(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006358
(43) 공개일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *C07K 14/475* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/185 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7032559
(22) 출원일자(국제) 2023년03월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/016270
(87) 국제공개번호 WO 2023/183594
국제공개일자 2023년09월28일
(30) 우선권주장
63/323,830 2022년03월25일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
아스클레피오스 바이오파마슈티컬, 인크.
미국 노스 캐롤라이나주 27709 리서치 트라이앵글 파크 스위트 110 알렉산더 드라이브 티.더블유. 20
(72) 발명자
뱅키에비치 크리스토프 에스.
미국 캘리포니아주 94619 오클랜드 발모랄 드라이브 5815
켈즈 아드리안 피.
미국 캘리포니아주 94158 샌프란시스코 넬슨 라이징 레인 525 아파트먼트 404
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
문두현

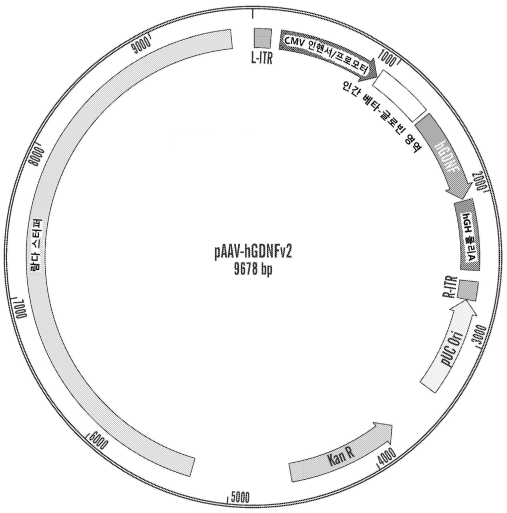
전체 청구항 수 : 총 81 항

(54) 발명의 명칭 **파킨슨병의 치료를 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 개시내용의 국면은 파킨슨병을 치료하는 데 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 GDNF(glial cell line-derived neurotrophic factor) 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터의 투여를 포함하는, 파킨슨병을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 투여는 대상체 피각에 국소적으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 투여는 이를테면 바람직하게는 CNS 또는 PNS 내의 표적화 세포에 대해, 예컨대, 변형된 바이러스 캡시드를 포함하는 바이러스 벡터를 통해 이루어진다.

대 표 도 - 도26



(52) CPC특허분류
A61K 48/0075 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
C07K 14/475 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자
반 라르 엠버
미국 노스 캐롤라이나주 27709 리서치 트라이앵글 파크 티.더블유. 알렉산더 드라이브 20 스위트 110 아스클레피오스 바이오파마슈티컬, 인크. 내
피안다카 마시모 에스.
미국 캘리포니아주 94546 카스트로 밸리 브룩데일 블바드 3912

(30) 우선권주장
63/326,236 2022년03월31일 미국(US)
63/341,841 2022년05월13일 미국(US)
63/393,196 2022년07월28일 미국(US)
63/438,164 2023년01월10일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(recombinant adeno-associated virus, rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하고,

여기서 대상체의 피각(putamen)의 부피의 적어도 30%는 GDNF 이식유전자로 형질전환되고,

여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 전신 도입을 통해 도입되는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 국소 도입을 통해 도입되는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 국소 도입은 대상체의 피각에의 직접 도입인 것인, 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 국소 도입은 대상체의 피각 각각에 상기 rAAV를 직접 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 국소 도입은 비-침습적 영상화와 동시에 수행되는 것인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 비-침습적 영상화는 수술 중 자기공명영상(intraoperative magnetic resonance image, iMRI) 유도 대류 증강 전달(convection enhanced delivery, CED), 초음파, 컴퓨터 단층촬영(computed tomography, CT), 기능성 자기공명영상(functional magnetic resonance imaging, fMRI), 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET), 뇌파 검사(electroencephalography, EEG), 자기 뇌파 검사(magnetoencephalography, MEG), 기능성 근적외선 분광법(fNIRS); 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 국소 도입은 수술 중 자기공명영상(iMRI) 유도 대류 증강 전달(CED)을 통해 각각의 피각에 rAAV 벡터의 약 절반을 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 국소 도입은 상기 AAV 벡터와 실질적으로 동시에 MRI 조영제를 도입하는 것을 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 MRI 조영제는 가도테리돌(gadoteridol)인 것인, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 MRI 조영제는 상기 rAAV와 동일한 조성물로 대상체에 도입되는 것인, 방법.

청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 MRI 조영제는 상기 rAAV와 상이한 조성물로 대상체에 도입되는 것인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 전신 도입을 통해 도입되는 것인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피각의 형질도입 및/또는 커버리지는 자기공명영상을 통해 평가되는 것인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 피각의 부피의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상은 상기 GDNF 이식유전자로 형질전환되는 것인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 12개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 이상 동안 PD-연관 증상의 감소를 나타내는 것인, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 12개월 이상 동안 PD-연관 증상의 감소를 나타내는 것인, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 대상체는 도입 전에, 32 미만의 초기 운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도(Movement Disorder Society-Unified Parkinson Disease Rating Scale, MDS-UPDRS) 점수를 갖는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 6개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 실질적으로 더 높지 않은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 12개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 실질적으로 더 높지 않은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 대상체는 도입 전에, 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는 것인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타내는 것인, 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 6개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 낮은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 25

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 12개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 30% 더 낮은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 도입 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 도입 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 제공하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 후 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 감소는 도입 후 6개월 후에 초기 MDS-UPDRS 점수의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 감소인 것인, 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 감소는 도입 후 12개월 후에 초기 MDS-UPDRS 점수의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 감소인 것인, 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 후 초기 MDS-UPDRS 점수의 안정화를 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소를 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 안정화는 적어도 6개월 이상 동안 발생하는 것인, 방법.

청구항 34

제1항에 있어서, 대상체는 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 미만의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 도입 전 5년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었던 것인, 방법.

청구항 36

제1항에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것으로 진단하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 37

제1항에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것으로 진단하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 38

제1항에 있어서, 대상체는 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 도입 전 4년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었던 것인, 방법.

청구항 40

제1항에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것으로 진단하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 41

제1항에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것으로 진단하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 42

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터인 것인, 방법.

청구항 43

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 신경계(NS) 또는 중추신경계(CNS) 특이적 프로모터인 것인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 NS 특이적 프로모터는 표 1의 NS 특이적 프로모터에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 CNS 특이적 프로모터는 표 2의 CNS 특이적 프로모터에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 46

제1항에 있어서, 상기 GDNF 이식유전자는 서열 번호: 1의 서열, 또는 서열 번호: 1에 대해 적어도 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 또는 그 이상 동일한 기능적 변이체를 포함하는 것인, 방법.

청구항 47

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, 또는 그의 합리적 반수체인 것인, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 rAAV는 AAV2인 것인, 방법.

청구항 49

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 뇌-특이적 친화성을 나타내는 것인, 방법.

청구항 50

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 그의 뇌-특이적 친화성을 증가시키는 변형을 포함하는 것인, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 뇌-특이적 친화성은 비변형된 AAV와 비교하여 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상만큼 증가되는 것인, 방법.

청구항 52

제1항에 있어서, rAAV는 $5x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg의 범위 내의 총 용량으로 도입되는 것인, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 총 용량의 약 절반은 대상체의 피각 각각에 투여되는 것인, 방법.

청구항 54

제3항에 있어서, 도입은 약 1μL/min 내지 약 30μL/min의 유량으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 55

제1항에 있어서, 상기 rAAV는 rAAV 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 액체 조성물로서 도입되는 것인, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 액체 조성물은 약 $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$vg/mL의 rAAV 농도를 갖는 것인, 방법.

청구항 57

제1항에 있어서, 대상체는 상기 rAAV의 도입 전에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는 것인, 방법.

청구항 58

제1항에 있어서, 대상체는 상기 rAAV의 도입 전에, 그리고 도입 후에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는 것인, 방법.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항-PD 치료제는 레보도파(levodopa), 시네메트(Sinemet), 리타리(Rytary), 스타레보(Stalevo), 아만타딘(amantadine), 프라미펙솔(pramipexole), 로티고틴(rotigotine), 로피니롤(ropinirole), 아포모르핀(apomorphine), 엔타카폰(entacapone)으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 도입 후 적어도 하나의 항-PD 치료제의 용량을 유지하거나 감소시키는 것인, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항-PD 치료제의 용량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 그 이상만큼 감소되는 것인, 방법.

청구항 62

이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각에 국소적으로 도입하는 것을 포함하고,

여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 이식유전자로 형질전환되는 것인, 방법.

청구항 63

이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

대상체의 피각의 부피의 약 30% 이상을 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자로 형질전환하는 것을 포함하고,

여기서 대상체는 형질전환 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 형질전환은 GDNF 이식유전자를 포함하는 rAAV를 대상체의 피각 각각에 투여함으로써 수행되는 것인, 방법.

청구항 65

파킨슨병(PD)을 갖고 있는 대상체에서 초기 운동 장애 학회-통합 파킨슨병의 평가 척도 부분(MDS-UPDRS) 점수를 감소시키거나 안정화하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각에 투여하는 것을 포함하고,

여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 투여 전의 대상체의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 감소되거나 안정화된 것인, 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 투여 전에, 대상체로부터 초기 MDS-UPDRS 점수를 획득하거나 수신하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 상기 제2 MDS-UPDRS 점수는 투여 후 12개월 후의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상만큼 감소된 것인, 방법.

청구항 68

제65항에 있어서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소인 것인, 방법.

청구항 69

파킨슨병(PD)에 의해 경도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하고,

여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 GDNF 이식유전자로 형질전환되고,

여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것인, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 대상체는 투여 후 12개월째에 MDS-UPDRS 점수를 가지며, 이는 투여 전의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것인, 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소인 것인, 방법.

청구항 72

파킨슨병(PD)에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하고,

여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 GDNF 이식유전자로 형질전환되고,

여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 감소되는 것인, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 감소는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상인 것인, 방법.

청구항 74

이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각 각각에 국소적으로 도입하는 것; 및

rAAV와 실질적으로 동시에 대상체의 피각 각각에 MRI 조영제를 국소적으로 도입하는 것을 포함하고,

여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 이식유전자로 형질전환되고,

여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

청구항 75

이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하고,

여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 이식유전자로 형질전환되고,

여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

청구항 76

대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은:

프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하는 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV); 및

약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 조성물은 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg의 rAAV 농도를 갖는 것인, 조성물.

청구항 78

제76항에 있어서, 상기 조성물은 1mL 당 $3.3x10^{12}$ vg의 rAAV 농도를 갖는 것인, 조성물.

청구항 79

대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 제형제로서, 상기 제형제는: 약제학적으로 허용 가능한 담체 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg의 농도로 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함하고,

여기서 rAAV는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 이식유전자를 포함하

는 게놈을 포함하는 것인, 제형제.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 도입 또는 투여 직후 적어도 6개월 동안 어떠한 심각한 부작용도 나타내지 않는 것인, 방법.

청구항 81

대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나, 억제하거나, 또는 안정화하거나, 또는 경도의 형태의 PD를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 위한 약제의 제조에서의, 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF), 이하 GDNF 이식유전자를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 용도로서,

여기서 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 이식유전자로 형질전환되고, 여기서 대상체는 약제의 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 증가를 나타내지 않는 것인, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2022년 3월 25일에 출원된 미국 가출원 제63/323,830호; 2022년 3월 31일에 출원된 미국 가출원 제63/326,236호; 2022년 5월 13일에 출원된 미국 가출원 제63/341,841호; 2022년 7월 28일에 출원된 미국 가출원 제63/393,196호; 및 2023년 1월 10일에 출원된 미국 가출원 제63/438,164호의 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 이익을 주장하며, 그 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본원에서 설명되는 기술은 신경성 질환 또는 장애, 예컨대, 파킨슨병을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0005] **정부 지원**

[0006] 본 발명은 미국 정부 기관인 재향군인부와의 협동 연구 개발 계약의 이행을 통해 만들어졌으며, 재향군인부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0007] 파킨슨병(PD)은 진행성 신경퇴행성 질환으로, 10년 내지 30년의 기간에 걸쳐 장애와 사망에 이르기까지 멈추지 않고 진행한다. 일반적으로 알려진 선조체 도파민 결핍을 호전시키기 위한 약물은 PD의 주요 운동 징후, 즉 안정 시 떨림, 경직, 운동완만증 및 자세 불안정성에 대해 실질적인 임상적 이점을 제공할 수 있다. 그러나, 도파민 대체 요법 및 다른 의학적 요법이 근본적인 신경퇴행성 과정에 영향을 미치지 않기 때문에 질환의 진행은 계속된다. 항-파킨슨병 약물에 대한 임상 반응은 시간이 지남에 따라 감소하며, 운동 변동, 운동이상증, 신경정신과적 징후를 포함하는 다양한 약물-관련 합병증이 뒤따른다.

[0008] 뇌심부자극술(Deep brain stimulation, DBS)은 특정 주요 운동 징후에 대한 합리적이고 효과적인 증상 치료 옵션이다. 하지만, 수술 이식 및 디바이스 프로그래밍의 위험과 복잡성, 뿐만 아니라 하드웨어-관련 합병증 및 유지로 인해 DBS의 사용은 부분적으로 제한되어 왔다. 최근에는, 심각한 운동 변동을 갖는 중증 환자에게도 듀오파(Duopa)가 승인되었다. 듀오파는 외부 휴대용 펌프에 연결된 위루관을 통해 투여되는 레보도파(levodopa)/카르비도파(carbidopa) 장내 겔로, 일관된 투여를 제공한다. 듀오파는 두개내 수술을 회피할 수 있지만, 장루 부위를 유지해야 하고 외부 부품을 휴대해야 하는 불편함이 있다. 듀오파의 산화로 인해, 이 치료법은 16시간/일로 승인되었기 때문에, 일부 환자는 하룻밤 동안 부적절하게 치료받을 수 있다.

[0009] 연구 노력은 PD의 신경퇴행성 과정의 근간이 될 수 있는 다수의 잠재적 메커니즘을 지적했다. 산화 스트레스, 미토콘드리아 기능 장애 및 세포 내 단백질 가공 이상은 일반적으로 제기되는 메커니즘이다. 실험적 치료 연구는 신경퇴행성 과정을 늦추거나 예방 또는 역전시키기 위한 의도로, 그러한 병리학적 교란을 교정하기 위해 설계되었다. GDNF와 같은 신경영양 인자는 특정 임상적 특징만 치료하기보다는 PD의 경과를 변경할 수 있는 잠재

력을 가진다.

[0010] PD는 안정 시 떨림, 경직, 운동완만증 및 자세 불안정성을 특징으로 하는 진행성, 다발성 신경퇴행성 질환이다. PD의 대부분은 특발성 질환이고, 알츠하이머병 다음으로 흔한 신경퇴행성 장애이다. 환자들은 우울증과 불안을 포함한 정서적 증상과 특징적인 운동 기능 및 운동 장애로 어려움을 겪는다. 현재까지 PD를 치료할 수 있는 방법은 없으며, 치료 옵션은 질환 증상을 호전시키는 데 제한되어 있다.

발명의 내용

[0011] 본원에 제공된 일 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자(종종 이식유전자로 지칭됨)로 형질전환되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 증가를 나타내지 않는다.

[0012] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 전신 도입을 통해 도입된다.

[0013] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 국소 도입을 통해 도입된다.

[0014] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 국소 도입은 대상체의 피각에의 직접 도입이다.

[0015] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 국소 도입은 대상체의 피각 각각에 rAAV를 직접 도입하는 것을 포함한다.

[0016] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 국소 도입은 비-침습적 영상화와 동시에 수행된다. 예시적인 비-침습적 영상화 기법은 수술 중 자기공명영상(intraoperative magnetic resonance image, iMRI) 유도 대류 증강 전달(convection enhanced delivery, CED), 초음파, 컴퓨터 단층촬영(computed tomography, CT), 기능성 자기공명영상(functional magnetic resonance imaging, fMRI), 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET), 뇌파 검사(electroencephalography, EEG), 자기 뇌파 검사(magnetoencephalography, MEG), 기능성 근적외선 분광법(fNIRS); 및 이들의 조합을 포함한다.

[0017] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 국소 도입은 수술 중 자기공명영상(iMRI) 유도 대류 증강 전달(CED)을 통해 각각의 피각에 rAAV 벡터의 총 전달 용량의 약 절반을 도입하는 것을 포함한다.

[0018] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 국소 도입은 AAV 벡터와 실질적으로 동시에 MRI 조영제를 도입하는 것을 더 포함한다.

[0019] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, MRI 조영제는 가도테리돌이다.

[0020] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, MRI 조영제는 rAAV와 동일한 조성물로 대상체에 도입된다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, MRI 조영제는 rAAV와 상이한 조성물로 대상체에 도입된다.

[0021] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 전신(예컨대, 정맥내) 도입을 통해 도입된다.

[0022] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 피각의 형질도입 및/또는 커버리지는 자기공명영상을 통해 평가된다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체의 피각의 부피의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상은 GDNF 유전자로 형질전환된다.

[0023] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 12개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0024] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 이상 동안 PD-연관 증상의 감소를 나타낸다.

[0025] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 12개월 이상 동안 PD-연관 증상의 감소를 나타낸다.

[0026] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 전에, 32 미만의 초기 운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도(Movement Disorder Society-Unified Parkinson Disease Rating Scale, MDS-UPDRS) 점수를 갖는다.

[0027] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 6개

월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 실질적으로 더 높지 않은 것을 특징으로 한다.

[0028] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 12개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 실질적으로 더 높지 않은 것을 특징으로 한다.

[0029] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 전에, 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는다.

[0030] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타낸다.

[0031] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 6개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 낮은 것을 특징으로 한다.

[0032] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 12개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 30% 더 낮은 것을 특징으로 한다.

[0033] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 도입 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 것을 더 포함한다.

[0034] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 도입 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 제공하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함한다.

[0035] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 후 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 특징으로 한다.

[0036] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 감소는 도입 후 6개월 후에 초기 MDS-UPDRS 점수의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 감소이다.

[0037] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 감소는 도입 후 12개월 후에 초기 MDS-UPDRS 점수의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 감소이다.

[0038] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 후 초기 MDS-UPDRS 점수의 안정화를 특징으로 한다.

[0039] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소를 특징으로 한다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 안정화는 적어도 6개월 이상 동안 발생한다.

[0040] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 PD에 의해 경도로 영향을 받는다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 미만의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 도입 전 5년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었다.

[0041] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것으로 진단하는 것을 더 포함한다.

[0042] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것으로 진단하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함한다.

[0043] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 PD에 의해 중등도로 영향을 받는다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 도입 전 4년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었다.

[0044] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것으로 진단하는 것을 더 포함한다.

[0045] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것으로 진단하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함한다.

[0046] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 프로모터는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터이다.

[0047] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 프로모터는 신경계(nervous system, NS) 또는 중추신경계(central nervous system, CNS) 특이적 프로모터이다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, NS 특이적 프로모터는 표 1의 NS 특이적 프로모터에서 선택된다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, CNS 특이적 프로모터는 표 2의

CNS 특이적 프로모터에서 선택된다.

[0048] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 핵산은 서열 번호: 1의 서열, 또는 서열 번호: 1에 대해 적어도 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 또는 그 이상 동일한 기능적 변이체를 포함한다.

[0049] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, 또는 그의 합리적 반수체이다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 AAV2이다.

[0050] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 뇌-특이적 친화성을 나타낸다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 그의 뇌-특이적 친화성을 증가시키는 변형을 포함한다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 뇌-특이적 친화성은 비변형된 AAV와 비교하여 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상만큼 증가된다.

[0051] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 $5x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg의 범위 내의 총 용량으로 도입된다.

[0052] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 총 용량의 약 절반은 대상체의 피각 각각에 투여된다.

[0053] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 도입은 약 1μL/min 내지 약 30μL/min의 유량으로 수행된다.

[0054] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, rAAV는 rAAV 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 액체 조성물로서 도입된다.

[0055] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 액체 조성물은 약 $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL의 rAAV 농도를 갖는다.

[0056] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 rAAV의 도입 전에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는다.

[0057] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 rAAV의 도입 전에, 그리고 도입 후에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 항-PD 치료제는 레보도파, 시네메트(Sinemet), 리타리(Rytary), 스타레보(Stalevo), 아만타딘(amantadine), 프라미펙솔(pramipexole), 로티고틴(rotigotine), 로피니롤(ropinirole), 아포모르핀(apomorphine), 엔타카폰(entacapone)으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0058] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 도입 후 적어도 하나의 항-PD 치료제의 용량을 유지하거나 감소시킨다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 항-PD 치료제의 용량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 그 이상만큼 감소된다.

[0059] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각에 국소적으로 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자로 형질전환된다.

[0060] 본원에 제공된 또 다른 국면은 대상체의 피각의 부피의 약 30% 이상을 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자로 형질전환하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체는 형질전환 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 형질전환은 GDNF 유전자를 포함하는 rAAV를 대상체의 피각 각각에 투여함으로써 수행된다.

[0061] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각에 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병(PD)을 갖는 대상체에서 초기 운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도 파트(MDS-UPDRS) 점수를 감소시키거나 안정화하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 투여 전의 대상체의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 감소되거나 안정화된 것이다.

[0062] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 방법은 투여 전에, 대상체로부터 초기 MDS-UPDRS 점수를 획득하거나 수신하는 단계를 더 포함한다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 제2 MDS-UPDRS 점수는 투여 후 12개월 후의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상만큼

감소된다.

[0063] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소이다.

[0064] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병(PD)에 의해 경도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 GDNF로 형질전환되고, 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것이다.

[0065] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 대상체는 투여 후 12개월째에 MDS-UPDRS 점수를 가지며, 이는 투여 전의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것이다.

[0066] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병(PD)에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 이식유전자로 형질전환되고, 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 감소되는 것이다. 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 감소는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상이다.

[0067] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 국소적으로 도입하는 것; 및 rAAV와 실질적으로 동시에 대상체의 피각 각각에 MRI 조영제를 국소적으로 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 핵산으로 형질전환되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0068] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법을 설명하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자로 형질전환되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0069] 본원에 제공된 또 다른 국면은, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자를 포함하는 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV); 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 조성물을 설명한다.

[0070] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 조성물은 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg의 rAAV 농도를 갖는다.

[0071] 본원의 임의의 국면의 일 실시형태에서, 조성물은 1mL 당 $3.3x10^{12}$ vg의 rAAV 농도를 갖는다.

[0072] 본원에 제공된 또 다른 국면은, 약제학적으로 허용 가능한 담체 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg의 농도로 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함하는, 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 제형제를 설명하고, 여기서 rAAV는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자를 포함하는 게놈을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 임상 연구 일정의 개략도를 도시한다. 대상체는 "OFF"(약물 복용 중단) 및 "ON"(약물 복용 중) 화살표로 표시된 바와 같이 처방된 항-파킨슨 치료제를 "ON" 및 "OFF"로 반복한다. MRI, FDG, 및 DaT 스캔은 십자가로 표시된 바와 같이 적용된다. 혈액 검사는 물방울로 표시된 바와 같이 실시된다. 대상체의 활동은 육각형으로 표시된 바와 같이 모니터링된다. 정의된 약물 OFF 상태에서 평가가 필요한 방문의 경우, 참가자는 방문 전날 저녁부터 모든 PD 약물(예컨대, 카르비도파/레보도파, 시네메트, 리타리, 스타레보, 아만타딘, 프라미펙솔, 로티고틴, 로피니롤, 아포모르핀, 엔타카폰)을 중단하도록 요청되며, 적어도 12시간 동안 약물 복용을 보류해야 한다.

도 2는 A 집단(PD에 의해 경미하게 영향을 받음)에 포함된 대상체의 요약을 도시한다.

도 3은 B 집단(PD에 의해 중등도로 영향을 받음)에 포함된 대상체의 요약을 도시한다.

도 4는 AAV2-GDNF를 국소 투여한 후 GDNF로 형질전환된 대상체의 피각의 퍼센트 부피의 요약을 도시한다. GDNF로 형질전환된 피각의 평균 부피는 63%이다.

도 5는 CMV 프로모터에 작동 가능하게 연결된 AAV2-GDNF를 국소 투여한 후 GDNF로 형질전환된 대상체의 피각의 퍼센트 부피를 도시하는 막대 그래프이다. GDNF로 형질전환된 피각의 평균 부피는 ~ 63%이다.

도 6a 및 도 6b는 A 집단의 대상체의 대표적인 수술 후 MRI를 도시한다. 도 6b는 치료제의 투여 후 일정 기간 동안의 MRI T1(조영제 전) 영상을 도시한다. 도 6b는 치료제의 투여 후 일정 기간 동안의 MRI T2 영상을 도시한다. 다양한 형태의 피각 과잉신호강도가 관찰된다.

도 7a 및 도 7b는 B 집단의 대상체의 대표적인 수술 후 MRI를 도시한다. 도 7a는 치료제의 투여 후 일정 기간 동안의 MRI T1(조영제 전) 영상을 도시한다. 도 7b는 치료제의 투여 후 일정 기간 동안의 MRI T2 영상을 도시한다. 다양한 형태의 피각 과잉신호강도가 관찰된다.

도 8a 내지 도 8h는 투여 후 다양한 시점의 PD 진행을 평가하는 데이터를 제시한다. 도 8a 내지 도 8d는 항-파킨슨병 치료제의 복용 중(도 8a) 또는 항-파킨슨병 치료제의 복용 중단(도 8b) 중 어느 하나의 MDS-UPDRS 총 운동 능력의 변화를 도시하는 선 그래프를 제시한다. A 집단("경도 PD 집단"으로 나타냄)에서는 12개월 동안 안정화된 MDS-UPDRS 점수가 관찰된다. B 집단("중등도 PD 집단"으로 나타냄)에서는 MDS-UPDRS 점수의 현저한 감소가 관찰된다. 투여 전 스크리닝에서 기준선을 확립하고, 이어서 수술 후 3개월, 6개월, 9개월, 및 12개월째에 MDS-UPDRS 점수를 평가했다. 총 UPDRS 점수(도 8c) 및 MDS-UPDRS II 점수(도 8d)는 수술 후 표시된 시간에 걸쳐 동일한 추세를 따른다. 도 8e 내지 도 8h는 경도 PD 집단(도 8e 및 도 8f)에서 AAV2-GDNF 투여 후 18개월에 걸친 안정적인 운동 측정값을, 중등도 PD 집단(도 8g 및 도 8h)에서 AAV2-GDNF 투여 후 18개월에 걸친 운동 개선을 도시한다. 도 8e 및 도 8f에서, (A)는 경도 PD에서 18개월에 걸쳐 입증된 안정성을 나타내고, (B)는 경도 PD에서 큰 폭의 기능적 개선을 측정하기 위한 제한된 창을 나타내고, (C)는 TH 돌연변이를 갖는 것으로 식별된 하나의 이상값(outlier)을 나타낸다.

도 9a 내지 도 9d는 PD 운동 일기 데이터를 도시하는 데이터를 제시한다. (도 9a 내지 9b) A집단(도 9a) 및 B 집단(도 9b)에 대한 PD 운동 일기 데이터를 도시하는 막대 그래프. 일기의 "ON/OFF" 시간은 16시간의 깨어있는 시간으로 정규화되었다. (도 9c) 투여 후 12개월 및 18개월 후 B 집단에서 대상체의 현저한 개선을 예시하는 원형 차트. 양호한 ON 시간은 기준선으로부터 27%만큼 개선되었고, OFF 시간은 기준선으로부터 52%만큼 개선되었다. (도 9d) 투여 후 12개월 및 18개월 후 A 집단에서 대상체의 현저한 개선을 예시하는 원형 차트. 양호한 ON 시간은 기준선으로부터 12%만큼 감소했고, OFF 시간은 기준선으로부터 46%만큼 증가했다.

도 10a 및 도 10b는 A 집단(경도로 영향받음; 도 10a) 및 B 집단(중등도로 영향받음; 도 10b)에 대한 NMSS(원) 및 PDG-39(사각형)를 도시하는 플롯 그래프를 제시한다. 투여 전, 수술 후 6개월, 수술 후 12개월, 수술 후 18개월, 수술 후 24개월째 스크리닝 때, NMSS 및 PDQ-39 점수를 평가했다.

도 11은 임상 1상과 비교하여 B 집단(중등도로 영향받음)에서 AAV2-GDNF의 용량 반응을 도시하는 선 그래프를 제시한다. 데이터는 중등도-병기 PD에서 임상 반응과 용량 및 피각 커버리지(>50%) 상관관계가 있다는 것을 나타냈다. 중등도-병기 PD에서 기능적 운동 개선의 정도는 예상되는 위약 효과(-5pt)의 기대치를 초과했다.

도 12는 동물 모델에서 예측한 바와 같이, 유전자 치료를 포함한 피각 주입(infusion)의 부피 분포가, 전달되는 주입 부피에 크게 의존한다는 것을 도시하는 그래프를 제시한다. 임상 PD 사례의 경우, 평균 일측성 피각 부피는 대략 4200입방mm이다. 이 도면의 점선 수평선 아래에 도시된 바와 같이, 피각 내에 주입된 초기의 유전자 치료 생성물은, 제한된 분포 부피로 제공되었으며, 총 피각 부피의 50%보다 훨씬 더 적었다. 분포 부피의 초기 제한은 주로 전달되는 주입 부피가 적기 때문이고, 피각에 표준 양측-전두엽 궤적을 활용했기 때문이다. 표준 양측-전두엽 접근법은 피각의 장축에 거의 수직인 궤적을 제공하고; 그러한 궤적에 따른 피각의 부피 커버리지는 작은 배측 피각 치수에 의해 제한되므로, 부피 커버리지를 확장하기 위해 다수의 궤적을 필요로 한다. 피각의 장축에 평행한 유전자 치료 주입의 진화는 훨씬 더 큰 주입 부피(최대 1800마이크로리터/피각) 및 >50%의 피각 커버리지의 달성을 제공했다.

도 13a 및 도 13b는 양측-전두엽 및 양측-후두부 궤적 기법의 개략도를 도시한다. (도 13a) 양측-전두엽 궤적 - 하나 이상의 전두엽 천공 구멍(들)이 양측으로 만들어진다. 피각 당 최소 2개의 궤적을 사용하여 교련(commissural) 전후의 피각을 커버할 수 있다. 궤적은 피각의 장축에 거의 수직이고 부피 커버리지는 주로 피

각의 짧은 배측 치수와, 사용된 궤적의 수에 의해 제한된다. 전형적으로 달성되는 피각 부피 커버리지는 < 50%이다. (도 13b) 양측-후두부 궤적 - 피각 당 단일 후두부 천공 구멍이 만들어진다. 이 기법은 교련 전후의 피각을 커버하기 위해 피각 당 단일 궤적을 필요로 한다. 궤적은 피각의 장축에 평행하고, 부피 커버리지는 주로 피각 내 혈관 주위 누출에 의해 제한된다. 전형적으로 달성되는 피각 부피 커버리지는 >50%이다.

도 14a 및 도 14b는 이전에 완료된 임상 시험 및 현재 진행 중인 임상 시험의 요약을 제시한다. 도 14a는 파킨슨병에서 피각에 대한 AAV2-GDNF 유전자 치료의 양측-전두엽 및 양측-후두부 전달 방법 둘 모두에 대한 임상 경험을 도시하는 차트를 제시한다. 도 14a는 PD의 진행성, 중등도, 및 초기 병기에서 다양한 벡터 용량 및 피각 커버리지의 안전성 및 내약성을 검사하는 이전에 완료된 1상 임상 시험 및 진행 중인 임상 시험의 세부사항을 제공한다. 현재 임상 시험(아래 실시예 1 내지 실시예 3에 설명된 바와 같음)은 초기 병기 PD를 갖는 참가자에서 유전자 치료 생성물의 안전성을 검사하기 위해 승인될 최초의 인간 유전자 치료 시험이다. 2022년 3월 말 현재, 임상 연구는 계획된 12명의 참가자 중 11명이 등록하여 치료를 받았다. 1상 연구에서는 13명의 참가자의 각각의 피각에 450마이크로리터($9x10^{10}$ vg 내지 $9x10^{11}$ vg)의 주입 부피를 전달하여, 26%의 평균 피각 커버리지를 달성했다. 본원에서 설명되는 임상 시험에서 지금까지 11명의 참가자를 대상으로 한 양측-후두부 전달은 각각의 피각에 최대 1800마이크로리터의 주입액을 제공했으며, 62.5%의 평균 피각 분포를 제공했다. 도 14b는 표시된 집단에 대해 이전에 완료된 임상 1상 시험과 현재 진행 중인 임상 시험(임상 1b상; 아래 실시예 1 내지 실시예 3에서 설명된 바와 같음)에서 달성된 피각 커버리지의 요약을 제시한다.

도 15는 AAV-GDNF의 개략도를 제시한다. CMV, 거대세포바이러스; hGDNF, 인간 신경교세포주-유래 신경영양 인자; hGH, 인간 성장 호르몬; ITR, 역전된 말단 반복.

도 16은 연구 설계의 개략도를 제시한다. 양측 피각(최대 용량 $1.2 x^{1013}$ vg로 피각 당 최대 1.8mL)과 분포를 시각화하기 위한 조영제(2mM 가도테리돌)를 1회, MRI로 모니터링되는 CED를 통해 AAV2-GDNF를 투여했다.

도 17은 수술 후 1개월 초과 관찰된 수술 후 부작용(즉, 치료 응급 부작용(treatment emergent adverse event, TEAE)에 대한 요약을 제시한다.

도 18a 및 도 18b는 경도 집단(도 18a) 및 중등도 집단(도 18b)의 운동 및 비운동 평가에 대한 개별 치료 후 변화의 요약을 제시한다.

도 19a 내지 도 19f는 투여 후 3.5년째에 AAV2-GDNF의 발현을 도시하는 데이터를 제시한다. (도 19a) AAV2-GDNF의 피각내 투여의 참가자의 MRI 영상. (도 19b 내지 도 19d) 피각에서 도파민 신경세포의 농축을 도시하는 피각 생검 샘플의 티로신 하이드록실라제 염색. 도 19b는 화살표로 표시된 바와 같이 도 19a의 면적을 도시한다. 도 19c는 화살표로 표시된 바와 같이 도 19b의 향상된, 확대된 영상을 도시한다. 도 19d는 화살표로 표시된 바와 같이 도 19c의 향상된, 확대된 영상을 도시한다. (도 19e) 샘플에서 수행된 6개의 생검 위치. 생검 위치 1번 및 5번은 수술 중 사용된 주입 부위이다. 생검 위치 6번은 피각 외부의 백질 영역에 위치한다. (도 19f) 표시된 생검 위치에서의 GDNF 이식유전자의 수준(pg GDNF/mg 단백질). 가장 높은 수준의 GDNF가 1번 및 5번 위치에서 발견되었다. 생검 위치 6번에서는 GDNF의 발현이 식별되지 않았다.

도 20은 안전 판독을 위한 종단 MRI 모니터링을 도시하는 데이터를 제시한다. 좌측 열의 T1(상단 행) 및 T2(하단 행) 가중치가 부여된 MRI 뇌 스캔은 피각(윤곽선)으로의 양측 주입 후 가도테리돌 분포(T1 영상의 밝은 흰색 신호)를 도시한다. 6개월 및 18개월 시점에 획득한 매칭되는 MRI 스캔은, 피각 또는 다른 뇌 구조에 가도테리돌 신호 또는 조직 이상이 남아있지 않다는 것을 보여준다.

도 21은 중등도 PD 집단의 반응을 나타내는 차트를 제시한다. 이전 CGT와 비교하여 강력하고 보다 점진적인 회복과 운동 기능이 발견되었다. 18개월의 임상 데이터는 (1) 이전의 신경영양 인자 CGT보다 더 강력한 개선, (2) 다른 CGT의 단기간 개선과 달리 6개월 이후에도 지속적인 개선으로 이전의 신경영양 인자 GTx보다 더 점진적인 AAV2-GDNF 효과, (3) 예상되는 작용 메커니즘과 일치하는 6개월 이후의 임상적으로 의미 있는 개선, 예컨대, 말초 발육 및 도파민 기능의 점진적 회복)을 나타낸다.

도 22a 및 도 22b는 경도(도 22a) 및 중등도(도 22b) 집단에 대한 치료 후 최대 18개월까지의 통합 운동이상증 평가 척도 병력, 객관적, 및 총 점수를 도시하는 차트를 제시한다.

도 23a 및 도 23b는 치료 후 최대 18개월까지의 경도(도 23a) 및 중등도(도 23b) 집단의 레바도파 등가 일일 용량(levadopa equivalent daily dose, LEDD) 평균값을 도시하는 차트를 제시한다.

도 24a 내지 도 24c는 경도 및 중등도 집단에서 DaT 스캔을 사용한 기능적 영상화의 예비 분석을 도시하는 데이터를 제시한다. 도 24a는 값의 막대 그래프를 제시한다. 도 24b 및 도 24c는 경도(도 24b) 집단 및 중등도(도 24c) 집단에 대해 도 24a에 도시된 값을 제시하는 표를 도시한다. 시간 경과에 따른 DAT 결합의 변화에 대한 예비 분석이 도시된다. 경도 및 중등도 집단 둘 모두에서 꼬리핵의 결합 감소가 관찰되었다. 두 집단 모두에서 상대적으로 안정적이거나 증가된 피각(put him)의 DaT 신호가 도시된다.

도 25a 내지 도 25d는 유전자 치료 투여 후 6개월 및 18개월째의 주입 부위에서의 F-도파 흡수의 변화를 도시하는 데이터를 제시한다. (도 25a 내지 도 25c) MRI 영상은 내측(전교련(precommissural)) 및 후방(후교련(postcommissural)) 피각에 양측 주입 후 축면(좌측 열) 및 관상면(우측 열)에서의 가도테리돌 분포를 도시한다(도 25a). 기준선(도 25b) 및 수술 18개월 후(도 25c) 한 환자의 축면 및 관상면에서의 F-dopa Ki 매개변수 맵은 MRI에서 가도테리돌 신호로 시각화된 주입 부위에 대응하는 영역에서 증가된 Ki를 도시한다.

도 26은 AAV2-GDNF 벡터, 예컨대, 서열 번호: 64를 생성하는 데 사용되는 플라스미드의 개략도를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 본원에 개시된 기술의 국면은 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자의, 예컨대, 국소 또는 전신 투여에 관한 것이고, 이로 인해 대상체의 피각의 적어도 30%는 유전자로 커버 및/또는 형질전환된다. 이러한 수준의 커버리지 및/또는 형질도입은 PD와 관련된 증상의 진행을 감소시키거나, 늦추거나, 또는 억제하는 데 유효한 것으로 도시되어 있다. 따라서, 본 개시내용에 의해 설명된 방법 및 조성물은, 일부 실시형태에서, PD의 치료에 유용하다.

[0075] *파킨슨병(Parkinson's Disease, PD)*

[0076] 본원에 제공된 방법은 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "파킨슨병" 또는 "PD"는 떨림과 경직이 점차 악화되고 균형, 보행, 협응력 문제가 증가하는 신경퇴행성 질환을 지칭한다. 대부분의 PD는 특발성으로 간주되지만, 전형적으로 유전적 소인과 환경적 영향의 조합이 후생적 조절에 작용하며, 다음을 포함하는 다수의 유전자 돌연변이가 PD의 위험에 기여하거나 위험을 증가시킬 수 있다: 시뉴클레인 알파(SNCA; NCBI 유전자 ID: 6622), 류신 농후 반복 키나아제 2(LRRK2/PARK8; NCBI 유전자 ID 120892), 글루코실세라미다제 베타(GBA1; NCBI 유전자 ID 2629), 파킨 RBR E3 유비퀴틴(PRKN; NCBI 유전자 ID 5071), PTEN 유도 키나아제 1(PINK1; NCBI 유전자 ID 65018), 파킨슨병 연관 디글리카제(DJ1/PARK7; NCBI 유전자 ID 11315), VPS35 리트로머 복합체 성분(VPS35; NCBI 유전자 ID 55737), 진핵 번역 개시 인자 4 감마 1(EIF4G1; NCBI 유전자 ID 1981), DnaJ 열 충격 단백질 패밀리 구성원 C13(DNAJC13; NCBI 유전자 ID 23317), 2(CHCHD2; NCBI 유전자 ID 51142)를 함유하는 코일드-코일-나선-코일드-코일-나선 도메인, 및/또는 유비퀴틴 C-말단 가수 분해 효소 L1(UCHL1; NCBI 유전자 ID 7345) 유전자를 갖는 돌연변이들. 그러한 PD-연관 유전자의 서열은 다수의 종에서 알려져 있으며, 예컨대, 인간 mRNA 및 단백질 서열은 제공된 유전자 ID 번호를 사용하여 NCBI 데이터베이스에서 이용 가능하다. 이러한 PD-연관 유전자 및 다른 유전자, 뿐만 아니라 그의 PD-연관 대립 유전자(예컨대, 돌연변이, 복제, SNP 등)는 해당 기술 분야에 알려져 있고, 예컨대, 문헌 [D'Souza et al. Acta Neuropsychiatrica 2020 32:10-22]; 문헌 [Sardi et al. Parkinsonism & Related Disorders 2019 59:32-38]; 문헌 [Hardy et al. Current Opinion in Genetics & Development 2009 19:254-65]; 문헌 [Ferreria et al. Neurologica 2017 135:273-84]; 문헌 [Jain et al. Clinical Science 2005 109:355-64]; 문헌 [Fagan et al. European Journal of Neurology 2017 24:561-e20]; 문헌 [Campelo et al. Parkinson's Disease 2017 4318416]; 및 문헌 [Porter et al. Chapter 15 of "Neurodegeneration and Alzheimer's Disease" 2019]에 더 설명되어 있으며; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0077] PD 발병의 위험 요인은 연령, 유전, 특정 독소에 대한 노출, 및 성별을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 청소년 또는 청년으로서의 PD의 진단은 드물다. 파킨슨병의 발병 위험은 연령과 함께 증가하며, 중년에서 말년에 시작하여; 대상체는 전형적으로 약 60세 이상에 발병한다. 가까운 친척(예컨대, 직계 가족, 삼촌, 이모, 또는 조부모)이 PD를 갖고 있으면, 대상체가 질환이 발병될 확률이 증가한다. 그러나, 다수의 친척이 PD 진단을 받은 경우가 아니라면 위험은 여전히 적은 것으로 간주된다. 특정 제초제 및 살충제에 지속적으로 노출되면 대상체에서 PD의 위험이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 마지막으로, 남성이 여성보다 PD가 발병할 확률이 더 높다.

[0078] PD의 증상은 통상의 기술자에게 잘 문서화되어 있고 잘 알려져 있다. 파킨슨병의 초기 증상은, 떨림(예컨대, 신체가 안정되어 있을 때, 종종 손 또는 손가락 등 사지에서 일반적으로 시작되는 떨림); 필링-룰링(pilling-

rolling) 떨림(예컨대, 신체가 안정되어 있을 때, 엄지와 검지를 앞뒤로 문지르는 것); 느려진 움직임(운동완만증); 경직된 근육(즉, 통증을 유발하고 운동 범위를 제한할 수 있는 임의의 신체 부위의 근육 경직); 자세 및 균형 장애(예컨대, 자세가 구부정해지거나, 또는 균형에 문제가 있을 수 있음); 자동 움직임의 상실(예컨대, 보행 시 눈을 깜박이거나, 웃거나 팔을 휘두르는 등의 무의식적 움직임 수행 능력의 감소); 말투 변화(예컨대, 더 부드럽고 빠르게 말하거나, 말을 더듬거나, 말하기 전에 머뭇거릴 수 있음); 또는 어조의 변화 및 억양의 손실); 및 쓰기 변화(예컨대, 쓰기는 더 작고 더 빽빽하게 보일 수 있음)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0079] PD의 합병증은, 인지 문제(치매) 및 PD 후기 단계의 사고력 장애; 파킨슨병 초기 및 후기의 우울증 및 정서적 변화(예컨대, 두려움, 불안 또는 의욕 상실); 병태가 진행됨에 따른 삼킴 문제(예컨대, 삼키기 어려움, 타액 축적 및 침 흘림); 질식 및 영양 부족으로 이어질 수 있는 후기 PD의 씹고 먹는 문제; 수면 문제 및 수면 장애(즉, 자주 깨는 것, 일찍 일어나는 것, 및 낮에 잠드는 것); 급속 안구 운동 수면 행동 장애; 방광 문제(즉, 소변을 조절할 수 없거나 배뇨 곤란을 가짐); 변비; 기립성 저혈압 (즉, 갑작스러운 혈압 강하); 후각 기능 장애(예컨대, 후각 상실 또는 특정 냄새 또는 냄새 간의 차이를 식별하기 어려움); 피로; 통증, 즉, 신체의 특정 부위 또는 신체 전체의 통증; 및 성기능 장애를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 파킨슨병을 진단하기 위한 특정 검사는 존재하지 않으며, 숙련된 임상의가 대상체의 의료 기록, 가족력, 나타나는 징후 및/또는 증상, 및 신경성 및 신체적 검사를 통해 진단을 할 것이다. 도파민 수송체 스캔(DaTscan)으로 불리는 특정 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영(single-photon emission computerized tomography, SPECT) 스캔이 수행되어 진단을 지원할 수 있지만, 진단에 대한 핵심 결정 요소는 아닐 가능성이 높다. 대부분의 환자는 DaTscan이 필요하지 않다. 예컨대, MRI, 뇌 초음파, 및 PET 스캔과 같은 비-침습적 영상화는 다른 신경성 장애를 배제하기 위해 수행될 수 있지만, PD를 진한하는 것에는 도움이 되지 않는다. 또한 파킨슨병이 의심되는 대상체는 충분한 용량(즉, 고용량)의 항-파킨슨병 치료제(예컨대, 카르비도파-레보도파)를 투여받고 증상(들)의 개선에 대해 모니터링할 수 있고; 투여 후 개선은 PD의 진단을 표시/확인할 수 있다.

[0081] PD 치료는 질환의 진행 중인 증상을 치료하기 위해 설계된 치료제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 치료제는, 카르비도파-레보도파; 카르비도파-레보도파 흡입; 카르비도파-레보도파 주입; 도파민 작용제; MAO B 억제제; 카테콜 O-메틸트랜스퍼라제(COMT) 억제제; 항콜린제; 및 아만타딘을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 가장 효과적인 PD 치료제인 레보도파는 뇌로 전달되어 도파민으로 전환되는 천연 화학 물질이다. 레보도파는 전형적으로 카르비도파(예컨대, 로도신(Lodosyn)® 카르비도파)와 조합되어 레보도파가 뇌 외부에서 도파민으로 조기 전환되는 것을 방지하여, 메스꺼움과 같은 부작용을 예방하거나 축소한다. 질환이 후기 단계로 진행됨에 따라, 레보도파의 효과는 덜 안정적이 될 수 있으며, 약해지거나 감소하는 경향(즉, "소실")이 있다. 불수의적 움직임(운동이상증)은 고용량의 레보도파와 연관된다. 인브리자(Inbrija)® 레보도파 흡입 분말은 레보도파를 흡입 형태로 전달하는 치료적 약물이다. 듀오파™ 카르비도파/레보도파 현탁액은 카르비도파 및 레보도파로 이루어진 브랜드명 약물로서, 약물이 젤 형태를 통해 소장으로 직접 전달되도록 공급 튜브를 통해 투여되는 것이다. 듀오파™ 카르비도파/레보도파 현탁액은, 카르비도파-레보도파에 여전히 반응하지만 반응의 변동이 심한 중증도 이상의 파킨슨병을 갖는 환자를 위한 것이다. 듀오파™는 지속적으로 주입되기 때문에, 두 약물(카르비도파 및 레보도파)의 혈중 농도가 일정하게 유지된다.

[0083] 레보도파와 달리, 도파민 작용제는 도파민으로 변하지 않고, 오히려 환자의 뇌에서 도파민 효과를 모방한다. 도파민 작용제는 PD 증상을 치료하는 것에 있어서 레보도파보다 덜 유효하지만; 약효가 더 오래 지속되며, 레보도파의 OFF-ON 효과를 지원하기 위해 레보도파와 함께 사용될 수 있다. 대표적인 도파민 작용제는 프라미펙솔(예컨대, 미라펙스(Mirapex)® 프라미펙솔), 로피니롤(예컨대, 리큅(Requip)® 로피니롤), 로티고틴(예컨대, 뉴프로(Neupro)® 로티고틴 경피 시스템, 패치제로 제공됨), 아포모르핀(예컨대, 아포킨(Apokyn)® 아포모르핀)을 포함하며, 이는 단기-작용 주입 가능한 도파민 작용제이다.

[0084] MAO B 억제제는 뇌 도파민을 대사하는, 뇌 효소 모노아민 옥시다제 B(MAO B)를 억제함으로써 뇌 도파민의 분해를 방지하는 데 도움이 된다. 예시적인 MAO B 억제제는 셀레길린(예컨대, 젤라파(Zelapar)® 셀레길린(selegiline) 하이드로클로라이드), 라사길린(rasagiline)(예컨대, 아질렉트(Azilect)® 라사길린), 및 사피나미드(safinamide)(예컨대, 자다고(Xadago)® 사피나미드)를 포함한다. 셀레길린을 레보도파와 함께 투여하면 약효가 소실되는 것을 방지하는 데 도움이 되는 것으로 나타났다.

[0085] 카테콜 O-메틸트랜스퍼라제(COMT) 억제제는 도파민을 분해하는 효소를 차단함으로써 레보도파 치료의 효과를 경

미하게 연장시킨다. 예시적인 COMT 억제제는 엔타카폰(예컨대, 콤탄(Comtan)® 엔타카폰), 오피카폰(opicapone)(예컨대, 온젠티스(Ongentys)® 오피카폰), 및 톨카폰(tolcapone)(예컨대, 타스마(Tasmar)® 톨카폰)을 포함한다. 톨카폰은 심각한 간 손상 및 간 기능부전 위험으로 인해 거의 처방되지 않는다.

[0086] 항콜린제는 이전에 투여되어 PD와 연관된 떨림을 조절하는 데 도움이 되었다. 예시적인 항콜린제는 항정신병약물(클로자핀(clozapine), 퀘티아핀(quetiapine)); 아트로핀(Atropine); 벤즈트로핀(Benztropine)(예컨대, 코젠틴(Cogentin)® 벤즈트로핀 메실레이트(benztropine mesylate)); 비페리덴(Biperiden); 클로르페니라민(Chlorpheniramine); 특정 SSRI(파록세틴(Paroxetine)); 디사이클로민(Dicyclomine)(디사이클로베린(Dicycloverine)); 디멘히드리네이트(Dimenhydrinate); 디펜히드라민(Diphenhydramine); 독세피(Doxepi); 독실아민(Doxylamine); 플라복세이트(Flavoxate); 글리코피롤레이트(Glycopyrrolate); 글리코피로니움(Glycopyrronium); 효시아민(Hyoscyamine); 이프라트로피움(Ipratropium); 오르페나드린(Orphenadrine); 옥시트로피움(Oxitropium); 옥시부티닌(Oxybutynin); 프로메타진(Promethazine); 프로판테린 브로마이드(Propantheline bromide); 스코폴라민(Scopolamine); 솔리페나신(Solifenacin); 톨테로딘(Tolterodine); 티오트로피움(Tiotropium); 트리사이클릭 항우울제; 트리헥시페니딜(Trihexyphenidyl); 트로피카미드(Tropicamide); 및 우메클리디늄(Umeclidinium)을 포함한다.

[0087] 아만타딘(예컨대, 고코브리(Gocovri)® 아만타딘)은 경도, 초기 단계 파킨슨병의 증상을 단기간 완화를 제공하기 위해 단일-요법으로 처방되는 항-운동이상증 약물이다. 이는 카르비도파-레보도파에 의해 유발되는 불수의 움직임(운동 이상증)을 조절하기 위해 PD 후기 단계에서 카르비도파-레보도파 치료법과 함께 추가로 처방된다.

[0088] PD를 갖는 환자는 질환-관련 증상을 감소시키기 위해 뇌심부자극술(deep brain stimulation, DBS)을 이식하는 수술을 추가로 받을 수 있다. DBS는,환자 뇌의 특정 부위에 전극을 이식하는 것을 수반하고; 전극은 쇄골 근처 환자의 흉부에 이식된 발전기에 연결되고 발전기는 환자의 뇌에 전기 펄스를 전송한다. DBS는 레보도파에 대한 불규칙하고 변동하는 반응을 조절하거나, 또는 약물 조절로 개선되지 않는 운동이상증을 조절하는 데 유효하다. DBS는 예컨대, 레보도파와 같이 약물에 불안정한 반응을 보이는 후기 단계 환자에게 보다 일반적으로 사용된다.

[0089] *치료 방법*

[0090] 핵산 및/또는 이식유전자(예컨대, GDNF를 암호화하는 핵산)를 대상체에게 전달하기 위한 방법이 본 개시내용에 의해 제공된다. 방법은 GDNF를 암호화하는 핵산의 유효량을 대상체에 투여하는 것을 전형적으로 수반한다. 일부 실시형태에서, 투여는 전신 투여이다. 일부 실시형태에서, 투여는 국소 투여이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 바이러스 벡터 및/또는 바이러스 입자, 예컨대, rAAV로 제공된다.

[0091] 본원에 제공된 일 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자로 형질전환되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 증가를 나타내지 않는다.

[0092] 본원에 제공된 일 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 여기서 rAAV를 도입하면 대상체의 피각의 적어도 30%가 rAAV로 커버되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 증가를 나타내지 않는다.

[0093] 피각은 양측 대칭의, 직사각형, 난형 피질 하엽을 포함하며, 이는 전방-후방(A-P) 축을 중심으로 길이방향으로 연장된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 그리고 문맥을 통해 결정될 수 있는 바와 같이, 용어 "피각"은 단일 피각(즉, 좌측 피각 또는 우측 피각) 중 어느 하나 또는 두 피각을 통칭하여 지칭할 수 있다. 피각은 각각의 뇌 반구의 전뇌(종뇌)의 뇌실곁핵의 심부 백질 내에 위치하고, 복수의 신경 세포(뉴런) 체를 포함한다. 피각은 인접한 꼬리핵과 함께 선조체를 형성한다. 선조체는 또한 각각의 뇌 반구의 기저핵을 형성하는 많은 구성 요소 중 하나이다. 피각은 다양한 경로를 통해, 대뇌 피질의 많은 영역 외에도, 흑질(substantia nigra)(치밀부(pars compacta) 및 망상부(pars reticulata)를 포함함), 담창구(globus pallidus), 전장(claustrum) 및 시상(thalamus)에 연결된다. 피각의 주요 기능은 신체 움직임의 준비와 실행을 조절하는 것이며, 다양한 유형의 학습에서 중요한 역할을 한다. 피각은 또한 PD와 같은 퇴행성 신경성 장애의 발병에도 중요한 역할을 한다. 피각으로부터 흑질로 GDNF 단백질 및/또는 AAV2 벡터의 역행성 축삭 수송이 가능하지만; PD 상태에서는 GDNF 단백

질 및/또는 AAV2 벡터의 망상부로의 전축삭 수송의 가능성이 더 높다. 축삭 수송의 방향은 GDNF 이식유전자를 전달하는 데 사용되는 벡터에 의해 결정될 수 있다.

[0094] 본원에 제공된 일 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자로 형질전환되고 및/또는 여기서 대상체의 피각 부피의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버된다.

[0095] 일 실시형태에서, rAAV는 국소 도입을 통해 도입된다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 합리적 반수체이고, 예컨대, 캡시드는 AAV8, AAV9이고, 레수스 AAV 균주로부터의 적어도 하나의 캡시드 단백질을 함유한다.

[0096] 다양한 실시형태에서, 국소 도입은 대상체의 피각에의 직접 도입이다. 예를 들어, 국소 도입은 대상체의 피각 중 하나 또는 둘 모두에 rAAV를 직접 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[0097] 다양한 실시형태에서, 국소 도입은 비-침습적 영상화와 동시에 수행된다. 예를 들어, 국소 도입은 수술 중 자기공명영상(iMRI) 유도 대류 증강 전달(CED)을 통해 각각의 피각에 총 rAAV 벡터 용량의 약 절반을 도입하는 것을 포함한다.

[0098] 일 실시형태에서, 국소 도입은 AAV 벡터와 동시에 또는 실질적으로 동시에 MRI 조영제를 도입하는 것을 더 포함한다. 예시적인 MRI 조영제는, 가도테레이트; 가도부트로(gadobutro); 가도테리돌; 가도펜테테이트(gadopentetate); 가도베네이트(gadobenate); 가도펜테산 디메글루민(gadopentetic acid dimeglumine); 가독센테이트(gadoxentate); 가도베르세타미드(gadoversetamide); 가도디아마이드(gadodiamide); 가도포스베셋(gadofosveset); 가도콜레산(gadocoletic acid); 가도멜리톨(gadomelitol) 및 가도머(gadomer)를 포함한다.

[0099] 일 실시형태에서, MRI 조영제는 rAAV와 동일한 조성물로 대상체에 도입된다. 일 실시형태에서, MRI 조영제는 rAAV와 상이한 조성물로 대상체에 도입되지만, 실질적으로 동시에 투여된다.

[0100] 일 실시형태에서, rAAV는 전신 도입을 통해 도입된다.

[0101] 본원에 제공된 또 다른 국면은 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각에 국소적으로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 핵산으로 형질전환된다. 일 실시형태에서, 피각을 형질전환하는 것은 피각 신경세포 집단을 형질전환하는 것이다. 일 실시형태에서, 대상체의 피각 신경세포 집단의 부피의 적어도 30%는 GDNF 핵산으로 형질전환된다.

[0102] 본원에 제공된 또 다른 국면은 대상체의 피각의 부피의 약 30% 이상을 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자로 형질전환하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체는 형질전환 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, 형질전환은 GDNF 유전자를 포함하는 rAAV를 대상체의 뇌 반구의 각각의 피각에 투여함으로써 수행된다. 일 실시형태에서, 피각을 형질전환하는 것은 피각 신경세포 집단을 형질전환하는 것이다. 일 실시형태에서, 대상체의 피각 신경세포 집단의 부피의 적어도 30%는 GDNF 핵산으로 형질전환된다.

[0103] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각에 투여하는 것을 포함하는, PD를 갖는 대상체에서 초기 운동 장애 학회-통합 PD 평가 척도 파트 III(MDS-UPDRS III) 점수를 감소시키거나 안정화하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS III 점수를 갖고, 이는 투여 전의 대상체의 초기 MDS-UPDRS III 점수와 비교하여 감소되거나 안정화된 것이다.

[0104] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하는, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 GDNF로 형질전환되거나 및/또는 대상체의 피각 부피의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버되고, 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS III 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS III 점수와 비교하여 안정화된 것이다.

[0105] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하는,

PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 이식유전자로 형질전환되거나 및/또는 대상체의 피각 부피의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버되고, 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS III 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS III 점수보다 적어도 약 20% 더 감소되는 것이다.

[0106] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 국소적으로 도입하는 것; 및 rAAV와 실질적으로 동시에 대상체의 피각 각각에 MRI 조영제를 국소적으로 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 핵산으로 형질전환되거나 및/또는 대상체의 피각 부피의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0107] 본원에 제공된 또 다른 국면은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법에 관한 것이고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자로 형질전환되거나 및/또는 대상체의 피각 부피의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버되고, 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0108] 다양한 실시형태에서, 대상체의 피각 부피의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 그 이상은 GDNF 유전자로 형질전환된다. 일 실시형태에서, 대상체의 피각의 형질전환은 비-침습적 영상을 통해, 예를 들어, MRI를 통해 평가된다. 통상의 기술자는 rAAV를 포함하지 않는 총 부피와 비교하여, rAAV를 포함하는 피각의 총 부피(예컨대, 주입된 MRI 조영제에 의해 평가됨)를 측정함으로써 rAAV의 형질도입을 평가할 수 있다.

[0109] 일 실시형태에서, 피각을 형질전환시키는 것은 피각의 내재적 중간 가시 신경세포(medium spiny neuron, MSN)를 형질전환시키는 것이다. 일 실시형태에서, MSN의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 31%, 적어도 32%, 적어도 33%, 적어도 34%, 적어도 35%, 적어도 36%, 적어도 37%, 적어도 38%, 적어도 39%, 적어도 40%, 적어도 41%, 적어도 42%, 적어도 43%, 적어도 44%, 적어도 45%, 적어도 46%, 적어도 47%, 적어도 48%, 적어도 49%, 적어도 50%, 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 그 이상은 핵산, 예컨대, GDNF로 형질전환된다.

[0110] 일 실시형태에서, 피각을 형질전환하는 것은 피각 신경세포 집단을 형질전환하는 것이다. 일 실시형태에서, 대상체의 피각 신경세포 집단의 부피의 적어도 30%는 GDNF 핵산으로 형질전환된다. 다양한 실시형태에서, GDNF 핵산으로 형질전환되는 대상체의 피각 신경세포 집단의 커버리지는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 31%, 적어도 32%, 적어도 33%, 적어도 34%, 적어도 35%, 적어도 36%, 적어도 37%, 적어도 38%, 적어도 39%, 적어도 40%, 적어도 41%, 적어도 42%, 적어도 43%, 적어도 44%, 적어도 45%, 적어도 46%, 적어도 47%, 적어도 48%, 적어도 49%, 적어도 50%, 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 그 이상이다.

[0111] 다양한 실시형태에서, rAAV로 커버되는 대상체의 피각의 부피의 커버리지는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 31%, 적어도 32%, 적어도 33%, 적어도 34%, 적어도 35%, 적어도 36%, 적어도 37%, 적어도 38%, 적어도 39%, 적어도 40%, 적어도 41%, 적어도 42%, 적어도 43%, 적어도 44%, 적어도 45%, 적어도 46%, 적어도 47%, 적어도 48%, 적어도 49%, 적어도 50%, 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적

어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 그 이상이다. 일부 실시형태에서, 대상체의 피각의 커버리지는 비-침습적 영상화를 통해, 예를 들어, MRI를 통해 평가된다. 통상의 기술자는 피각의 총 부피와 비교하여, rAAV를 포함하는 피각의 총 부피(예컨대, 주입된 MRI 조영제에 의해 평가됨)를 측정함으로써 rAAV의 커버리지를 평가할 수 있다.

[0112] 일 실시형태에서, MRI 조영제는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것과 공동 투여 또는 공동 도입되어, CED 분포의 향상된 실시간 수술 중 MRI 모니터링을 제공하고 형질도입의 부피를 평가한다.

[0113] *비-침습적 영상화*

[0114] 일 실시형태에서, 국소 투여는 비-침습적 영상화와 동시에 수행되며, 예컨대, 바람직하거나 미리 결정된 위치 또는, 예를 들어, 피각으로 국소 전달을 유도하거나, 및/또는 투여 후 전달을 시각화하기 위해 수행된다. 일 실시형태에서, 비-침습적 영상화는 수술 중 자기공명영상(iMRI) 유도 대류 증강 전달(CED)이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "수술 중 자기공명영상(iMRI)"은 예를 들어, 신경외과 수술 중에 획득한 뇌의 MRI 영상을 지칭한다. iMRI 기술은 종양의 제거 또는 원하는 위치(예컨대, 피각)에의 치료제의 배치와 같이, 신경외과 수술 중 유도를 위해 뇌의 정확한 실시간 사진을 생성하는 데 활용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "대류 증강 전달(CED)"은 양수압을 사용하여 치료 물질을 함유하는 유체를 뇌 실질의 국소 영역 내 간질 공간으로 직접 대량 흐름으로 전달하는 약물-전달 기법을 지칭한다. 직접 대뇌내 CED는 혈뇌장벽을 우회하여, 볼루스 침착(국소 주입) 또는 다른 확산-기반 직접 전달 접근법보다 더 넓고 균질한 분포를 제공한다. CED는 예컨대, 문헌 [Rogawski MA, Neurotherapeutics. 2009 Apr; 6(2): 344-351] 및 문헌 [Mehta AM, et al. Neurotherapeutics. 2017 Apr;14(2):358-371.]에 더 설명되고 있고, 그 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0115] 실시형태에서, iMRI는 본원에서 설명되는 rAAV 또는 이의 조성물의 투여를 모니터링하기 위해 T1-가중치 시퀀스를 사용하여 rAAV 또는 이의 조성물과 함께 공동-주입되는 MRI 조영제, 예컨대, 가돌리늄-기반 조영제를 시각화하는 데 사용될 수 있다.

[0116] 일 실시형태에서, 국소 도입은 AAV 벡터와 실질적으로 동시에 MRI 조영제를 도입하는 것을 더 포함한다. 이 경우, MRI 조영제는 MRI 영상에서 촬영된 내부 뇌 구조의 가시성을 개선하는 데 활용된다. 가돌리늄 기반의 MRI 조영제(GBCA)로 해당 기술 분야에 알려져 있는, 가돌리늄(III)을 포함하는 상자성(paramagnetic) 조영제가 바람직하고, 그 전체가 본원에 참조로 통합되는 문헌 ["Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents Structure, Dynamics, and Applications" by P. Caravan et al. Chem. Rev. 99, 2293-2352 (1999)]을 참조한다. 사용될 수 있는 다른 조영제는, 가독세테이트 디나트륨(예컨대, 에오비스트(Eovist)™ 가독세테이트 디나트륨; 쉐링 AG); U.S. 특허 제5,798,092호 및 제5,695,739호에 개시된 조영제; 가도베네이트 디메글루민(예컨대, 멀티핸스(MultiHance)™ 가도베네이트 디메글루민, Bracco SpA); 및 미국 특허 제5,733,528호에 개시된 조영제를 포함한다. 특히 "혈액 풀" MRI 조영제가 바람직하며, 본원에 참조로 통합되는 문헌 ["Blood pool Contrast Agents for Cardiovascular MR Imaging" by L. J. M. Kroft et al. JMRI 10, 395-403 (1999)], 및 본원에 참조로 또한 통합되는 문헌 ["The Future of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Angiography: Are Blood Pool Agents Needed?" by A. Muhler Invest. Radiol. 33, 709-714(1998)]을 참조한다. 혈액 풀 조영제의 예는 MP-2269(Mallinckrodt, Inc.); 미국 특허 제5,888,576호에 개시된 조영제; MS-325(EPIX Medical, Inc.); PCT 공보 WO 96/23526에 개시된 조영제; P760(게르베); 가돌리늄-디에틸 트리아민 펜타아세트산(GD-DTPA; 예컨대, 가도머-17™, 쉐링 AG); U.S. 특허 제5,876,698호, 제5,820,849호, 제5,681,543호, 제5,650,136호, 및 제5,364,614호에 개시된 조영제; 가도테레이트 메글루민(예컨대, 클라리스캔™ 가도테레이트 메글루민, 나이코메트 아머샴(Nycomed Amersham)); PCT 공보 WO 96/09840 및 WO 9725073에 개시된 조영제; B22956/1(Bracco SpA); 및 PCT 공보 WO 00/30688, WO 98/05625, WO 98/05626, WO 95/32741, WO 98/38738, WO 95/32741, 및 미국 특허 제5,649,537호에 개시된 조영제를 포함한다. 그러한 혈액 풀 제제의 다른 예는, 페루카보트란(예컨대, 레소비스트™ 페루카보트란) 또는 SHU 555 A 및 C(쉐링)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 위에서 언급된 모든 특허 및 특허 출원의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 명시적으로 통합된다.

[0117] 예시적인 MRI 조영제는, 가도테레이트; 가도부트로; 가도테리돌; 가도펜테테이트; 가도베네이트; 가도펜테산 디메글루민; 가독센테이트; 가도베르세타미드; 가도디아마이드; 가도포스베셋; 가도콜레산; 가도멜리톨 및 가도머를 포함한다.

[0118] 일 실시형태에서, MRI 조영제는 가도테리돌(예컨대, ProHance® 가도테리돌)이다. 일 실시형태에서, 가도테리돌(예컨대, ProHance® 가도테리돌)은 2mM 용액으로 투여된다.

[0119] MRI 조영제는 검사 대상체에 따라 혈류에 주입(정맥내)으로, 또는 경구로 투여될 수 있다. 경구 투여는 위장관 스캔에 적합한 반면, 혈관내 투여는 대부분의 다른 스캔에 더 유용하다. 일 실시형태에서, MRI 조영제는 rAAV와 동일한 조성물로 투여된다. 일 실시형태에서, MRI 조영제는 rAAV와 별개의 조성물로 투여되지만, 별개의 rAAV 조성물과 동시에 투여된다. 별개의 조성물로 투여되는 경우, MRI 조영제는 rAAV와 동일한 방식으로 투여될 필요가 없다. 예를 들어, rAAV가 예컨대, 피각에 국소적으로 투여되는 경우, MRI 조영제는 정맥내 또는 경구 투여될 수 있다.

[0120] MRI 뇌 스캔은 스캔 과정의 일부로서 수술 전, 뿐만 아니라 유전자 치료 주입 시술 동안, 투여 후 6개월 및 18개월에 작동 가능하게 수행될 수 있다. 조사자가 필요하다고 판단하는 경우, 다른 시점에 스캔이 수행될 수 있다. MRI 뇌 스캔은 예를 들어, 1.5T 또는 3T 스캐너로 수행될 수 있으며, 시퀀스는 T1, T2, 터보 FLAIR, T2 그래디언트 에코 및 확산을 포함할 수 있다. 18개월 스크리닝 시 선택적 영상화는 또한 확장 확산 가중 시퀀스, 휴식 상태, 및 참가자가 간단한 작업(예컨대, 손가락 두드리기 또는 손 잡기)을 수행하는 동안 영상 획득을 통한 기능 평가를 포함할 수 있다. 총 영상화 시간은 세션 당 90분이며, 기능 및 휴식 상태 영상화를 포함한다.

[0121] 본원에서 설명되는 방법에 활용될 수 있는 예시적인 비-침습적 영상화 기법은 초음파, 컴퓨터 단층촬영(CT); 기능성 자기공명영상(fMRI); iMRI; 양전자 방출 단층촬영(PET); 뇌파 검사(EEG); 자기 뇌파 검사(MEG); 기능성 근적외선 분광법(fNIRS); DaTscan 도파민 수송체 영상화; FDG 영상화 및 이들의 조합을 포함한다.

[0122] 이오플루판(Ioflupane) I-123(예컨대, DaTscan™ 이오플루판 I23)은 시냅스 전 도파민 수송체에 선택적으로 결합하여 선조체의 흑질선조체 말단을 영상화하기 위한 방법을 제공한다. DaTscan™ 이오플루판 I23은 성인용 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT) 스캔과 함께 사용되는 FDA-승인 방사성의약품이다. 요오드-123은 사이클로트론으로 생성되는 방사성 핵종으로, 전자 포획에 의해 ^{123}Te로 붕괴되며 물리적 반감기는 13.2시간이다. 권장 용량은 성인의 경우 정맥내로 투여되는 111 내지 185MBq(3 내지 5mCi)이다. 성인의 경우, 185MBq(5mCi)의 활성도로 투여되는 DaTscan 투여로 인한 유효 용량은 3.94mSv이다. DaTscan 주입은 최대 6%의 유리 요오드화물(요오드 123)을 함유할 수 있다. 요오드-123의 갑상선 축적을 감소시키기 위해, 최대 100mg의 요오드화칼륨 경구 용액 또는 루골액(Lugol's Solution)이 투여될 것이다.

[0123] 플루오로-2-데옥시글루코스(FDG)는 뇌 및 기타 기관의 글루코스 대사를 측정하기 위해 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화와 함께 사용되는 보편적인 FDA-승인 방사성의약품 추적자이다. 다른 파킨슨병 유사 질환에는 나타나지 않는 파킨슨병 특이적 뇌 대사 패턴이 특징적으로 나타났다. FDG PET는 스크리닝 동안 PD 진단을 확인하는 데 활용될 것이다. FDG는 110분의 반감기로 표지된 F^{18}이다. 권장 용량은 성인의 경우 정맥내로 투여되는 111 내지 185MBq(3 내지 5mCi)이다. 성인의 경우, 185MBq(5mCi)의 활성도로 투여되는 FDG 스캔으로 인한 유효 용량은 3.51mSv이다.

[0124] 일 실시형태에서, 피각의 커버리지 또는 형질도입은 비-침습적 영상화를 통해, 예를 들어, 수술 중 MRI를 통해 평가된다. GDNF로 형질전환되는 피각의 부피는 피각의 총 부피와 비교하여 피각 내에서 CED-주입된 MRI 조영제를 나타내는 피각의 퍼센트를 측정함으로써 간접적으로 결정된다. 일 실시형태에서, 형질전환된 피각의 부피는 F-DOPA PET 영상화를 통해 평가되며, 이는 수술 중 CED-주입된 MRI 조영제 국소화와 상관된다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, "커버리지"는 피각의 총 부피를 기준으로 주입된 rAAV가 차지하는 피각의 부피를 지칭한다. 커버리지는 피각 세포가 rAAV에 노출된다는 것을 규정한다. 투여 후 전달되는 치료제에 의한 커버리지를 결정하기 위한 많은 방법이 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 피각의 커버리지는 예를 들어, 시각화될 수 있는 MRI 조영제와의 공동-주입을 통해, 비-침습적 영상화를 통해 평가될 수 있다. 예를 들어, 동시-주입된 MRI 제제를 표시하는 피각의 면적 또는 부피를 측정하고, 이것을 제제를 표시하지 않는 피각의 면적 또는 부피와 비교함으로써, 도입/투여 후 피각의 커버리지를 결정할 수 있다. 유사하게, 커버리지는 F-DOPA PET 영상화를 통해 평가된다. 또한, 일 실시형태에서, rAAV는 현미경 관찰과 같은 표준 조직학적 방법을 사용하여 사후에 시각화될 수 있는 형광 태그와 같은 리포터 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0126] 본원에서 사용되는 바와 같이, "형질도입" 또는 "형질전환된"은, 투여된 rAAV 또는 이의 조성물을 포함하는 피각 내의 세포를 지칭한다. 일 실시형태에서, 형질전환된 세포는 rAAV의 게놈을 포함하고, GDNF 이식유전자를

발현할 수 있는 잠재력을 가진다. 일 실시형태에서, 형질전환된 세포는 rAAV의 게놈을 포함하며, GDNF 이식유전자를 발현하는 능력을 포함할 필요가 없다. 일 실시형태에서, 형질전환된 세포는 GDNF 이식유전자를 일시적으로 발현한다. 일 실시형태에서, 형질전환된 세포는 GDNF 이식유전자를 안정되게 발현한다.

[0127] 투여 후 형질도입을 결정하는 많은 방법이 있고; 이들은 전형적으로 2차적이고, 추론적인(또는 간접적인) 기법이다. 예를 들어, 형질도입은 시각화될 수 있는 MRI 조영제와의 공동-주입을 통해 평가될 수 있다. 피각의 형질전환된 세포의 퍼센티지는, 예컨대, 피각의 총 부피와 비교하여, rAAV 또는 조성물을 포함하는 피각 내의 세포의 퍼센트를 측정함으로써 결정될 수 있다. 형질도입은 예를 들어, 시각화될 수 있는 MRI 조영제와의 공동-주입을 통해, 비-침습적 영상화를 통해 평가될 수 있다. 일 실시형태에서, rAAV는 현미경 관찰과 같은 표준 방법을 사용하여 시각화될 수 있는 형광 태그와 같은 리포터 유전자를 더 포함할 수 있으며; 그러한 리포터 유전자는 형질도입의 퍼센트를 결정하는 데 활용될 수 있다. rAAV를 표적화하도록 설계된 프로브(예컨대, 캡시드 단백질)는 세포가 rAAV로 형질전환되었는지 여부를 평가하는 데 사용될 수 있다. 또한, GDNF 핵 작용을 표적화하도록 설계된 프로브가 사용되어 세포가 GDNF 이식유전자를 발현하는지 여부를 평가할 수 있다. 일 실시형태에서, 형질전환된 피각의 부피는 F-DOPA PET 영상화를 통해 평가된다. 또한, 일 실시형태에서, rAAV는 현미경 관찰과 같은 표준 방법을 사용하여 시각화될 수 있는 형광 태그와 같은 리포터 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0128] ***파킨슨병 및 질병 진행에 대한 진단 분석***

[0129] PD의 진행 및 중증도는 PD를 갖고 있거나 갖고 있다고 생각되는 대상체의 다양한 증상과 정신 상태를 평가하는 다양한 임상 설문조사를 사용하여 종종 측정된다. 이러한 임상 설문조사는 대상체, 대상체의 보호자 및/또는 숙련된 주치의에 의해 작성될 수 있다. 이러한 설문조사는 종종 임상의와 연구자가 치료 과정이나 임상 연구 동안 PD의 종단적 경과를 평가하는 데 사용된다. 이러한 설문조사의 결과는 임상의나 연구자가 대상체를 치료하기 위한 최선의 조치를 결정하는 데, 즉 치료제의 유형, 치료제의 용량, 또는 치료제의 투여 빈도를 변경하는 데 도움이 될 수 있다.

[0130] 일 실시형태에서, 본원에서 설명되는 방법은 본원에서 설명되는 rAAV를 도입하기 전에 대상체에 대해 본원에서 설명되는 적어도 하나의 진단 분석의 초기 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다. 일 실시형태에서, 진단 분석은 운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도(MDS-UPDRS), 비-운동 증상 척도(NMSS), 파킨슨병 설문지(PDQ-39) 점수; MDS-UPDRS 부분 III; 수정된 호엔-야르(Hoehn and Yahr); 기립-보행-앉기; 9홀 페그보드 민첩성 검사(9-Hole Pegboard Dexterity Test); 및 기립 균형 검사; 전반적 인상 평가(CGI & PGI); 간이 후각 식별 검사(Brief Smell Identification Test, BSIT); 파킨슨병 수면 척도(PDSS-2); 파킨슨병-자율신경계 질환의 결과 척도(Scales for Outcomes in Parkinson's Disease-Autonomic, SCOPA-AUT); 몬트리올 인지 평가(Montreal Cognitive Assessment, MoCA)를 통한 전반적 인지 평가; 30개 항목의 보스턴 네이밍 검사(Boston Naming Test, BNT); 언어 유창성 검사; 캠브리지 신경심리학 검사 자동화 배터리(Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery, CANTAB); 벡 우울증 인벤토리-II(BDI-II); 벡 불안증 인벤토리(BAI); 및 파킨슨병의 충동-강박 장애에 대한 설문지(QUIP-RS), 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0131] 일 실시형태에서, 본원에서 설명되는 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대해 본원에서 설명되는 적어도 하나의 진단 분석의 초기 점수를 수신하는 단계를 더 포함한다.

[0132] *운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도(MDS-UPDRS)*

[0133] UPDRS(통합 파킨슨병 평가 척도)는 PD의 단기(1년 미만) 및 장기(1년 이상) 진행을 평가하는 평가 척도이다. UPDRS는 임상의가 환자의 증상 진행을 객관적인 방식으로 추적할 수 있도록 임상 환경에서 활용되는 통일되고 인정된 분석이다. 이 검사는 총 6개의 파트로 구성되어 있으며, 자가 수행 및 임상의/연구자 시행 둘 모두에 의해 이루어진다. 6개의 파트는 다음을 포함한다 - 파트 I: 지적 장애, 사고 장애, 동기 부여/창의성, 우울증을 포함한, 정신, 행동, 및 기분 평가; 파트 II: 일상생활동작(ADL) 말하기, 침 삼키기, 삼키기, 글씨 쓰기, 음식 자르기, 옷 입기, 위생, 침대에서 뒤집기, 넘어지기, 굳어버림, 보행, 떨림, 감각 불만에 대한 자가 평가; 파트 III: 임상의가 점수를 매긴 모니터링 운동 평가로서, 말하기, 표정, 안정 시 떨림, 동작 떨림, 경직, 손가락 두드리기, 손 움직임, 손 내전(pronation) 및 외전(supination), 다리 민첩성, 의자에서 일어나기, 자세, 걸음걸이, 자세 안정성, 신체 운동완만증을 포함함; 파트 IV: 치료의 합병증으로서, 운동이상증 지속 시간, 운동이상증 장애, 운동이상증 통증, 이른 아침 근긴장 이상증, 예측 가능한 OFF, 예측 불가능한 OFF, 갑작스러운 OFF, OFF-지속 시간, 식욕 부진-구역-구토, 수면 장애, 증상성 기립 부전을 포함함; 파트 V: 호엔-야르의 PD 중증도 병기 결정; 및 파트 VI: 슈왑 및 영국 ADL 척도(Schwab and England ADL scale).

[0134] 운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도(MDS-UPDRS)는 PD의 단기(1년 미만) 및 장기(1년 이상) 진행을 평가하는 평가 척도(즉, 0 내지 272)이다. 역사적으로, 연구자들은 통합되고 인정된 평가 시스템에서 소정의 치료의 치료적 이점을 측정하기 위해 UPDRS를 사용했다. MDS-UPDRS는 각각의 하위 범주에서 비운동 기능의 측면을 제거한 UPDRS의 업데이트된 버전이다. MDS-UPDRS 파트 I은 "일상 생활의 비운동적 경험"이라는 명칭으로, 파트 IA(환자 및 간병인의 모든 관련 정보를 사용하여 조사자에 의해 평가되는 다수의 행동에 관한 것) 및 파트 IB(조사자와는 독립적으로, 간병인의 도움 유무에 관계 없이 환자에 의해 작성됨)를 포함한다. MDS-UPDRS 파트 II는 기존 UPDRS의 제2 파트와 동일하지만, 파트 I의 새로운 명칭과 구분하기 위해, "일상 생활의 운동 경험"으로 명칭이 변경되었다. MDS-UPDRS 파트 III의 명칭은 "운동 검사"이다. MDS-UPDRS 파트 IV는 UPDRS에 비해 "운동 합병증"만 포함하도록 압축되었다. 총 MDS-UPDRS 점수는 파트 I, II, III(오프 상태), 및 IV의 합으로, 이는 기능적 및 평가자-도출 하위 점수 둘 모두를 제공하므로 질환 중증도 및 진행의 점수를 제공한다. 통상의 기술자는 MDS-UPDRS 설문조사를 적절히 시행하고, 대상체에게 MDS-UPDRS 설문조사의 일부를 자가 수행하도록 안내하여, 예컨대, 초기 MDS-UPDRS 점수(예컨대, 본원에서 설명되는 rAAV 투여 전), 및 제2 MDS-UPDRS 점수(즉, rAAV 투여 후의 MDS-UPDRS 점수, 예컨대, 본원에서 설명되는 rAAV 투여 직후 적어도 6개월 또는 적어도 12개월 후)를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 임상의가 필요하다고 판단하는 경우, 추가적인 MDS-UPDRS 점수(예컨대, 제3, 제4, 제5 점수 등)가 결정될 수 있다는 것이 이해된다. 또한, 초기 및 제2 MDS-UPDRS 점수는 MDS-UPDRS 설문조사의 임의의 개별 부분(예컨대, 파트 I, 파트 II, 파트 III, 파트 IV) 또는 총 MDS-UPDRS 점수일 수 있다는 것이 더 이해된다.

[0135] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다. 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 수신하는 단계, 즉, rAAV의 투여를 수행하지 않는 숙련된 의료인에 의해 이전에 측정된 초기 MDS-UPDRS 점수를 수신하는 단계를 더 포함한다.

[0136] 일 실시형태에서, 대상체는 PD에 의해 경도로 영향을 받는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "경도로 영향을 받는"은 32 미만의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는 대상체를 지칭한다.

[0137] 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 미만의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, rAAV의 도입 전 5년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었다.

[0138] 일 실시형태에서, MDS-UPDRS는 MDS-UPDRS III 점수를 지칭한다.

[0139] 일 실시형태에서, 대상체는 PD에 의해 중등도로 영향을 받는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "중등도로 영향을 받는"은 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는 대상체를 지칭한다.

[0140] 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수(예컨대, MDS-UPDRS III 점수)를 갖고, rAAV의 도입 전 4년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었다.

[0141] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 rAAV의 투여/도입 직후 적어도 6개월 또는 적어도 12개월 후에 제2 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다.

[0142] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체(즉, 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는 대상체)에게 rAAV의 투여/도입 직후 적어도 6개월 후에 제2 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다.

[0143] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체(즉, 32 미만의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는 대상체)에게 rAAV의 투여/도입 직후 적어도 12개월 후에 제2 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다.

[0144] 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 12개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 증가를 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 6개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 증가를 나타내지 않는다.

[0145] 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후

적어도 12개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적인 증가"는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하인 증가를 지칭한다. 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 6개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0146] 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 안정화를 나타낸다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "안정화"는 10% 초과만큼 증가하거나 감소하지 않는 초기 MDS-UPDRS 점수를 지칭하고, 즉, 제2 MDS-UPDRS 점수는 초기 MDS-UPDRS 점수의 +/-10% 이하이다. 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 안정화를 나타낸다.

[0147] 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 12개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 6개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소는 적어도 1점, 2점; 3점; 4점; 5점; 6점; 7점; 8점; 9점; 10점; 11점; 12점; 13점; 14점; 15점; 16점; 17점; 18점; 19점; 20점; 21점; 22점; 23점; 24점; 25점; 26점; 27점; 28점; 29점; 30점; 또는 31점만큼; 또는 적어도 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 또는 그 이상만큼이다.

[0148] 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소는 적어도 20%만큼이다. 일 실시형태에서, 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소는 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상만큼, 또는 적어도 1점; 2점; 3점; 4점; 5점; 6점; 7점; 8점; 9점; 10점; 11점; 12점; 13점; 14점; 15점; 16점; 17점; 18점; 19점; 20점; 21점; 22점; 23점; 24점; 25점; 26점; 27점; 28점; 29점; 30점; 31점; 32점; 33점; 34점; 35점; 36점; 37점; 38점; 39점; 40점; 41점; 42점; 43점; 44점; 45점; 46점; 47점; 48점; 49점; 50점; 51점; 52점; 53점; 54점; 55점; 56점; 57점; 58점; 59점; 60점; 61점; 62점; 63점; 64점; 65점; 66점; 67점; 68점; 69점; 70점; 71점; 72점; 73점; 74점; 75점; 76점; 77점; 78점; 79점; 80점; 81점; 82점; 83점; 84점; 85점; 86점; 87점; 88점; 89점; 90점; 91점; 92점; 93점; 94점; 95점; 96점; 97점; 98점; 99점; 100점; 101점; 102점; 103점; 104점; 105점; 106점; 107점; 108점; 109점; 110점; 111점; 112점; 113점; 114점; 115점; 116점; 117점; 118점; 119점; 120점; 121점; 122점; 123점; 124점; 125점; 126점; 127점; 128점; 129점; 130점; 131점; 132점; 133점; 134점; 135점; 136점; 137점; 138점; 139점; 140점; 141점; 142점; 143점; 144점; 145점; 146점; 147점; 148점; 149점; 150점; 151점; 152점; 153점; 154점; 155점; 156점; 157점; 158점; 159점; 160점; 161점; 162점; 163점; 164점; 165점; 166점; 167점; 168점 169점; 170점; 171점; 172점; 173점; 174점; 175점; 176점; 177점; 178점; 179점; 180점; 181점; 182점; 183점; 184점; 185점; 186점; 187점; 188점; 189점; 190점; 191점; 192점; 193점; 194점; 195점; 196점; 197점; 198점; 199점; 200점; 201점; 202점; 203점; 204점; 205점; 206점; 207점; 208점; 209점; 210점; 211점; 212점; 213점; 214점; 215점; 216점; 217점; 218점; 219점; 220점; 221점; 222점; 223점; 224점; 225점; 226점; 227점; 228점; 229점; 230점; 231점; 232점; 233점; 234점; 235점; 236점; 237점; 238점; 239점; 240점; 241점; 242점; 243점; 244점; 245점; 246점; 247점; 248점; 249점; 250점; 251점; 252점; 253점;

254점; 255점; 256점; 257점; 258점; 259점; 260점; 261점; 262점; 263점; 264점; 265점; 266점; 267점; 268점; 269점; 270점; 271점; 또는 272점만큼이다.

[0149] 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 증가를 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 증가를 나타내지 않는다.

[0150] 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적인 증가"는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하인 증가를 지칭한다. 일 실시형태에서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 MDS-UPDRS 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0151] *비-운동 증상 척도(Non-Motor Symptoms Scale, NMSS)*

[0152] 비-운동 증상 척도(NMSS)는 PD를 갖는 대상체의 광범위한 비-운동 증상을 평가하기 위한 30개 항목의 자가 수행 설문조사 척도이다. PD의 비-운동 증상은 일반적으로 신경정신과적 증상, 수면 장애, 자율 기능 장애, 위장 증상 및 감각 증상을 포함하며, 삶의 질을 크게 감소시킬 수 있다. NMSS는 심혈관, 수면/피로, 기분/인지, 지각 문제, 주의력/기억, 위장, 비뇨기, 성 기능, 기타 등 9가지 차원에서 비-운동 증상의 심각도 및 빈도를 측정한다. 이 척도는 PD의 모든 병기에 있는 환자들에게 사용될 수 있다. 각 항목의 점수는 심각도(0 내지 3) 및 빈도 점수(1 내지 4)의 조합에 기초하여, 심각하지만 상대적으로 빈도가 낮은 증상, 또는 덜 심각하지만 지속되는 증상을 파악할 수 있다. 총 NMSS 점수는 0 내지 360의 범위이다.

[0153] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대한 초기 NMSS 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다. 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대한 초기 NMSS 점수를 수신하는 단계, 즉, 임상의/연구에 의해 이전에 결정된, rAAV의 투여를 수행하지 않는 초기 NMSS 점수를 수신하는 단계를 더 포함한다.

[0154] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 rAAV의 투여/도입 직후 적어도 6개월 또는 적어도 12개월 후에 제2 NMSS 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다.

[0155] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, 초기 NMSS 점수의 감소는 적어도 20%만큼이다. 일 실시형태에서, 초기 NMSS 점수의 감소는 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상만큼, 또는 적어도 1점; 2점; 3점; 4점; 5점; 6점; 7점; 8점; 9점; 10점; 11점; 12점; 13점; 14점; 15점; 16점; 17점; 18점; 19점; 20점; 21점; 22점; 23점; 24점; 25점; 26점; 27점; 28점; 29점; 30점; 31점; 32점; 33점; 34점; 35점; 36점; 37점; 38점; 39점; 40점; 41점; 42점; 43점; 44점; 45점; 46점; 47점; 48점; 49점; 50점; 51점; 52점; 53점; 54점; 55점; 56점; 57점; 58점; 59점; 60점; 61점; 62점; 63점; 64점; 65점; 66점; 67점; 68점; 69점; 70점; 71점; 72점; 73점; 74점; 75점; 76점; 77점; 78점; 79점; 80점; 81점; 82점; 83점; 84점; 85점; 86점; 87점; 88점; 89점; 90점; 91점; 92점; 93점; 94점; 95점; 96점; 97점; 98점; 99점; 100점; 101점; 102점; 103점; 104점; 105점; 106점; 107점; 108점; 109점; 110점; 111점; 112점; 113점; 114점; 115점; 116점; 117점; 118점; 119점; 120점; 121점; 122점; 123점; 124점; 125점; 126점; 127점; 128점; 129점; 130점; 131점; 132점; 133점; 134점; 135점; 136점; 137점; 138점; 139점;

140점; 141점; 142점; 143점; 144점; 145점; 146점; 147점; 148점; 149점; 150점; 151점; 152점; 153점; 154점; 155점; 156점; 157점; 158점; 159점; 160점; 161점; 162점; 163점; 164점; 165점; 166점; 167점; 168점; 169점; 170점; 171점; 172점; 173점; 174점; 175점; 176점; 177점; 178점; 179점; 180점; 181점; 182점; 183점; 184점; 185점; 186점; 187점; 188점; 189점; 190점; 191점; 192점; 193점; 194점; 195점; 196점; 197점; 198점; 199점; 200점; 201점; 202점; 203점; 204점; 205점; 206점; 207점; 208점; 209점; 210점; 211점; 212점; 213점; 214점; 215점; 216점; 217점; 218점; 219점; 220점; 221점; 222점; 223점; 224점; 225점; 226점; 227점; 228점; 229점; 230점; 231점; 232점; 233점; 234점; 235점; 236점; 237점; 238점; 239점; 240점; 241점; 242점; 243점; 244점; 245점; 246점; 247점; 248점; 249점; 250점; 251점; 252점; 253점; 254점; 255점; 256점; 257점; 258점; 259점; 260점; 261점; 262점; 263점; 264점; 265점; 266점; 267점; 268점; 269점; 270점; 271점; 272점; 273점; 274점; 275점; 276점; 277점; 278점; 279점; 280점; 281점; 282점; 283점; 284점; 285점; 286점; 287점; 288점; 289점; 290점; 291점; 292점; 293점; 294점; 295점; 296점; 297점; 298점; 299점; 300점; 301점; 302점; 303점; 304점; 305점; 306점; 307점; 308점; 309점; 310점; 311점; 312점; 313점; 314점; 315점; 316점; 317점; 318점; 319점; 320점; 321점; 322점; 323점; 324점; 325점; 326점; 327점; 328점; 329점; 330점; 331점; 332점; 333점; 334점; 335점; 336점; 337점; 338점; 339점; 340점; 341점; 342점; 343점; 344점; 345점; 346점; 347점; 348점; 349점; 350점; 351점; 352점; 353점; 354점; 355점; 356점; 357점; 358점; 359점; 또는 360점만큼이다.

[0156] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 증가를 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 증가를 나타내지 않는다.

[0157] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적인 증가"는 초기 NMSS 점수의 10% 이하인 증가를 지칭한다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0158] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 안정화를 나타낸다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "안정화"는 10% 초과만큼 증가 또는 감소하지 않는 초기 NMSS 점수를 지칭한다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 NMSS 점수의 안정화를 나타낸다.

[0159] *파킨슨병 설문지(PDQ-39) 점수*

[0160] 파킨슨병 설문지(PDQ-39)는, 이동성, 일상 생활 활동(ADL), 정서적 건강 상태, 낙인, 사회적 지지, 인지 장애, 의사소통, 및 신체적 불편감 등 8가지 하위 척도를 갖는 39개 항목의 자가 수행 설문지이다. 설문지는 0점에서 100점까지 점수를 매기며, 점수가 낮을수록 건강 상태에 대한 인식이 좋다는 것을 나타내고, 점수가 높을수록 질환의 상태가 심각하다는 것을 나타낸다. PDQ-39는 PD를 갖는 개별의 삶의 질을 측정하기 위한 신뢰할 수 있는 도구로서 사용될 수 있다. 우울증, 인지 장애, 및 낙상 위험 등 삶의 질에 큰 영향을 미칠 수 있는 다른 임상적 특징보다는, 운동 결손과 주요 특징에 초점을 맞춘 치료 경향으로 인해 포괄적인 평가에 포함시키는 것이 특히 중요하다.

[0161] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대한 초기 PDQ-39 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다. 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입하기 전에 대상체에 대한 초기 PDQ-39 점수를 수신하는 단계, 즉, 임상의/연구에 의해 이전에 결정된, rAAV의 투여를 수행하지 않는 초기 PDQ-39 점수를 수신하는 단계를 더 포함한다.

[0162] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 rAAV의 투여/도입 직후 적어도 6개월 또는 적어도 12개월 후에 제2 PDQ-39 점수를 결정하는 단계를 더 포함한다.

[0163] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수가 감소한다. 일 실시형태에서, 초기 PDQ-39 점수의 감소는 적어도 20%만큼이다. 일 실시형태에서, 초기 PDQ-39 점수의 감소는 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상만큼, 또는 적어도 1점; 2점; 3점; 4점; 5점; 6점; 7점; 8점; 9점; 10점; 11점; 12점; 13점; 14점; 15점; 16점; 17점; 18점; 19점; 20점; 21점; 22점; 23점; 24점; 25점; 26점; 27점; 28점; 29점; 30점; 31점; 32점; 33점; 34점; 35점; 36점; 37점; 38점; 39점; 40점; 41점; 42점; 43점; 44점; 45점; 46점; 47점; 48점; 49점; 50점; 51점; 52점; 53점; 54점; 55점; 56점; 57점; 58점; 59점; 60점; 61점; 62점; 63점; 64점; 65점; 66점; 67점; 68점; 69점; 70점; 71점; 72점; 73점; 74점; 75점; 76점; 77점; 78점; 79점; 80점; 81점; 82점; 83점; 84점; 85점; 86점; 87점; 88점; 89점; 90점; 91점; 92점; 93점; 94점; 95점; 96점; 97점; 98점; 99점; 또는 100점만큼이다.

[0164] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 증가를 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 증가를 나타내지 않는다.

[0165] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적인 증가"는 초기 PDQ-39 점수의 10% 이하인 증가를 지칭한다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 실질적인 증가를 나타내지 않는다.

[0166] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 6개월 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 안정화를 나타낸다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "안정화"는 10% 초과만큼 증가 또는 감소하지 않는 초기 PDQ-39 점수를 지칭한다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것을 도입한 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 12개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 그들의 초기 PDQ-39 점수의 안정화를 나타낸다.

[0167] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것의 투여/도입 전과 후에 적어도 하나의 표준 임상 검사를 투여받아 PD 환자의 운동 증상 및 기능을 평가한다. 그러한 평가는 MDS-UPDRS 파트 III; 수정된 호엔-야르; 기립-보행-앉기; 9홀 페그보드 민첩성 검사; 및 기립 균형 검사를 포함한다.

[0168] 수정된 호엔-야르 척도는 PD로 인한 전반적인 장애 수준을 측정하는 5단계 척도이다(Hoehn and Yahr, 1967).

[0169] SWS(기립-보행-앉기(Stand-Walk-Sit))는 의자에서 일어나기, 7미터(23피트) 직선으로 걷기, 돌아서기 및 다시 의자로 걸어와 앉는 것을 수반하는 자세 안정성 및 걸음걸이 평가이다. 대상체가 의자 뒷면에 다시 접촉할 때 타이머가 중지된다. 대상체는 실제로 정의된 약물 OFF 및 ON 상태에서 이러한 검사를 수행할 것이다. SWS 검사는 비디오로 녹화되며, MDS-UPDRS 평가와 조합될 수 있다.

[0170] 9홀 페그보드 민첩성 검사는 손재주의 간단한 검사이고; 이는 참가자가 9개의 플라스틱 페그를 플라스틱 페그보드에 정확하게 넣고 제거하는 데 필요한 시간을 기록한다.

[0171] 기립 균형 검사는 공간에서 신체의 방향을 잡고, 정적 및 동적 조건 둘 모두에서 직립 자세를 유지하며, 넘어지지 않고 움직이고 보행하는 능력을 평가한다. 이는 참가자가 각각 50초 동안 최대 5가지 자세를 취하고 유지하는 것을 수반한다. 자세의 순서는: 고체 표면에서 눈 뜨기, 고체 표면에서 눈 감기, 거품 표면에서 눈 뜨기,

거품 표면에서 눈 감기, 및 고체 표면에서 일렬 서기 자세로 눈 뜨기를 포함한다. 점점 더 까다로워지는 자세에서 참가자의 안전을 보장하기 위해 세부적인 정지 규칙이 마련되어 있다. 참가자가 허리 높이에 착용하는 가속도계를 사용하여 각 자세마다 자세의 흔들림이 기록된다. 이 검사는 수행하는 데 대략 7분 정도 소요된다.

[0172] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 전에 본원에서 설명되는 표준 임상 검사 중 임의의 것이 투여되고, 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 다시 투여된다. 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 표준 임상 검사 중 임의의 것에 대해 개선된 점수를 나타낸다. 일 실시형태에서, 개선은 투여/도입 전의 점수와 비교하여 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상이다.

[0173] 일 실시형태에서, 운동이상증의 중등도는 통합 운동이상증 평가 척도(UDysRS)를 사용하여 측정된다. 이 척도는 치료된 PD와 종종 연관된 불수의적 움직임을 평가한다. 이는 2개의 주요 섹션을 포함한다: 병력 [파트 1(ON-운동이상증) 및 파트 2(OFF-근긴장 이상증)] 및 객관적 [파트 3(손상) 및 파트 4(장애)].

[0174] ON-운동이상증은 PD 약물이 작용할 때 발생하는 갑작스러운 움직임 또는 틀어짐과 같은 환자의 묘사에 따른 무도증적(choreiform)이고 근긴장 이상의 움직임을 지칭한다. OFF-근긴장 이상증은 PD 약물을 복용하지 않거나 효과가 없을 때 발생하는 고통스러운 발작 또는 경련을 지칭한다. 평가 전반에 걸쳐, 이러한 두 가지 형태의 움직임에 초점을 맞추고, 파킨슨병 자체의 영향과 떨림은 평가로부터 배제하는 것에 지속적으로 중점을 두어야 한다(Goetz 2008).

[0175] 일 실시형태에서, 대상체는 대상체가 보고하는 PD 운동 일기를 작성한다. 하우저(Hauser)와 동료들은 24시간의 기간에 걸쳐 PD 운동 증상을 평가하기 위해 종이 운동 일기를 개발했다(Hauser 2004). 일기는 참가자가 운동이상증이 없는 ON 상태, 문제가 없는 운동이상증이 있는 ON 상태, 문제가 있는 운동이상증이 있는 ON 상태, OFF 상태 또는 수면 상태에 있는 기간을 30분 간격으로 캡처한다. 참가자는 하루 종일 30분 간격으로 이 정보를 기록해야 한다.

[0176] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 전에 UDysRS 및/또는 PD 운동 일기가 수행되고, 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 다시 수행된다. 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 UDysRS 및/또는 PD 운동에 대해 개선된 점수를 나타낸다. 일 실시형태에서, 개선은 투여/도입 전의 점수와 비교하여 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상이다.

[0177] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/투여 직후 적어도 18개월 동안 일일 활동량을 평가하기 위해 웨어러블 활동 모니터(예컨대, Fitbit®)를 제공받는다.

[0178] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 전 및/또는 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 전반적 장애 및 삶의 질 평가를 수행한다. 대표적인 전반적 장애 및 삶의 질 평가는 전반적 인상 평가(CGI 및 PGI); 간이 후각 식별 검사(BSIT); 파킨슨병 수면 척도(PDSS-2); 및 파킨슨병-자율신경계 결과 척도(SCOPA-AUT)를 포함한다.

[0179] 임상적인 전반적 인상 평가(CGI)는, 환자의 병력에 대한 지식, 심리사회적 상황, 증상, 행동, 증상이 환자의 기능 능력에 미치는 영향을 포함하여, 이용 가능한 모든 정보를 고려하여 임상의가 결정하는 전반적인 요약 척도를 제공한다. CGI는 다음을 평가하는 2개의 동반 1개 항목 측정을 실제로 포함한다: (a) 1부터 7까지의 질병의 중증도, 및 (b) 유사한 7점 척도로 치료의 개시로부터의 변화. 환자 전반적 인상 평가(PGI)는 CGI와 동일하지만 환자에 의해 직접 작성된다. PGI와 CGI는 별도로 작성될 것이다. PGI는 자가 평가 도구로, 참가자가 집에서 종이로 평가하거나 스폰서가 제공한 태블릿으로 답하는 방식으로 독립적으로 작성될 것이다.

[0180] 간이 후각 식별 검사(BSIT)는 "긁고 냄새 맡기" 스트립을 사용하여 후각 시스템 기능을 검사하는 12개 항목의

검사이다. 참가자는 연필로 긁어서 각 향기를 방출한 후에, 냄새를 맡고 그 향기와 관련된 4지 선다형 문제에 답한다. 이것은 자기 주도적 평가이다.

[0181] 파킨슨병 수면 척도(PDSS-2)는 시각적 아날로그 척도를 사용하여 PD의 수면 장애와 연관하여 흔히 보고되는 15가지 증상을 해결한다. 대상체는 지난 한 주 동안의 경험에 기초하여 15개의 문항을 작성한다. 이것은 자기 주도적 측정이다.

[0182] 파킨슨병-자율신경계 질환의 결과 척도(SCOPA-AUT)는 26개의 항목의 자율신경계 기능 자가 보고 설문지이다. 설문은 상부 및 하부 위장 기능, 비뇨기 기능, 심순환 기능, 성 기능 및 다른 기타 자율신경계 문제를 포함한다. 이것은 자기 주도적 증상 척도이다.

[0183] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 전에 본원에서 설명되는 전반적 장애 및 삶의 질 평가 중 임의의 것이 투여되고, 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 다시 투여된다. 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 전반적 장애 및 삶의 질 평가에 대해 개선된 점수를 나타낸다. 일 실시형태에서, 개선은 투여/도입 전의 점수와 비교하여 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상이다.

[0184] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 전 및/또는 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 신경심리학적 검사를 받는다. 예시적인 신경심리학적 검사는 몬트리올 인지 평가(MoCA)를 통한 전반적 인지 평가; 30개 항목의 보스턴 네이밍 검사(BNT); 언어 유창성 검사; 캠브리지 신경심리학 검사 자동화 배터리(CANTAB); 벡 우울증 인벤토리-II(BDI-II); 벡 불안증 인벤토리(BAI); 및 파킨슨병의 충동-강박 장애에 대한 설문지(QUIP-RS)를 포함한다.

[0185] 몬트리올 인지 평가(MoCA)는 경미한 인지 기능 장애에 대한 신속한 스크리닝 도구로서 설계되었다. 이는 주의력과 집중력, 실행 기능, 기억력, 언어, 시각적 구성 능력, 개념적 사고, 계산, 및 방향 감각 등 다양한 인지 영역을 평가한다. BNT는 PD에서 나타날 수 있는 대립 명명 및 언어 결함을 평가한다. 참가자에게는 점점 더 어려워지는 사물의 선 그림의 자극이 제시되고, 20초 이내에 답을 제공해야 한다. 점수는 자발적으로 제공된 정답 수, 주어진 힌트 수, 및 힌트 후 응답 수에 기초한다. 이 간단한 구두 평가는 화상 통화를 통한 연구팀의 원격 안내로 작성될 것이다.

[0186] 언어 유창성 테스트에서, 대상체는 60초 이내에 미리 선택된 문자와 범주로부터 최대한 많은 단어를 생성하도록 요구되며, 고유 명사나 접미사만 바뀐 단어는 사용하지 않도록 지시된다. 각 카테고리별로 정답 수가 점수로 매겨질 것이다.

[0187] 캠브리지 신경심리학적 검사 자동화 배터리(CANTAB)는 신경성 장애의 평가에 있어서 민감하고 객관적인 인지 기능 측정을 포함하기 위해 개발되었다. 인지 평가는 시간 경과에 따른 신경심리학적 수행 능력의 변화와 개입의 효과를 검출하기 위해 개발되었다. 작업 기억, 에피소드 기억, 실행 기능, 계획 및 정보 처리 영역에 초점을 맞춘 여러 가지 평가가 PD에서 검증되었다. 모든 작업은 대상체가 응답 시간의 수집을 포함하는 태블릿을 사용하여 작성될 것이다. CANTAB는 다양한 신경퇴행성 질환에서 검증되었던 결과 측정이 전자적으로 캡처될 수 있게 한다. CANTAB은 스폰서가 제공한 태블릿을 통해 자가 주도로 작성되거나, 또는 연구 코디네이터 또는 조사자를 통해 원격으로 안내를 받아 작성될 수 있다.

[0188] 반응 시간(RTI)은 정신적 반응 시간 뿐만 아니라 이동 시간, 반응 시간, 반응 정확도 및 충동성을 평가한다.

[0189] 운동 스크리닝 작업(Motor Screening Task, MOT)은 감각 운동 결핍 또는 이해력 부족이 참가자로부터 유효한 데이터를 수집하는 능력을 제한할 수 있는지 여부에 대한 일반적인 평가를 제공한다. 이 작업은 참가자의 반응 속도 및 화면에서 물체의 중심을 가리키는 정확도를 측정한다.

[0190] 캠브리지 원터치 스타킹(One Touch Stockings of Cambridge, OTS)은 공간 계획 및 작업 기억 하위 영역의 평가를 통해 실행 기능을 평가한다. 참가자는 정해진 이동 횟수만큼 화면 상에 3D 배열을 생성하도록 요구된다. 이는 첫 번째 선택지에서 해결된 문제 수, 평균 정답 선택 수, 평균 응답 지연 시간, 및 평균 수정 지연 시간에 의해 측정된다.

[0191] 페어링된 연관 학습(Paired Associates Learning, PAL)은 시각적 기억과 새로운 학습 능력을 평가하는 과제이다. 참가자는 난이도가 높아진 미리 지정된 패턴의 상자를 선택하도록 요청받는다. 결과는 오류 횟수, 패턴을 정확하게 식별하는 데 필요한 시도 횟수, 완료한 단계, 및 기억력 점수로 측정된다. 예상 완료 시간: 8분.

[0192] 패턴 인식 기억력(PRM)은 2지 선다형 강제 변별 패러다임에서의 시각적 패턴 인식 기억력 검사이다. 오디오 녹음을 통해 관련 없는 단어가 제시되고 참가자는 즉시 또는 지연 후 가능한 한 많은 단어를 회상한다. 이는 올바른 시도의 횟수 및 퍼센티지와 응답 지연 시간으로 측정된다.

[0193] 멀티태스킹 검사(MTT)는 상충되는 정보를 해석 및 관리하고 작업과 관련이 없는 정보를 올바르게 무시하는 개인의 능력 평가이다. 임상 시험 사이에 규칙을 변경하면 참가자에게 더 높은 인지적 요구가 발생하여 PD 환자에게 종종 영향을 미치는 영역인 실행 기능 장애의 근본적인 결함을 드러낼 수 있다. 이는 응답 지연 시간과 오류 횟수로 측정된다.

[0194] 자격 평가의 일환으로 스크리닝 시 벡 우울증 인벤토리-II(BDI-II)가 수행될 수 있으며, 스크리닝에서 >20인 참가자는 연구에서 배제되고 정신과적 평가 및 치료를 위해 주치의에게 의뢰된다. BDI-II에 대한 점수 가이드라인은 샘플의 특성과 BDI-II를 사용하는 목적에 기초하여 임계값이 조정된다는 권장사항과 함께 제공된다. 일반적으로, BDI-II 총점 0점 내지 13점은 경미한 우울증, 14점 내지 19점은 경도의 우울증, 20점 내지 28점은 중등도 우울증, 및 29점 내지 63점은 중증 우울증을 나타낸다. 치료 후 BDI-II 점수가 28점 초과인 경우, 참가자는 연구를 계속 진행하되 정신과적 평가 및 치료를 위해 주치의에게 의뢰된다. 이 평가는 자가 보고 측정이다.

[0195] 벡 불안증 인벤토리(BAI)는 어린이와 성인의 불안 정도를 측정하는 데 사용되는 21개 문항의 객관식 자가 보고 인벤토리이다. 이 평가는 자가 보고 측정이다.

[0196] PD에 대한 강박 장애 설문지 평가 척도(QUIP-RS)는 증상의 중증도를 측정하고 PD의 충동 조절 장애 및 관련 장애의 진단을 지원하기 위해 설계된 평가 척도이다. 이 평가 척도는 5점 리커트(Likert) 척도로 충동 조절 행동을 커버하여, 다음 행동들: 도박, 쇼핑, 식사, 과잉 성욕, 단순(펀딩(punding)) 및/또는 복잡한(취미) 반복 행동, 및 강박적 약물 남용(도파민 조절장애 증후군)의 빈도를 평가한다. 이 평가는 자가 보고 측정이다.

[0197] 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 전에 본원에서 설명되는 임의의 신경심리학적 검사가 수행되고, 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 다시 수행된다. 일 실시형태에서, 대상체는 투여/도입 직후 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이후에 신경심리학적 검사에 대해 개선된 점수를 나타낸다. 일 실시형태에서, 개선은 투여/도입 전의 점수와 비교하여 적어도 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7%; 8%; 9%; 10%; 11%; 12%; 13%; 14%; 15%; 16%; 17%; 18%; 19%; 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 또는 그 이상이다.

[0198] 일 실시형태에서, 대상체는 도입 또는 투여 직후 적어도 6개월 동안 어떠한 심각한 부작용도 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, 대상체는 도입 또는 투여 직후 적어도 12개월 동안 어떠한 심각한 부작용도 나타내지 않는다. 일 실시형태에서, 대상체는 도입 또는 투여 직후 적어도 1개월; 2개월; 3개월; 4개월; 5개월; 7개월; 8개월; 9개월; 10개월; 11개월; 13개월; 14개월; 15개월; 16개월; 17개월; 18개월; 19개월; 20개월; 21개월; 22개월; 23개월; 24개월; 또는 그 이상 동안 어떠한 심각한 부작용도 나타내지 않는다. 심각한 부작용은, 혈액 및 림프계 장애(예컨대, 빈혈, 림프구 수 감소, 및 백혈구 증가); 위장 장애(예컨대, 소화 불량, 연하곤란, 및 변비); 국소 부종; 피로; 낙상; 목의 멍; 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 증가; 혈소판 수 감소; 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 연장; 체중 감소; 혈액 젖산 탈수소효소; 신진대사 및 영양 장애(예컨대, 고혈당증, 저칼슘혈증, 저알부민혈증, 저인산혈증, 고나트륨혈증, 저혈당증, 고칼륨혈증, 및 저나트륨혈증); 근골격계 및 결합조직 장애(예컨대, 통증, 목 통증, 요통, 흉벽 통증 및 사지 통증); 신경계 장애(예컨대, 두통, 불수의 운동, 기억력 장애, 수면 장애 - 꿈 증가, 감각 신경 병증 및 과다수면); 정신과 장애(예컨대, 환각, 우울증, 불면증 및 충동 조절 장애); 신장 및 비뇨기 장애(예컨대, 요실금); 호흡기, 흉부 및 종격동 장애(예컨대, 기침 및 가래동반 기침), 피부 및 피하 조직 장애(예컨대, 피부 궤양), 수술 및 의료 시술(예컨대, 손목 터널 방출 수술); 일시적 감각이상; 일시적 떨림; 저혈압; 및 혈관 장애(예컨대, 고혈압)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0199] *핵산*

[0200] 일부 국면에서, 본 개시내용은 GDNF 유전자 또는 GDNF 유전자 생성물을 발현하는 데 유용한 단리된 핵산을 제공한다. "핵산" 서열은 DNA 또는 RNA 서열을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 핵산, 및 그로부터 번역된 단백질은 단리되어 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 인공적으로 생성되는 것을 의미한다. 핵산에 대해 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은: (i) 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 시험관 내에서 증폭된; (ii) 클로닝에 의해 재조합적으로 생성된; (iii) 절단 및 겔 분리에 의해 정제된; 또는 (iv) 예를 들어, 화학적 합성에 의해 합성된, 을 의미한다. 단리된 핵산은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기법에 의해 쉽게 조작 가능한 것이다. 따라서, 5' 및 3' 제한 부위가 알려져 있는 벡터에 함유되거나 중합효소 연쇄 반응(PCR) 프라이머 서열이 공개된 뉴클레오타이드 서열은 단리된 것으로 간주되지만, 자연 숙주에서 자연 상태로 존재하는 핵산 서열은 그렇지 않은 것으로 간주된다. 단리된 핵산은 실질적으로 정제될 수 있지만, 반드시 정제될 필요는 없다. 예를 들어, 클로닝 또는 발현 벡터 내에서 단리된 핵산은 그것이 존재하는 세포 내 물질의 극히 일부 퍼센티지만 구성할 수 있다는 점에서 순수하지 않다. 그러나, 그러한 핵산은 통상의 기술자에게 알려져 있는 표준 기법에 의해 쉽게 조작될 수 있기 때문에, 본원에서 사용되는 용어와 같이 단리된 핵산이다. 본원에서 단백질 또는 펩타이드와 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "단리된"은, 자연 환경으로부터 분리되거나 (예컨대, 화학적 합성에 의해, 재조합 DNA 기술 등에 의해) 인공적으로 생산된 단백질 또는 펩타이드를 지칭한다.

[0201] 통상의 기술자는 또한 보존적 아미노산 치환이 기능적으로 동등한 변이체, 또는 캡시드 단백질의 상동체를 제공하기 위해 이루어질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 국면에서 본 개시내용은 보존적 아미노산 치환을 일으키는 서열 변경을 포괄한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 보존적 아미노산 치환은 아미노산 치환이 이루어지는 단백질의 상대 전하 또는 크기 특성을 변경하지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 변이체는 통상의 기술자에게 알려져 있는 폴리펩타이드 서열을 변경하기 위한 방법에 따라 제조될 수 있으며, 그러한 방법을 정리한 참고문헌, 예컨대, 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989], 또는 [Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]에서 찾을 수 있다. 아미노산의 보존적 치환은 다음 그룹 내의 아미노산 간의 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D. 따라서, 본원에 개시된 단백질 및 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 보존적 아미노산 치환을 할 수 있다.

[0202] 본원에서 설명되는 단리된 핵산은 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터(rAAV 벡터)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 의해 설명된 바와 같은 단리된 핵산은 제1 아데노-연관 바이러스(AAV) 역전된 말단 반복(ITR), 또는 그 변이체를 포함하는 영역(예컨대, 제1 영역)을 포함한다. 단리된 핵산(예컨대, 재조합 AAV 벡터)은 캡시드 단백질로 구성된 캡시드에 패키징되어 대상체에게 투여되거나 및/또는 선택된 표적 세포에 전달될 수 있다. "재조합 AAV(rAAV) 벡터"는 전형적으로 최소한 이식유전자 및 그의 조절 서열, 및 5' 및 3' AAV 역전된 말단 반복(ITRs)으로 구성된다. 이식유전자는 예를 들어, 본 개시내용의 다른 곳에서 설명된 바와 같은, 단백질 및/또는 발현 제어 서열(예컨대, 폴리-A 테일)을 암호화하는 영역을 포함할 수 있다.

[0203] 일반적으로, ITR 서열은 약 145bp의 길이이다. 다양한 국면에서, 좌측 및 우측 ITR은 독립적으로 145bp 이하 또는 130bp 이하이다. "독립적으로"란, 좌측 및 우측 ITR이 동일한 길이 또는 상이한 길이일 수 있다는 것을 의미한다. 비제한적인 예로서, 좌측 및 우측 ITR은 독립적으로 145bp, 130bp, 128bp, 124bp, 또는 119bp일 수 있다. 바람직하게는, ITR을 암호화하는 실질적으로 전체 서열은 핵산 서열에 사용되지만, 이러한 서열을 어느 정도 약간 수정하는 것은 허용 가능하다. 이러한 ITR 서열을 수정하는 능력은 해당 분야의 기술에 속한다. (예컨대, 문헌 [Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1989)]; 및 문헌 [K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532(1996)]과 같은 텍스트를 참조한다). 그러한 핵산 분자의 일례는 이식유전자를 함유하는 "시스-작용" 플라스미드이고, 여기서 선택된 이식유전자 서열 및 연관된 조절 요소는 5' 및 3' AAV ITR 서열에 의해 플랭킹된다. AAV ITR 서열은 현재 식별된 포유류 AAV 유형을 포함하여, 임의의 알려진 AAV에서 얻을 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 핵산(예컨대, rAAV 벡터)는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, 및 이들의 변이체에서 선택되는 혈청형을 갖는 적어도 하나의 ITR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단리된 핵산은 AAV2 ITR을 암호화하는 영역(예컨대, 제1 영역)을 포함한다.

[0204] 일부 실시형태에서, 단리된 핵산은 제2 AAV ITR을 포함하는 영역(예컨대, 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역 등)을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, 및 이들의 변이체에서 선택되는 혈청형을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제2 ITR은 기능적 말단 분해 부

위(terminal resolution site, TRS)가 결여되어 있는 돌연변이 ITR이다. 용어 "말단 분해 부위가 결여되어 있는"은, ITR의 말단 분해 부위(TRS)의 기능을 폐지하는 돌연변이(예컨대, 비동의(non-synonymous) 돌연변이와 같은 센스 돌연변이, 또는 미스센스 돌연변이)를 포함하는 AAV ITR, 또는 기능적 TRS(예컨대, ATRS ITR)를 암호화하는 핵산 서열이 결여되어 있는 절단된 AAV ITR을 지칭할 수 있다. 임의의 특정 이론에 얽매이기를 바라지 않고, 기능적 TRS가 결여되어 있는 ITR을 포함하는 rAAV 벡터는, 예를 들어 문헌 [McCarthy(2008) Molecular Therapy 16(10): 1648-1656]에서 설명된 바와 같은, 자가-상보적인 rAAV 벡터를 생성한다.

[0205] 재조합 AAV 벡터에 대해 위에서 확인된 요소들 이외에, 벡터는 또한 벡터로 형질감염되거나 본원에서 설명되는 방법에 의해 생산된 바이러스에 감염된 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 이식유전자의 요소와 작동 가능하게 연결되는 통상적인 제어 요소들을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "작동 가능하게 연결된" 서열은 관심있는 유전자(즉, GDNF)와 인접한 발현 제어 서열 및 관심있는 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 원거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 모두를 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화(폴리A) 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우, 암호화된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 천연, 구성적, 유도성 및/또는 조직-특이적인 프로모터를 포함하는 다수의 발현 제어 서열은 해당 기술 분야에 알려져 있고 활용될 수 있다.

[0206] 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산 서열(예컨대, 코딩 서열) 및 조절 서열은, 핵산 서열의 발현 또는 전사가 조절 서열의 영향 또는 제어 하에 놓이는 방식으로 공유결합으로 연결되어 있는 경우 작동 가능하게 연결된다고 한다. 핵산 서열이 기능적 단백질로 번역되기를 원하는 경우, 조절 서열(예컨대, 5' 조절 서열)의 프로모터 유도로 인해 코딩 서열의 전사가 발생하는 경우, 그리고 2개의 DNA 서열 사이의 연결의 특성이 (1) 프레임 시프트 돌연변이의 도입을 초래하지 않거나, (2) 프로모터 영역이 코딩 서열의 전사를 지시하는 능력을 방해하지 않거나, (3) 대응하는 RNA 전사체가 단백질로 번역되는 능력을 방해하지 않는 경우, 2개의 DNA 서열은 작동 가능하게 연결되어 있다고 한다. 따라서, 프로모터 영역은, 프로모터 영역이 해당 DNA 서열의 전사에 영향을 줄 수 있는 경우 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으므로, 생성된 전사체는 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역될 수 있다. 유사하게, 2개 이상의 코딩 영역은 공통 프로모터로부터 전사되어 프레임 내에서 번역된 2개 이상의 단백질의 발현을 초래하는 방식으로 연결될 때 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, 작동 가능하게 연결된 코딩 서열은 융합 단백질을 생성한다.

[0207] *프로모터*

[0208] 다양한 실시형태에서, 이식유전자는 하나 이상의 발현 제어 서열(예컨대, 프로모터 등)을 암호화하는 핵산 서열을 더 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화(폴리A) 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우, 암호화된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 천연, 구성적, 유도성 및/또는 조직-특이적인 프로모터를 포함하는 더 많은 수의 발현 제어 서열은 해당 기술 분야에 알려져 있고 활용될 수 있다.

[0209] "프로모터"는 유전자의 특정 전사를 개시하는 데 필요한, 세포의 합성 기계 또는 도입된 합성 기계에 의해 인식되는 DNA 서열(예컨대, 유전자의 코딩 서열)을 지칭한다. "작동 가능하게 위치된", "제어 하에" 또는 "전사 제어 하에"라는 어구는 유전자의 RNA 중합효소 개시 및 발현을 제어하기 위해 핵산과 관련하여 프로모터가 올바른 위치 및 배향에 있다는 것을 의미한다.

[0210] 단백질을 암호화하는 핵산의 경우, 폴리아데닐화 서열은 일반적으로 이식유전자 서열의 뒤, 즉, 이식유전자 서열의 하류 또는 이식유전자 서열의 3', 및 3' AAV ITR 서열 앞에 삽입된다. 본 개시내용에서 유용한 rAAV 컨스트럭트는 또한, 바람직하게는 프로모터/인핸서 서열과 이식유전자 사이에 위치한 인트론을 함유할 수 있다. 일 예시적인 인트론 서열은 SV-40에서 유래하고, SV-40 T 인트론 서열로 지칭된다. 사용될 수 있는 또 다른 벡터 요소는 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES)이다. IRES 서열은 단일 유전자 전사체로부터 하나 초과의 폴리펩타이드를 생성하는 데 사용된다. IRES 서열은 하나 초과의 폴리펩타이드쇄를 함유하는 단백질을 생성하는 데 사용될 수 있다. 이러한, 그리고 다른 공통 벡터 요소의 선택은 통상적이며 많은 그러한 서열이 이용 가능하다[예컨대, 문헌 [Sambrook et al.], 및 그 안에 인용된 참고문헌, 예를 들어, 페이지 3.18 3.26 및 16.17 16.27 및 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989]을 참조한다]. 일부 실시형태에서, 구제역 바이러스 2A 서열은 다단백질에 포함되며; 이는 다단백질의 절단을 매개하는 것으로 나타난 작은 펩타이드(대략 18개의 아미노산의 길이)이다(문헌 [Ryan, M

D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933]; 문헌 [Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127]; 문헌 [Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873]; 및 문헌 [Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459]). 2A 서열의 절단 활성은 플라스미드 및 유전자 치료 벡터(AAV 및 레트로바이러스)를 포함하는 인공 시스템에서 이전에 입증되었다(문헌 [Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933]; 문헌 [Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127]; 문헌 [Furler, S et al., Gene Therapy, 2001 ; 8: 864-873]; 및 문헌 [Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459]; 문헌 [de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208]; 문헌 [de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11 : 1921- 1931.]; 및 문헌 [Klump, H et al., Gene Therapy, 2001 ; 8: 811-817]).

[0211] 구성적 프로모터의 예는, 레트로바이러스 루스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(선택적으로 RSV 인핸서 포함), 거대세포바이러스(CMV) 프로모터(선택적으로 CMV 인핸서 포함) [예컨대, 문헌 [Boshart et al., Cell, 41 :521-530(1985)] 참조], SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, β-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나아제(PGK) 프로모터, 및 EF1 a 프로모터 [인비트로젠]를 제한 없이 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 향상된 닭 β-액틴 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 U6 프로모터이다.

[0212] 유도성 프로모터는 유전자 발현을 조절할 수 있으며, 외인적으로 공급되는 화합물, 온도와 같은 환경 요인 또는 특정 생리학적 상태(예컨대, 급성기, 세포의 특정 분화 상태 또는 복제 세포에서만)의 존재에 의해 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 다양한 상업적 출처에서 이용 가능하며, 인비트로젠, 클론테크 및 아리아드를 제한없이 포함한다. 많은 다른 시스템이 설명되었고 통상의 기술자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 외인성으로 공급된 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오네인(metallothionein, MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex)-유도성 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템(WO 98/10088); 엑디손 곤충 프로모터(문헌 [No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351(1996)]), 테트라사이클린-억제가능 시스템(문헌 [Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992)]), 테트라사이클린-유도성 시스템(문헌 [Gossen et al., Science, 268: 1766-1769(1995)], 또한 문헌 [Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518(1998)] 참조), RU486-유도성 시스템(문헌 [Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243(1997)] 및 문헌 [Wang et al., Gene Ther., 4:432-441(1997)]) 및 라파마이신-유도성 시스템(문헌 [Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872(1997)])을 포함한다. 이러한 맥락에서 유용할 수 있는 다른 유형의 유도성 프로모터는 예컨대, 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태 또는 복제 세포에서만 조절되는 것과 같은 특정 생리학적 상태에 의해 조절되는 프로모터이다.

[0213] 또 다른 실시형태에서, 이식유전자에 대한 천연 프로모터가 사용될 것이다. 이식유전자의 발현이 천연 발현을 모방하는 것이 바람직한 경우 천연 프로모터가 바람직할 수 있다. 천연 프로모터는 이식유전자의 발현이 시간적 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로 조절되어야 하거나, 또는 특정 전사 자극에 대한 반응으로 조절되어야 하는 경우 사용될 수 있다. 추가 실시형태에서, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작 공통 서열과 같은 다른 천연 발현 제어 요소는 또한 천연 발현을 모방하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "천연 프로모터"는 이식유전자의 내인성 프로모터를 지칭한다.

[0214] 일부 실시형태에서, 조절 서열은 조직-특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에서, 조직-특이적 조절 서열은 조직 특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직-특이적 전사 인자에 결합한다. 그러한 조직-특이적 조절 서열(예컨대, 프로모터, 인핸서 등)은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예시적인 조직-특이적 조절 서열은 다음의 조직 특이적 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 간-특이적 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터, 인슐린 프로모터, 글루카곤 프로모터, 소마토스타틴 프로모터, 췌장 폴리펩타이드(PPY) 프로모터, 시냅신-1(Syn) 프로모터, 크레아틴 키나아제(MCK) 프로모터, 포유류 데스민(DES) 프로모터, a-미오신 중쇄(a-MHC) 프로모터, 또는 심장 트로포닌 T(cTnT) 프로모터.

[0215] 다른 예시적인 프로모터는, 그 중에서도 베타-액틴 프로모터, B형 간염 바이러스 핵심 프로모터, Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996); 알파-태아단백질(AFP) 프로모터, Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7: 1503-14 (1996)), bone osteocalcin promoter (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24: 185-96 (1997)); 골 시알로단백질 프로모터 (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11 :654-64 (1996)), CD2 promoter (Hansal et al., J. Immunol., 161: 1063-8 (1998); 면역글로불린 중쇄 프로모터; T 세포 수용체 a-쇄 프로모터, 신경세포의, 이를테면 신경세포-특이적 에놀라아제(NSE) 프로모터(Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), 신경필라멘트 경쇄 유전자 프로모터(Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), 및 신경세포-특이적 vgf 유전자 프로모터(Piccioli et al., Neuron, 15:373- 84 (1995))를 포함하며,

이들은 숙련된 전문가에게 명백할 것이다.

[0216] 본 방법 및 조성물에 사용하기 위해 고려되는 신경계(NS)-특이적 프로모터는 또한 국제 특허 출원 번호 WO/2022/049385 및 WO/2021/214443에 설명되어 있는 것들을 포함하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 일부 실시형태에서, NS-특이적 프로모터는 표 1의 프로모터이거나, 또는 표 1의 프로모터에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 동일성을 갖는 프로모터이다. 일부 실시형태에서, NS-특이적 프로모터는 표 1의 프로모터이거나, 또는 표 1의 프로모터에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 동일성을 갖고 표 1의 프로모터의 NS-특이적 프로모터 활성을 보유하는 프로모터이다.

[0217] 본 방법 및 조성물에 사용하기 위해 고려되는 CNS-특이적 프로모터는 또한 국제 특허 출원 WO/2021/214443에 설명되어 있는 것들을 포함하며, 그 내용은 그 전체가 참조에 의해 본원에 통합된다. 일부 실시형태에서, CNS-특이적 프로모터는 표 2 내지 표 4의 프로모터이거나, 또는 표 2 내지 표 4의 프로모터에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 동일성을 갖는 프로모터이다. 일부 실시형태에서, CNS-특이적 프로모터는 표 2 내지 표 4의 프로모터이거나, 또는 표 2 내지 표 4의 프로모터에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 동일성을 갖고 표 2 내지 표 4의 프로모터의 CNS-특이적 프로모터 활성을 보유하는 프로모터이다.

[0218] 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 시스-조절 요소(cis-regulatory element, CRE)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 NS-특이적 CRE 또는 CNS-특이적 CRE를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 표 4 내지 표 6의 하나 이상의 CRE, 또는 표 4 내지 표 6의 CRE에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 동일성을 갖는 CRE이다. 일부 실시형태에서, CRE는 표 4 내지 표 6의 CRE이거나, 또는 표 4 내지 표 6의 CRE에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 동일성을 갖고 표 4 내지 표 6의 CRE의 활성을 보유하는 CRE이다.

[0219] 일부 실시형태에서, CRE는 해당 기술 분야에 알려져 있는 하나 이상의 CRE를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 하나 이상의 CRE는 국제 특허 출원 번호 WO/2022/049385 내의 서열 번호: 19-24, 27, 28, 37, 38에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 하나 이상의 CRE는 WO 2019/199867A1로부터의 서열 번호: 1-8, WO2020/076614A1로부터의 서열 번호: 1-7 및 WO2020/097121로부터의 서열 번호: 25-51, 177-178, 188에서 선택될 수 있다. 상술한 참고문헌은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0220] *표 1 - NS-특이적 프로모터*

이름	서열	길이
SP0013 (서열 번호:3)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCAC CGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCC CAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCA AGGACACAAATGGGTGAGGGGAGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCC ACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGAC CCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGAC CCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCGGATCCCACGGTTCCCGG CGGGGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATT GTGGGAAACTCCCGA	795
SP0014 (서열 번호: 4)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCAC CGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCC CAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCA AGGACACAAATGGGTGAGGGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCG CGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGC GCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTC CGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGG CGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGC GGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	810
SP0026	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC	916

[0221]

(서열 번호: 5)	ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCAC CGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCC CAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCA AGGACACAAATGGGTGAGGGGAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGC GCGTCACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGG TTGCTGGCAGCCTGGCTGGCACTGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACC CACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGA CCCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGA CCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCGGATCCCACGGTTCCCG GCGGGGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCAT TGTGGGAAACTCCCGA	
SP0027 (서열 번호: 6)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCAC CGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCC CAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCA AGGACACAAATGGGTGAGGGGAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGC GCGTCACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGG TTGCTGGCAGCCTGGCTGGCACTTGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACC GCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGG CGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGT CCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGG GCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAG CGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	931
SP0030 (서열 번호: 7)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCAC CCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGG ACCCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGG ACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCGGATCCCACGGTTCCC GGCGGGGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCA TTGTGGGAAACTCCCGA	617
SP0031 (서열 번호: 8)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACTGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCAC CGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAG GCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCG TCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACG GGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCA GCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	632
SP0032 (서열 번호: 9)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACCCCATGG CTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCA TCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTTTAGAAC ACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTG GTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTTCTGGA ATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGA TTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGGGCTAGGCCTG CGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCT	701

[0222]

	GGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACT TGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCT GGGTTTGCGGATCCCACGGTTCCCGGCGGGGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCG CCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTGGGAAACTCCCGA	
SP0033 (서열 번호: 10)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACCCCATGG CTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCA TCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTTTAGAAC ACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTG GTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTTCTGGA ATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGA TTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAATGCGGCGAGGCG CGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGC GCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTC CCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACG CGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAG CGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	716
SP0019 (서열 번호: 11)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTTTGACAA GGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACC CCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTC ATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTT TAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGT GGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTT TCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCT AGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACT GAAGAAGATCTTAACAGAAGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCACC GACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCCG CCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCCT AAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCGGATCCCACGGTTCCCGGCGG GGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGTG GGAAACTCCCGA	792
SP0020 (서열 번호: 12)	CTTCCTCTTATATTTCACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCACAGCAAGT GCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTCACACTCCAATCTCCACTTCCTTCT CAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCCCTGCTGTGTTGAGCTGGGCTC TGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGGTGCTCCTGCTCTGCCCCCGGCTCAGCTC ATGCTGGGCCTGCACTTCTGGAAGGGAGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAACCCAA ATGAATTAATGGAATTTGACATAGTTCAAAAATAATAAAATGTGATACCCATGAAATGCT GATATTCTGCCTTAATTTGCCAGATTGGGGGCCGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCG ACCCCTCACCCACCGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATG CTGAGCGGGACCCGCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTG CTCTCTCGGACCCTAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCGGATCCC ACGGTTCCCGGCGGGGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGG AGCAGTGCATTGTGGGAAACTCCCGA	686
SP0021 (서열 번호: 13)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTTTGACAA GGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACC CCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTC ATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTT TAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGT GGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTT TCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCT AGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACT GAAGAAGATCTTAACAGAATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGG ACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCG CTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGC GCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGC GACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGA GGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	807
SP0022 (서열 번호: 14)	CTTCCTCTTATATTTCACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCACAGCAAGT GCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTCACACTCCAATCTCCACTTCCTTCT CAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCCCTGCTGTGTTGAGCTGGGCTC TGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGGTGCTCCTGCTCTGCCCCCGGCTCAGCTC	701

[0223]

	ATGCTGGGCCTGCACTTCTGGAAGGGAGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAACCCAA ATGAATTAATGGAATTTGACATAGTTCAAAAATAATAAAATGTGATACCCATGAAATGCT GATATTCTGCCTTAATTTGCCAGATTGGGGGCCTGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAG CTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCA GCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACC TTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAG GGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTG CGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	
SP0028 (서열 번호: 15)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTTTGACAA GGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACC CCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTC ATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTT TAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGT GGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTT TCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCT AGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACT GAAGAAGATCTTAACAGAAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCG TCACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTG CTGGCAGCCTGGCTGGCACTGGGCTAGGCCTGCGCACCCACCCACCGACCCCTCACCCAC CGACCCGTCACCCACCGACCAAGGGGCACCCTGGCCTAGAGGGGATGCTGAGCGGGACCC GCCTCCTGCCTCTGGCAGTCCCAGATGGGACTTGGACCCCGCAGTTGCTCTCTCGGACCC TAAGTTTCTACCCCTGGATCTAAGGCGGAGCTGGGTTTGCGGATCCCACGGTTCCCGGCG GGGCGGGGCCCGGTCGCCCCTCCCCCTCCCCGCCCTCCTGCGCCGGGAGCAGTGCATTGT GGGAAACTCCCGA	913
SP0029 (서열 번호: 16)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTTTGACAA GGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACC CCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTC ATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTT TAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGT GGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTT TCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCT AGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACT GAAGAAGATCTTAACAGAAAGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCG TCACAGCCGCGCTATTCTCAGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTG CTGGCAGCCTGGCTGGCACTTGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCG GACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGC GCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCG CGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCG CGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGG AGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG	928
SP0011 (서열 번호: 17)	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGACCAACCC GAAACTGTTCAGGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATGGGATAATCATGCCCA GTAAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTAGGTCACTATGCA GAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGGCCCCTCCCTAGCTGGGAACA GTCAACCCTTAGGAACTAGACTGTCAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAACCGTG GCAACCAAGTGTTGCTGGCACATTGTGAGGTGGTGATGGGAACTGCAGAGGCCCTGCACA GCATGCTAATGAGCCCAGGCAAACATGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCC CACCCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGC CCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGC	529
SP0034 (서열 번호: 18)	TCCAAAGAAAAGCCAGATAAGTAGCTGATTATTGCATAGAGCTGACAGTATCACAGGAAG ATCAGTAGTAGCAGCTCAAGTACAAAAAGGTTAATTAGCAATACTTAATAAGAAAAACTA CCTCTGGCAGGTGAAGAGTTAATCCCTGGTCAATTTTAAGCTACTCTGCTGAGAGTACTA ATAAGTGTAGGGGTTGGAGCCAATGAGGGTGACCCCTTCCTTGATGGGAACAGTCATCCC TTAGGAACTGCCCTGGAAAGCATCAGCCAGCCAGAAAACAGGGAAAGAGGCTGAGAAACC GTGGTAACCAAGTTTTGCTGGCACTTTGTAAAATGGTAACTGCAACTGCCGAGGCTGTGC AGAGAATGCTAATAAGCCTAGGACAACCTGTAAAGAGTGGACCTAGAAAATGTCCACCCG CTAGAGAGAGGGAGCGAGCATGTGCGATGAGCAATAGCTGTGGACCTTACAGTTGCTGCT AACTGCCCTGGTGTGTGTGAGGGAGAGAGAGGGAGGGAGGGAGAGAGAGCGCGCTAGCGC GAGAGAGCGAGTGAGCAAGCGAGCAGAAAAGAGGTGGAGAGGGGGGGAATAAGAAAGAGA GAGAAGGAAAGGAGAGAAGGCAGGAAGAAGGCAAGGGACGAGACAA	646

[0224]

SP0035 (서열 번호: 19)	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGACCAACCC GAAACTGTTCAGGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATGGGATAATCATGCCCA GTAAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTAGGTCACTATGCA GAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGGCCCCTCCCTAGCTGGGAACA GTCAACCCTTAGGAACTAGACTGTCAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAACCGTG GCAACCAAGTGTTGCTGGCACATTGTGAGGTGGTGATGGGAACTGCAGAGGCCCTGCACA GCATGCTAATGAGCCCAGGCAAACATCGCTAGAGAGAGGGAGCGAGCATGTGCGATGAGC AATAGCTGTGGACCTTACAGTTGCTGCTAACTGCCCTGGTGTGTGTGAGGGAGAGAGAGG GAGGGAGGGAGAGAGAGCGCGCTAGCGCGAGAGAGCGAGTGAGCAAGCGAGCAGAAAAGA GGTGGAGAGGGGGGGAATAAGAAAGAGAGAGAAGGAAAGGAGAGAAGGCAGGAAGAAGGC AAGGGACGAGACAA	614
CNS-1 (서열 번호: 20)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCCTGGGCGC CTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCCTGTCTGGGAGATGAGCATTTAGG AATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAG ATTGGATGGAAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAGT AAACAGCCGCTGCCCTGTCCTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAGGCCTGTTTGGACA GCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGGCTGATAGATGGGGATGGGCGGACT GTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTGCTATGTGCTTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGT AGCCAGAAGGTGGTCCTGGCTGTGCCCCCAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTCTAGTTC TGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCTCCTCCCCGCACC AGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCCCAGTGGTGACTAGGGGCAGAATATG TCTCTGAGTGAGTGTCTGGAGCCCTCCTCACCCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAGT CAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	696
CNS-2 (서열 번호: 21)	GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACACAGACACTGAAAGAATCCTAGGCCTGGTAGG CACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAGAGACCCAAGCCCCTC ATAGGAACAGTGAGAAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGTAACTTTATCTAAAGTCATAGGCT CCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACCAGATCTACCAGCTAGC CTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGCAGCACCGGCTGTGGCCGATGCCAGCCAGGTAGC CGGTTTCCCACGTCCCCCGCACGCACGCACCTCTTTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCC GACCTGGAGTAGGGGGGGTGGTGAGTGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTT CGTTCCTGTACATCCAGCTCGCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGACTCA AGCGCAACTTTGAATCATCACGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTATTTCATTTATCTTT GAAAACGAGGGAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGGATGGGCCAAGGGTGAGTTGGCCCCCG GGGAGCTGGTCCCTGTTCCTGGCTTTAGTCCCAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGCGGGC TGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	709
CNS-3 (서열 번호: 22)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGCGGGCTGGACATGAGC AGCGGCTGCCGGTCCTGGGACTAGGCCCCGCCATTTTGGATCCGCTGACAGGTCAGCGAA GTCTCTTCCTAGAGTTCCGGTGTCGTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAATAGGGAATTAGT GGGAAGGGCCCTTAAATTGGGCGAGCCAAGGTGGGGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAG GGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGT CTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCCGTGCGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCT CGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGG ACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTG CCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGG GGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGCGGGGCCTGGAGATCCACAG CTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAAGGGGCGGGGCCTGACGCGCGCGGC TCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGG GTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCGCC	
CNS-4 (서열 번호: 23)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAGAAGAGGAAAGAAAGGC GAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGA GAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCCGTG CGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTG CCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCT GCCTAAGCGTCCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTG CTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCC CTCCCTCAAAGGCGGGGCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCA GCTGGAAAGGGGCGGGGCCTGACGCGCGCGGCTCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGG TCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCC TCCGAGAGTCCAGGAGCGCCCGAGCGGAGAGGCGGCCCGGGAGCAGGGGGGCGGCCCCCA	

[0225]

	CTCCGGCCGGGTGCCCGGCCCCTGGCCCCTGCCTGCCCTCTAGATCGCCGCCGCAGCCGC CGCTACTGGGAGTCTG	
CNS-5 (서열 번호: 24)	ttgtAATGGGAATAAGGGCAGGACtcctgggtataagtagctcagctgatcccaccctgc ttctatgtgttaattcatttattcattcattcaacaagcatttgttgaaatgctctttgt gtcaggctcagcaggaagcagtggcaataaaatggtgaacaagaaagactcggggtttct tcatctatgttgatgtctgcagagaacagtatcagccttctaggaagtttgtaatcagat acattgttagagagatacttatctagtaaattcctactcatcctataaggctcaaaacaa atgcctctatgaaaccttccgtgattccctcaggcagagttaagagcttcctttcctggg cctctatctccttccattagtattataactgtttaccagtttcccctctagactaaattt ctcaaaagagagaatgaggtctctttcagtcttctttgcatctttaaactagcctgggtc ccagcctgtttgatgaaagaaacaagaacactgatacaagccacagccccttggcaaaaa agatacccaatagcaatggcaatgtaaaatcagttttagtaaatgaatcaagaattctga tgctttagggaaagtaatgtgaacctggcaccattaacaaattcagaactcttcttctta ggagctctctaactgaacagacagagggatgtcaacccctaattcagcttgatcgtatct cagcaactacatttaatgagacagtgggaaaaagagagctgtccacttttaaatcagcat atttctaactaaacaatggcaatggctaaatctttaaaatgcctatttctctcaagaaca ctgcaatggaacatttagactttgggaaagagattagtgatttacattgctatctcactg atttaatttaaatgctcttccaaaccaaacacacatgtgccgaagaggctactaagaaac ccaacatgcagagttctctataagtgcagccgacagtgttgactgaaactaaacttggaa atccagggcactaatgcacaatatcaagcaataaaacggcatctctttggcaatatttaa tttaaaaaagaagaaagagacaggcgaagatcaggcactgtctgttttggaggatcaacc attctgcatttcaaagcattggtccctgcaatatccaggttactgtgctagaatctcgac tattatatcgcagttgtgagagggagggcaaagatgtgtttactcagtgattaggcccttt agaataagcctctagctcctagagagacagctcaccacttattcatttgggccaattcac aaagcctaggaagattaaacatccatgctgagaagacaagcgaatgcagacggtgaaaaa gaaataaaaattctttaaaaactctgagatgacttcattatttttccacaaggaaacttt aggaaagtgtttagttagagaaaaacccacattgacctctctctaaacccttaatctttc ctttgtggtggcactgctttgtggtaagcgactggctcgcctcgcccctcttttcactgg aagctgagagaaaaaagactctggagaaacagttttcgttccagggacacaaacccctga cactgttaaacatgagatgccaggaaaacacacttaaaaaaaaaattcccactttaagct ttagactgaatgtgagaaaggagatgataaaaagagtatcacaaGAGAATCTTCAGGCTG TGGG	1744
CNS-6 (서열 번호: 25)	TTTGGCACTGTGAGCAGTTTACttgacaaattctgtcaaatatttgctttctgaaatctc gagaattggttgaatataattgtacttaatgtttgcaaaataaataaatatgggactaag gacgttctatcattaatttgtcagaaaagagagttgtcatttctgaaaatttaatgtcat tgaagctctatttccaatagcaaaggagcactattgctaatagacttcagagcttgaaat aaataaatctttggaatcctgttgcatctcttggggtgtgacatttgacagtcttttata gcacagaacgaaacaagtttgtgagctggaattcaattgtggcgtattgattccttgcat cagtcattattccctgctgattgacaggtgaaaattggttacgttaagtatttcatatgt tatattggctgacatttgcttgcctgctcttgtgtcaatattgttgtaaagatctccagc tttatgagatagcaatagacactgactgtggcttttgtgtgatgttccagtgtttttcct gacataatttaagacatattaaaaaccagcagcatcttccctcttgagaagcttaatgcc aatattattgtcttccaggggaagatcatgtatgctcataatcgggtgctaatttccacc agtacgctcatgtttaggcattaggcactataactgtaaaattgagccttcttgattgat tcatgtcaagcctcatctcggctcctgcaggggaagtcatccggctgacccttttacac taaaagaagagatttgtgttcctttctttcacctggaaccatcaaattgactgaataatc tgtaatacattagtgctgacatttgttagggagaattaaacaagacacagtaatcattcc ccagaataaaaattgtgtttgatttccagcagagttctattaaagggaggacagaatctg tctcttccaaggtggaaaatcgtgaatattccctgcattaatgaaccaagttaacacttt aattgcttatagaaccgagttctccaatgacagcattaaaagatagggaggctctgattt aTGGTCAACACAGATTTGTAACCC	1104
CNS-7 (서열 번호: 26)	TCAACATGGATAACCAAAGTTCTtaaaactacgctttcaatgaacacatatcctttgagc aagactaataatgaggaatgggagccagctcctgtgatatttatgcaactactaaattct cactgaagtcaatgggagtttgcttacgtaagggctgcaaactttagcctccagagatta aaggggaaaaaaatccttaaactctttcaacattaatattgcctgtaaggaatccagcca tgacctaagccatggagctttctgaacctagcaagtagaagggtaaacagtaaacaccag ttattttaagcacaatctaatcagagttcaatgagaagcaatattatatttgatctctaa ggtattaatacttgtatatcactattagacatctttatgtagtccattatccaaacaatg gcttaagtctgtggtatttaataaatcaagtttccatggccgtgagactgagtgggagtg gggatgaagccttttttcttcatttttttttcctcaggtgcaattctgtgttaatataag	1941

[0226]

	agaagtgtggccttccttctcatagcactaaaagtgagataatccctgtgtaagaaatca gtaagtacggtctgcttaatctagtcccagtgtgaaactgttgacatttgttctttttc tatcattatgtgactgggcctgttttgtgctggattaggcacaaatctcctatgcagcac atttggcatgttactagtagtttaacttcattaataatgtatgaagaaaatgtaatccat gacaaggaagcaaagaaaagtatttttttttttttttgcttctcccaaatcctttggaat gagtaattattcaacattttatgtttgatgttatattttacaattcaacttccatagtga tatttaaaaaagaaactttggcaaatgcttgcaaaaaacacacctttacaattttaaat gtgatttactgatggccagaacttgttaaacatagtaggaaattaaatatttattcatct tatttcattttcagggccgtaaacgctccttctgagtcattcccaataacaagaatttct accagtaaagctattaacaggcatcaaaataggggagtgctaaattaagatgagattgta aaagcaaataagaacatacgcagactcgcataggagtgcaaatgatcgtttctgattgaa atgtttatagctaaatgagtttggctgaattaaacacaaatgttccaaaagataagccgt agctggtgcttctttttttctgtttttttaagctgctttacagacgaaaatggaactatatt tggaacaatgctttctgtttttccatactattgatatttgtggaaagtcacaaaatggcc taaggaagctaagctcgccccaagcagtggtcacttacaagtacttttgtactctgtact cctgtcacatttgggcgatcagagcaacagctggggagacttttttcaacaaagatgagtg tcagataatcctgatgagattccacatccaacatcttttgtaattatgtcacattcagct gtaatggaataattcaagctgaaagaacaagctttgatcctttcttaaacctttccctgt ggactggctatctaaaagatttaaagatatttctgttacaagatctagtgtttcctcaga gaagtcatgcttctgaagcatcgtgatctacaagaacaatatcaagtttgccaaacacat ttctgaaagcatcgtgttttgggggggagggggttgtatttaatgaagatatcaataatatg ctatgcttcaattttcatctaggtgatcaagattcattttcttgttctgtcatccaaata ggcagacagaaaagtgattgaaatacattaTGGAGATGTGTCATTGCACA	
CNS-8 (서열 번호: 27)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACTATATTT GGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCACAAAATGGCCT AAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTC CTGTCACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGT CAGATAATCCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTTGTAATTATGTCACATTCAGCTG TAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTG GACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTTTCCTCAGAG AAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATT TCTGAAAGCATCGTGTTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGC	540

[0227]

[0228] 표 2 - CNS-특이적 프로모터

이름	서열	길이
CNS-1 (서열 번호 : 28)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCCTGGGCGC CTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCCTGTCTGGGAGATGAGCATTTAGG AATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAG ATTGGATGGAAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAGT AAACAGCCGCTGCCCTGTCCTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAGGCCTGTTTGGACA GCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGGCTGATAGATGGGGATGGGCGGACT GTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTGCTATGTGCTTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGT AGCCAGAAGGTGGTCCTGGCTGTGCCCCCAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTCTAGTTC TGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCTCCTCCCCGCACC AGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCCCAGTGGTGACTAGGGGCAGAATATG TCTCTGAGTGAGTGTCTGGAGCCCTCCTCACCCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAGT CAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	696
CNS-2 (서열 번호 : 29)	GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACACAGACACTGAAAGAATCCTAGGCCTGGTAGG CACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAGAGACCCAAGCCCCTC ATAGGAACAGTGAGAAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGTAACTTTATCTAAAGTCATAGGCT CCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACCAGATCTACCAGCTAGC CTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGCAGCACCGGCTGTGGCCGATGCCAGCCAGGTAGC CGGTTTCCCACGTCCCCCGCACGCACGCACCTCTTTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCC GACCTGGAGTAGGGGGGGTGGTGAGTGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTT CGTTCCTGTACATCCAGCTCGCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGACTCA AGCGCAACTTTGAATCATCACGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTATTTCATTTATCTTT GAAAACGAGGGAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGGATGGGCCAAGGGTGAGTTGGCCCCCG	709

[0229]

	GGGAGCTGGTCCCTGTTCCTGGCTTTAGTCCCAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGCGGGC TGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	
CNS-3 (서열 번호 : 30)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGCGGGCTGGACATGAGC AGCGGCTGCCGGTCCTGGGACTAGGCCCCGCCATTTTGGATCCGCTGACAGGTCAGCGAA GTCTCTTCCTAGAGTTCCGGTGTCGTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAATAGGGAATTAGT GGGAAGGGCCCTTAAATTGGGCGAGCCAAGGTGGGGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAG GGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGT CTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCCGTGCGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCT CGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTGCCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGG ACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTCCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTG CCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGG GGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGCGGGGCCTGGAGATCCACAG CTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAAGGGGCGGGGCCTGACGCGCGCGGC TCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGG GTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAGCGCC	
CNS-4 (서열 번호 : 31)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAGAAGAGGAAAGAAAGGC GAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGA GAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCCGTG CGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTG CCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCT GCCTAAGCGTCCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTG CTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCC CTCCCTCAAAGGCGGGGCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCA GCTGGAAAGGGGCGGGGCCTGACGCGCGCGGCTCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGG TCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCC TCCGAGAGTCCAGGAGCGCCCGAGCGGAGAGGCGGCCCGGGAGCAGGGGGGCGGCCCCCA CTCCGGCCGGGTGCCCGGCCCCTGGCCCCTGCCTGCCCTCTAGATCGCCGCCGCAGCCGC CGCTACTGGGAGTCTG	
CNS-5_v2 (서열 번호 : 32)	ttgtAATGGGAATAAGGGCAGGACtcctgggtataagtagctcagctgatcccaccctgc ttctatgtgttaattcatttattcattcattcaacaagcatttgttgaaatgctctttgt gtcaggctcagcaggaagcagtggcaataaaatggtgaacaagaaagactcggggtttct tcatctatgttgatgtctgcagagaacagtatcagccttctaggaagtttgtaatcagat acattgttagagagatacttatctagtaaattcctactcatcctataaggctcaaaacaa atgcctctatgaaaccttccgtgattccctcaggcagagttaagagcttcctttcctggg cctctatctccttccattagtattataactgtttaccagtttcccctctagactaaattt ctcaaaagagagaatgaggtctctttcagtcttctttgcatctttaaactagcctgggtc ccagcctgtttgatgaaagaaacaagaacactgatacaagccacagccccttggcaaaaa agatacccaatagcaatggcaatgtaaaatcagttttagtaaatgaatcaagaattctga tgctttagggaaagtaatgtgaacctggcaccattaacaaattcagaactcttcttctta ggagctctctaactgaacagacagagggatgtcaacccctaattcagcttgatcgtatct cagcaactacatttaatgagacagtgggaaaaagagagctgtccacttttaaatcagcat atttctaactaaacaatggcaatggctaaatctttaaaatgcctatttctctcaagaaca ctgcaatggaacatttagactttgggaaagagattagtgatttacattgctatctcactg atttaatttaaatgctcttccaaaccaaacacacatgtgccgaagaggctactaagaaac ccaacatgcagagttctctataagtgcagccgacagtgttgactgaaactaaacttggaa atccagggcactaatgcacaatatcaagcaataaaacggcatctctttggcaatatttaa tttaaaaaagaagaaagagacaggcgaagatcaggcactgtctgttttggaggatcaacc attctgcatttcaaagcattggtccctgcaatatccaggttactgtgctagaatctcgac tattatatcgcagttgtgagagggagggcaaagatgtgtttactcagtgattaggccctt agaataagcctctagctcctagagagacagctcaccacttattcatttgggccaattcac aaagcctaggaagattaaacatccatgctgagaagacaagcgaatgcagacggtgaaaaa gaaataaaaattctttaaaaactctgagatgacttcattatttttccacaaggaaacttt aggaaagtgtttagttagagaaaaacccacattgacctctctctaaacccttaatctttc ctttgtggtggcactgctttgtggtaagcgactggctcgcctcgccctcttttcactgg aagctgagagaaaaaagactctggagaaacagttttcgttccagggacacaaaccccctga cactgttaaacatgagatgccaggaaaacacacttaaaaaaaaaattcccactttaagct ttagactgaatgtgagaaaggagatgataaaaagagtatcacaaGAGAATCTTCAGGCTG TGGG	1744
CNS-6_v2	TTTGGCACTGTGAGCAGTTTACttgacaaattctgtcaaatatttgctttctgaaatctc gagaattggttgaatataattgtacttaatgtttgcaaaataaataaatatgggactaag	1104

[0230]

(서열 번호 : 33)	gacgttctatcattaatttgtcagaaaagagagttgtcatttctgaaaatttaatgtcat tgaagctctatttccaatagcaaaggagcactattgctaatagacttcagagcttgaaat aaataaatctttggaatcctgttgcatctcttggggtgtgacatttgacagtcttttata gcacagaacgaaacaagtttgtgagctggaattcaattgtggcgtattgattccttgcat cagtcattattccctgctgattgacaggtgaaaattggttacgttaagtatttcatatgt tatattggctgacatttgcttgcctgctcttgtgtcaatattgttgtaaagatctccagc tttatgagatagcaatagacactgactgtggcttttgtgtgatgttccagtgtttttcct gacataatttaagacatattaaaaaccagcagcatcttccctcttgagaagcttaatgcc aatattattgtcttccaggggaagatcatgtatgctcataatcgggtgctaatttccacc agtacgctcatgtttaggcattaggcactataactgtaaaattgagccttcttgattgat tcatgtcaagcctcatctcggctcctgcaggggaagtcatccggctgacccttttacac taaaagaagagatttgtgttcctttctttcacctggaaccatcaaattgactgaataatc tgtaatacattagtgctgacatttgttagggagaattaaacaagacacagtaatcattcc ccagaataaaaattgtgtttgatttccagcagagttctattaaagggaggacagaatctg tctcttccaaggtggaaaatcgtgaatattccctgcattaatgaaccaagttaacacttt aattgcttatagaaccgagttctccaatgacagcattaaaagatagggaggctctgattt aTGGTCAACACAGATTTGTAACCC	
CNS-7_v2 (서열 번호 : 34)	TCAACATGGATAACCAAAGTTCTtaaaactacgctttcaatgaacacatatcctttgagc aagactaataatgaggaatgggagccagctcctgtgatatttatgcaactactaaattct cactgaagtcaatgggagtttgcttacgtaagggctgcaaactttagcctccagagatta aaggggaaaaaaatccttaaactctttcaacattaatattgcctgtaaggaatccagcca tgacctaagccatggagctttctgaacctagcaagtagaagggtaaacagtaaacaccag ttattttaagcacaatctaatcagagttcaatgagaagcaatattatatttgatctctaa ggtattaatacttgtatatcactattagacatctttatgtagtccattatccaaacaatg gcttaagtctgtggtatttaataaatcaagtttccatggccgtgagactgagtgggagtg gggatgaagccttttttcttcatttttttttcctcaggtgcaattctgtgttaatataag agaagtgtggccttccttctcatagcactaaaagtgagataatccctgtgtaagaaatca gtaagtacggtctgcttaatctagtcccagtgtgaaactgttgacatttgttctttttc tatcattatgtgactgggcctgttttgtgctggattaggcacaaatctcctatgcagcac atttggcatgttactagtagtttaacttcattaataatgtatgaagaaaatgtaatccat gacaaggaagcaaagaaaagtatttttttttttttttgcttctcccaaatcctttggaat gagtaattattcaacattttatgtttgatgttatattttacaattcaacttccatagtga tatttaaaaaagaaacttggcaaatgcttgcaaaaaacacacctttacaatttaaat gtgatttactgatggccagaacttgttaaacatagtaggaaattaaatatttattcatct tatttcattttcagggccgtaaacgctccttctgagtcattcccaataacaagaatttct accagtaaagctattaacaggcatcaaaatagggagtgctaaattaagatgagattgta aaagcaaataagaacatacgcagactcgcataggagtgcaaatgatcgtttctgattgaa atgtttatagctaaatgagtttggctgaattaaacacaaatgttccaaaagataagccgt agctggtgcttcttttttctgttttttaagctgctttacagacgaaaatggaactatatt tggaacaatgctttctgttttttccatactattgatatttgtggaaagtcacaaaatggcc taaggaagctaagctcgccccaagcagtggtcacttacaagtacttttgtactctgtact cctgtcacatttgggcgatcagagcaacagctggggagacttttttcaacaaagatgagtg tcagataatcctgatgagattccacatccaacatcttttgtaattatgtcacattcagct gtaatggaataattcaagctgaaagaacaagctttgatcctttcttaaacctttccctgt ggactggctatctaaaagatttaaagatatttctgttacaagatctagtgtttcctcaga gaagtcatgcttctgaagcatcgtgatctacaagaacaatatcaagtttgccaaacacat ttctgaaagcatcgtgttttgggggggaggggttgtatttaatgaagatatcaataatatg ctatgcttcaattttcatctaggtgatcaagattcattttcttgttctgtcatccaaata ggcagacagaaaagtgattgaaatacattaTGGAGATGTGTCATTGCACA	1941
CNS-8_v2 (서열 번호 : 35)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACTATATTT GGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCACAAAATGGCCT AAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTC CTGTCACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGT CAGATAATCCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTTGTAATTATGTCACATTCAGCTG TAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTG GACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTTTCCTCAGAG AAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATT TCTGAAAGCATCGTGTTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGC	540
CNS-1 +	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCCTGGGCGC CTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCCTGTCTGGGAGATGAGCATTTAGG	982

[0231]

CMV-IE UTR 및 인트론 (서열 번호 : 36)	AATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAG ATTGGATGGAAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAGT AAACAGCCGCTGCCCTGTCCTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAGGCCTGTTTGGACA GCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGGCTGATAGATGGGGATGGGCGGACT GTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTGCTATGTGCTTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGT AGCCAGAAGGTGGTCCTGGCTGTGCCCCCAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTCTAGTTC TGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCTCCTCCCCGCACC AGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCCCAGTGGTGACTAGGGGCAGAATATG TCTCTGAGTGAGTGTCTGGAGCCCTCCTCACCCCAACACCATGGGGCTGGGCATAAAAGT CAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTG TTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCAT TGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGACTCTATAGGCA CACCCCTTTGGCTCTTATGCATGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTT GCTGCCGCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCTTTCCATG GGTCTTTTCTGCAGATGCCACC	
CNS-4+ CMV-IE UTR 및 인트론 (서열 번호 : 37)	AAGGAGAATGGTAAACAGCAGGAGCGAAGCGGCTGAGGAGAAAGAAGAGGAAAGAAAGGC GAGACGTGGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGA GAAAATCGGCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCCGTG CGCCTTCCCACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTG CCAGCCGATCCCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCT GCCTAAGCGTCCTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTG CTGAAGAGCGCTTCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCC CTCCCTCAAAGGCGGGGCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCA GCTGGAAAGGGGCGGGGCCTGACGCGCGCGGCTCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGG TCTGCCATAAAGTGAATGGGCGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCTCAGATCGCCTGGAGA CGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGC CGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTAT AGACTCTATAGGCACACCCCTTTGGCTCTTATGCATGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCT GAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGAC TGTTCCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGATGCCACC	876
CNS-5 (서열 번호 : 38)	GGAACATTTAGACTTTGGGAAAGAGATTAGTGATTTACATTGCTATCTCACTGATTTAAT TTAAATGCTCTTCCAAACCAAACACACATGTGCCGAAGAGGCTACTAAGAAACCCAACAT GCAGAGTTCTCTATAAGTGCAGCCGACAGTGTTGACTGAAACTAAACTTGGAAATCCAGG GCACTAATGCACAATATCAAGCAATAAAACGGCATCTCTTTGGCAATATTTAATTTAAAA AAGAAGAAAGAGACAGGCGAAGATCAGGCACTGTCTGTTTTGGAGGATCAACCATTCTGC ATTTCAAAGCATTGGTCCCTGCAATATCCAGGTTACTGTGCTAGAATCTCGACTATTATA TCGCAGTTGTGAGAGGGAGGGCAAAGATGTGTTTACTCAGTGATTAGGCCCTTAGAATAA GCCTCTAGCTCCTAGAGAGACAGCTCACCACTTATTCATTTGGGCCAATTCACAAAGCCT AGGAAGATTAAACATCCATGCTGAGAAGACAAGCGAATGCAGACGGTGAAAAAGAAATAA AAATTCTTTAAAAACTCTGAGATGACTTCATTATTTTTCCACAAGGAAACTTTAGGAAAG TGTTTAGTTAGAGAAAAACCCACATTGACCTCTCTCTAAACCCTTAATCTTTCCTTTGTG GTGGCACTGCTTTGTGGTAAGCGACTGGCTCGCCTCGCCCCTCTTTTCACTGGAAGCTGA GAGAAAAAAGACTCTGGAGAAACAGTTTTCGTTCCAGGGACACAAACCCCTGACACTGTT AAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	835
CNS-6 (서열 번호 : 39)	GAAAATTTAATGTCATTGAAGCTCTATTTCCAATAGCAAAGGAGCACTATTGCTAATAGA CTTCAGAGCTTGAAATAAATAAATCTTTGGAATCCTGTTGCATCTCTTGGGGTGTGACAT TTGACAGTCTTTTATAGCACAGAACGAAACAAGTTTGTGAGCTGGAATTCAATTGTGGCG TATTGATTCCTTGCATCAGTCATTATTCCCTGCTGATTGACAGGTGAAAATTGGTTACGT TAAGTATTTCATATGTTATATTGGCTGACATTTGCTTGCCTGCTCTTGTGTCAATATTGT TGTAAAGATCTCCAGCTTTATGAGATAGCAATAGACACTGACTGTGGCTTTTGTGTGATG TTCCAGTGTTTTTCCTGACATAATTTAAGACATATTAAAAACCAGCAGCATCTTCCCTCT TGAGAAGCTTAATGCCAATATTATTGTCTTCCAGGGGAAGATCATGTATGCTCATAATCG GGTGCTAATTTCCACCAGTACGCTCATGTTTAGGCATTAGGCACTATAACTGTAAAATTG AGCCTTCTTGATTGATTCATGTCAAGCCTCATCTCGGCTCCTGCAGGGGAAGTCATCCGG CTGACCCTTTTTACACTAAAAGAAGAGATTTGTGTTCCTTTCTTTCACCTGGAACCATCA AATTGACTGAATAATCTGTAATACATTAGTGCTGACATTTGTTAGGGAGAATTAAACAAG ACACAGTAATCATTCCCCAGAATAAAAATTGTGTTTGATGGGCTGGGCATAAAAGTCAGG GCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	812
CNS-7 (서열	TGAGACTGAGTGGGAGTGGGGATGAAGCCTTTTTTCTTCATTTTTTTTTCCTCAGGTGCA ATTCTGTGTTAATATAAGAGAAGTGTGGCCTTCCTTCTCATAGCACTAAAAGTGAGATAA	487

[0232]

번호 : 40)	TCCCTGTGTAAGAAATCAGTAAGTACGGTCTGCTTAATCTAGTCCCAGTGTGAAACTGTT GACATTTGTTCTTTTTTCTATCATTATGTGACTGGGCCTGTTTTGTGCTGGATTAGGCAC AAATCTCCTATGCAGCACATTTGGCATGTTACTAGTAGTTTAACTTCATTAATAATGTAT GAAGAAAATGTAATCCATGACAAGGAAGCAAAGAAAAGTATTTTTTTTTTTTTTTGCTTC TCCCAAATCCTTTGGAATGAGTAATTATTCAACATTTTATGTTTGATGTTATATTTTACA ATTCAACTTCCATAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTT GCTTCTG	
CNS-8 (서열 번호 : 41)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACTATATTT GGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCACAAAATGGCCT AAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTC CTGTCACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGT CAGATAATCCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTTGTAATTATGTCACATTCAGCTG TAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTG GACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTTTCCTCAGAG AAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATT TCTGAAAGCATCGTGTTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGC GGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG	593

[0233]

[0234] 표 3 - 표 2의 프로모터에 포함된 최소/근위 프로모터

이름	서열
SYNP_CRE151 (서열 번호: 42)	GGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG
CRE0001v1_Pitx3 (서열 번호: 43)	GGGAGGATTGGAACAGAGACAAAAGGGAGGAGAGACGGACAGCGACAAGTGGAGAAAATCG GCGAAACTTGAGTGGCAGAGAAGTCTGAGCGCTGAGACCCGGCGGCCCCGTGCGCCTTCCC ACCTGGCGCCGATCCACTTTCCTCGGGGTAGCGGCCCAACCCACTTCGCTGCCAGCCGATC CCTTTTACCCGTGGCTACCGGGACCACTCTACTCTCGCCCACTTGGCTCTGCCTAAGCGTC CTAGCCGGAGCGCGGTCTCTGCCACGTGGGGAGGGGCGCGGCCGAGTTGCTGAAGAGCGCT TCTGATTGGCCAGAGGGCGGGGTTCTTGGCGTCTCGCCGGCCAGACCCCTCCCTCAAAGGC GGGGCCTGGAGATCCACAGCTGGAAAGGGCGGAGCCCCAGCAGGGCAGCTGGAAAGGGGCG GGGCCTGACGCGCGCGGCTCGCCGCGGCGGGCTGGGGGCGCCCTGGTCTGCCATAAAGTGA ATGGGCGCCGGCTGGGGGTGGCAGTACGCGGTGAGGCTCACTCCCTCCGAGAGTCCAGGAG CGCC

[0235]

[0236] 표 4 - 합성 CNS-특이적 프로모터 개요

프로모터 이름	최소 / 근위 프로모터	CRE	UTR
CNS-1	SYNP_CRE151	CRE0004_Lmx1b	
CNS-2	SYNP_CRE151	CRE0003_Pitx3	
CNS-3	CRE0001v1_Pitx3	CRE0002_Gbf1	
CNS-4	CRE0001_Pitx3		
CNS-5_v2	CRE0005_faf1		
CNS-6_v2	CRE0006_Pitx2		
CNS-7_v2	CRE0007_Pitx2		
CNS-8_v2	CRE0008_Pitx2		
CNS-1 + CMV-IE UTR 및 인트론	SYNP_CRE151	CRE0004_Lmx1b	CMV-IE UTR 및 인트론
CNS-4 + CMV-IE UTR 및 인트론	CRE0001_Pitx3		CMV-IE UTR 및 인트론
CNS-5	SYNP_CRE151	CRE0005_faf1_단축	
CNS-6	SYNP_CRE151	CRE0006_Pitx2_단축	
CNS-7	SYNP_CRE151	CRE0007_Pitx2_단축	

[0237]

CNS-8	SYNP_CRE151	CRE0008_Pitx2_단축	

[0238]

[0239] 표 5 - 예시적인 CRE들

이름	서열
CRE0006_GFAP (서열 번호: 44)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCA
CRE0008_GFAP (서열 번호: 45)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAG GAAAGGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGC TGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGA
CRE0006_AQP4 (서열 번호: 46)	CTAGCCCACAGGAAATGTCTGTCTATATCCAGGCAAGTACCTTGCTCATTGGACCAACCC GAAACTGTTCAGGGAAGATCAGGGAAATCAACTCAGTTACAAATGGGATAATCATGCCCA GTAAAAACTACCTGTGGTGAATAAAGAGTTAACCCCTGTTCCATCTTAGGTCACTATGCA GAGTACCAATGAGTACAAGAGATGGTGCCAAAGAGGGTGGCCCCTCCCTAGCTGGGAACA GTCAACCCTTAGGAACTAGACTGTCAACACATCAGCCAGCCAGAGACAAGGGAAACCGTG GCAACCAAGTGTTGCTGGCACATTGTGAGGTGGTGATGGGAACTGCAGAGGCCCTGCACA GCATGCTAATGAGCCCAGGCAAACAT
CRE0008_AQP4 (서열 번호: 47)	TCCAAAGAAAAGCCAGATAAGTAGCTGATTATTGCATAGAGCTGACAGTATCACAGGAAG ATCAGTAGTAGCAGCTCAAGTACAAAAAGGTTAATTAGCAATACTTAATAAGAAAAACTA CCTCTGGCAGGTGAAGAGTTAATCCCTGGTCAATTTTAAGCTACTCTGCTGAGAGTACTA ATAAGTGTAGGGGTTGGAGCCAATGAGGGTGACCCCTTCCTTGATGGGAACAGTCATCCC TTAGGAACTGCCCTGGAAAGCATCAGCCAGCCAGAAAACAGGGAAAGAGGCTGAGAAACC GTGGTAACCAAGTTTTGCTGGCACTTTGTAAAATGGTAACTGCAACTGCCGAGGCTGTGC AGAGAATGCTAATAAGCCTAGGACAACCTGTAAAGAGTGGACCTAGAAAATGTCCACC
CRE0005_GFAP (서열 번호: 48)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCAC CGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCC CAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCA AGGACACAAATGGGTGAGGGGA
CRE0007_GFAP (서열 번호: 49)	AACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTG GCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGC ATTGGGCTGGCCGCCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCA CAGACACAATGTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCCTCA AATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCT GGCATCTTGGGATAAAAGCAGCAC
CRE0012_Arc (서열 번호: 50)	AGCGCGCAGAGTCTGCATGCGTGAGGAAGCTCCTGGGCGCGTCACAGCCGCGCTATTCTC AGCGTCTCTCCTTTTATGGCTCCGGAAGTGAGCTGGGGTTGCTGGCAGCCTGGCTGGCAC T
CRE0001_S100B (서열 번호: 51)	CTTCCTCTTATATTTCACCAAGACTCAGTTCCTGAGCAAGAAACCACAGGCACAGCAAGT GCCATGAAAAGCGGCTTTGTGTGGGGTGGGCTCTTCACACTCCAATCTCCACTTCCTTCT CAAGGCCTCAAAAAAAGTTGAAAAATGAAAACAAAAGCCCTGCTGTGTTGAGCTGGGCTC TGGCGTTGCCATGGACCCAGGGCAAACAGCGGTGCTCCTGCTCTGCCCCCGGCTCAGCTC ATGCTGGGCCTGCACTTCTGGAAGGGAGCATGGACTTTGGAATGACTGGTTAGAACCCAA

[0240]

	ATGAATTAATGGAATTTGACATAGTTCAAAAATAATAAAATGTGATACCCATGAAATGCT GATATTCTGCCTTAATTTGCCAGATTGGGGGCC
CRE0009_S100B (서열 번호: 52)	TTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACCCCATGG CTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTCATTGCA TCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTTTAGAAC ACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGTGGCTTG GTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTTTCTGGA ATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCTAGTTGA TTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAA
CRE0002_S100B (서열 번호: 53)	TCAGGGGTGCAGCTTTTTTTCTGTCTTTTACTCAGCCTGAGAAAGGTTGTCGTTTGACAA GGTTTGTTCAGAGGTCGGATCTGAATCCAGCTCCAAGGCCCCAGCACCCAAGCCCTGACC CCATGGCTGCCTGCTGGCTGGGAGTGGCATTCTTTAGAACAGGAAAGGCAGTGAGTTCTC ATTGCATCAATACTTGCATTTGCTACAACAGAAGCTTTTTGTCTCTTCCTCACATTCCTT TAGAACACAAGCCTCCTTTTCTGCCTGTGGCCATCGGTCACTGGAGTCAGCCTCGTGAGT GGCTTGGTGGCGGATGGCACCGTCCTTTGTGGGAGAAAACAATGTTGCTGCCCAGGCCTT TCTGGAATGACCCCTTCCCACCCCCTGACCAGCCCCAGCAAGGCCCGGGGCTGGCTGCCT AGTTGATTGGAGCCAAGAGTTTGCTGAATGGATGAAGGGAGAAGGGACATCCAAGTGACT GAAGAAGATCTTAACAGAA

[0241]

[0242] 표 6. 표 2의 프로모터에 포함된 시스-조절 요소(CRE)

이름	서열
CRE0004_Lmx1b (서열 번호 : 54)	CTGGGCAGAGAGGGGGCATCGGGGGCATGGCTAGGGGCCAGCACTGTGCTTCCTGGGCGC CTCACCTCCTCCCTGACTCCTGGAGACTCCCAGCCCCTGTCTGGGAGATGAGCATTTAGG AATCTGCTTGTGCAGGGGTGGTGGGAGGGGCCGGGGTGGAGGGCGCATCCCCACGGGGAG ATTGGATGGAAATGGCCTGCCAGTGTGTGTGTGAGTGTGCGCCTGTGGCAGCAGCAGAGT AAACAGCCGCTGCCCTGTCCTCTCTGCGGCCGTGGCCAGGTACACAGGCCTGTTTGGACA GCTGCCTTGTCTGTCCGTCTGTTTGGGAGATGCTGGCTGATAGATGGGGATGGGCGGACT GTTAACCCCTCGTTGCCTGCACTGCTATGTGCTTCCTGCCTCATCCATGGGGTAGAAGGT AGCCAGAAGGTGGTCCTGGCTGTGCCCCCAGCTCCTCTCTAGGGGGGAAACCTCTAGTTC TGAGTCAGGGACAGAGTGAGGAGGGCTCCAGGGCATCAAGAGCTTGCTCCTCCCCGCACC AGGGAGCCAAGGACAGAGGAGAAGGGGGTCTTCCCCAGTGGTGACTAGGGGCAGAATATG TCTCTGAGTGAGTGTCTGGAGCCCTCCTCACCCCAACACCATG
CRE0003_Pitx3 (서열 번호 : 55)	GGTGTGTGGAAGGGTGAGAGGCACACACACAGACACTGAAAGAATCCTAGGCCTGGTAGG CACTTAACAAATGTCTGTTACAGACCAGAATTTTATTGCTGTTAGAGACCCAAGCCCCTC ATAGGAACAGTGAGAAACAGGTGCAGAAAGGCGGAGTAACTTTATCTAAAGTCATAGGCT CCCTGAATAGCAGAGCTGACACCTACAAGGAAGCGTTGGAGACCAGATCTACCAGCTAGC CTCCCTGAGACCACGAGGTGGCGCCGCAGCACCGGCTGTGGCCGATGCCAGCCAGGTAGC CGGTTTCCCACGTCCCCCGCACGCACGCACCTCTTTGCTGCAGGAATCCCGGGCTGCCCC GACCTGGAGTAGGGGGGGTGGTGAGTGGGACTGAGTCCCTAGAAGCCTGGACCCTCACTT CGTTCCTGTACATCCAGCTCGCCTGTAGACAGTGGGGGAGGATGAAGGGAAGAGGACTCA AGCGCAACTTTGAATCATCACGCCTTCGACAGTCCGCGCACGTTTATTTCATTTATCTTT GAAAACGAGGGAGGGGAAGCCTGGAGAAGGCGGGATGGGCCAAGGGTGAGTTGGCCCCCG GGGAGCTGGTCCCTGTTCCTGGCTTTAGTCCCAGGGGCGCGGTCTGTGTGTAGGGC
CRE0002_Gbf1 (서열 번호 : 56)	TGCTACCAGAGCCGGGAGAGCTGCTCGGAGACGCCTCCGGGGTGCGGGCTGGACATGAGC AGCGGCTGCCGGTCCTGGGACTAGGCCCCGCCATTTTGGATCCGCTGACAGGTCAGCGAA GTCTCTTCCTAGAGTTCCGGTGTCGTGAAGGCCGCCCTGACATCGCAATAGGGAATTAGT GGGAAGGGCCCTTAAATTGGGCGAGCCAAGGTGGG
CRE0005_faf1_단축 (서열 번호 : 57)	GGAACATTTAGACTTTGGGAAAGAGATTAGTGATTTACATTGCTATCTCACTGATTTAAT TTAAATGCTCTTCCAAACCAAACACACATGTGCCGAAGAGGCTACTAAGAAACCCAACAT GCAGAGTTCTCTATAAGTGCAGCCGACAGTGTTGACTGAAACTAAACTTGGAAATCCAGG GCACTAATGCACAATATCAAGCAATAAAACGGCATCTCTTTGGCAATATTTAATTTAAAA AAGAAGAAAGAGACAGGCGAAGATCAGGCACTGTCTGTTTTGGAGGATCAACCATTCTGC ATTTCAAAGCATTGGTCCCTGCAATATCCAGGTTACTGTGCTAGAATCTCGACTATTATA TCGCAGTTGTGAGAGGGAGGGCAAAGATGTGTTTACTCAGTGATTAGGCCCTTAGAATAA GCCTCTAGCTCCTAGAGAGACAGCTCACCACTTATTCATTTGGGCCAATTCACAAAGCCT AGGAAGATTAAACATCCATGCTGAGAAGACAAGCGAATGCAGACGGTGAAAAAGAAATAA

[0243]

	AAATTCTTTAAAAACTCTGAGATGACTTCATTATTTTTCCACAAGGAAACTTTAGGAAAG TGTTTAGTTAGAGAAAAACCCACATTGACCTCTCTCTAAACCCTTAATCTTTCCTTTGTG GTGGCACTGCTTTGTGGTAAGCGACTGGCTCGCCTCGCCCCTCTTTTCACTGGAAGCTGA GAGAAAAAAGACTCTGGAGAAACAGTTTTCGTTCCAGGGACACAAACCCCTGACACTGTT AA
CRE0006_Pitx2_단축 (서열 번호 : 58)	GAAAATTTAATGTCATTGAAGCTCTATTTCCAATAGCAAAGGAGCACTATTGCTAATAGA CTTCAGAGCTTGAAATAAATAAATCTTTGGAATCCTGTTGCATCTCTTGGGGTGTGACAT TTGACAGTCTTTTATAGCACAGAACGAAACAAGTTTGTGAGCTGGAATTCAATTGTGGCG TATTGATTCCTTGCATCAGTCATTATTCCCTGCTGATTGACAGGTGAAAATTGGTTACGT TAAGTATTTCATATGTTATATTGGCTGACATTTGCTTGCCTGCTCTTGTGTCAATATTGT TGTAAAGATCTCCAGCTTTATGAGATAGCAATAGACACTGACTGTGGCTTTTGTGTGATG TTCCAGTGTTTTTCCTGACATAATTTAAGACATATTAAAAACCAGCAGCATCTTCCCTCT TGAGAAGCTTAATGCCAATATTATTGTCTTCCAGGGGAAGATCATGTATGCTCATAATCG GGTGCTAATTTCCACCAGTACGCTCATGTTTAGGCATTAGGCACTATAACTGTAAAATTG AGCCTTCTTGATTGATTCATGTCAAGCCTCATCTCGGCTCCTGCAGGGGAAGTCATCCGG CTGACCCTTTTTACACTAAAAGAAGAGATTTGTGTTCCTTTCTTTCACCTGGAACCATCA AATTGACTGAATAATCTGTAATACATTAGTGCTGACATTTGTTAGGGAGAATTAAACAAG ACACAGTAATCATTCCCCAGAATAAAAATTGTGTTTGAT
CRE0007_Pitx2_단축 (서열 번호 : 59)	TGAGACTGAGTGGGAGTGGGGATGAAGCCTTTTTTCTTCATTTTTTTTTCCTCAGGTGCA ATTCTGTGTTAATATAAGAGAAGTGTGGCCTTCCTTCTCATAGCACTAAAAGTGAGATAA TCCCTGTGTAAGAAATCAGTAAGTACGGTCTGCTTAATCTAGTCCCAGTGTGAAACTGTT GACATTTGTTCTTTTTTCTATCATTATGTGACTGGGCCTGTTTTGTGCTGGATTAGGCAC AAATCTCCTATGCAGCACATTTGGCATGTTACTAGTAGTTTAACTTCATTAATAATGTAT GAAGAAAATGTAATCCATGACAAGGAAGCAAAGAAAAGTATTTTTTTTTTTTTTTGCTTC TCCCAAATCCTTTGGAATGAGTAATTATTCAACATTTTATGTTTGATGTTATATTTTACA ATTCAACTTCCATA
CRE0008_Pitx2_단축 (서열 번호 : 60)	GCTGGTGCTTCTTTTTTCTGTTTTTTAAGCTGCTTTACAGACGAAAATGGAACTATATTT GGAACAATGCTTTCTGTTTTTCCATACTATTGATATTTGTGGAAAGTCACAAAATGGCCT AAGGAAGCTAAGCTCGCCCCAAGCAGTGGTCACTTACAAGTACTTTTGTACTCTGTACTC CTGTCACATTTGGGCGATCAGAGCAACAGCTGGGGAGACTTTTTCAACAAAGATGAGTGT CAGATAATCCTGATGAGATTCCACATCCAACATCTTTTGTAATTATGTCACATTCAGCTG TAATGGAATAATTCAAGCTGAAAGAACAAGCTTTGATCCTTTCTTAAACCTTTCCCTGTG GACTGGCTATCTAAAAGATTTAAAGATATTTCTGTTACAAGATCTAGTGTTTCCTCAGAG AAGTCATGCTTCTGAAGCATCGTGATCTACAAGAACAATATCAAGTTTGCCAAACACATT TCTGAAAGCATCGTGTTTTGGGGGGAGGGGTTGTATTTAATGAAGATATCAATAATATGC

[0244]

[0245] 일부 실시형태에서, 프로모터는 시냅신(Syn1) 프로모터(예컨대, 서열 번호: 61 참조)이다. 일 국면에서, 프로

모터는 서열 번호: 61에 대해 적어도 80% 동일한, 예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다. 일 국면에서, 서열 번호: 61에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열, 예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.

[0246] 시냅신-1(서열 번호: 61)

GAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCC
TACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCA
TCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTT
CAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACT
GAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCG
CGTCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACG

[0247]

GGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGC

[0248] GGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCG **(서열 번호: 61)**

[0249] 일 실시형태에서, 핵산은, 예를 들어, 특정 CNS 조직 또는 세포 유형으로 발현을 유도하는 데 도움이 되는 인핸서 서열을 더 포함한다. 예시적인 인핸서 서열이 예컨대, US 특허 출원 제17/283,232호; US17/291,584; 또는 국제 특허 공개 번호 WO2020168279A2; WO2021195591A2; WO2021248085A2; WO2021216778A2에 설명되어 있고; 각각의 내용은 그 전체가 참조에 의해 본원에 통합된다.

[0250] 일부 실시형태에서, 핵산은 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함한다. 단백질은 치료 단백질(예컨대, 포유류 대상체에서 질환 상태의 치료 또는 예방에 유용한 펩타이드, 단백질, 또는 폴리펩타이드) 또는 리포터 단백질일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단백질은 GDNF이다. 일부 실시형태에서, 단백질은 인간 GDNF이다. 일부 실시형태에서, GDNF 유전자는 서열 번호: 2, 또는 서열 번호: 2를 포함하는 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, GDNF 유전자는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 치료 단백질, 및 그러한 단백질을 암호화하는 유전자는 PD의 치료 또는 진행을 늦추는 데 유용하다.

[0251] 본원에서 설명되는 핵산은 리포터 서열(예컨대, 리포터 단백질을 암호화하는 핵산 서열)을 더 포함한다. 리포터 서열은, β-락타마제, β-갈락토시다아제(LacZ), 알칼리성 포스파타아제, 티미딘 키나아제, 그린 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT), 루시퍼라아제, 및 해당 기술 분야에 잘 알려져 있는 기타를 암호화하는 DNA 서열을 제한 없이 포함한다. 발현을 유도하는 조절 요소와 연관되는 경우, 리포터 서열은, 효소, 방사선, 비색, 형광 또는 기타 분광 분석, 형광 활성화 세포 분류 분석, 및 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA), 방사선 면역분석(RIA) 및 면역 조직 화학을 포함한 면역학적 분석을 포함하여, 기존 수단에 의해 검출 가능한 신호를 제공한다. 예를 들어, 마커 서열이 LacZ 유전자인 경우, 신호를 전달하는 벡터의 존재는 β- 갈락토시다아제 활성에 대한 분석에 의해 검출된다. 이식유전자가 녹색 형광 단백질 또는 루시퍼라아제인 경우, 신호를 전달하는 벡터는 광도계에서 색상 또는 조명 생성에 의해 시각적으로 측정될 수 있다. 그러한 리포터는, 예를 들어, 핵산의 조직-특이적 표적화 능력 및 조직 특이적 프로모터 조절 활성을 확인하는 데 유용할 수 있다.

[0252] *GDNF*

[0253] ATF, ATF1, ATF2, HSCR3, 또는 HFB1-GDNF로도 알려져 있는 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF; NCBI 유전자 ID: 2668)는, 말초 교감, 부교감, 장 및 감각 신경세포 뿐만 아니라 중뇌 도파민 신경세포 및 운동신경세포의 발달과 생존을 지원하는 신경영양 인자이다. 파킨슨병(PD)의 다양한 동물 모델에서 GDNF는 신경독소로 인한 도파민 신경세포의 사멸을 방지하고 축삭의 발육을 촉진하여 기능 회복을 유도할 수 있다. 프리-(α)프로-GDNF(이전에는 GDNFα라고 불림) 및 프리-(β)프로-GDNF(이전에는 GDNFβ라고 불림)라고 불리는 2개의 GDNF 스플라이스 변이체가 설명되었다(Suter-Crazzolara and Unsicker, Neuroreport, 5:2486-2488 (1994)). 이러한 스플라이스 변이체는 GDNF mRNA의 대체 스플라이싱에 의해 생성된다.

[0254] 신경영양 인자를 포함하여, 많은 분비형 단백질은, 전구체, 프리-프로-성숙 단백질의 형태로 합성된다. ER 신호 펩타이드로 이루어지는 프리-영역은 신호 펩티다아제에 의해 번역 동안 잘리고, 전성숙 단백질은 합성된 직

후 ER의 내강으로 방출된다. 성숙한 단백질의 단백질분해성 절단은 세포 내부 또는 세포 외 기질, 또는 둘 모두에서 발생할 수 있다.

[0255] 전성숙 단백질은 또한 절단되지 않은 상태로 남아 있을 수 있으며, 절단된 성숙 단백질과는 상이한 기능을 할 수 있다. 예를 들어, 성숙한 뇌유래 신경영양 인자(BDNF) 및 프로-BDNF는 둘 모두 신경 세포에서 분비된다. 성숙한 BDNF는 신경세포의 생존, 분화 및 시냅스 변조를 유도하는 TrkB 수용체에 결합하는 반면, 프로-BDNF는 $p75^{NTR}$ 및 소르틸린(sortilin) 수용체에 결합하여 아폽토시스를 유도한다(검토를 위해, 문헌 [Thomas and Davies, Curr. Biol., 15:262-264(2005)]; 문헌 [Teng et al., J. Neurosci., 25:5455-5463(2005)] 참조).

[0256] 과학 텍스트에서는, 전장 프리-(α)프로-GDNF mRNA 및 (α)프로-GDNF 단백질의 단백질분해성 절단에 의해 생성되는 성숙한 GDNF 단백질에 대해, GDNF mRNA 및 GDNF 단백질이라는 이름이 사용되었다. 이 성숙한 GDNF 단백질은 광범위하게 연구되어 왔으며, PubMed에서 GDNF에 대한 2,500개 이상의 인용 문헌이 이용 가능하다. GDNF는 신경돌기 길이, 세포 크기, 및 도파민성 신경세포의 수를 증가시키는 능력과 배양에서 그들의 고친화성의 도파민 흡수에 기초하여 확인되었다(Lin et al., Science, 260:1130-1132 (1993)). GDNF는 PD의 동물 모델과 PD를 갖는 환자 치료에서 독소로 인한 악화로부터 흑질 도파민성 신경세포의 보호를 위한 강력한 인자이다(문헌 [Airaksinen and Saarma, Nat. Rev. Neurosci. 3:383-394 (2002)] 및 문헌 [Bespalov and Saarma, Trends Pharmacol. Sci. 28:68-74 (2007)]에서 검토됨). 또한, GDNF는 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 중독, 알코올 중독 및 우울증의 동물 모델 치료에 치료적 역할을 한다(문헌 [Bohn, Exp. Neurol., 190:263-275 (2004)]; 문헌 [Messer et al., Neuron, 26:247-257 (2000)]; 문헌 [He et al., J. Neurosci., 25:619-628 (2005)]; 문헌 [Angelucci et al., Int. J. Neuropsychopharmacol., 6:225-231 (2003)]에서 검토됨). GDNF는 신경계 외부에서도 중요한 역할을 한다. 이는 신장 발달에서 모르포겐(morphogen)으로 작용하며 정자세포의 분화를 조절한다(문헌 [Sariola and Saarma, J. Cell Sci. 116:3855-3862 (2003)]에서 검토됨).

[0257] 일부 실시형태에서, PD의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 바이러스 벡터가 본원에서 설명되고, 여기서 벡터는 핵산을 암호화하는 GDNF를 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터(예컨대, rAAV)이다.

[0258] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아미노산 서열 번호: 2를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0259] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 서열 번호: 1의 서열을 포함한다.

[0260] 용어 "유전자"는 전사되거나 번역된 후에 특정 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화할 수 있는 적어도 하나의 개방형 해독틀을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0261] 용어 "코딩 서열" 또는 "특정 단백질을 암호화하는 서열"은, 적절한 조절 서열의 제어 하에 위치될 때 시험관 내에서 또는 생체 내에서 폴리펩타이드로 전사되고(DNA의 경우) 번역되는(mRNA의 경우) 핵산 서열을 나타낸다. 코딩 서열의 경계는 5'(아미노) 말단에서의 시작 코돈 및 3'(카르복시) 말단에서의 번역 중지 코돈에 의해 결정된다. 코딩 서열은 원핵 또는 진핵 mRNA로부터의 cDNA, 원핵 또는 진핵 DNA로부터의 게놈 DNA 서열, 및 심지어 합성 DNA 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0262] GDNF에 대한 예시적인 cDNA 서열은 젠뱅크 액세스 NM_000514.4(서열 번호: 1)에 개시되어 있다. 아미노산 서열은 서열 번호: 2에 도시되어 있다. 본원에서 설명되는 방법은 PD의 진행을 늦추거나 억제하기 위해 서열 번호: 1 또는 그의 변이체를 포함하는 핵산 컨스트럭트를 사용한다. 변이체는, 예를 들어, 개체 간 대립 유전자 변이체(예컨대, 다형성), 대체 스플라이싱 형태 등으로 인한 자연 발생 변이체를 포함한다. 변이체라는 용어는 또한 다른 소스 또는 유기체로부터의 GDNF 유전자 서열도 포함한다. 변이체는 바람직하게는 서열 번호: 1 및/또는 2에 실질적으로 상동이고, 즉, 서열 번호: 1 또는 2와 전형적으로 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%의 뉴클레오타이드 서열 동일성을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 핵산 컨스트럭트는, 서열 번호: 1에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열 번호: 1 또는 2의 활성을 보유하는 서열을 포함한다. GDNF 유전자의 변이체는 또한 핵산 서열을 포함할 수 있는데, 이는 엄격한 혼성화 조건 하에서 위에서 정의된 바와 같은 서열(또는 그의 상보적인 가닥)로 혼성화된다.

전형적인 엄격한 혼성화 조건은 30℃ 초과의 온도, 바람직하게는 35℃ 초과의 온도, 보다 바람직하게는 42℃ 초과의 온도, 및/또는 약 500mM 미만의 염도, 바람직하게는 200mM 미만의 염도를 포함한다. 혼성화 조건은 SDS, SSC 등과 같은 다른 시약의 온도, 염도 및/또는 농도를 수정함으로써 통상의 기술자에 의해 조정될 수 있다.

[0263] GDNF의 뉴클레오타이드 277번, 633번, 및 1389번에서의 변이체에 대한 보고가 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 277번에서의 C 내지 T 점 돌연변이(예컨대, 서열 번호: 62 참조), 뉴클레오타이드 633번에서의 C 내지 G 점 돌연변이(예컨대, 서열 번호: 63 참조), 및 뉴클레오타이드 1389번에서의 A 내지 G 점 돌연변이가 있다. 코돈 최적화된 서열, 및 보존적 변경을 포함하는 다른 변이체도 가능하다. 보존적 치환은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0264] 일 실시형태에서, GDNF 유전자는 코돈 최적화된다. 일 실시형태에서, GDNF 핵산 서열은, 예를 들어, (1) 생체 내 발현 향상, (2) CpG 섬 감소 또는 (3) 선천성 면역 반응 감소 중 임의의 하나 이상에 대해 코돈 최적화된다. 숙련된 전문가는 해당 분야의 표준 기법을 사용하여 GDNF를 코돈-최적화할 수 있다.

[0265] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아미노산 서열 번호: 2, 또는 그의 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0266] *서열 번호: 1 GDNF mRNA*

```
atgaagtta tgggatgtcg tggctgtctg cctggtgctg ctccacaccg
cgtccgcctt cccgctgccc gccggtaaga ggcctcccga ggcgcccgcc
gaagaccgct ccctcggccg ccgccgcgcg cccttcgcgc tgagcagtga
ctcaaatatg ccagaggatt atcctgatca gttcgatgat gtcatggatt
ttattcaagc caccattaaa agactgaaaa ggtcaccaga taaacaaatg
gcagtgcttc ctagaagaga gcggaatcgg caggctgcag ctgccaaccc
agagaattcc agaggaaaag gtcggagagg ccagaggggc aaaaaccggg
gttgtgtctt aactgcaata catttaaatg tcactgactt gggtctgggc
tatgaaacca aggaggaact gatttttagg tactgcagcg gctcttgcga
tgcagctgag acaacgtacg acaaaatatt gaaaaactta tccagaaata
gaaggctggt gagtgacaaa gtagggcagg catgttgcag acccatcgcc
tttgatgatg acctgtcgtt tttagatgat aacctggttt accatattct
aagaaagcat tccgctaaaa ggtgtggatg tatctga (서열 번호: 1)
```

[0267]

[0268] 서열 번호: 2 GDNF 아미노산 서열

```
MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPEDYPDQFDD
VMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLN
VTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDLS
FLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI[정지] (서열 번호: 2)
```

[0269]

[0270] 서열 번호: 62 변이체 GDNF mRNA (C277T)

```
atgaagtta tgggatgtcg tggctgtctg cctggtgctg ctccacaccg
cgtccgcctt cccgctgccc gccggtaaga ggcctcccga ggcgcccgcc
gaagaccgct ccctcggccg ccgccgcgcg cccttcgcgc tgagcagtga
ctcaaatatg ccagaggatt atcctgatca gttcgatgat gtcatggatt
ttattcaagc caccattaaa agactgaaaa ggtcaccaga taaacaaatg
gcagtgcttc ctagaagaga gcggaattgg caggctgcag ctgccaaccc
agagaattcc agaggaaaag gtcggagagg ccagaggggc aaaaaccggg
gttgtgtctt aactgcaata catttaaatg tcactgactt gggtctgggc
tatgaaacca aggaggaact gatttttagg tactgcagcg gctcttgcga
```

[0271]

tgcagctgag acaacgtacg acaaaatatt gaaaaactta tccagaaata
gaaggctggt gagtgacaaa gtagggcagg catgttgcag acccatcgcc
tttgatgatg acctgtcgtt tttagatgat aacctggttt accatattct
aagaaagcat tccgctaaaa ggtgtggatg tatctga (**서열 번호 :** 1)

[0272]

[0273] 서열 번호: 63 변이체 GDNF mRNA (C633G)

atgaagtta tgggatgtcg tggctgtctg cctggtgctg ctccacaccg
cgtccgcctt cccgctgccc gccggtaaga ggcctcccga ggcgcccgcc
gaagaccgct ccctcggccg ccgccgcgcg cccttcgcgc tgagcagtga
ctcaaatatg ccagaggatt atcctgatca gttcgatgat gtcatggatt
ttattcaagc caccattaaa agactgaaaa ggtcaccaga taaacaaatg
gcagtgcttc ctagaagaga gcggaatcgg caggctgcag ctgccaaccc
agagaattcc agaggaaaag gtcggagagg ccagaggggc aaaaaccggg
gttgtgtctt aactgcaata catttaaatg tcactgactt gggtctgggc
tatgaaacca aggaggaact gatttttagg tactgcagcg gctcttgcga
tgcagctgag acaacgtacg acaaaatatt gaaaaactta tccagaaata
gaaggctggt gagtgacaaa gtagggcagg catgttgcag acccatcgcc
tttgatgatg acctgtcgtt tttagatgat aacctggttt accatattct
aagaaagcat tccgctaaaa ggtgtggatg tatgtga (**서열 번호 :** 1)

[0274]

[0275] *벡터*

[0276] 일부 실시형태에서, 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 또는 재조합 AAV이다. 일부 국면에서, 본 개시내용은 단리된 AAV를 제공한다. AAV에 대해 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 인공적으로 생성되거나 얻어진 AAV를 지칭한다. 단리된 AAV는 재조합 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 그러한 AAV는 본원에서 "재조합 AAV"로 지칭된다. 재조합 AAV(rAAV)는 바람직하게는 조직-특이적 표적화 능력을 가지므로, rAAV의 뉴클레아제 및/또는 이식유전자가 하나 이상의 미리 결정된 조직(들)에 특이적으로 전달될 것이다. AAV 캡시드는 이러한 조직-특이적 표적화 능력을 결정하는 데 있어서 중요한 요소이다. 따라서, 표적화된 조직에 대해 적절한 캡시드를 갖는 rAAV가 선택될 수 있다.

[0277] 원하는 캡시드 단백질을 갖는 재조합 AAV를 얻기 위한 방법은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다. (예를 들어, US 2003/0138772를 참조하며), 이의 내용은 그 전체가 참조에 의해 본원에 통합된다). 전형적으로, 방법은 AAV 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열; 기능적 렙 유전자; AAV 역전된 말단 반복(ITR) 및 이식유전자로 구성된 재조합 AAV 벡터; 및 AAV 캡시드 단백질에 재조합 AAV 벡터의 패키징을 허용하는 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 수반한다. 일부 실시형태에서, 캡시드 단백질은 AAV의 캡 유전자에 의해 암호화되는 구조적 단백질이다. AAV는 3개의 캡시드 단백질, 즉, 비리온 단백질 1 내지 3(VP1, VP2 및 VP3으로 명명됨)을 포함하고, 이들 모두는 대체 스플라이싱을 통해 단일 캡 유전자로부터 전사된다. 일부 실시형태에서, VP1, VP2 및 VP3의 분자량은 각각 약 87kDa, 약 72kDa 및 약 62kDa이다. 일부 실시형태에서, 번역 시, 캡시드 단백질은 AAV 게놈 주위에 구형 60-mer 단백질 쉘을 형성한다. 일부 실시형태에서, 캡시드 단백질의 기능은 바이러스 *게놈을* 보호하고, *게놈을 전달하고 숙주와 상호 작용하기 위한 것이다. 일부 국면에서, 캡시드 단백질은* 조직 특이적 방식으로 *바이러스 게놈을 숙주에 전달한다.*

[0278] 일부 실시형태에서, 재조합 AAV(rAAV) 캡시드 단백질은 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAVrh10, AAV 2G9, AAV 2.5G9, AAV9, 및 AAV10으로 이루어지는 군에서 선택되는 AAV 혈청형이다. 일부 실시형태에서, AAV 캡시드는 단백질은 비인간 영장류에서 유래된 혈청형, 예를 들어 AAVrh10 혈청형이다. 일부 실시형태에서, AAV 캡시드 단백질은 AAV9 혈청형이다. 일부 실시형태에서, 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 또는 AAV13 캡시드 단백질 또는, 그의 키메라이다. 일부 실시형태에서, rAAV는 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV 2G9, AAV 2.5G9, AAV rh8, AAV rh10, AAV rh74, AAV10, 또는, AAV11 또는, 그의 키메라로부터의 캡시드 단백질을 포함한다.

[0279] 일 실시형태에서, 본원에서 설명되는 AAV 혈청형 및/또는 캡시드는 표 7에서 선택된다.

표 7	
혈청형 및 캡시드 서열이 공지된 곳	혈청형 및 캡시드 서열이 공지된 곳
AAV3.3b(US20030138772 의 서열 번호: 72 참조)	AAV3-3(US20150315612 의 서열 번호: 200 참조)
AAV3-3(US20150315612 의 서열 번호: 217 참조)	AAV3a(US6156303 의 서열 번호: 5 참조)
AAV3a(US6156303 의 서열 번호: 9 참조)	AAV3b(US6156303 의 서열 번호: 6 참조)
AAV3b(US6156303 의 서열 번호: 10 참조)	AAV3b(US6156303 의 서열 번호: 1 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 17 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 5 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 3 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 14 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 15 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 19 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 12 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 13 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 7 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 8 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 9 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 2 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 10 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 11 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 18 참조)	AAV4(US20030138772 의 서열 번호: 63 참조) 및 US20160017295 SEQ
ID NO:(US20140348794 의 서열 번호: 4 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 16 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 20 참조)	AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 6 참조)
AAV4(US20140348794 의 서열 번호: 1 참조)	AAV42.2(US20030138772 의 서열 번호: 9 참조)

[0280]

AAV42.2(US20030138772 의 서열 번호: 102 참조)	AAV42.3b(US20030138772 의 서열 번호: 36 참조)
AAV42.3B(US20030138772 의 서열 번호: 107 참조)	AAV42.4(US20030138772 의 서열 번호: 33 참조)
AAV42.4(US20030138772 의 서열 번호: 88 참조)	AAV42.8(US20030138772 의 서열 번호: 27 참조)
AAV42.8(US20030138772 의 서열 번호: 85 참조)	AAV43.1(US20030138772 의 서열 번호: 39 참조)
AAV43.1(US20030138772 의 서열 번호: 92 참조)	AAV43.12(US20030138772 의 서열 번호: 41 참조)
AAV43.12(US20030138772 의 서열 번호: 93 참조)	AAV8(US20150159173 의 서열 번호: 15 참조)
AAV8(US20150376240 의 서열 번호: 7 참조)	AAV8(US20030138772 의 서열 번호: 4 참조;US20150315612 서열
번호: 182	AAV8(US20030138772 의 서열 번호: 95 참조), US20140359799 SEQ
AAV8(US20150159173 의 서열 번호: 31 참조)	AAV8(예컨대, US20160017295 의 서열 번호: 8, 또는 US7198951 의 서열 번호:7, 또는 US20150315612 의 서열 번호: 223 참조)
AAV8(US20150376240 의 서열 번호: 8 참조)	AAV8(US20150315612 의 서열 번호: 214 참조)
AAV-8b(US20150376240 의 서열 번호: 5 참조)	AAV-8b(US20150376240 의 서열 번호: 3 참조)
AAV-8h(US20150376240 의 서열 번호: 6 참조)	AAV-8h(US20150376240 의 서열 번호: 4 참조)
AAV9(US20030138772 의 서열 번호: 5 참조)	AAV9(US7198951 의 서열 번호: 1 참조)
AAV9(US20160017295 의 서열 번호: 9 참조)	AAV9(US20030138772 의 서열 번호: 100, US7198951 서열 번호: 2 참조)
	AAV9(US7198951 의 서열 번호: 3 참조)
AAV9(AAVhu.14)(US20150315612 의 서열	AAV9(AAVhu.14)(US20150315612 의 서열

[0281]

번호: 3 참조)	번호: 123 참조)
AAVA3.1(US20030138772 의 서열 번호: 120 참조)	AAVA3.3(US20030138772 의 서열 번호: 57 참조)
AAVA3.3(US20030138772 의 서열 번호: 66 참조)	AAVA3.4(US20030138772 의 서열 번호: 54 참조)
AAVA3.4(US20030138772 의 서열 번호: 68 참조)	AAVA3.5(US20030138772 의 서열 번호: 55 참조)
AAVA3.5(US20030138772 의 서열 번호: 69 참조)	AAVA3.7(US20030138772 의 서열 번호: 56 참조)
AAVA3.7(US20030138772 의 서열 번호: 67 참조)	AAV29.((AAVbb. 1) 161 US20030138772 의 서열 번호: 11 참조)
AAVC2(US20030138772 의 서열 번호: 61 참조)	AAVCh.5(US20150159173 의 서열 번호: 46 참조); US20150315612 서열
번호: 234	AAVcy.2(AAV13.3)(US20030138772 의 서열 번호: 15 참조)
AAV24.1(US20030138772 의 서열 번호: 101 참조)	AAVcy.3(AAV24.1)(US20030138772 의 서열 번호: 16 참조)
AAV27.3(US20030138772 의 서열 번호: 104 참조)	AAVcy.4(AAV27.3)(US20030138772 의 서열 번호: 17 참조)
AAVcy.5(US20150315612 의 서열 번호: 227 참조)	AAV7.2(US20030138772 의 서열 번호: 103 참조)
AAVcy.5(AAV7.2)(US20030138772 의 서열 번호: 18 참조)	AAV16.3(US20030138772 의 서열 번호: 105 참조)
AAVcy.6(AAV16.3)(US20030138772 의 서열 번호: 10 참조)	AAVcy.5(US20150159173 의 서열 번호: 8 참조)
AAVcy.5(US20150159173 의 서열 번호: 24 참조)	AAVCy.5R1(US20150159173 의 서열 번호: 참조
AAVCy.5R2(US20150159173 의 서열 번호: 참조)	AAVCy.5R3(US20150159173 의 서열 번호: 참조
AAVCy.5R4(US20150159173 의 서열 번호: 참조)	AAVDJ(US20140359799 의 서열 번호: 3 및 US7588772 의 서열 번호: 2 참조)

[0282]

	AAVDJ(US20140359799 의 서열 번호: 2; 및 US7588772 의 서열 번호: 1 참조)
	AAVDJ-8(US7588772 의 서열 번호: 참조; Grimm et al 2008
AAVDJ-8(US7588772 의 서열 번호: 참조; Grimm et al 2008	AAVF5(US20030138772 의 서열 번호: 110 참조)
AAVH2(US20030138772 의 서열 번호: 26 참조)	AAVH6(US20030138772 의 서열 번호: 25 참조)
AAVhE1. 1(US9233131 의 서열 번호: 44)	AAVhEr1.14(US9233131 의 서열 번호: 46 참조)
AAVhEr1.16(US9233131 의 서열 번호: 48 참조)	AAVhEr1.18(US9233131 의 서열 번호: 49 참조)
AAVhEr1.23(AAVhEr2.29)(US9233131 의 서열 번호: 53 참조)	AAVhEr1.35(US9233131 의 서열 번호: 50 참조)
AAVhEr1.36(US9233131 의 서열 번호: 52 참조)	AAVhEr1.5(US9233131 의 서열 번호: 45 참조)
AAVhEr1.7(US9233131 의 서열 번호: 51 참조)	AAVhEr1.8(US9233131 의 서열 번호: 47 참조)
AAVhEr2.16(US9233131 의 서열 번호: 55 참조)	AAVhEr2.30(US9233131 의 서열 번호: 56 참조)
AAVhEr2.31(US9233131 의 서열 번호: 58 참조)	AAVhEr2.36(US9233131 의 서열 번호: 57 참조)
AAVhEr2.4(US9233131 의 서열 번호: 54 참조)	AAVhEr3.1(US9233131 의 서열 번호: 59 참조)
AAVhu.1(US20150315612 의 서열 번호: 46 참조)	AAVhu.1(US20150315612 의 서열 번호: 144 참조)
AAVhu.10(AAV16.8)(US20150315612 의 서열 번호: 56 참조)	AAVhu.10(AAV16.8)(US20150315612 의 서열 번호: 156 참조)
AAVhu.1 1(AAV16.12)(US20150315612 의 서열 번호: 57 참조)	AAVhu.1 1(AAV16.12)(US20150315612 의 서열 번호: 153 참조)
AAVhu.12(US20150315612 의 서열 번호: 59	AAVhu.12(US20150315612 의 서열 번호:

[0283]

참조)	154 참조)
AAVhu.13(US2015015917 의 서열 번호: 16 및 US20150315612 의 서열 번호: 71 참조)	
AAVhu.13(US20150159173 의 서열 번호: 32 및 US20150315612 의 서열 번호: 129 참조)	
AAVhu.136.1(US20150315612 의 서열 번호: 165 참조)	AAVhu.140.1(US20150315612 의 서열 번호: 166 참조)
AAVhu.140.2(US20150315612 의 서열 번호: 167 참조)	AAVhu.145.6(US20150315612 의 서열 번호: 178 참조)
AAVhu.15(US20150315612 의 서열 번호: 147 참조)	AAVhu.15(AAV33.4)(US20150315612 의 서열 번호: 50 참조)
AAVhu.156.1(US20150315612 의 서열 번호: 179 참조)	AAVhu.16(US20150315612 의 서열 번호: 148 참조)
AAVhu.16(AAV33.8)(US20150315612 의 서열 번호: 51 참조)	AAVhu.17(US20150315612 의 서열 번호: 83 참조)
AAVhu.17(AAV33.12)(US20150315612 의 서열 번호: 4 참조)	AAVhu.172.1(US20150315612 의 서열 번호: 171 참조)
AAVhu.172.2(US20150315612 의 서열 번호: 172 참조)	AAVhu.173.4(US20150315612 의 서열 번호: 173 참조)
AAVhu.173.8(US20150315612 의 서열 번호: 175 참조)	AAVhu.18(US20150315612 의 서열 번호: 52 참조)
AAVhu.18(US20150315612 의 서열 번호: 149 참조)	AAVhu.19(US20150315612 의 서열 번호: 62 참조)
AAVhu.19(US20150315612 의 서열 번호: 133 참조)	AAVhu.2(US20150315612 의 서열 번호: 48 참조)
AAVhu.2(US20150315612 의 서열 번호: 143 참조)	AAVhu.20(US20150315612 의 서열 번호: 63 참조)
AAVhu.20(US20150315612 의 서열 번호: 134 참조)	AAVhu.21(US20150315612 의 서열 번호: 65 참조)
AAVhu.21(US20150315612 의 서열 번호: 135 참조)	AAVhu.22(US20150315612 의 서열 번호: 67 참조)

[0284]

AAVhu.22 239(US20150315612 의 서열 번호: 138 참조)	AAVhu.23(US20150315612 의 서열 번호: 60 참조)
AAVhu.23.2(US20150315612 의 서열 번호: 137 참조)	AAVhu.24(US20150315612 의 서열 번호: 66 참조)
AAVhu.24(US20150315612 의 서열 번호: 136 참조)	AAVhu.25(US20150315612 의 서열 번호: 49 참조)
AAVhu.25(US20150315612 의 서열 번호: 146 참조)	AAVhu.26(US20150159173 의 서열 번호: 17 및 US20150315612 의 서열 번호: 61 참조)
	AAVhu.26(US20150159173 의 서열 번호: 33 참조), US20150315612 SEQ
	AAVhu.27(US20150315612 의 서열 번호: 64 참조)
AAVhu.27(US20150315612 의 서열 번호: 140 참조)	AAVhu.28(US20150315612 의 서열 번호: 68 참조)
AAVhu.28(US20150315612 의 서열 번호: 130 참조)	AAVhu.29(US20150315612 의 서열 번호: 69 참조)
AAVhu.29(US20150159173 의 서열 번호: 42 및 US20150315612 의 서열 번호: 132 참조)	
AAVhu.29(US20150315612 의 서열 번호: 225 참조)	AAVhu.29R(US20150159173 의 서열 번호: 참조
AAVhu.3(US20150315612 의 서열 번호: 44 참조)	AAVhu.3(US20150315612 의 서열 번호: 145 참조)
AAVhu.30(US20150315612 의 서열 번호: 70 참조)	AAVhu.30(US20150315612 의 서열 번호: 131 참조)
AAVhu.31(US20150315612 의 서열 번호: 1 참조)	AAVhu.31(US20150315612 의 서열 번호: 121 참조)
AAVhu.32(US20150315612 의 서열 번호: 2 참조)	AAVhu.32(US20150315612 의 서열 번호: 122 참조)
AAVhu.33(US20150315612 의 서열 번호: 75 참조)	AAVhu.33(US20150315612 의 서열 번호: 124 참조)

[0285]

AAVhu.34(US20150315612 의 서열 번호: 72 참조)	AAVhu.34(US20150315612 의 서열 번호: 125 참조)
AAVhu.35(US20150315612 의 서열 번호: 73 참조)	AAVhu.35(US20150315612 의 서열 번호: 164 참조)
AAVhu.36(US20150315612 의 서열 번호: 74 참조)	AAVhu.36(US20150315612 의 서열 번호: 126 참조)
AAVhu.37(US20150159173 의 서열 번호: 34 및 US20150315612 의 서열 번호: 88 참조)	
AAVhu.37(AAV106.1)(US20150315612 의 서열 번호: 10 및 US20150159173 의 서열 번호: 18 참조)	
AAVhu.38(US20150315612 의 서열 번호: 161 참조)	AAVhu.39(US20150315612 의 서열 번호: 102 참조)
AAVhu.39(AAVLG-9)(US20150315612 의 서열 번호: 24 참조)	AAVhu.4(US20150315612 의 서열 번호: 47 참조)
AAVhu.4(US20150315612 의 서열 번호: 141 참조)	AAVhu.40(US20150315612 의 서열 번호: 87 참조)
AAVhu.40(AAV114.3)(US20150315612 의 서열 번호: 11 참조)	AAVhu.41(US20150315612 의 서열 번호: 91 참조)
AAVhu.41(AAV127.2)(US20150315612 의 서열 번호: 6 참조)	AAVhu.42(US20150315612 의 서열 번호: 85 참조)
AAVhu.42(AAV127.5)(US20150315612 의 서열 번호: 8 참조)	AAVhu.43(US20150315612 의 서열 번호: 160 참조)
AAVhu.43(US20150315612 의 서열 번호: 236 참조)	AAVhu.43(AAV128.1)(US20150315612 의 서열 번호: 80 참조)
AAVhu.44(US20150159173 의 서열 번호: 45 및 US20150315612 의 서열 번호: 158 참조)	
AAVhu.44(AAV128.3)(US20150315612 의 서열 번호: 81 참조)	AAVhu.44R1(US20150159173 의 서열 번호: 참조
AAVhu.44R2(US20150159173 의 서열 번호: 참조	AAVhu.44R3(US20150159173 의 서열 번호: 참조

[0286]

AAVhu.45(US20150315612 의 서열 번호: 76 참조)	AAVhu.45(US20150315612 의 서열 번호: 127 참조)
AAVhu.46(US20150315612 의 서열 번호: 82 참조)	AAVhu.46(US20150315612 의 서열 번호: 159 참조)
AAVhu.46(US20150315612 의 서열 번호: 224 참조)	AAVhu.47(US20150315612 의 서열 번호: 77 참조)
AAVhu.47(US20150315612 의 서열 번호: 128 참조)	AAVhu.48(US20150159173 의 서열 번호: 38 참조)
AAVhu.48(US20150315612 의 서열 번호: 157 참조)	AAVhu.48(AAV130.4)(US20150315612 의 서열 번호: 78 참조)
AAVhu.48R1(US20150159173 의 서열 번호: 참조	AAVhu.48R2(US20150159173 의 서열 번호: 참조
AAVhu.48R3(US20150159173 의 서열 번호: 참조	AAVhu.49(US20150315612 의 서열 번호: 209 참조)
AAVhu.49(US20150315612 의 서열 번호: 189 참조)	AAVhu.5(US20150315612 의 서열 번호: 45 참조)
AAVhu.5(US20150315612 의 서열 번호: 142 참조)	AAVhu.51(US20150315612 의 서열 번호: 208 참조)
AAVhu.51(US20150315612 의 서열 번호: 190 참조)	AAVhu.52(US20150315612 의 서열 번호: 210 참조)
AAVhu.52(US20150315612 의 서열 번호: 191 참조)	AAVhu.53(US20150159173 의 서열 번호: 19 참조)
AAVhu.53(US20150159173 의 서열 번호: 35 참조)	AAVhu.53(AAV145.1)(US20150315612 의 서열 번호: 176 참조)
AAVhu.54(US20150315612 의 서열 번호: 188 참조)	AAVhu.54(AAV145.5)(US20150315612 의 서열 번호: 177 참조)
AAVhu.55(US20150315612 의 서열 번호: 187 참조)	AAVhu.56(US20150315612 의 서열 번호: 205 참조)
AAVhu.56(AAV145.6)(US20150315612 의 서열 번호: 168 참조)	AAVhu.56(AAV145.6)(US20150315612 의 서열 번호: 192 참조)
AAVhu.57(US20150315612 의 서열 번호: 206	AAVhu.57(US20150315612 의 서열 번호:

[0287]

참조)	169 참조)
AAVhu.57(US20150315612 의 서열 번호: 193 참조)	AAVhu.58(US20150315612 의 서열 번호: 207 참조)
AAVhu.58(US20150315612 의 서열 번호: 194 참조)	AAVhu.6(AAV3.1)(US20150315612 의 서열 번호: 5 참조)
AAVhu.6(AAV3.1)(US20150315612 의 서열 번호: 84 참조)	AAVhu.60(US20150315612 의 서열 번호: 184 참조)
AAVhu.60(AAV161.10)(US20150315612 의 서열 번호: 170 참조)	AAVhu.61(US20150315612 의 서열 번호: 185 참조)
AAVhu.61(AAV161.6)(US20150315612 의 서열 번호: 174 참조)	AAVhu.63(US20150315612 의 서열 번호: 204 참조)
AAVhu.63(US20150315612 의 서열 번호: 195 참조)	AAVhu.64(US20150315612 의 서열 번호: 212 참조)
AAVhu.64(US20150315612 의 서열 번호: 196 참조)	AAVhu.66(US20150315612 의 서열 번호: 197 참조)
AAVhu.67(US20150315612 의 서열 번호: 215 참조)	AAVhu.67(US20150315612 의 서열 번호: 198 참조)
AAVhu.7(US20150315612 의 서열 번호: 226 참조)	AAVhu.7(US20150315612 의 서열 번호: 150 참조)
AAVhu.7(AAV7.3)(US20150315612 의 서열 번호: 55 참조)	AAVhu.71(US20150315612 의 서열 번호: 79 참조)
AAVhu.8(US20150315612 의 서열 번호: 53 참조)	AAVhu.8(US20150315612 의 서열 번호: 12 참조)
AAVhu.8(US20150315612 의 서열 번호: 151 참조)	AAVhu.9(AAV3.1)(US20150315612 의 서열 번호: 58 참조)
AAVhu.9(AAV3.1)(US20150315612 의 서열 번호: 155 참조)	AAV-LK01(US20150376607 의 서열 번호: 2 참조)
AAV-LK01(US20150376607 의 서열 번호: 29 참조)	AAV-LK02(US20150376607 의 서열 번호: 3 참조)
AAV-LK02(US20150376607 의 서열 번호: 30 참조)	AAV-LK03(US20150376607 의 서열 번호: 4 참조)

[0288]

AAV-LK03(WO2015121501 의 서열 번호: 12 및 US20150376607 의 서열 번호: 31 참조)	
AAV-LK04(US20150376607 의 서열 번호: 5 참조)	AAV-LK04(US20150376607 의 서열 번호: 32 참조)
AAV-LK05(US20150376607 의 서열 번호: 6 참조)	AAV-LK05(US20150376607 의 서열 번호: 33 참조)
AAV-LK06(US20150376607 의 서열 번호: 7 참조)	AAV-LK06(US20150376607 의 서열 번호: 34 참조)
AAV-LK07(US20150376607 의 서열 번호: 8 참조)	AAV-LK07(US20150376607 의 서열 번호: 35 참조)
AAV-LK08(US20150376607 의 서열 번호: 9 참조)	AAV-LK08(US20150376607 의 서열 번호: 36 참조)
AAV-LK09(US20150376607 의 서열 번호: 10 참조)	AAV-LK09(US20150376607 의 서열 번호: 37 참조)
AAV-LK10(US20150376607 의 서열 번호: 11 참조)	AAV-LK10(US20150376607 의 서열 번호: 38 참조)
AAV-LK11(US20150376607 의 서열 번호: 12 참조)	AAV-LK11(US20150376607 의 서열 번호: 39 참조)
AAV-LK12(US20150376607 의 서열 번호: 13 참조)	AAV-LK12(US20150376607 의 서열 번호: 40 참조)
AAV-LK13(US20150376607 의 서열 번호: 14 참조)	AAV-LK13(US20150376607 의 서열 번호: 41 참조)
AAV-LK14(US20150376607 의 서열 번호: 15 참조)	AAV-LK14(US20150376607 의 서열 번호: 42 참조)
AAV-LK15(US20150376607 의 서열 번호: 16 참조)	AAV-LK15(US20150376607 의 서열 번호: 43 참조)
AAV-LK16(US20150376607 의 서열 번호: 17 참조)	AAV-LK16(US20150376607 의 서열 번호: 44 참조)
AAV-LK17(US20150376607 의 서열 번호: 18 참조)	AAV-LK17(US20150376607 의 서열 번호: 45 참조)
AAV-LK18(US20150376607 의 서열 번호: 19	AAV-LK18(US20150376607 의 서열 번호:

[0289]

참조)	46 참조)
AAV-LK19(US20150376607 의 서열 번호: 20 참조)	AAV-LK19(US20150376607 의 서열 번호: 47 참조)
AAV-PAEC(US20150376607 의 서열 번호: 1 참조)	AAV-PAEC(US20150376607 의 서열 번호: 48 참조)
AAV-PAEC11(US20150376607 의 서열 번호: 26 참조)	AAV-PAEC11(US20150376607 의 서열 번호: 54 참조)
AAV-PAEC 12(US20150376607 의 서열 번호: 27 참조)	AAV-PAEC 12(US20150376607 의 서열 번호: 51 참조)
AAV-PAEC 13(US20150376607 의 서열 번호: 28 참조)	AAV-PAEC 13(US20150376607 의 서열 번호: 49 참조)
AAV-PAEC2(US20150376607 의 서열 번호: 21 참조)	AAV-PAEC2(US20150376607 의 서열 번호: 56 참조)
AAV-PAEC4(US20150376607 의 서열 번호: 22 참조)	AAV-PAEC4(US20150376607 의 서열 번호: 55 참조)
AAV-PAEC6(US20150376607 의 서열 번호: 23 참조)	AAV-PAEC6(US20150376607 의 서열 번호: 52 참조)
AAV-PAEC7(US20150376607 의 서열 번호: 24 참조)	AAV-PAEC7(US20150376607 의 서열 번호: 53 참조)
AAV-PAEC8(US20150376607 의 서열 번호: 25 참조)	AAV-PAEC8(US20150376607 의 서열 번호: 50 참조)
AAVpi.1(US20150315612 의 서열 번호: 28 참조)	AAVpi.1(US20150315612 의 서열 번호: 93 참조; AAVpi.2 408, US20150315612 의 서열 번호: 30 참조)
AAVpi.2(US20150315612 의 서열 번호: 95 참조)	AAVpi.3(US20150315612 의 서열 번호: 29 참조)
AAVpi.3(US20150315612 의 서열 번호: 94 참조)	AAVrh.10(US20150159173 의 서열 번호: 9 참조)
AAVrh.10(US20150159173 의 서열 번호: 25 참조)	AAV44.2(US20030138772 의 서열 번호: 59 참조)
AAVrh.10(AAV44.2)(US20030138772 의 서열 번호: 81 참조)	AAV42.1B(US20030138772 의 서열 번호: 90 참조)

[0290]

AAVrh.12(AAV42.1b)(US20030138772 의 서열 번호: 30 참조)	AAVrh.13(US20150159173 의 서열 번호: 10 참조)
AAVrh.13(US20150159173 의 서열 번호: 26 참조)	AAVrh.13(US20150315612 의 서열 번호: 228 참조)
AAVrh.13R(US20150159173 의 서열 번호: 참조	AAV42.3A(US20030138772 의 서열 번호: 87 참조)
AAVrh.14(AAV42.3a)(US20030138772 의 서열 번호: 32 참조)	AAV42.5A(US20030138772 의 서열 번호: 89 참조)
AAVrh.17(AAV42.5a)(US20030138772 의 서열 번호: 34 참조)	AAV42.5B(US20030138772 의 서열 번호: 91 참조)
AAVrh.18(AAV42.5b)(US20030138772 의 서열 번호: 29 참조)	AAV42.6B(US20030138772 의 서열 번호: 112 참조)
AAVrh.19(AAV42.6b)(US20030138772 의 서열 번호: 38 참조)	AAVrh.2(US20150159173 의 서열 번호: 39 참조)
AAVrh.2(US20150315612 의 서열 번호: 231 참조)	AAVrh.20(US20150159173 의 서열 번호: 1 참조)
AAV42.10(US20030138772 의 서열 번호: 106 참조)	AAVrh.21(AAV42.10)(US20030138772 의 서열 번호: 35 참조)
AAV42.11(US20030138772 의 서열 번호: 108 참조)	AAVrh.22(AAV42.11)(US20030138772 의 서열 번호: 37 참조)
AAV42.12(US20030138772 의 서열 번호: 113 참조)	AAVrh.23(AAV42.12)(US20030138772 의 서열 번호: 58 참조)
AAV42.13(US20030138772 의 서열 번호: 86 참조)	AAVrh.24(AAV42.13)(US20030138772 의 서열 번호: 31 참조)
AAV42.15(US20030138772 의 서열 번호: 84 참조)	AAVrh.25(AAV42.15)(US20030138772 의 서열 번호: 28 참조)
AAVrh.2R(US20150159173 의 서열 번호: 참조	AAVrh.31(AAV223.1)(US20030138772 의 서열 번호: 48 참조)
AAVC1(US20030138772 의 서열 번호: 60 참조)	AAVrh.32(AAVC1)(446 US20030138772 의 서열 번호: 19 참조)
AAVrh.32/33(US20150159173 의 서열 번호: 2 참조)	AAVrh.51(AAV2-5)(US20150315612 의 서열 번호: 104 참조)

[0291]

AAVrh.52(AAV3-9)(US20150315612 의 서열 번호: 18 참조)	AAVrh.52(AAV3-9)(US20150315612 의 서열 번호: 96 참조)
AAVrh.53(US20150315612 의 서열 번호: 참조)	AAVrh.53(AAV3-11)(US20150315612 의 서열 번호: 17 참조)
AAVrh.53(AAV3-11)(US20150315612 의 서열 번호: 186 참조)	AAVrh.54(US20150315612 의 서열 번호: 40 참조)
AAVrh.54(US20150159173 의 서열 번호: 49 및 US20150315612 의 서열 번호: 116 참조)	
AAVrh.55(US20150315612 의 서열 번호: 37 참조)	AAVrh.55(AAV4-19)(US20150315612 의 서열 번호: 117 참조)
AAVrh.56(US20150315612 의 서열 번호: 54 참조)	AAVrh.56(US20150315612 의 서열 번호: 152 참조)
AAVrh.57(US20150315612 의 서열 번호: 497 서열 번호: 26 참조	AAVrh.57(US20150315612 의 서열 번호: 105 참조)
AAVrh.58(US20150315612 의 서열 번호: 27 참조)	AAVrh.58(US20150159173 의 서열 번호: 48 및 US20150315612 의 서열 번호: 106 참조)
	AAVrh.58(US20150315612 의 서열 번호: 232 참조)
AAVrh.59(US20150315612 의 서열 번호: 42 참조)	AAVrh.59(US20150315612 의 서열 번호: 110 참조)
AAVrh.60(US20150315612 의 서열 번호: 31 참조)	AAVrh.60(US20150315612 의 서열 번호: 120 참조)
AAVrh.61(US20150315612 의 서열 번호: 107 참조)	AAVrh.61(AAV2-3)(US20150315612 의 서열 번호: 21 참조)
AAVrh.62(AAV2-15)(US20150315612 의 서열 번호: 33 참조)	AAVrh.62(AAV2-15)(US20150315612 의 서열 번호: 114 참조)
AAVrh.64(US20150315612 의 서열 번호: 15 참조)	AAVrh.64(US20150159173 의 서열 번호: 43 및 US20150315612 의 서열 번호: 99 참조)
	AAVrh.64(US20150315612 의 서열 번호: 233 참조)
AAVRh.64R1(US20150159173 의 서열 번호: 참조	AAVRh.64R2(US20150159173 의 서열 번호: 참조
AAVrh.65(US20150315612 의 서열 번호: 35 참조)	AAVrh.65(US20150315612 의 서열 번호: 112 참조)
AAVrh.67(US20150315612 의 서열 번호: 36 참조)	AAVrh.67(US20150315612 의 서열 번호: 230 참조)
AAVrh.67(US20150159173 의 서열 번호: 47 및 US20150315612 의 서열 번호: 47 참조)	
AAVrh.68(US20150315612 의 서열 번호: 16 참조)	AAVrh.68(US20150315612 의 서열 번호: 100 참조)
AAVrh.69(US20150315612 의 서열 번호: 39	AAVrh.69(US20150315612 의 서열 번호:

[0292]

참조)	119 참조)
AAVrh.70(US20150315612 의 서열 번호: 20 참조)	AAVrh.70(US20150315612 의 서열 번호: 98 참조)
AAVrh.71(US20150315612 의 서열 번호: 162 참조)	AAVrh.72(US20150315612 의 서열 번호: 9 참조)
AAVrh.73(US20150159173 의 서열 번호: 5 참조)	AAVrh.74(US20150159173 의 서열 번호: 6 참조)
AAVrh.8(US20150159173 의 서열 번호: 41 참조)	AAVrh.8(US20150315612 의 서열 번호: 235 참조)
AAVrh.8R(US20150159173, WO2015168666 의 서열 번호: 9 참조)	AAVrh.8R A586R 돌연변이(WO2015168666 의 서열 번호: 10 참조)
AAVrh.8R R533A 돌연변이(WO2015168666 의 서열 번호: 11 참조)	BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 8 참조)
BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 10 참조)	BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 4 참조)
BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 2 참조)	BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 6 참조)
BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 1 참조)	BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 5 참조)
BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 3 참조)	BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 11 참조)
BAAV(소 AAV)(US7427396 의 서열 번호: 5 참조)	BAAV(소 AAV)(US7427396 의 서열 번호: 6 참조)
BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 7 참조)	BAAV(소 AAV)(US9193769 의 서열 번호: 9 참조)
BNP61 AAV(US20150238550 의 서열 번호: 1 참조)	BNP61 AAV(US20150238550 의 서열 번호: 2 참조)
BNP62 AAV(US20150238550 의 서열 번호: 3 참조)	BNP63 AAV(US20150238550 의 서열 번호: 4 참조)
염소 AAV(US7427396 의 서열 번호: 3 참조)	염소 AAV(US7427396 의 서열 번호: 4 참조)
트루 타입 AAV(ttAAV)(WO2015121501 의 서열 번호: 2 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 12 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 2 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 6 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 4 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 8 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 14 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 10 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 15 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 5 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 9	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열

[0293]

참조)	번호: 3 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 7 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 11 참조)
AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 참조)	AAAV(조류 AAV)(US9238800 의 서열 번호: 1 참조)
AAV 셔플 100-1(US20160017295 의 서열 번호: 23 참조)	AAV 셔플 100-1(US20160017295 의 서열 번호: 11 참조)
AAV 셔플 100-2(US20160017295 의 서열 번호: 37 참조)	AAV 셔플 100-2(US20160017295 의 서열 번호: 29 참조)
AAV 셔플 100-3(US20160017295 의 서열 번호: 24 참조)	AAV 셔플 100-3(US20160017295 의 서열 번호: 12 참조)
AAV 셔플 100-7(US20160017295 의 서열 번호: 25 참조)	AAV 셔플 100-7(US20160017295 의 서열 번호: 13 참조)
AAV 셔플 10-2(US20160017295 의 서열 번호: 34 참조)	AAV 셔플 10-2(US20160017295 의 서열 번호: 26 참조)
AAV 셔플 10-6(US20160017295 의 서열 번호: 35 참조)	AAV 셔플 10-6(US20160017295 의 서열 번호: 27 참조)
AAV 셔플 10-8(US20160017295 의 서열 번호: 36 참조)	AAV 셔플 10-8(US20160017295 의 서열 번호: 28 참조)
AAV SM 100-10(US20160017295 의 서열 번호: 41 참조)	AAV SM 100-10(US20160017295 의 서열 번호: 33 참조)
AAV SM 100-3(US20160017295 의 서열 번호: 40 참조)	AAV SM 100-3(US20160017295 의 서열 번호: 32 참조)
AAV SM 10-1(US20160017295 의 서열 번호: 38 참조)	AAV SM 10-1(US20160017295 의 서열 번호: 30 참조)
AAV SM 10-2(US20160017295 의 서열 번호: 10 참조)	AAV SM 10-2(US20160017295 의 서열 번호: 22 참조)
AAV SM 10-8(US20160017295 의 서열 번호: 39 참조)	AAV SM 10-8(US20160017295 의 서열 번호: 31 참조)
AAV CBr-7.1(WO2016065001 의 서열 번호: 4 참조)	AAV CBr-7.1(WO2016065001 의 서열 번호: 54 참조)
AAV CBr-7.10(WO2016065001 의 서열 번호: 11 참조)	AAV CBr-7.10(WO2016065001 의 서열 번호: 61 참조)
AAV CBr-7.2(WO2016065001 의 서열 번호: 5 참조)	AAV CBr-7.2(WO2016065001 의 서열 번호: 55 참조)
AAV CBr-7.3(WO2016065001 의 서열 번호: 6 참조)	AAV CBr-7.3(WO2016065001 의 서열 번호: 56 참조)
AAV CBr-7.4(WO2016065001 의 서열 번호: 7 참조)	AAV CBr-7.4(WO2016065001 의 서열 번호: 57 참조)
AAV CBr-7.5(WO2016065001 의 서열 번호: 8 참조)	AAV CHt-6.6(WO2016065001 의 서열 번호: 35 참조)
AAV CHt-6.6(WO2016065001 의 서열 번호:	AAV CHt-6.7(WO2016065001 의 서열

[0294]

85 참조)	번호: 36 참조)
AAV CHt-6.7(WO2016065001 의 서열 번호: 86 참조)	AAV CHt-6.8(WO2016065001 의 서열 번호: 37 참조)
AAV CHt-6.8(WO2016065001 의 서열 번호: 87 참조)	AAV CHt-P1(WO2016065001 의 서열 번호: 29 참조)
AAV CHt-P1(WO2016065001 의 서열 번호: 79 참조)	AAV CHt-P2(WO2016065001 의 서열 번호: 1 참조)
AAV CHt-P2(WO2016065001 의 서열 번호: 51 참조)	AAV CHt-P5(WO2016065001 의 서열 번호: 2 참조)
AAV CHt-P5(WO2016065001 의 서열 번호: 52 참조)	AAV CHt-P6(WO2016065001 의 서열 번호: 30 참조)
AAV CHt-P6(WO2016065001 의 서열 번호: 80 참조)	AAV CHt-P8(WO2016065001 의 서열 번호: 31 참조)
AAV CHt-P8(WO2016065001 의 서열 번호: 81 참조)	AAV CHt-P9(WO2016065001 의 서열 번호: 3 참조)
AAV CHt-P9(WO2016065001 의 서열 번호: 53 참조)	AAV CKd-1(US8734809 의 서열 번호: 57 참조)
AAV CKd-1(US8734809 의 서열 번호: 131 참조)	AAV CKd-10(US8734809 의 서열 번호: 58 참조)
AAV CKd-10(US8734809 의 서열 번호: 132 참조)	AAV CKd-2(US8734809 의 서열 번호: 59 참조)
AAV CKd-2(US8734809 의 서열 번호: 133 참조)	AAV CKd-3(US8734809 의 서열 번호: 60 참조)
AAV CKd-3(US8734809 의 서열 번호: 134 참조)	AAV CKd-4(US8734809 의 서열 번호: 61 참조)
AAV CKd-4(US8734809 의 서열 번호: 135 참조)	AAV CKd-6(US8734809 의 서열 번호: 62 참조)
AAV CKd-6(US8734809 의 서열 번호: 136 참조)	AAV CKd-7(US8734809 의 서열 번호: 63 참조)
AAV CKd-7(US8734809 의 서열 번호: 137 참조)	AAV CKd-8(US8734809 의 서열 번호: 64 참조)

[0295]

AAV CKd-8(US8734809 의 서열 번호: 138 참조)	AAV CKd-B 1(US8734809 의 서열 번호: 73 참조)
AAV CKd-B 1(US8734809 의 서열 번호: 147 참조)	AAV CKd-B2(US8734809 의 서열 번호: 74 참조)
AAV CKd-B2(US8734809 의 서열 번호: 148 참조)	AAV CKd-B3(US8734809 의 서열 번호: 75 참조)
AAV CKd-B3(US8734809 의 서열 번호: 참조	AAV CKd-B3(US8734809 의 서열 번호: 149 참조)
AAV CLv-1(US8734809 의 서열 번호: 65 참조)	AAV CLv-1(US8734809 의 서열 번호: 139 참조)
AAV CLvl-1(US8734809 의 서열 번호: 171 참조)	AAV Civ 1-10(US8734809 의 서열 번호: 178 참조)
AAV CLvl-2(US8734809 의 서열 번호: 172 참조)	AAV CLv-12(US8734809 의 서열 번호: 66 참조)
AAV CLv-12(US8734809 의 서열 번호: 140 참조)	AAV CLvl-3(US8734809 의 서열 번호: 173 참조)
AAV CLv-13(US8734809 의 서열 번호: 67 참조)	AAV CLv-13(US8734809 의 서열 번호: 141 참조)
AAV CLvl-4(US8734809 의 서열 번호: 174 참조)	AAV Civ 1-7(US8734809 의 서열 번호: 175 참조)
AAV Civ 1-8(US8734809 의 서열 번호: 176 참조)	AAV Civ 1-9(US8734809 의 서열 번호: 177 참조)
AAV CLv-2(US8734809 의 서열 번호: 68 참조)	AAV CLv-2(US8734809 의 서열 번호: 142 참조)
AAV CLv-3(US8734809 의 서열 번호: 69 참조)	AAV CLv-3(US8734809 의 서열 번호: 143 참조)
AAV CLv-4(US8734809 의 서열 번호: 70 참조)	AAV CLv-4(US8734809 의 서열 번호: 144 참조)
AAV CLv-6(US8734809 의 서열 번호: 71 참조)	AAV CLv-6(US8734809 의 서열 번호: 145 참조)
AAV CLv-8(US8734809 의 서열 번호: 72 참조)	AAV CLv-8(US8734809 의 서열 번호: 146 참조)

[0296]

AAV CLv-D1(US8734809 의 서열 번호: 22 참조)	AAV CLv-D1(US8734809 의 서열 번호: 96 참조)
AAV CLv-D2(US8734809 의 서열 번호: 23 참조)	AAV CLv-D2(US8734809 의 서열 번호: 97 참조)
AAV CLv-D3(US8734809 의 서열 번호: 24 참조)	AAV CLv-D3(US8734809 의 서열 번호: 98 참조)
AAV CLv-D4(US8734809 의 서열 번호: 25 참조)	AAV CLv-D4(US8734809 의 서열 번호: 99 참조)
AAV CLv-D5(US8734809 의 서열 번호: 26 참조)	AAV CLv-D5(US8734809 의 서열 번호: 100 참조)
AAV CLv-D6(US8734809 의 서열 번호: 27 참조)	AAV CLv-D6(US8734809 의 서열 번호: 101 참조)
AAV CLv-D7(US8734809 의 서열 번호: 28 참조)	AAV CLv-D7(US8734809 의 서열 번호: 102 참조)
AAV CLv-D8(US8734809 의 서열 번호: 29 참조)	AAV CLv-D8(US8734809 의 서열 번호: 103 참조); AAV CLv-K1 762, WO2016065001 의 서열 번호: 18 참조)
AAV CLv-K1(WO2016065001 의 서열 번호: 68 참조)	AAV CLv-K3(WO2016065001 의 서열 번호: 19 참조)
AAV CLv-K3(WO2016065001 의 서열 번호: 69 참조)	AAV CLv-K6(WO2016065001 의 서열 번호: 20 참조)
AAV CLv-K6(WO2016065001 의 서열 번호: 70 참조)	AAV CLv-L4(WO2016065001 의 서열 번호: 15 참조)
AAV CLv-L4(WO2016065001 의 서열 번호: 65 참조)	AAV CLv-L5(WO2016065001 의 서열 번호: 16 참조)
AAV CLv-L5(WO2016065001 의 서열 번호: 66 참조)	AAV CLv-L6(WO2016065001 의 서열 번호: 17 참조)
AAV CLv-L6(WO2016065001 의 서열 번호: 67 참조)	AAV CLv-M1(WO2016065001 의 서열 번호: 21 참조)
AAV CLv-M1(WO2016065001 의 서열 번호: 71 참조)	AAV CLv-M11(WO2016065001 의 서열 번호: 22 참조)

[0297]

AAV CLv-M1 1(WO2016065001의 서열 번호: 72 참조)	AAV CLv-M2(WO2016065001의 서열 번호: 23 참조)
AAV CLv-M2(WO2016065001의 서열 번호: 73 참조)	AAV CLv-M5(WO2016065001의 서열 번호: 24 참조)
AAV CLv-M5(WO2016065001의 서열 번호: 74 참조)	AAV CLv-M6(WO2016065001의 서열 번호: 25 참조)
AAV CLv-M6(WO2016065001의 서열 번호: 75 참조)	AAV CLv-M7(WO2016065001의 서열 번호: 26 참조)
AAV CLv-M7(WO2016065001의 서열 번호: 76 참조)	AAV CLv-M8(WO2016065001의 서열 번호: 27 참조)
AAV CLv-M8(WO2016065001의 서열 번호: 77 참조)	AAV CLv-M9(WO2016065001의 서열 번호: 28 참조)
AAV CLv-M9(WO2016065001의 서열 번호: 78 참조)	AAV CLv-R1(US8734809의 서열 번호: 30 참조)
AAV CLv-R1(US8734809의 서열 번호: 104 참조)	AAV CLv-R2(US8734809의 서열 번호: 31 참조)
AAV CLv-R2(US8734809의 서열 번호: 105 참조)	AAV CLv-R3(US8734809의 서열 번호: 32 참조)
AAV CLv-R3(US8734809의 서열 번호: 106 참조)	AAV CLv-R4(US8734809의 서열 번호: 33 참조)
AAV CLv-R4(US8734809의 서열 번호: 107 참조)	AAV CLv-R5(US8734809의 서열 번호: 34 참조)
AAV CLv-R5(US8734809의 서열 번호: 108 참조)	AAV CLv-R6(US8734809의 서열 번호: 35 참조)
AAV CLv-R6(US8734809의 서열 번호: 109 참조); AAV CLv-R7 802(US8734809의 서열 번호: 36 참조)	AAV CLv-R7(US8734809의 서열 번호: 110 참조)
AAV CLv-R8(US8734809의 서열 번호: 37 참조)	AAV CLv-R8(US8734809의 서열 번호: 111 참조)
AAV CLv-R9(US8734809의 서열 번호: 38 참조)	AAV CLv-R9(US8734809의 서열 번호: 112 참조)

[0298]

AAV CSp-1(US8734809 의 서열 번호: 45 참조)	AAV CSp-1(US8734809 의 서열 번호: 119 참조)
AAV CSp-10(US8734809 의 서열 번호: 46 참조)	AAV CSp-10(US8734809 의 서열 번호: 120 참조)
AAV CSp-11(US8734809 의 서열 번호: 47 참조)	AAV CSp-11(US8734809 의 서열 번호: 121 참조)
AAV CSp-2(US8734809 의 서열 번호: 48 참조)	AAV CSp-2(US8734809 의 서열 번호: 122 참조)
AAV CSp-3(US8734809 의 서열 번호: 49 참조)	AAV CSp-3(US8734809 의 서열 번호: 123 참조)
AAV CSp-4(US8734809 의 서열 번호: 50 참조)	AAV CSp-4(US8734809 의 서열 번호: 124 참조)
AAV CSp-6(US8734809 의 서열 번호: 51 참조)	AAV CSp-6(US8734809 의 서열 번호: 125 참조)
AAV CSp-7(US8734809 의 서열 번호: 52 참조)	AAV CSp-7(US8734809 의 서열 번호: 126 참조)
AAV CSp-8(US8734809 의 서열 번호: 53 참조)	AAV CSp-8(US8734809 의 서열 번호: 127 참조)
AAV CSp-8.10(WO2016065001 의 서열 번호: 38 참조)	AAV CSp-8.10(WO2016065001 의 서열 번호: 88 참조)
AAV CSp-8.2(WO2016065001 의 서열 번호: 39 참조)	AAV CSp-8.2(WO2016065001 의 서열 번호: 89 참조)
AAV CSp-8.4(WO2016065001 의 서열 번호: 40 참조)	AAV CSp-8.4(WO2016065001 의 서열 번호: 90 참조)
AAV CSp-8.5(WO2016065001 의 서열 번호: 41 참조)	AAV CSp-8.5(WO2016065001 의 서열 번호: 91 참조)
AAV CSp-8.6(WO2016065001 의 서열 번호: 42 참조)	AAV CSp-8.6(WO2016065001 의 서열 번호: 92 참조)
AAV CSp-8.7(WO2016065001 의 서열 번호: 43 참조)	AAV CSp-8.7(WO2016065001 의 서열 번호: 93 참조)
AAV CSp-8.8(WO2016065001 의 서열 번호:	AAV CSp-8.8(WO2016065001 의 서열

[0299]

44 참조)	번호: 94 참조)
AAV CSp-8.9(WO2016065001 의 서열 번호: 45 참조)	AAV CSp-8.9(WO2016065001 의 서열 번호: 95 참조)
AAV CSp-9 842(US8734809 의 서열 번호: 54 참조)	AAV CSp-9(US8734809 의 서열 번호: 128 참조)
AAV.hu.48R3(US8734809 의 서열 번호: 183 참조)	AAV.VR-355(US8734809 의 서열 번호: 181 참조)
AAV3B(WO2016065001 의 서열 번호: 48 참조)	AAV3B(WO2016065001 의 서열 번호: 98 참조)
AAV4(WO2016065001 의 서열 번호: 49 참조)	AAV4(WO2016065001 의 서열 번호: 99 참조)
AAV5(WO2016065001 의 서열 번호: 50 참조)	AAV5(WO2016065001 의 서열 번호: 100 참조)
AAVF1/HSC1(WO2016049230 의 서열 번호: 20 참조)	AAVF1/HSC1(WO2016049230 의 서열 번호: 2 참조)
AAVF11/ HSC11(WO2016049230 의 서열 번호: 26 참조)	AAVF11/HSC11(WO2016049230 의 서열 번호: 4 참조)
AAVF12/HSC12(WO2016049230 의 서열 번호: 30 참조)	AAVF12/HSC12(WO2016049230 의 서열 번호: 12 참조)
AAVF13/HSC13(WO2016049230 의 서열 번호: 31 참조)	AAVF13/HSC13(WO2016049230 의 서열 번호: 14 참조)
AAVF14/HSC14(WO2016049230 의 서열 번호: 32 참조)	AAVF14/HSC14(WO2016049230 의 서열 번호: 15 참조)
AAVF15/HSC15(WO2016049230 의 서열 번호: 33 참조)	AAVF15/HSC15(WO2016049230 의 서열 번호: 16 참조)
AAVF16/HSC16(WO2016049230 의 서열 번호: 34 참조)	AAVF16/HSC16(WO2016049230 의 서열 번호: 17 참조)
AAVF17/HSC17(WO2016049230 의 서열 번호: 35 참조)	AAVF17/HSC17(WO2016049230 의 서열 번호: 13 참조)
AAVF2/HSC2(WO2016049230 의 서열 번호: 21 참조)	AAVF2/HSC2(WO2016049230 의 서열 번호: 3 참조)

[0300]

AAVF3/HSC3(WO2016049230 의 서열 번호: 22 참조)	AAVF3/HSC3(WO2016049230 의 서열 번호: 5 참조)
AAVF4/HSC4(WO2016049230 의 서열 번호: 23 참조)	AAVF4/HSC4(WO2016049230 의 서열 번호: 6 참조)
AAVF5/HSC5(WO2016049230 의 서열 번호: 25 참조)	AAVF5/HSC5(WO2016049230 의 서열 번호: 11 참조)
AAVF6/HSC6(WO2016049230 의 서열 번호: 24 참조)	AAVF6/HSC6(WO2016049230 의 서열 번호: 7 참조)
AAVF7/HSC7(WO2016049230 의 서열 번호: 27 참조)	AAVF7/HSC7(WO2016049230 의 서열 번호: 8 참조)
AAVF8/HSC8(WO2016049230 의 서열 번호: 28 참조)	AAVF8/HSC8(WO2016049230 의 서열 번호: 9 참조)
AAVF9/HSC9(WO2016049230 의 서열 번호: 10 참조)	AAVF9/HSC9 882(WO2016049230 의 서열 번호: 29 참조)

[0301]

[0302] 특정 실시형태에서, rAAV는 WO 2017/212019에 개시된 바와 같은 화학적으로 변형된 캡시드를 포함하고, 예컨대, 만노스 리간드는 AAV2에 화학적으로 결합한다. rAAV는 WO 2017/212019에 개시된 화학적으로 변형된 캡시드를

가지며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 추가 실시형태로서, 본원에서 사용되는 AAV 캡시드 단백질 및 바이러스 캡시드는, 이들이 본원에 참조로 통합되는 PCT/US18/22725, PCT/US2018/044632, 또는 US 10,550,405에서 설명된 바와 같은 단일 AAV 캡시드 내의 VP1, VP2 및 VP3 AAV 혈청형의 상이한 조합을 포함할 수 있다는 점에서 배수체(합리적 반수체로도 지칭됨)일 수 있다.

[0303] 숙주 세포에서 배양되어 AAV 캡시드에 rAAV 벡터를 패키징하기 위한 성분이 숙주 세포에 제공될 수 있다. 대안적으로, 통상의 기술자에게 알려져 있는 방법을 사용하여 필요한 성분 중 하나 이상을 포함하도록 엔지니어링된 안정한 숙주 세포에 의해, 필요한 성분(예컨대, 재조합 AAV 벡터, 렙 서열, 캡 서열, 및/또는 헬퍼 기능) 중 임의의 하나 이상이 제공될 수 있다. 가장 적합하게는, 그러한 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에 필요한 성분(들)을 함유할 것이다. 그러나, 필요한 성분(들)은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 이식유전자에 사용하기에 적합한 조절 요소에 대한 논의에서, 적합한 유도성 및 구성적 프로모터의 예가 본원에 제공된다. 또 다른 대안에서, 선택된 안정한 숙주 세포는 구성적 프로모터의 제어 하에 선택된 성분(들), 및 하나 이상의 유도성 프로모터의 제어 하에 선택된 다른 성분(들)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 293 세포(구성적 프로모터의 제어 하에 E1 헬퍼 기능을 포함함)에서 유래되었지만 유도성 프로모터의 제어 하에 렙 및/또는 캡 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 통상의 기술자에 의해 또 다른 안정한 숙주 세포가 생성될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 단백질(예컨대, 야생형 헌팅틴 단백질, 선택적으로 "강화된" 야생형 헌팅틴 단백질)을 암호화하는 코딩 서열을 포함하는 핵산을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 위에서 설명된 숙주 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 숙주 세포를 포함하는 조성물은 동결보존제를 더 포함한다.

[0304] 본 개시내용의 rAAV를 생성하는 데 필요한 재조합 AAV 벡터, 렙 서열, 캡 서열, 및 헬퍼 기능은 임의의 적절한 유전적 요소(벡터)를 사용하여 패키징 숙주 세포에 전달될 수 있다. 선택된 유전적 요소는 본원에서 설명되는 방법들을 포함하여, 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 개시내용의 임의의 실시형태를 구성하는 데 사용되는 방법은 핵산 조작 기술을 갖는 통상의 기술자에게 알려져 있고, 이는 유전적 엔지니어링, 재조합 엔지니어링, 및 합성 기법을 포함한다. 예컨대, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 잘 알려져 있고, 적합한 방법의 선택은 본 개시내용에 한정되지 않는다. 예컨대, 문헌 [K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 제5,478,745호를 참조한다.

[0305] 일부 실시형태에서, 재조합 AAV는 삼중 형질감염 방법(미국 특허 제6,001,650호에 상세하게 설명되어 있음)을 사용하여 생성될 수 있다. 전형적으로, 재조합 AAV는 AAV 입자에 패키징될 재조합 AAV 벡터(이식유전자를 포함함), AAV 헬퍼 기능 벡터, 및 보조 기능 벡터로 숙주 세포를 형질감염시킴으로써 생성된다. AAV 헬퍼 기능 벡터는 "AAV 헬퍼 기능" 서열(즉, rep 및 cap)을 암호화하며, 생산적인 AAV 복제 및 캡슐화를 위해 트랜스로 기능한다. 바람직하게는, AAV 헬퍼 기능 벡터는 임의의 검출 가능한 야생형 AAV 비리온(즉, 기능적 렙 및 캡 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않고 효율적인 AAV 벡터 생성을 지원한다. 본 개시내용에서 사용하기 위한 적합한 벡터의 비제한적인 예는, 미국 특허 제6,001,650호에 설명되어 있는 pHLP19, 및 미국 특허 제6,156,303호에 설명되어 있는 pRep6cap6 벡터를 포함하며, 둘 모두의 전체는 본원에 참조로 통합된다. 보조 기능 벡터는, AAV가 복제를 위해 의존하는 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포 기능(즉, "보조 기능")을 위한 뉴클레오타이드 서열을 암호화한다. 보조 기능은, AAV 유전자 전사의 활성화, 단계별 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, 캡 발현 산물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여하는 모이어티를 제한없이 포함하는, AAV 복제에 필요한 기능을 포함한다. 바이러스 기반의 보조 기능은 아데노바이러스, 헤르페스바이러스(1형 단순 포진 바이러스 제외), 및 우두바이러스와 같은 알려진 헬퍼 바이러스중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0306] 일부 국면에서, 본 개시내용은 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. 용어 "형질감염"은 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하는 데 사용되고, 세포는 외인성 DNA가 세포막으로 도입되었을 때 "형질감염된다". 다수의 형질감염 기법이 일반적으로 해당 기술 분야에 알려져 있다. 예컨대, 문헌(Graham et al. (1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, and Chu et al. (1981) Gene 13:197)을 참조한다. 그러한 기법은 하나 이상의 외인성 핵산, 이를테면 뉴클레오타이드 통합 벡터 및 다른 핵산 분자를 적합한 숙주 세포에 도입하는 데 사용될 수 있다.

[0307] "숙주 세포"는 관심있는 물질을 함유하거나, 또는 함유할 수 있는 임의의 세포를 지칭한다. 종종 숙주 세포는 포유류 세포이다. 숙주 세포는 AAV 헬퍼 컨스트럭트의 수용자, AAV 미니유전자 플라스미드, 보조 기능 벡터, 또는 재조합 AAV의 생성과 연관된 다른 수송 DNA로서 사용될 수 있다. 해당 용어는 형질감염된 본래의 세포의

자손을 포함한다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같은 "숙주 세포"는 외인성 DNA 서열로 형질감염된 세포를 지칭한다. 단일 모세포의 자손은, 천연, 우발적, 또는 의도적 돌연변이로 인해, 본래의 모체와 형태 또는 게놈 또는 총 DNA 상보체가 반드시 완전히 동일할 필요는 없다는 것이 이해된다.

[0308] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포주"는 시험관 내에서 연속적이거나 장기적인 성장 및 분할이 가능한 세포의 집단을 지칭한다. 종종, 세포주는 단일 전구 세포에서 유래된 클론 집단이다. 자발적이거나 유도된 변화는 그러한 클론 집단의 저장 또는 수송 동안 핵형에서 발생할 수 있다는 것이 해당 기술 분야에 추가로 알려져 있다. 따라서, 언급된 세포주에서 유래한 세포는 조상 세포 또는 배양물과 정확히 동일하지 않을 수 있고, 언급된 세포주는 그러한 변이체를 포함한다.

[0309] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "재조합 세포"는, 생물학적으로-활성인 폴리펩타이드의 전사, 또는 RNA와 같은 생물학적으로 활성인 핵산의 생성을 초래하는 외인성 DNA 분절, 이를테면 DNA 분절이 도입된 세포를 지칭한다.

[0310] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 인공 염색체, 바이러스, 비리온 등과 같은 임의의 유전 요소를 포함하고, 이는 적절한 제어 요소와 연관될 때 복제가 가능하고 세포 사이에 유전자 서열을 수송할 수 있다. 따라서, 용어 "벡터"는 클로닝 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함한다. 벡터의 일 유형은 "플라스미드"이고, 이는 추가적인 DNA 분절이 결찰된 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 벡터의 또 다른 유형은 바이러스 벡터이고, 여기서 DNA 분절은 바이러스 게놈에 결찰된다. 특정 벡터(예컨대, 복제의 박테리아 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터)는 그들이 도입되는 숙주 세포로 자체적인 복제가 가능하다. 또한, 특정 벡터는 그들이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 그러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환적으로 사용되는데 이는 플라스미드가 가장 보편적으로 사용되는 벡터의 형태이기 때문이다. 그러나, 본원에서 설명된 기술은 바이러스 벡터(예컨대, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은, 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도되고, 이들은 동등한 기능을 한다.

[0311] 클로닝 벡터는, 숙주 세포의 게놈에서 자체적으로 또는 통합적으로 복제할 수 있으며, 벡터가 결정 가능한 방식으로 절단될 수 있고 새로운 재조합 벡터가 숙주 세포에서 복제 능력을 유지하도록 원하는 DNA 서열이 결찰될 수 있는 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 더 특징으로 하는 벡터이다. 플라스미드의 경우, 숙주 박테리아와 같은 숙주 세포 내에서 플라스미드의 복사본 수가 증가함에 따라 원하는 서열의 복제가 다회 발생하거나, 숙주가 유사 분열에 의해 번식하기 전에 숙주 당 단 1회만 발생할 수 있다. 파지의 경우, 복제는 용해성 단계 동안 활발하게 발생할 수 있거나, 용원 단계 동안 소극적으로 발생할 수 있다.

[0312] 발현 벡터는 제한 및 결찰에 의해 원하는 DNA 서열이 삽입될 수 있는 벡터이므로, 조절 서열에 작동 가능하게 결합되어 RNA 전사체로서 발현될 수 있다. 벡터는 또한 형질전환되었거나 형질전환되지 않은 세포, 또는 벡터로 형질전환되었거나 형질감염되지 않은 세포를 식별하는 데 사용하기에 적합한 하나 이상의 마커 서열을 함유할 수 있다. 예를 들어, 마커는 항생제 또는 다른 화합물에 대한 내성 또는 민감성 중 어느 하나를 증가 또는 감소시키는 단백질을 암호화하는 유전자, 해당 기술 분야에 알려져 있는 표준 분석에 의해 활성이 검출 가능한 효소(예컨대, β-갈락토시다아제, 루시퍼라아제 또는 알칼리성 포스파타아제)를 암호화하는 유전자, 및 형질전환 또는 형질감염된 세포, 숙주, 콜로니 또는 플라크의 표현형에 가시적으로 영향을 주는 유전자(예컨대, 녹색 형광 단백질)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원에 사용된 벡터는 그들이 작동 가능하게 결합된 DNA 분절에 존재하는 구조적 유전자 산물을 자체적으로 복제 및 발현할 수 있다.

[0313] 본 발명의 일부 국면에서, GDNF (AAV2-GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV는, 박테리아 백본 서열이 결여되어 있는 폐쇄형 말단 선형 듀플렉스화 DNA 분자를 사용하는 삼중 감염 방법에 의해 생성되고, 예를 들어, 이는 PCT/US2021/013689에 설명된 바와 같고, WO/2021/146591에서 공개된 바와 같으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0314] 본 발명의 일부 국면에서, GDNF(AAV2-GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV는 PCT/US2022/013279에서 설명되고, WO2022159679에서 공개된 바와 같은 방법에 의해 생성되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0315] 일부 실시형태에서, 유용한 벡터는 전사될 핵산 분절이 프로모터의 전사 제어 하에 위치되는 그러한 벡터로 고려된다. 코딩 서열이 기능적 단백질로 번역되기를 원하는 경우, 5' 조절 서열의 프로모터 유도로 인해 코딩 서

열의 전사가 발생하는 경우, 그리고 2개의 DNA 서열 사이의 연결의 특성이 (1) 프레임 시프트 돌연변이의 도입을 초래하지 않거나, (2) 프로모터 영역이 코딩 서열의 전사를 지시하는 능력을 방해하지 않거나, (3) 대응하는 RNA 전사체가 단백질로 번역되는 능력을 방해하지 않는 경우, 2개의 DNA 서열은 작동 가능하게 연결되어 있다고 한다. 따라서, 프로모터 영역은, 프로모터 영역이 해당 DNA 서열의 전사에 영향을 줄 수 있었던 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으므로, 생성된 전사체는 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역될 수 있다.

[0316] 유전자 발현에 필요한 조절 서열의 정확한 본질은 종 또는 세포 유형에 따라 달라질 수 있지만, 일반적으로, TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열 등과 같은, 각각 전사 및 번역의 개시에 관여되는 5′ 비전사 및 5′ 비번역 서열을 필요에 따라 포함할 수 있다. 특히, 그러한 5′ 비전사 조절 서열은 작동 가능하게 결합된 유전자의 전사 제어를 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함할 것이다. 조절 서열은 또한 원하는 바와 같이 인핸서 서열 또는 상류 활성화제 서열을 포함할 수 있다. 본원에서 설명되는 벡터는 5′ 리더 또는 신호 서열을 선택적으로 포함할 수 있다. 적절한 벡터의 선택 및 설계는 통상의 기술자의 능력 및 재량 내에 있다.

[0317] 발현을 위해 필요한 모든 요소를 함유하는 발현 벡터는 상업적으로 입수 가능하고 통상의 기술자에게 알려져 있다. 예컨대, 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]을 참조한다. 세포는 이종 DNA(RNA)의 세포로의 도입에 의해 유전적으로 엔지니어링된다. 해당 이종 DNA(RNA)는 전사 요소의 작동 가능한 제어 하에 위치되어 숙주 세포에서 이종 DNA의 발현을 허용한다.

[0318] "작동 가능하게 연결된", "작동 가능하게 위치된", "제어 하에" 또는 "전사 제어 하에"라는 어구는 유전자의 RNA 중합효소 개시 및 발현을 제어하기 위해 핵산과 관련하여 프로모터가 올바른 위치 및 배향에 있다는 것을 의미한다. 용어 "발현 벡터 또는 컨스트럭트"는 핵산을 함유하는 임의의 유형의 유전적 컨스트럭트를 의미하며, 여기서 서열을 암호화하는 핵산의 일부 또는 전부는 전사될 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현은 예를 들어, 전사된 유전자로부터 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드 생성물 또는 기능적 RNA(예컨대, 가이드 RNA)를 생성하기 위해, 핵산의 전사를 포함한다.

[0319] 본 개시내용의 rAAV를 생성하기 위해 재조합 벡터를 원하는 AAV 캡시드에 패키징하기 위한 전술한 방법은 제한적인 것으로 의도되지 않으며, 다른 적합한 방법은 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0320] 일부 실시형태에서, 재조합적으로 발현되는 유전자 중 하나 이상은 세포의 게놈에 통합될 수 있다.

[0321] 본원에서 설명되는 핵산 분자는 해당 기술 분야에서 표준인 방법 및 기법을 사용하여 세포 또는 세포들에 도입된다. 예를 들어, 핵산 분자는 화학적 형질전환 및 전기 천공법을 포함하는 형질전환, 형질도입, 입자 충격법(particle bombardment) 등과 같은 표준 프로토콜에 의해 도입될 수 있다. 본원에서 설명되는 핵산 분자를 발현하는 것은 또한 핵산 분자를 게놈에 통합함으로써 달성될 수 있다.

[0322] 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 내에 패키징된 게놈은 서열 번호: 64의 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 내에 패키징된 게놈은 서열 번호: 64의 서열로 이루어지거나 또는 이로 본질적으로 이루어진다. 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 내에 패키징된 게놈은 서열 번호: 64의 서열에 대해 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어진다.

[0323] 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 벡터는 서열 번호: 64의 ITR 사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)을 포함한다. 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 벡터는 서열 번호: 64의 ITR 사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)으로 이루어지거나 또는 이로 본질적으로 이루어진다. 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 벡터는 서열 번호: 64의 ITR 사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어지고, 서열 번호: 64를 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어지는 플라스미드로부터 생성된다. 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 벡터는 서열 번호: 64의 ITR 사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)의 서열에 대해 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, rAAV는 서열 번호: 64에 명시된 플라스미드 DNA를 사용하여 제조되고, 이는 도 26에 도시되어 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 폐쇄형 말단 선형 듀플렉스화 DNA를 사용하여 제조된다. 다양한 실시형태에서, AAV2-GDNF는 서열 번호: 64의 ITR

사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)을 포함하는 플라스미드를 포함한다. 다른 실시형태에서, AAV2-GDNF는 서열 번호: 64의 ITR 사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)을 포함하는 폐쇄형 말단 선형 듀플렉스화 DNA를 포함하고, 이것의 비제한적인 예는 US 출원 2018/0037943 및 문헌 [Karbowniczek et al., Bioinsights, 2017]에 개시된 바와 같은 도기 본(Doggybone) DNA(dbDNA™)이며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

서열 번호 :64

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct
cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaa
cccgccatgctacttatctacgtagccatgctctagagcggccgcacgcgt**ctagttattaatagtaatcaat**
tacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggc
tgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactt
tccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgcc
aagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgg
gactttcctacttggcagtacatctagtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacat
caatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttg
ttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggta
ggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccatcc
acgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggattcgaatcccggccgggaacg
gtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgcctatagagtctataggcccacaaaaa
aatgctttcttctttttaatatacttttttgtttatcttatttctaatactttccctaatctctttctttcagg
gcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg
caatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgcta
atagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtcca
agctaggccctttgctaatcatgttcatacctcttatcttcctcccacagctcctgggcaacgtgctggtct
gtgtgctggcccatcactttggcaaagaattgggattcgaacatcgattgaattgcaccatgaagttatggga
tgtcgtggctgtctgcctggtgctgctccacaccgcgtccgccttcccgctgcccgccggtaagaggcctccc
gaggcgcccgccgaagaccgctccctcggccgccgccgcgcgcccttcgcgctgagcagtgactcaaatatgc
cagaggattatcctgatcagttcgatgatgtcatggattttattcaagccaccattaaaagactgaaaaggtc
accagataaacaaatggcagtgcttcctagaagagagcggaatcggcaggctgcagctgccaacccagagaat
tccagaggaaaaggtcggagaggccagaggggcaaaaaccggggttgtgtcttaactgcaatacatttaaatg
tcactgacttgggtctgggctatgaaaccaaggaggaactgatttttaggtactgcagcggctcttgcgatgc

[0324]

agctgagacaacgtacgacaaaatattgaaaaacttatccagaaatagaaggctggtgagtgacaaagtaggg
caggcatgttgcagacccatcgcctttgatgatgacctgtcgtttttagatgataacctggtttaccatattc
taagaaagcattccgctaaaaggtgtggatgtatctgaccatcgatagatcta**cgggtggcatccctgtgacc**
cctccccagtgcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaag
ttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaagggg
caagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatctt
ggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattcca
ggcatgcatgaccaggctcagctaatttttgtttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctg
gtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaacca
ctgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaacgaccgagcggccgctctagagcatggctacgtagat
aagtagcatggcgggttaatcattaactaca**aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcg**
ctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgag
cgagcgagcgcgcagctgcctgcaggacatgt***gagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcc***
gcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggt
ggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttcc
gaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgc
tgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccg
accgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagc
agccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaac
tacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttg
gtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcg
cagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaactccgtcgag
aggtctgcctcgtgaagaaggtgttgctgactcataccaggcctgaatcgccccatcatccagccagaaagtg
agggagccacggttgatgagagctttgttgtaggtggaccagttggtgattttgaacttttgctttgccacgg
aacggtctgcgttgtcgggaagatgcgtgatctgatccttcaactcagcaaaagttcgatttattcaacaaag
ccacgttgtgtctcaaaatctctgatgttacattgcacaagataaaaatatatcatcatgaacaataaaactg
tctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttgctcgaagccgc
gattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgc
gacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgcc
aatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcatt
ttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtattaga
agaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgcattcgattcct
gtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtt
tggttgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataa
gcttttgccattctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgag
gggaaattaataggttgtattgatgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctat
ggaactgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacggctttttcaaaaatatggtattgataatcctga
tatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagtttttctaatcagaattggttaattggttgtaacac
tggcagagcattacgctgacttgacgggacggcggctttgttgaataaatcgcattcgccattcaggctgcgc
aactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaa

[0325]

ggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgc
atgcctgcaggtctaaatcaaaagaatagcccgagatagagttgagtgttgttccagtttggaacaagagtcc
actattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaa
ccatcacccaaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagccccc
gatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgc
taaggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacag
ggcgcgtactatggttgctttgacgtatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcat
caggcaggtcgccgccc*cgtaacctgtcggatcaccggaaaggacccgtaaagtgataatgattatcatctac*
atatcacaacgtgcgtggaggccatcaaaccacgtcaaataatcaattatgacgcaggtatcgtattaattga
tctgcatcaacttaacgtaaaaacaacttcagacaatacaaatcagcgacactgaatacggggcaacctcatg
tcaacgaagaacagaacccgcagaacaacaacccgcaacatccgctttcctaaccaaatgattgaacaaatta
acatcgctcttgagcaaaaagggtccgggaatttctcagcctgggtcattgaagcctgccgtcggagactaac
gtcagaaaagagagcatatacatcaattaaaagtgatgaagaatgaacatcccgcgttcttccctccgaacag
gacgatattgtaaattcacttaattacgagggcattgcagtaattgagttgcagttttaccactttcctgaca
gtgacagactgcgtgttggctctgtcacagactaaatagtttgaatgattagcagttatggtgatcagtcaac
caccagggaataatccttcatattattatcgtgcttcaccaacgctgcctcaattgctctgaatgcttccaga
gacaccttatgttctatacatgcaattacaacatcagggtaactcatagaaatggtgctattaagcatatttt
ttacacgaatcagatccacggagggatcatcagcagattgttctttattcattttgtcgctccatgcgcttgc
tcttcatctagcggttaaaatattacttcaaatctttctgtatgaagatttgagcacgttggccttacataca
tctgtcggttgtatttccctccagaatgccagcaggaccgcactttgttacgcaaccaatactattaagtgaa
aacattcctaatatttgacataaatcatcaacaaaacacaaggaggtcagaccagattgaaacgataaaaacg
ataatgcaaactacgcgcccctcgtatcacatggaaggttttaccaatggctcaggttgccatttttaaagaaa
tattcgatcaagtgcgaaaagatttagactgtgaattgttttattctgaactaaaacgtcacaacgtctcaca
ttatatttactatctagccacagataatattcacatcgtgttagaaaacgataacaccgtgttaataaaagga
cttaaaaaggttgtaaatgttaaattctcaagaaacacgcatcttatagaaacgtcctatgataggttgaaat
caagagaaatcacatttcagcaatacagggaaaatcttgctaaagcaggagttttccgatgggttacaaatat
ccatgaacataaaagatattactatacctttgataattcattactatttactgagagcattcagaacactaca
caaatctttccacgctaaatcataacgtccggtttcttccgtgtcagcaccggggcgttggcataatgcaata
cgtgtacgcgctaaaccctgtgtgcatcgttttaattattcccggacactcccgcagagaagttccccgtcag
ggctgtggacatagttaatccgggaatacaatgacgattcatcgcacctgacatacattaataaatattaaca
atatgaaatttcaactcattgtttagggtttgtttaattttctacacatacgattctgcgaacttcaaaaagc
atcgggaataacaccatgaaaaaaatgctactcgctactgcgctggccctgcttattacaggatgtgctcaac
agacgtttactgttcaaaacaaaccggcagcagtagcaccaaaggaaaccatcacccatcatttcttcgtttc
tggaattgggcagaagaaaactgtcgatgcagccaaaatttgtggcggcgcagaaaatgttgttaaaacagaa
acccagcaaacattcgtaaatggattgctcggttttattactttaggcatttatactccgctggaagcgcgtg
tgtattgctcacaataattgcatgagttgcccatcgatatgggcaactctatctgcactgctcattaatatac
ttctgggttccttccagttgtttttgcatagtgatcagcctctctctgagggtgaaataatcccgttcagcgg
tgtctgccagtcgggggggaggctgcattatccacgccggaggcggtggtggcttcacgcactgactgacagac
tgctttgatgtgcaaccgacgacgaccagcggcaacatcatcacgcagagcatcattttcagctttagcatca
gctaactccttcgtgtattttgcatcgagcgcagcaacatcacgctgacgcatctgcatgtcagtaattgccg

[0326]

cgttcgccagcttcagttctctggcatttttgtcgcgctgggctttgtaggtaatggcgttatcacggtaatg
attaacagcccatgacaggcagacgatgatgcagataaccagagcggagataatcgcggtgactctgctcata
catcaatctctctgaccgttccgcccgcttctttgaattttgcaatcaggctgtcagccttatgctcgaactg
accataaccagcgcccggcagtgaagcccagatattgctgcaacggtcgattgcctgacggatatcaccacga
tcaatcataggtaaagcgccacgctccttaatctgctgcaatgccacagcgtcctgacttttcggagagaagt
ctttcaggccaagctgcttgcggtaggcatcccaccaacgggaaagaagctggtagcgtccggcgcctgttga
tttgagttttgggtttagcgtgacaagtttgcgagggtgatcggagtaatcagtaaatagctctccgcctaca
atgacgtcataaccatgatttctggttttctgacgtccgttatcagttccctccgaccacgccagcatatcga
ggaacgccttacgttgattattgatttctaccatcttctactccggctttttagcagcgaagcgtttgataa
gcgaaccaatcgagtcagtaccgatgtagccgataaacacgctcgttatataagcgagattgctacttagtcc
ggcgaagtcgagaaggtcacgaatgaactaggcgataatggcgcacatcgttgcgtcgattactgtttttgta
aacgcaccgccattatatctgccgcgaaggtacgccattgcaaacgcaaggattgccccgatgccttgttcct
ttgccgcgagaatggcggccaacaggtcatgtttttctggcatcttcatgtcttacccccaataaggggattt
gctctatttaattaggaataaggtcgattactgatagaacaaatccaggctactgtgtttagtaatcagattt
gttcgtgaccgatatgcacgggcaaaacggcaggaggttgttagcgcgacctcctgccacccgctttcacgaa
ggtcatgtgtaaaaggccgcagcgtaactattactaatgaattcaggacagacagtggctacggctcagtttg
ggttgtgctgttgctgggcggcgatgacgcctgtacgcatttggtgatccggttctgcttccggtattcgctt
aattcagcacaacggaaagagcactggctaaccaggctcgccgactcttcacgattatcgactcaatgctctt
acctgttgtgcagatataaaaaatcccgaaaccgttatgcaggctctaactattacctgcgaactgtttcggg
attgcattttgcagacctctctgcctgcgatggttggagttccagacgatacgtcgaagtgaccaactaggcg
gaatcggtagtaagcgccgcctcttttcatctcactaccacaacgagcgaattaacccatcgttgagtcaaat
ttacccaattttattcaataagtcaatatcatgccgttaatatgttgccatccgtggcaatcatgctgctaac
gtgtgaccgcattcaaaatgttgtctgcgattgactcttctttgtggcattgcaccaccagagcgtcatacag
cggcttaacagtgcgtgaccaggtgggttgggtaaggtttgggattagcatcgtcacagcgcgatatgctgcg
cttgctggcatccttgaatagccgacgcctttgcatcttccgcactctttctcgacaactctcccccacagct
ctgttttggcaatatcaaccgcacggcctgtaccatggcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctctt
cgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttccca
gtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatg （**서열 번호:** 64）

[0327]

[0328] 일 실시형태에서, 도 26에 도시된 플라스미드는 AAV2-GDNF 게놈을 생성하는 데 사용된다.

[0329] 일 실시형태에서, AAV2-GDNF 내에 패키징된 게놈이 도 26에 도시되어 있다.

[0330] 일 실시형태에서, AAV2-GDNF는 도 26에 도시된 플라스미드를 사용하여 제조된다.

[0331] 일 실시형태에서, AAV2-GDNF는 표 8에 나열된 적어도 하나의 성분을 포함한다.

표 8

AAV2-GDNF 의 성분	서열번호:	서열 번호: 34 로 표시됨	서열 번호: 64 의 염기쌍
좌측 ITR 서열	65	서열 번호: 64 에서 밑줄 친 텍스트로 표시됨	12-130
우측 ITR 서열	66	서열 번호: 64 에서 볼드체, 이중으로 밑줄 친 텍스트로 표시됨	2587-2716
CMV 인핸서/프로모터 서열	67	서열 번호: 64 에서 볼드체 텍스트로 표시됨	198-944
인간 베타-글로빈 영역 서열	68	서열 번호: 64 에서 볼드체, 밑줄 친 텍스트로 표시됨	946-1345
hGDNF 이식유전자 서열	69	서열 번호: 64 에서 이중으로 밑줄 친 텍스트로 표시됨	1374-2009
hGH 폴리 A 테일 서열	70	서열 번호: 64 에서 점선으로 밑줄 친 텍스트로 표시됨	2025-2510
pUC Ori 서열	71	서열 번호: 64 에서 볼드체, 이탤릭체, 밑줄 친 텍스트로 표시됨	2734-3399
카나마이신 저항성 서열	72	서열 번호: 64 에서 물결 모양으로 밑줄 친 텍스트로 표시됨	3757-4569
람다 스터퍼 서열	73	서열 번호: 64 에서 이탤릭체, 밑줄 친 텍스트로 표시됨	5274-9529

[0332]

[0333] *변형된 캡시드*

[0334] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 캡시드는 CNS에 대한 친화성을 증가시키기 위해 더 변형된다. 일 실시형태에서, 캡시드의 친화성, 따라서 AAV는 비변형된 AAV와 비교하여, 적어도 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% 또는 그 이상만큼, 또는 적어도 1x, 2x, 3x, 4x, 0x; 5x; 10x; 15x; 20x; 25x; 30x; 35x; 40x; 45x; 50x; 55x; 60x; 65x; 70x; 75x; 80x; 85x; 90x; 95x; 100x; 250x; 500x; 750x, 또는 1,000x 또는 그 이상만큼 증가된다.

[0335] 일 실시형태에서, 캡시드는 비-CNS 조직에 대한 그의 친화성이 감소되도록 변형된다. 예를 들어, 간-특이적 친화성을 갖는 캡시드는 그러한 친화성을 더 이상 갖지 않도록 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, 캡시드는 비-CNS 조직에 대한 그의 친화성이, 비변형된 캡시드와 비교하여, 적어도 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% 또는 그 이상만큼 감소되도록 변형된다.

[0336] 또 다른 실시형태에서, 변형된 캡시드는 CNS 조직에 대한 그의 친화성이 증가하고 비-CNS 조직에 대한 그의 친화성이 감소되도록 변형된다. 예를 들어, 간-특이적 친화성을 갖는 캡시드는 그것이 CNS-특이적 친화성을 나타내고 감소된 간-특이적 친화성을 갖도록 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, 캡시드의 CNS-친화성은 비변형된 캡시드와 비교하여 적어도 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%;

98%; 99% 또는 그 이상만큼, 또는 적어도 1x, 2x, 3x, 4x, 0x; 5x; 10x; 15x; 20x; 25x; 30x; 35x; 40x; 45x; 50x; 55x; 60x; 65x; 70x; 75x; 80x; 85x; 90x; 95x; 100x; 250x; 500x; 750x, 또는 1,000x 또는 그 이상만큼 증가되고, 비-CNS 조직에 대한 친화성은 비변형된 캡시드와 비교하여 적어도 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%; 50%; 51%; 52%; 53%; 54%; 55%; 56%; 57%; 58%; 59%; 60%; 61%; 62%; 63%; 64%; 65%; 66%; 67%; 68%; 69%; 70%; 71%; 72%; 73%; 74%; 75%; 76%; 77%; 78%; 79%; 80%; 81%; 82%; 83%; 84%; 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% 또는 그 이상만큼 감소된다.

[0337] 페이로드를 포함하는 변형된 바이러스 캡시드를 포함하는 조성물이 본원에 제공되고, 여기서 페이로드는 중추신경계 장애를 표적화하는, 역전된 말단 반복(ITRs)에 의해 플랭킹된 조절 서열 및 핵산 서열을 포함하고, 여기서 변형은 화학적, 비-화학적 또는 아미노산 변형이다. 일부 실시형태에서, 페이로드의 핵산 서열은 이식유전자, 예컨대, GDNF를 암호화하는 단리된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 페이로드의 핵산 서열은 GDNF 단백질을 암호화하는 단리된 핵산을 포함한다.

[0338] 특정 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 CNS를 우선적으로 표적화하는 변형을 포함한다. 예를 들어, 변형된 바이러스 캡시드는 CNS에 대해 증가된 친화성, 및/또는 적어도 제2 위치, 예컨대, 간에 대해 감소된 친화성을 갖는다. CNS의 우선적인 표적화는 다른 부위에 대한 표적화를 배제하는 것이 아니라, 다른 부위와 비교하여 CNS에 대해 고도로 표적화된다는 것을 나타낸다.

[0339] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 CNS를 표적화하는 변형을 포함한다. 예를 들어, 전형적으로 비-CNS 부위(예컨대, 간)를 표적화하는 캡시드에 대한 변형은 캡시드가 이제 CNS 및 비-CNS 부위 둘 모두를 표적화하도록 할 수 있다. 그러한 실시형태에서, CNS-표적화는 우선적일 필요가 없다.

[0340] 일 실시형태에서, 캡시드에 대한 변형은 아미노산 변형, 예컨대, 아미노산 결실, 삽입, 또는 치환이다. 일 실시형태에서, 아미노산 변형은 CNS에 대한 친화성을 증가시킨다. 일 실시형태에서, 아미노산 변형은 변형된 캡시드를 CNS로 표적화한다.

[0341] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 US 특허 출원 제16/511,913호의 서열 번호 1-4에 대해 90% 동일한 핵산 서열로 이루어지거나, 또는 이로 본질적으로 이루어지며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 이 US 미국 출원은 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)에 대해 우세한 친화성을 나타내는 키메라 AAV 캡시드 서열을 설명하고, 대상체의 CNS에서 희소돌기아교세포를 형질전환하는 AAV 벡터를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0342] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 AAV 캡시드 단백질이고, 여기서 치환은 새로운 글리칸 결합 부위를 AAV 캡시드 단백질에 도입한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 치환은 AAV2 내의 아미노산 266번, 아미노산 463-475번 및 아미노산 499-502번에 있거나, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 또는 AAV10 내의 대응하는 아미노산 위치에 있다. 그러한 AAV 캡시드 단백질은 예컨대, US 특허 출원 제16/110,773호에서 더 설명되어 있고; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0343] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는, 새로운 글리칸 결합 부위를 도입하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 AAV 2.5 캡시드 단백질(국제 특허 출원 번호 PCT/US2020/029493의 서열 번호: 1; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합됨)을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어지는 AAV 캡시드 단백질이다. 그러한 아미노산 치환은 캡시드를 성상세포종과 같은 신경세포 및 신경교세포로 표적화할 수 있다. 국제 특허 출원 제WO/2020/219656호에 설명된 캡시드 단백질, 캡시드, 바이러스 벡터 및 방법의 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 A267S, SQAGASDIRDQSR464-476SX_1AGX_2S$X_3X_4X_5X_6$QX_7R(각각 서열 번호 153 및 154)을 포함하고, 여기서 X_{1-7}은 임의의 아미노산, 및 EYSW 500-503(서열 번호: 155) EX_8X_9W일 수 있고, 여기서 X_{8-9}는 임의의 아미노산일 수 있다. 본원에서 설명되는 캡시드 단백질, 캡시드, 바이러스 벡터 및 방법의 실시형태에서, X_1는 V 또는 그 보존적 치환이고; X_2는 P 또는 그 보존적 치환이고; X_3는 N 또는 그 보존적 치환이고; X_4는 M 또는 그 보존적 치환이고; X_5는 A 또는 그 보존적 치환이고; X_6는 V 또는 그 보존적 치환이고; X_7는 G 또는 그 보존적 치환이고; X_8는 F 또는 그 보존적 치환이고; 및/또는 X_9는 A 또는 그 보존적 치환이다. 본원에서 설명되는 캡시드 단백질, 캡시드, 바이러스 벡터 및 방법의 실시형태에서, X_1는 V이고, X_2는 P이고, X_3는 N이고, X_4는 M이고, X_5는 A이고, X_6는 V이고, X_7는 G이고, X_8는 F이고, X_9는 A이고, 여기서 새로운 글리칸 결합 부위는 갈락토스 결합 부위이다. 그러한 AAV 캡시드 단백질은 예컨대, 국제 특허 출원 번호 WO/2020/219656에 더 설명되어

있고; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0344] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 표면-결합 펩타이드를 포함하는 AAV 캡시드 단백질 입자이며, 여기서, AAV 입자의 표면에 결합된 펩타이드는 예컨대, US 특허 출원 제16/956,306호에서 설명된 바와 같이, 안지오펩-2, GSH, HIV-1 TAT (48-60), ApoE (159-167)2, 렙틴 30 (61-90), THR, PB5-3, PB5-5, PB5-14 또는 이들의 임의의 조합이고; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 그러한 AAV 캡시드는 예컨대, 혈액 뇌 장벽을 통과하여, 페이로드의 전달을 허용한다.

[0345] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 AAV 캡시드 단백질(예컨대, AAV1, AAV5, 또는 AAV6 캡시드 단백질)을 포함하고, 여기서 캡시드 단백질의 VP3 영역은, 야생형 AAV1 캡시드 단백질의 Y705, Y731, 및 T492 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 1; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합됨); 야생형 AAV5 캡시드 단백질의 Y436, Y693, 및 Y719 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 2); 또는 야생형 AAV6 캡시드 단백질의 Y705, Y731, 및 T492 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 3)에 대응하는 위치에서, 변형(예컨대, 티로신 잔기를 비-티로신 잔기로 교체 및/또는 트레오닌 잔기를 비-트레오닌 잔기로 교체)을 포함한다. 그러한 AAV 캡시드는 신경세포 및 성상세포종을 표적화한다.

[0346] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는, 야생형 AAV1 캡시드 단백질의 Y705F, Y731F, 및 T492V 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 1); 야생형 AAV5 캡시드 단백질의 Y436F, Y693F, 및 Y719F 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 2); 또는 야생형 AAV6 캡시드 단백질의 Y705F, Y731F, 및 T492V 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 3)에 대응하는 위치에서, 캡시드의 VP3 영역 내의 Y에서 F로의(티로신에서 페닐알라닌으로의) 변형 또는 T에서 V로의(트레오닌에서 발린으로의) 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질(예컨대, AAV1, AAV5, 또는 AAV6 캡시드 단백질)을 포함한다. 그러한 AAV 캡시드는 신경세포 및 성상세포종을 표적화한다.

[0347] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 AAV 캡시드 단백질(예컨대, AAV1, AAV5, 또는 AAV6 캡시드 단백질)을 포함하고, 여기서 캡시드 단백질의 VP3 영역은, 야생형 AAV1 캡시드 단백질의 Y705, Y731, 및 T492 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 1); 야생형 AAV5 캡시드 단백질의 Y436, Y693, 및 Y719 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 2); 또는 야생형 AAV6 캡시드 단백질의 Y705, Y731, 및 T492 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 3)에 대응하는 위치에서, 변형(예컨대, 티로신 잔기를 비-티로신 잔기로 교체 및/또는 트레오닌 잔기를 비-트레오닌 잔기로 교체)을 포함한다. 그러한 AAV 캡시드는 신경세포 및 성상세포종을 표적화한다.

[0348] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는, 야생형 AAV1 캡시드 단백질의 Y705F, Y731F, 및 T492V 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 1); 야생형 AAV5 캡시드 단백질의 Y436F, Y693F, 및 Y719F 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 2); 또는 야생형 AAV6 캡시드 단백질의 Y705F, Y731F, 및 T492V 중 하나 이상 또는 이들 각각(예컨대, US 특허 출원 제16/565,191호의 서열 번호: 3)에 대응하는 위치에서, 캡시드 단백질의 VP3 영역 내의 Y에서 F로의(티로신에서 페닐알라닌으로의) 변형 또는 T에서 V로의(트레오닌에서 발린으로의) 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질(예컨대, AAV1, AAV5, 또는 AAV6 캡시드 단백질)이다. 그러한 AAV 캡시드는 신경세포 및 성상세포종을 표적화한다.

[0349] 일 실시형태에서, 아미노산 변형은 변형된 캡시드가 예를 들어 동일한 혈청형의 바이러스 벡터에 대해 생성되는 중화 항체를 회피할 수 있도록 한다. 일 실시형태에서, 아미노산 변형은 변형된 캡시드가 반복 투여에 사용될 수 있도록 허용하며, 예를 들어, 변형은 캡시드가 재-투여 시 치료 효과를 가질 수 있도록 할 것이다.

[0350] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 키메라 캡시드이다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "키메라" 캡시드 단백질은, 야생형에 비해 캡시드 단백질의 아미노산 서열 내의 하나 이상의(예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등) 아미노산 잔기 내의 치환, 뿐만 아니라 야생형에 비해 아미노산 서열 내의 하나 이상의(예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등) 아미노산 잔기의 삽입 및/또는 결실에 의해 변형된 AAV 캡시드 단백질(예컨대, VP1, VP2 또는 VP3 중 임의의 하나 이상)을 의미한다. 일부 실시형태에서, 하나의 AAV 혈청형으로부터의 완전하거나 부분적인 도메인, 기능적 영역, 에피토프 등은 상이한 AAV 혈청형의 대응하는 야생형 도메인, 기능적 영역, 에피토프 등을 임의의 조합으로 대체하여, 키메라 캡시드 단백질을 생성할 수 있다. 키메라 캡시드 단백질의 생성은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있는 프로토콜에 따라 수행될 수 있

고, 상당수의 키메라 캡시드 단백질이 본원 뿐만 아니라 문헌에 설명되어 있으며 이는 캡시드에 포함될 수 있다.

[0351] 일 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 반수체 캡시드이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "반수체 AAV"는 국제 출원 WO2018/170310, 또는 US 출원 US2018/037149에 설명된 바와 같은 AAV를 의미하며, 이들은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 일부 실시형태에서, 비리온의 집단은 반수체 AAV 집단이고, 여기서 비리온 입자는 컨스트럭트화될 수 있고, 여기서 AAV 캡시드 단백질, VP1, VP2 및 VP3으로 이루어지는 군으로부터의 적어도 하나의 바이러스 단백질은, AAV 게놈을 캡슐화할 수 있는 비리온 입자를 형성하는 데 필요한 다른 바이러스 단백질 중 적어도 하나와는 상이하다. 존재하는 각각의 바이러스 단백질(VP1, VP2, 및/또는 VP3)에 대해, 해당 당백질은 동일한 유형(예컨대, 전부 AAV2 VP1)이다. 일 경우에서, 바이러스 단백질 중 적어도 하나는 키메라 바이러스 단백질이고, 다른 2개의 바이러스 단백질 중 적어도 하나는 키메라가 아니다. 일 실시형태에서 VP1 및 VP2는 키메라이고 VP3만 비-키메라이다. 예를 들어, 키메라 AAV2/8로부터의 VP1/VP2(AAV2의 N-말단 및 AAV8의 C-말단)로 구성된 바이러스 입자만이 AAV2로부터의 VP3와만 쌍을 이루거나; 또는 키메라 VP1/VP2 28m-2P3(VP3 시작 코돈의 돌연변이를 갖지 않는 AAV8로부터의 N-말단 및 AAV2로부터의 C-말단)만이 AAV2로부터의 VP3과만 쌍을 이루었다. 다른 실시형태에서 VP3만 키메라이고 VP1 및 VP2는 비-키메라이다. 다른 실시형태에서 바이러스 단백질 중 적어도 하나는 완전히 상이한 혈청형에서 유래된다. 예를 들어, 키메라 VP1/VP2 28m-2P3만이 AAV3만으로부터의 VP3와 쌍을 이룬다. 다른 예에서, 키메라 단백질은 존재하지 않는다.

[0352] 본원에서 설명된 기술의 일부 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드는 하나 이상의 변형, 예컨대, 화학적 변형, 비-화학적 변형, 또는 캡시드에 대한 아미노산 변형을 포함한다. 그러한 변형은 다른 것들 중에서도, 예를 들어, 변형된 캡시드의 조직-유형 친화성 또는 세포-유형 친화성을 개질한다.

[0353] 변형은 수용체 결합과 같은 생화학적 특성을 포함하여 캡시드의 특성을 직접적으로 변경하여, 변형 자체가 캡시드의 동작을 변경하거나, 리간드의 부착과 같은 추가 변형을 허용하여 이는 다시 원하는 방식으로 캡시드의 동작을 변형할 수 있다.

[0354] 일 실시형태에서, 자연적으로 존재하거나 또는 캡시드 폴리펩타이드 코딩 서열의 유전적 변형에 의해 도입될 수 있는 시스테인 잔기의 화학적 변형은, 이황화물 결합 형성을 통해 리간드의 공유적 부착을 허용한다(예컨대, WO 2005/106046을 참조하며, 이의 내용은 본원에 참조로 통합된다).

[0355] 다양한 리간드가 고려되며, 예를 들어, 표적 세포에 의해 발현되는 세포-표면 단백질을 표적화하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다(예컨대, WO 2000/002654를 참조하며, 이는 본원에 참조로 통합됨).

[0356] 그 내용이 또한 본원에 참조로 통합되는 WO2015/062516은, 캡시드 유전자의 유전적 변형에 의해 아지도기를 포함하는 아미노산을 삽입한 후 아지도기를 통해 리간드를 화학적으로 결합하는 것을 설명한다.

[0357] 당화 또는 당 모이어티의 화학적 접합에 의한 AAV 캡시드 친화성의 변형은 문헌 [Horowitz et al., Bioconjugate Chem. 22: 529-532 (2011)]에 의해 설명되어 있다. 그러한 접근법, 및 유사한 접근법이 본원에서 설명된 바와 같은 캡시드의 변형을 위해 고려된다.

[0358] 다른 실시형태에서, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리-(N-하이드록시프로필)메타크릴아미드(pHPMA)와 같은 폴리머로 바이러스 캡시드를 코팅하는 것이 구체적으로 고려된다. 그러한 변형은, 예를 들어, 비-표적 조직과의 특이적 및 비특이적 상호 작용을 감소시킬 수 있다.

[0359] 다른 실시형태에서, 카르보디이미드 결합이 구체적으로 고려된다. 예컨대, 문헌(Joo et al. ACS Nano 5, titled "Enhanced Real-time Monitoring of Adeno-Associated Virus Trafficking by Virus-Quantum Dot Conjugates" (2011))을 참조한다.

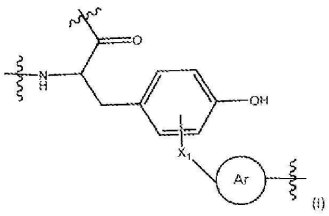
[0360] 다른 실시형태에서, 바이러스 캡시드는 예컨대, WO 2017/212019에서 설명된 바와 같이 변형될 수 있고, 또한 U.S. 국제 단계 USSN 16/308,740을 참조하며, 이들 내용은 각각 본원에 참조로 통합된다. 본원에서 설명되는 접근법은 -CSNH- 및 방향족 모이어티를 포함하는 결합을 통해 바이러스 캡시드를 리간드에 결합시킨다. 유전적으로 변형된 바이러스 캡시드는 이러한 접근법에 의해 추가로 변형될 수 있는 반면, 본원에서 설명되는 변형은 바이러스 캡시드의 유전적 변형을 요구하지 않는다. 설명된 리간드는 예를 들어, 표적화제, 중화 항체 상호작용을 회피하기 위한 입체 차폐제, 라벨링제 또는 자성제를 포함한다. 본원에서 설명되는 타겟화 리간드는 예를 들어, 세포-유형 특이적 리간드, 단백질, 단당류 또는 다당류, 스테로이드 호르몬, RGD 모티프 펩타이드(예컨대, Arg-Gly-Asp, 세포 접착 단백질을 모방하고 인테그린에 결합할 수 있는 세포 접착 모티프),

비타민, 및 소분자를 포함한다.

[0361] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 화학적 변형은 국제 특허 출원 WO/2017/212019에서 설명된 변형이고, 이것의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0362] 일 실시형태에서, 본원에서 설명된 화학적 변형은 국제 특허 출원 WO/2021/005210에서 설명된 변형이고, 이것의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

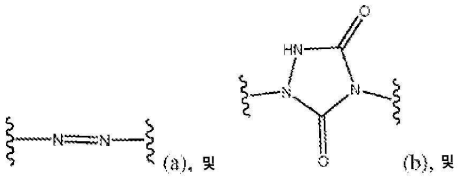
[0363] 일 실시형태에서, 캡시드는 그 캡시드 내에 적어도 하나의 화학적으로-변형된 티로신 잔기를 갖고, 여기서 상기 화학적으로-변형된 티로신 잔기는 화학식(I)을 갖는다:

[0364] 

(I)

[0365] 여기서:

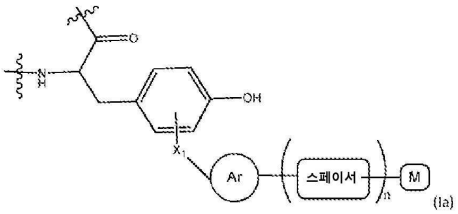
[0366] -X1은 다음으로 이루어지는 군에서 선택되고:

[0367] 

(a), 및 (b), 및

[0368] -Ar은 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티이다.

[0369] 일 실시형태에서, 캡시드는 적어도 하나의 화학적으로-변형된 티로신 잔기를 갖고, 화학식(Ia)을 갖는다:

[0370] 

(Ia)

[0371] 여기서:

[0372] -Xi, 및 Ar은 위에서 정의된 바와 같고,

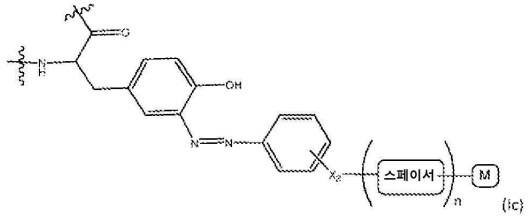
[0373] - 스페이서는 "Ar" 그룹을 기능성 모이어티 "M"에 연결하기 위한 그룹으로, 바람직하게는 최대 1000개의 탄소 원자를 포함하며, 이는 바람직하게는 선택적으로 헤테로 원자 및/또는 사이클릭 모이어티를 포함하는 화학적 쇄의 형태이다.

[0374] -n은 0 또는 1이고;

[0375] -M은 입체제, 라벨링제, 세포-유형 특이적 리간드 또는 약물 모이어티를 포함하는 기능적 모이어티이다.

[0376] 일 실시형태에서, Xi는 화학식 (a)이거나 및/또는 "Ar"은 치환되거나 또는 비치환된 페닐, 피리딜, 나프틸, 및 안트라세닐에서 선택된다.

[0377] 일 실시형태에서, 캡시드는 적어도 하나의 화학적으로-변형된 티로신을 갖고, 화학식(Ic)을 갖는다:

[0378] 

(Ic)

[0379] 여기서:

[0380] -X2는 -C(=O)-NH, -C(=O)-O, -C(=O)-O-C(=O)-, O-(C=O)-, NH-C(=O)-, NH-C(=O)-NH, -O-C=O-O-, O, NH, -NH(C=S)-, 또는 -(C=S)-NH-이고, 바람직하게는 -(C=O)-NH- 또는 -(C=O)-O-이고,

[0381] -X2는 파라, 메타 또는 오르토 위치에 있고, 바람직하게는 페닐기의 파라 위치에 있고,

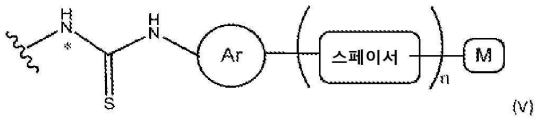
[0382] -스페이서, n 및 M은 위에서 정의된 바와 같다.

[0383] 일 실시형태에서, "스페이서"는 존재하는 경우, 포화 또는 불포화된, 선형 또는 분지형 C2-C40 탄화수소쇄, 임의로 치환된, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, pHPMA(N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드의 폴리머), 폴리 젖산-코-글리콜산(PLGA), 알킬 디아민의 폴리머 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되거나, 및/또는

[0384] "M"은 세포-유형 타겟화 리간드를 포함하거나 이것으로 이루어지며, 이는 바람직하게는 단당류 또는 다당류, 스테로이드 호르몬을 포함하는 호르몬, 펩타이드, 이를테면 RGD 펩타이드(예컨대, 세포 접착 단백질을 모방하고 인테그린에 결합할 수 있는 세포 접착 모티프인 Arg-Gly-Asp), 근육 표적화 펩타이드(MTP) 또는 안지오펩-2, 단백질 또는 그의 단편, 막 수용체 또는 그의 단편, 앱타머, 중쇄 항체를 포함하는 항체, 및 그의 단편, 이를테면 항원-결합 단편(Fab), Fab'(이는 유리 설프히드릴기를 더 포함하는 항원-결합 단편임), 및 VHH, 단일쇄 가변 단편(ScFv), 스피에겔머(spiegelmer), 펩타이드 앱타머, 비타민 및 약물, 이를테면 칸나비노이드(Cannabinoid) 수용체 1(CB1) 및/또는 칸나비노이드 수용체 2(CB2) 리간드에서 선택된다.

[0385] 일 실시형태에서, "스페이서"(존재하는 경우)는 선형 또는 분지형 C2-C20 알킬쇄, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, pHPMA, PLGA, 알킬 디아민의 폴리머 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되고, 상기 폴리머는 2개 내지 20개의 단량체를 갖거나, 및/또는 "M"은, 트랜스페린, 상피 성장 인자(EGF), 및 기본 섬유아세포 성장 인자 13FGF에서 선택되는 단백질, 하나 또는 몇몇 갈락토스, 만노스, N-아세틸갈락토사민 잔기, 가교 GalNac, 또는 만노스-6-포스페이트를 포함하는 단당류 또는 다당류, 서열 번호: 1 내지 서열 번호: 7에서 선택되는 MTP, 및 엽산과 같은 비타민에서 유래되는 세포-유형 특이적 리간드를 포함하거나, 또는 이것으로 이루어진다.

[0386] 일 실시형태에서, 캡시드는 캡시드 내에 적어도 하나의 추가적인 화학적으로 변형된 아미노산 잔기를 갖고, 이는 티로신 잔기와는 상이하며, 상기 아미노산 잔기는 바람직하게는 다음 화학식(V)의 기로 화학적으로 변형된 아미노기를 포함한다:

[0387] 

(V)

[0388] 여기서:

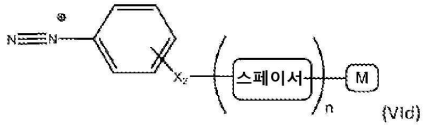
[0389] - N*은 아미노산 잔기, 예컨대, 리신 잔기 또는 아르기닌 잔기의 아미노기의 질소이고,

[0390] - Ar, 스페이서, n 및 M은 청구항 2의 화학식 (II)의 Ar, 스페이서, n 및 M과 동일한 정의를 가진다.

[0391] 일 실시형태에서, 캡시드는 아릴 디아조늄, 및 4-페닐-1,2,4-트리아졸-3,5-디온(PTAD) 모이어티에서 선택되는 반응기를 갖는 화학 시약과, 캡시드에 존재하는 티로신 잔기와 상기 반응성 기를 반응시켜 공유 결합을 형성하기에 적합한 조건에서 배양된다.

[0392] 일 실시형태에서, 캡시드는 화학식 VId의 화학적 시약으로 배양되어 화학식 Ic의 캡시드에서 적어도 하나의 화

학적으로-변형된 티로신 잔기를 획득한다.

[0393] 

[0394] *약제학적 조성물*

[0395] 본 발명의 발현 카세트, 벡터 또는 비리온은 약제학적으로 허용 가능한 부형제 즉, 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체 물질 및/또는 첨가제, 예컨대, 완충액, 담체, 부형제, 안정제 등을 사용하여 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적 조성물은 키트 형태로 제공될 수 있다.

[0396] 따라서, 본 발명의 추가 국면은 본원에서 설명된 바와 같은 발현 카세트, 벡터 또는 비리온을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0397] 다양한 국면에서, 약제학적 조성물은 포스페이트 완충액을 포함한다. 포스페이트 완충액은 약 1mM 내지 약 50mM 포스페이트, 이를테면 약 1mM, 약 2mM, 약 3mM, 약 4mM, 약 5mM, 약 6mM, 약 7mM, 약 8mM, 약 9mM, 약 10mM, 약 15mM, 약 20mM, 약 25mM, 약 30mM, 약 35mM, 약 40mM, 약 45mM, 또는 약 50mM의 농도로 포스페이트를 포함한다. 포스페이트는 약 1:10 내지 약 10:1의 이염기성 포스페이트:일염기성 포스페이트 몰비로, 이염기성 포스페이트(예컨대, Na_2HPO_4, K_2HPO_4) 및 일염기성 포스페이트(예컨대, NaH_2PO_4, KH_2PO_4)의 조합으로부터 제조된다. 예를 들어, 다양한 예시적인 실시형태에서, 10mM 포스페이트는 9.5mM 이염기성 포스페이트 및 0.5mM 일염기성 포스페이트, 9mM 이염기성 포스페이트 및 1mM 일염기성 포스페이트, 8.5mM 이염기성 포스페이트 및 1.5mM 일염기성 포스페이트, 8mM 이염기성 포스페이트 및 2mM 일염기성 포스페이트, 7.5mM 이염기성 포스페이트 및 2.5mM 일염기성 포스페이트, 또는 7mM 이염기성 포스페이트 및 3mM 일염기성 포스페이트를 포함한다. 포스페이트 완충액의 pH는 약 6.5 내지 약 7.5, 이를테면 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 또는 7.5의 pH이다. 일 실시형태에서, 포스페이트 완충액의 pH는 7.2-7.3이다. 일 실시형태에서, 포스페이트 완충액의 pH는 7.22이다. 포스페이트 완충액은 또한 약 50mM 내지 약 200mM의 농도로, 이를테면 약 50mM, 약 60mM, 약 70mM, 약 80mM, 약 90mM, 약 100mM, 약 110mM, 약 120mM, 약 130mM, 약 135mM, 약 136mM, 약 137mM, 약 138mM, 약 139mM, 약 140mM, 약 150mM, 약 160mM, 약 170mM, 약 180mM, 약 190mM, 또는 약 200mM의 농도로 NaCl을 포함할 수 있다. 포스페이트 완충액은 또한 약 0.5mM 내지 약 10mM의 농도로, 이를테면 약 0.5mM, 약 0.6mM, 약 0.7mM, 약 0.8mM, 약 0.9mM, 약 1mM, 약 2mM, 약 2.5mM, 약 2.6mM, 약 2.7mM, 약 2.8mM, 약 2.9mM, 약 3mM, 약 4mM, 약 5mM, 약 6mM, 약 7mM, 약 8mM, 약 9mM, 또는 약 10mM의 농도로 KCl을 포함할 수 있다. 포스페이트 완충액은 또한 약 0.20mM 내지 약 10mM의 농도로, 이를테면 약 0.2mM, 약 0.3mM, 약 0.4mM, 약 0.5mM, 약 0.6mM, 약 0.7mM, 약 0.8mM, 약 0.81mM, 약 0.82mM, 약 0.83mM, 약 0.84mM, 약 0.85mM, 약 0.86mM, 약 0.87mM, 약 0.88mM, 약 0.89mM, 약 0.9mM, 약 1mM, 약 2mM, 약 3mM, 약 4mM, 약 5mM, 약 6mM, 약 7mM, 약 8mM, 약 9mM, 또는 약 10mM의 농도로 $CaCl_2$를 포함할 수 있다. 포스페이트 완충액은 또한 약 0.10mM 내지 약 1mM의 농도로, 이를테면 0.1mM, 약 0.2mM, 약 0.3mM, 약 0.4mM, 0.41mM, 0.42mM, 0.43mM, 0.44mM, 0.45mM, 0.46mM, 0.47mM, 0.48mM, 0.49mM, 약 0.5mM, 약 0.6mM, 약 0.7mM, 약 0.8mM, 약 0.9mM, 또는 약 1mM의 농도로 $MgCl_2$를 포함할 수 있다. 포스페이트 완충액은 또한 약 0.0001 wt.% 내지 약 0.005 wt.%의 농도로, 이를테면 약 0.0001 wt.%, 약 0.0002 wt.%, 약 0.0003 wt.%, 약 0.0004 wt.%, 약 0.0005 wt.%, 약 0.0006 wt.%, 약 0.0007 wt.%, 약 0.0008 wt.%, 약 0.0009 wt.%, 약 0.001 wt.%, 약 0.0015 wt.%, 약 0.002 wt.%, 약 0.0025 wt.%, 약 0.003 wt.%, 약 0.0035 wt.%, 약 0.004 wt.%, 약 0.0045 wt.%, 또는 약 0.005 wt.%의 농도로 폴록사머 188(예컨대, 플루로닉™ F-68 비-이온성 계면활성제)을 포함할 수 있다. 포스페이트 완충액은 또한 약 0.005 wt.% 내지 약 10 wt.%의 농도로, 이를테면 약 0.005 wt.%, 약 0.075 wt.%, 약 0.01 wt.%, 약 0.02 wt.%, 약 0.03 wt.%, 약 0.04 wt.%, 약 0.05 wt.%, 약 0.06 wt.%, 약 0.07 wt.%, 약 0.08 wt.%, 약 0.09 wt.%, 약 0.1 wt.%, 약 0.2 wt.%, 약 0.3 wt.%, 약 0.4 wt.%, 약 0.5 wt.%, 약 0.6 wt.%, 약 0.7 wt.%, 약 0.8 wt.%, 약 0.9 wt.%, 약 1 wt.%, 약 2 wt.%, 약 3 wt.%, 약 4 wt.%, 약 5 wt.%, 약 6 wt.%, 약 7 wt.%, 약 8 wt.%, 약 9 wt.%, 또는 약 10 wt.%의 농도로 소르비톨을 포함할 수 있다. 핵산(예를 들어, CMV 프로모터를 포함하는 AAV2 및 서열 번호: 1에 대해 적어도 80% 동일한, 예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 핵산; AAV2-GDNF)을 포함하는 rAAV는 포스페이트 완충액에서, 약 $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$

vg/mL 내지 약 $2x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $9x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $5x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $6x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $7x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $8x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $7x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $6x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $5x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $3x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $2x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $1x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{11}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $7x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $6x10^{12}$ vg/mL; $4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $5x10^{12}$ vg/mL; $3.1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.5x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.6x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.7x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.8x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.9x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.9x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.8x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.7x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.6x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.5x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.4x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.3x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.2x10^{12}$ vg/mL; 및 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.1x10^{12}$ vg/mL의 역가를 가질 수 있다.

[0398] 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 표 9에서 설명된 조성물을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0399]

표 9

성분	농도
염화나트륨	180mM
인산나트륨 일염기성 일수화물	2mM
인산나트륨 이염기성 이수화물	8mM
폴록사머 P188	0.001 %
주사용 물 q.s.	NA
pH	7.22

[0400] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 포스페이트(일염기성 및 이염기성 포스페이트), NaCl, 및 폴록사머; pH 7.2-7.3을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0401] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 10mM 포스페이트(일염기성 및 이염기성 포스페이트), 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0402] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM 이염기성 포스페이트, 약 2mM 일염기성 포스페이트, 약 180mM NaCl, 및 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0403] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM Na_2HPO_4, 약 2mM NaH_2PO_4, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0404] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM 이염기성 포스페이트, 약 2mM 일염기성 포스페이트, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 약 $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.1x10^{13}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0405] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM 이염기성 포스페이트, 약 2mM 일염기성 포스페이트, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $1x10^{12}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0406] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM 이염기성 포스페이트, 약 2mM 일염기성 포스페이트, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $5x10^{12}$ vg/mL vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로

본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0407] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM 이염기성 포스페이트, 약 2mM 일염기성 포스페이트, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $1x10^{13}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0408] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM 이염기성 포스페이트, 약 2mM 일염기성 포스페이트, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $3x10^{13}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0409] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM K_2HPO_4, 약 2mM KH_2PO_4, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 약 $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.1x10^{13}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0410] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM K_2HPO_4, 약 2mM KH_2PO_4, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $1x10^{12}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0411] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM K_2HPO_4, 약 2mM KH_2PO_4, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $5x10^{12}$ vg/mL vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0412] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM K_2HPO_4, 약 2mM KH_2PO_4, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $1x10^{13}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0413] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 8mM K_2HPO_4, 약 2mM KH_2PO_4, 약 180mM NaCl, 및 약 0.001% 폴록사머; pH 7.2-7.3; 및 적어도 $3x10^{13}$ vg/mL AAV2-GDNF를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진다.

[0414] *투여*

[0415] 본 개시내용의 rAAV는 해당 기술 분야에 알려져 있는 임의의 적절한 방법에 따른 조성물로 대상체에 전달될 수 있다. 예를 들어, 바람직하게는 생리학적으로 호환 가능한 담체(즉, 조성물)에 현탁된 rAAV는 대상체, 즉, 숙주 동물, 이를테면 인간, 마우스, 래트, 고양이, 개, 양, 토끼, 말, 소, 염소, 돼지, 기니피그, 햄스터, 닭, 칠면조, 또는 비인간 영장류(예컨대, 마카크)에게 투여될 수 있다. 임의의 실시형태에서 숙주 동물은 인간을 포함하지 않는다.

[0416] 본원에서 설명되는 rAAV를 대상체의 CNS에 직접 전달하는 것이 바람직할 수 있다. "CNS"란 척추 동물의 뇌 및 척수의 모든 세포 및 조직을 의미한다. 따라서, 용어는 신경 세포, 신경교세포, 성상세포, 뇌척수액(CSF), 간질 공간, 뼈 연골 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 재조합 AAV는 예컨대, 심실 영역 뿐만 아니라 선조체(예컨대, 선조체의 꼬리핵 또는 피각), 척수 및 신경근 접합부, 또는 소뇌 소엽에, 바늘, 카테터 또는 관련 디바이스를 사용하여 정위고정성 주입과 같은 해당 기술 분야에 알려져 있는 신경외과적 기법을 사용하여, 주입에 의해 CNS 또는 뇌에 직접 전달될 수 있다(예컨대, 문헌 [Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999]; 문헌 [Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000]; 문헌 [Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993]; 및 문헌 [Alisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11 :2315-2329, 2000]을 참조한다). 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 설명된 바와 같은 rAAV는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 대뇌내 주입에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 척추강내 주입에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 선조체내 주입에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 두개내 주입에 의해 전달된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 대조(cisterna magna) 주입에 의해 전달된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 대뇌 측뇌실 주입에 의해 전달된다.

[0417] 일 실시형태에서, rAAV 또는 그 조성물은, 예컨대, US 특허 제7,815,623호; 제8,337,458호; 및 제9,302,070호

에서 설명된 바와 같이, 계단식 캐뉼라를 통해 CNS에 국소적으로, 예컨대, 피각에 직접 전달되며, 그 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0418] 일 실시형태에서, rAAV 또는 이의 조성물은 MRI-호환 주입 펌프(예컨대, 메드퓨전 시린지 펌프(Medfusion syringe pump), Smiths Medical Inc.)에 연결된 스마트플로우 캐뉼라를 통해 국소적으로, 예컨대, 피각으로 직접 CNS에 전달된다.

[0419] 일 실시형태에서, 본원에서 설명되는 조성물은, 예컨대, 캐뉼라를 통해 1-30 μL/min의 유량으로 피각에 국소적으로 투여된다. 일 실시형태에서, 유량은 약 1-25 μL/min; 1-20 μL/min; 1-15 μL/min; 1-10 μL/min; 1-5 μL/min; 5-30 μL/min; 10-30 μL/min; 15-30 μL/min; 20-30 μL/min; 25-30 μL/min; 5-25 μL/min; 10-20 μL/min; 15-25 μL/min; 5-15 μL/min; 5-25 μL/min; 또는 10-15 μL/min이다.

[0420] 일 실시형태에서, 유량은 약1 μL/min; 2 μL/min; 3 μL/min; 4 μL/min; 5 μL/min; 6 μL/min; 7 μL/min; 8 μL/min; 9 μL/min; 10 μL/min; 11 μL/min; 12 μL/min; 13 μL/min; 14 μL/min; 15 μL/min; 16 μL/min; 17 μL/min; 18 μL/min; 19 μL/min; 20 μL/min; 21 μL/min; 22 μL/min; 23 μL/min; 24 μL/min; 25 μL/min; 26 μL/min; 27 μL/min; 28 μL/min; 29 μL/min; 또는 30 μL/min이다.

[0421] 또한, 일부 경우에서, 포유류 대상체에 rAAV를 전달하는 것은 예를 들어, 근육내 주입 또는 포유류 대상체의 혈류로의 투여에 의해 이루어지는 것이 바람직할 수 있다. 정맥, 동맥 또는 임의의 다른 혈관으로의 주입에 의해 혈류에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV는 외과 기술에서 잘 알려져 있는 기법인 분리된 사지 관류를 통해 혈류로 투여되며, 이 방법은 본질적으로 전문가가 rAAV 비리온을 투여하기 전에 사지를 전신 순환으로부터 분리할 수 있게 한다. U.S. 특허 제6,177,403호에서 설명된 분리된 사지 관류 기법의 변형은 또한 숙련된 전문가에 의해 채용되어 비리온을 분리된 사지의 혈관에 투여하여 근육 세포 또는 조직으로의 형질도입을 잠재적으로 향상시킬 수 있다.

[0422] 일 실시형태에서, rAAV 또는 그 조성물은 대상체의 "오프(off)" 기간 동안 투여된다.

[0423] 일 실시형태에서, rAAV 또는 그 조성물은 대상체의 "온(on)" 기간 동안 투여된다.

[0424] 본 개시내용의 국면은 본원에서 설명되는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자를 포함하는 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 중 임의의 것 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 조성물에 관한 것이다. 일 국면에서, 조성물은 본원에서 설명되는 바이러스 벡터 중 임의의 것, 및 선택적으로, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 본 개시내용의 조성물은 rAAV를 단독으로 포함하거나, 또는 하나 이상의 다른 바이러스(예컨대, 하나 이상의 상이한 이식유전자를 암호화하는 제2 rAAV)와 조합하여 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 상이한 rAAV를 포함하며, 이들 각각은 하나 이상의 상이한 이식유전자를 갖는다.

[0425] 본 개시내용의 조성물은 제2 치료제, 예컨대, 본원에서 설명되는 항-파킨슨 치료제를 더 포함할 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 본원에서 설명되는 임의의 면역 조절제를 더 포함할 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 제2 치료제, 예컨대, 본원에서 설명되는 항-파킨슨 치료제 및 본원에서 설명되는 임의의 면역 조절제를 더 포함할 수 있다.

[0426] rAAV가 지향된 지표를 고려하여 적합한 담체가 통상의 기술자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나의 적합한 담체는 식염수를 포함하고, 이는 다양한 완충 용액으로 제형화될 수 있다(예컨대, 포스페이트 완충 식염수). 다른 예시적인 담체는 멸균 식염수, 락토스, 수크로스, 칼슘 포스페이트, 젤라틴, 덱스트란, 한천, 펙틴, 땅콩유, 참깨유, 및 물을 포함한다. 담체의 선택은 본 개시내용의 제한이 아니다.

[0427] 선택적으로, 본 개시내용의 조성물은 rAAV 및 담체(들) 외에도, 다른 종래의 약제학적 성분, 이를테면 보존제, 또는 화학적 안정제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 갈산프로필, 파라벤, 에틸바닐린, 글리세린, 페놀, 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0428] rAAV는 원하는 조직의 세포를 형질감염시키고 과도한 부작용 없이 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하기에 충분한 양으로 투여된다. 통상적이고 약제학적으로 허용 가능한 투여 경로는, 선택된 기관으로의 직접 전달(예컨대, 피각으로의 전달), 경구, 흡입(비강내 및 기관내 전달을 포함함), 안구내, 정맥내, 근육내, 피하, 진피내, 종양내 및 다른 모체 투여 경로를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 투여 경로는 원하는 경우 조합

될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 핵산 서열 전부 또는 적어도 하나는 적어도 하나의 DD-ITR을 포함하는 비바이러스 DNA 컨스트럭트를 통해 전달된다. 예를 들어, WO 2019/246554에서 설명된 바와 같은 비바이러스 DNA 컨스트럭트가 활용되어 본원에서 설명되는 핵산 중 하나 이상을 전달할 수 있다. WO 2019/246554의 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0429] 특정 "치료 효과"를 달성하는 데 필요한 rAAV 비리온의 용량, 예컨대, 체중 킬로그램 당 게놈 카피(GC/kg)의 용량 단위는, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 몇몇 인자에 따라 달라질 수 있다: rAAV 비리온 투여의 경로, 치료 효과를 달성하는 데 필요한 유전자 또는 RNA 발현 수준, 치료 중인 특정 질환 또는 장애, 및 유전자 또는 RNA 생성물의 안정성. 통상의 기술자는 위에서 언급된 인자, 뿐만 아니라 해당 기술 분야에 잘 알려져 있는 다른 인자에 기초하여 rAAV 비리온 용량 범위를 쉽게 결정하여 특정 질환 또는 장애를 갖고 있는 환자를 치료할 수 있다.

[0430] 일 실시형태에서, rAAV는 $5x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg의 범위 내의 총 용량으로 투여된다. 다른 실시형태에서 rAAV는, $1x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $2x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $3x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $4x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $6x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $7x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $8x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $9x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $1x10^{13}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $2x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $3x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $4x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $6x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $7x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $8x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $9x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $1x10^{13}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $2x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $3x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $4x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $6x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $7x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $8x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $9x10^{12}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $1x10^{13}$ vg 내지 약 $6.5x10^{13}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $1x10^{13}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $9x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $8x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $7x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $6x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $5x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $4x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $3x10^{12}$ vg; $1x10^{12}$ vg 내지 약 $2x10^{12}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $1x10^{13}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $9x10^{12}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $8x10^{12}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $7x10^{12}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $6x10^{12}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $5.5x10^{13}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $4.5x10^{13}$ vg; $5x10^{12}$ vg 내지 약 $3.5x10^{13}$ vg; 및 $5x10^{12}$ vg 내지 약 $2.5x10^{13}$ vg의 범위 내의 총 용량으로 투여된다.

[0431] 일 실시형태에서, rAAV는 총 적어도 $5.1x10^{12}$ vg; $5.2x10^{12}$ vg; $5.3x10^{12}$ vg; $5.4x10^{12}$ vg; $5.5x10^{12}$ vg; $5.6x10^{12}$ vg; $5.7x10^{12}$ vg; $5.8x10^{12}$ vg; $5.9x10^{12}$ vg; $6x10^{12}$ vg; $6.1x10^{12}$ vg; $6.2x10^{12}$ vg; $6.3x10^{12}$ vg; $6.4x10^{12}$ vg; $6.5x10^{12}$ vg; $6.6x10^{12}$ vg; $6.7x10^{12}$ vg; $6.8x10^{12}$ vg; $6.9x10^{12}$ vg; $7x10^{12}$ vg; $7.1x10^{12}$ vg; $7.2x10^{12}$ vg; $7.3x10^{12}$ vg; $7.4x10^{12}$ vg; $7.5x10^{12}$ vg; $7.6x10^{12}$ vg; $7.7x10^{12}$ vg; $7.8x10^{12}$ vg; $7.9x10^{12}$ vg; $8x10^{12}$ vg; $8.1x10^{12}$ vg; $8.2x10^{12}$ vg; $8.3x10^{12}$ vg; $8.4x10^{12}$ vg; $8.5x10^{12}$ vg; $8.6x10^{12}$ vg; $8.7x10^{12}$ vg; $8.8x10^{12}$ vg; $8.9x10^{12}$ vg; $9x10^{12}$ vg; $9.1x10^{12}$ vg; $9.2x10^{12}$ vg; $9.3x10^{12}$ vg; $9.4x10^{12}$ vg; $9.5x10^{12}$ vg; $9.6x10^{12}$ vg; $9.7x10^{12}$ vg; $9.8x10^{12}$ vg; $9.9x10^{12}$ vg; $1.1x10^{13}$ vg; $1.2x10^{13}$ vg; $1.3x10^{13}$ vg; 및 $1.4x10^{13}$ vg으로 투여된다. 일 실시형태에서, rAAV는 총 적어도 $1x10^{12}$ vg; 적어도 $2x10^{12}$ vg; 적어도 $3x10^{12}$ vg; 적어도 $4x10^{12}$ vg; 적어도 $5x10^{12}$ vg; 적어도 $6x10^{12}$ vg; 적어도 $7x10^{12}$ vg; 적어도 $8x10^{12}$ vg; 적어도 $9x10^{12}$ vg; 적어도 $1x10^{13}$ vg; 적어도 $2x10^{13}$ vg; 적어도 $3x10^{13}$ vg; 적어도 $4x10^{13}$ vg; 적어도 $5x10^{13}$ vg; 적어도 $6x10^{13}$ vg; 및 적어도 $7x10^{13}$ vg 또는 그 이상으로 투여된다.

[0432] 일 실시형태에서, 투여 또는 유도가 대상체의 피각에 국소적으로 수행되는 경우, 총 용량의 절반은 대상체의 피각 각각에 투여된다. 다시 말해서, 총 용량은 대상체의 좌측 피각 및 우측 피각 사이에 실질적으로 균일하게 분할된다.

[0433] rAAV의 유효량은 동물에서 감염을 표적화하거나, 또는 원하는 조직을 표적화하기에 충분한 용량이다. 일부 실

시형태에서, rAAV의 유효량은 안정한 체세포 형질전환 동물 모델을 생성하기에 충분한 용량이다. 유효량은 주로 대상체의 종, 연령, 체중, 건강, 및 표적화되는 조직과 같은 인자에 따라 달라질 것이고, 따라서 동물 및 조직 사이에서 달라질 것이다. 예를 들어, rAAV의 유효량은 일반적으로 약 10^{9} 내지 10^{16} 게놈 카피를 함유하는 약 1ml 내지 약 100ml의 용액의 범위 내에 있다. 일부 경우에서, 약 10^{11} 내지 10^{13} rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 특정 실시형태에서, 10^{12} 또는 10^{13} rAAV 게놈 카피는 CNS 조직(즉, 피각)을 표적화하는 데 유효하다. 일부 경우에서, 안정한 형질전환 동물은 rAAV의 다회 투여에 의해 생성된다.

[0434] 일 실시형태에서, rAAV는 액체 조성물로 도입되거나 투여된다. 일 실시형태에서, 액체 조성물은 약 $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL의 rAAV 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 액체 조성물은, 약 $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $2x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $9x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $5x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $6x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $7x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $8x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $7x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $6x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $5x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $3x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $2x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $1x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{11}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $7x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $6x10^{12}$ vg/mL; $4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $5x10^{12}$ vg/mL; $3.1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.5x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.6x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.7x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.8x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.9x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.9x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.8x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.7x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.6x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.5x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.4x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.3x10^{12}$ vg/mL; $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.2x10^{12}$ vg/mL; 및 $3\ x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.1x10^{12}$ vg/mL의 rAAV 농도를 갖는다.

[0435] 일 실시형태에서, 액체 조성물은, 약 $8x10^{11}$ vg/mL; $9x10^{11}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL; $3.1x10^{12}$ vg/mL; $3.2x10^{12}$ vg/mL; $3.3x10^{12}$ vg/mL; $3.4x10^{12}$ vg/mL; $3.5x10^{12}$ vg/mL; $3.6x10^{12}$ vg/mL; $3.7x10^{12}$ vg/mL; $3.8x10^{12}$ vg/mL; $3.9x10^{12}$ vg/mL;$4x10^{12}$ vg/mL; $5x10^{12}$ vg/mL; $6x10^{12}$ vg/mL; $7x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{12}$ vg/mL; 및 $9x10^{12}$ vg/mL의 rAAV 농도를 갖는다.

[0436] 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 1회 이하로 대상체에게 투여되고, 예컨대, 1회 이하로 각각의 피각에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 역일 기준 1일(예컨대, 24시간 주기) 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 역일 기준 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 역일 기준 1주(예컨대, 역일 기준 7일) 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 격주 이하로(예컨대, 역일 기준 2주 주기로 1회) 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 역일 기준 1개월 당 1회(예컨대, 역일 기준 30일에 1회) 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 역일 기준 6개월 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV의 용량은 역일 기준 1년(예컨대, 365일 또는 윤년의 경우 366일) 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다.

[0437] 일 실시형태에서, rAAV 또는 그 조성물은 트랜스-전두엽(예컨대, "양측-전두엽") 궤적을 통한 주입으로서 투여된다. 트랜스-전두엽 궤적은 각각의 피각의 A-P 축에 실질적으로 수직이며 두개골의 전두골을 통해 접근하는 적어도 하나의 궤적이다. 트랜스-전두엽 투여는 각각의 피각의 A-P 축에 실질적으로 수직인 하나 초과의 궤적

을 통해 rAAV를 주입하는 것을 포함할 수 있다. 각각의 궤적은 두개골의 전두골을 통한 단일 천공 구멍을 통해, 또는 별개의 개별적인 천공 구멍을 통해 접근할 수 있다. 따라서, 전두골 내의 적어도 하나의 천공 구멍은 좌측 및 우측 피각 각각에 대해 필요하다. 예를 들어, 투여는 트랜스-전두엽 궤적, 이를테면 양측-전두엽 궤적을 사용하여 수행될 수 있고, 여기서 캐뉼라는 제1 피각의 A-P 축에 실질적으로 수직인 제1 궤적에서 전두골로부터 유도되고, rAAV는 제1 궤적을 사용하여 주입된다. 이어서 캐뉼라는 제1 피각의 A-P 축에 실질적으로 수직인 제2 궤적에 위치되고(제2 궤적은 제1 궤적과는 상이함) rAAV는 제2 궤적을 사용하여 주입된다. 이어서 과정은 제2 피각에서 반복된다. 각각의 궤적은 캐뉼라가 상이한 위치들에서 피각과 접촉하도록 한다는 것이 이해된다. 도 13a는 예시적인 트랜스-전두엽 궤적을 도시한다.

[0438] 일 실시형태에서, rAAV 또는 그의 조성물은 양측-후두부 궤적을 통한 주입으로서 투여된다. 후두부 궤적은 피각의 A-P 축에 실질적으로 평행이며 두개골의 후두골을 통해 접근하는 단일 후방 궤적이다. 따라서, 후두골 내의 단일 천공 구멍은 피각마다 필요하다. 예를 들어, 투여는 양측-후두부 궤적을 사용하여 수행될 수 있고, 여기서 캐뉼라는 제1 피각의 A-P 축에 실질적으로 평행인 궤적을 사용하여 후두골로부터 유도되고, rAAV는 캐뉼라가 제1 피각의 앞쪽 말단을 향해 진행하는 동안 주입된다. 이어서 과정은 제2 피각에서 반복된다. 변형에서는, rAAV는 캐뉼라가 고정되어 있고 각각의 피각의 앞쪽 말단으로 진행하고 있지 않는 동안 주입된다. 도 13b는 예시적인 후두부 궤적을 도시한다.

[0439] 일 실시형태에서, 각각의 피각은 동일한 궤적 기법을 사용하여 주입되고, 즉, 각각의 피각은 양측-전두엽 궤적을 통해 주입된다. 일 실시형태에서, 각각의 피각은 상이한 궤적 기법을 사용하여 주입되고, 즉, 하나의 피각은 양측-전두엽 궤적을 통해 주입되고 다른 피각은 양측-후두부 궤적을 통해 주입된다.

[0440] 일 실시형태에서, 단일 피각에의 주입 부피는 2000㎕ 이하, 및 1,800㎕ 초과이다. 예를 들어, 단일 피각에 총 1,800㎕; 1,810㎕; 1,820㎕; 1,830㎕; 1,840㎕; 1,850㎕; 1,860㎕; 1,870㎕; 1,880㎕; 1,890㎕; 1,900㎕; 1,910㎕; 1,920㎕; 1,930㎕; 1,940㎕; 1,950㎕; 1,960㎕; 1,970㎕; 1,980㎕; 1,990㎕; 또는 2,000㎕의 용량을 주입할 수 있다. 일 실시형태에서, 각각의 피각에 대한 주입 부피는 동일하다. 일 실시형태에서, 각각의 피각에 대한 주입 부피는 상이하다(예컨대, 하나의 피각은 1,800㎕ 부피로 주입되고 다른 피각은 2,000um 부피로 주입된다).

[0441] 일부 실시형태에서, rAAV 조성물은 특히 높은 rAAV 농도(예컨대, ~10^{13} GC/ml 또는 그 이상)가 존재하는 경우 조성물 내의 AAV 입자의 응집을 감소시키기 위해 제형화된다. rAAV의 응집을 감소시키기 위한 방법은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 계면활성제의 첨가, pH 조정, 염 농도 조정 등을 포함한다. (예컨대, 문헌 [Wright FR, et al., Molecular Therapy(2005) 12, 171-178]을 참조하며, 이의 내용은 본원에 참조로 통합된다.)

[0442] 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및 담체 용액의 제형은, 본원에서 설명되는 특정 조성물을 다양한 치료 요법에 사용하기 위한 적합한 투여 및 치료 요법의 개발과 마찬가지로, 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0443] 본원에서 설명되는 일 국면은, 약제학적으로 허용 가능한 담체 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg의 농도로 본원에서 설명되는 임의의 바이러스 벡터(예컨대, AAV)를 포함하는, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 제형제이다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 농도는 약 $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $2x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $9x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $5x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $6x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $7x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $8x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $7x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $6x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $5x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $3x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $2x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $1x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{11}$ vg/mL 내지 약 $9x10^{11}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $7x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $6x10^{12}$ vg/mL; $4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $5x10^{12}$ vg/mL; $3.1x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.2x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.4x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.5x10^{12}$ vg/mL

내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.6x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.7x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.8x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; $3.9x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.9x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.8x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.7x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.6x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.5x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.4x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.3x10^{12}$ vg/mL; 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.2x10^{12}$ vg/mL; 및 3 $x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $3.1x10^{12}$ vg/mL이다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 농도는 약 $8x10^{11}$ vg/mL; $9x10^{11}$ vg/mL; $1x10^{12}$ vg/mL; $2x10^{12}$ vg/mL; $3x10^{12}$ vg/mL; $3.1x10^{12}$ vg/mL; $3.2x10^{12}$ vg/mL; $3.3x10^{12}$ vg/mL; $3.4x10^{12}$ vg/mL; $3.5x10^{12}$ vg/mL; $3.6x10^{12}$ vg/mL; $3.7x10^{12}$ vg/mL; $3.8x10^{12}$ vg/mL; $3.9x10^{12}$ vg/mL;$4x10^{12}$ vg/mL; $5x10^{12}$ vg/mL; $6x10^{12}$ vg/mL; $7x10^{12}$ vg/mL; $8x10^{12}$ vg/mL; 및 $9x10^{12}$ vg/mL이다.

[0444] 전형적으로, 이러한 제형은 적어도 약 0.1%의 활성 화합물 또는 그 이상을 함유할 수 있지만, 물론 활성 성분(들)의 퍼센티지는 다양할 수 있으며, 편리하게는 전체 제형의 중량 또는 부피의 약 1% 또는 2% 내지 약 70% 또는 80% 또는 그 이상일 수 있다. 당연히, 각각의 치료적으로 유용한 조성물에서 활성 화합물의 양은 화합물의 임의의 주어진 단위 용량에서 적합한 용량을 얻을 수 있는 방식으로 제조될 수 있다. 용해도, 생체 이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 생성물 유통기한, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려 사항과 같은 요소들은, 그러한 약제학적 제형제를 제조하는 통상의 기술자에 의해 고려될 것이며, 따라서 다양한 용량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0445] 특정 상황에서는 피하, 췌장내, 비강내, 비경구, 정맥내, 근육내, 체내, 또는 경구, 복강내 또는 흡입을 통해 본원에 개시된 적합하게 제형화된 약제학적 조성물로 rAAV 기반 치료 컨스트럭트를 전달하는 것이 바람직할 것이다. 일부 실시형태에서, U.S. 특허 제5,543,158호; 제5,641,515호 및 제5,399,363호(각각은 그 전체가 본원에 참조로 구체적으로 통합됨)에서 설명된 바와 같은 투여 양식은 rAAV를 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바람직한 투여 방식은 간문맥 주입에 의한 것이다.

[0446] 주입 가능한 용도에 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액, 그리고 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 멸균 분말을 포함한다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물로, 그리고 오일로 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용 조건 하에서, 이러한 조제물은 미생물의 성장을 방지하는 방부제를 함유한다. 많은 경우에서 형태는 쉽게 주사할 수 있을 정도로 멸균되고 유동적이다. 이는 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하며, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용제 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에서, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨과 같은 등장성 제제를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주입 가능한 조성물의 장기적인 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 제제의 조성물로 사용함으로써 이루어질 수 있다.

[0447] 예를 들어, 주입 가능한 수용액을 투여하는 경우, 필요한 경우에는, 용액을 적절히 완충하고, 액체 희석제를 충분한 식염수 또는 글루코스를 사용하여 먼저 등장성 상태로 만들 수 있다. 이러한 특정 수용액은 정맥, 근육, 피하 및 복강 내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 채용될 수 있는 멸균 수성 매질은 통상의 기술자가 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 1회 투여량을 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해시켜 1000ml의 피하주입액에 첨가하거나, 제안된 주입 부위에 주입할 수 있다(예를 들어, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 및 1570-1580] 참조). 투여량의 일부 변형은 숙주의 병태에 따라 반드시 발생할 것이다. 투여의 책임자는 어떠한 경우에도 개별 숙주에게 적절한 용량을 결정할 것이다.

[0448] 멸균 주사액은 필요에 따라 본원에 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 rAAV를 혼합한 후, 여과 멸균하여 제조된다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매체 및 위에서 열거된 것들 중 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 다양한 멸균 활성 성분을 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 원하는 성분을 더한 분말을 생성하는 진공-건조 및 동결-건조 기법이 바람직한 제조 방법이다.

[0449] 본원에 개시된 rAAV 조성물은 또한 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 형성된 산 부가염(단백질의 유리 아미노기로 형성됨)을 포함한다. 유리 카르복실기로 형성된 염은 또한 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화철과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기에서 유래될 수 있다. 제형화 시에, 용액은 제형과 호환되는 방식으로, 그리고 치료적으로 유효한 양만큼 투여될 것이다. 제형은 주입액, 약물-방출 캡슐 등 다양한 투여 형태로 쉽게 투여될 수 있다.

[0450] 본원에서 사용되는 바와 같이, "담체"는 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 성분에 대한 그러한 매질 및 제제의 사용은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다. 보충적 활성 성분 또한 조성물에 통합될 수 있다. "약제학적으로-허용 가능한"이라는 어구는, 숙주에 투여될 때 알레르기 또는 유사한 부적절한 반응을 생성하지 않는 분자 엔티티 및 조성물을 지칭한다.

[0451] 리포좀, 나노캡슐, 마이크로입자, 마이크로스피어, 지질 입자, 지질 나노입자, 소포 등과 같은 전달 비히클은, 본 개시내용의 조성물을 적합한 숙주 세포에 도입하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 이식유전자에 의해 전달되는 rAAV 벡터는 지질 입자, 리포좀, 소포, 나노스피어, 또는 나노입자 중 어느 하나에 캡슐화되어 전달되도록 제형화될 수 있다.

[0452] 그러한 제형은 본원에 개시된 핵산 또는 rAAV 컨스트럭트의 약제학적으로 허용 가능한 제형의 도입을 위해 바람직할 수 있다. 리포좀의 형성 및 사용은 일반적으로 통상의 기술자에게 알려져 있다. 최근에는, 혈청 안정성과 순환 반감기를 개선한 리포좀이 개발되었다(U.S. 특허 제5,741,516호). 또한, 잠재적인 약물 담체로서 리포좀 및 리포좀 유사 조제물의 다양한 방법이 설명되어 있다(U.S. 특허 제5,567,434호; 제5,552,157호; 제5,565,213호; 제5,738,868호 및 제5,795,587호).

[0453] 리포좀은 일반적으로 다른 절차에 의한 형질감염에 내성이 있는 다수의 세포 유형에 성공적으로 사용되었다. 또한, 리포좀은 바이러스 기반 전달 시스템에서 전형적인 DNA 길이의 제약이 없다. 리포좀은 다양한 배양 세포주 및 동물에 유전자, 약물, 방사선 치료제, 바이러스, 전사 인자 및 알로스테릭 이펙터를 도입하는 데 효과적으로 사용되어 왔다. 또한, 리포좀 매개 약물 전달의 효과를 조사하는 여러 성공적인 임상 시험이 완료되었다.

[0454] 리포좀은 인지질로부터 형성되며, 수성 매질에 분산되어 자발적으로 다중막 동심원 이중층 소포(다중막 소포(MLV)라고도 함)를 형성한다. MLV는 일반적으로 25nm 내지 4㎛의 직경을 갖는다. MLV의 소니케이션은 코어에 수용액을 함유하는, 200 내지 500A 범위의 직경을 갖는 작은 단일막 소포(SUV)를 형성한다.

[0455] 대안적으로, rAAV의 나노캡슐 제형이 사용될 수 있다. 나노캡슐은 일반적으로 안정적이고 재현 가능한 방식으로 물질을 포획할 수 있다. 세포 내 중합체성 과부하로 인한 부작용을 피하기 위해서는, 이러한 초미립자(약 0.1㎛ 크기)는 생체 내에서 분해될 수 있는 폴리머를 사용하여 설계되어야 한다. 이러한 요건을 만족시키는 생분해성 폴리알킬-시아노아크릴레이트 나노입자가 사용을 위해 고려된다.

[0456] 위에서 설명된 전달 방법 외에도, 하기 기법들도 숙주에 rAAV 조성물을 전달하는 대안적인 방법으로 고려된다. 소노포레시스(sonophoresis)(즉, 초음파)는 순환계로 및 순환계를 통한 약물 투과의 속도 및 효능을 향상시키기 위한 디바이스로서 사용되었고 U.S. 특허 제5,656,016호에 설명되어 있다. 고려되는 다른 약물 전달 대안은, 골내 주입(U.S. 특허 제5,779,708호), 마이크로칩 디바이스(U.S. 특허 제5,797,898호), 안과용 제제(문헌[Bourlais et al., 1998]), 경피 매트릭스(U.S. 특허 제5,770,219호 및 제5,783,208호), 및 피드백-제어 전달(U.S. 특허 제5,697,899호)이다.

[0457] 일부 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 PD를 갖고 있거나 또는 갖는 것으로 진단된 대상체를 본원에서 설명되는 핵산으로 치료하는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 위에서 설명된 바와 같이, 임상의는 이러한 질환 및 장애를 진단하는 현재의 방법을 사용하여 PD를 갖는 대상체를 식별할 수 있다. 이러한 병태를 특성화하고, 진단, 뿐만 아니라 이들을 수행하기 위한 임상 검사에 도움이 되는 PD의 증상 및/또는 합병증은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있고 상기와 같이 본원에서 설명된다. PD의 가족력도 대상체가 PD를 가질 가능성이 있는지를 결정하는 데 또는 PD의 진단을 내리는 데 도움이 될 수 있다.

[0458] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명된 바와 같은 치료를 받기 전에 PD를 갖는 것으로 진단되었다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명된 바와 같은 치료를 받기 적어도 1년; 2년; 3년; 4년; 5년; 6년; 7년; 8년; 9년; 10년 또는 그 이상 전에 PD를 갖는 것으로 진단되었다.

[0459] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명된 바와 같은 치료를 받기 전에 PD를 가질 위험이 있는 것으로 진단되었다.

[0460] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명된 바와 같은 치료를 받기 전에 PD를 갖고 있는 것으로, 또는 가질 위험이 있는 것으로 진단되지 않았다.

[0461] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명된 바와 같은 치료를 받기 전에 PD를 갖는 것으로 진단된다. 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명된 바와 같은 치료를 받기 전에 PD를 가질 위험이 있는 것으로 진단된다.

[0462] 일 실시형태에서, 치료를 투여하는 사람은, 투여 치료 전에, 대상체가 PD를 갖고 있다고 진단하는 진단 분석(들)의 결과를 수신한다. 일 실시형태에서, 치료를 투여하는 사람은, 투여 치료 전에, 대상체가 PD를 가질 위험이 있다고 진단하는 분석(들)의 결과를 수신한다.

[0463] 본원에서 설명된 조성물 및 방법은 PD를 갖고 있거나 또는 갖는 것으로 진단된 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명된 조성물, 예컨대, PD의 증상을 경감시키기 위해 대상체에게 본원에서 설명되는 핵산의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "증상을 경감시키는"은 PD와 연관된 임의의 병태 또는 증상을 호전시키는 것이다. 동등한 비치료된 대조군과 비교할 때, 그러한 감소는 임의의 표준 기법으로 측정될 때 적어도 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상이다.

[0464] 유효량, 독성, 및 치료적 효능은, 예컨대, 최소 유효 용량 및/또는 최대 허용 가능 용량을 결정하기 위해, 세포 배양물 또는 실험용 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 채용되는 투여 형태 및 활용되는 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효 용량은 초기에 세포 배양물 분석으로부터 추정될 수 있다. 또한, 투여량은 최소 유효 투여량 및 최대 허용 가능한 투여량 사이의 투여량 범위를 달성하기 위해 동물 모델로 제형화될 수 있다. 임의의 특별한 투여량의 효과는 적합한 생체분석, 예를 들어, 그 중에서도 신경세포 분해 또는 기능성의 분석에 의해 모니터링될 수 있다. 투여량은 주치의에 의해 결정될 수 있고, 치료의 관찰된 효과에 적합하도록 필요에 따라 조정될 수 있다.

[0465] *조합 요법*

[0466] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것의 도입 또는 투여 전에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는다.

[0467] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것의 도입 또는 투여 후에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는다.

[0468] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 항-PD 치료제는 듀오파(Duopa)를 배제한다.

[0469] 일 실시형태에서, 본원에 설명되는 rAAV는 단일요법으로 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본원에서 설명되는 rAAV는 PD에 대해 알려진 다른 제제 및 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "조합하여" 투여된다는 것은, 대상체가 질병을 앓는 동안 2개(또는 그 이상)의 상이한 치료가 대상체에 전달된다는 것을 의미하고, 예컨대, 2개 이상의 치료는 대상체가 PD를 갖는 것으로 진단된 후에, 그리고 질환이 치료되거나 제거되기 전에, 또는 치료가 다른 이유로 인해 중단되기 전에 전달된다. 일부 실시형태에서, 하나의 치료의 전달은 제2 치료의 전달이 시작될 때 여전히 발생하고 있으므로, 투여 측면에서 중복이 존재한다. 이는 본원에서 종종 "동시" 또는 "동시 전달"로 지칭된다. 다른 실시형태에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 두 경우 모두의 일부 실시형태에서, 치료는 조합된 투여로 인해 더욱 유효하다. 예를 들어, 제2 치료는 보다 유효한데, 예를 들어, 더 적은 제2 치료로 동등한 효과가 관찰되거나, 제1 치료가 없는 상태에서 제2 치료가 투여됐을 때 관찰되는 것보다 제2 치료가 증상을 더 크게 감소시키거나, 유사한 상황이 제1 치료에서도 관찰된다. 일부 실시형태에서, 증상, 또는 질환과 관련된 다른 매개변수의 감소가 하나의 치료를 다른 치료의 부재 하에서 사용할 때 관찰되는 것보다 더 크도록 전달이 이루어진다. 두 가지 치료의 영향은 부분적으로 부가적이거나, 전체적으로 부가적이거나, 또는 부가적인 것보다 더 클 수 있다. 제2 치료가 전달될 때 제1 치료의 효과가 여전히 검출 가능하도록 전달이 이루어진다. 본원에서 설명된 rAAV 및 적어도 하나의 추가적인 치료법은 동시에, 동일한 조성물로 또는 별도의 조성물로, 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적 투여의 경우, 본원에서 설명되는 제제가 먼저 투여될 수 있고, 추가적인 제제가 그 다음으로 투여될 수 있으며, 또는 투여의 순서는 반대일 수 있다. 제제 및/또는 다른 치료제, 절차 또는 양식은 활성 장애 기간 동안, 또는 차도 기간 또는 덜 활성 질환 기간 동안 투여될 수 있다. 제제는 다른 치료 전에 투여될 수 있고, 치료와 동시

에 투여될 수 있고, 치료 후, 또는 장애의 차도 동안 투여될 수 있다.

[0470] PD를 치료하는 데 사용되는 예시적인 치료제가 상기와 같이 본원에서 설명된다.

[0471] rAAV와 조합하여 투여되는 경우, 추가적인 치료제(예컨대, 제2 또는 제3 항-PD 치료제)는 예컨대, 단일요법으로서 개별적으로 사용되는 각각의 치료제의 양 또는 투여량보다 더 높거나, 더 낮거나 또는 동일한 양 또는 용량으로 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 추가적인 치료제의 투여되는 양 또는 투여량은 개별적으로 사용되는 각각의 추가적인 치료제의 양 또는 투여량보다 더 낮다(예컨대, 적어도 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95% 또는 그 이상 더 낮다).

[0472] 다른 실시형태에서, 원하는 효과(예컨대, PD의 진행을 억제하거나 낮추는 것)를 생성하는 추가적인 치료제의 양 또는 투여량은 동일한 치료적 효과를 달성하는 데 개별적으로 필요한 각각의 추가적인 치료제의 양 또는 투여량보다 더 낮다(예컨대, 적어도 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95% 또는 그 이상 더 낮다).

[0473] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것의 도입 또는 투여 후에 적어도 하나의 항-PD 치료제의 동일한 양 또는 투여량을 유지한다.

[0474] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것의 도입 또는 투여 후에 적어도 하나의 항-PD 치료제의 양 또는 투여량을 감소시킨다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 항-PD 치료제의 양 또는 투여량은 rAAV 중 임의의 것의 도입 또는 투여 전에 취해지는 양 또는 투여량과 비교하여 적어도 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95% 또는 그 이상 감소된다.

[0475] 일 실시형태에서, 대상체는 본원에서 설명되는 rAAV 중 임의의 것의 도입 또는 투여 후에 더 이상 항-PD 치료제를 투여받지 않는다.

[0476] *면역 조절제*

[0477] 일부 실시형태에서, 본원에서 설명되는 조성물은 면역 조절제를 포함하고, 방법은 면역 조절제를 투여하는 것을 더 포함한다. 면역 조절제는 투여 시, 투여 전 또는 투여 후에 투여될 수 있다. 대상체가 적어도 제2 조성물을 재투여받는 경우, 면역 조절제는 적어도 제2 투여 전, 투여와 함께, 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0478] 바람직한 실시형태에서, 면역 조절제는 재조합 바이러스 벡터의 투여 전에 투여된다. 다양한 실시형태에서, 면역 조절제는 재조합 바이러스 벡터 투여의 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 또는 그 이상 전에 투여된다. 일 실시형태에서, 면역 조절제는 재조합 바이러스 벡터 투여의 24시간 이하 전에 투여된다.

[0479] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 재조합 바이러스 벡터와 실질적으로 동시에 투여되며, 예컨대, 본원에 개시된 바와 같은 재조합 바이러스 벡터의 투여의 약간 전(즉, 6시간, 또는 5시간, 또는 4시간, 또는 3시간, 또는 2시간, 또는 1시간 이내)이다. 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 바이러스 벡터의 투여와 동시에, 또는 투여 후 6시간 내에(즉, 개시된 바와 같은 바이러스 벡터 조성물의 투여 후 1시간 내에, 또는 2시간 내에, 또는 3시간 내에, 또는 4시간 내에, 또는 5시간 내에 또는 6시간 내에, 또는 약 6시간) 투여된다.

[0480] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 원래는 그러한 벡터를 투여받기에 좋은 후보자가 아닌 대상체에게 재조합 바이러스 벡터를 투여하는 것을 허용한다. 그러한 벡터를 투여받기에 달리 양호한 후보자가 아닌 대상체는, 예를 들어, 이전에 재조합 바이러스 벡터의 투여를 받은 적이 있거나 및/또는 이전에 재조합 바이러스 벡터에 노출된 적이 있고 이후 벡터에 대한 항체 반응을 일으킨 대상체이다. 전형적으로, 대상체는 바이러스 벡터 결합 항체의 역가가 1:5 미만(예컨대, 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4)인 경우, 재조합 바이러스 벡터의 투여를 위한 후보, 즉, 양호한 후보로 간주된다. 반면, 대상체의 바이러스 벡터 결합 항체의 역가가 1:5 이상(예컨대 1:6, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1,000 또는 그 이상)인 경우, 대상체는 재조합 바이러스 벡터의 투여에 적합한 후보가 아닌 것으로 간주된다. 통상의 기술자는 대상체로부터 생물학적 샘플, 예컨대, 대상체의 혈액을 채취하고, 공지된 항원으로 생물학적 샘플을 자극하고, 공지된 항원으로 바이러스 결합 항체의 존재를 검출하는 등 해당 분야의 표준 기법을 사용하여 대상체의 항체 역가를 평가할 수 있다. 항체 역가는 샘플에서 50%의 바이러스 벡터 중화가 검출되기까지 샘플이 얼마나 희석될 수 있는지를 측정하는 지표이다. 항체 역가는 일반적으로 1:100과 같은 비율로 표시되는데, 이는 1부의 혈청을 100부의 식염수 용액(즉, 희석액)에 첨가하면 샘플에서 50%의 항체가 중화된다는 것을 의미하고, 즉, 바이러스 감염을 50%만큼 억제하는 데 필요한 혈청의 역

수 희석량은 50% 억제 시 중화 항체 역가로 지정될 수 있다. 바이러스 벡터 항체의 1:10의 역가는, 따라서, 1:100 역가보다 더 낮은 수준의 바이러스 벡터 항체의 지표이다.

[0481] 따라서, 일 실시형태에서, 대상체는 유전자 치료의 투여 전에 유전자 치료의 AAV 벡터에 대한 항-AAV 항체의 존재에 대해 평가된다. 일 실시형태에서, 대상체는 유전자 치료의 투여 전에 유전자 치료의 AAV 벡터에 대한 중화 항-AAV 항체의 존재에 대해 평가된다. 중화 항-AAV 항체를 검출하기 위한 방법은 예컨대, 문헌 [Kasprzyk T., et al. Mol Therapy. Methods & Clinical Dev. Jan 6, 2022]에서 더 설명되어 있고, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0482] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 생물학적 샘플, 예컨대, 대상체로부터의 혈액 샘플에 존재하는 바이러스 벡터 결합 항체의 역가가 약 1:5 미만(예컨대, 1:1, 1:2, 1:3, 또는 1:4)인 대상체에게 투여되고, 여기서 생물학적 샘플의 1 부는 완충액의 10,000 부에 희석되어 50%의 바이러스 벡터 중화를 초래한다.

[0483] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 대상체로부터의 생물학적 샘플 또는 혈액제제에 존재하는 바이러스 벡터 결합 항체의 역가가 1:5 이상 약 1:10 미만(예컨대, 1:6, 1:7, 1:8, 또는 1:9)인 대상체에게 투여되고, 여기서 생물학적 샘플 또는 혈액제제의 1 부는 완충액의 10,000 부에 희석되어 50%의 바이러스 벡터 중화를 초래하여, AAV 유전자 치료로 효과적으로 치료받을 수 있는 대상체의 풀을 확대한다. 현재, 바이러스 중화 항체 수준이 1:5 이상인 예비 환자는 그러한 치료에서 배제되며, 즉, 그들은 좋은 후보자가 아니다. 항체 역가가 1:5 이상이지만 1:10 미만인 대상체에의 면역 조절제의 투여는 대상체에 존재하는 항체 역가를 1:5 미만까지 감소시킬 것으로 예상되고, 이로써 대상체에 재조합 바이러스 벡터(예컨대, 유전자 치료 벡터)의 투여를 위한 후보자의 자격을 부여할 수 있다.

[0484] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 생물학적 샘플, 예컨대, 대상체로부터의 혈액 샘플에 존재하는 바이러스 벡터 결합 항체의 역가가 1:5 이상 약 1:25 미만(예컨대, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23 및 1:24)인 것으로 밝혀진 대상체에 투여되고, 여기서 생물학적 샘플 또는 혈액제제의 1 부는 완충액의 10,000 부에 희석되어 50%의 바이러스 벡터 중화를 초래한다. 예를 들어, 역가가 1:5 이상이지만 1:15 미만인 대상체에의 면역 조절제의 투여는 대상체에 존재하는 항체 역가를 1:5 미만까지 감소시킬 것으로 예상되고, 이로써 대상체에 재조합 바이러스 벡터(예컨대, 유전자 치료 벡터)의 투여를 위한 후보자의 자격을 부여할 수 있다. 일 실시형태에서, 면역 조절제는 대상체로부터의 생물학적 샘플에 존재하는 바이러스 벡터 결합 항체의 항체 역가가 1:5 이상 약 1:100 미만(예컨대, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 및 1:99)인 대상체에게 투여되고, 여기서 생물학적 샘플 또는 혈액제제의 1 부는 완충액의 10,000 부에 희석되어 50%의 바이러스 벡터 중화를 초래한다. 항체 역가가 1:5 이상이지만 1:25 미만인 대상체에의 면역 조절제의 투여는 대상체에 존재하는 항체 역가를 1:5 미만까지 감소시킬 것으로 예상되고, 이로써 대상체에 재조합 바이러스 벡터(예컨대, 유전자 치료 벡터)의 투여를 위한 후보자의 자격을 부여할 수 있다.

[0485] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터의 반복 투약, 또는 반복 투여를 가능하게 한다. 예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대, 본원에 개시된 AAV 벡터의 투여는, 정의된 기간에 걸쳐 면역 조절제와 함께(AAV 벡터의 투여와 실질적으로 동시에, 또는 전 또는 후에) 다회(즉, 1회 초과) 투여될 수 있다. 예시적인 목적으로, AAV 벡터는 수회, 즉, 몇 주(예컨대, 2주) 내지 몇 개월(예컨대, 2개월)에 걸쳐 1회 초과 투여될 수 있다. 이론에 제한되기를 바라지 않고, 본원에 개시된 바와 같은 방법에 따른 면역 조절제와 함께 AAV 벡터를 투여하는 것은, 비제한적인 예로서, 6개월의 기간에 걸쳐 매달, 6주의 기간에 걸쳐 3-4회, 1개월(또는 약 4주) 또는 2개월(또는 약 8주)의 기간에 걸쳐 매주일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터는 면역 조절제와 함께(AAV 벡터의 투여와 실질적으로 동시에, 또는 전 또는 후에) 다회(예컨대, 반복 투여) 투여되고, 바이러스 벡터, 예컨대, AAV 벡터의 용량은 단일 용량 요법에 전형적으로 사용되는 것보다 더 낮고, 예를 들어, 본원에서 설명된 바와 같은 단일 용량 요법보다 더 낮은 용량이다. 예를 들어, AAV 벡터의 용량은 약 10^{12} 이하, 또는 약 10^{12} 미만일 수 있고, 예를 들어, 용량은 약 10^{7}, 10^{8}, 10^{9}, 10^{10}, 10^{11}, 또는 10^{12}, 또는 10^{7} 내지 10^{12} 사이의 임의의 용량일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터의 반복 투여는 본원에 개시된 바와 같은 방법에 따라 면역 조절제와 함께 대상체에게 투여되고, 면역 조절제는 용량 사이에서 변경될 수 있고, 즉, 동일하거나 상이한 면역 조절제가 반복 투여에 사용될 수 있다. 예를 들어, AAV의 제1 투여가 면역 조절제 A와 공동 투여될 때, AAV의 제2 또는 제3 투여와 함께 투여되는 제2 면역 조절제는 면역 조절제 A와 상이하고, 예컨대, 제2 면역 조절제는 면역 조절제 B이다. 예시적인 목적으로, 개시

된 바와 같은 방법에 따른 투여 요법은 10^{12} 또는 10^{12} 미만의 농도의 AAV 벡터의 투여일 수 있고, 여기서 면역 조절제는 A-B-C-D, 또는 A-A-B-C, 또는 A-B-A-C로서 투여되고, 여기서 A, B, C 및 D는 본원에 개시된 바와 같이 서로 다른 면역 조절제이다. 다시 말해서, 투여 요법은 일정 기간에 걸친 면역 조절제의 복수의 투여를 포함할 수 있으며, 여기서 복수 중 각각의 투여는 면역 조절제 A, 면역 조절제 B, 면역 조절제 C, 면역 조절제 D, 및 이들의 조합에서 독립적으로 선택되는 면역 조절제를 포함한다(즉, 각각의 투여는 하나 초과의 면역 조절제를 포함할 수 있다). 그러한 다양한 면역 조절제는 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터의 반복 투여를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이, 면역 조절제 "A"는 이를테면 IdeS일 수 있고, 면역 조절제 "B"는 ImmTOR™일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터는 IdeS 면역 조절제와 함께 제1 시점에 투여되고, 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터는 상이한 면역 조절제, 이를테면 면역글로불린 분해 단백질 또는 소분자, 예컨대, ImmTOR™과 함께 제2 시점에 투여되고, 그 반대이기도 하다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터는 ImmTOR™ 면역 조절제와 함께 제1 시점에 투여될 수 있고, 본원에 개시된 바와 같은 AAV 벡터는 IdeS와 함께 제2 시점에 투여될 수 있다.

[0486] 본원의 일 국면은 이전에 재조합 바이러스 벡터, 예를 들어, 유사한 혈청형을 갖는 동일한 재조합 바이러스 벡터 또는 다른 바이러스 벡터를 투여받은 적이 있는 대상체에 재조합 바이러스 벡터(예컨대, 유전자 치료 벡터)를 투여하기 위한 방법을 제공하고, 방법은 재조합 바이러스 벡터를 투여하기 전에, 면역 조절제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 이전에 투여받은 재조합 바이러스 벡터는, 투여받은 재조합 바이러스 벡터를 표적화(즉, 인식하고 결합)하는 항-AAV 항체를 생성하는 면역 반응을 유도한다.

[0487] 본원의 또 다른 국면은 이전에 바이러스 벡터에 노출된 적이 있는 대상체에 재조합 바이러스 벡터(예컨대, 유전자 치료 벡터)를 투여하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 노출은 투여될 재조합 바이러스 벡터를 표적화하는 항-AAV 항체를 생성하는 면역 반응을 유도하고, 여기서 대상체는 적어도 1:5-1:15, 적어도 1:5-1:25, 적어도 1:5-1:50, 또는 적어도 1:5-1:100의 항-AAV 항체 역가를 갖고, 방법은 재조합 바이러스 벡터를 투여하기 전에, 면역 조절제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0488] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 전신에 투여된다.

[0489] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 혈액 뇌 장벽을 통과한다. 대안적인 실시형태에서, 면역 조절제는 혈액 뇌 장벽을 통과하지 않는다.

[0490] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 국소적으로 투여된다. 예를 들어, 재조합 바이러스 벡터가 뇌 조직에 국소적으로 투여되고 면역 조절제가 혈액 뇌 장벽을 통과하지 않는 경우, 예컨대, 적절한 카테터를 통해, 뇌 조직에 직접 또는 척수 주위를 순환하는 뇌척수액을 통해 뇌 조직에 간접적으로(즉, 요추천자(spinal tap)) 면역 조절제를 뇌 조직에 국소적으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0491] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 중추신경계(CNS) 조직(예컨대, 뇌 조직, 척수 조직, 뇌척수액(CSF))에 국소적으로 투여된다. CNS 조직은 또한 신경 세포, 신경교세포, 성상세포, 뇌척수액(CSF), 간질 공간, 뼈 연골 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에서 설명되는 임의의 조성물은 예컨대, 심실 영역 뿐만 아니라 선조체(예컨대, 선조체의 꼬리핵 또는 피각), 척수 및 신경근 접합부 또는 소뇌 소엽에 주입함으로써 CNS 또는 뇌에 직접 전달될 수 있다.

[0492] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 신경 경로, 체감각 시스템, 시각 시스템, 청각 시스템, 신경, 신경 내분비 시스템, 신경 혈관 시스템, 뇌 신경전달 물질 시스템, 경막 수막 시스템, 또는 이들의 조합 중 임의의 것에 국소적으로 투여된다.

[0493] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 눈, 예컨대, 유리체, 망막 또는 공막에 국소적으로 투여된다.

[0494] 일 실시형태에서, 면역 조절제는 전신에 투여된다.

[0495] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 IdeS, IdeZ, IdeS/Z, Endo S, 또는, 그 기능적 변이체와 같은 효소를 분해하는 면역글로불린이다. 그러한 면역 글로불린 분해 효소 및 그의 용도의 비제한적인 예는 US 7,666,582, US 8,133,483, US 20180037962, US 20180023070, US 20170209550, US 8,889,128, WO 2010057626, US 9,707,279, US 8,323,908, US 20190345533, US 20190262434, US 20210246469 및 WO 2020016318에 설명되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0496] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역 조절제는 임의의 적합한 용량으로, 이를테면 의학 전문가에 의해 결정

된 적합한 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 적합한 투여량은 대상체의 체중 기준 약 0.05mg/kg 내지 약 5mg/kg, 또는 대상체의 체중 기준 약 0.1mg/kg 내지 약 4mg/kg일 수 있다.

[0497] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역 조절제, 예컨대, IdeZ는, 대상체의 체중 기준 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg의 투여량으로 투여된다. 예를 들어, 적합한 투여량은 대상체의 체중 기준 약 0.05mg/kg 내지 약 5mg/kg, 또는 대상체의 체중 기준 약 0.1mg/kg 내지 약 4mg/kg일 수 있다.

[0498] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역 조절제, 예컨대, IdeZ는, 대상체의 체중 기준 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg의 투여량으로 투여된다. 예를 들어, 적합한 투여량은 대상체의 체중 기준 약 0.05mg/kg 내지 약 5mg/kg, 또는 대상체의 체중 기준 약 0.1mg/kg 내지 약 4mg/kg일 수 있다.

[0499] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역 조절제, 예컨대, EndoS는, 대상체의 체중 기준 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg의 투여량으로 투여된다. 예를 들어, 적합한 투여량은 대상체의 체중 기준 약 0.05mg/kg 내지 약 5mg/kg, 또는 대상체의 체중 기준 약 0.1mg/kg 내지 약 4mg/kg일 수 있다.

[0500] 또한, 수치 범위에 대한 언급, 이를테면 "0.01 내지 10"은 0.01 1, 0.012, 0.013 등, 뿐만 아니라 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 등을 포함한다. 예를 들어, 대상체의 체중 기준 약 "0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg"의 용량은 0.011mg/kg, 0.012mg/kg, 0.013mg/kg, 0.014mg/kg, 0.015mg/kg 등, 뿐만 아니라 9.5mg/kg, 9.6mg/kg, 9.7mg/kg, 9.8mg/kg, 9.9mg/kg 등을 포함한다.

[0501] 다양한 실시형태에서, 대상체에의 재조합 바이러스 벡터의 투여보다 프로테아제 및/또는 글리코시다제의 투여가 선행되어, 재조합 바이러스 벡터에 대한 면역 반응(예컨대, 체액성 면역 반응), 또는 바이러스 벡터에 의해 캡슐화된 이종 폴리뉴클레오타이드 또는 이종 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 항체를 억제하거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 투여보다 프로테아제 및/또는 글리코시다제의 투여가 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간; 또는 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일만큼; 또는 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월만큼; 또는 적어도 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 또는 그 이상만큼 선행될 수 있다.

[0502] 일 실시형태에서, 대상체에의 재조합 바이러스 벡터의 투여는 프로테아제 및/또는 글리코시다제의 투여와 동시에 수행되어, 재조합 바이러스 벡터에 대한 면역 반응(예컨대, 체액성 면역 반응), 또는 바이러스 벡터에 의해 캡슐화된 이종 폴리뉴클레오타이드 또는 이종 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 항체를 억제하거나, 감소시키거나, 또는 예방한다.

[0503] 특정 실시형태에서, 프로테아제 및/또는 글리코시다제는 면역 반응(예컨대, 체액성 면역 반응) 전에, 이를테면 중화 항체의 발달, 또는 이종 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 항체, 바이러스 벡터에 의해 캡슐화된 이종 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 항체의 발달 전에 대상체에 투여된다. 일 실시형태에서, 면역 반응은 재조합 바이러스 벡터의 투여 후 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 내에; 또는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 또는 그 이상 내에 발생한다.

[0504] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 프로테아좀 억제제이다. 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 프로테아제 또는 글리코시다제이다. 특정 국면에서, 프로테아좀 억제제는 보르테조밉이다. 실시형태의 일부 국면에서, 면역 조절제는 보르테조밉 및 항-CD20 항체, 이를테면 리툭시맙을 포함한다. 실시형태의 다른 국면에서, 면역 조절제는 보르테조밉, 리툭시맙, 메토트렉세이트, 및 정맥내 감마 글로불린을 포함한다. 프로테아좀 억제제와, 이들의 리툭시맙, 메토트렉세이트 및 정맥내 감마 글로불린과의 조합의 비제한적인 예는 US 10,028,993, US 9,592,247 및 US 8,809,282에 설명되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0505] 대안적인 실시형태에서, 면역 조절제는 NF-kB 경로의 억제제이다. 실시형태의 특정 국면에서, 면역 조절제는 라파마이신 또는 그 기능적 변이체이다. 라파마이신의 용도의 비제한적인 예는 US 10,071,114, US 20160067228, US 20160074531, US 20160074532, US 20190076458, US 10,046,064에 설명되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 실시형태의 다른 국면에서, 면역 조절제는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체이다. 면역억제제, 합성 나노담체에 결합된 면역억제제, 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체, 및/또는, 면역관용(toloregenic) 합성 나노담체, 그들의 용량, 투여 및 용도의 비제한적인 예가 US20150320728, US

20180193482, US 20190142974, US 20150328333, US20160243253, US 10,039,822, US 20190076522, US 20160022650, US 10,441,651, US 10,420,835, US 20150320870, US 2014035636, US 10,434,088, US 10,335,395, US 20200069659, US 10,357,483, US 20140335186, US 10,668,053, US 10,357,482, US 20160128986, US 20160128987, US 20200038462, US 20200038463에서 설명되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0506] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 Kishimoto, et al., 2016, Nat Nanotechnol, 11(10): 890-899; Maldonado, et al., 2015, PNAS, 112(2): E156-165) 및 US20200038463 및 US 특허 9,006,254에 개시된 바와 같은 라파마이신(즉, ImmTOR™ 나노입자)을 포함하는 합성 나노담체를 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 엔지니어링된 세포, 예컨대, WO2017192786에서 설명된 바와 같은, SQZ 기술을 사용하여 변형된 면역 세포이며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0507] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄염, 앰플리백스(Amplivax), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(Imiquimod), 이뮤팩트(ImuFact) IMP321, IS 패치, ISS, 이스코매트릭스(ISCOMATRIX), 쥬브이뮨(Juvlmmune), 리포백(LipoVac), MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, 온탁(ONTAK), 펩텔(PEPTEL), 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드(resiquimod), SRL172, 바이로좀 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys, 아퀼라(Aquila's) QS21 스티뮬론(stimulon), 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 면역 조절제 또는 폴리-ICLC이다.

[0508] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 세포에서 선천성 면역 반응을 억제하는 소분자이고, 이를테면 클로로퀸(TLR 신호 전달 억제제) 및/또는 2-아미노퓨린(PKR 억제제)이며, 이들은 또한 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 rAAV를 포함하는 조성물과 조합하여 투여될 수 있다. 상업적으로 이용 가능한 TLR 신호 전달 억제제의 일부 비제한적인 예는 BX795, 클로로퀸, CLI-095, OxPAPC, 폴리믹신 B, 및 라파마이신(모두 INVIVOGEN에서 구매 가능함)을 포함한다. 또한, 2-아미노퓨린, BX795, 클로로퀸, 및 H-89와 같은 패턴 인식 수용체(PRR)(선천성 면역력 신호 전달에 관여함)의 억제제는, 또한 본원에 개시된 바와 같은 생체 내 단백질 발현을 위한 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 조성물 및 방법에 사용될 수 있다.

[0509] 일부 실시형태에서, 면역 조절제는 광분리술(photopheresis)이고, 이는 또한 체외광화학요법(extracorporeal photochemotherapy), 또는 ECP로도 알려져 있다. 광분리술 치료는 대상체의 혈액에서 수행된다. IV 또는 카테터를 사용하여, 백혈구 세포(백혈구)의 일부를 분리하는 디바이스를 통해 대상체로부터 혈액을 채취한다. 분리된 백혈구 세포를 8-메톡시프소랄렌(8-MOP)이라고 불리는 자연 발생 광감각화 화학물질로 처리하고, 이어서 특정 파장의 자외선(UVA) 광선에 노출시킨다. UVA 광선에 노출된 후, 혈액은 대상체에 다시 투여된다. 광분리술은 적어도 매일 수행될 수 있다. 일 실시형태에서, 광분리술은 재조합 바이러스 벡터의 투여 전에 1주일에 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회 수행된다. 일 실시형태에서, 광분리술은 재조합 바이러스 벡터의 투여 전에 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주 또는 그 이상 동안, 또는 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 또는 12개월 동안 1주일에 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회 수행된다. 따라서, 대상체에 면역 조절제를 투여하는 것은 대상체에 광분리술을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 광분리술은 본원에서 설명되는 효소, 나노입자, 및 화학적 조성물에서 선택되는 제2 면역 조절제의 투여와 함께, 및/또는 다회의 투여 요법의 일부로서 수행될 수 있다는 것이 이해된다.

[0510] 일부 실시형태에서, 변형된 바이러스 캡시드를 갖는 rAAV 벡터는 또한 NLRX1과 같은 선천성 면역력의 음성 조절자를 암호화할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, rAAV 벡터는 또한 NLRX1, NS1, NS3/4A, 또는 A46R 중 하나 이상을 선택적으로 암호화할 수 있다. 또한, 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 조성물은 또한 조직 또는 대상체에 의해 생성되는 선천성 면역 반응을 피하기 위해 선천성 면역 시스템의 억제제를 암호화하는 합성, 변형된-RNA를 포함할 수 있다.

[0511] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 바와 같은 투여 방법에 사용하기 위한 면역 조절제는 면역억제 약물 또는 제제이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역억제 약물 또는 제제"는 정상적인 면역 기능을 억제하거나 방해하는 약제학적 제제를 지칭한다. 본원에 개시된 방법에 적합한 면역억제 약물 또는 제제의 예는, 미국 특허 공보 제2002/0182211호에 개시된 바와 같은 CTLA4 및 B7 경로를 통한 T-세포와 B-세포의 결합을 방해하는 제제와 같이, T-세포/B-세포 공동자극 경로를 억제하는 제제를 포함하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로

통합된다. 일 실시형태에서, 면역억제제는 사이클로스포린 A이다. 면역억제제의 일 예는 마이코페닐레이트 모페틸, 라파마이신, 및 항-흉선세포 글로불린을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 면역억제 약물은 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 조성물, 또는 본원에 개시된 바와 같은 투여 방법에 따라 적어도 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 조성물의 투여와 동시에, 또는 투여 전, 또는 후에 별도의 조성물에서 투여될 수 있다. 면역억제 약물은 투여의 경로와 호환되는 제형으로 투여되며, 원하는 치료 효과를 달성하기에 충분한 투여량으로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역억제 약물은 본원에 개시된 바와 같은 rAAV 벡터에 대한 내성을 유도하기에 충분한 시간 동안 일시적으로 투여된다.

[0512] 본원에 개시된 바와 같은 방법 및 조성물의 임의의 실시형태에서, 본원에 개시된 바와 같은 조성물을 투여받는 대상체는 또한 면역억제제를 투여받는다. AAV를 투여받고 있는 환자의 면역 반응의 면역억제를 달성하기 위한 다양한 방법이 알려져 있다. 해당 기술 분야에 알려져 있는 방법은 프로테아좀 억제제와 같은 면역억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 해당 기술 분야에 알려져 있는 하나의 그러한 프로테아좀 억제제는, 예를 들어 미국 특허 제9,169,492호 및 미국 특허 출원 제15/796,137호에 개시되어 있으며, 둘 모두는 그 전체가 본원에 참조로 통합되고, 이는 보르테조밉이다. 일부 실시형태에서, 면역억제제는 예를 들어, 세포를 생성하는 항체의 제거 또는 억제를 통해 면역 반응을 억제할 수 있는 다클론, 단일클론, scfv 또는 다른 항체 유래 분자를 포함하는 항체이다. 추가 실시형태에서, 면역억제 요소는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 이러한 실시형태에서, shRNA의 코딩 영역은 rAAV 카세트에 포함되고, 일반적으로, 즉, 폴리-A 테일의 3'의 하류에 위치한다. shRNA는 표적화되어 사이토카인, 성장 인자(형질전환 성장 인자 β1 및 β2, TNF 및 해당 기술 분야에 알려져 있는 다른 인자를 포함함)와 같은 면역자극제의 발현을 감소시키거나 또는 제거할 수 있다.

[0513] 그러한 면역 조절제의 사용은 수개월 및/또는 수년에 걸쳐 다회 투약(예컨대, 다회 투여)하는 능력을 용이하게 한다. 이는 후술하는 바와 같은, 다수의 유전자를 암호화하는 rAAV 벡터, 또는 대상체에 대한 다회 투여와 같은, 다수의 제제의 사용을 허용한다.

[0514] *정의*

[0515] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 일부 용어 및 구문의 의미가 아래에 제공된다. 달리 명시되지 않거나 문맥에서 암시하지 않는 한, 다음 용어 및 구문에는 아래에 제공된 의미가 포함된다. 정의는 특정 실시형태를 설명하는 데 도움이 되도록 제공되며 본원에서 설명된 청구된 기술을 제한하려는 의도가 아닌데, 본 기술의 범위는 청구범위에 의해서만 제한되기 때문이다. 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 기술이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 해당 기술 분야의 용어 사용과 본 명세서에 제공된 정의 사이에 명백한 불일치가 있는 경우, 명세서 내에 제공된 정의가 우선한다.

[0516] 편의상, 본원, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 채용된 특정 용어를 본원에 수집했다.

[0517] 물질의 "유효량"은 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양이다. 일부 실시형태에서, 단리된 핵산의 유효량은 대상체의 표적 조직의 표적 세포를 형질감염(또는 rAAV 매개 전달의 맥락에서는 감염)시키기에 충분한 양이다. 일부 실시형태에서, 표적 조직은 중추신경계(CNS) 조직(예컨대, 뇌 조직, 척수 조직, 뇌척수액(CSF) 등)이다. 일부 실시형태에서, 단리된 핵산(예컨대, 이는 rAAV를 통해 전달될 수 있음)의 유효량은, 대상체에서 치료적 이점, 예컨대, 대상체의 MDS-UPDRS 점수를 감소시키거나 안정화하고, 대상체의 수명을 연장하고, 대상체에서 질환의 하나 이상의 증상(예컨대, PD의 증상)을 개선하는 등의 이점을 갖기에 충분한 양일 수 있다. 유효량은 예를 들어, 대상체의 종, 연령, 체중, 건강, 및 표적화되는 조직과 같은 다양한 인자에 따라 달라질 것이고, 따라서 본 개시내용의 다른 곳에서 설명된 바와 같은 대상체 및 조직 사이에서 달라질 것이다.

[0518] 용어 "줄다", "감소된", "감소" 또는 "억제하다"는 모두 통계적으로 유의미한 양만큼의 감소를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 일부 실시형태에서, "감소하다", "감소" 또는 "줄다" 또는 "억제하다"는 일반적으로 기준 수준(예를 들면, 주어진 치료 또는 제제의 부재)과 비교하여 적어도 10% 감소를 의미하고, 예를 들면, 적어도 약 10%, 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%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 그 이상의 감소를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 "감소" 또는 "억제"는, 기준 수준과 비교하여 완전한 억제 또는 감소를 포함하지 않는다. "완전한 억제"는 기준 수준과 비교하여 100% 억제이다. 감소는 바람직하게는, 특정 장애가 없는 개체에 대해 정상 범위 내에서 허용되는 수준까지 내려갈 수 있다.

[0519] 용어 "증가된", "증가하다", "강화하다" 또는 "활성화하다"는 모두 본원에서 통계적으로 유의미한 양만큼의 증가를 의미하는 것으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 용어 "증가된", "증가하다", "강화하다" 또는 "활성화하다"는 기준 수준과 비교하여, 적어도 10%의 증가, 예를 들면, 기준 수준과 비교하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 100%를 포함하여 100%까지의 증가 또는 10-100% 사이의 임의의 증가, 또는 기준 수준과 비교하여 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배 증가, 또는 2배 내지 10배 또는 그 이상 사이의 임의의 증가를 의미할 수 있다. 마커 또는 증상의 맥락에서, "증가"는 그러한 수준에서 통계적으로 유의미한 증가이다.

[0520] 본원에서 사용되는 바와 같이, "대상체"는 인간 또는 비인간 동물을 의미한다. 일반적으로, 비인간 동물은 영장류, 설치류, 가축 또는 수렵 동물과 같은 척추동물이다. 영장류는 침팬지, 시아노몰로구스 원숭이, 거미원숭이, 마카크원숭이, 예를 들면, 레수스원숭이를 포함한다. 설치류는 마우스, 래트, 우드척, 페럿, 토끼, 및 햄스터를 포함한다. 가축 및 수렵 동물은 소, 말, 돼지, 사슴, 들소, 버팔로, 고양이과, 예를 들면, 집고양이, 개과, 예를 들면, 개, 여우, 늑대, 조류, 예를 들면, 닭, 에뮤, 타조 및 어류, 예를 들면, 송어, 메기, 연어를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 포유동물, 예를 들면, 영장류, 예를 들면, 인간이다. "개체", "환자" 및 "대상체"라는 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0521] 바람직하게는, 대상체는 포유동물이다. 포유동물은 인간, 인간외 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말 또는 소일 수 있지만, 이러한 예에 제한되지 않는다. 인간 이외의 포유동물은 PD의 동물 모델을 대표하는 대상체로서 유리하게 사용될 수 있다. 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있다.

[0522] 대상체는 치료(예컨대, PD)를 필요로 하는 병태 또는 그러한 병태와 관련된 하나 이상의 합병증으로 이전에 진단되었거나 또는 앓거나 또는 갖는 것으로 확인되었고, 임의로 병태 또는 병태와 관련된 하나 이상의 합병증의 치료를 이미 겪은 인간 또는 동물일 수 있다. 대안적으로, 대상체는 또한 병태 또는 병태와 관련된 하나 이상의 합병증을 갖는 것으로 이전에 진단되지 않은 대상체일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 병태 또는 병태와 관련된 하나 이상의 합병증의 하나 이상의 위험 인자를 나타내는 대상체 또는 위험 인자를 나타내지 않는 인간 또는 동물일 수 있다.

[0523] 특별한 병태(예컨대, PD)의 치료를 "필요로 하는 대상체"는 해당 병태를 갖고 있거나, 해당 병태를 갖고 있는 것으로 진단되거나, 또는 해당 병태가 발병할 위험이 있는 대상체일 수 있다.

[0524] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서는 인접하는 잔기의 알파-아미노기와 카르복시기 사이의 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된 일련의 아미노산 잔기를 표기하는 데 상호교환적으로 사용된다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 크기 또는 기능과 상관없이 변형된 아미노산(예를 들어, 포스포릴화, 당화, 글리코실화 등) 및 아미노산 유사체를 포함하는 아미노산의 중합체를 지칭한다. "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 상대적으로 큰 폴리펩타이드에 대해 종종 사용되는 반면, "펩타이드"라는 용어는 작은 폴리펩타이드에 대해 종종 사용되지만, 해당 분야에서 이러한 용어의 사용은 중복된다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 유전자 생성물 및 그 단편을 언급할 때, 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 따라서, 예시적인 폴리펩타이드 또는 단백질은 유전자 산물, 천연 단백질, 상동체, 오르쏘로그(ortholog), 파라로그(paralog), 단편 및 상기의 다른 등가물, 변이체, 단편 및 유사체를 포함한다.

[0525] 변이체 아미노산 또는 DNA 서열은 천연 또는 기준 서열에 대해, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97 %, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 이상 동일할 수 있다. 천연 서열과 돌연변이 서열 간의 상동성(퍼센트 동일성) 정도는 예를 들면, 월드 와이드 웹(예를 들면, 디폴트 설정의 BLASTp 또는 BLASTn)에서 이 목적을 위해 일반적으로 사용되는 무료 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 두 서열을 비교함으로써 결정할 수 있다.

[0526] 네이티브 아미노산 서열의 변경은 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려진 많은 기법 중 임의의 기법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들면, 돌연변이 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 특정 유전자좌에 돌연변이를 도입할 수 있고, 돌연변이는 천연 서열의 단편에 대한 결찰을 가능하게 하는 제한 부위와 인접할 수 있다. 결찰 후, 생성된 재구조화된 서열은 원하는 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 갖는 유사체를 암호화한다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드-지정 부위-특이적 돌연변이 유발 절차를 사용하여, 필요한 치환, 결실 또는 삽입에 따라 변경된 특정 코돈을 갖는 변경된 뉴클레오타이드 서열을 제공할 수 있다. 이러한 변경을 만드는 기법은 매우 잘 확립되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Walder et al. (Gene 42:133, 1986)]; 문헌 [Bauer et al. (Gene 37:73, 1985)]; 문헌 [Craik(BioTechniques, January 1985, 12-19)]; 문헌 [Smith et al. (Genetic

Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981)]; 및 미국 특허 제4,518,584호 및 제4,737,462호(그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 의해 개시된 것들을 포함한다. 폴리펩타이드의 적절한 형태를 유지하는 데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는, 분자의 산화 안정성을 개선하고, 비정상적인 가교 처리를 방지하기 위해 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 안정성을 개선하거나, 또는 올리고머화를 용이하게 하기 위해, 시스테인 결합(들)을 폴리펩타이드에 부가할 수 있다.

[0527] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산" 또는 "핵산 서열"은 리보핵산, 데옥시리보핵산 또는 그의 유사체의 단위를 포함하는 임의의 분자, 바람직하게는 중합체성 분자를 지칭한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 단일 가닥 핵산은 변성 이중 가닥 DNA의 한 핵산 가닥일 수 있다. 대안적으로, 이중 가닥 DNA에서 유래되지 않은 단일 가닥 핵산일 수 있다. 일 국면에서, 핵산은 DNA일 수 있다. 다른 국면에서, 핵산은 RNA일 수 있다. 적합한 DNA는 예컨대, 게놈 DNA 또는 cDNA를 포함할 수 있다. 적합한 RNA는, 예컨대, mRNA, miRNA를 포함할 수 있다.

[0528] 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명된 바와 같은 폴리펩타이드, 핵산, 또는 세포는 엔지니어링될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "엔지니어링된"은 사람의 손에 의해 조작된 국면을 의미한다. 예를 들면, 폴리펩타이드의 적어도 한 국면, 예컨대, 그 서열이 자연에 존재하는 국면과 다르게 인간의 손에 의해 조작되었을 때, 폴리펩타이드는 "엔지니어링된" 것으로 간주된다. 통상적인 관례이며, 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 엔지니어링된 세포의 자손은 실제 조작이 이전 엔티티에서 수행되었음에도 불구하고, 전형적으로 여전히 "엔지니어링된" 것으로 지칭된다.

[0529] 변이체 아미노산 또는 DNA 서열은 천연 또는 기준 서열에 대해, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97 %, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 이상 동일할 수 있다. 천연 서열과 돌연변이 서열 간의 상동성(퍼센트 동일성) 정도는 예를 들면, 월드 와이드 웹(예를 들면, 디폴트 설정의 BLASTp 또는 BLASTn)에서 이 목적을 위해 일반적으로 사용되는 무료 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 두 서열을 비교함으로써 결정할 수 있다.

[0530] 용어 "외인성"은 세포의 천연 공급원 이외의 세포 내에 존재하는 물질을 지칭한다. 본원에서 사용될 때 용어 "외인성"은, 세포 또는 유기체와 같은 생물학적 시스템에 인간의 손을 포함하는 과정에 의해 도입된 핵산(예컨대, 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산) 또는 폴리펩타이드를 지칭할 수 있고, 여기서 상기 핵산 또는 폴리펩타이드는 일반적으로 발견되지 않고, 핵산 또는 폴리펩타이드를 그러한 세포 또는 유기체에 도입하고자 하는 것이다. 대안적으로, "외인성"은 세포 또는 유기체와 같은 생물학적 시스템에 인간의 손을 포함하는 과정에 의해 도입된 핵산 또는 폴리펩타이드를 지칭할 수 있고, 여기서 상기 세포 또는 유기체는 상대적으로 적은 양으로 발견되고, 예컨대, 이소성 발현 또는 수준을 생성하기 위해 세포 또는 유기체에서 핵산 또는 폴리펩타이드의 양을 증가시키고자 하는 것이다. 대조적으로, 용어 "내인성"은 생물학적 시스템 또는 세포에 대해 천연인 물질을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소성"은 비정상적인 위치 및/또는 양으로 발견되는 물질을 지칭한다. 이소성 물질은 소정의 세포에서 일반적으로 발견되지만, 양이 훨씬 적거나 및/또는 상이한 시간에 발견되는 물질일 수 있다. 이소성은 또한 소정의 세포 내에서 그의 천연 환경에서 자연적으로 발견되지 않거나 발현되지 않는 폴리펩타이드 또는 핵산과 같은 물질을 포함한다.

[0531] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는, 숙주 세포로의 전달을 위해, 또는 상이한 숙주 세포 간 이동을 위해 설계된 핵산 컨스트럭트를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성일 수 있다. 용어 "벡터"는 적절한 제어 요소와 연관될 때 복제할 수 있고 유전 서열을 세포로 이동할 수 있는 임의의 유전 요소를 포함한다. 벡터는 클로닝 벡터(cloning vector), 발현 벡터(expression vector), 플라스미드(plasmid), 파지(phage), 트랜스포존(transposon), 코스미드(cosmid), 염색체(artificial chromosome), 바이러스, 비리온(virion) 등을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0532] 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합이고, 예컨대, 백터는 적어도 2개의 상이한 공급원으로부터 유래하는 서열을 포함한다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 벡터는 적어도 2개의 상이한 종으로부터 유래하는 서열을 포함한다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 벡터는 적어도 2개의 상이한 유전자로부터 유래하는 서열을 포함하고, 예컨대, 벡터는 적어도 하나의 비-천연(예컨대, 이종) 유전적 제어 요소(예컨대, 프로모터, 억제자, 활성화제, 인핸서, 반응 요소 등)에 작동 가능하게 연결된 발현 산물을 암호화하는 융합 단백질 또는 핵산을 포함한다.

[0533] 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에 설명되는 벡터 또는 핵산은 코돈-최적화되고, 예컨대, 핵산 서열의 천연 또는 야생형 서열은 대체 코돈을 포함하기 위해 변경되거나 엔지니어링되었으므로, 변경되거나 엔지니어링

된 핵산은 천연/야생형 서열과 동일한 폴리펩타이드 발현 산물을 암호화하지만, 원하는 발현 시스템에서 개선된 효율로 전사 및/또는 번역될 것이다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 발현 시스템은 천연/야생형 서열의 공급원 이외의 유기체(또는 그러한 유기체에서 얻은 세포)이다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명되는 벡터 및/또는 핵산 서열은 포유동물 또는 포유류 세포, 예컨대, 마우스, 뮤린 세포, 또는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명되는 벡터 및/또는 핵산 서열은 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명되는 벡터 및/또는 핵산 서열은 효모 또는 효모 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명되는 벡터 및/또는 핵산 서열은 박테리아 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명되는 벡터 및/또는 핵산 서열은 대장균 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0534] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 벡터 상의 전사 조절 서열에 연결된 서열로부터 RNA 또는 폴리펩타이드의 발현을 유도하는 벡터를 지칭한다. 발현된 서열은 종종 세포와 이종이지만, 반드시 그렇지는 않다. 발현 벡터는 추가 요소를 포함할 수 있고, 예를 들면, 발현 벡터는 2개의 복제 시스템을 가질 수 있으므로, 2개의 유기체, 예를 들면 발현을 위한 인간 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에서 유지될 수 있다.

[0535] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는 바이러스 기원의 적어도 하나의 요소를 포함하고 바이러스 벡터 입자로 패키징될 수 있는 능력을 갖는 핵산 벡터 컨스트럭트를 지칭한다. 바이러스 벡터는 비필수 바이러스 유전자 대신에 본원에서 설명된 바와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 함유할 수 있다. 벡터 및/또는 입자는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 임의의 핵산을 세포로 이동하기 위한 목적으로 활용될 수 있다. 다수의 형태의 바이러스 벡터가 해당 기술 분야에 공지되어 있다. 본원에서 설명되는 바이러스 벡터의 비제한적인 예는 AAV 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 배큘로바이러스 벡터, 및 키메라 바이러스 벡터를 포함한다.

[0536] 본원에서 설명된 벡터는 일부 양태에서는 다른 적합한 조성물 및 치료법과 조합될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 일부 양태에서, 벡터는 에피솜이다. 적합한 에피솜 벡터의 사용은 관심 뉴클레오타이드를 대상체에서 높은 복제 수의 염색체외 DNA로 유지하고, 이렇게 함으로써 염색체 통합의 잠재적 효과를 제거하는 수 단을 제공한다.

[0537] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료", "치료하는", 또는 "호전(amelioration)"은 치료적 치료를 지칭하고, 여기서 목적은 질환 또는 장애, 예컨대, PD와 연관된 병태의 진행 또는 심각성을 역전하거나, 경감시키거나, 호전시키거나, 억제하거나, 둔화하거나 또는 멈추게 하는 것이다. 용어 "치료"는 병태, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 부작용 또는 증상을 감소시키거나 경감시키는 것을 포함하고, 예컨대, 대상체의 초기(즉, 투여 전) MDS-UPDRS 점수를 감소시키거나 안정화함으로써 평가된다. 치료는 일반적으로 하나 이상의 증상이나 임상 지표가 감소하면 "효과적"이다. 또는, 질환의 진행이 감소하거나 중단되면 치료가 "효과적"이다. 즉, "치료"는 증상이나 지표의 개선뿐아니라, 치료의 부재로 예상되는 것과 비교하여, 증상의 진행 또는 악화를 중단하거나 최소한 늦추는 것도 포함한다. 유익한 또는 원하는 임상 결과에는, 검출 가능 여부에 관계없이, 하나 이상의 증상(들)의 경감, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 병태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 호전 또는 일시적 완화, 차도(부분적이든 전체적이든), 및/또는 감소된 사망률이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 질환의 "치료"라는 용어는 질환의 증상 또는 부작용을 완화시키는 것(일시적 완화 치료를 포함함)도 포함한다.

[0538] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약제학적 조성물"이라는 용어는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들면, 제약 산업에서 일반적으로 사용되는 담체와 조합된 활성제를 의미한다. 어구 "약제학적으로 허용되는"은, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 등이 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 합리적인 이익/위험 비율에 부합하는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 본원에서 채용된다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 물 이외의 담체일 수 있다. 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 크림, 에멀젼, 겔, 리포좀, 나노입자 및/또는 연고일 수 있다. 임의의 국면의 일부 양태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 인공 또는 엔지니어링된 담체, 예를 들면, 활성 성분이 자연에서 발생하는 것으로 발견되지 않는 담체일 수 있다.

[0539] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "투여하는"은 원하는 부위에 제제의 적어도 부분 전달을 초래하는 방법 또

는 경로에 의해 본원에서 개시된 바와 같은 화합물을 대상체 안에 넣는 것을 지칭한다. 본원에 개시된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 대상체에서 유효한 치료를 초래하는 임의의 적당한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여는 인간 신체 활동, 예를 들어, 주입, 섭취 행위, 적용 행위, 및/또는 전달 디바이스 또는 기계의 조작을 포함한다. 그러한 활동은 의학 전문가 및/또는 치료받는 대상체에 의해 수행될 수 있다.

[0540] 본원에서 사용되는 바와 같이, "접촉하는" 또는 "도입하는"은 제제를 적어도 하나의 세포에 전달하거나, 또는 노출시키기 위한 임의의 적합한 수단을 지칭한다. 예시적인 전달 방법은 세포 배양 배지에 직접 전달, 관류, 주사, 또는 통상의 기술자에게 잘 알려진 다른 전달 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 접촉하는 것은 인간 실체 활동, 예를 들어, 주입; 분배, 혼합, 및/또는 디캔팅(decanting) 행위; 및/또는 전달 디바이스 또는 기계의 조작을 포함한다.

[0541] 본원에서 사용되는 바와 같이, "온(on)"이란 대상체에게 항-파킨슨 치료제(예컨대, 레보도파)가 투여되고, 대상체가 치료제에 대해 유익한 반응을 보이는 기간을 지칭한다.

[0542] 본원에서 사용되는 바와 같이, "오프(off)"란 대상체에게 항-파킨슨 치료제(예컨대, 레보도파)가 투여되지 않는 기간(예컨대, 최대 12시간), 또는 대상체에게 항-파킨슨 치료제(예컨대, 레보도파)가 투여되지만 치료제에 대해 낮은 유익한 반응을 보이는 기간을 지칭한다.

[0543] 본원에서 사용되는 바와 같이, "cDNA" 또는 "cDNA 분자"는, 관심있는 RNA 분자의 적어도 일부를 템플릿으로 사용하여 관심있는 RNA 분자에 어닐링하는 프라이머의 RNA-의존성 DNA 중합효소 또는 역전사효소-촉매 연장에 의해 합성되는 "상보적인 DNA"를 지칭한다(이 과정은 "역전사"로도 불린다). 합성된 cDNA 분자는 템플릿의 적어도 일부와 "상동"이거나, "염기쌍을 이루거나", "복합체를 형성"한다.

[0544] 용어 "통계적으로 유의미한" 또는 "유의미하게"는 통계적 유의성을 의미하고, 일반적으로 두 개의 표준 편차(2SD) 또는 그 이상의 차이를 의미한다.

[0545] 작동 실시예 또는 달리 표시된 경우를 제외하고, 본원에서 사용된 성분 또는 반응 조건의 양을 나타내는 모든 숫자는 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 퍼센티지와 관련하여 사용될 때, "약"이라는 용어는 ±1%를 의미할 수 있다.

[0546] 본원에서 사용되는 바와 같이, "포함하는"이라는 용어는 제시된 정의된 요소 외에 다른 요소도 존재할 수 있음을 의미한다. "포함하는"의 사용은 제한이 아니라 포함을 나타낸다.

[0547] 용어 "~으로 이루어지는"은, 본원에 설명된 바와 같은 조성물, 방법 및 이들의 각각의 성분을 지칭하며, 그 실시형태의 설명에서 언급되지 않은 임의의 요소를 배제한다.

[0548] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "본질적으로 이루어지는"은, 특정 실시형태에 필요한 요소를 지칭한다. 상기 용어는 본원에서 설명된 기술의 해당 실시형태의 기본적이고 신규한 또는 기능적 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 추가 요소의 존재를 가능하게 한다.

[0549] 본원에서 사용되는 바와 같이, "대응하는"이라는 용어는 제1 폴리펩타이드 또는 핵산의 열거된 위치에 있는 아미노산 또는 뉴클레오타이드, 또는 제2 폴리펩타이드 또는 핵산의 열거된 아미노산 또는 뉴클레오타이드와 동등한 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 동등한 열거된 아미노산 또는 뉴클레오타이드는 해당 기술 분야에 알려져 있는 상동성 프로그램, 예컨대, BLAST를 사용하여 후보 서열의 정렬에 의해 결정될 수 있다.

[0550] 본원에서 사용되는 용어 "특이적 결합"은 2개의 분자, 화합물, 세포 및/또는 입자 사이의 화학적 상호작용을 지칭하고, 여기서 제1 엔티티는 비-표적인 제3 엔티티에 결합하는 경우보다, 더 큰 특이도 및 친화성으로 제2 표적 엔티티에 결합한다. 일부 양태에서, 특이적 결합은 제3 비-표적 엔티티에 대한 친화성보다 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배, 적어도 1000배 또는 그 이상인 제2 표적 엔티티에 대한 제1 엔티티의 친화성을 의미할 수 있다. 주어진 표적에 특이적인 시약이란, 사용되는 어세이 조건 하에서 해당 표적에 대해 특이적인 결합을 나타내는 시약이다.

[0551] 단수 용어 "하나의(a)", "하나의(an)", 및 "그(the)"는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수 지시 대상을 포함한다. 유사하게, "또는"이라는 단어는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, "그리고"를 포함하도록 의도되었다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 개시 내용의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에 기술되어 있다. "e.g."라는 약어는 라틴어 exempli gratia에서 파생되었으며 비제한적인 예를 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 따라서, 약어 "e.g."는 용어 "예를 들어(for

example)"와 동의어이다.

[0552] 본원에 개시된 본 기술의 대안적 요소 또는 실시형태의 그룹화는 제한으로 해석되어서는 안 된다. 각 그룹 멤버는 개별적으로 또는 본원의 그룹의 다른 멤버 또는 다른 요소와 임의로 조합하여 참조 및 청구될 수 있다. 편의성 및/또는 특허 가능성을 이유로 그룹의 하나 이상의 멤버가 그룹에 포함되거나 그룹에서 삭제될 수 있다. 이러한 포함 또는 삭제가 발생할 경우, 명세서는 첨부된 청구범위에 사용된 모든 마쿠시(Markush) 그룹의 기재된 설명을 충족하도록 수정된 그룹을 포함하는 것으로 간주된다.

[0553] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 출원과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 본 개시가 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 본 기술은 본원에 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약 등에 제한되지 않으며, 따라서 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시형태를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 기술의 범위를 한정하려는 의도가 아니며, 본 기술은 청구범위에 의해서만 정의된다. 면역학 및 분자 생물학에서 일반적인 용어의 정의는, 문헌 [The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 20th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2018 (ISBN 978-0-0911910190-978-0911910421)]; 문헌 [Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)]; 및 문헌 [Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]; 문헌 [Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006]; 문헌 [Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), W. W. Norton & Company, 2016 (ISBN 0815345054, 978-0815345053)]; 문헌 [Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055)]; 문헌 [Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414)]; 문헌 [Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X)]; 문헌 [Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542)]; 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005]; 및 문헌 [Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)], WO 2018/057855A, US 10,457,940에서 찾을 수 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0554] 임의의 국면의 일부 실시형태에서, 본원에서 설명된 본 개시는 인간을 복제하는 과정, 인간의 생식 계열 유전적 정체성을 수정하는 과정, 산업적 또는 상업적 목적으로의 인간 배아의 사용, 또는 인간이나 동물에게 어떠한 실질적인 의학적 이익 없이 고통을 야기할 가능성이 있는 동물의 유전적 정체성을 수정하는 과정, 및 또한 그러한 과정으로 생성된 동물에 관한 것이 아니다.

[0555] 다른 용어는 본원에서 설명된 기술의 다양한 국면의 설명 내에서 본원에서 정의된다.

[0556] 본 출원을 통해 인용되어 있는, 참고 문헌, 교부된 특허, 공개된 특허 출원, 및 동시 계속 중의 특허 출원을 포함하는 모든 특허 및 기타 간행물은 예를 들어 본원에서 설명되는 기술과 관련되어서 사용될 수 있는, 그러한 간행물 중에 기재된 방법론을 설명 및 개시하는 목적으로 참조에 의해 본원에 명확하게 포함된다. 이들 간행물은 본 출원의 출원일보다 전에 이들이 개시되었다는 이유만으로 제공된다. 이 점에 관한 어떠한 것도 본 발명자들이 선행 발명 또는 임의의 다른 이유로 그러한 개시를 선행하는 자격이 없는 것을 인정하는 것이라고 해석되어서는 안 된다. 날짜에 관한 모든 기재 또는 이들의 문서 내용에 관한 표현은 본 출원인에게 이용 가능한 정보에 기반하여 있고, 날짜의 정확함 또는 이들 문서 내용에 관해 어떠한 승인도 구성하지 않는다.

[0557] 본 개시의 실시형태의 설명은, 하나도 빠뜨리지 않거나 또는 개시된 정확한 형태로 본 개시를 한정하는 것으로 의도된 것이 아니다. 본 개시의 구체적인 실시형태, 및 본 개시에 대한 예가, 예시 목적으로 본원에 기재되어 있으나, 관련된 기술 분야의 통상의 기술자가 인식하는 바와 같이, 본 개시의 범위 내에서 다양한 등가의 수정이 가능하다. 예를 들면 방법의 단계들 또는 기능들은 주어진 순서로 제시되나, 대체적인 실시형태는 다른 순서로 기능을 수행할 수도 있으며, 또는 기능들은 실질적으로 동시에 수행될 수도 있다. 본원에 있어서 제공되는 본 개시의 교시는 필요에 따라 다른 순서 또는 방법에 적용할 수 있다. 본원에 있어서 기재되는 다양한 실시형태를 조합하여 새로운 실시형태를 제공할 수 있다. 본 개시의 국면을 필요하면 상술한 참고 문헌들 및 출

원들의 조성, 기능 및 개념을 채택하도록 수정하여 본 개시의 추가의 실시형태를 제공할 수 있다. 이들 및 기타 변경을 상세한 설명에 비추어 본 개시에 더할 수 있다. 그러한 수정은 모두 첨부의 특허청구범위 안에 포함되는 것이 의도된다.

[0558] 전술한 실시형태 중 하나의 구체적 요소는 다른 실시형태의 요소와 조합하거나, 또는 그것과 치환할 수 있다. 또한, 본 개시의 어느 특정의 실시형태와 연관된 이점이 이들의 실시형태와의 관련으로 설명되어 있으나, 다른 실시형태도 또한 그러한 이점을 나타내는 경우가 있고, 반드시 모든 실시형태가 본 개시의 범위 내에 들어가도록 그러한 이점을 나타낼 필요는 없다.

[0559] 본원에 있어서 설명되는 기술을 이하의 실시예에 의해 추가로 예시하나, 이들의 실시예는 결코 새로운 한정으로서 해석되어서는 안된다.

[0560] 본원에서 설명된 기술은 다음의 번호로 매겨진 단락에 추가로 설명될 수 있다.

[0561] 1. 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0562] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 핵산으로 형질전환되고 및/또는 여기서 대상체의 피각 부피의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버되고,

[0563] 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 증가를 나타내지 않는 것인, 방법. 해당 기술 분야에 알려져 있는 바와 같이, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 GDNF를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 AAV를 사용하여, 여기에, 그리고 다음 단락에 개시된 다양한 방법을 수행하기 위한 약제를 준비할 수 있다.

[0564] 2. 단락 1에 있어서, 상기 rAAV는 전신 도입을 통해 도입되는 것인, 방법.

[0565] 3. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 국소 도입을 통해 도입되는 것인, 방법.

[0566] 4. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 국소 도입은 대상체의 피각에의 직접 도입인 것인, 방법.

[0567] 5. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 국소 도입은 대상체의 피각 각각에 상기 rAAV를 직접 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

[0568] 6. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 국소 도입은 비-침습적 영상화와 동시에 수행되는 것인, 방법.

[0569] 7. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 비-침습적 영상화는 수술 중 자기공명영상(iMRI) 유도 대류 증강 전달(CED), 초음파, 컴퓨터 단층촬영(CT), 기능성 자기공명영상(fMRI), 양전자 방출 단층촬영(PET), 뇌파 검사(EEG), 자기 뇌파 검사(MEG), 기능성 근적외선 분광법(fNIRS); 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

[0570] 8. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 국소 도입은 수술 중 자기공명영상(iMRI) 유도 대류 증강 전달(CED)을 통해 각각의 피각에 rAAV 벡터의 약 절반을 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

[0571] 9. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 국소 도입은 상기 AAV 벡터와 실질적으로 동시에 MRI 조영제를 도입하는 것을 더 포함하는 것인, 방법.

[0572] 10. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 MRI 조영제는 가도테리돌인 것인, 방법.

[0573] 11. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 MRI 조영제는 상기 rAAV와 동일한 조성물로 대상체에 도입되는 것인, 방법.

[0574] 12. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 MRI 조영제는 상기 rAAV와 상이한 조성물로 대상체에 도입되는 것인, 방법.

[0575] 13. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 전신 도입을 통해 도입되는 것인, 방법.

[0576] 14. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 피각의 형질도입 및/또는 커버리지는 자기공명영상을 통해 평가되는 것인, 방법.

[0577] 15. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체의 피각의 부피의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상은 상기 GDNF 이식유전자로 형질전환되는 것인, 방법.

[0578] 16. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 12개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0579] 17. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 이상 동안 PD-연관 증상의 감소를 나타내는 것인, 방법.

[0580] 18. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 12개월 이상 동안 PD-연관 증상의 감소를 나타내는 것인, 방법.

[0581] 19. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 전에, 32 미만의 초기 운동 장애 학회-통합 파킨슨병 평가 척도(MDS-UPDRS) 점수를 갖는 것인, 방법.

[0582] 20. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 6개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 실질적으로 더 높지 않은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

[0583] 21. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 12개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 실질적으로 더 높지 않은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

[0584] 22. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 전에, 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖는 것인, 방법.

[0585] 23. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 나타내는 것인, 방법.

[0586] 24. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 6개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 낮은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

[0587] 25. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체에서 파킨슨병의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 직후 약 12개월 후의 제2 MDS-UPDRS 점수가 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 30% 더 낮은 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

[0588] 26. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 결정하는 것을 더 포함하는, 방법.

[0589] 27. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입 전에 대상체에 대한 초기 MDS-UPDRS 점수를 제공하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함하는, 방법.

[0590] 28. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 후 초기 MDS-UPDRS 점수의 감소를 특징으로 하는 것인, 방법.

[0591] 29. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 감소는 도입 후 6개월 후에 초기 MDS-UPDRS 점수의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 감소인 것인, 방법.

[0592] 30. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 감소는 도입 후 12개월 후에 초기 MDS-UPDRS 점수의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 감소인 것인, 방법.

[0593] 31. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 것은 도입 후 초기 MDS-UPDRS 점수의 안정화를 특징으로 하는 것인, 방법.

[0594] 32. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소를 특징으로 하는 것인, 방법.

[0595] 33. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 안정화는 적어도 6개월 이상 동안 발생하는 것인, 방법.

[0596] 34. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것인, 방법.

[0597] 35. 임의의 선행하는 단락에 있어서, PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 미만의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 도입 전 5년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었던 것인, 방법.

[0598] 36. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것으로 진단하는 것을 더 포함하는, 방법.

[0599] 37. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 경도로 영향을 받는 것으로 진단하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함하는, 방법.

[0600] 38. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것인, 방법.

[0601] 39. 임의의 선행하는 단락에 있어서, PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체는 rAAV의 도입 전에 32 이상의 초기 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 도입 전 4년 미만 내에 PD를 갖는 것으로 진단되었던 것인, 방법.

[0602] 40. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것으로 진단하는 것을 더 포함하는, 방법.

[0603] 41. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입 전에, 대상체가 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 것으로 진단하는 분석의 결과를 수신하는 것을 더 포함하는, 방법.

[0604] 42. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 프로모터는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터인 것인, 방법.

[0605] 43. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 프로모터는 신경계(NS) 또는 중추신경계(CNS) 특이적 프로모터인 것인, 방법.

[0606] 44. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 NS 특이적 프로모터는 표 1의 NS 특이적 프로모터에서 선택되는 것인, 방법.

[0607] 45. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 CNS 특이적 프로모터는 표 2의 CNS 특이적 프로모터에서 선택되는 것인, 방법.

[0608] 46. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 핵산은 서열 번호: 1의 서열, 또는 서열 번호: 1에 대해 적어도 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 또는 그 이상 동일한 기능적 변이체를 포함하는 것인, 방법.

[0609] 47. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, 또는 그의 합리적 반수체인 것인, 방법.

[0610] 48. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 AAV2인 것인, 방법.

[0611] 49. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 뇌-특이적 친화성을 나타내는 것인, 방법.

[0612] 50. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 그의 뇌-특이적 친화성을 증가시키는 변형을 포함하는 것인, 방법.

[0613] 51. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 뇌-특이적 친화성은 비변형된 AAV와 비교하여 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상만큼 증가되는 것인, 방법.

[0614] 52. 임의의 선행하는 단락에 있어서, rAAV는 $5x10^{12}$ vg 내지 약 $1.5x10^{13}$ vg의 범위 내의 총 용량으로 도입되는 것인, 방법.

[0615] 53. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 총 용량의 약 절반은 대상체의 피각 각각에 투여되는 것인, 방법.

[0616] 54. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 도입은 약 1μL/min 내지 약 30μL/min의 유량으로 수행되는 것인, 방법.

[0617] 55. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 rAAV는 rAAV 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 액체 조성물로서 도입되는 것인, 방법.

[0618] 56. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 액체 조성물은 약 $3x10^{12}$ vg/mL 내지 약 $4x10^{12}$vg/mL의 rAAV 농도를 갖는 것인, 방법.

[0619] 57. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 상기 rAAV의 도입 전에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는 것인, 방법.

[0620] 58. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 상기 rAAV의 도입 전에, 그리고 도입 후에 적어도 하나의 항-PD 치료제를 투여받는 것인, 방법.

[0621] 59. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 적어도 하나의 항-PD 치료제는 레보도파, 시네메트, 리타리, 스타레보, 아만타딘, 프라미펙솔, 로티고틴, 로피니롤, 아포모르핀, 엔타카폰으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

[0622] 60. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 후 적어도 하나의 항-PD 치료제의 용량을 유지하거나 감소시키는 것인, 방법.

[0623] 61. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 적어도 하나의 항-PD 치료제의 용량은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 그 이상만큼 감소되는 것인, 방법.

[0624] 62. 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0625] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각에 국소적으로 도입하는 것을 포함하고,

[0626] 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 GDNF 유전자로 형질전환되는 것인, 방법.

[0627] 63. 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0628] 대상체의 피각의 부피의 약 30% 이상을 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자로 형질전환하는 것을 포함하고,

[0629] 여기서 대상체는 형질전환 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0630] 64. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 형질전환은 GDNF 유전자를 포함하는 rAAV를 대상체의 피각 각각에 투여함으로써 수행되는 것인, 방법.

[0631] 65. 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0632] 대상체의 피각의 부피의 약 30% 이상을 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자로 커버하는 것을 포함하고,

[0633] 여기서 대상체는 커버 후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0634] 66. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 형질전환은 GDNF 유전자를 포함하는 rAAV를 대상체의 피각 각각에 투여함으로써 수행되는 것인, 방법.

[0635] 67. 파킨슨병(PD)을 갖고 있는 대상체에서 초기 운동 장애 학회-통합 파킨슨병의 평가 척도 파트(MDS-UPDRS) 점수를 감소시키거나 안정화하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0636] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각에 투여하는 것을 포함하고,

[0637] 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 투여 전의 대상체의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 감소되거나 안정화된 것인, 방법.

[0638] 68. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 투여 전에, 대상체로부터 초기 MDS-UPDRS 점수를 획득하거나 수신하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0639] 69. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 제2 MDS-UPDRS 점수는 투여 후 12개월 후의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상만큼 감소된 것인, 방법.

[0640] 70. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소인 것인, 방법.

[0641] 71. 파킨슨병(PD)에 의해 경도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0642] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하고,

[0643] 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 GDNF로 형질전환되고,

[0644] 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것인, 방법.

[0645] 72. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 투여 후 12개월째에 MDS-UPDRS 점수를 가지며, 이는 투여 전의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것인, 방법.

[0646] 73. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소인 것인, 방법.

[0647] 74. 파킨슨병(PD)에 의해 경도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0648] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하고,

[0649] 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 rAAV에 의해 커버되고,

[0650] 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것인, 방법.

[0651] 75. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 투여 후 12개월째에 MDS-UPDRS 점수를 가지며, 이는 투여 전의 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 안정화된 것인, 방법.

[0652] 76. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 안정화는 초기 MDS-UPDRS 점수의 10% 이하의 증가 또는 감소인 것인, 방법.

[0653] 77. 파킨슨병(PD)에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0654] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하고,

[0655] 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 핵산으로 형질전환되고,

[0656] 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 감소되는 것인, 방법.

[0657] 78. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 감소는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상인 것인, 방법.

[0658] 79. 파킨슨병(PD)에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0659] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 대상체의 피각 각각에 투여하는 것을 포함하고,

[0660] 여기서 대상체의 피각의 적어도 30%는 rAAV로 커버되고,

[0661] 여기서 대상체는 투여 후 6개월째에 제2 MDS-UPDRS 점수를 갖고, 이는 초기 MDS-UPDRS 점수보다 적어도 약 20% 더 감소되는 것인, 방법.

[0662] 80. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 감소는 초기 MDS-UPDRS 점수와 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상인 것인, 방법.

[0663] 81. 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0664] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각 각각에 국소적으로 도입하는 것; 및

[0665] rAAV와 실질적으로 동시에 대상체의 피각 각각에 MRI 조영제를 국소적으로 도입하는 것을 포함하고,

[0666] 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 핵산으로 형질전환되고,

[0667] 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0668] 82. 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0669] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 대상체의 피각 각각에 국소적으로 도입하는 것; 및

[0670] rAAV와 실질적으로 동시에 대상체의 피각 각각에 MRI 조영제를 국소적으로 도입하는 것을 포함하고,

[0671] 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 rAAV로 커버되고,

[0672] 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0673] 83. 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0674] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 핵산으로 형질전환되고,

[0675] 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0676] 84. 이를 필요로 하는 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0677] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 대상체에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 대상체의 피각의 부피의 적어도 30%는 rAAV로 커버되고,

[0678] 여기서 대상체는 도입 전과 비교하여 도입 직후 적어도 6개월 동안 PD-연관 증상의 실질적인 증가를 나타내지 않는 것인, 방법.

[0679] 85. 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은:

[0680] 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자를 포함하는 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV); 및

[0681] 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것인, 조성물.

[0682] 86. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 조성물은 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg의 rAAV 농도를 갖는 것인, 조성물.

[0683] 87. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 상기 조성물은 1mL 당 $3.3x10^{12}$ vg의 rAAV 농도를 갖는 것인, 조성물.

[0684] 88. 대상체에서 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하기 위한 제형제로서, 상기 제형제는: 약제학적으로 허용 가능한 담체 1mL 당 $3x10^{12}$ vg 내지 $4x10^{12}$ vg 의 농도로 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함하고,

[0685] 여기서 rAAV는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF) 유전자를 포함하는 게놈을 포함하는 것인, 제형제.

[0686] 89. 임의의 선행하는 단락에 있어서, 대상체는 도입 또는 투여 직후 적어도 6개월 동안 어떠한 심각한 부작용도 나타내지 않는 것인, 방법.

[0687] 90. 파킨슨병(PD)의 진행을 늦추거나 억제하거나, 또는 이를 필요로 하는 대상체에서 PD의 진행을 안정화하거나, 또는 PD에 의해 경도로 또는 중등도로 영향을 받는 대상체를 치료하는 방법을 위한 약제의 제조에서의, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 신경교세포주-유래 신경영양 인자(GDNF)를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 용도로서, 단락 1 내지 단락 84 및 단락 89의 방법을 포함하는, 용도.

[0688] **실시예**

[0689] ***실시예 1—CMV 프로모터에 작동 가능하게 연결된 GDNF 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터의 생성.***

[0690] *부착성 HEK293 적격 마스터 세포 은행으로부터 현탁 HEK293 세포의 유도.*

[0691] 모체 HEK293 마스터 세포 은행(MCB)으로부터 현탁 세포주의 유도는 클래스 10,000 클린룸 시설에서 수행된다.

현탁 세포주의 유도는 먼저 소 혈청을 함유하는 배지에서 세포를 떼어내고, 이어서 HEK293 세포와 호환되는 무혈청 현탁 배지에 세포를 적응시키는 2단계 과정으로 수행된다. 현탁 세포주는 다음과 같이 생성된다. 먼저, 적격 마스터 세포 은행(MCB)의 바이알을 해동하여 10%의 태아 소 혈청(FBS)을 함유하는 DMEM 배지에 위치시키고, 며칠 동안 배양하여 세포가 동결/해동 사이클에서 회복될 수 있도록 했다. MCB 세포를 4주 동안 배양 및 계대시키면서 조직 배양 배지의 FBS의 양을 10%에서 2.5%로 점차 감소시켰다. 이어서 세포를 DMEM 2.5% FBS로부터 무혈청 현탁 배지로 옮기고, 쉐이커 플라스크에서 성장시켰다. 이어서 세포를 무혈청 배지에서 3주 동안 배양하면서 성장 속도 및 생존율을 모니터링했다. 이어서 적응된 세포를 확장하고 동결했다. 이후 이 세포 은행의 다수의 바이알을 해동하고 공정 개발 연구 동안 사용하여, 쉐이커 플라스크와 웨이브 생물 반응기 시스템을 사용하여 확장 가능한 제조 공정을 만들어 rAAV 벡터를 생성했다. 현탁 HEK293 세포를 쉐이커 플라스크와 웨이브 생물 반응기 백에서 성장과 높은 형질감염 효율 둘 모두를 지원하는 무혈청 현탁 배지에서 배양했다. 멀티트론 쉐이커 인큐베이터(ATR)는 특정 rpm 쉐이킹 속도(세포 배양량 기준), 80% 습도, 및 5% CO_2에서 세포의 유지 및 rAAV 벡터의 생성에 사용된다.

[0692] *현탁 HEK293 세포의 형질감염.*

[0693] 형질감염 당일, ViCell XR 생존율 분석기(Beckman Coulter)를 사용하여 세포 수를 측정하고, 형질감염을 위해 희석했다. 형질감염 칵테일을 혼합하기 위해 다음 시약을 원뿔형 관에 순서대로 첨가했다: 플라스미드 DNA, OPTIMEM® I(Gibco) 또는 OptiPro SFM(Gibco), 또는 기타 무혈청 호환성 형질감염 배지, 및 이어서 플라스미드 DNA에 특정 비율로 형질감염 시약. 플라스미드 DNA는 CMV 프로모터에 작동 가능하게 연결된 GDNF 유전자(즉, GDNF(서열 번호: 1)를 암호화하는 핵산 서열)의 이종 핵산 서열을 포함하는 서열을 갖는다. 칵테일은 Rep2와 혈청형-특이적 Cap2: AAV-Rep/Cap을 암호화하는 패키징 플라스미드, 및 Ad-헬퍼 플라스미드(XX680: 아데노바이러스 헬퍼 서열을 암호화함)를 더 포함한다. 칵테일은 실온에서 배양하기 전에 역으로 혼합했다. 이어서 형질감염 칵테일을 플라스크에 피펫팅하고, 쉐이커/배양기에 다시 위치시켰다. 모든 최적화 연구는 30mL 배양량으로 수행한 후, 더 큰 배양량에서 검증했다. 세포를 형질감염 후 48시간 후에 채취했다.

[0694] *웨이브 생물 반응기 시스템을 사용한 rAAV 생산.*

[0695] 웨이브 백은 형질감염 2일 전에 시딩(seed)했다. 웨이브 백을 시딩한 후 2일 후에, 세포 배양 수를 측정하고 이어서 형질감염 전에 세포 배양물을 확장/희석했다. 이어서 웨이브 생물 반응기 세포 배양물을 형질감염시켰다. 세포 배양물은 유도 후 적어도 48시간째에 웨이브 생물 반응기 백으로부터 채취했다.

[0696] *유세포 분석을 사용하여 형질감염 효율 분석.*

[0697] 유도 후 대략 24시간 후에, 각각의 플라스크 또는 웨이브 생물 반응기 백으로부터 1mL의 세포 배양물을 제거하고, 뿐만 아니라 유도되지 않은 대조군도 제거했다. 샘플을 Dako Cyan 유세포 분석을 사용하여 분석하여 플라스미드 DNA를 확인했다.

[0698] *쉐이커 플라스크와 웨이브 생물 반응기 백으로부터 현탁 세포 채취.*

[0699] 유도 후 48시간 후에, 세포 배양물을 쉐이커 플라스크에서 따르거나 웨이브 생물 반응기 백에서 펌핑하여 500mL 폴리프로필렌 원뿔형 관(Corning)에 수집했다. 이어서 세포 배양물을 Sorvall RC3C 및 원심분리기와 H6000A 로터를 사용하여 655 x g로 10분 동안 원심분리했다. 상층액은 버리고, 세포를 1X PBS에 재현탁시키고, 50mL 원뿔형 관으로 옮기고, 655 x g로 10분 동안 원심분리했다. 이 시점에서, 펠렛을 NLT-60℃에 보관하거나 정제를 계속할 수 있다.

[0700] *qPCR을 사용하여 세포 용해물로부터 rAAV를 적정.*

[0701] 10mL의 세포 배양물을 제거하고 Sorvall RC3C 및 원심분리기와 H6000A 로터를 사용하여 655 x g로 10분 동안 원심분리했다. 상층액을 세포 펠렛으로부터 디캔팅했다. 이어서 세포 펠렛을 5mL의 DNase 완충액(5mM $CaCl_2$, 5mM $MgCl_2$, 50mM Tris-HCl pH 8.0)에 재현탁시킨 후, 소니케이션에 의해 세포를 효율적으로 용해시켰다. 이어서 300ul를 제거하고 1.5mL 마이크로퓨지 관에 위치시켰다. 이어서 140유닛의 DNase I를 각각의 샘플에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양했다. DNase 소화의 효과를 확인하기 위해, 4 내지 5ug의 플라스미드 DNA를 DNase를 첨가하거나 첨가하지 않은 비형질감염 세포 용해물에 스파이크했다. 이어서 50ul의 EDTA/사르코실 용액(6.3% 사르코실, 62.5mM EDTA pH 8.0)을 각각의 관에 첨가하고 70℃에서 20분 동안 배양했다. 이어서 50ul의 프로테이나아제 K(10mg/mL)를 첨가하고 55℃에서 적어도 2시간 동안 배양했다. 이어서 샘플을 15분간 끓여서

프로테이나아제 K를 비활성화했다. 각각의 샘플로부터 분취액을 제거하여 qPCR로 분석했다. 세포 당 생성되는 rAAV 벡터의 양을 효과적으로 결정하기 위해 2회의 qPCR 반응을 수행했다.

[0702] *크루드 용해물로부터 rAAV의 정제.*

[0703] 각각의 세포 알갱이를 10mL의 최종 부피로 조정했다. 펠렛을 짧게 볼텍스하고, 1초 켜짐, 1초 꺼짐의 분출로 30% 출력에서 4분 동안 소니케이팅했다. 소니케이션 후에, 550U의 DNase를 첨가하고 37℃에서 45분 동안 배양했다. 이어서 세포 파편을 펠렛화하기 위해 Sorvall RCSB 원심분리기와 HS-4 로터를 사용하여 9400 x g로 펠렛을 원심분리하고, 정화된 용해물을 Type70Ti 원심분리기 관(Beckman 361625)으로 옮겼다. rAAV의 단리를 위해 현탁 HEK293 세포를 채취하고 용해하는 것과 관련하여, 통상의 기술자는 미세유체화와 같은 기계적 방법, 또는 세제 등과 같은 화학적 방법을 사용한 후에, 깊이 여과 또는 접선 유동 여과(Tangential Flow Filtration, TFF)를 사용하여 정화 단계를 수행할 수 있다.

[0704] *AAV 벡터 정제.*

[0705] 정화된 AAV 용해물을 통상의 기술자가 숙지할 수 있는 컬럼 크로마토그래피 방법에 의해 정제하고, 이는 다음 논문(Allay et al., Davidoff et al., Kaludov et al., Zolotukhin et al., Zolotukin et al, etc)에 설명되어 있다.

[0706] *도트 블롯을 사용하여 rAAV 적정.*

[0707] 96웰 마이크로타이터 플레이트의 각각의 웰에 100ul의 DNase 완충액(140유닛 DNase, 5mM $CaCl_2$, 5mM $MgCl_2$, 50mM Tris-HCl pH 8.0)을 첨가했다. 1-3ul 또는 연속 희석된 바이러스를 각각의 웰에 첨가하고 37℃에서 30분 동안 배양했다. 이어서 샘플을 15ul 사르코실/EDTA 용액(6.3% 사르코실, 62.5mM EDTA pH 8.0)으로 보충하고, 70℃에서 20분 동안 위치시켰다. 다음으로, 15ul의 프로테이나아제 K(10mg/mL)를 첨가하고 50℃에서 적어도 2시간 동안 배양했다. 125ul의 NaOH 완충액(80mM NaOH, 4mM EDTA pH 8.0)을 각각의 웰에 첨가했다. 일련의 희석을 통해 일련의 이식유전자 특이적 표준을 생성했다. 이어서 NaOH 완충액을 첨가하고 배양했다. 나일론 막을 RT에서 0.4M 트리스-HCl, pH 7.5로 배양하고, 이어서 도트 블롯 장치 상에 설치했다. NaOH 완충액에서 10 내지 15분 배양한 후에, 샘플과 표준을 도트 블롯 장치에 로딩하여 GeneScreen PlusR 혼성화 전달 막(PerkinElmer)에 옮겼다. 이어서 진공을 사용하여 샘플을 막에 적용했다. 나일론 막을 0.4M Tris-HCl, pH 7.5에 소킹하고, 이어서 UV 스트라타 링커 1800(Stratagene)을 사용하여 600 ujouls x 100으로 교차 연결했다. 이어서 막을 CHURCH 완충액(1% BSA, 7% SDS, 1mM EDTA, 0.5M Na_3PO_4, pH 7.5)에서 사전 혼성화했다. 사전 혼성화 후에, 막을 ^{32}P-CTP 표지된 이식유전자 프로브(Roche Random Prime DNA 라벨링 키트)로 하룻밤 동안 혼성화했다. 다음 날, 막을 저강력 SSC 완충액(1xSSC, 0.1% SDS) 및 고강력(0.1xSSC, 0.1% SDS)으로 세척했다. 이어서 이것을 인광 이미저 스크린에 노출하고 STORM840 스캐너(GE)를 사용하여 밀도 측정을 위해 분석했다.

[0708] *은 염색법을 사용하여 rAAV 벡터 순도를 분석.*

[0709] 정제된 벡터의 샘플을 NuPage 10% Bis-Tris 젤(인비트로젠)에 로딩하고, 1x NuPage 전개 완충액을 사용하여 전개시켰다. 전형적으로, 웰 당 1 x 10^{10} 입자를 로딩했다. 젤을 SilverXpress 실버 염색 키트 #LC6100(인비트로젠)으로 처리했다.

[0710] *알칼리성 겔 전기영동과 서던 블롯을 사용한 자가-상보적 게놈 분석.*

[0711] 간단하게, 정제된 자가-상보적 rAAV를 200ul의 DNase I 완충액(140유닛 DNase, 5mM $CaCl_2$, 5mM $MgCl_2$, 50mM Tris-HCl pH 8.0)에 첨가하고 37℃에서 60분 동안 배양한 후에, 30ul의 EDTA 사르코실/EDTA 용액션(6.3% 사르코실, 62.5mM EDTA pH 8.0)을 첨가하여 DNase를 비활성화하고 70℃에서 20분 동안 위치시켰다. 이어서 20ul의 프로테이나아제 K(10mg/mL)를 샘플에 첨가하고 최소 2시간 동안 50℃에서 배양했다. 페놀/클로로포름을 1:1 비율로 첨가한 후, 바이러스 벡터 DNA를 에탄올로 침전시켰다. 이어서 펠렛화된 DNA를 변성을 위해 알칼리성 완충액(50mM NaOH, 1mM EDTA)에 재현탁하고, 1% 알칼리성 아가로스 젤에 로딩하고, 25V에서 하룻밤 동안 전개시켰다. 이어서 젤을 알칼리성 전이 완충액(0.4M NaOH, 1M NaCl)에서 평형화하고, 벡터 DNA를 GeneScreen PlusR 혼성화 전이 막(PerkinElmer)으로 하룻밤 동안 옮겨 서던 블롯을 수행했다. 이어서 막을 0.5M Tris pH 7.5와 1M NaCl을 사용하여 중화시키고, ^{32}P-CTP 표지된 이식유전자 프로브로 하룻밤 동안 혼성화했다. 이전에 설명한 바와 같이, 막을 세척한 후에, 막을 인광 이미저 스크린에 노출시키고 STORM840 스캐너를 사용하여 분석했다.

[0712] *형질도입 분석.*

[0713] HeLaRC-32 세포(Chadeuf *et al., J Gene Med.* 2:260 (2000))를 24 웰 플레이트의 $2x10^5$ 세포/웰에 플레이팅하고 37℃에서 하룻밤 동안 배양했다. 세포가 90-100% 융합되는 것으로 관찰되었다. 2% FBS, 1% 펜/스트렙이 포함된 50mL의 DMEM을 미리 가온하고, 아데노바이러스(d1309)를 10의 MOI에서 첨가했다. D1309 함유 배지를 900ul 분율로 분취하고, 일련의 10배 희석액으로 rAAV를 희석하는 데 사용했다. 이어서 rAAV를 400㎕에서 플레이팅하고, 48시간 동안 37℃에서 배양했다.

[0714] *농도 분석.*

[0715] 시작 벡터 스톡을 샘플링하여 비바스핀 컬럼에 로드하고, 10분 간격으로 470 x g(Sorvall H1000B)로 원심분리했다. 원하는 부피/농도에 도달하면, 막의 양면을 농축액으로 헹구고, 이어서 이를 채취했다. 물리적 역가와 형질도입 단위를 결정하기 위해 사전 농축된 rAAV 및 농축된 rAAV의 샘플을 채취했다.

[0716] *음성 염색된 rAAV 입자의 투과 전자 현미경 관찰(TEM).*

[0717] 전자 현미경은 바이러스 입자의 직접 시각화를 가능하게 한다. 정제된 투석된 rAAV 벡터를 20ul의 바이러스 방울에 그리드를 반전시켜 400메시 글로우-방전 탄소 그리드 상에 위치시켰다. 이어서 그리드를 20ul의 ddH_2O 방울에 반전시켜 2회 세척한 후, 20ul의 2% 우라닐 아세테이트 방울에 30초 동안 그리드를 반전시켰다. 그리드의 가장자리에 와트만지(Whatman paper)를 가볍게 터치하여 격자를 닦아냈다. 각각의 벡터를 Zeiss EM 910 전자 현미경을 사용하여 시각화했다.

[0718] ***실시예 2 - 파킨슨병의 치료를 위한 AAV2-GDNF의 국소 투여.***

[0719] GDNF는 도파민 신경세포의 생존을 지원하고 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 오랫동안 파킨슨병의 유력한 치료제로 평가되어 왔다. 비임상 연구는 GDNF를 뇌로 국소 전달하면 PD의 설치류 및 비인간 영장류 모델에서 도파민성 신경세포를 신경독성 공격으로부터 보호하고 해부학적 및 기능적 회복을 자극할 수 있다는 것을 입증했다(Kordower 2013).

[0720] 재조합 GDNF 단백질의 직접 투여는 1990년대 이후 다수의 임상 연구에서 조사되었다(Kordower 1999, Nutt 2003, Gill 2003, Slevin 2005, Lang 2006, Whone 2019). GDNF가 혈뇌장벽을 통과할 수 없기 때문에, 이러한 임상 조사에서는 뇌에 직접 GDNF를 지속적 또는 간헐적으로 전달하도록 의도된 이식형 디바이스를 활용했다. 현재까지, GDNF 단백질의 직접 전달은, GDNF 단백질의 피각내 직접 전달이 PD 환자에게 내약성이 우수함에도 불구하고, 위약 처리된 대조군과 비교하여 유의미한 임상적 이점을 입증하지 못했다. 그러나, 가장 최근의 연구에서 F-DOPA PET을 통해 피각 도파민 기능을 평가하는 신경 영상은, 간헐적 GDNF 투여를 받은 환자에서 활성이 유의미하게 회복된 것으로 나타났다(Whone 2019). 이 조사자들은 PET로 확인된 뇌 도파민 기능의 회복과 PD 임상적 특징의 임상적 호전 사이에는 잠재적인 시차가 있을 수 있으며, 9개월의 연구 평가 기간 외에, 더 긴 기간의 투약과 관찰이 필요하다고 제안했다.

[0721] 임상 시험용 제제를 뇌에 주입하기 위해 CED 방법론을 채택함으로써, 이전에 유체 확산에 의존하는 방법으로는 불가능했던 넓은 뇌 영역의 표적화가 가능해졌다(Christine 2019). CED는 역류-방지 전달 캐뉼라를 표적 조직에 정밀하게 배치하는 것을 수반하고, CED는 캐뉼라 끝 주변의 간질액을 대체하여, 단일 투여 절차 동안 비교적 큰 실질 부피에 걸쳐, AAV 벡터와 같은 주입액 내의 큰 분자를 안전하고 균일하게 분포시킬 수 있다(Richardson 2011). 실시간으로 CED를 모니터링하는 iMRI의 사용을 통해, 이전에 전달된 것보다 더 많은 양의 CED 주입 부피(50 내지 450㎕)를 전달하여 보다 효율적으로 피각 부피를 커버할 수 있었다.

[0722] 현재 조사를 위한 주입 부피(피각 당 최대 1.8mL)는 최근 다른 임상 PD 연구에서 안전하고 효과적으로 사용되었다(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03065192).

[0723] 비임상 연구는, 가도테리돌을 AAV2 벡터와 함께 투여한 MRI 시각화는 신경세포 유전자 전달을 조직학적으로 나타내는 실질 부피의 정확한 해부학적 표현을 제공하며, 전달된 조영제는 내재적인 국소 독성을 제공하지 않는다는 것을 입증했다(Su 2010, Richardson 2011). 따라서, 수술 중 MRI 모니터링은 수술 팀에게 약물 분포에 대한 실시간 피드백을 제공하고, 개별 환자의 해부학적 구조에 기초하여 CED를 맞춤화하여, 표적에 대한 전달을 극대화하는 동시에, 시각화된 역류 또는 주입액 누출로 인한 비표적 영역의 노출을 제한할 수 있는 기회를 제공한다.

[0724] 최근의 비임상 연구는 이전 연구에서 사용되었던 전통적인 정면 접근 방식에 필요한 다수의 궤적과는 반대로,

단일 궤적인 후두부 접근법(Bankiewicz 2016)을 사용하여 피각 내에서 보다 효과적인 분포가 가능하다는 것을 문서화했다. 후두부/정수리 접근법은 피각의 긴 축을 따라 단일 주입 궤적을 활용하며, 이전 PD 유전자 치료 시험에서 효과적으로 사용되었다(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03065192).

[0725] **파킨슨병에 대한 GDNF 유전자 전달**

[0726] 본원에서 설명되는 현재 연구는 PD의 질환-개질 치료로서 GDNF 유전자 전달을 조사한다. 연구 약물인 AAV2-GDNF는 거대세포바이러스 즉각 초기 프로모터(CMV)의 제어 하에 인간 GDNF의 상보적 서열을 암호화하는 DNA 발현 카세트를 함유하는 AAV 혈청형 2 벡터이다.

[0727] 용량-증량 안전성 연구에 대한 관찰 추적 조사는 NIH 임상 센터에서 진행 중이다(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01621581). 2013년부터 2017년까지 총 13명의 PD 환자가 동일한 연구 약물을 투여받았다. 피각 당 0.45mL의 주입 부피로 세 가지 농도의 연구 약물을 평가했다(1.0×10^{11}, 3.3×10^{11}, 및 1.0×10^{12} vg/mL). 이전 연구에서 달성된 평균 피각 커버리지는 총 피각 부피의 26%였다. 중간 분석에서 표시된 예상보다 낮은 커버리지로 인해, 13명의 치료 대상체를 대상으로 한 이 이전 연구는, 개선된 전달 옵션을 제공하기 위해 선택적 중단을 결정하게 되었다. 이전 연구 모집이 마감될 때까지, 승인되고 계획된 3.3×10^{12} vg/mL의 고용량은 인간을 대상으로 검사가 이루어지지 않았다. 13명의 P 연구 참가자들은 세 가지 용량(6명의 대상체는 각각 9×10^{10} vg/mL 및 3.3×10^{11} vg/mL 용량을 투여 받고; 1명의 대상체는 9×10^{11} vg/mL 용량을 투여받음)을 투여받은 결과, 연구 약물과 관련된 SAE는 없었으며, 피각에 연구 약물을 전두골경유-전달로 양측 주입하는 것이 실제로 안전하고 내약성이 우수하다는 증거를 제공했다. 피각 약물 전달 부위에 대한 F-DOPA PET 분석은, GDNF 효과의 가능성을 나타내는, 증가된 DA 활성을 나타냈다. 투여 후 6개월 및 18개월째에 기준선과 비교하여 F-DOPA 흡수의 증가가 관찰되었다(도 25a 내지 도 25d).

[0728] 본원에서 설명되는 현재 연구는 수술 중 MRI-유도 CED를 통해 연구 참여자에게 연구 약물을 주입하는 것을 특징으로 한다. 각각의 피각에 최대 1.8mL의 연구 약물을 피각 부피의 50 내지 80%까지 예상되는 분포로 주입했다. 연구 약물의 일회성 전달은, 주로 내재적 중간 가시 신경세포(MSN)를 형질전환하는, 피각 부피의 ≥50% 내에서 GDNF 단백질이 지속적으로 발현되도록 의도된 것이다. (직접 및 간접 경로를 통해) MSN으로부터 SN으로 연구 약물을 추가로 전방 수송하는 것은 SN 내의 도파민성 신경세포 체세포에 직접 GDNF 발현 및 영양 지원을 제공할 것이다.

[0729] 이 연구에서는 총 12명의 연구 참여자가 조사용 생성물(즉, AAV2-GDNF)을 투여받았다. 참가자들의 PD의 기간과 병기에 기초하여, 이들을 2개의 병렬 집단 중 하나에 등록했다. A 집단은 PD에 의해 경도로 영향을 받는 대상체를 포함하고(도 2), B 집단은 PD에 의해 중등도로 영향을 받는 대상체를 포함한다(도 3).

[0730] ***연구 포함 기준***

[0731] 1. 35 내지 75세 연령(포괄적임)의 성인 남성 및 여성으로 사전 동의를 제공할 수 있는 경우

[0732] 2. 특발성 PD 진단

[0733] a. 다음 임상 특징 중 적어도 3개: 휴식 시 떨림, 경직, 운동완만증, 자세 반사 장애

[0734] b. 상기 중 적어도 하나는 휴식 시 떨림 또는 운동완만증이어야 함

[0735] 상기 임상적 특징은 외상, 뇌종양, 감염, 뇌혈관 질환, 기타 알려진 신경성 질환(예컨대, 다계통 위축증, 진행성 핵상 마비, 선조체 변성, 헌팅턴병, 피질기저 증후군, 광범위 레비소체병(diffuse Lewy body disease), 윌슨병)으로 인한 것이 아니거나, PD 진단과 관련된 약물, 화학 물질 또는 독성에 의한 이차적인 것이 아니어야 한다.

[0736] 3. 수정된 호엔-야르 병기 I-III 약물 OFF

[0737] 4. 다음 중 하나와 일치하는 PD 및 질병 중증도에 대한 임상 진단을 받은 후의 시간:

[0738] 둘 중 하나: PD의 임상 진단 후 5년 미만 및 MDS-UPDRS III "OFF 상태" 운동 점수 ≤ 32(집단 A)

[0739] 또는: PD의 임상 진단 후 적어도 4년 및 MDS-UPDRS III "OFF 상태" 운동 점수 33 내지 60점(B 집단)

[0740] 5. 레보도파 투여 후 MDS-UPDRS III 운동 점수가 30% 이상 개선된 것에 기초한, 레보도파에 대한 명백한 반응성

[0741] 6. 스크리닝 방문 시 실험실 값

[0742] a. 혈소판 >100,000/mm^3 (수혈과 무관함)

[0743] b. PT/PTT가 정상 범위이고 INR <1.3(및 수술 전)

[0744] c. 절대 호중구 수(ANC) >1500/mm^3

[0745] d. 헤모글로빈 >10.0 g/dL(수혈 허용됨)

[0746] e. 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라제 <2.5xULN

[0747] f. 총 빌리루빈 <2.5 mg/dL

[0748] g. 혈청 크레아티닌 <1.5mg/dL

[0749] h. HbA1C <10%

[0750] 7. (연구자가 권장하지 않는 한) 18개월의 연구 방문을 완료할 때까지, 뇌심부자극술을 포함한 신경과적 수술을 연기할 의향

[0751] 8. 스크리닝 전 >5주 안정적인 PD 약물 요법

[0752] ***배제 기준***

[0753] 1. 두드러진 안구운동 마비, 소뇌 징후, 성대 마비, 기립성 저혈압(기립 시 수축기 혈압이 > 20mm Hg 또는 이완기 혈압 강하가 > 10mm Hg), 피라미드 관 징후 또는 근위축증의 존재

[0754] 2. PD 관련 유전적 요인(예컨대, *PRKN, PINK1, 또는 LRKK2* 돌연변이)

[0755] 3. 중증 운동이상증(UDysRS >30)

[0756] 4. 치매의 존재(몬트리올 인지 평가(MoCA) <25)

[0757] 5. 운동 증상을 개선하는 데 필요한 용량의 항-PD 약물에 의해 유발된 경우를 포함하여, 정신병의 존재 또는 병력

[0758] 6. 치료받지 않았거나 치료가 적절하지 않은 우울증(BDI-II 점수 >20) 또는 심각한 기분 장애의 병력(정신과 입원이 필요하거나 이전에 자살을 시도한 적이 있는 경우)의 존재

[0759] 7. DSM-5 기준 및 조사자의 판단에 의해 정의된 물질(약물, 알코올) 남용의 존재. 참고: 테트라하이드로칸나비놀 또는 칸나비디올의 사용은 배제되지 않음

[0760] 8. 응고병증, 항응고제 치료, 낮은 혈소판 수, 또는 임의의 항혈전 약물을 일시적으로 중단할 수 없는 경우

[0761] 9. 뇌졸중 또는 잘 조절되지 않는 심혈관 질환 병력

[0762] 10. 조절되지 않는 고혈압이나 당뇨병 또는 신경외과적 시술의 위험을 크게 증가시킬 수 있는 임의의 다른 급성 또는 만성 의학적 병태

[0763] 11. 치료받은 피부 편평상피암 또는 기저세포암 이외의 악성 종양(대뇌 또는 전신) 병력

[0764] 12. 급성 또는 만성 두피 감염을 포함한 임상적으로 활성인 감염

[0765] 13. 이전의 뇌 수술 또는 다른 뇌 영상화 이상

[0766] 14. MRI 및/또는 가돌리늄 사용에 대한 사용 금지 사유

[0767] 15. 임신 또는 수유 중

[0768] 16. 투여 후 3개월 동안 차단 피임법을 사용할 의사가 없는 생식 능력이 있는 남성 또는 여성

[0769] 17. 만성 면역억제 요법(예컨대, 만성 스테로이드, 종양 괴사 인자, 길항제, 화학요법)

[0770] 18. 치료 전후 1 개월 이내에 임의의 백신 접종을 연기하려는 의사가 없는 경우

[0771] 19. 스크리닝 전 12주 이내에 임의의 조사용 제제를 투여받은 경우

[0772] 20. 빈번하고 장기간의 후속 평가를 포함하여 프로토콜 절차를 준수할 수 없는 경우

[0773] 21. 수술 위험을 증가시킬 수 있는 암 또는 잘 조절되지 않는 의학적 병태의 병력

[0774] 22. 신경과 전문의, 심리학자/정신과 전문의 또는 신경외과 전문의가 제기한 충동적 또는 강박적 행동에 관한 사항을 포함한 임의의 중대한 문제

[0775] ***조사용 연구 약물***

[0776] 조사용 생성물인 AAV2-GDNF는 인간 GDNF 상보적인 DNA(cDNA), 인간 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 및 3' UTR 서열을 함유하는 아데노-연관 바이러스, 혈청형 2(AAV2)를 포함한다. AAV2-GDNF는 1mL 분취액으로 7.9×10^{12} vg/mL 농도로 공급된다.

[0777] AAV2-GDNF의 희석을 위한 부형제는 1mL 분취액으로 공급했다. 뇌에 주입하기 전에 가도테리돌(ProHance®)을 연구 약물 조제물에 첨가(2mM 용액 제공)했다. 가돌리늄 기반 조영제인 가도테리돌(2mM)을 각각의 연구 약물 용액에 혼합하여 CED 분포에 대한 향상된 실시간 수술 중 MRI 모니터링을 제공했다.

[0778] ***연구 설계의 개요***

[0779] 본원에서 설명되는 현재 연구는 PD를 갖는 환자의 피각에 CED에 의해 양측으로 전달된 AAV2-GDNF(예컨대, 도 15 참조)에 대한 오픈-라벨 안전성 연구이다. 주요 연구 목표는 전달된 바이러스 벡터의 안전성과 경도 및 중등도 진행성 PD 환자 모두에서 GDNF 이식유전자의 후속 발현을 확인하는 것이었다. 1차 안전성 및 임상 결과 평가는 연구 약물을 투여한 후 18개월 후에 실시했다. 현재 실험의 개략도가 도 1 및 도 16에 제시되어 있다.

[0780] 임의의 예비 임상 효과의 장기적인 안전성과 지속성을 평가하기 위해, 가능한 경우, 적어도 5년까지 장기 추적 관찰이 실시될 것이다. 장기 추적 관찰의 연례 방문은 약물 OFF/ON 상태에서 직접 대면하여 실시하도록 의도되지만; 평가 일정표에 나열된 선택적 평가를 제외한 약식 ON 방문은 화상 통화를 통해 원격으로 수행될 수 있다.

[0781] 연구 참가자에게는 연구 약물을 투여하기 전에 기준선 평가 및 수술 전 평가가 수행되었다. 연구 약물은 각각의 피각에 iMRI-유도 CED 신경외과적 주입을 통해 두개골내로 투여된다.

[0782] ***스크리닝 절차***

[0783] 연구 약물의 수술적 투여에 대한 예정일로부터 3개월 이내에, 연구 참가자는 다음과 같은 일련의 스크리닝 절차를 거친다:

[0784] ● 병력

[0785] ● 현재 PD 및 비PD 약물의 검토

[0786] ● 활력 징후를 통한 신체 검사; 신경성 검사

[0787] ● 활성 모니터: 설정 및 사용에 대한 지침 검토

[0788] ● 연구실:

[0789] ○ 혈액학(혈소판을 갖는 CBC)

[0790] ○ 임상 화학 - 기본 대사 패널(나트륨, 칼륨, 클로라이드, 총 CO2, 크레아티닌, 글루코스, 요소 질소, eGFR), 간 패널(알칼리성 포스파타아제, ALT/GPT, AST/GOT, 총 & 직접 빌리루빈), 및 HbA1C

[0791] ○ 응고 패널(INR, PT, PTT)

[0792] ○ 임신 검사(해당되는 경우; 각각의 신경 영상 세션 후 30일 이내에 혈청 또는 소변 검사를 수행함)

[0793] ○ PD 유전자 검사

[0794] ○ 임신 검사(해당되는 경우; 각각의 신경 영상 세션 후 30일 이내에 혈청 또는 소변 검사를 수행함)

[0795] ○ 면역학적 마커(혈청): AAV2 중화 항체, GDNF 항체

[0796] ● 신경 영상:

[0797] ○ 뇌 MRI(수술 전 계획을 위한 조영제 유무에 관계없이 ON 또는 OFF 상태)

[0798] ○ FDG PET(OFF 상태, PD-관련 패턴을 평가함)

[0799] ○ DaT SPECT(OFF 상태, 시냅스 전 말단 밀도를 평가함)

[0800] ● PD 운동 증상 및 기능에 대한 임상 평가:

[0801] ○ 레보도파 반응성을 평가하기 위한 MDS-UPDRS 파트 I 내지 IV(파트 III은 OFF&ON으로 평가함)

[0802] ○ 수정된 호엔-야르(OFF)

[0803] ○ 기립-보행-앉기(OFF/ON)

[0804] ○ 민첩성 및 균형 검사(OFF/ON)

[0805] ○ 운동이상증 등급(UDysRS, ON)

[0806] ● 일치성 검사가 포함된 PD 운동 일기

[0807] 신경심리학적 평가: MoCA, CANTAB, BDI-II, BAI, QUIP-RS

[0808] ● 삶의 질 측정(PDQ-39)

[0809] ● CGI 및 PGI

[0810] ● CSSRS(이번 방문에만 사용되는 스크리닝 버전)

[0811] ● PD 비운동 증상 평가: NMSS, BSIT, PDSS-2, SCOPA-AUT

[0812] 대상체는 연구 조사자의 재량에 따라 최대 2회까지 재스크리닝될 수 있다.

[0813] ***연구 치료 및 투여***

[0814] 연구 약물의 투여는 연구 신경외과 전문의가 수술 중 MRI 모니터링을 통해 수행했다. 연구 약물은 미리 계획된 궤적을 따라 정밀하게 유도된 MRI-호환 캐뉼라(SmartFlow®; MRI Interventions, Irvine, CA USA)를 통해 직접 투여되었다. 외과의는 각각의 피각의 장축을 통과하는 정수리/후두부 궤적을 우선적으로 계획하지만, 대안적인 궤적을 사용할 수도 있다. 수술 절차는 MRI-호환 궤적 유도(예컨대, ClearPoint® 신경 내비게이션 시스템)를 갖는 중재적 MRI 제품군 내에서 수행했다. 이 절차는 뇌에 디바이스(예컨대, 생검 바늘, 전극, 절제 프로브)를 MR 기반의 정위고정성 배치하는 데 숙련된 신경외과 전문의가 수행했다. 대상체를 헤드-홀더에 고정하고, 뇌 MRI 영상에서 계획된 진입 지점 및 표적 부위(양측 피각)를 확인했다. 전달 캐뉼라를 적절히 표적화한 후, CED를 사용하여 각각의 피각에 최대 1.8mL의 연구 약물을 주입했다. MR 영상화에 따른 시각화된 분포가 최적이 아니거나, 목표 부피 한계에 도달하거나, 목표 이상으로 누출(또는 역류)되는 경우, 외과의는 캐뉼라의 위치를 변경하여 피각으로의 약물 전달을 최적화하도록 선택할 수 있다. 1-30μL/min의 다양한 유속으로 CED를 사용하여 최대 3.6mL(1.8mL/피각)의 용량을 전달했다.

[0815] ***용량***

[0816] 모든 참가자는 1회의 수술 절차를 통해 연구 약물을 투여받았다. 연구 약물의 농도는 모든 대상체에서 3.3×10^{12} vg/mL로 일정했으며, 각각의 피각에 최대 1.8mL를 주입했다. 대상체 당 총 약물 용량은 최대 1.2×10^{13} vg(3.3×10^{12} vg/mL × 3.6mL)이었다.

[0817] 연구 약물을 MRI-호환 주입 펌프(예컨대, 메드퓨전 시린지 펌프, Smiths Medical Inc.)에 연결된 스마트플로우(SmartFlow) 캐뉼라를 사용하여 단일 수술 환경에서 피각에 양측으로 전달했다. 각각의 피각에 약물량을 전달하기 위해 주입 속도(1 내지 30μL/min)가 증가하는 CED 주입을 사용했다. 수술팀은 각각의 피각 부피의 50 내지 80%를 커버하는 것을 목표로, 캐뉼라 깊이와 주입 속도를 조정하여 목표 부피 내에서 분포를 제어했다. 주입은 목표 커버리지에 도달하거나, 추가적인 주입으로 목표 커버리지가 유의미하게 증가하거나, 주입 부피가 증가하여 커버리지가 목표량 이상으로 확장되거나, 피각 당 최대 주입 부피 1.8mL에 도달하면 종료되었다.

[0818] 이전 연구에서, 투여되는 연구 약물의 부피는 피각 당 0.45mL였다. 더 낮은 투여량의 활용과 전두골 경유 표적화 접근법 때문에, 평균 피각 부피 커버리지가 26%로 제한되었다. 이 연구에서 F-DOPA PET 흡수의 향상은 iMRI를 통해 문서화된 바와 같이, 피각의 주입된 영역으로 제한되었다.

[0819] MRI로 모니터링되는 투약 절차의 목표는 각각의 피각의 커버리지를 최대화하면서 표적을 벗어난 전달을 최소화하는 것이었다. 소량의 가도테리돌을 연구 약물과 혼합하여, 수술팀은 iMRI를 통해 실시간으로 분포를 시각적으로 모니터링하여 커버리지를 문서화하고, 필요에 따라 캐뉼라 위치, 주입 속도, 또는 주입 중단을 수정할 수 있었다. 뇌의 크기, 형태, 해부학적 특성, 특히 PD 환자의 피각의 개인차를 고려할 때, 실제 주입 부피와 그에 따른 분포의 부피, 및 피각 부피 커버리지의 퍼센티지는 대상체들 사이에서 달라질 것으로 예상했다. 투여 절차 전반에 걸쳐 약물 주입액 분포를 모니터링하면 50 내지 80%의 피각 커버리지를 최적으로 확보할 수 있다. 연구 약물의 주입은 (i) 최대 목표 커버리지인 80%를 달성하거나, (ii) 추가 주입으로 목표 커버리지를 유의미하게 증가시키지 못하거나, (iii) 목표량을 초과하는 상당한 역류 또는 누출이 문서화되거나, (iv) 피각 당 최대 주입 부피인 1.8mL에 도달하면 중단되었다.

[0820] ***결과***

[0821] 본원에서 설명되는 주입 방법을 활용하면, A 집단 및 B 집단 둘 모두에 대해 단일 피각(즉, 좌측 또는 우측 피각)에 대해 평균 63%의 커버리지가 발생한다(예컨대, 도 4, 도 5 및 도 6a 내지 도 7b 참조). A 집단 내의 대상체는 투여 직후 적어도 12개월 동안 초기 MDS-UPDRS III 점수의 안정화를 나타낸 반면, B 집단 내의 대상체는 투여 직후 적어도 12개월 동안 MDS-UPDRS III 점수의 현저하게 감소를 나타냈다(도 8a). 이러한 결과는 "ON" 상태 및 "OFF" 상태 둘 모두에서 관찰되었다(도 8a 및 도 8b). MDS-UPDRS II 점수에서도 유사한 결과가 관찰되었다(도 8d).

[0822] 대상체의 PD 일기(도 9a 및 도 9b 참조), 및 투여 후 NMSS 및 PDQ-39 점수를 모니터링했을 때 유사한 결과가 관찰되었다. 투여 직후 6개월째에 A 집단에서는 양호한 "ON" 기간의 안정화가 관찰되었고, 투여 직후 6개월째에 B 집단에서는 양호한 ON 기간의 현저한 증가가 관찰되었다(도 9a 내지 도 9d). 또한, 투여 직후 6개월, 12개월, 및 18개월 시점에서 A 집단에서는 대상체의 NMSS 및 PDQ-39 점수의 안정화가 관찰되었으며(도 10a), 투여 직후 6개월 및 12개월 시점에서 B 집단에서는 대상체의 NMSS 및 PDQ-39 점수의 현저한 감소가 관찰되었다(도 10b). 마지막으로, 경도 집단(도 22a)에서는 투여 후 최대 적어도 18개월까지 UDYSRS 객관적 하위 점수가 안정적이었고, 중등도 집단(도 22b)에서는 약간 감소했다. 중등도 집단에서는, 투여 후 18개월째에 UDYSRS 전체 및 병력 하위 점수가 감소했다(도 22b). 또한, 경도 집단에서 투여 후 적어도 18개월째에 레바도파 등가 일일 용량 평균값 점수는 기준선과 비교하여 안정화되었고(도 23a), 중등도 집단에서는 투여 후 적어도 18개월째에 감소되었다(도 23b).

[0823] 마지막으로, 투여 12개월째(도 11) 및 투여 후 18개월째(도 21)에 대상체의 MDS-UPDRS III 점수의 용량-의존적 감소가 관찰되었다. 이전 임상 시험은 본원에서 설명되는 것보다 더 낮은 총 용량(예컨대, $9.0x10^{10}$ vg 및 $3.0x10^{11}$ vg)의 투여를 포함하였고 피각의 총 커버리지(즉, 26%)가 더 낮아졌다. 이 투여로, 투여 후 12개월째에 대상체의 초기 MDS-UPDRS III 점수가 약간만 감소하게 되었다. 반면, 더 높은 총 용량(즉, $1.2x10^{13}$ vg)을 투여하여 피각의 63% 커버리지를 발생시킨 경우, 투여 후 12개월째에 MDS-UPDRS III 점수의 현저한 감소가 관찰되었다. 이러한 데이터는 본원에서 설명되는 방법이 이전에 활용된 방법보다 우수하다는 것을 나타낸다.

[0824] 경도 및 중등도 집단에 대한 모든 운동 및 비운동 평가의 치료 후 변화에 대한 요약은 각각 도 18a 및 도 18b에 제공된다.

[0825] 이 연구에서는 11명의 참가자에게서총 56개의 TEAE가 관찰되었다. 이러한 이벤트의 대부분은 일시적이고 예상되는 수술 전후 이벤트였다. 이러한 이벤트는 도 17에 요약되어 있다. AAV2-GDNF-연관 부작용은 보고되지 않았다. 임의의 이유(TEAE를 포함함)로 연구를 중단한 대상체는 없었다. 현재까지 생명을 위협하는 TEAE 또는 사망 사례는 발생하지 않았다.

[0826] ***실시예 3 - 파킨슨병의 초기 및 중등도 병기에 양측 단일 후방 궤적을 통한 AAV2-GDNF의 재현성이 높고 안전한 피각내 전달***

[0827] *도입*: 유전자 치료를 위한 용량 최적화(특정 CNS 표적을 표적화 하는 경우)는 직접 뇌실질 내 전달을 위한 기술적 어려움을 나타냈지만, 유의미한 결과를 달성하는 데 있어서 중요하다(예컨대, 도 12 참조). 최근 파킨슨병(PD) 유전자 치료 시험에서 높은 피각 커버리지와 개선된 임상 결과 사이의 강력한 상관관계가 입증되었다. 그러나, 이전 연구에서 사용된 트랜스-전두엽 궤적은 가변의 낮은 부피 커버리지(<5-42%)를 초래했다. 발명자들의 현재 PD 임상 시험에서, 양측 단일 후방 궤적은 피각의 길게 연장되는 A-P 축 내에서 개선된 AAV2-GDNF 분포를 제공하여, PD 증상에 대한 고용량, 고 커버리지의 임상 효과를 평가했다.

[0828] *방법*: 초기 병기(<5년; MDS-UPDRS III OFF ≤32) 또는 중등도 병기 PD(>4년; MDS-UPDRS 33-60) 중 어느 하나로 진단받은 적격 참가자는 수술 중 MRI(iMRI) 모니터링을 통해 피각 당 최대 1.8mL의 AAV2-GDNF($3E^{12}$ vg/ml)를 투여받았다. 참가자(n=10)는 가도테리돌(2mM)과 혼합된 AAV2-GDNF를 주입받아, 개별 해부학적 변형에 맞춘 주입을 가능하게 하고, 주입 전반에 걸쳐 iMRI 모니터링에 의해 거의 실시간으로 피각 커버리지를 정의할 수 있었다. 가도테리돌 신호는 MRI를 통해 투여 직후 피각에서 볼 수 있었지만, 투여 후 6개월 및 18개월 후에는 더 이상 볼 수 없었다(도 20).

[0829] 추가 궤적없이 피각 분포를 증가시키는 양측-전두엽 옵션은 피각의 장축에 평행하게 주입액을 분배하는 전략을 개발하도록 장려했다. 이에 따라, 형상에 맞는 주입 방법론이 발전했다. 피각과 같이 길게 연장되는 뇌 표적을 위해 특별히 설계된, 주입하며-이동하는-주입 방법은 2022년에 공개되었다. 임상전 및 최근 임상 경험은, 단일 궤적을 통해 상당한 실질 커버리지가 가능하며, 주입이 시작되는 피각의 꼬리 부분에 진입하여, 캐뉼라가 등극(rostral pole)을 향해 전진하는 동안 피각 부피를 천천히 채울 수 있다는 것을 나타냈다. 이 주입 방법은 피각 내에 일정한 용량(평균 1500마이크로리터)이 전달될 수 있게 하여, 현재 PD 임상 시험에서 >50%의 커버리지를 제공하면서도 임상적 안전성을 유지할 수 있다.

[0830] 혈관 주위 누출은 피각에 주입하며-이동하는-주입 CED를 사용할 때 흔히 관찰될 수 있지만, 이러한 누출은 수술 전 위치와 범위를 예측하기 어렵다. 신경외과 의사를 위한 주요 완화 전략은 a) 전달 캐뉼라의 전진 및 b) 주입 유속의 미세 조정을 포함한다. 혈관 주위 채널을 따라 꼬리핵으로 혈관 주위를 확장하는 것이 잠재적으로 유리할 수 있다.

[0831] *결과*: 주입은 모든 참가자에 의해 안전하게 수행되었으며 내약성이 우수했다. 6개월 후 예정된 MRI에서 피각에 인접한 곳에서 단일, 일측성, 무증상 뇌혈관 질환의 증거가 우연히 검출되었다. 20회의 주입으로부터의 평균 피각 부피 커버리지는 62.5%였고, 이는 초기 AAV2-GDNF 연구에서의 26% 평균 커버리지로부터 현저한 개선이고, >50%의 커버리지 목표(예컨대, 도 14a 및 도 14b 참조)를 초과했다. 예비 임상 결과는 이전의 1상 연구(Heiss 2019)와 비교했을 때 더 큰 운동 이점 및 PD 약물의 감소를 나타냈다.

[0832] *결론*: 본원에서 설명되는 전달 기법은 해부학적 이질성과 다양한 피각 부피에도 불구하고 재현성이 높다. 이러한 결과는 후방 궤적을 활용하는 피각 주입이 안전하고 내약성이 우수하며, 트랜스-전두엽 궤적과 비교했을 때 더 큰 부피 목표 커버리지를 일관되게 제공한다는 것을 나타냈다. 이러한 플랫폼은 치료용 주입 부피의 안전하고 유효한 뇌실질 내 분포를 제공하기 위해 특이적으로 설계된 방법 및 기법을 활용한다. 파킨슨병의 피각 유전자 치료에는, 다음 기법들이 현재 활용되고 있다: (i) 피각의 장축과 평행한, **후두부 접근법**을 활용하여, **피각 당** 단일 **주입하며-이동하는-주입 궤적**; (ii) 수술 중 MR 스캐너 내에서 주입액 분포를 거의 실시간으로 직접 시각화를 가능하게 하는 **가도테리돌 공동-주입**; (iii) 개별화된 목표 부피 내에서 치료 분포를 확장하는 **대류 증강 전달** 방법; (iv) 표적 내에서 주입액의 분포를 최대화하는 **역류-방지 캐뉼라**; 및 (v) 수술 전 궤적 계획의 검증, 수술 중 전달 캐뉼라 배치의 확인, 및 "형태에 맞는" 분포를 맞춤화하기 위해 주입 동안 캐뉼라 진행을 시각화하기 위한 **수술 중 자기 공명 영상.** 이러한 기법은 AAV2-GDNF의 투여를 향상시켰으며, PD 환자에서 의미있는 임상적 개선을 위한 것이다.

[0833] ***실시예 4 - 피각 주입 부위에 국한된 AAV2-GDNF 발현***

[0834] 1상 안전성 시험 참가자의 피각을, 투여 후 3.5년 후에 평가하여 GDNF 이식유전자 발현의 수준과 위치를 평가했다.

[0835] 1상 시험에서 AAV2-GDNF의 트랜스-전두엽 투여는 피각의 ~23% 커버리지가 되게 했다. 참가자로부터 얻은 피각의 펀치 생검은, 수술 동안 피각에의 가도테리돌의 국소 투여와, AAV2-GNDF의 국소 발현이 상관된다는 것을 나타냈다(도 19a 내지 도 19e). 수술 동안 피각 당 2회의 주입이 투여외었으며; 펀치 생검 1번 및 5번은 2개의 피각 주입 부위와 상관된다. 그러한 부위들에서 GDNF의 가장 높은 발현 수준이 관찰되었으며, 이는 주입 부위에서 GDNF의 가장 높은 이식유전자 발현이 지속된다는 것을 나타낸다(도 19e 및 도 19f). 이러한 데이터는 AAV2-GDNF가 투여 후 조직 전체로 확산된다는 것을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 투여 후 피각의 더 높은 퍼센트 커버리지를 제공하는 프로토콜이 바람직하다. 이러한 데이터를 더 뒷받침하기 위해, 백질 영역의 피각 외부에서 수행된 펀치 생검 6번에서는 GDNF 이식유전자 발현이 관찰되지 않았다(도 19e 및 도 19f).

[0836] 관찰된 GDNF 이식유전자 수준이 GDNF 활성을 나타내는지 평가하기 위해, 피각 샘플에 도파민성 섬유가 존재하는지 평가했다. 피각 샘플의 티로신 하이드록실라제 염색은 높은 GDNF 발현을 갖는 영역에서 강화된 도파민성 섬유를 나타내어, GDNF가 피각에서 활성화된다는 것을 나타낸다(도 19b 내지 도 19d). 이러한 데이터는 피각 내

의 더 넓은 GDNF의 분포가 도파민성 섬유의 더 큰 향상을 제공한다는 것을 보여준다. 이러한 데이터를 뒷받침하여, 투여 후 6개월과 18개월 후 연구 참여자에게서 F-DOPA의 현저한 증가가 관찰되었다. 위에서 설명된 바와 같이, F-DOPA 흡수를 PET 스캔을 통해, 그리고 기준선(예컨대, 투여 전)과 비교하여 평가했다. 시간 경과에 따라 점진적으로 증가하는 것이 관찰되었다; 6개월째에 기준선에 비해 F-DOPA 흡수의 ~25% 증가가 관찰되었고, 18개월째에 기준선에 비해 F-DOPA 흡수의 ~45% 증가가 관찰되었다. 증가된 F-DOPA 흡수는 도파민성 신경세포에 긍정적인 신경영양 효과를 시사한다.

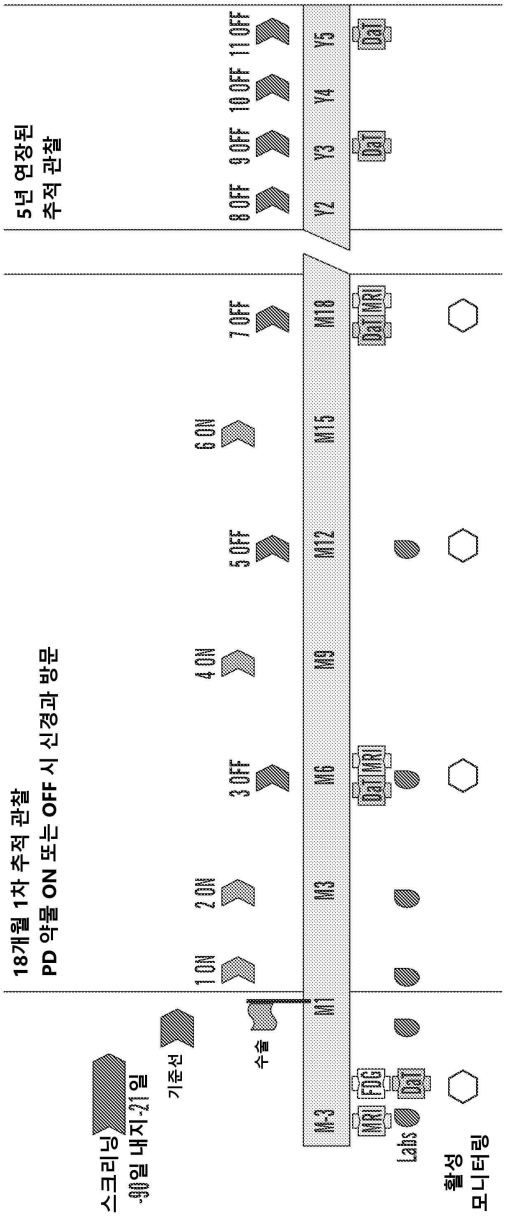
[0837] 이러한 데이터는 주입 후 피각의 23% 커버리지로 1상 안전성 시험에서 얻은 것이지만, 이러한 데이터는 투여 프로토콜이 안전하며 AAV2-GDNF가 내구성이 있다는 것을 확인했다.

[0838] *실시예 5 - AAV2-GDNF*

[0839] AAV2-GDNF는 파킨슨병을 갖는 대상체에게 투여될 것이다. AAV2-GDNF는 AAV2에 의해 캡슐화된 폐쇄형 말단 선형 듀플렉스화 DNA를 포함할 것이다. 폐쇄형 말단 선형 듀플렉스화 DNA는 서열 번호: 64의 ITR 사이 부분(즉, 서열 번호: 64의 염기쌍 12-2,716)을 포함할 것이다. 일례로서, 폐쇄형 말단 선형 듀플렉스화 DNA는 도 26에서 예시된 플라스미드 DNA로부터 제조될 수 있다. AAV2-GDNF는 양측-후두부 궤적을 사용하여 MRI-유도 CED에 의해 대상체의 피각에 주입될 것이다. 결과는 위에서 설명된 것들과 실질적으로 유사할 것으로 예상된다.

도면

도면1


18개월 1차 추적 관찰
PD 약물 ON 또는 OFF 시 신경과 방문
5년 연장된
추적 관찰
스크리닝
-90일 내지 -21일
기준선
수술
M-3
M1
M3
M6
M9
M12
M15
M18
Y2
Y3
Y4
Y5
1 ON
2 ON
3 OFF
4 ON
5 OFF
6 ON
7 OFF
8 OFF
9 OFF
10 OFF
11 OFF
MRI
FDG
DaT
Labs
활성
모니터링

도면2

A 집단

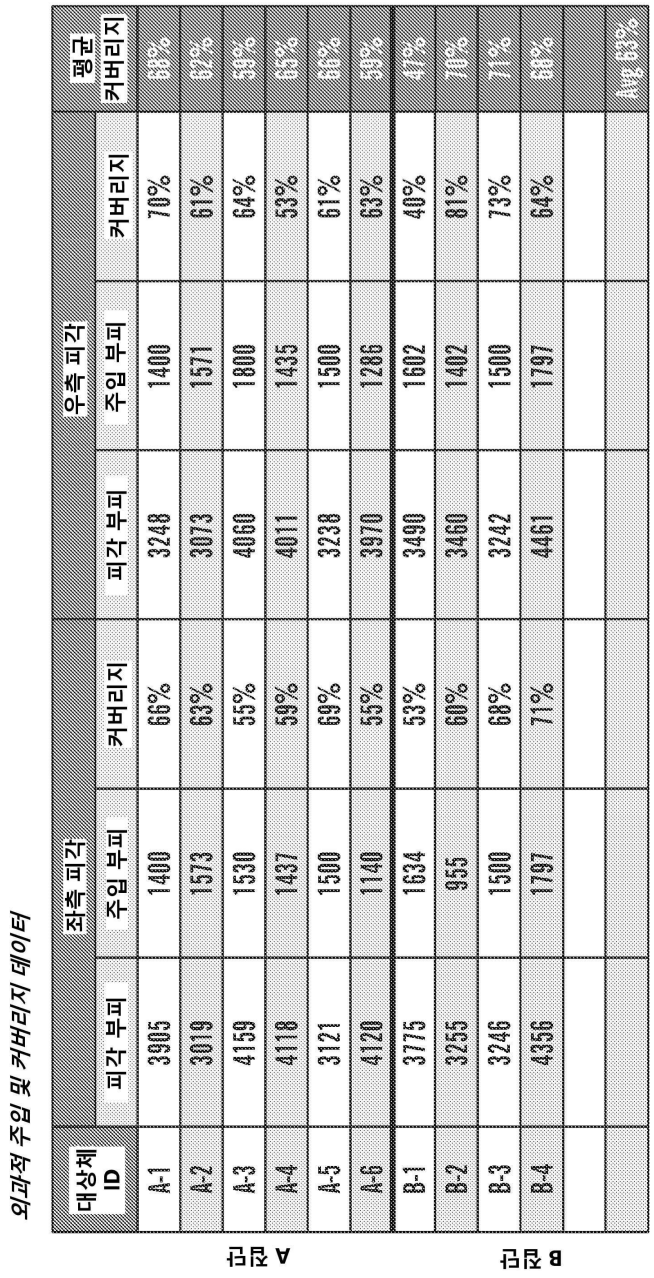
대상체	Dx 지속 시간	스크리닝 UPDRS III (OFF→ON)	스크리닝 UDysRS	스크리닝 시 레보도파 등가 용량	AE/코멘트
A-1	1.5 년	15→10 (33.3%)	0	1575 mg	AEs: R 어깨 통증, 저혈압
A-2	1.5 년	15→7 (53%)	0	400 mg	AEs: 일시적으로 증가된 떨림
A-3	3 년	27→14 (48.1%)	0	300 mg	AEs: 일시적으로 증가된 떨림, 요통, 손가락 냉증, 피로
A-4	3 년	27→8 (70%)	5	740 mg	AEs: 절개 부위 통증, 일시적인 혀 마비, 불안 발작, 허벅지 마비, 두통
A-5	9 개월	15→7 (53%)	0	400 mg	AEs: 없음
A-6	2 년	11→5 (55%)	0	850 mg	AEs: 구토, 두통

도면3

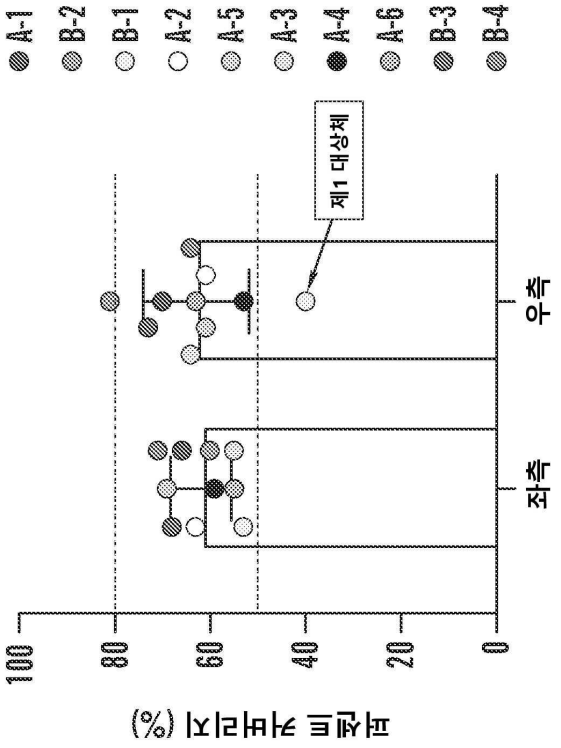
B 집단

대상체	Dx 지속 시간	스크리닝 UPDRS III (OFF → ON)	스크리닝 UPDRS	스크리닝 시 레보도파 등가 용량	AE/코멘트
B-1	6 년	51→32 (37%)	5	825 mg	AEs: HA, RLE 통증, 갈비뼈 통증
B-2	8 년	45→27 (37%)	4	2505 mg	SAE: 사다리 낙상으로 인한 L2 fx 지연성 출혈/경색 AEs: 없음
B-3	9 년	40→21 (48%)	0	650 mg	AEs: 어깨 통증, 메스꺼움, 두통, 갈비뼈 통증
B-4	9 년	35→13 (63%)	23	600 mg	AEs: 목 따끔함, IV 부위 멍, 피로

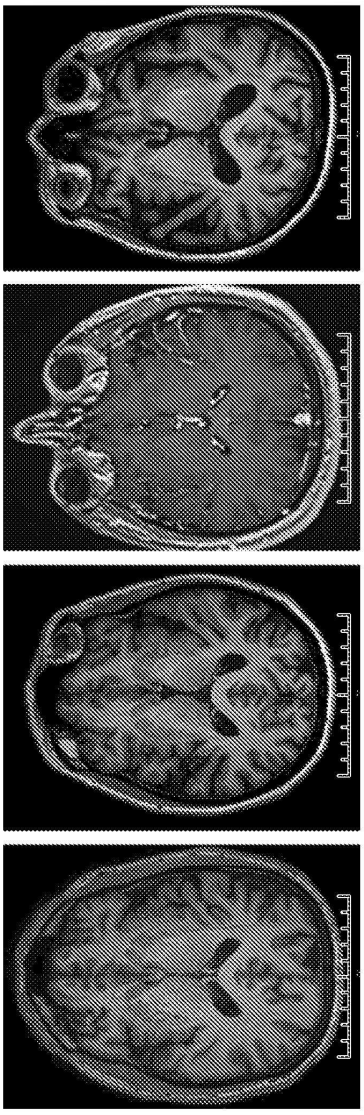
도면4


외과적 주입 및 커버리지 데이터
대상체 ID
좌측 피각
우측 피각
평균
피각 부피
주입 부피
커버리지
피각 부피
주입 부피
커버리지
커버리지
A-1 3905 1400 66% 3248 1400 70% 68%
A-2 3019 1573 63% 3073 1571 61% 62%
A-3 4159 1530 55% 4060 1800 64% 59%
A-4 4118 1437 59% 4011 1435 53% 56%
A-5 3121 1500 69% 3238 1500 61% 65%
A-6 4120 1140 55% 3970 1286 63% 59%
B-1 3775 1634 53% 3490 1602 40% 47%
B-2 3255 955 60% 3460 1402 81% 70%
B-3 3246 1500 68% 3242 1500 73% 71%
B-4 4356 1797 71% 4461 1797 64% 68%
A 집단
B 집단
Avg 63%

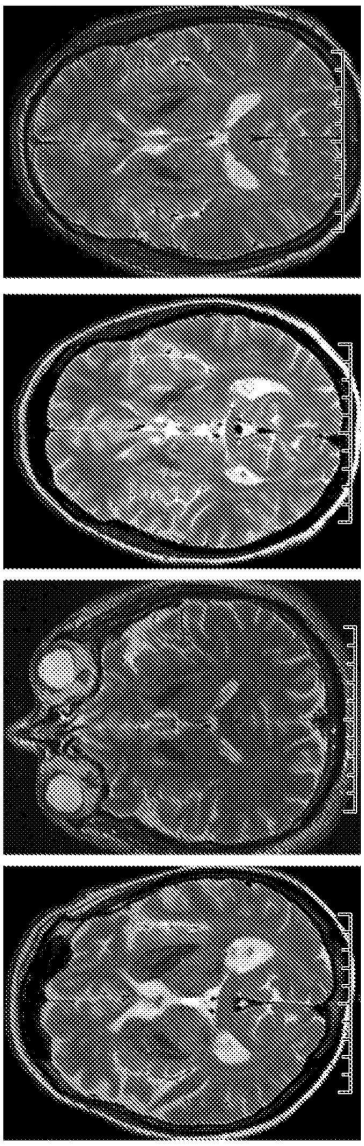
도면5



도면6

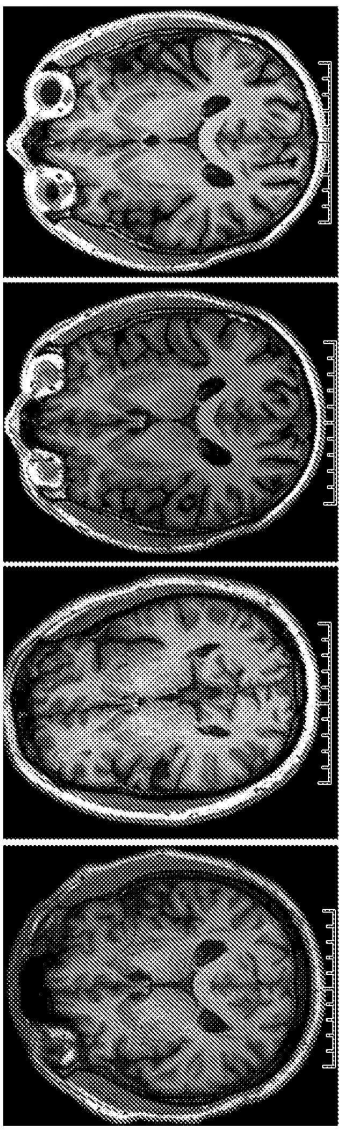


도 6a

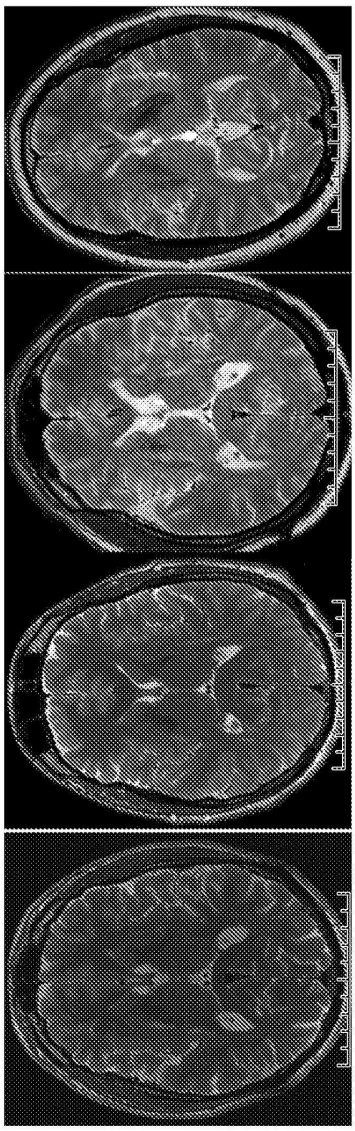


도 6b

도면7

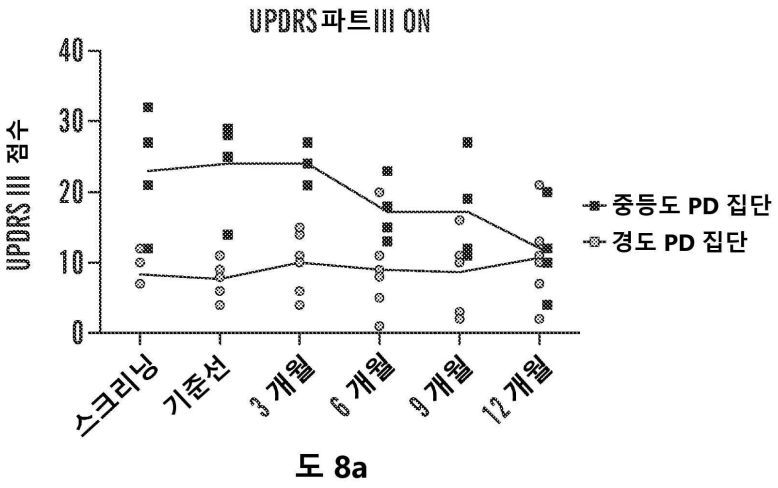


도 7a

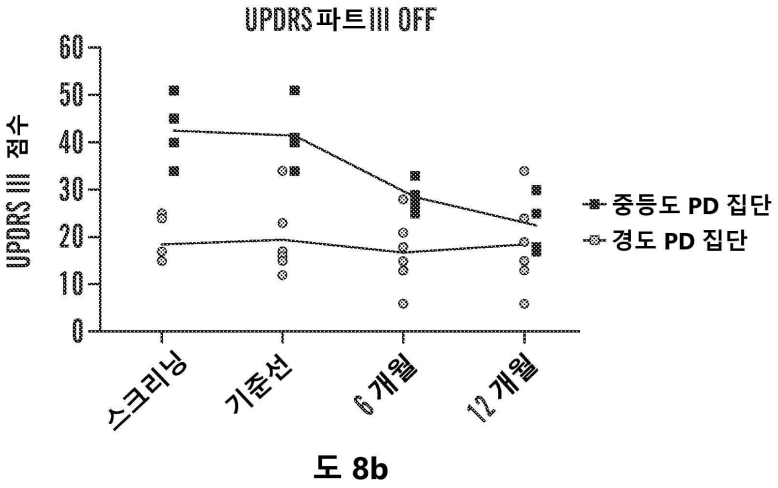


도 7b

도면8i

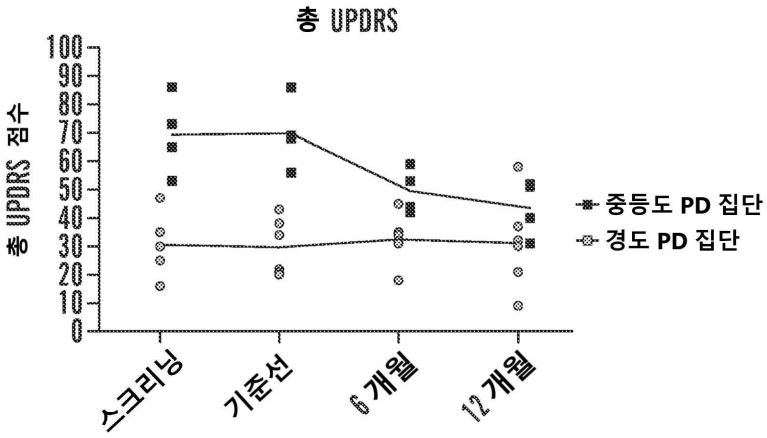

UPDRS 파트 III ON
UPDRS III 점수
40
30
20
10
0
스크리닝
기준선
3 개월
6 개월
9 개월
12 개월
중등도 PD 집단
경도 PD 집단

도 8a

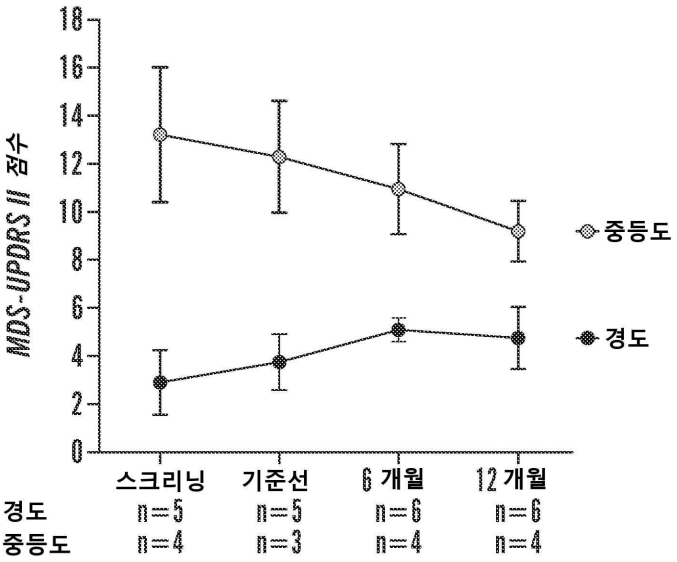

UPDRS 파트 III OFF
UPDRS III 점수
60
50
40
30
20
10
0
스크리닝
기준선
6 개월
12 개월
중등도 PD 집단
경도 PD 집단

도 8b

도면8ii

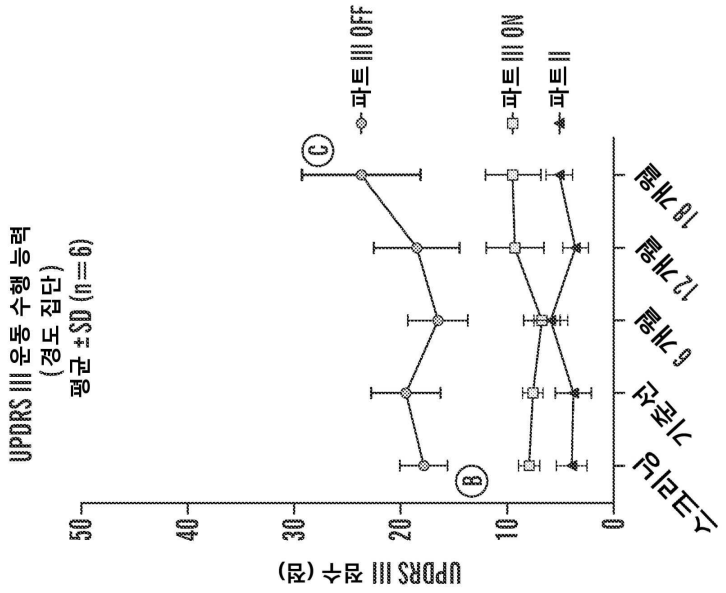


도 8c

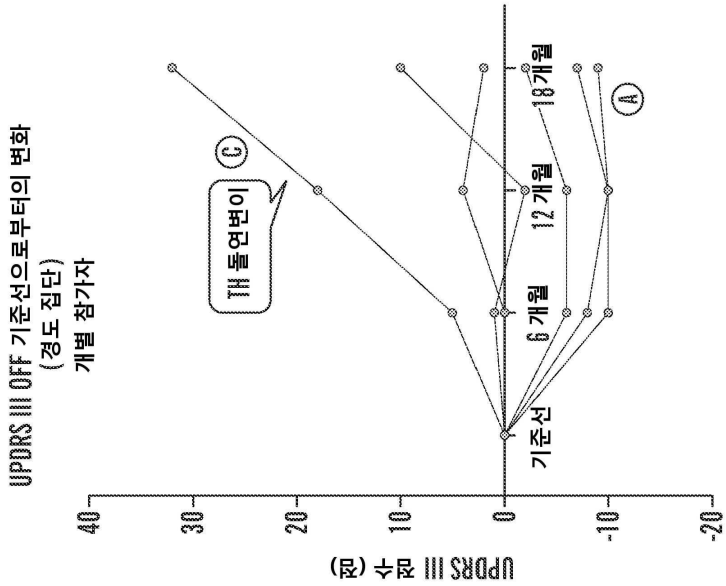


도 8d

도면8iii

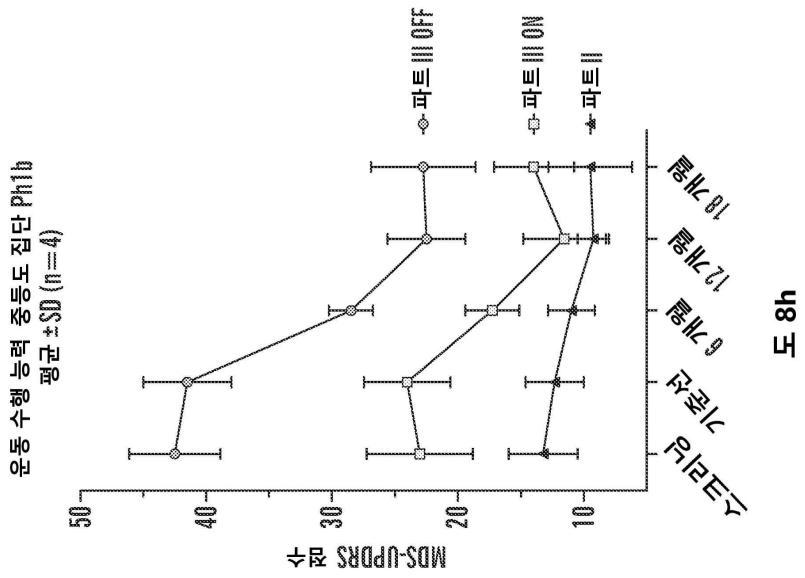


도 8f

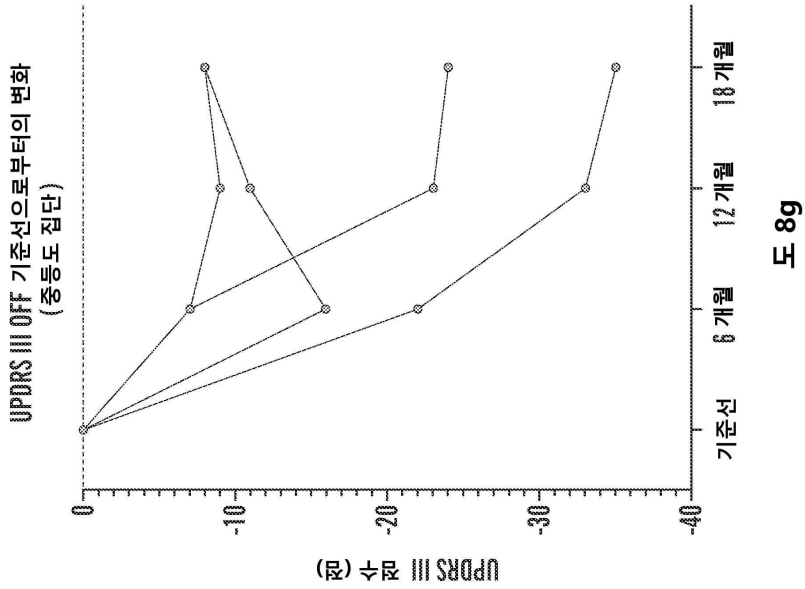


도 8e

도면8iv

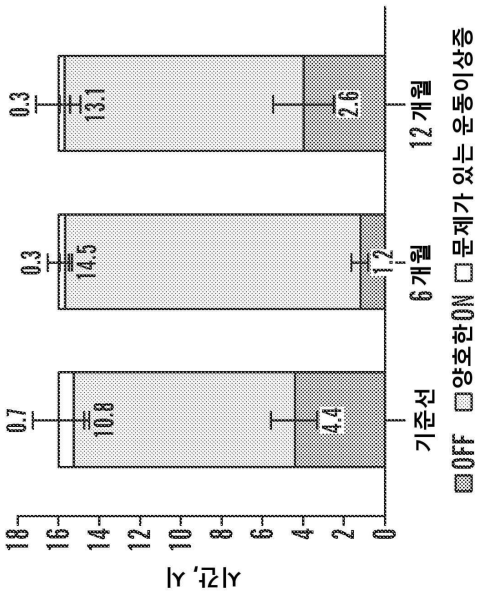


도 8h

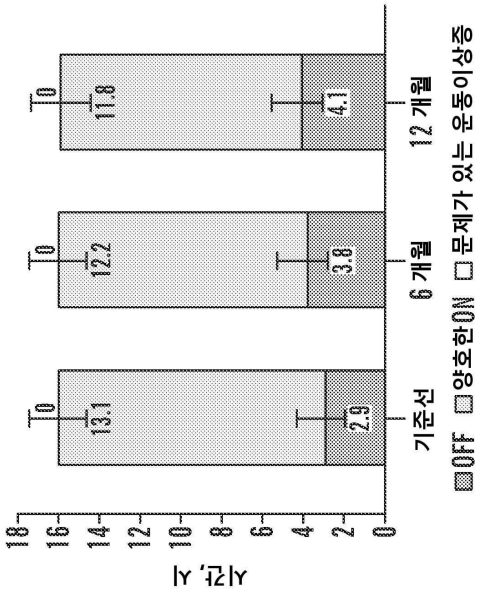


도 8g

도면9i

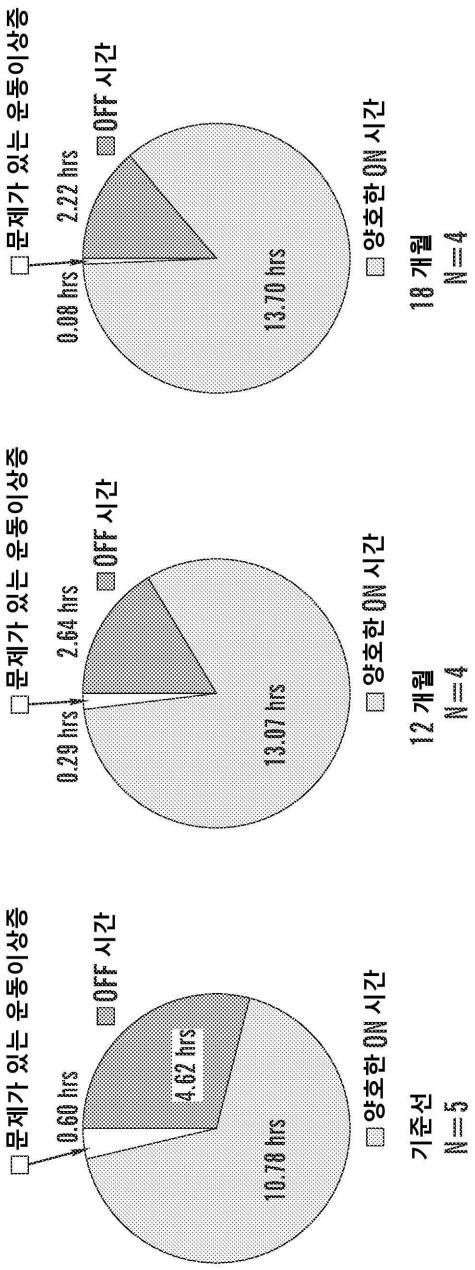

시간, 시
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0.7
10.8
4.4
0.3
14.5
1.2
0.3
13.1
2.6
기준선
6 개월
12 개월
OFF
양호한ON
문제가 있는 운동이상증

도 9b


시간, 시
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
13.1
2.9
0
12.2
3.8
0
11.8
4.1
기준선
6 개월
12 개월
OFF
양호한ON
문제가 있는 운동이상증

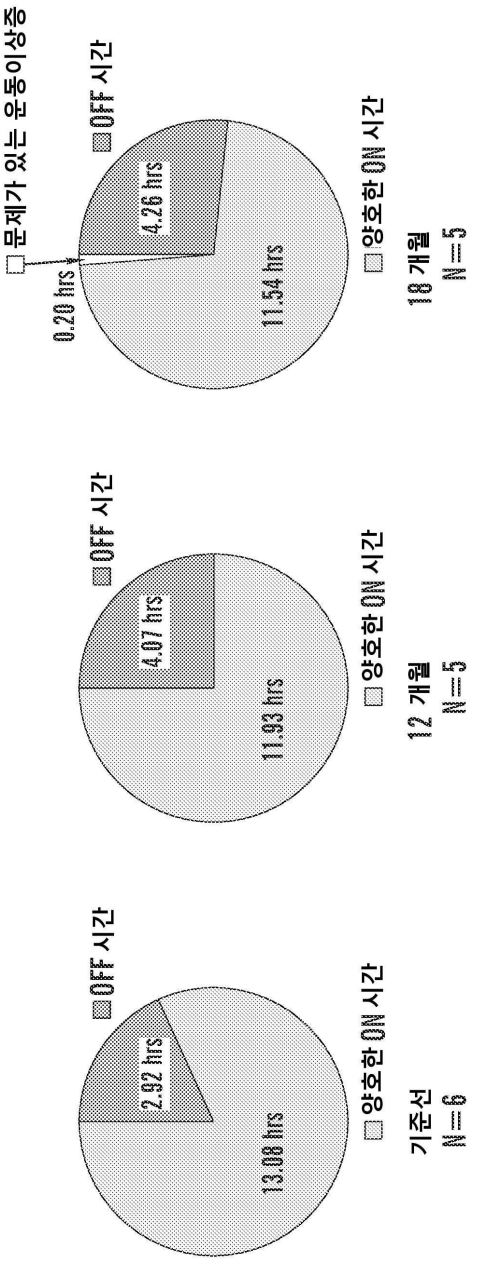
도 9a

도면9ii


문제가 있는 운동이상증
0.60 hrs
OFF 시간
4.62 hrs
10.78 hrs
양호한 ON 시간
기준선
N=5
문제가 있는 운동이상증
0.29 hrs
2.64 hrs
OFF 시간
13.07 hrs
양호한 ON 시간
12 개월
N=4
문제가 있는 운동이상증
0.08 hrs
2.22 hrs
OFF 시간
13.70 hrs
양호한 ON 시간
18 개월
N=4

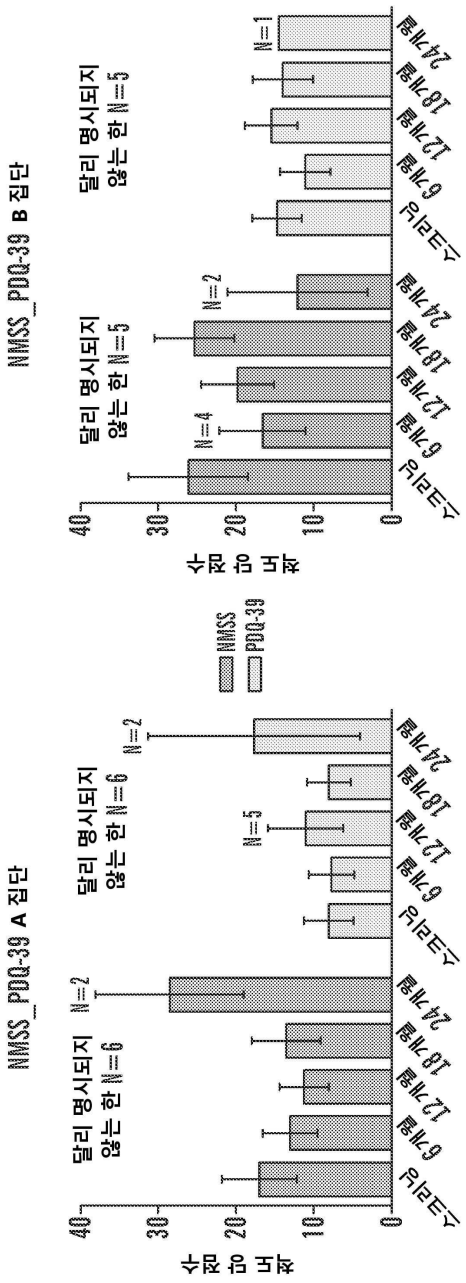
도 9c

도면9iii


문제가 있는 운동이상증
OFF 시간
양호한 ON 시간
0.28 hrs
4.26 hrs
11.54 hrs
10 개월
N = 5
OFF 시간
양호한 ON 시간
4.07 hrs
11.93 hrs
12 개월
N = 5
OFF 시간
양호한 ON 시간
2.92 hrs
13.08 hrs
기준선
N = 6

도 9d

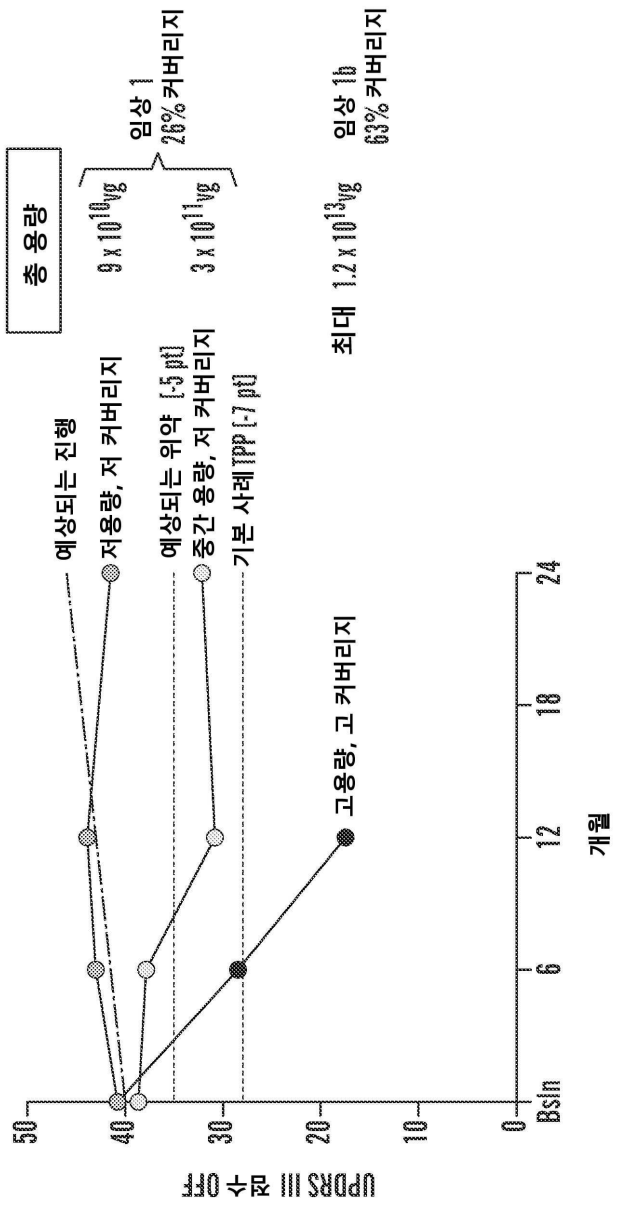
도면10



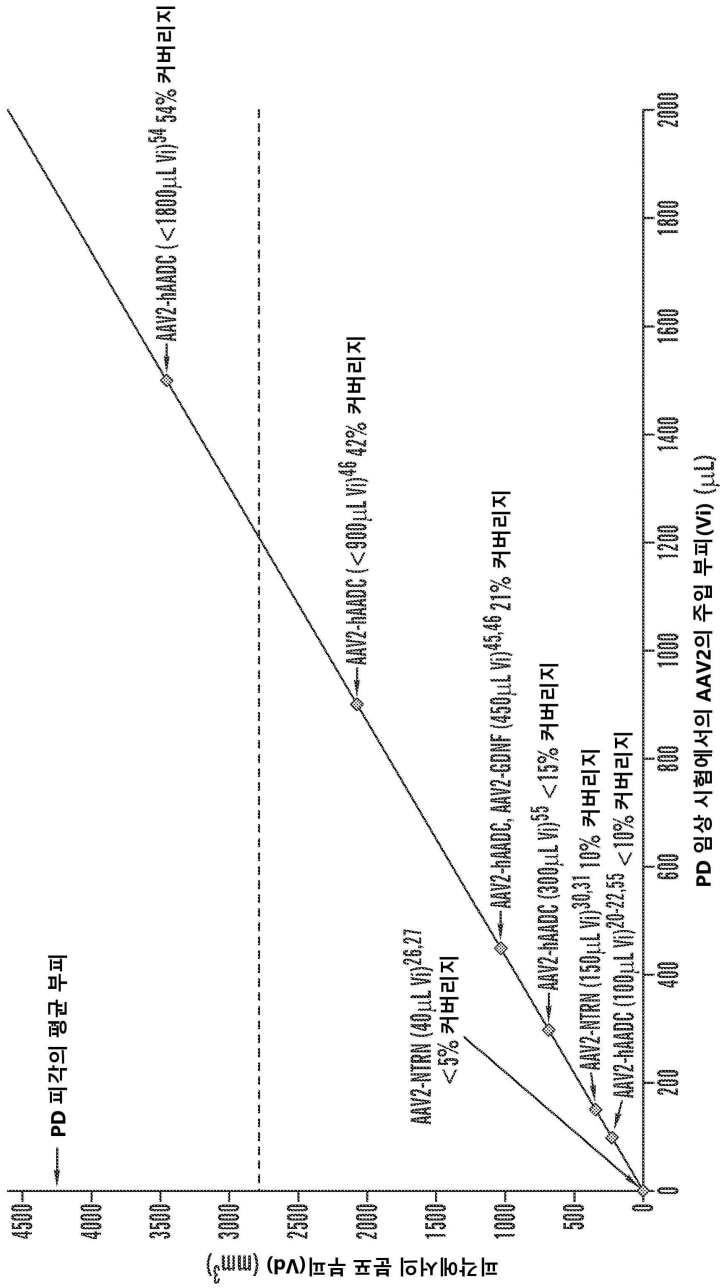
도 10a

도 10b

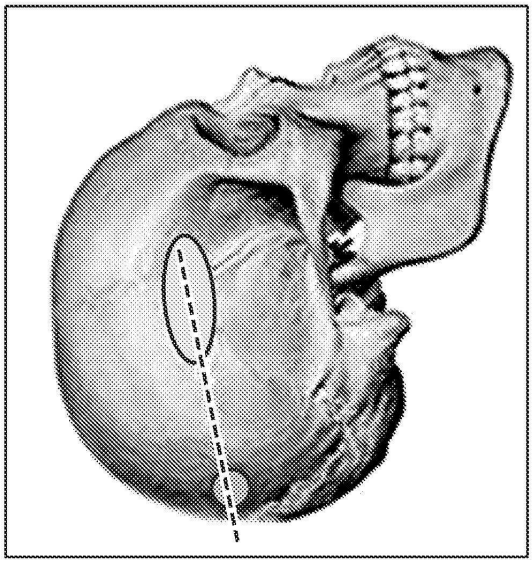
도면11


총 용량
예상되는 진행
저용량, 저 커버리지
9 x 10^10 vg
임상 1
26% 커버리지
예상되는 위약 [-5 pt]
중간 용량, 저 커버리지
3 x 10^11 vg
기본 사례 TPP [-7 pt]
최대 1.2 x 10^13 vg
임상 1b
63% 커버리지
고용량, 고 커버리지
UPDRS III 변화 Off
50
40
30
20
10
0
BsIn
6
12
18
24
개월

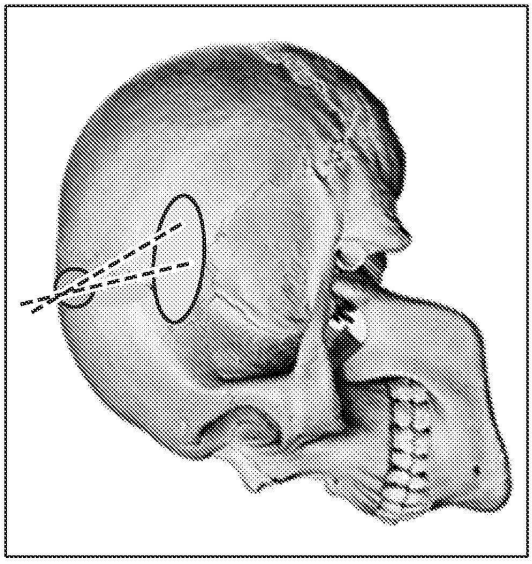
도면12


PD 피각의 평균 부피
AAV2-hAADC (<1800μL Vi)54 54% 커버리지
AAV2-hAADC (<900μL Vi)46 42% 커버리지
AAV2-NTRN (40μL Vi)26,27
<5% 커버리지
AAV2-hAADC, AAV2-GDNF (450μL Vi)45,46 21% 커버리지
AAV2-hAADC (300μL Vi)55 <15% 커버리지
AAV2-NTRN (150μL Vi)30,31 10% 커버리지
AAV2-hAADC (100μL Vi)28-22,55 <10% 커버리지
피각에서의 분포 부피(Vd) (㎣)
PD 임상 시험에서의 AAV2의 주입 부피(Vi) (μL)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

도면13



도 13b



도 13a

도면14a

	임상 부위	참가자 수 & PD의 병기	전달 접근법	벡터 용량 (vg/ml)	주입 용량 (μL/피각)
임상 1상 오픈 라벨, 용량 증량 안정성 시험	NIH 임상 센터	모든 진행 병기 1집단 - n=6 2집단 - n=6 3집단 - n=1^ 4집단 - n=0^ ^ 이 집단을 완료하기 전에 낮은 피각 커버리지로 인해 모집이 중단되었음	• 피각 당 2개의 궤적을 갖는 양측-전두엽; • 대류 증강 전달 (CED); • 수술 중 MRI(iMRI) 모니터링; • 가도테리돌 공동-주입	1집단 - 9E10 2집단 - 3E11 3집단 - 9E11 4집단 - 3E12	총 - 450 전교련 - 300 후교련 - 150 평균 부피 피각 커버리지 (26 피각/52 주입 궤적) 28%
임상 1b상 오픈 라벨, 단일 용량 안정성 시험	OSU UCSF UCI# #신경과 부위만 해당	초기 병기 - n=6 중등도 병기 - n=6^ ^5/6 2022년 3월 말까지 치료받음	• 피각 당 단일 궤적을 갖는 양측-후두부; • 그 외에는, 상기와 동일	양 집단 - 3E12	총 ≤1800 평균 - 1500 평균 부피 피각 커버리지 (20 피각/ 20 주입 궤적) 62.5%

도면14b

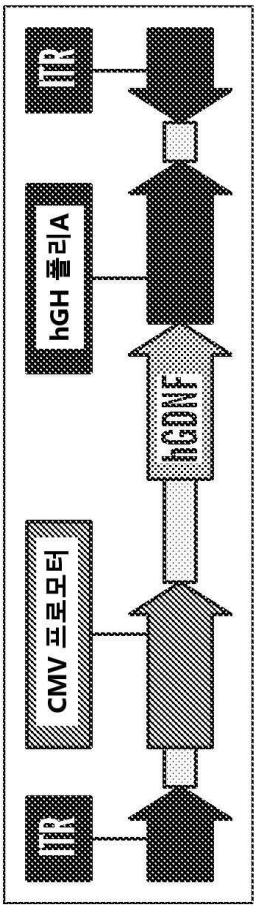
임상 1상 연구에서 집단별 달성된 피각 커버리지

	저용량 집단 n=6	중간 용량 집단 n=6	고용량 집단 n=1
평균(범위) 피각 부피, mm^3	4453 (3310-5247)	4261 (3570-5486)	3463 (3320-3606)
평균(범위) 주입 부피, μL	900	900	900
평균(범위) 피각 커버리지, %	28 (18-43)	22 (9-48)	38 (37-39)

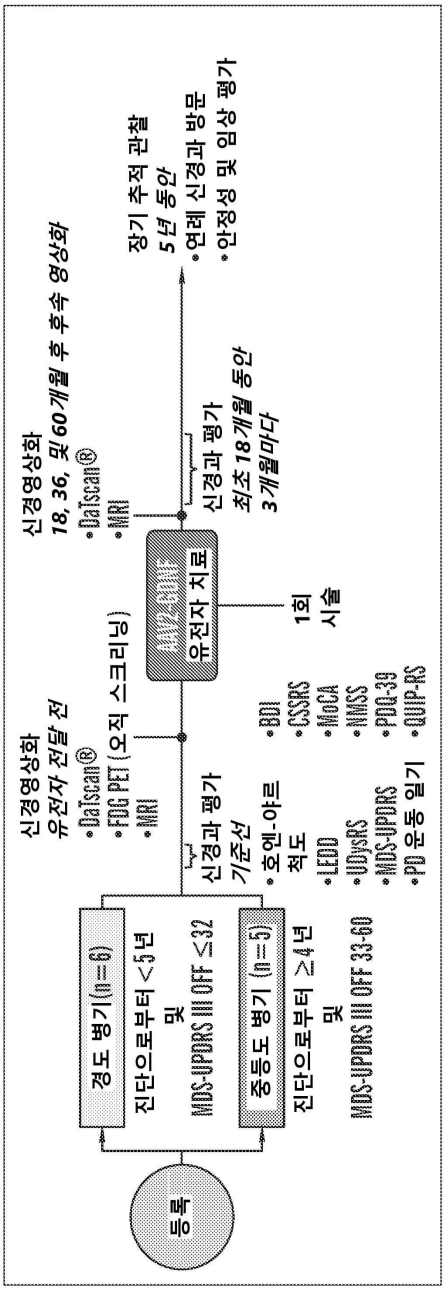
임상 1b상 연구에서 집단별 달성된 피각 커버리지

	경도 집단 N=6	중등도 집단 (N=5)
평균(범위) 피각 부피, mm^3	3670 (3019-4159)	3701 (3242-4461)
평균(범위) 주입 부피, μL	1464 (1140-1800)	1529 (955-1800)
평균(범위) 피각 커버리지, %	62 (53-70)	64 (40-81)

도면15



도면16


등록
경도 병기(n=6)
진단으로부터 <5년
및
MDS-UPDRS III OFF ≤32
중등도 병기 (n=5)
진단으로부터 ≥4년
및
MDS-UPDRS III OFF 33-60
신경영상화
유전자 전달 전
•DaTscan®
•FDG PET (오직 스크리닝)
•MRI
신경과 평가
기준선
•호엔-야르 척도
•LEDD
•UDysRS
•MDS-UPDRS
•PD 운동 일기
•BDI
•CSSRS
•MoCA
•NMSS
•PDQ-39
•QUIP-RS
AAV2-GDNF
유전자 치료
1회 시술
신경영상화
18, 36, 및 60개월 후 후속 영상화
•DaTscan®
•MRI
신경과 평가
최초 18개월 동안
3개월마다
장기 추적 관찰
5년 동안
•연례 신경과 방문
•안정성 및 임상 평가

도면17

기관계 분류 선호 용어	수술 전후 n=11 n (%)	치료 후 n=11 n (%)
적어도 하나의 TEAE를 갖는 대상체	11 (100)	11 (100)
신경계 장애	8 (73)	3 (27)
두통	4 (36)	
떨림	2 (18)	
감각저하	1 (9)	
구강 감각저하	1 (9)	
기립성 저혈압	1 (9)	
파킨슨증	1 (9)	
균형 장애		1 (9)
대뇌허혈		1 (9)
복시증		1 (9)
운동이상증		1 (9)
근긴장 이상증		1 (9)
프리징 현상		1 (9)
근골격계 및 결합 조직 장애	5 (45)	3 (27)
관절통	2 (18)	
근골격계 흉통	2 (18)	
요통	1 (9)	
사지 통증	1 (9)	
척추 골절	1 (9)	1 (9)
근육 경련		1 (9)
근육 경직		1 (9)
일반 장애 및 투여 부위 상태	3 (27)	2 (18)
피로	3 (27)	
주입 부위 멍	1 (9)	
안면 부종	1 (9)	
무력증		1 (9)
독감과 유사한 질병		1 (9)
감염 및 침입	0 (0)	5 (45)
코비드-19		2 (18)
박테리아 감염		1 (9)
봉와직염		1 (9)
비인두염		1 (9)
바이러스 감염		1 (9)

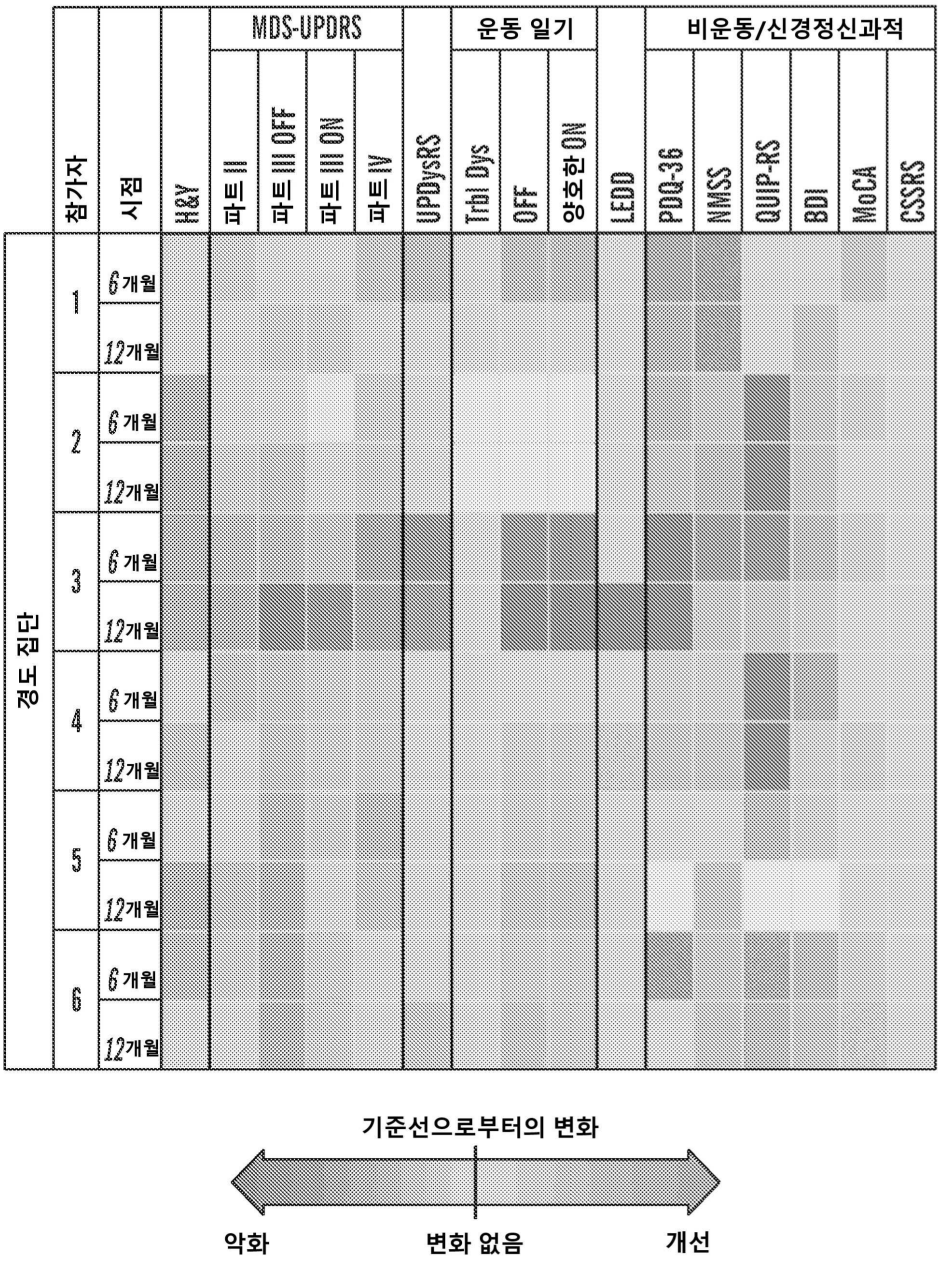
도면17a

위장 장애	2 (18)	1 (9)
메스꺼움	1 (9)	
구토	1 (9)	
복통		1 (9)
정신 장애	1 (9)	2 (18)
불안	1 (9)	
환각		1 (9)
충동적 행동		1 (9)
검사	0 (0)	2 (18)
자기 공명영상 이상		2 (18)
혈액 및 림프계 장애	0 (0)	1 (9)
혈소판 증가증		1 (9)
부상, 중독 및 시술 합병증	1 (9)	0 (0)
절개 부위 통증	1 (9)	

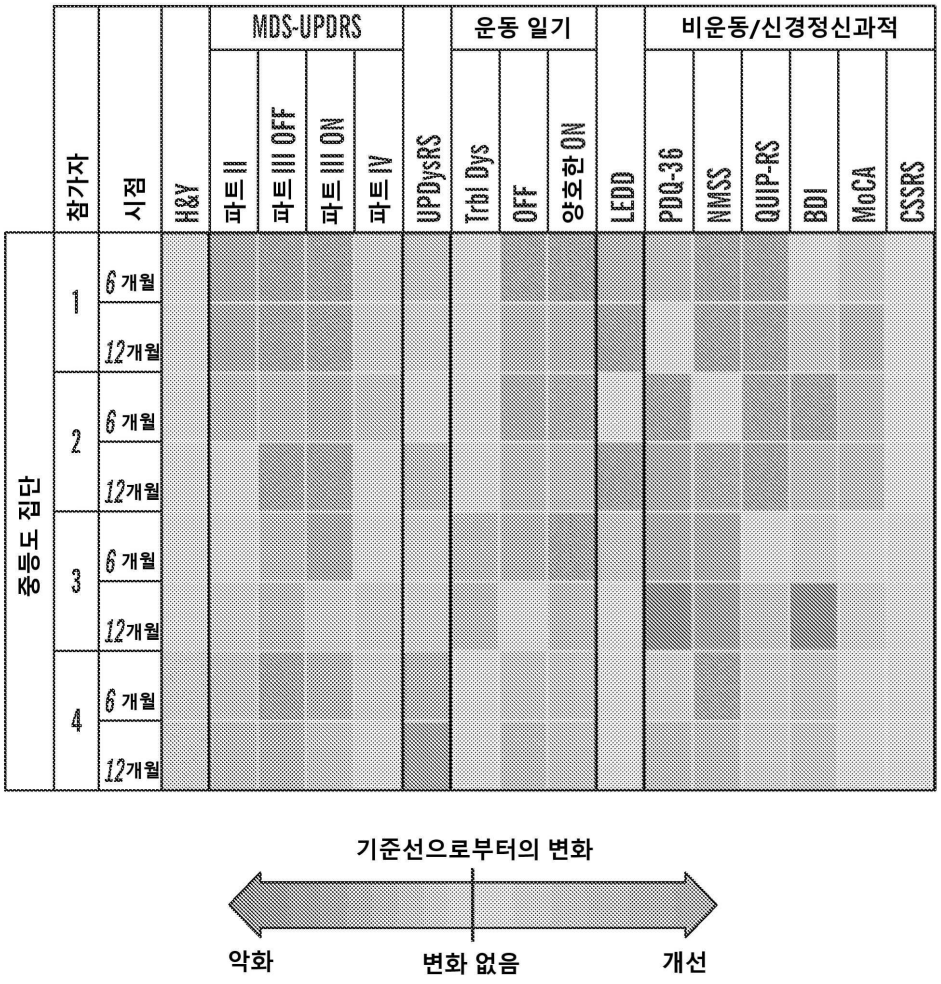
기관계 분류 선호 용어	수술 전후 n (%)	치료 후 n (%)
양성, 악성 및 불특정 신생물(신 낭종 및 용종)	0 (0)	1 (9)
편도암		1 (9)
생식기 및 유방 장애	0 (0)	1 (9)
외음질 불편감		1 (9)
호흡기, 흉부 및 종격동 장애	1 (9)	0 (0)
인후 자극	1 (9)	
피부 및 피하 조직 장애	1 (9)	0 (0)
안면 부종	1 (9)	
혈관 장애	1 (9)	0 (0)
레이노 현상	1 (9)	

적어도 하나의 SAE를 갖는 대상체	1 (9)	3 (27)
감염 및 침입	0 (0)	1 (9)
봉와직염		1 (9)
근골격계 및 결합 조직 장애	1 (9)	0 (0)
척추 골절	1 (9)	
양성, 악성 및 불특정 신생물(낭종 및 용종 포함)	0 (0)	1 (9)
편도암		1 (9)
신경계 장애	0 (0)	1 (9)
대뇌허혈		1 (9)

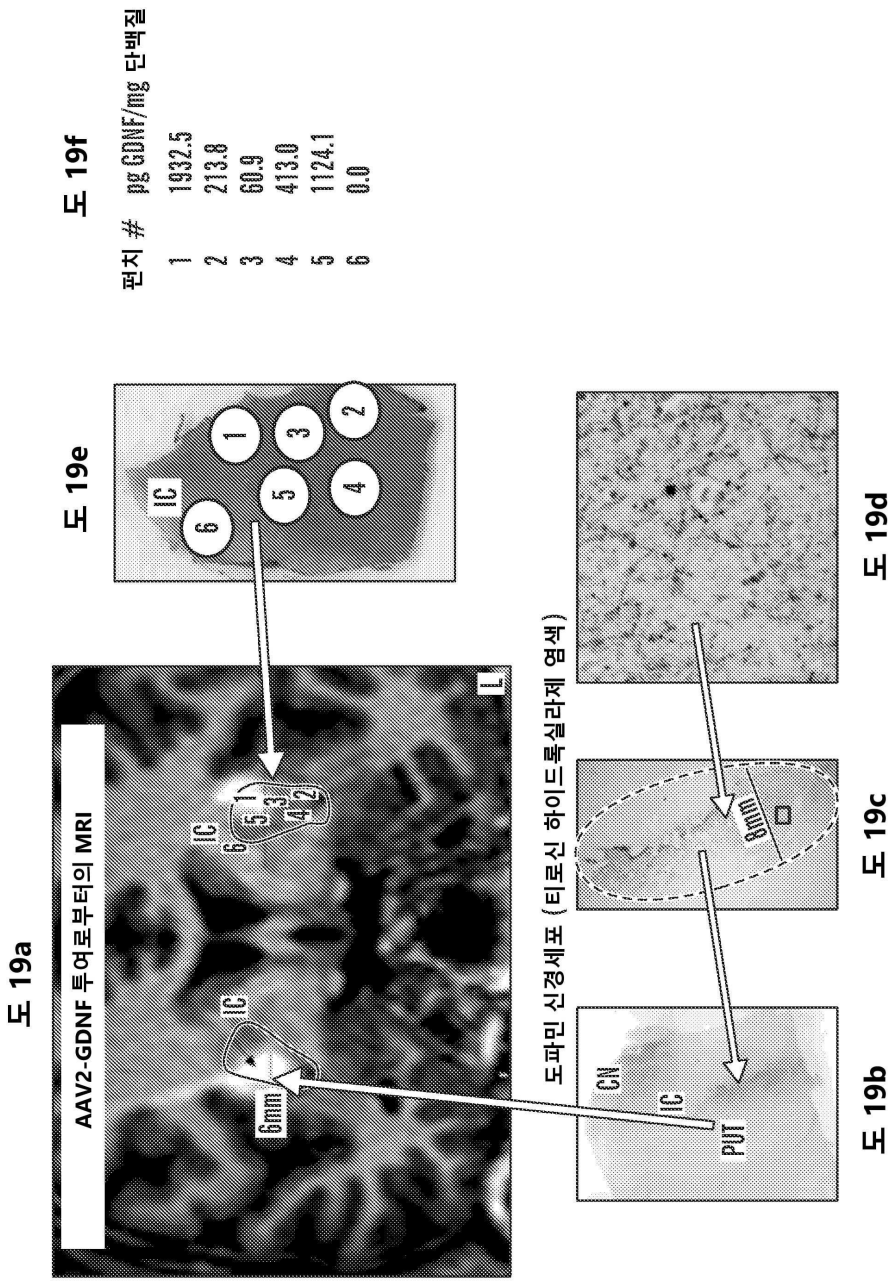
도면18a


경도 집단
참가자
시점
H&Y
MDS-UPDRS
파트 II
파트 III OFF
파트 III ON
파트 IV
UPDysRS
운동 일기
Trbl Dys
OFF
양호한 ON
LEDD
비운동/신경정신과적
PDQ-36
NMSS
QUIP-RS
BDI
MoCA
CSSRS
1
2
3
4
5
6
6 개월
12개월
기준선으로부터의 변화
악화
변화 없음
개선

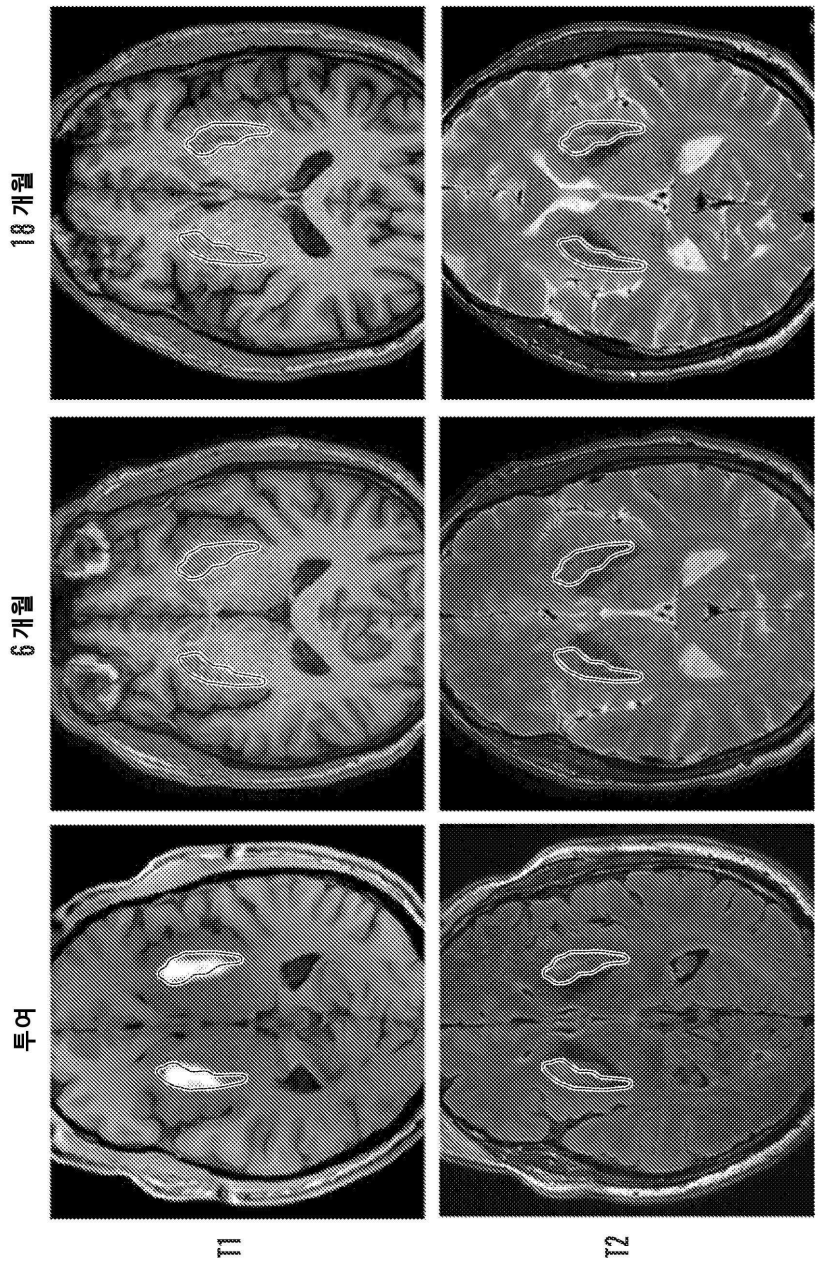
도면18b


MDS-UPDRS
운동 일기
비운동/신경정신과적
참가자
시점
H&Y
파트 II
파트 III OFF
파트 III ON
파트 IV
UPDysRS
Trbl Dys
OFF
양호한 ON
LEDD
PDQ-36
NMSS
QUIP-RS
BDI
MoCA
CSSRS
중등도 집단
1
2
3
4
6 개월
12개월
기준선으로부터의 변화
악화
변화 없음
개선

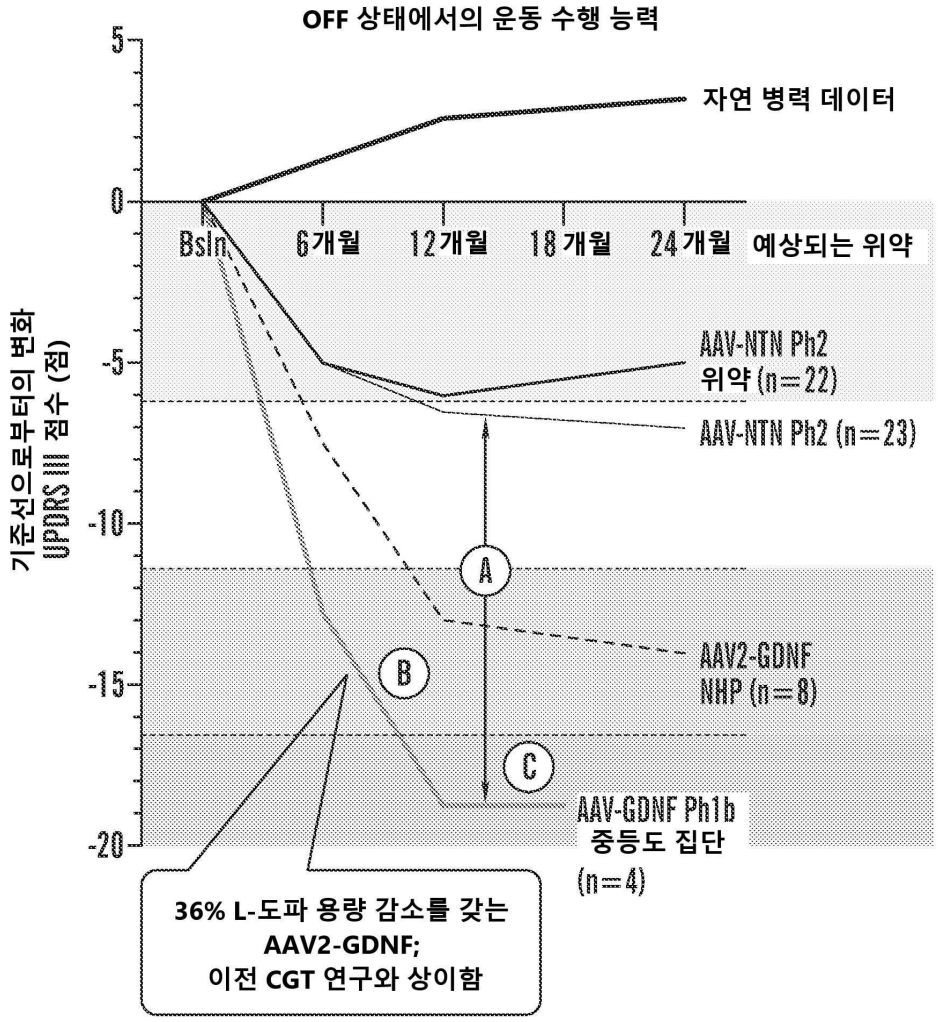
도면19


도 19a
AAV2-GDNF 투여로부터의 MRI
IC
6mm
L
IC
6 5 1 3 4 2
도 19e
IC
1
2
3
4
5
6
도 19f
펀치 # pg GDNF/mg 단백질
1 1932.5
2 213.8
3 60.9
4 413.0
5 1124.1
6 0.0
도파민 신경세포 (티로신 하이드록실라제 염색)
CN
IC
PUT
도 19b
8mm
도 19c
도 19d

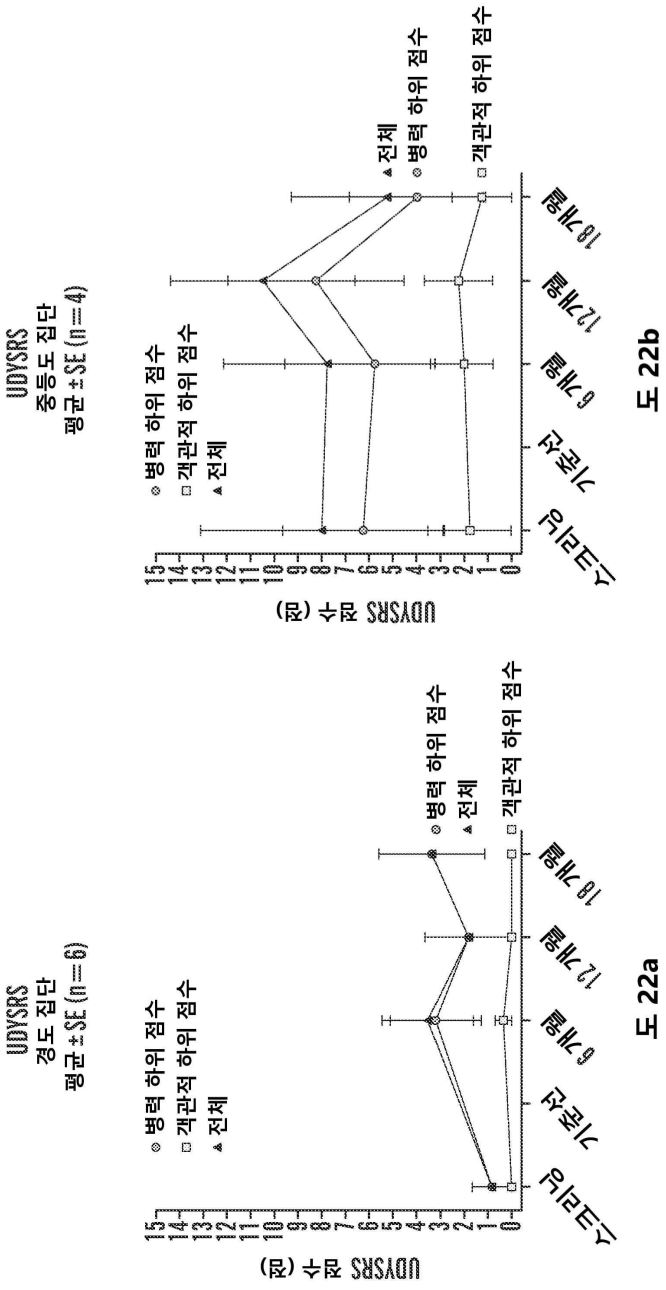
도면20



도면21


OFF 상태에서의 운동 수행 능력
기준선으로부터의 변화
UPDRS III 점수 (점)
5
0
-5
-10
-15
-20
Bsln
6개월
12개월
18개월
24개월
자연 병력 데이터
예상되는 위약
AAV-NTN Ph2
위약 (n=22)
AAV-NTN Ph2 (n=23)
A
B
C
AAV2-GDNF
NHP (n=8)
AAV-GDNF Ph1b
중등도 집단
(n=4)
36% L-도파 용량 감소를 갖는
AAV2-GDNF;
이전 CGT 연구와 상이함

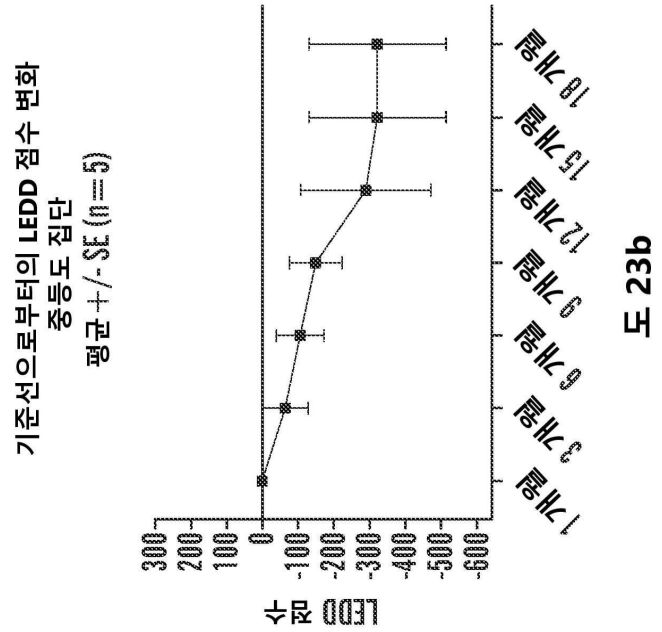
도면22



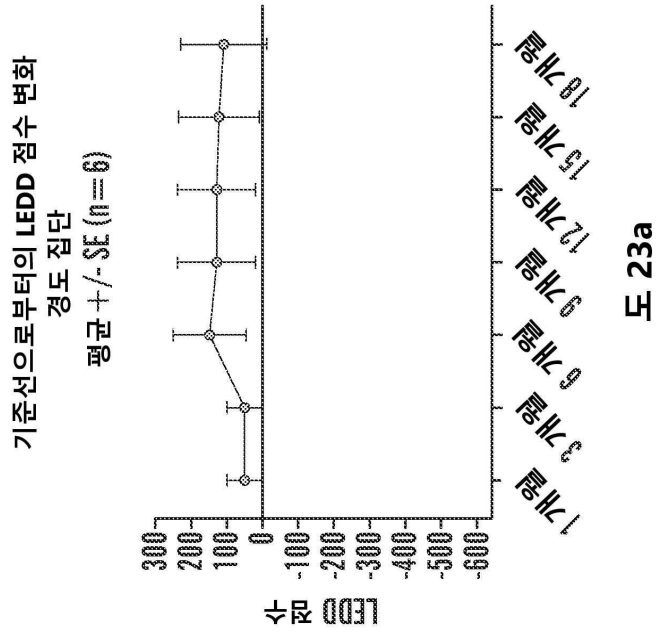
도 22a

도 22b

도면23

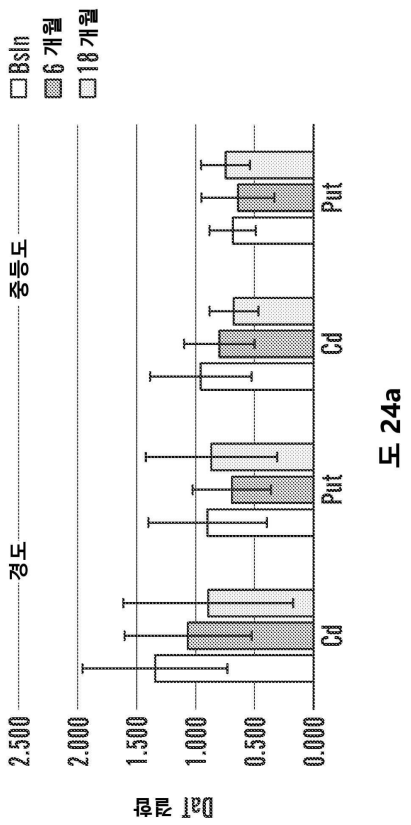


도 23b



도 23a

도면24



도 24a

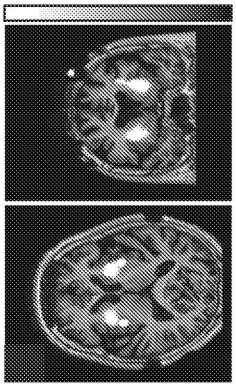
경도	Bsln	6개월	18개월
꼬리핵	1.341 ± 0.510	1.066 ± 0.512	0.891 ± 0.545
피각	0.899 ± 0.407	0.693 ± 0.266	0.864 ± 0.438

도 24b

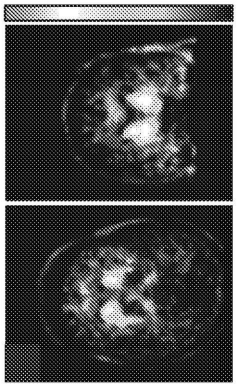
중등도	Bsln	6개월	18개월
꼬리핵	0.954 ± 0.401	0.802 ± 0.389	0.677 ± 0.257
피각	0.677 ± 0.258	0.643 ± 0.169	0.746 ± 0.198

도 24c

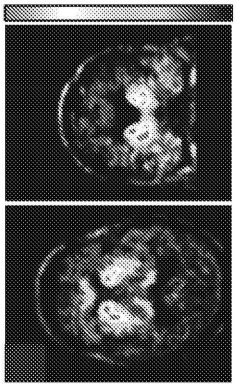
도면25



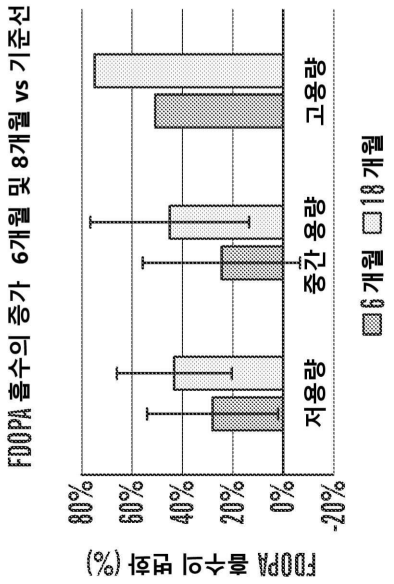
도 25a



도 25b

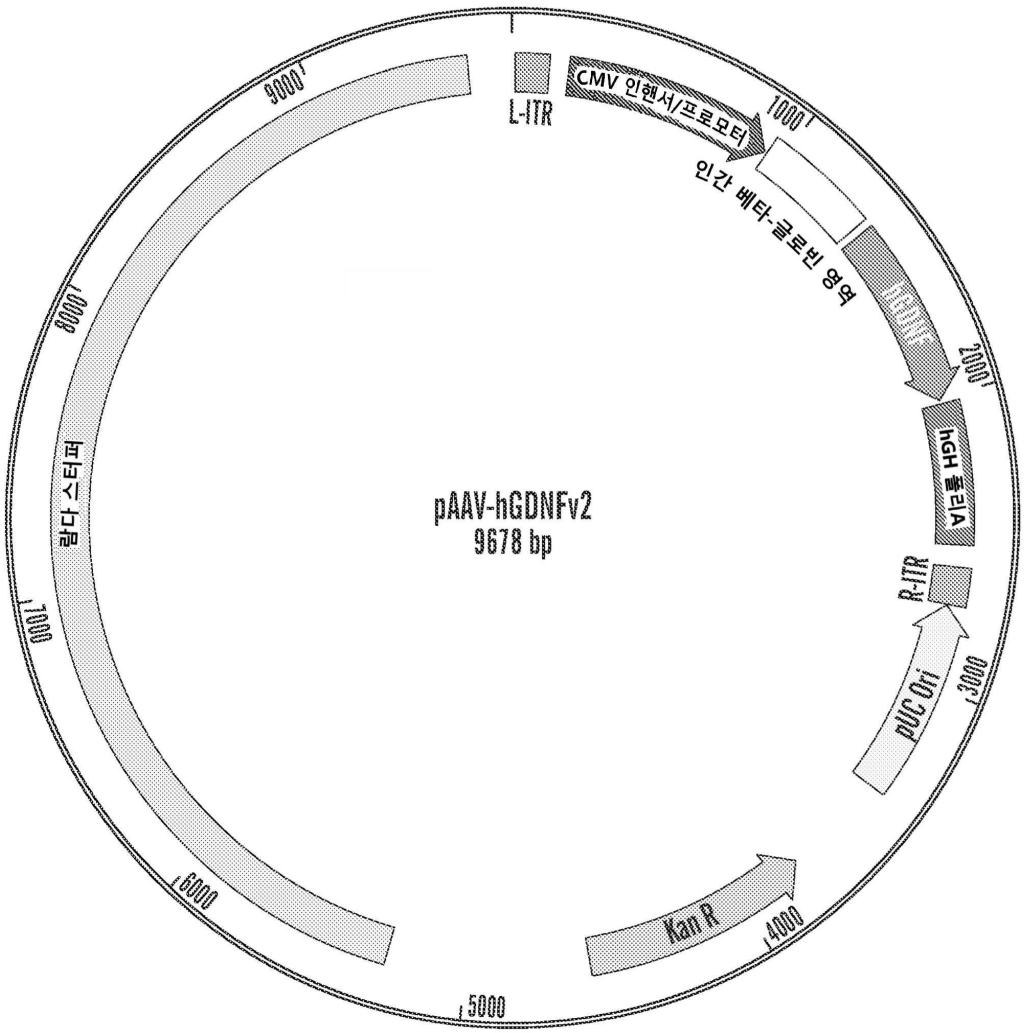


도 25c



도 25d

도면26


pAAV-hGDNFv2
9678 bp
L-ITR
CMV 인핸서/프로모터
인간 베타-글로빈 영역
hGH 폴리A
R-ITR
pUC Ori
Kan R
람다 스터퍼
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.