성 아미노산으로의 치환, 한 염기성 아미노산의 또 다른 염기성 아미노산으로의 치환 또는 한 중성 아미노산의 또 다른 중성 아미노산에 의한 치환을 나타낸다. 보존성 아미노산 치환에 의해 의도되는 것은 당 분야에 널리 공지되어 있다.

[0157] 양태에서, 상기 작용제는 소분자 화합물을 포함한다. 구현예에서, 소분자 화합물은 글루코세레브로시다제 활성의 활성제이다. 예를 들어, 국제 특허 공개 번호 WO 2013/148333호를 참조하라. 일부 구현예에서, "소분자"는 관심 단백질에 결합함으로써 단백질의 기능을 변경시킬 수 있는 저분자량(MW)을 갖는 분자이다. 일부 구현예에서, 소분자의 MW는 1,000 이하이다. 단백질 기능을 변경시킬 수 있는 소분자를 스크리닝하기 위한 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 세포에서 소분자-단백질 상호작용을 검출하기 위한 소형화 배열 검정은 문헌[You et al. (1997) Chem. Biol. 4:961-968]에 논의되어 있다.

[0158] 구현예에서, 상기 작용제는 샤페론이다. 본원에서 사용되는 용어 "샤페론"은 단백질에 특이적으로 결합하는 분자, 예를 들어, 소분자, 폴리펩티드, 핵산 등을 나타내며, 단백질의 적어도 부분적인 야생형 기능 및/또는 활성을 회복시키거나 향상시키고/시키거나; 단백질의 안정적인 분자 형태의 형성을 향상시키고/시키거나; ER로부터의 단백질의 또 다른 세포 위치, 예를 들어, 자연 세포 위치로의 트래피킹(trafficking)을 유도함으로써 단백질의 ER-관련 분해를 방지하고/하거나; 미스폴딩된 단백질의 응집을 방지하는 효과 중 하나 이상을 갖는다. 관련 구현예에서, 샤페론은 단백질의 적어도 부분적인 야생형 기능 및/또는 활성을 회복시키거나 향상시킨다. 예를 들어, 문헌[Patnaik et al. (2012) J. Med. Chem. 55:5734-5748]을 참조하라. 다른 구현예에서, 샤페론은 GBA1의 활성을 증가시키는 작용제(예를 들어, GBA1 또는 이의 동등물 또는 GBA1을 인코딩하는 핵산 또는 이의 동등물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 본원에 기재된 작용제)와 임의로 조합되어 세포(예를 들어, 단백질병, 시

뉴클레인병, 타우병증 등으로 고통받는 포유동물로부터의 세포)의 나머지 활성을 증가시킨다. 예를 들어, 국제 특허 공개 번호 WO 2012/177997호; 및 문헌[Chang et al. (2006) FEBS J. 273:4082-4092]을 참조하라.

[0159] 양태에서, 본 발명은 적어도 2개의 작용제를 투여(예를 들어, 또 다른 작용제와 조합된 GBA1 활성을 증가시키는 작용제의 투여를 포함하는 조합 요법)하는 것을 포함한다.

[0160] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 작용제는 단백질병, 시누클레인병, 타우병증 등과 관련된 증상을 치료하는데 이로운 또 다른 치료제와 조합하여 투여된다. 구현예에서, 본원에 기재된 작용제는 핵산(예를 들어, GBA1을 인코딩하는 핵산 또는 이의 동등물)이다. 구현예에서, 본원에 기재된 작용제는 폴리펩티드(예를 들어, GBA1 또는 이의 동등물)이다. 구현예에서, 본원에 기재된 작용제는 소분자(예를 들어, GBA1의 활성제)이다. 구현예에서, 본원에 기재된 작용제는 항체 또는 이의 단편(예를 들어, GBA1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편)이다. 구현예에서, 본원에 기재된 작용제는 사페론(예를 들어, GBA1의 사페론)이다.

[0161] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 작용제 중 적어도 2개를 투여하는 것을 포함한다.

[0162] 구 "조합 요법"은 치료제의 공동-작용으로부터 이로운 효과를 제공하기 위해 의도된 특정 치료 요법의 일부로서의 GBA1의 활성을 증가시키는 작용제 및 제2 치료제의 투여를 포함한다. 조합의 이로운 효과는 치료제의 조합으로부터 발생하는 약동학 또는 약역학적 공동-작용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조합된 치료제의 투여는 통상적으로 규정된 기간(일반적으로, 선택된 조합에 따라 수분, 수시간, 수일, 또는 수주)에 걸쳐 수행된다. "조합 요법"은 일반적으로 본 발명의 조합을 우연히 및 임의로 발생시키는 별개의 단일치료 요법의 일부로서의 상기 치료제 중 두 개 이상의 투여를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다. "조합 요법"은 연속적 방식의 상기 치료제의 투여, 즉, 상이한 시간에서의 각각의 치료제의 투여뿐만 아니라, 실질적으로 동시 방식으로의 상기 치료제의 투여 또는 상기 치료제의 적어도 두 개의 투여를 포함하는 것으로 의도된다. 실질적 동시 투여는, 예를 들어, 고정된 비의 각각의 치료제를 갖는 단일 캡슐 또는 치료제 각각에 대한 다수의 단일 캡슐을 대상체로 투여함으로써 달성될 수 있다. 각각의 치료제의 연속적 또는 실질적으로 동시 투여는 경구 경로, 정맥내 경로, 근내 경로, 및 점막 조직(예를 들어, 코, 구강, 질, 및 직장)을 통한 직접 흡수를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 임의의 적절한 경로에 의해 실행될 수 있다. 치료제는 동일 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 특정 조합물의 한 성분은 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 한편, 조합물의 다른 성분(들)은 경구 투여될 수 있다. 성분은 임의의 치료적으로 효과적인 순서로 투여될 수 있다. 구 "조합"은 조합 요법의 일부로서 유용한 화합물 또는 비-약물 요법의 그룹을 포함한다.

[0163] 상기 양태 및 구현예 중 임의의 양태 및 구현예에서, 상기 작용제는 검출가능한 모이어티를 추가로 함유할 수 있다. 검출가능한 모이어티는 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 물리적, 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있다. 예시적 모이어티는 효소, 형광 분자, 입자 표지, 전자-밀도 시약, 방사선표지, 비오틴, 디코시게닌, 또는 합텐 또는 검출가능하게 되는 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0164] 상기 양태 및 구현예 중 임의의 양태 및 구현예에서, 상기 작용제는 일반적으로 작용제의 부분이 아닌 추가 화학적 및/또는 생물학적 모이어티를 함유할 수 있다. 상기 유도체화된 모이어티는 상기 작용제의 전달, 용해도, 생물학적 반감기, 흡수 등을 개선시킬 수 있다. 상기 모이어티는 또한 상기 작용제의 임의의 요망되는 부작용을 감소시키거나 제거할 수 있다. 상기 모이어티의 개관은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (20th ed., Mack Publishing Co. 2000)](또한, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Pathan et al. (2009) Recent Patents on Drug Delivery & Formulation 3:71-89] 참조)에서 발견될 수 있다.

[0165] 상기 작용제는 모이어티에 공유적 또는 비공유적으로 연결될 수 있다. 구현예에서, 상기 작용제는 모이어티에 공유적으로 연결된다. 관련 구현예에서, 모이어티의 공유 결합은 폴리뉴클레오티드/폴리펩티드에 대해 N-말단에 존재한다. 관련 구현예에서, 모이어티의 공유 결합은 폴리뉴클레오티드/폴리펩티드에 대해 C-말단에 존재한다.

[0166] 상기 구현예 중 임의의 예에서, 상기 작용제는 포유동물에서의 기준선 수준에 비해 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것일 수 있다. 특정 구현예에서, 글루코세레브로시다제 활성은 포유동물에서 기준선 수준에 비해 적어도 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4.0배, 약 4.5배, 약 5배, 또는 그 초과까지 증가된다. 특정 구현예에서, 글루코세레브로시다제 활성은 기준선 수준에 비해 적어도 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4.0배, 약 4.5배, 약 5배, 또는 그 초과까지 뉴런에서 증가된다. 글루코세레브로시다제 활성의 기준선 수준은 당 분야에 공지되어 있고 본원에 기재된 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일부 예에서, 기준선 수준은 평균적으로 단백질병 또는 GBA1 돌연변이가 없는 개체에 의해 나타나는 수준이다.



[0167] 또 다른 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서  $\alpha$ -시누클레인을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다.  $\alpha$ -시누클레인은 세포의 다양한 부분, 예를 들어, 막에서 발견될 수 있고, 세포질에서 가용성일 수 있고, 세포질에서 불용성일 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 방법은  $\alpha$ -시누클레인의 특정 분획을 감소시키는데 효과적이다. 한 구현예에서, 세포질 가용성  $\alpha$ -시누클레인이 감소된다. 또 다른 구현예에서, 막-결합  $\alpha$ -시누클레인이 감소된다. 구현예에서,  $\alpha$ -시누클레인은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 한 구현예에서,  $\alpha$ -시누클레인은  $\alpha$ -시누클레인에서의 증가를 특징으로 하는 단백질병을 갖지 않는 포유동물과 유의하게 상이하지 않은 수준까지 감소된다.

[0168] 또 다른 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 타우를 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 타우는 세포의 다양한 부분, 예를 들어, 막에서 발견될 수 있고, 세포질에서 가용성일 수 있고, 세포질에서 불용성일 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 타우의 특정 분획을 감소시키는데 효과적이다. 한 구현예에서, 세포질 가용성 타우가 감소된다. 또 다른 구현예에서, 막-결합 타우가 감소된다. 구현예에서, 타우는 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 한 구현예에서, 타우는 타우에서의 증가를 특징으로 하는 단백질병을 갖지 않는 포유동물과 유의하게 상이하지 않은 수준까지 감소된다.

[0169] 또 다른 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 독성 지질(예를 들어, 글루코실스핑고신)을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 한 구현예에서, 독성 지질은 글루코실스핑고신이다. 추가 구현예에서, 글루코실스핑고신은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 한 구현예에서, 글루코실스핑고신은 글루코실스핑고신에서의 증가를 특징으로 하는 단백질병을 갖지 않는 포유동물과 유의하게 상이하지 않은 수준까지 감소된다.

[0170] 또 다른 양태는 치료적 유효량의 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 단백질병을 갖는 포유동물에서 단백질 응집체의 축적을 억제하기 위한 방법에 관한 것이다. 관련 구현예에서, 단백질 응집체는 유비퀴틴, 타우, 및  $\alpha$ -시누클레인으로 구성된 군으로부터 선택된다.

# [0171] 조성물 및 키트

[0172] 글루코세레브로시다제 활성을 증가시킬 필요가 있는 포유동물에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는데 유용한 본원에 기재된 작용제 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물 또는 키트가 본 발명에 의해 또한 제공된다. 이들 조성물 및 키트는 본원에 기재된 바와 같이 치료적으로 사용될 수 있고, 단백질병에 대한 다른 공지된 요법과 조합하여 이용될 수 있다. 예를 들어, 단백질병에 대한 일반적인 치료는 레보도파(Levodopa), 도파민 효능제, MAO-B 억제제, 아만타딘(amantadine), 항콜린제, 수술, 재활, 및 식이 관리를 포함한다. 알츠하이머병에 대한 일반적인 요법은, 예를 들어, 아세틸콜린에스테라제 억제제, 예를 들어, 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galantamine), 도네페질(donepezil), 메만틴(memantine)을 포함한다. 단백질병에 대한 추가 요법은 정신사회적 개입, 행동 개입, 회상 요법, 인정 요법, 지지 정신요법, 감각 통합, 인지 재활훈련, 재활, 언어 치료 등을 포함한다.

[0173] "약학적 조성물"은 작용제 및 또 다른 담체, 예를 들어, 비활성이거나 활성인 화합물 또는 조성물, 예를 들어, 검출가능한 작용제, 표지, 애췌번트, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지질성 용매, 보존제, 애췌번트 등을 포함할 수 있다. 담체는 또한 약학적 부형제 및 첨가제, 예를 들어, 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물(예를 들어, 당, 예를 들어, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당류; 유도체화된 당, 예를 들어, 알디톨, 알도산, 에스테르화된 당 등; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하며, 이들은 중량 또는 부피를 기준으로 하여 1 내지 99.99%를 단독으로 또는 조합하여 포함되어, 단독으로 또는 조합하여 제공될 수 있다. 예시적인 단백질 부형제는 혈청 알부민, 예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴, 카세인 등을 포함한다. 완충능에 있어서 또한 작용할 수 있는 대표적 아미노산/항체 성분은 알라닌, 글리신, 아르

기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 탄수화물 부형제가 또한 본 발명의 범위 내인 것이 의도되며, 이의 예는 단당류, 예를 들어, 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예를 들어, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예를 들어, 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예를 들어, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨) 및 미오이노시톨을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0174] 용어 담체는 완충제 또는 pH 조정제를 추가로 포함하며; 통상적으로, 완충제는 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적 완충제는 유기산 염, 예를 들어, 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 숙신산, 아세트산, 또는 프탈산의 염; Tris, 트로메타민 하이드로클로라이드, 또는 포스페이트 완충제를 포함한다. 추가 담체는 중합체 부형제/첨가제, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 피콜(중합체 당), 텍스트레이트(예를 들어, 사이클로덱스트린, 예를 들어, 2-하이드록시프로필-β-과드라쳐(quadrature)-사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 착향제, 향미생물제, 감미제, 향산화제, 대전방지제, 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트, 예를 들어, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80"), 지질(예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤), 및 킬레이트제(예를 들어, EDTA)를 포함한다.

[0175] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 표준 약학적 담체 중 임의의 담체, 예를 들어, 인산염 완충 염수 용액, 물, 및 에멀전, 예를 들어, 오일/물 또는 물/오일 에멀전, 및 다양한 유형의 습윤제를 포함한다. 조성물은 또한 안정화제 및 보존제 및 상기 언급된 담체 중 임의의 담체를 포함할 수 있으나, 단, 이들이 생체 내에서 사용하기에 허용되는 것임을 추가 조건으로 한다. 담체, 안정화제 및 애췌번트의 예에 대해, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (20th ed., Mack Publishing Co. 2000) 및 the Physician's Desk Reference (52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics 1998)]을 참조하라.

[0176] 일반적으로, 본원에 기재된 작용제 및 조성물은 대상체에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키기에 충분한 유효량 또는 효과적인 용량으로 투여된다. 통상적으로, 상기 용량은, 예를 들어, 연령, 신체 상태, 체중, 성별, 식이, 투여 시간, 및 다른 임상 요인을 기초로 하여 상기 범위 내에서 조정될 수 있다. 유효량의 결정은 충분히 당업자의 능력 내이다.

[0177] 본원에 기재된 조성물의 전달 방법은 경구, 비경구(예를 들어, 국소, 경피, 흡입, 또는 주사) 전달 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 투여 방식 및 본원에서 사용하기 위한 적절한 약학적 조성물을 제조하기 위한 방법은 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care (1st ed., American Society of Health-System Pharmacists 2007)]에 기재되어 있다.

[0178] 구현예에서, 약학적 조성물은 고체 형태로 경구 투여된다.

[0179] 경구 투여에 적합한 약학적 조성물은 활성 성분(들)로서 소정량의 본원에 기재된 화합물(들), 이들의 유도체, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 프리드러그를 각각 함유하는 캡슐, 카세제(cachet), 환약, 정제, 로젠지(착향된 베이스, 일반적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트래거칸스(tragacanth)를 이용함), 분말, 과립의 형태, 또는 수성 또는 비수성 액체 중 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전, 또는 엘릭서(elixir) 또는 시럽, 또는 향정(pastille)(비활성 베이스, 예를 들어, 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 이용함), 및/또는 함수제 등의 형태일 수 있다. 활성 성분은 또한 볼루스, 연질약, 또는 페이스트로 투여될 수 있다.

[0180] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태(예를 들어, 캡슐, 정제, 환약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 활성 성분은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 희석제, 예를 들어, 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트, 및/또는 (1) 충전제 또는 증량제, 예를 들어, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 보습제, 예를 들어, 글리세롤; (4) 붕해제, 예를 들어, 당-당, 칼슘 카르보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이이트, 및 소듐 카르보네이트; (5) 용해지연제, 예를 들어, 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예를 들어, 사차 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예를 들어, 아세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예를 들어, 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예를 들어, 토텔크(talc), 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물; 및 (10) 착색제 중 임의의 것과 혼합된다. 캡슐, 정제, 및 환약의 경우에서, 약학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 연질 및 경질-충전 젤라틴 캡슐 내의 충전제, 및 부형제, 예를 들어, 락토스 또

는 밀크 당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용하여 제조될 수 있다.

[0181] 정제는 임의로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 성형에 의해 제조될 수 있다. 압축된 정제는 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 비활성 회석제, 보존제, 봉해제(예를 들어, 소듐 전분 글리콜레이트 또는 가교된 소듐 카르복시메틸 셀룰로스), 표면활성제, 및/또는 분산제를 이용하여 제조될 수 있다. 성형된 정제는 비활성 액체 회석제로 습윤화된 분말화 활성 성분의 혼합물을 적합한 기계에서 성형 시킴으로써 제조될 수 있다. 정제 및 다른 고체 투여 형태, 예를 들어, 당의정, 캡슐, 환약, 및 과립은 임의로 스코어링(scoring)될 수 있거나, 코팅 및 껍질, 예를 들어, 장용 코팅 및 당 분야에 널리 공지된 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다.

[0182] 약학적 조성물은 또한, 예를 들어, 요망되는 방출 프로파일을 제공하기 위한 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미세구를 이용하여 약학적 조성물 내의 활성 성분의 느리거나, 연장되거나, 조절된 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다. 약학적 조성물은 또한 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 임의로 지연된 방식으로 위장관의 특정 부분에서만 또는 우선적으로 위장관의 특정 부분에서 활성 성분(들)을 방출시키는 조성물일 수 있다. 엠베딩(embedding) 조성물의 예는 중합 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적절한 경우 당 분야에 널리 공지된 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 회석제와 함께 미세피막화 형태로 존재할 수 있다(예를 들어, 문헌[Remington] 참조).

[0183] 구현예에서, 약학적 조성물은 액체 형태로 경구 투여된다. 활성 성분의 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함한다. 활성 성분은 더하여, 액체 투여 형태는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 비활성 회석제, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 용해보조제 및 유화제, 예를 들어, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(예를 들어, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아 오일, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로퓨릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 비활성 회석제에 더하여, 액체 약학적 조성물은 애즈벤트, 예를 들어, 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 착향제, 착색제, 방향제 및 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0184] 활성 성분(들)에 더하여 현탁액은 현탁제, 비제한적인 예로, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트래거캔스, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0185] 구현예에서, 약학적 조성물은 비-경구 수단, 예를 들어, 국소 적용, 경피 적용, 주사 등에 의해 투여된다. 관련 구현예에서, 약학적 조성물은 주사, 주입, 또는 이식에 의해 비경구적으로(예를 들어, 정맥내, 근내, 동맥내, 피하 등) 투여된다.

[0186] 양태에서, 본 발명의 개시의 약학적 조성물 및/또는 세포를 CNS로 직접 투여하는 것이 요망될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 조성물은 혈액뇌장벽을 피하기 위해 CNS로 직접 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 직접 척수 주사를 통해 투여될 수 있다. 구현예에서, 조성물은 수막강내 주사에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 뇌척수관내 주사를 통해 투여된다. 구현예에서, 조성물은 편측 뇌 가쪽뇌실로 투여된다. 구현예에서, 조성물은 양측 뇌 가쪽뇌실로 투여된다. 추가 구체예에서, 조성물은 해마내 주사를 통해 투여된다.

[0187] 조성물은 1회 주사 또는 다수의 주사로 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 조성물은 하나 초과(예를 들어, CNS에 대해 2개의 부위)로 투여된다.

[0188] 비경구 사용을 위한 조성물은 단위 투여 형태, 예를 들어, 여러 용량을 함유하는 앰플 또는 바이알 내에 제공될 수 있으며, 여기에는 적합한 보존제가 첨가될 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 주입 장치, 이식용 전달 장치의 형태로 존재할 수 있거나, 이는 사용 전에 물 또는 또 다른 적합한 비히클로 재구성되는 건조 분말로 제공될 수 있다. 하나 이상의 공동-비히클, 예를 들어, 에탄올이 또한 이용될 수 있다. 활성 성분(들) 외에, 조성물은 적합한 비경구적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 함유할 수 있거나, 활성 성분(들)은 조절 방출을 위해 미세구, 미세캡슐, 나노입자, 리포솜 등으로 통합될 수 있다. 또한, 조성물은 현탁제, 가용화제, 안정화제, pH-조정제, 및/또는 분산제를 또한 함유할 수 있다.

[0189] 약학적 조성물은 멸균 주사 형태로 존재할 수 있다. 약학적 조성물은, 예를 들어, 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해 멸균될 수 있거나, 사용 직전에 멸균수 또는 일부 다른 멸균 주사용 매질에 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물 형태의 멸균제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다. 상기 조성물을 제조하기 위해, 활성 성분은 비경구적으로 허용되는 액체 비히클에 용해되거나 현탁된다. 예시적인 비히클 및 용매는 물, 적절한 양의 염산, 소

등 하이드록시드 또는 적합한 완충제의 첨가에 의해 적합한 pH로 조정된 물, 1,3-부탄디올, 링거 용액 및 등장성 소듐 클로라이드 용액을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 약학적 조성물은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들어, 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트를 함유할 수 있다. 용해도를 개선시키기 위해, 용해 향상제 또는 가용화제가 첨가될 수 있거나, 용매는 10~60% w/w의 프로필렌 글리콜 등을 함유할 수 있다.

[0190] 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말을 함유할 수 있다. 이러한 약학적 조성물은 항산화제; 완충제; 정균제; 제형이 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질; 현탁제; 증점제; 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0191] 본 발명의 약학적 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브유, 및 주사용 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅 물질, 예를 들어, 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에서 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 활성 성분의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근내 주사로부터 화합물의 흡수를 늦추는 것이 요망된다. 이는 불량한 수 용해도를 갖는 결정성 또는 무정형 물질의 액체 현탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이후, 활성 성분의 흡수율은 차례로 결정 크기 및 결정 형태에 좌우될 수 있는 활성 성분의 용해율에 좌우된다. 대안적으로, 비경구적으로 투여된 활성 성분의 지연 흡수는 화합물을 오일 비히클에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다. 또한, 주사가 가능한 약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 발생될 수 있다.

[0192] 조절 방출 비경구 조성물은 수성 현탁액, 미세구, 미세캡슐, 자기 미세구, 오일 용액, 오일 현탁액, 에멀전의 형태로 존재할 수 있거나, 활성 성분이 생체적합성 담체(들), 리포솜, 나노입자, 이식 또는 주입 장치에 혼입될 수 있다.

[0193] 미세구 및/또는 미세캡슐의 제조에서 사용하기 위한 물질은 생물분해성/생분해성 중합체, 예를 들어, 폴리글락틴, 폴리-(이소부틸 시아노아크릴레이트), 폴리(2-하이드록시에틸-L-글루타민) 및 폴리(락트산)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0194] 조절 방출 비경구 제형을 제형화시키는 경우에 사용될 수 있는 생체적합성 담체는 탄수화물, 예를 들어, 텍스트란, 단백질, 예를 들어, 알부민, 지질단백질 또는 항체를 포함한다.

[0195] 이식에 사용하기 위한 물질은 비-생물분해성 물질, 예를 들어, 폴리디메틸실록산, 또는 생물분해성 물질, 예를 들어, 폴리(카프롤락톤), 폴리(락트산), 폴리(글리콜산) 또는 폴리(오르토 에스테르)일 수 있다.

[0196] 하기 실시예는 본원에 일반적으로 기재되었으나, 본 발명을 추가로 예시하기 위해 제공된다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0197] 실시예

[0198] 고셔-관련 타우병증 및 다른 단백질병에 대한 치료 전략으로서의 CNS에서의 글루코세레브로시다제 활성 증가

[0199] 글루코세레브로시다제를 인코딩하는 유전자인 *GBA1*의 돌연변이는 시누클레인병인 파킨슨병(PD) 및 레비소체치매(DLB) 발생에 대한 일반적인 유전적 위험 요인이다. *GBA1* 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 PD 환자는 또한 중추신경계(CNS)에서 글루코세레브로시다제의 더 낮은 효소 수준을 나타내며, 이는 상기 효소와 상기 질병의 발생 사이의 가능한 연관성을 암시한다. 본 실시예는 고셔-관련 시누클레인병(*Gba1*<sup>D409V/D409V</sup>)의 마우스 모델 및 A53T α-시누클레인을 과발현하는 트랜스제닉 마우스의 CNS에서의 글루코세레브로시다제 활성의 증가를 기재한다. 실시예 1은 증상 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서의 글루코세레브로시다제의 아데노-관련 바이러스-매개 발현이 독성 지질 글루코실스핑고신의 이상 축적을 완전히 교정하였고, 유비퀴틴, 타우 및 단백분해효소-K-내성 α-시누클레인 응집체의 수준을 감소시킨 것을 입증한다. 중요하게는, *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스에서의 글루코세레브로시다제의 해마 발현(4개월령 또는 12개월령에서 시작)이 또한 새로운 대상 인지 검사를 이용하여 시험하는 경우에 마우스의 인지 장애를 역전시켰다. A53T α-시누클레인 마우스의 CNS에서의 글루코세레브로시다제의 과발현은 가용성 α-시누클레인의 수준을 감소시켰고, 이는 상기 글리코시다제가 α-시누클레인병의 발생을 조절할 수 있음을 암시한다. 그러므로, CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 *GBA1*-관련 및 비-*GBA1*-관련 타우병증



에 대한 잠재적인 치료 전략이다.

[0200]

글루코세레브로시다제에 대한 유전자(*GBA1*)에서의 돌연변이는 보고에 의하면 파킨슨병(PD) 및 레비소체치매(DLB)와 같은 시누클레인병 발생에 대한 가장 높은 유전적 위험 요인이다(예를 들어, 문헌[Aharon-Peretz J et al. (2004) N Engl J Med 351:1972-1977; Sidransky E et al. (2009) N Engl J Med 361:1651-1661; Velayati A et al. (2010) Curr Neurol Neurosci Rep 10:190-198; Clark LN et al. (2007) Neurology 69:1270-1277; Mata IF et al. (2008) Arch Neurol 65:379-382; Bultron G et al. (2010) J Inherit Metab Dis 33:167-173; Rosenbloom B et al. (2010) Blood Cells Mol Dis 46:95-102; 및 Duran R et al. (2012) Mol Genet Metab 4:495-497] 참조). 고서 환자 및 파킨슨증 및 치매를 갖는 보인자의 중추신경계(CNS)는 해마 뉴런 내의  $\alpha$ -시누클레인-양성 레비소체(LB) 및 레비 신경돌기(Lewy neurites)(LN)의 침착 및 고전적인 PD 및 DLB를 갖는 환자에서 인지되는 것과 유사한 과정을 갖는다(예를 들어, 문헌[Spillantini MG et al. (1997) Nature 388:839-840; Spillantini MG et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U S A 95:6469-6473; Tayebi N et al. (2003) Mol Genet Metab 79:104-109 및 Wong K et al. (2004) Mol Genet Metab 82:192-207] 참조). 상기 특징의 양태는 또한 신경병증 및 비-신경병증 고서병의 여러 마우스 모델의 CNS에서 인지된 적이 있다(예를 들어, 문헌[Xu YH et al. Mol Genet Metab (2010) 102:436-447; Cullen V et al. (2011) Ann Neurol 69:940-953; 및 Sardi SP et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108:12101-12106] 참조). 결과로서, 글루코세레브로시다제 활성의 상실 또는 분해되지 않은 대사물의 리소좀 축적과 PD 및 DLB의 발생 사이의 인과 관계가 암시되었다. 글루코세레브로시다제 활성과  $\alpha$ -시누클레인 대사 사이의 더욱 직접적인 관련성은  $\alpha$ -시누클레인 응집체의 수준을 증가시킨 약리학 적 또는 유전학적 개입에 의한 글루코세레브로시다제 활성에서의 감소를 나타낸 마우스 및 고서 세포의 연구에 의해 강조되었다(예를 들어, 문헌[Cullen V et al. (2011) Ann Neurol 69:940-953; Sardi SP et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108:12101-12106; Manning-Bog AB et al. (2009) Neurotoxicology 30:1127-1132; 및 Mazzulli JR et al. (2011) Cell 146:37-52] 참조). 또한, 글루코세레브로시다제 활성에서의 감소가 PD 및 DLB를 갖는 대상체(이들이 *GBA1*에서 돌연변이를 갖는지의 여부와 상관 없음)로부터의 CSF 및 뇌 샘플에서 인지 되었으며, 이는 글루코세레브로시다제 활성에서의 감소가 시누클레인병의 발생에 기여할 수 있음을 암시한다(예를 들어, 문헌[Balducci C et al. (2007) Mov Disord 22:1481-1484; Parnetti L et al. (2009) Neurobiol Dis 34:484-486; 및 Gegg ME et al. (2012) Annals of Neurology 72:455-63] 참조).

[0201]

시누클레인병의 발생에서의 글루코세레브로시다제의 역할은 고서-관련 파킨슨증을 갖는 대상체의 임상적 관찰에 의해 추가로 뒷받침된다. 상기 개체는 이들의 삶의 질을 실질적으로 잠식하는 비-운동 증상(예를 들어, 인지 장애)의 증가된 빈도 및 중증도를 나타낸다(예를 들어, 문헌[Brockmann K et al. (2011) Neurology 77:276-280; McNeill A et al. (2012) Mov Disord 27:526-532; 및 McNeill A et al. (2012) J Neurol Neurosurg Psychiatry 83:253-254] 참조). *GBA1*에 돌연변이를 갖는 개체는 또한  $\alpha$ -시누클레인의 응집체의 신뢰성 축적의 존재와 관련된 치매의 더 높은 발생률을 갖는다(예를 들어, 문헌[Clark LN et al. (2009) Arch Neurol 66:578-583; 및 Neumann J et al. (2009) Brain 132:1783-1794] 참조). 게다가, *GBA1*에서의 돌연변이는 현재 PD 환자에서의 인지 장애 발생에 대한 독립적인 위험 요인으로 인정되고 있다(예를 들어, 문헌[Alcalay RN et al. (2012) Neurology 78:1434-1440] 참조). PD에서의 치매 발생에 대해 증가된 위험과 관련된 것으로 밝혀진 또 다른 유전자는 *MPT*이다(예를 들어, 문헌[Goris A et al. (2007) Ann Neurol 62:145-153] 참조). 이러한 유전자는 세포골격의 적절한 조직화 및 온전성을 유지시키는 역할을 하는 미세관-관련 단백질인 타우를 인코딩한다. 타우-관련 병리 및  $\alpha$ -시누클레인-관련 병리는 PD 및 LBD를 갖는 환자에서 나란히 빈번하게 발견된다(예를 들어, 문헌[McKeith IG et al. (1996) Neurology 47:1113-1124; Duda JE et al. (2002) Acta Neuropathol 104:7-11; 및 Giasson BI et al. (2003) Science 300:636-640] 참조).

[0202]

글루코세레브로시다제 활성에서 결과로서 발생한 결핍을 갖는 *GBA1*에서의 돌연변이는 리소좀 축적 질환 패밀리의 가장 우세한 일원인 고서병의 분자적 기초이다(예를 들어, 문헌[Brady RO et al. (1966) J Clin Invest 45:1112-1115 및 Sidransky (2004) Mol Genet Metab 83:6-15] 참조). 상기 질병은 리소좀 내의 대사되지 않은 지질 물질, 주로 글루코실세라미드의 점진적 축적을 특징으로 한다. 고서병을 갖는 대상체는 현재 글리칸-변형된 재조합 글루코세레브로시다제의 주기적 투여에 의해 관리된다(예를 들어, 문헌[Cox TM (2001) QJM 94:399-402 및 Grabowski GA (2008) Lancet 372:1263-1271] 참조). 그러나, 재조합 효소는 신경병증 고서 환자의 CNS 소견을 다루기에 충분한 양으로 혈액뇌장벽을 횡단할 수 없다(예를 들어, 문헌[Grabowski GA (2008) Lancet 372:1263-1271 및 Grabowski GA et al. (1998) Blood Rev 12:115-133] 참조). CNS에서 글루코세레브로시다제 수준을 증가시키기 위한 전략은 최근에 집중된 연구 주제였다(예를 들어, 문헌[Cabrera-Salazar MA et al. (2010) Exp Neurol 225:436-444; Khanna R et al. (2010) FEBS J 277:1618-1638; Ashe KM et al. (2011) PLoS

One 6:e21758; 및 Patnaik S et al. (2012) J Med Chem 55:5734-5748] 참조).

[0203]

레비 신경돌기를 연상케 하는 단백질분해효소 K-내성  $\alpha$ -시누클레인/유비퀴틴 응집체의 점진적 CNS 축적을 나타내는 고셔-관련 시누클레인병의 마우스 모델이 이전에 기재된 적이 있다(Sardi SP et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 108:12101-12106). 상기 마우스는 또한 이들의 CNS에서의 신경독소 글루코실스핑고신 (GlcSph)의 더 높은 수준 및 입증가능한 해마 기억 장애를 나타낸다. 본 실시예는 단백질 타우를 포함하는 고셔-관련 시누클레인병의 상기 모델과 관련된 병리학적 특징을 특성규명한다. 또한, 글루코세레브로시다제가 임상적으로 관련된 증상후 단계에서 동물에 투여된 경우에 이상이 완화되거나 역전될 수 있는지의 여부를 시험하였다. 최종적으로, 글루코세레브로시다제와  $\alpha$ -시누클레인 사이의 관계를 추가로 탐지하기 위해, A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스에서  $\alpha$ -시누클레인 수준에 영향을 미치는 리소좀 가수분해효소의 능력을 본원에 기재된 바와 같이 평가하였다.

[0204]

실시예 1: 타우 응집체의 축적을 나타내는 고셔병의 마우스 모델의 CNS

[0205]

결과로서 발생하는 치매를 갖는  $\alpha$ -시누클레인 및 타우 봉입체의 축적은 PD 및 DLB를 포함하는 다수의 신경변성 질병의 특징이다(예를 들어, 문헌[McKeith IG et al. (1996) Neurology 47:1113-1124; Ishizawa T et al. (2003) J Neuropathol Exp Neurol 62:389-397; 및 Lee VM et al. (2004) Trends Neurosci 27:129-134] 참조). 뮤린 *Gba1* 유전자좌(*Gba1*<sup>D409V/D409V</sup>)에서 단일한 점 돌연변이를 갖는 고셔병의 마우스 모델이 CNS에서  $\alpha$ -시누클레인/유비퀴틴 응집체의 점진적이고 현저한 축적 및 해마 기억에서 측정가능한 결핍을 나타내는 것이 이전에 보고되었다(문헌[Sardi SP et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108:12101-12106])(또한, 도 5a 및 b 및 도 6a 내지 d 참조). 결과로서 발생하는 글루코세레브로시다제 활성의 상실을 갖는 *Gba1*에서의 돌연변이가 또한 CNS에서 타우의 축적을 촉진하는지 결정하기 위해, 12개월령 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 뇌 섹션을 타우를 특이적으로 인지하는 항체를 이용하여 면역조직화화학적으로 검사하였다. 면역반응성의 증거가 또한 대뇌피질 및 소뇌와 같은 다른 뇌 영역에서 또한 관찰되었으나, 현저한 점 염색(punctate staining)이 주로 해마 영역에서 인지되었다(도 1a). *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 뇌에서의 타우 응집체의 축적 개시 및 속도를 또한 결정하였다. 2개월령에서, *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스에서의 타우 면역반응성의 정도는 야생형 대조군에서 인지된 것과 상이하지 않았다(도 1a 및 b). 6개월령 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스에서의 타우 염색의 수준은 연령-매치된 대조군에서의 타우 염색 수준보다 유의하게 높았다. 축적은 점진적이었고, 12개월령 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스는 타우 응집체의 더 많은 양을 나타내었다(도 1a 및 b).

[0206]

신경변성 질병에서의 일반적인 발견은 신경섬유매듭을 포함하는 과인산화된 타우의 존재의 증가이다(예를 들어, 문헌[Goedert M et al. (1995) Neurosci Lett 189:167-169; 및 Hanger DP et al. (2009) Trends Mol Med 15:112-119] 참조). 이들 인산화된 종은 특정 항체, 예를 들어, AT270(Thr181에서 인산화된 타우를 인지함), AT8(Ser202 및 Thr205에서 인산화된 타우를 인지함), 및 AT180(Thr231에서 인산화된 타우를 인지함)을 이용하여 검출될 수 있다. *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서의 타우 응집체의 인산화 상태를 탐지하기 위해, 18개월령 마우스로부터의 해마 용해질에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 모든 타우 종을 인지하는 항체(Tau-5)를 이용하여 블롯을 염색하는 것은 단백질의 전체 수준이 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup>와 야생형 마우스 사이에서 상이하지 않은 것을 나타내었다(도 1c). 블롯을 AT180 또는 AT270 항체를 이용하여 탐지한 경우에 대조군과 연령-매치된 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 사이에서 염색의 정도의 차이가 관찰되지 않았다(도 1c). 그러나, Ser202 및 Thr205에 대한 인산화를 검출하는 AT8 염색은 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 용해질에서 약간 그러나 유의하게 증가되었다(야생형에 비해  $1.3 \pm 0.1$ ,  $n=6$ ,  $p<0.05$ , 도 1c). 타우 응집체( $\alpha$ -시누클레인에 더함)의 축적의 점진적 특성과 커플링된 Ser202 및 Thr205에서의 증가된 인산화의 상기 관찰은 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS가 PD 및 DLB를 갖는 대상체에서 인지되는 병리학적 특징을 반복하는 것을 나타낸다.

[0207]

실시예 2: 증상후 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 생화학적 및 기억 이상을 역전시키는 해마로의 글루코세레브로시다제의 투여

[0208]

재조합 글루코세레브로시다제를 이용한 CNS의 재구성이 증상 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 생화학적 이상 및 기억 결핍을 고칠 수 있는지 결정하기 위해, 인간 글루코세레브로시다제를 인코딩하는 재조합 자기-상보성 아테노-관련 바이러스 벡터(형질형 1)(AAV-GBA1)를 초기 및 후기 증상 마우스(각각 4개월령 및 12개월령)의 해마로 양측 투

여하였다. 12개월령에서 AAV-GBA1이 투여된 후, 6개월 후에 분석된 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS의 면역조직화학 검사는 글루코세레브로시다제의 풍부하고 광범위한 해마 발현을 나타내었다(도 2a). 트랜스진을 인코딩하지 않는 대조군 바이러스(AAV-EV)로 처리된 마우스는 염색을 나타내지 않았다(도 2a, 삽입물). AAV-GBA1-처리된(도 2b, 적색 막대) 마우스에서의 효소 활성화는 기준선(도 2b, 흑색 막대)에서의 효소 활성화, 및 AAV-EV가 투여된 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스(도 2b, 청색 막대)의 효소 활성화보다 약 10배 더 높은 것으로 결정되었다. 효소의 유사한 분포가 4개월령에서 처리되고, 처리 6개월 후에 분석된 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서 인지되었다(데이터는 제시되지 않음). 12개월령 마우스에서의 글루코세레브로시다제의 발현은 6개월 후의 뇌 글루코실스핑고신의 과-상승된 수준의 정상화와 관련되었다(도 2c, 적색 막대). 대조적으로, 대조군 바이러스로 처리된 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스는 동일한 기간에 걸쳐 전염증성 지질의 지속된 축적을 나타내었다(도 2c, 청색 막대).

[0209]

해마 기억을 새로운 대상 인지 검사를 이용하여 평가하였다. 처리 전의 4개월령 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 검사는 이들이 새로운 대상 재수집에서 장애를 나타낸 것을 입증하였다(도 2d). AAV-GBA1을 이용한 상기 마우스의 처리는 마우스를 2개월 후(6개월령; 도 2e, 적색 막대, n=10,  $p<0.05$ )에 검사한 경우에 기억 결핍을 역전시켰다. 대조적으로, 대조군 바이러스 벡터로 처리된 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스는 식별가능한 개선을 나타내지 않았다(도 2e, 청색 막대, n=9). 유사한 결과가 12개월령(즉, 높은 수준의 미리 존재하는 병리를 가짐)에서 AAV-GBA1으로 처리되고, 2개월 후(14개월령; 도 2f, 적색 막대, n=12,  $p<0.05$ ; AAV-EV, 청색 막대, n=12)에 검사된 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 별개의 코호트에서 달성되었다. 그러므로, 증상 후 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 글루코실스핑고신의 병리학적 축적 및 중요하게는 상기 마우스의 기억 장애를 교정하였다(또한, GBA1 증가가 2개월령의 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스에서 기억 결핍을 또한 고칠 수 있는 것을 나타내는 도 7 참조).

[0210]

실시예 3: 뇌에서 응집된 단백질의 수준을 감소시키는 증상 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 해마로의 글루코세레브로시다제의 투여

[0211]

*GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스가 감소된 글루코세레브로시다제 활성 및 해마에서의 유비퀴틴,  $\alpha$ -시누클레인 및 타우 응집체의 점진적 축적을 나타냄에 따라, 뇌에서 글루코세레브로시다제 수준을 증가시키는 것이 증상 후 동물에서 상기 이상 단백질성 물질의 수준을 감소시키는지의 여부를 검사하였다. 4개월령 및 12개월령 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스(후자는 응집체 및 병리의 더 큰 축적을 나타냄)의 해마에 AAV-GBA1 또는 AAV-EV의 2E11 DNase-내성입자(drp)를 양측으로 정위 주사하였다. 대조군 AAV-EV 벡터를 이용한 연구 시작시(4개월령 및 12개월령) 및 주사 6개월 후의 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 뇌 조직의 분석은 상기 기간에 걸쳐 유비퀴틴,  $\alpha$ -시누클레인 및 타우 응집체의 축적을 나타내었다(도 3a 내지 3c). 대조적으로, 4개월령 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스로의 AAV-GBA1의 유전자 전달은 해마 유비퀴틴, 단백질분해효소 K-내성  $\alpha$ -시누클레인 및 타우 응집체의 감소를 발생시켰다(도 3a 내지 3c). 그러나, 유비퀴틴의 감소는 통계적 유의성에 도달하였으나,  $\alpha$ -시누클레인 또는 타우의 감소는 그렇지 않았다. 더 나이든(12개월령) 마우스에서의 글루코세레브로시다제의 CNS 발현은 6개월 후에 검정되는 경우에 더 어린 코호트에서 인지되는 것과 유사하나 약간 더 나은 효과를 발생시켰다(도 3a 내지 3c). 글루코세레브로시다제의 전달은 타우 및  $\alpha$ -시누클레인의 축적 속도를 늦춘 것으로 보였으나, 유비퀴틴 수준에 대해서는 효과가 없었으며, 이는 상기 단백질의 축적에 대한 메커니즘이 상이할 수 있음을 암시한다. 더 나이든 동물에 존재하는 응집체의 더 높은 수준은 더 긴 기간 또는 더 많은 글루코세레브로시다제가 효과적으로 감소되어야 하는 것을 필요로 하는 것일 수 있다. 그럼에도 불구하고, 데이터는 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것이 증상 *GbaI*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 내의 병리학적으로 미스폴딩된 단백질 응집체의 축적의 정도를 지연시킬 수 있음을 암시한다.

[0212]

실시예 4: 더 낮은 글루코세레브로시다제 활성화와 관련된 트랜스제닉 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 CNS

[0213]

PD 또는 DLB를 갖는 대상체의 CSF 및 뇌 샘플의 분석은 글루코세레브로시다제 활성이 병에 걸리지 않은 개체에서보다 병에 걸린 개체에서 낮은 것을 나타내었고, 이는 상기 시누클레인병의 발생에서의 리소좀 효소의 원인적 역할을 암시한다(예를 들어, 문헌[Balducci C et al. (2007) Mov Disord 22:1481-1484; Parnetti L et al. Neurobiol Dis (2009) 34:484-486; 및 Gegg ME et al. (2012) Annals of Neurology 72:455-63] 참조). 최근의

데이터는 또한  $\alpha$ -시누클레인이 리소좀 글루코세레브로시다제 활성을 억제하는 능력을 갖는 것을 암시하였다(예를 들어, 문헌[Mazzulli JR et al. (2011) Cell 146:37-52 및 Yap TL et al. (2011) J Biol Chem 286:28080-28088] 참조).  $\alpha$ -시누클레인의 과발현이 글루코세레브로시다제의 활성에 부정적으로 영향을 미치는지의 여부를 결정하기 위해, 트랜스제닉 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스로부터의 뇌 용해질(A53T 돌연변이를 갖는 돌연변이 인간  $\alpha$ -시누클레인을 발현함)을 연구하였다. GBA1에 돌연변이가 없는 PD 환자에서의 발견과 유사하게, A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스는 야생형 동물보다 유의하게 낮은 리소좀 글루코세레브로시다제 활성을 나타내었다(도 4a). 이러한 효과는  $\alpha$ -시누클레인의 수준에 좌우되었는데, 이는 동형접합 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 CNS가 더 낮은 수준의  $\alpha$ -시누클레인을 발현한 이들의 한배새끼(littermate)(Het)보다 효소 활성에 있어서 더 큰 감소를 나타냈기 때문이다(도 4a, 해치 막대). 이러한 감소는 글루코세레브로시다제와 선택적으로 관련되었는데, 이는 다른 리소좀 효소(즉, 핵소사미니다제 및  $\beta$ -갈락토시다제)의 활성이 영향을 받지 않았기 때문이다(도 4a). 이들 결과는 더 큰 억제가  $\alpha$ -시누클레인의 더 높은 수준과 관련되었으므로,  $\alpha$ -시누클레인의 높은 수준이 리소좀 글루코세레브로시다제 활성을 억제할 수 있다는 주장을 뒷받침한다.

[0214] 실시예 5:  $\alpha$ -시누클레인 수준을 낮추는 트랜스제닉 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 CNS에서의 글루코세레브로시다제의 AAV-매개 발현.

[0215] 이전에, 글루코세레브로시다제의 과발현이 증상 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS 내의  $\alpha$ -시누클레인 응집체의 축적을 감소시킨 것이 인지되었다(도 3b).  $\alpha$ -시누클레인의 축적을 완화시키는데 있어서의 글루코세레브로시다제의 치료적 잠재성을 확인하기 위해, 다음으로 상기 감소가 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스에서 또한 실현될 수 있는지의 여부를 검사하였다. 4개월령 이형접합 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 선조체에 AAV-GBA1 또는 GFP를 인코딩하는 대조군 바이러스(AAV-GFP)를 편측 주사하였다. 예상된 바와 같이, 대측 측면 또는 AAV-GFP-주사된 대조군과 비교하는 경우 글루코세레브로시다제 활성이 AAV-GBA1-주사된 마우스의 동측 선조체에서 유의하게 증가하였다(약 7배)(도 4b). 선조체 조직 균질액을 또한 연속 분획화에 적용시켜  $\alpha$ -시누클레인의 세포질 가용성 형태, 막-결합 형태 및 세포질 불용성 형태를 분리시켰다. ELISA에 의한 정량은 세포질 가용성  $\alpha$ -시누클레인의 수준이 글루코세레브로시다제의 선조체 발현에 의해 유의하게 감소(대조군의  $86 \pm 3\%$ ,  $n=5$ ,  $p<0.01$ )된 것을 나타내었다(도 4b). 막-결합  $\alpha$ -시누클레인의 수준은 또한 글루코세레브로시다제의 발현시 약간의 감소(대조군의  $81 \pm 9\%$ ,  $n=5$ ,  $p=0.07$ )를 나타내었다(도 4b). 그러나, 불용성 분획의 양은 처리에 의해 변화되지 않았다.

[0216] A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 척수에서  $\alpha$ -시누클레인 수준을 감소시키는데 있어서의 글루코세레브로시다제의 효능을 또한 결정하였다. 신생아 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스에 새끼 당 3E11 drp의 전체 용량으로 뇌 가쪽뇌실 및 상부 허리 척수 둘 모두로 AAV-GBA1 또는 AAV-GFP를 주사하였다. 예상된 바와 같이, 척수에서의 글루코세레브로시다제의 강한 발현(대조군보다 약 3배 높음)이 AAV-GBA1의 투여 후에 달성되었으나, 대조군 백터에서는 그렇지 않았다(도 4c). 선조체 주사와 유사하게, AAV-GBA1의 투여는 가용성 분획 내의  $\alpha$ -시누클레인 수준을 대조군의  $67 \pm 7\%$ 까지 낮추었다( $p<0.01$ , 도 4c). 이와 함께, 상기 결과는 글루코세레브로시다제의 활성을 증가시키는 것이 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 CNS 내의  $\alpha$ -시누클레인 수준을 낮출 수 있음을 나타낸다.

[0217] 실시예 6: 타우 응집체의 축적을 감소시키는 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스 뇌에서의 글루코세레브로시다제의 발현

[0218] 타우의 응집이  $\alpha$ -시누클레인 과발현 마우스를 포함하는 여러 동물 모델에서 관찰되었다(Haggerty et al. (2011) Eur J Neurosci 33:1598-1610). 타우의 축적을 완화시키는데 있어서 글루코세레브로시다제의 치료 잠재성을 입증하기 위해, 다음으로 상기 감소가 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스에서 또한 실현될 수 있는지의 여부를 검사하였다. A53T- $\alpha$ -시누클레인 트랜스제닉 마우스에 P0에서 양측으로 AAV-대조군 또는 AAV-GBA1을 주사하였다. 연령 매치된 주사되지 않은 WT 마우스를 음성 대조군으로서 처리되지 않은 채로 두었다. A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스의 뇌 조직의 분석은 야생형 대조군에 비해 더 많은 수의 응집체를 나타내었다(도 8). 특히, GBA1의 과발현은 연령 매치된 한배새끼에서 축적된 타우의 수를 감소시켰다(도 8). 데이터는 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것이 병리학적으로 미스폴딩된 단백질 응집체의 축적의 정도를 지연시킬 수 있다는 관찰과 일치한다.

[0219] 실시예 7: 기억 기능이상을 예방하는 타우 트랜스제닉 마우스에서의 글루코세레브로시다제의 발현

[0220] 타우 트랜스제닉 마우스(Thy1-TAU22)는 알츠하이머병 및 Thy1.2-프로모터 하에서 부위 G272V 및 P301S에서 돌연변이된 인간 4-반복 타우를 발현하는 다른 타우병증의 마우스 모델이다. Thy1-TAU22는 기억 기능 검사를 방해하는 임의의 운동 기능이상 및 근육긴장 자세의 부재하에서 타우 병리를 나타낸다. Thy1-TAU22는 여러 알츠하이머병-관련 타우 에피토프(AT8, AT100, AT180, AT270, 12E8, tau-pSer396, 및 AP422) 상에서의 타우의 과인산화, 드문 유령 매듭(ghost tangle) 및 PHF-유사 필라멘트를 갖는 신경섬유매듭-유사 봉입체(Gallyas 및 MC1-양성),



및 가벼운 성장교세포증을 나타낸다. 상기 마우스는 또한 지연 학습 및 감소된 공간 기억을 포함하는 손상된 행동을 나타낸다.

[0221]

글루코세레브로시다제(GBA1) 활성을 증가시키는 것의 치료 효능을 추가로 평가하기 위해, 타우 트랜스제닉 마우스에 대한 GBA1 증가의 효과를 평가하였다. 2개월령 Thy1-TAU22 마우스에 AAV1-GBA1 또는 AAV1-대조군 바이러스(1e13 DRPs/μl)를 주사하였다. 마우스를 마취시키고, 해마로의 바이러스 벡터의 정위 주사(3μl/부위의 양측 해마 주사)에 적용시켰다(도 9a). *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스와 일치하게, AAV-GBA1을 이용한 Thy1-TAU22 마우스의 처리는 기억 결핍을 역전시켰다(도 9b). 주사 2개월 후에 인지 개선의 경향이 있었고, 이는 동물을 처리 6개월 후에 검사한 경우에 강화되었다(도 9b). 대조적으로, 대조군 바이러스 벡터로 처리된 Thy1-TAU22 마우스는 새로운 대상에 대한 선호를 나타내지 않았으며, 이는 양 모두의 시점에서의 기억 기능이상을 나타낸다(도 9b). 그러므로, 타우 트랜스제닉 마우스의 CNS에서 GBA1 활성을 증가시키는 것은 기억 장애를 교정하였다.

[0222]

논의

[0223]

PD 및 DLB 발생에 대한 위험 요인으로서의 *GBA1* 돌연변이의 첫번째 기재 후, 여러 독립적 연구로부터의 발견은 상기 파괴적인 질병의 발병기전에서의 글루코세레브로시다제의 역할을 뒷받침하였다. 글루코세레브로시다제 활성의 감소 및 돌연변이 글루코세레브로시다제의 존재 둘 모두는 α-시누클레인/유비퀴틴 응집체의 CNS 수준에서의 증가를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Xu YH et al. (2010) Mol Genet Metab 102:436-447; Cullen V et al. (2011) Ann Neurol 69:940-953; Sardi SP et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108:12101-12106; Manning-Bog AB et al. (2009) Neurotoxicology 30:1127-1132; 및 Mazzulli JR et al. (2011) Cell 146:37-52] 참조). *Gba1*에서 돌연변이를 갖는 고셔병의 마우스 모델의 분석은 효소 활성의 감소가 PD 및 DLB의 두 특징인 신경 단백질 미스프로세싱(misprocessing) 및 인지 결핍을 촉진하는 것을 암시한다(예를 들어, 문헌[Xu YH et al. (2010) Mol Genet Metab 102:436-447; Cullen V et al. (2011) Ann Neurol 69:940-953; 및 Sardi SP et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108:12101-12106] 참조). 그러나, 상기 효소의 결핍이 상기 병의 발병기전에 기여하는 정도는 결정되어야 하는 채로 남아 있다. 본 연구는 상기 질병의 발생에서의 글루코세레브로시다제의 역할에 대한 추가적인 지지를 제공하며, PD 및 DLB와 같은 α-시누클레인 미스프로세싱과 관련된 질병에 대한 치료 접근법으로서의 CNS에서의 글루코세레브로시다제 증가를 확인한다.

[0224]

PD 및 LBD의 정확한 병인은 불명확한 채로 남아있으나, LB에서의 α-시누클레인 및 다른 단백질의 점진적 축적의 발견은 잠재적 원인 메커니즘으로서의 단백질 미스폴딩을 관련시켰다(예를 들어, 문헌[Lee VM et al. (2004) Trends Neurosci 27:129-134 및 Dawson TM & Dawson VL (2003) Science 302:819-822] 참조). 상기 단백질병은 α-시누클레인 및 유비퀴틴 응집체의 이전에 기재된 축적에 더하여 타우 병리의 점진적 축적을 나타내는 고셔병의 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 모델에서 반복된다. α-시누클레인 및 미세관-관련 단백질 타우 둘 모두는 여러 질병의 신경변성 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. α-시누클레인 및 타우 응집체의 결과로서 발생하는 상황을 갖는 *SNCA* 및 *MAPT*(각각 α-시누클레인 및 타우를 인코딩하는 유전자)에서의 돌연변이는 알츠하이머병, PD, DLB 및 전두측두엽 치매를 포함하는 다양한 신경변성 질병과 관련되어 있다(예를 들어, 문헌[Goris A et al. (2007) Ann Neurol 62:145-153; Lee VM et al. (2004) Trends Neurosci 27:129-134; 및 Schlossmacher M (2007) α-synuclein and synucleinopathies; 및 The Dementias 2 ed MN GJR (Butterworth Heinemann, Inc., Oxford), Vol 30, pp 186-215] 참조). 상기 단백질이 응집하는 메커니즘은 상이한 것으로 보이며, 예를 들어, α-시누클레인은 자발적으로 자기-중합할 수 있는 반면(문헌[Conway KA et al. (1998) Nat Med 4:1318-1320]), 타우는 유도제의 존재를 필요로 한다(문헌[Goedert M et al. (1996) Nature 383:550-553]). 또한, α-시누클레인 원섬유는 보고에 의하면 타우의 중합을 촉진할 수 있다(문헌[Giasson BI et al. (2003) Science 300:636-640 및 Waxman EA & Giasson BI (2011) J Neurosci 31:7604-7618]). 따라서, *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서 관찰된 타우 응집은 α-시누클레인 원섬유화에 종속적으로 발생할 가능성이 있다. 또한, 단지 하나의 타우 인산화 종(Ser202 및 Thr205)이 나이든 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 뇌에서 증가되었다. 문헌[Lasagna-Reeves et al. (2012) FASEB J 26:1946-1959]에 의해 제안된 바와 같이 고셔 마우스 모델에서의 광범위한 타우 과인산화의 결핍은 인산화가 후기 사건일 수 있음을 암시한다.

[0225]

PD는 통상적으로 운동 장애로 나타나지만, 치매를 포함하는 다양한 정도의 인지 장애와 관련된 것으로 공지되어 있다. *GBA1*에 돌연변이를 갖는 PD 환자는 통상적으로 이의 비-*GBA1* 돌연변이를 갖는 대증자보다 낮은 인지 스코어를 가지며, 이는 변경된 *GBA1*이 인지 결핍의 발생에 대한 민감성을 증가시키는 것을 암시한다(문헌[Alcalay RN et al. (2012) Neurology 78:1434-1440]). 고셔병의 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 모델은 PD 및 DLB 환자로부터의 뇌

에서 인지된 많은 이상 생화학 특징 및 측정가능한 기억에서의 결핍을 반복한다. 상기 질병 소견이 외인성 공급원의 효소를 이용한 보충에 의해 증상전 동물의 CNS에서 개선될 수 있는 것으로 밝혀졌다(문헌[Sardi SP et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108:12101-12106]). *Gba1*-관련 인지 장애의 발생을 예측하는데 있어서의 내재성 어려움으로 인해, 동일한 이로온 효과가 또한 명백한 질병을 갖는 동물에서 실현될 수 있는지의 여부를 시험하는 것이 적절하였다. 본 실시예는 초기 및 후기 증상 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 둘 모두에서의 글루코세레브로시다제의 AAV-매개 발현이 또한 인지 장애를 역전시키는데 효과적인 것을 입증한다. 이러한 인지의 회복은 당지질 글루코실스핑고신의 완전한 청소 및 병리학적 응집체의 축적에서의 측정가능한 감소와 관련되었다. *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스의 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것이 "독성" 대사물의 수준을 감소시키고, 이에 의해 리소좀 기능을 개선시키는 것이 가능하며, 이는 정확한 시냅스 기능(문헌[Hernandez D et al. (2012) Neuron 74:277-284]) 및 응집된 단백질을 분해하는 경로의 적절한 기능(문헌[Martinez-Vicente M & Cuervo AM (2007) Lancet Neurol 6:352-361 및 Cremades N et al. (2012) Cell 149:1048-1059])에 필요하다. 중요하게는, 상기 결과는 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것이 고셔-관련 파킨슨증 및 관련 시누클레인병의 임상 양태 중 일부의 진행을 방해할 수 있음(심지어 역전시킬 수 있음)을 강하게 암시한다.

[0226]

진행 중인 연구는 글루코세레브로시다제와 α-시누클레인 사이의 관계에 대한 더 큰 통찰을 지속적으로 제공한다. 글루코세레브로시다제 활성의 감소 또는 돌연변이 글루코세레브로시다제의 존재가 α-시누클레인의 이상 축적을 촉진할 수 있는 것이 명백하다(문헌[Sardi SP et al. (2012) Neurodegener Dis 10:195-202]). 보고에 의하면, α-시누클레인은 또한 글루코세레브로시다제와 상호작용하여 리소좀으로의 이의 트래피킹을 감소시키거나, 이의 활성을 억제함으로써, 질병 상태를 악화시킬 수 있다(문헌[Mazzulli JR et al. (2011) Cell 146:37-52 및 Yap TL et al. (2011) J Biol Chem 286:28080-28088]). 질병 과정에서의 글루코세레브로시다제의 역할은 또한 *Gba1* 돌연변이를 갖는지의 여부와 상관없이 산발적 PD 환자의 뇌 및 CSF에서의 감소된 글루코세레브로시다제 활성의 발견에 의해 뒷받침된다(문헌[Gegg ME et al. (2012) Annals of Neurology 72:455-63]). 상기 발견을 보충하기 위해, 상기 예는 CNS에서 A53T-α-시누클레인을 과발현하는 트랜스제닉 A53T α-시누클레인 마우스의 연구를 기재한다. A53T-α-시누클레인 마우스로부터의 뇌 용해질의 측정은 더 높은 수준의 α-시누클레인을 갖는 마우스가 더 낮은 양의 글루코세레브로시다제 활성과 관련된 것을 나타내었다. 중요하게는, A53T-α-시누클레인 마우스의 뇌에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 α-시누클레인 수준을 감소시켰다. 상기 결과는 "시누클레아제" 활성을 통해 A53T α-시누클레인 마우스의 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것이 글루코세레브로시다제 활성에 대한 α-시누클레인의 유해한 피드백을 방해함으로써 α-시누클레인을 분해하는 세포의 능력을 회복시킬 수 있음을 암시한다. 그러므로, 재조합 효소, 리소좀 효소를 인코딩하는 유전자 전달 벡터 또는 가수분해효소의 소분자 활성제의 투여를 통해 CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 미스폴딩된 단백질의 축적의 정도를 감소시킬 수 있고, 이에 의해 *Gba1* 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 대상체에서 PD의 질병 진행을 늦출 수 있다.

[0227]

요컨대, CNS에서 응집체의 축적의 정도를 조절하는데 있어서의 글루코세레브로시다제 증가의 효능이 타우 및 α-시누클레인 단백질병의 3개의 무인 모델에서 입증되었다. 고셔-관련 파킨슨증 및 치매의 증상 마우스 모델에서, CNS에서 글루코세레브로시다제 활성을 증가시키는 것은 지질의 이상 축적을 교정하였고, 인지 기능이상을 역전시켰고, 응집된 α-시누클레인 및 타우의 수준을 감소시켰다. CNS에서 글루코세레브로시다제 수준을 증가시키는 것은 또한 A53T α-시누클레인 마우스 모델에서 α-시누클레인 수준 및 타우 응집체를 감소시키는데 효과적이었다. 타우 트랜스제닉 마우스의 CNS에서 글루코세레브로시다제 수준을 증가시키는 경우 기억 기능이상에서의 개선이 추가로 관찰되었다. 이와 함께, 상기 결과는 PD 및 관련 시누클레인병 및 타우병증에 대한 글루코세레브로시다제 증가 요법의 개발을 뒷받침한다.

[0228]

#### 재료 및 방법

[0229]

동물: 젠자임(Genzyne) 및 사노피 컴퍼니(Sanofi Company)의 동물실험윤리위원회(The Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 모든 절차가 승인되었다. 고셔병의 *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 마우스 모델은 무인 글루코세레브로시다제(*Gba1*) 유전자의 잔기 409에 점 돌연변이를 갖는다(예를 들어, 문헌[Xu YH et al. (2003) Am J Pathol 163:2093-2101] 참조). 트랜스제닉 A53T α-시누클레인 마우스는 무인 PrP 프로토타입의 전사 조절하에서 인간 A53T α-시누클레인(계통 M83)을 발현한다(문헌[Giasson BI et al. (2002) Neuron 34:521-533]). A53T α-시누클레인 마우스의 지노타이핑(genotyping)을 인간 SNCA에 대한 프라이머-프로브 세트(검정 ID Hs00240907\_m1)를 이용한 Applied Biosystems 7500 실시간 PCR 시스템(Life Technologies, Carlsbad CA)을 이용한 정량적 PCR에 의해 수행하였다. SNCA 값을 마우스 GAPDH(4352339E)로 표준화시켰다.

- [0230] 자기-상보성(sc) AAV 벡터: 인간 *GBA1* cDNA의 열린해독들을 scAAV2 ITRs 및 0.4 kb GUSB 프로모터를 함유하는 서플라스미드로 클로닝하였다(문헌[Passini MA et al. (2010) J Clin Invest (2010) 120:1253-1264]). 녹색 형광 단백질(GFP) 열린해독들 또는 비-코딩 스템퍼(stuffer) DNA(빈 벡터, EV)를 또한 동일 서플 벡터로 클로닝 하였다. 재조합 플라스미드를 인간 293 세포의 삼중-플라스미드 트랜스펙션에 의해 AAV 혈청형-1 캡시드로 각각 패키징시켜 scAAV2/1-GusB-hGBA1(AAV-GBA1), scAAV2/1-GusB-GFP(AAV-GFP) 및 scAAV2/1-GusB-EV(AAV-EV)를 생성시켰다. 재조합 AAV 벡터를 이온-교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. AAV-GBA1, AAV-GFP 및 AAV-EV의 생성된 벡터 제조물은 통상적으로 1E13 DNase-내성 입자(drp)/ml의 역가를 가졌다.
- [0231] 정위 주사: *Gba1*<sup>D409V/D409V</sup> 및 A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, 해마(정수리점 및 경질막으로부터 A-P: -2.00; M-L:  $\pm 1.50$ ; D-V: -1.5; 인사이서 바(incisor bar): 0.0) 또는 선조체(정수리점 및 경질막으로부터 A-P: +0.50; M-L:  $\pm 2.00$ ; D-V: -2.5; 인사이서 바: 0.0)로의 바이러스 벡터(AAV-GFP, AAV-GBA1, AAV-EV)의 정위 주사에 적용시켰다. 10- $\mu$ l Hamilton 주사기를 이용하여 각각의 주사 부위에 2 마이크로리터를 투여하였다(전체 2E11 drp/주사 부위에 대해 0.5  $\mu$ l/분의 속도). 수술 1시간 전 및 수술 24시간 후, 진통을 위해 마우스에 케토프로펜(5 mg/kg s.c.)을 제공하였다.
- [0232] 신생아 주사: 탄생일(P0)에, 새끼에게 둘 모두의 반구의 뇌 가쪽뇌실 및 상요추 척수로 3회의 주사(각 부위에 2  $\mu$ l)를 제공하였다. 투여된 AAV-GBA1 및 AAV-GFP 벡터의 전체 용량은 동물 당 3E11 drp였다. 모든 주사를 이전에 기재된 바와 같은 미세하게 잡아늘린 마이크로피펫 바늘을 이용하여 수행하였다(문헌[Passini MA et al. (2010) J Clin Invest 120:1253-1264]).
- [0233] 웨스턴 블로팅: 생화학 분석을 위해, 마우스를 인산염-완충 염수(PBS)로 관류시키고, 이전에 기재된 바와 같이 처리하였다(문헌[Sardi SP et al. (2012) Neurodegener Dis 10:195-202]). 조직을 액체 질소에 즉시 동결시키고, 검정 때까지 -80°C에서 저장하였다. 조직을 프로테아제(Complete®; Roche, Germany) 및 인산분해효소(Pierce, Rockford, IL) 억제제의 카테일을 함유하는 T-PER 용해 완충액(Pierce, Rockford, IL)에서 균질화시켰다. 원심분리 후, 용해질을 4 내지 12% SDS-PAGE에 용해시키고, 니트로셀룰로스 막으로 옮기고, 마우스 항-타우(Tau-5, 1:500, Millipore, Billerica, MA), 마우스 항-인산화 타우(AT8, Ser202/Thr205; AT180, Thr231; AT270, Thr181; 모두 Pierce로부터 구입, Rockford, IL) 또는 토끼 항- $\beta$ -튜블린 항체(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 항체로 탐지하였다. 막을 적외선 이차(1:10,000) 항체(LI-COR Biosciences, Lincoln NB)와 함께 인큐베이션하고, Odyssey 소프트웨어(LI-COR Biosciences)를 이용한 정량적 형광에 의해 단백질 밴드를 시각화시켰다.
- [0234] 글루코세레브로시다제 활성 및 글리코스핑고지질 수준의 측정: 뇌 및 해마 글루코세레브로시다제 활성을 인공 기질로서 4-메틸움벨리페틸(4-MU)- $\beta$ -D-글루코시드를 이용하여 이전에 기재된 바와 같이 결정하였다. 핵소사미니다제 및  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 각각 4-MU-N-아세틸- $\beta$ -D-글루코사미니드 및 4-MU- $\beta$ -D-갈락토포라노시드를 이용하여 결정하였다. 조직 글루코실세라미드(GlcCer) 및 글루코실스핑고신(GlcSph) 수준을 이전에 기재된 바와 같이 질량분광법에 의해 측정하였다(Cabrera-Salazar MA et al. Exp Neurol (2010) 225:436-444).
- [0235] 면역조직화학: 조직을 이전에 기재된 바와 같이 처리하였다(문헌[Sardi SP et al. (2012) Neurodegener Dis 10:195-202]). 일부 조직을 실온에서 7분 동안 단백질분해효소 K(1:4 희석; DAKO, Carpinteria, CA)로 전처리하여  $\alpha$ -시누클레인 응집체를 노출시켰다. 마우스 항-유비퀴틴(1:50; Millipore, Billerica, MA), 토끼 항- $\alpha$ -시누클레인(1:300; Sigma, St. Louis, MO), 및 마우스 항-타우(1:500, Tau-5, Millipore, Billerica, MA)의 일차 항체를 이용하였다.
- [0236] 새로운 대상 인지 시험: 시험을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다(문헌[Sardi SP et al. (2012) Neurodegener Dis 10:195-202]). 간단히, 마우스를 연속 3일 동안 5분 동안 개방장(open-field) 박스를 탐험시켜 개별적으로 순응시켰다. 첫번째 트레이닝 시행(T1) 동안, 2개의 동일한 대상을 서로 14인치 떨어지게 하여 개방장에 대칭으로 두었다. 동물을 5분 동안 탐험시켰다. 대상을 조사하는데 소비된 시간을 Ethovision 비디오 추적 소프트웨어(Noldus, The Netherlands)를 이용하여 기록하였다. 24시간의 유지 기간 후, 동물을 이들의 새로운 대상의 인지에 대해 시험(T2)하였다. 마우스를 5분 동안 개방장 박스에 다시 두고, 친숙한 대상 및 새로운 대상을 조사하는데 소비된 시간을 기록하였다. 결과는 트레이닝(T1) 또는 시험(T2) 동안 표적 조사의 백분율로 표현된다. 표적에 대한 50% 조사의 스코어가 어느 한 대상에 대한 선호가 없는 것이다.
- [0237]  $\alpha$ -시누클레인의 분획화 및 정량: A53T  $\alpha$ -시누클레인 마우스로부터의 선조체 및 척수를 이전에 기재된 바와 같이 균질화시켜(문헌[Cullen V et al. (2011) Ann Neurol 69:940-953]), 세포질(Tris-가용성), 막-결합(Triton-



X100-가용성) 및 불용성(SDS-가용성)의 3개의 분획을 수득하였다. 다양한 분획에서의 인간  $\alpha$ -시누클레인의 농도를 샌드위치 ELISA(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 정량하였다. 단백질 농도를 마이크로BCA 검정(Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였다.

[0238]

통계 분석: 통계 분석을 스튜던츠  $t$ -검정(Student's  $t$ -test) 또는 분산분석(ANOVA) 후 뉴만-쿨스 post-hoc 검정(Newman-Keuls's post-hoc test)에 의해 수행하였다. 새로움에 대한 신호는 1-샘플  $t$ -검정을 이용하여 시간의 50% 초과로 새로운 대상을 조사하는 것으로 정의되었다. 모든 통계 분석을 GraphPad Prism v4.0(GraphPad Software, San Diego, CA)으로 수행하였다.  $p < 0.05$ 의 값을 유의한 것으로 간주하였다.

[0239]

본 발명은 상기 구현예와 관련하여 기재되었으나, 상기 기재 및 실시예는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것으로 의도되고, 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 본 발명의 범위 내의 다른 양태, 장점 및 변형은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 명백할 것이다.

[0240]

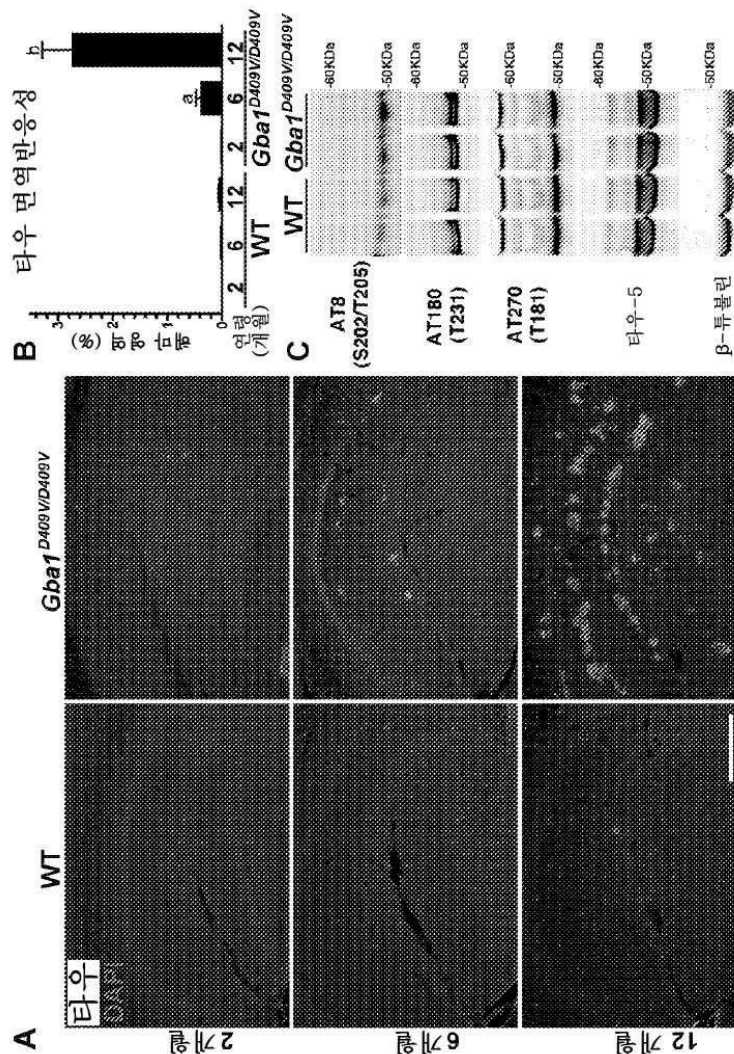
또한, 본 발명의 특징 또는 양태가 마커쉬 그룹에 의해 기재되는 경우, 당업자는 본 발명이 마커쉬 그룹의 임의의 개별적 일원 또는 일원의 하위그룹에 의해 기재되는 것을 인지할 것이다.

[0241]

본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌은 각각이 개별적으로 참조로서 포함되는 것과 동일한 정도로 전체내용이 참조로서 명백히 포함된다. 불일치의 경우, 정의를 포함하는 본 발명의 명세서가 우선할 것이다.

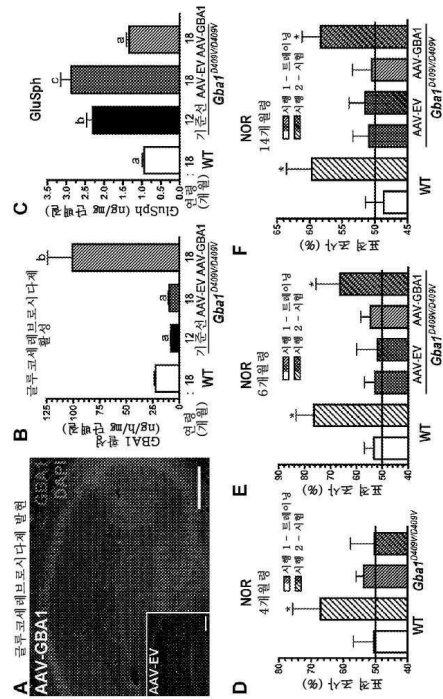
## 도면

### 도면1

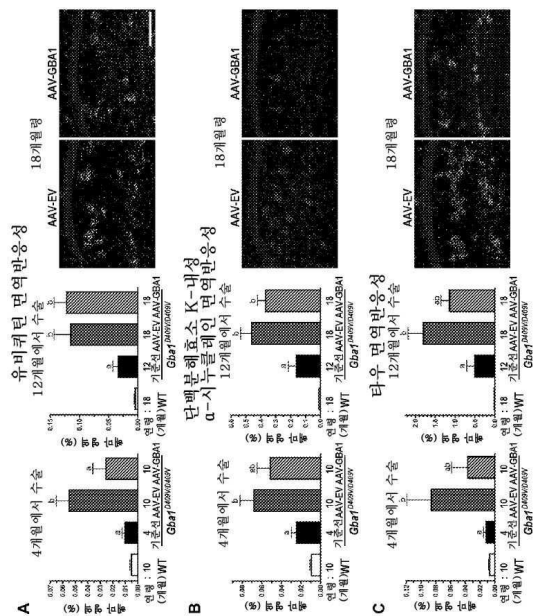




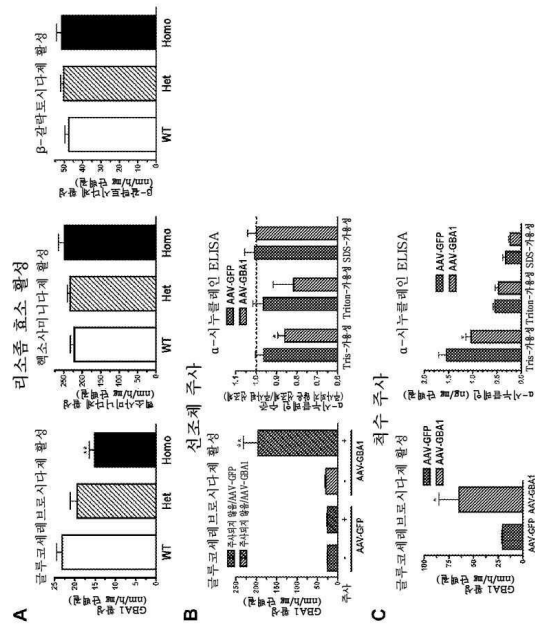
도면2



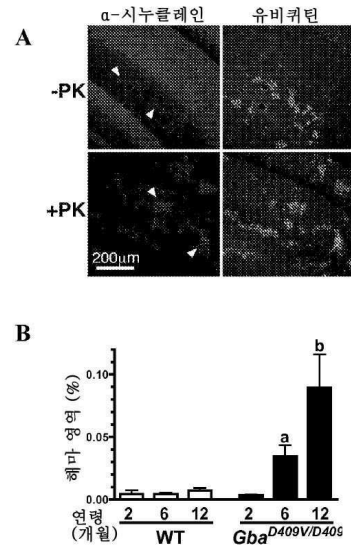
도면3



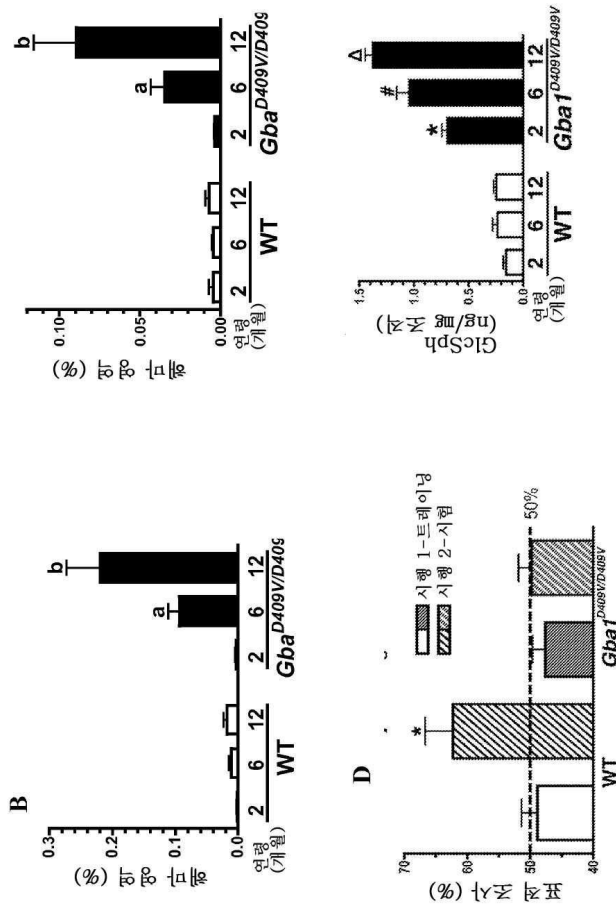
도면4



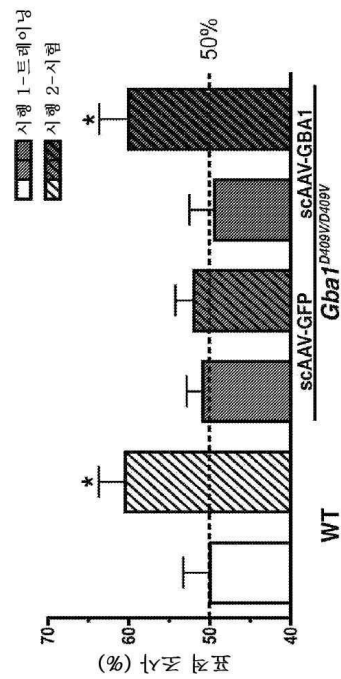
도면5



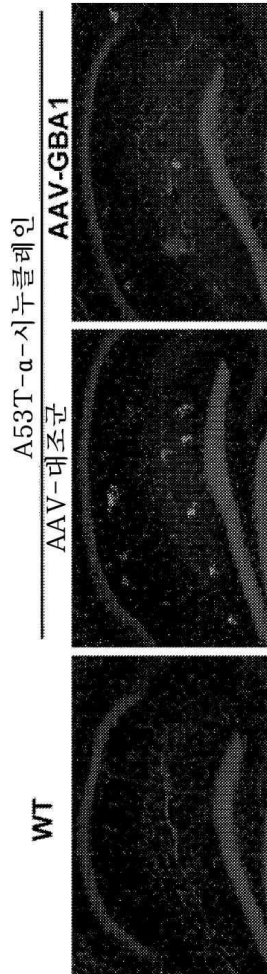
도면6



도면7

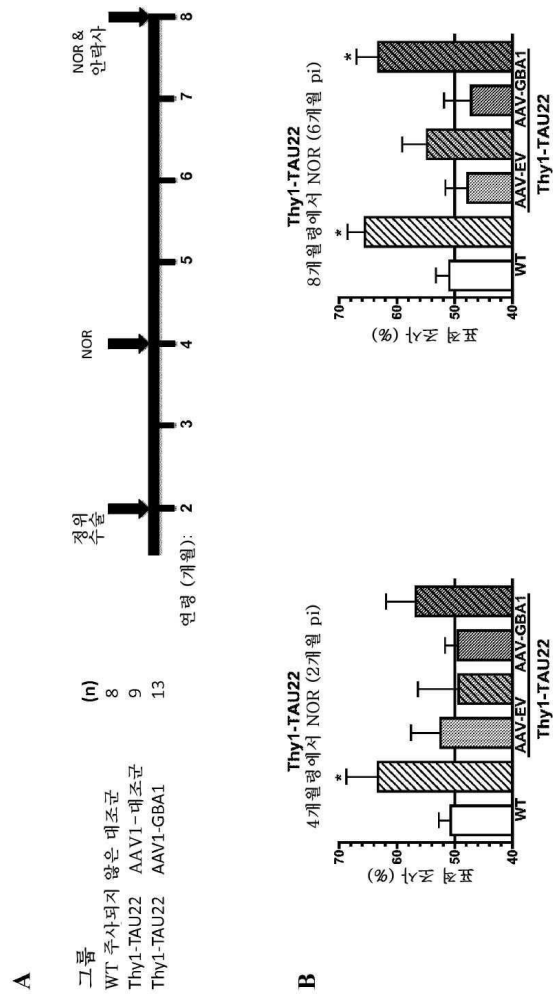


도면8





도면9



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GENZYME CORPORATION
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING PROTEINOPATHIES
- <130> US2012-143 WO PCT
- <140> US 61/722,434
- <141> 2012-11-05
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys

1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro

20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg

35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly

50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly

65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu

85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu

100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe

115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu

130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu

145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala

165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn

180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr

195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

	485	490	495
Gln			