

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7261583号

(P7261583)

(45)発行日 令和5年4月20日(2023.4.20)

(24)登録日 令和5年4月12日(2023.4.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/7088 Z N A

A 6 1 K 35/761 (2015.01)

A 6 1 K 35/761

A 6 1 K 38/02 (2006.01)

A 6 1 K 38/02

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 13 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-515539(P2018-515539)

(86)(22)出願日 平成28年9月23日(2016.9.23)

(65)公表番号 特表2018-527941(P2018-527941  
A)

(43)公表日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/053347

(87)国際公開番号 WO2017/053732

(87)国際公開日 平成29年3月30日(2017.3.30)

審査請求日 令和1年9月20日(2019.9.20)

審判番号 不服2021-10424(P2021-10424/J  
1)

審判請求日 令和3年8月5日(2021.8.5)

(31)優先権主張番号 62/232,008

(32)優先日 平成27年9月24日(2015.9.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 502409813

ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ  
ーシティ・オブ・ペンシルベニア  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州191  
04フィラデルフィア・ナインスフロア  
ー・シビックセンタービルボード36  
00

(74)代理人 110000741

弁理士法人小田島特許事務所

(72)発明者 宋文超

アメリカ合衆国ペンシルベニア州190  
10プリンマー・コーネルドライブ21  
3

(72)発明者 ガリバリ, ダモダル

アメリカ合衆国ペンシルベニア州191

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 補体媒介性疾患を処置するための組成物及び方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

その発現を指図する発現制御配列に操作可能に連結されている人工改変ヒト補体調節物質H因子(fH)遺伝子を含む発現カセットをその中にパッケージングしているAAVキヤプシドを含む組換えAAVベクターであって、前記fH遺伝子は配列番号48のアミノ酸配列を含むfHバリエーションをコードする、組換えAAVベクター。

## 【請求項2】

前記キヤプシドは、AAV1、AAV2、AAV5、AAV8、AAVrh64R1、AAV9又はAAVrh10キヤプシドである、請求項1に記載の組換えAAVベクター。

## 【請求項3】

前記発現カセットは、肝細胞中でのhfHバリエーションの発現を特異的に指図するプロモータを含む、請求項2に記載の組換えAAVベクター。

## 【請求項4】

前記発現カセットは、眼について組織特異的なプロモータを含む、請求項1に記載の組換えAAVベクター。

## 【請求項5】

製薬学的に許容できる担体と、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の組換えAAVベクターとを含む、医薬組成物。

## 【請求項6】

補体関連障害の処置に使用するための、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の組換



え A A V ベクターまたは請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

(i) 前記補体関連障害は、デンスデボジット病及び C 3 系球体腎炎を包含する C 3 系球体腎症、非典型溶血性尿毒症症候群 ( a H U S )、加齢黄斑変性 ( A M D )、微小血管症性溶血性貧血、血栓性血小板減少性紫斑病 ( T T P )、急性腎不全、発作性夜間ヘモグロビン尿症 ( P N H )、統合失調症、虚血性脳卒中、及び / 又は細菌性病原体の動員により引き起こされる細菌感染症である、

(ii) 前記 A A V ベクターは、静脈内、眼内、筋肉内、皮下若しくはそれらの組合せから選択される経路を介して送達される、又は

(iii) タンパク質に基づく f H 治療が、ベクターの投与と同時に、それを必要とする被験体に送達される、

請求項 6 に記載の組換え A A V ベクター。

【請求項 8】

前記補体媒介性障害は加齢黄斑変性であり、

任意的に、前記ベクターは網膜下に投与される、

請求項 6 に記載の組換え A A V ベクター。

【請求項 9】

前記補体媒介性障害は腎障害である、請求項 6 に記載の組換え A A V ベクター。

【請求項 10】

配列番号 48 のアミノ酸配列を含む、人工改変ヒト f H バリエーション。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の人工改変ヒト f H バリエーションがペグ化されている、ペグ化ヒト f H バリエーション。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の人工改変ヒト f H バリエーション、及び担体及び / 又は賦形剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 13】

前記担体はリポソームである、

前記担体はナノ担体である、及び / 又は

前記人工改変 h f H バリエーションはペグ化されている、

請求項 12 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦に資金提供される研究若しくは開発に関する声明

本発明は、米国立保健研究所 ( N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h ) により与えられる助成金番号 A I 0 8 5 5 9 6 の下での政府支援を伴い生み出された。米国政府は本発明においてある種の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

補体系は生体防御において重要な役割を演じる自然免疫の一部である。補体は 3 種の異なる経路すなわち古典的、代替及びレクチン経路により活性化され得る。それらのなかで、代替経路は、それが、補体が「遊転」機構により活性化される独立した経路を表すのみならず、しかしまたそれが他の 2 経路により開始される補体活性化を増幅する点において独特である。代替経路は C 3、B 因子 ( f B )、D 因子 ( f D ) 及びプロパージン ( f P ) の参画を必要とする。全部の経路は、代替経路の増幅ループが活動し始める C 3 活性化段階で収束する。どの経路の補体活性化が発生するかに関係なく、活性化された補体は 3 種類のエフェクター機能：食作用および排除を助長するための C 3 b / i C 3 b / C 3 d での標的のオプソニン作用、炎症前メディエーター C 3 a 及び C 5 a の産生、並びに、膜侵襲複合体 ( M A C ) としてもまた知られる終末補体活性化エフェクター C 5 b - 9 によ

10

20

30

40

50



る直接的細胞攻撃を生じる。B細胞及び濾胞樹状細胞上のC R 2のような補体受容体(C R)、並びにマクロファージ及び単球のような白血球上のアナフィラトキシン受容体C 3 a受容体(C 3 a R)及びC 5 a受容体(C 5 a R)の活性化により、補体はまた適応免疫系と相互作用およびこれを交差調節もし、そして従ってB及びT細胞免疫学において調節性の役割を演じる。

#### 【0003】

多数のヒト疾患が補体調節不全により引き起こされ、補体媒介性の自己組織傷害をもたらす。補体調節不全は、これらの調節物質がもはや正常に機能しないような、補体調節物質若しくは調節物質関連遺伝子中の体細胞性若しくは生殖系列性いずれかの変異から生じうる。この分類の例は、G P I アンカー生合成における重要な酵素をコードするP I G - A 遺伝子の造血幹細胞中の変異を包含し、そして、こうした変異は、発作性夜間ヘモグロビン尿症(P N H)患者の血液細胞上のD A F及びC D 5 9の発現の欠如をもたらす。結果として、P N H患者の赤血球及び血小板は補体攻撃から保護されず、そしてそれらは血管内溶血及び血小板活性化を発生し、貧血及び血栓性発作に至る。第2の一例は、腎における補体の代替経路の過剰活性化をなす膜調節物質M C P又は液相調節物質f H若しくはf I中の変異であり、C 3系球体腎症若しくは非典型溶血性尿毒症症候群(a H U S)の発病に至る。D A F、C D 5 9、f H、f I及びM C Pの発現の非存在若しくは機能障害に至るこうした希少かつ高浸透性の変異に加え、より高頻度かつより低浸透性であるがしかしにもかかわらず補体媒介性の機構を介して疾患の発病に寄与することが同定されているf H中の一塩基多型(S N P)が存在する。非常に良好に特徴づけられている一例は、f H中のY 4 2 0 H多型の加齢黄斑変性(A M D)との強い関連である。従って、補体調節物質の機能障害若しくは配列の変動は普遍的な及び稀なヒト疾患につながりうる。

#### 【0004】

補体調節不全は、調節性変異/多型からのみならず、しかしまた、代替経路の極めて重要な成分すなわちC 3及びf Bをコードする遺伝子中の変異から、並びにf H、C 3若しくはf Bのような調節物質若しくは補体タンパク質に対する自己抗体の存在によっても生じうる。C 3若しくはf B中のある種の変異が、活性化される場合に調節性タンパク質による調節に抵抗性である異常に安定な代替経路C 3転換酵素C 3 b B bを形成するタンパク質をもたらすことができ、それが順に補体調節不全及び過剰活性化につながり得ることが、今や理解されている。補体調節物質に対する自己抗体の場合、それらはこうしたタンパク質をコードする遺伝子中の変異をしばしば模倣し、その結果は液相中若しくは細胞表面上のこうしたタンパク質の低下された機能的効力である。独立して、C 3腎炎因子(C 3 n e f)と呼ばれるC 3 bに対する自己抗体は、代替経路C 3転換酵素C 3 b B bを結合かつ安定化することが可能であり、従って、C 3若しくはf B遺伝子変異により生じられるものと同じ転換酵素の半減期の延長及び活性の効果を達成する。全体として、補体活性化カスケードの調節不全から生じる過度の補体活性化により引き起こされる普遍的及び希少ヒト疾患が存在する。補体調節不全の基礎機構は多様であり、一部は遺伝子変異にかつ他者は自己抗体により、そして自己抗体の変異遺伝子若しくは標的は代替経路の調節タンパク質若しくは成分であり得る。

#### 【0005】

現在の治療アプローチは、特定の代替経路若しくは終末経路補体成分を結合かつ阻害するm A b、ペプチド若しくは他の小分子のような試薬の開発に集中されている。臨床で検証された一例は、エクリズマブすなわちP N H及びa H U Sの処置のため承認された補体C 5に対するヒト化m A bである。記述されている他のアプローチは、f B、f D若しくはf Pに対するm A b、及びC 3を結合かつ阻害する環状ペプチドを包含する。これらのアプローチの限界は、それらが患者の頻回のかつ不便なI V投与を必要とすることである。さらに、それらは代替経路若しくは終末経路を阻害するため、それらは生体防御を損なうという危険を冒す。実際、エクリズマブ治療中の患者は、致死性の髄膜炎を引き起こす細菌株に対しワクチン接種されなければならない、そしてこれらの患者は、承認されたm A b薬で処置される前に予防的抗生物質治療もまた処方される。



## 【 0 0 0 6 】

他のアプローチにおいて、可溶性 D A F、C R 1、C R I g のような組換え調節タンパク質、並びに f H の最小ドメインを含んでなるタンパク質（N 末端ショートコンセンサスリピート [ S C R ] 1 - 5 及び C 末端 S C R 1 9 - 2 0 ）若しくは f H と C R 2 の間の融合タンパク質（T T 3 0 ）が試験されている。例えば、特許文献 1；特許文献 2 を参照されたい。しかしながら、治療薬としてのこうしたタンパク質の大スケールの異種発現は多大な労力を必要とし、また、動物研究は投与後のそれらの *i n v i v o* 消失速度が迅速であることを示しており（非特許文献 1；非特許文献 2）、こうした治療戦略を厄介かつより少なく現実的にする。こうしたタンパク質薬物の複数のかつ頻繁な投与が必要となるうからである。

10

## 【 0 0 0 7 】

より大きいかつより長期間持続する有効性を伴う、補体媒介性疾患を処置するのに有用な組成物に対する必要性が当該技術分野において今も存在する。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【 文献 】米国特許公開第 2 0 1 3 / 0 2 9 6 2 5 5 号明細書

米国特許公開第 2 0 0 8 / 0 2 2 1 0 1 1 号明細書

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 9 】

20

【 文献 】Nichols E M , Barbour T D , Pappworth I Y , Wong E K , Palmer J M , Sheerin N S , Pickering M C , Marchbank K J . Kidney Int . 2 0 1 5 Jul 2 9 . doi : 1 0 . 1 0 3 8 / k i . 2 0 1 5 . 2 3 3 .

Fridkis - Hareli M , Storek M , Mazsaroff I , Risitano A M , Lundberg A S , Horvath C J , Holers V M , Blood . 2 0 1 1 Oct 2 7 ; 1 1 8 ( 1 7 ) : 4 7 0 5 - 1 3 . doi : 1 0 . 1 1 8 2 / b l o o d - 2 0 1 1 - 0 6 - 3 5 9 6 4 6 . Epub 2 0 1 1 Aug 2 2 .

## 【 発明の概要 】

30

## 【 0 0 1 0 】

## [ 発明の要約 ]

一局面において、本発明は、その発現を指図する発現制御配列に操作可能に連結されている人工改変されたヒト補体調節物質 H 因子（f H）遺伝子を含んでなる発現カセットをその中にパッケージングしている組換えベクターを提供し、前記 h f H 遺伝子は補体調節機能を保持する可溶性 h f H タンパク質バリエーションをコードし、前記 f H バリエーションは、ショートコンセンサスリピート（S C R）1、2、3、4、19 及び 20 と、S C R 7、S C R 17 及び / S C R 18 のうち最低 1 種とを含んでなり、被験体への該ベクターの投与及び発現後に、h f H バリエーションの検出可能な血漿レベルが被験体で最低 1 週間存在する。

40

## 【 0 0 1 1 】

別の局面において、本発明は、その発現を指図する発現制御配列に操作可能に連結されている人工改変されたヒト補体調節物質 H 因子（f H）遺伝子を含んでなる発現カセットをその中にパッケージングしている組換え A A V ベクターを提供し、前記 h f H 遺伝子は補体調節機能を保持する可溶性 h f H タンパク質バリエーションをコードし、前記 f H バリエーションは、ショートコンセンサスリピート（S C R）1、2、3、4、19 及び 20 を含んでなり、被験体への該ベクターの投与及び発現後に、h f H バリエーションの検出可能な治療上有用な血漿レベルが被験体で最低約 1 か月間存在する。

## 【 0 0 1 2 】

さらなる一局面において、担体及び / 又は賦形剤、並びに f H バリエーションを発現する本

50



明細書に記述されるところの組換えベクターを含んでなる医薬組成物が提供される。

【 0 0 1 3 】

なお別の局面において、本明細書に記述されるところのベクターを被験体に送達することによる補体関連障害の処置方法が提供される。補体関連障害は、とりわけ、膜性増殖性糸球体腎炎、非典型溶血性尿毒症症候群（a H U S）、加齢黄斑変性（A M D）、微小血管症性溶血性貧血、血小板減少症、急性腎不全、発作性夜間ヘモグロビン尿症（P N H）、統合失調症、虚血性脳卒中、及び／又は細菌性病原体の動員により引き起こされる細菌感染症でありうる。

【 0 0 1 4 】

さらなる一局面において、A M Dを処置するための組換えベクターの使用が提供される。別の局面において、P N H、a H U S、若しくは別の補体関連障害を処置するためのr A A Vベクターの使用が記述される。

10

【 0 0 1 5 】

別の局面において、リーダー配列、並びに：（a）S C R 1 - 4、7及び19 - 20；（b）S C R 1 - 4、6、7及び19 - 20；（c）S C R 1 - 4、7、8及び19 - 20；（d）S C R 1 - 4、6、7、8及び19 - 20；（e）S C R 1 - 4、17及び19 - 20；（f）S C R 1 - 4及び18 - 20；（g）S C R 1 - 4及び17 - 20よりなるヒト補体受容体S C Rを含んでなる、人工改変されたh f Hバリエーションが提供される。他の態様は、例えば、S C R 1 - 4、7及び18 - 20；S C R 1 - 4、6、7及び18 - 20；S C R 1 - 4、7、8及び18 - 20；若しくはS C R 1 - 4、6、7、8及び18 - 20、S C R 1 - 4、7及び17 - 20；S C R 1 - 4、6、7及び17 - 20；S C R 1 - 4、7、8及び17 - 20；若しくはS C R 1 - 4、6、7、8及び17 - 20を包含する。場合によっては、最低1個の糖鎖付加部位がS C Rの最低1個中に人工改変される。別の局面において、人工改変されたh f Hバリエーションの1種がペグ化される。

20

【 0 0 1 6 】

なお別の局面において、最低1種類の人工改変されたh f Hバリエーション、担体及び／又は賦形剤を含んでなる医薬組成物が提供される。こうした組成物は、それ自体で、若しくは別の治療、具体的には例えば本明細書に記述されるベクター治療との組合せで使用しうる。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の局面及び利点は、本発明の以下の詳細な記述から容易に明らかであることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

【図 1 A】成熟ヒトH因子タンパク質のドメイン構造の図解を提供する。

【図 1 B - 1 E】リーダーペプチドの核酸及びアミノ酸配列を提供し、かつ、下の実施例で具体的に説明されるf Hバリエーションの生成において使用される20種のショートコンセンサスリピート（S C R）ドメインの場所を同定する。配列番号1は該核酸配列を提供し；配列番号2はシグナルペプチドのアミノ酸配列を提供する。S C R 1 - 20のアミノ酸配列は、配列番号3（S C R 1）、5（S C R 2）、7（S C R 3）、9（S C R 4）、11（S C R 5）、13（S C R 6）、14（S C R 7）、16（S C R 8）、17（S C R 9）、19（S C R 10）、21（S C R 11）、23（S C R 12）、25（S C R 13）、27（S C R 14）、29（S C R 15）、31（S C R 16）、33（S C R 17）、35（S C R 18）、37（S C R 19）及び38（S C R 20）にそれぞれ提供される。f Hアイソフォーム1中のこれらのドメインの場所は、C . E s t a l l e rら、E u r J I m m u n o l . 1 9 9 1 M a r ; 2 1 ( 3 ) : 7 9 9 - 8 0 2 に記述される規約に基づく。定義されるS C R間のアミノ酸配列はf Hの柔軟性を提供するリンカー配列である[それぞれ配列番号4、6、8、10、12、15、18、20、22、24、26、28、30、32、34及び36]。S C R 19とS C R 20の間のリンカーはわずか3アミノ酸（L e u - H i s - P r o）であり、そして従って配列表中で

40

50



特徴により生成されない。

【図 2 A】S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト H 因子バリエーションの図解のドメイン構造を提供する。

【図 2 B - 2 C】f H バリエーション S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 のリーダーペプチド及び 9 種のショートコンセンサスリピート ( S C R ) ドメインの核酸 [ 配列番号 4 1 の n t 5 3 - 1 8 0 4 ] 及びアミノ酸配列 [ 配列番号 4 2 ] を提供する。

【図 3 A - 3 B】リーダーペプチド並びに S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト H 因子短縮化構築物 ( h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) の完全な c D N A [ 配列番号 4 1 の n t 5 3 - 1 8 0 4 ] 並びに 5 ' - [ 配列番号 4 1 の n t 1 - 5 2 ] 及び 3 ' - U T R [ 配列番号 4 1 の n t 1 8 0 5 - 2 0 6 8 ] である。

【図 4】リーダーペプチド ( 下線 ) 及び S C R 1 - 4、6 - 8、1 9 - 2 0 を含有する H 因子短縮化構築物 ( h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) のアミノ酸配列である [ 配列番号 4 2 ] 。

【図 5 A - 5 B】h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 のタンパク質発現及び安定性の確認を提供するゲルである。S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト f H 短縮化バリエーション [ 配列番号 4 1 ] の図 2 に示される c D N A 配列を真核生物発現ベクター中にクローン化し、それをその後使用して H E K 細胞をトランスフェクトした。細胞培養物上清をウエスタンブロット分析に使用して切断型 f H タンパク質発現を検出した。パネル A : レーン 1、トランスフェクトされない H E K 細胞 ; レーン 2 及び 3、f H 短縮化バリエーションの c D N A を含有する p C M V S p o r t 6 ベクターでトランスフェクトされた H E K 細胞 ; レーン 4 - 6、f H バリエーション c D N A を含有する p C B A R B G ベクターでトランスフェクトされた H E K 細胞。p C B A R B G ベクターは、図 4 に示される p A A V ベクター構築物と同一の 5 ' 及び 3 ' 調節エレメントを含有する。パネル B : レーン 1、トランスフェクトされない H E K 細胞 ; レーン 2、対照として切断型 f H バリエーションの c D N A を含有する p C B A R B G ベクターでトランスフェクトされた H E K 細胞 ; レーン 3、切断型 f H バリエーションの c D N A を含有する A A V 8 プラスミドでトランスフェクトされた H E K 細胞。

【図 6】組換え h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の精製を示す S D S ゲルである。S D S ゲル分析は、p C B A R B G ベクターを使用して H E K 細胞をトランスフェクトすることにより発現された S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト f H 短縮化バリエーションのクマシーブルー染色を介して実施した。該組換え f H 短縮化タンパク質は、S C R 2 - 3 中の 1 エピトープを認識するヒト H 因子に対する m A b ( クローン O X - 2 3 ) を使用して製造されたアフィニティークラムを通過させることにより上清から精製した。タンパク質分子量マーカーのサイズと位置を左側に示す。

【図 7】組換え h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 が補体調節活性 ( 補助因子活性 ) を保持することを示すゲルである。S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト f H 短縮化バリエーションを、I 因子に媒介される C 3 b 切断のための補助因子活性について試験した。このアッセイのため、ヒト C 3 b を、完全長 f H ( h f H ) 若しくは切断型 f H バリエーション ( h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) の存在 ( レーン 1 - 6 ) 若しくは非存在 ( レーン 7 ) 下で I 因子と混合した。反応混合物をインキュベートし、そしてその後 S D S - P A G E 及びウエスタンブロット分析により分析した。補助因子活性は i C 3 b 鎖フラグメントの出現により示される。

【図 8】組換え h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ( 四角、上の線 ) が強いヘパリン結合活性を有することを示す線グラフである。S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト f H 短縮化バリエーションはヘパリン結合活性を保持する。そのヘパリン結合活性は用量依存性であり、そして  $\mu g / m l$  に基づき完全長ヒト f H ( 菱形、下の線 ) と比較した場合、それはより高い活性を示した。ヘパリン結合活性は、プレート被覆されたヘパリン、完全長若しくは切断型 f H タンパク質溶液のオーバーレイ、及び洗浄後に m A b O X - 2 3 ( S C R 2 - 3 中の 1 エピトープに対する ) による結合された f H 若しくは切断型 f H の検出を使用する E L I S A により評価した。

10

20

30

40

50



【図 9】組換え h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ( 正方形、上の線 ) が強い C 3 b 結合活性を有することを示す線グラフである。S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するヒト f H 短縮化バリエーションは C 3 b 結合活性を保持する。その C 3 b 結合活性は用量依存性であり、そして  $\mu\text{g} / \text{mL}$  に基づき完全長ヒト f H ( 菱形、下の線 ) と比較した場合、それはより高い活性を示した。C 3 b 結合活性は、プレート被覆された C 3 b、完全長若しくは切断型 f H タンパク質溶液のオーバーレイ、及び洗浄後に m A b O X - 2 3 ( S C R 2 - 3 中の 1 エピトープに対する ) による結合された f H 若しくは切断型 f H の検出を使用する E L I S A により評価した。

【図 1 0】A A V 8 媒介性 f H 遺伝子治療 1 週後の 3 匹の異なる f H 変異体マウス ( f H  $m/m$ ; F 1、F 2、F 2 0 ) の血液中の h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の E L I S A 検出を示す線グラフである。f H  $m/m$  マウスは S C R 1 9 の始めに未成熟な終止コドンを含む f H 変異体マウスの一系統である。これらマウスは痕跡量の切断型 f H ( S C R 1 9 - 2 0 を欠く ) を産生し、そして液相代替経路補体活性化及び消費制御不全 ( 二次的 C 3 及び f B 欠乏症 ) を有する。マウスを、h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 (  $3 \times 10^{11}$  遺伝子コピー / マウス ) を含有する A A V 8 ウイルスで後眼窩 I . V . により感染させ、そして 1 週後に血液サンプルを収集しかつヒト f H タンパク質検出のため処理した。E L I S A アッセイのため、m A b O X - 2 3 を捕捉抗体 ( ヒト f H S C R 2 - 3 中の 1 エピトープを認識する ) として使用し、そしてビオチニル化 m A b L 2 0 / 3 を検出抗体 ( ヒト f H S C R 1 9 を認識する ) として使用した。図に示されるとおり、A A V - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 処置前 ( P r e ) に、3 f H  $m/m$  マウス ( F 1、F 2、F 2 0 ) の血液中に h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 は存在しないが、しかし h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 は処置 1 週間後 ( 1 W ) に検出された。

【図 1 1】f H  $m/m$  マウスにおける A A V 8 媒介性のヒト f H 遺伝子治療が、十分な内因性マウス f H 発現の欠如により代替経路補体活性化を阻害し、処置されない f H  $m/m$  マウスは制御されない液相代替経路補体活性化を有し、そして結果としてそれらが血漿 C 3 及び f B を消費する ( W T のレーン 1 を遺伝子治療前の 3 f H  $m/m$  マウスのレーン 2、4、6 と比較されたい ) ことを示すウエスタンブロット分析である。f H  $m/m$  マウスを A A V 8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置した 1 週間後、血漿 C 3 及び f B レベルは処置前のレベルと比較して有意に増大し、A A V 8 媒介性のヒト f H 遺伝子治療が制御されない代替経路補体活性化並びに C 3 及び f B 消費を阻害したことを示唆する。全 3 マウス ( F 1、F 2 及び F 2 0 ) が後眼窩 I . V . を介してそれぞれ  $3 \times 10^{11}$  遺伝子コピーを受領した。

【図 1 2 A】S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 7 - 2 0 を含有するヒト H 因子バリエーションの図解のドメイン構造を提供し、N - 糖鎖付加部位の場所を矢印により具体的に説明する。

【図 1 2 B - 1 2 C】f H バリエーション S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 7 - 2 0 のリーダーペプチド及び 1 1 種のショートコンセンサスリピート ( S C R ) ドメインの核酸及びアミノ酸配列を提供する [ それぞれ配列番号 4 5 及び 4 6 ]。

【図 1 3】リーダーペプチド並びに S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 7 - 2 0 を含有するヒト H 因子バリエーション ( h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 ) の完全な c D N A および 5 ' U T R 配列である ( 5 ' U T R は大文字である ) [ 配列番号 4 7 ]。

【図 1 4】リーダーペプチド ( 下線 ) 並びに S C R 1 - 4、6 - 8 及び 1 7 - 2 0 を含有する H 因子短縮化構築物 ( h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 ) のアミノ酸配列である [ 配列番号 4 8 ]。

【図 1 5 A - 1 5 C】変動する用量の A A V 8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 で処置された 3 f H 変異体マウスの血漿中の h f H 1 - 4 . 6 - 8 . 1 7 - 2 0 タンパク質の E L I S A 検出を示す。f H  $m/m$  マウスは S C R 1 9 の始めに未成熟な終止コドンを含む f H 変異体マウスの一系統である。これらマウスは痕跡量の切断型 f H ( S C R 1 9 - 2 0 を欠く ) を産生し、そして液相代替経路補体活性化及び消費制御不全 ( 二次的 C 3 及び f B 欠乏症 ) を有する。マウスを、3 つの用量すなわちそれぞれ  $1 \times 10^{12}$  遺伝子コピー ( G C ) / マウス、 $3 \times 10^{11}$  G C / マウス及び  $1 \times 10^{11}$  G C / マウスの h f H 1 -



4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 を含有する A A V 8 ウイルスで後眼窩 I . V . により感染させた。血漿サンプルを、A A V 処置前 ( P r e ) 又は A A V 処置後 1 週 ( W 1 ) 、 2 週 ( W 2 ) 、 1 か月 ( M 1 ) 、 2 か月 ( M 2 ) 若しくは 3 か月 ( M 3 ) に E L I S A アッセイのため回収した。E L I S A アッセイのため、m A b O X - 2 3 を捕捉抗体 ( ヒト f H S C R 2 - 3 中の 1 エピトープを認識する ) として使用し、かつ、ビオチニル化 m A b L 2 0 / 3 を検出抗体 ( ヒト f H S C R 1 9 を認識する ) として使用した。図に示されるとおり、A A V - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 処置前 ( P r e ) の f H<sup>m/m</sup>マウスの血液中に h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 は存在しないが、しかし、高レベルの h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 が A A V 処置後に検出され、そして h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 発現は最低 3 か月間安定のままであった。

10

【図 1 6 A - 1 6 C】f H<sup>m/m</sup>マウスの A A V 8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 遺伝子治療での処置が代替経路補体活性化を阻害することを示すウエスタンブロット分析である。十分な内因性マウス f H 発現の欠如により、処置されない f H<sup>m/m</sup>マウスは液相代替経路補体活性化制御不全を有し、そして結果として、それらは血漿 C 3 及び f B を消費する ( レーン 1 ) 。それぞれ  $1 \times 10^{12}$  遺伝子コピー ( G C ) / マウス ( 図 1 6 A ) 、  $3 \times 10^{11}$  遺伝子コピー ( G C ) / マウス ( 図 1 6 B ) 及び  $1 \times 10^{11}$  遺伝子コピー ( G C ) / マウス ( 図 1 6 C ) で後眼窩 I . V . により処置された 3 f H<sup>m/m</sup>マウスにおいて、代替経路補体活性化が、処置されたマウスを A A V 8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 遺伝子治療後 1 週 ( W 1 ) 、 1 か月 ( M 1 ) 、 2 か月 ( M 2 ) 及び 3 か月 ( M 3 ) で検査した場合に、血漿 C 3 及び f B の対応する回復を伴い予防された。すべての処置投薬量及び時間点 ( レーン 2 、 3 、 4 、 5 ) において、血漿 C 3 及び f B は、A A V 8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 遺伝子治療後に処置前 ( P r e 、 レーン 1 ) より顕著に高かった。

20

【図 1 7 A - 1 7 C】マウスにおけるリーダーペプチド及び 2 0 種のショートコンセンサスリピート ( S C R ) ドメインの核酸及びアミノ酸配列 [ それぞれ配列番号 7 9 及び 8 0 ] を示す。定義される S C R の間のアミノ酸配列は f H に柔軟性を与えるリンカー配列である。

【図 1 8 A - 1 8 B】マウス f H バリエーションのリーダーペプチド及び 9 種のショートコンセンサスリピート ( S C R ) ドメインの核酸及びアミノ酸配列 [ それぞれ配列番号 8 1 及び 8 2 ] を提供する。定義される S C R の間のアミノ酸配列は f H タンパク質に柔軟性を与えるリンカー配列である。マウス f H のこのバリエーションを、後の研究において h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の i n v i v o 機能を試験するための代理物として使用する。

30

【図 1 9】リーダーペプチド ( 下線 ) 及び S C R 1 - 4 、 6 - 8 、 1 9 - 2 0 を含有するマウス H 因子短縮化構築物 ( m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) のコーディング配列並びに 5 ' 及び 3 ' - U T R 配列 [ 配列番号 4 3 ] を提供する。

【図 2 0】リーダーペプチド ( 下線 ) 並びに S C R 1 - 4 、 6 - 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するマウス H 因子短縮化構築物 ( m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) のアミノ酸配列 [ 配列番号 4 4 ] を提供する。

【図 2 1】m f H 1 - 4 . 1 9 - 2 0 及び m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 のタンパク質発現及び安定性の確認を示すゲルである。S C R 1 - 4 、 6 7 8 及び 1 9 - 2 0 を含有するマウス f H 短縮化バリエーションの c D N A 配列、若しくは S C R 1 - 4 及び 1 9 - 2 0 を含有する別の f H 短縮化バリエーションの c D N A 配列を、真核生物発現ベクター p C B A R B G にクローン化し、それをその後使用してマウス肝細胞株 H e p a 1 C 1 C 7 細胞をトランスフェクトした。細胞培養物上清をウエスタンブロット分析に使用して切断型マウス f H タンパク質発現を検出した。M : 分子量マーカー ; レーン 1 、トランスフェクトされない H e p a 1 C 1 C 7 細胞 ( 対照 ) ; レーン 2 及び 3 、 p C B A R B G - m f H 1 - 4 . 1 9 - 2 0 クローン 3 若しくはクローン 4 でトランスフェクトされた H e p a 1 C 1 C 7 細胞 ; レーン 5 及び 6 、 p C B A R B G - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 クローン 1 ( センス ) 若しくはクローン 2 ( アンチセンス ) でトランスフェクトされた H e p a 1 C 1 C 7 細胞。

40

50



【図 2 2 A】血液サンプルを f H タンパク質検出のためどのように収集かつ処理したかを示すフローチャートである。f H<sup>m/m</sup>マウスは、S C R 1 9 の始めに未熟な終止コドンを運搬する f H 変異体マウスの一列である。これらマウスは痕跡量の切断型 f H ( S C R 1 9 - 2 0 を欠く ) を産生し、そして制御されない液相代替経路補体活性化及び消費 ( 二次的 C 3 及び f B 欠乏症 ) を有する。マウスを m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 を含有する A A V 8 ウイルス (  $3 \times 10^{12}$  遺伝子コピー / マウス ) で後眼窩 I . V . により感染させ、そして 1 週後に、フローチャートに示されるとおり血液サンプルを収集し、処理し、かつ分析した。

【図 2 2 B】A A V 8 媒介性 f H 遺伝子治療 1 週後の f H 変異体マウス ( f H<sup>m/m</sup> ) の血液中の m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 のウエスタンブロット検出である。図に示されるとおり、W T 及び処置されない f H<sup>m/m</sup>マウスに m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ( およそ 7 0 k d ) が存在しなかった。3 匹のウイルスに感染させた f H<sup>m/m</sup>マウス M 3、F 1 0、F 3 0 ( M は雄性を示しかつ F は雌性を示す ) において、m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 が明確に検出された。

【図 2 3】f H<sup>m/m</sup>マウスにおける A A V 8 媒介性 f H 遺伝子治療が代替経路補体活性化制御不全を予防することを示すウエスタンブロット分析である。十分な内因性 f H 発現の欠如により、未処置 f H<sup>m/m</sup>マウスは液相代替経路補体活性化制御不全を有し、そして結果としてそれらは血漿 C 3 及び f B を消費する ( W T のレーン 1 を遺伝子治療前の f H<sup>m/m</sup>マウスのレーン 2、5、8 と比較されたい )。f H<sup>m/m</sup>マウスを A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置した後、1 週 ( 1 W、レーン 3、6、9 ) 及び 1 か月 ( 1 M、レーン 4、7、10 ) で血漿 C 3 及び f B レベルが W T のレベルに回復され、A A V 8 媒介性 f H 遺伝子治療が代替経路補体活性化制御不全並びに C 3 及び f B 消費を予防したこと、並びに、治療効果が早くも 1 週から明らかでありかつ最低 1 か月持続することを示唆する。

【図 2 4】A A V 8 媒介性 f H 遺伝子治療が致死性 C 3 系球体腎症のマウスモデルにおいて代替経路補体活性化制御不全を予防することを示すウエスタンブロット分析である。プロパージンもまた欠乏している f H<sup>m/m</sup>マウス ( f H<sup>m/m</sup> P<sup>-/-</sup> ) において、C 3 及び f B 消費を伴う類似の制御されない代替経路補体活性化が発生する。f H<sup>m/m</sup>マウスと比較して、f H<sup>m/m</sup> P<sup>-/-</sup> マウスは致死性の形態の C 3 G を発症し、そしてそれらは 1 0 ~ 1 2 週齢までに死亡する。この実験において、それぞれ約 7 週齢の 2 f H<sup>m/m</sup> P<sup>-/-</sup> マウスを、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0、若しくは対照群 ( 対照 A A V ) として空の A A V 8 ベクター ( p A A V . T B G . r B G ) で処置した。A A V 8 遺伝子治療 1 週後に血液サンプルを回収し、そして C 3 及び f B レベルについてウエスタンブロットにより分析した。該パネルに示されるとおり、A A V 8 処置前の血液サンプル ( p r e ) と比較して、対照 A A V 8 処置後 1 週 ( 1 W ) に無傷の C 3 若しくは f B レベルの差異が存在しなかった ( レーン 2 - 5 )。しかしながら、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の処置 1 週後のマウスにおける血漿 C 3 及び f B レベルは有意に増大し ( レーン 6 - 9 )、代替経路補体活性化制御不全が遺伝子治療により阻害されたことを示唆する。マウスは後眼窩 I . V . 注入を介して A A V 8 (  $3 \times 10^{12}$  遺伝子コピー / マウス ) で処置した。

【図 2 5】A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療で処置された f H<sup>m/m</sup> P<sup>-/-</sup> ( 図 2 4 からの M 3 ) の長期経過観察を示す。C 3 及び f B が遺伝子治療後に野生型マウスレベルに持続的に上昇したことを示し、治療効果が長期間持続したことを示唆する、遺伝子治療前 ( P r e )、並びに A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 での処置後 1 週 ( 1 W )、1、2、3、4、5 及び 6 か月 ( 1 M、2 M、3 M、4 M、5 M、6 M ) の血漿 C 3 及び f B レベルのウエスタンブロット分析。

【図 2 6】A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療で処置された f H<sup>m/m</sup> P<sup>-/-</sup> ( 図 2 4 からの M 3 ) の長期経過観察を示す。治療的タンパク質薬物としての m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 が持続的に発現されたことを示す、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置する前 ( P r e )、並びに 1 週、1、2、3、4、5 及び

10

20

30

40

50



6 か月 ( M ) 後の m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質の血漿レベルの E L I S A 分析。

【図 2 7】C 3 系球体腎症における腎の病理の予防における A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療の有効性を示す。対照 A A V 8 ベクターで処置された f H<sup>m</sup>/m P<sup>-/-</sup>マウス ( 図 2 4 からのマウス M 1 ) は処置の 2 週以内に瀕死状態となり、そしてその腎の免疫染色は、未処置 f H<sup>m</sup>/m P<sup>-/-</sup>マウスについて以前に記述されたとおり強い系球体 C 3 沈着を示した ( 左パネル )。対照的に、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ベクターで処置された f H<sup>m</sup>/m P<sup>-/-</sup>マウス ( 図 2 3 からの M 3 ) は生き残り、そして処置後 6 か月でなお健康であり、その時点でそれを 殺しかつ腎の組織像について分析した。系球体 C 3 沈着はこのマウスで検出されず ( 右パネル )、C 3 系球体腎症が A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療により予防されたことを示唆する。

10

【図 2 8 A - 2 8 B】A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療が膜調節物質機能障害により引き起こされる代替経路補体活性化を予防することを示す。この実験において、2 種の膜調節物質 D A F 及び C r r y が欠乏しているマウスを A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ( 後眼窩経路、I . V . 、 $3 \times 10^{12}$  遺伝子コピー / マウス ) で処置した。血漿サンプルを、遺伝子治療前及び 1 週後 ( 1 W ) に回収してウエスタンブロットにより血漿 C 3 ( A ) 及び f B ( B ) レベルを分析した。該データにより示されるとおり、D A F / C r r y 二重変異体マウスは、C 3 及び f B レベル低下を伴う過度の代替経路補体活性化を有した ( P r e )。A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 処置後、C 3 及び f B 双方が野生型マウスレベルに復帰し、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 処置が膜補体調節物質により引き起こされる病態を是正し得ることを示唆する。このデータは、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 処置が、根底にある調節機構の欠陥に関係なく、代替経路補体調節制御不全により引き起こされる補体媒介性疾患に広範に有効であったことを示唆した。本研究で使用された D A F / C r r y 二重変異体マウスは D A F ノックアウトマウスと C r r y<sup>flox/flox</sup> - T i e - 2 C r e<sup>+</sup>マウスの間の交雑種である。T i e - 2 - C r e は生殖細胞中で発現されるため、それは一部子孫における C r r y 遺伝子の生殖系列欠失につながり、全体的 C r r y 欠失に至る。

20

【図 2 9 A - 2 9 B】読み出し情報として C 3 回復を使用する A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療の投薬量比較を提供する。この実験において、多様な用量の A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 を f H<sup>m</sup>/m マウスに投与した ( 後眼窩経路、I . V . )。各 2 マウスに以下の投薬量： $1 \times 10^{12}$  遺伝子コピー / マウス ( M # 1、M # 2 )、 $3 \times 10^{11}$  遺伝子コピー / マウス ( M # 3、M # 6 ) 及び  $1 \times 10^{11}$  遺伝子コピー / マウス ( M # 4、M # 5 ) を与えた。ウエスタンブロットを実施して、遺伝子治療前 ( P r e ) 及び 1 週 ( 1 W ) 若しくは 1 か月 ( 1 M ) 後の血漿 C 3 レベルを分析した。示されるとおり、試験された全部の用量は、1 W 及び 1 M の時間点で検査される場合に血漿 C 3 レベルを増大させることが可能であった。

30

【図 3 0 A - 3 0 B】読み出し情報として f B 回復を使用する A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 遺伝子治療の投薬量比較を提供する。ウエスタン分析は、本質的に、C 3 を読み出し情報として使用した図 2 9 A - B において記述されるとおり実施した。示されるとおり、試験された全部の用量は、1 W 及び 1 M の時間点で検査される場合に血漿 f B レベルを増大させることが可能であった。

40

【図 3 1】マウス f H の S C R 2 0 中の W から R への突然変異 ( 位置 1 2 0 6、ヒト f H 中の位置 1 1 8 3 に対応する ) を導入するのに使用された遺伝子ターゲティング戦略を示す図解である。

【図 3 2】野生型同腹仔マウス及び f H 中に W 1 2 0 6 R 突然変異を有する変異体マウスの生存曲線を示す。f H 変異体マウスは a H U S の特徴的病理を発現し、そしてそれらの半分近くが 3 0 週齢までに死亡した。

【図 3 3 A】野生型、ヘテロ接合性及びホモ接合性変異体マウスにおける血小板数の比較を示す。ホモ接合性変異体マウスは血小板数低下を示し、それらが慢性血小板減少症に苦しんでいたことを示唆する。

50



【図 3 3 B】野生型、ヘテロ接合性及びホモ接合性変異体マウスにおけるヘモグロビンレベルの比較を示す。ホモ接合性変異体マウスはヘモグロビンレベル低下を示し、それらが慢性溶血性貧血に苦しんでいることを示唆する。

【図 3 4 A - 3 4 C】W 1 2 0 6 R 変異体マウスの腎切片が a H U S に特徴的な病理を示したことを示す。該病理学的特徴は、メサンギウム拡大及び毛細管腔の狭窄（パネル A）、パネル A 及びパネル C で矢印により示される小血管中の血栓を包んだ。電子顕微鏡検査は、糸球体の毛細血管壁が、ふわふわした粒状の電子密度の低い物質を伴う内皮下の拡大、並びに二重輪郭線及び新たな糸球体基底膜の形成を表したことを示した。

【図 3 5 A - 3 5 D】f H 中に W 1 2 0 6 R 突然変異を運搬するマウスが網膜傷害および眼中の血液凝固もまた発症したことを示す。野生型マウスの正常に見える網膜（図 3 5 A）と比較して、f H W 1 2 0 6 R 変異体マウスの網膜中に多くの白斑、網膜浮腫及び拡張された血管が存在した（図 3 5 B）。加えて、フルオレセイン血管造影法は、変異体マウスの網膜の灌流が良好でなかったことを示した。色素は、野生型マウスの眼中の全部の血管に 3 0 秒以内に達した（図 3 5 C）が、しかし該色素は変異体マウス網膜の同じ領域の多くに 4 分経っても近づかなかった（図 3 5 D）からである。

【図 3 6】m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質が、 $3 \times 10^{11}$  G C / マウスの A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ベクターでの処置後 1 か月及び 2 か月に f H W 1 2 0 6 R / W 1 2 0 6 R マウスの血液で E L I S A により検出されたが、しかし A A V 遺伝子治療前のこれらマウスの血液で検出されなかったことを示す。

【図 3 7 A - 3 7 B】 $3 \times 10^{11}$  G C / マウスの A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ベクターでの f H W 1 2 0 6 R / W 1 2 0 6 R マウスの処置がそれらの血小板数を正常化したことを示す線グラフである。A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置された全 3 f H W 1 2 0 6 R / W 1 2 0 6 R マウスは生存しかつ健康であった。それらの血小板数（図 3 7 A）及びヘモグロビンレベル（H b、図 3 7 B）は増大しかつ正常範囲で維持された。対照的に、対照 A A V ベクターで処置された 2 f H W 1 2 0 6 R / W 1 2 0 6 R マウスの 1 匹は（処置後 4 週で）死亡し、かつ、残存するマウスは、一貫して、血小板数が低下し、変動するヘモグロビンレベルが A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置されたマウスのものより下であった。

【0 0 1 9】

[ 発明の詳細な説明 ]

新規の人工改変された H 因子（f H）遺伝子及びタンパク質バリエーションを本明細書に説明する。これらバリエーションは、H 因子に関連する状態及び他の補体障害の処置における半減期の延長及び有効性の増大を特徴とする。

【0 0 2 0】

多数の経路を介し、及び具体的には r A A V ベクターのような組換えベクターにより媒介される i n v i v o の発現による、その必要な被験体へのこれらバリエーションの送達記述される。H 因子関連障害を処置するための投与計画でのこれらバリエーションの使用方もまた提供される。有利には、本明細書で提供される組成物は、複数の経路に同時に標的を定めかつ／若しくは多様な因子により引き起こされる制御されない代替経路補体調節を処置若しくは調節するために有用である。

【0 0 2 1】

本明細書で使用される「補体 H 因子障害を処置する（こと）」という用語は、無症候性の再発性細菌感染症及び腎不全を包含する数種の異なる表現型として現れ得る、補体 H 因子障害と関連する症状を軽減すること、低下すること及び／又は寛解すること、並びに／又は付加的症状の発生を予防することを包含しうる。これは、典型的に、H 因子、補体成分 C 3 の低下された血清レベル、及び代替補体経路の活性化を示す他の終末補体成分の減少を特徴とする。この障害は、C 3 糸球体腎症及び非典型溶血性尿毒症症候群を包含する多様な臨床症状及び進行を伴う多数の腎疾患と関連する。とりわけ加齢黄斑変性（A M D）、非典型溶血性尿毒症症候群（例えば、微小血管症性溶血性貧血、血小板減少症、急性腎不全を包含する）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（P N H）、統合失調症、虚血性脳卒

10

20

30

40

50



中の1種若しくはそれ以上を処置する、及び/或いは細菌性病原体（例えばアスペルギルス（Aspergillus）属の種；ライム病菌（Borrelia burgdorferi）；B. ダットンナイ（B. duttonii）；B. リカレンティス（B. recurrentis）；カンジダ アルビカンズ（Candida albicans）；野兔病菌（Francisella tularensis）；インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）；髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）；化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes））、又はライム病ボレリア（B. burgdorferi）の5種のH因子結合タンパク質（CRASP-1、CRASP-2、CRASP-3、CRASP-4若しくはCRASP-5）の1種の動員により引き起こされる細菌感染症を予防若しくは処置するための組成物及び方法もまた本明細書で提供される。

10

#### 【0022】

本明細書で使用される「補体関連障害を処置すること」という用語は、症状、上で同定された補体H因子障害と、代替経路補体調節の制御不全と関連する他の障害との双方を軽減、低下及び/又は寛解することを包含する。より具体的には、本明細書で提供されるデータは、最低1種のAAV媒介性fHバリエーションが、根底にある調節機構の欠陥に関係なく、代替経路補体調節の制御不全により引き起こされる補体媒介性疾患に広範に有効であることを示唆する。例えば図23を参照されたい。

#### 【0023】

「補体媒介性障害」は、無症候性の再発性細菌感染症を包含する数種の異なる表現型として現れ得る補体調節不全に関連する症状、及び限定されるものでないが腎疾患を挙げることができる多様な組織傷害を包含する。他に特記されない限り、ホモ接合性被験体及びヘテロ接合性被験体の双方がこの定義に含まれる。補体調節不全は、典型的に、fH、I因子（fI）及び膜補助因子タンパク質（MCP）を挙げることができるがこれらに限られない補体調節タンパク質中の機能欠失変異若しくはそれに対する自己抗体により、又はC3及びB因子（fB）を挙げることができるがこれらに限られない他の補体タンパク質中の機能獲得変異により引き起こされる。補体調節不全は、典型的に、とは言え常にではなく、代替及び/又は終末補体経路の活性化を示す、H因子、補体成分C3、fBの血清レベルの低下、及び他の終末補体成分の減少を特徴とする。組成物及び方法の本発明により処置され得る補体媒介性の病理は、多様な臨床症状及び進行を伴う以下の疾患：その2種の既知の形態 - デンスデポジット病（DDD）及びC3系球体腎炎（C3GN）が存在するC3系球体腎症（以前はII型膜性増殖性系球体腎炎若しくはMPGNIIと呼ばれる）；非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）、志賀毒素様毒素産生大腸菌HUS（STEC-HUS）及び血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）を挙げることができるがこれらに限られない血栓性微小血管症（TMA）；加齢黄斑変性（AMD）、RPE変性、網脈絡膜変性、光受容体変性を包含する網膜変性眼疾患、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、全部の器官及び状況の虚血再灌流傷害、関節リウマチ、血液透析、糖尿病性ニューロパシー、糖尿病性脈管障害、喘息、全身性エリテマトーデス（SLE）、虚血性脳卒中、腹部大動脈瘤（AAA）、抗好中球細胞質抗体（ANCA）媒介性血管炎（ANCA血管炎）、ANCA媒介性出血性肺傷害及び疾患、ANCA系球体腎炎、移植片対宿主病（GvHD）、臓器移植における急性若しくは遅発性移植片拒絶、クローン病、乾癬、多発性硬化症、抗リン脂質抗体症候群、妊娠高血圧腎症、アテローム硬化症、視神経脊髄炎（NMO）、自己免疫性皮膚水疱形成疾患、水疱性類天疱瘡（BP）、アルツハイマー病（AD）、並びに、細菌性病原体（例えば、アスペルギルス（Aspergillus）属の種；ライム病ボレリア（Borrelia burgdorferi）、B. ダットンナイ（B. duttonii）；B. リカレンティス（B. recurrentis）；カンジダ アルビカンズ（Candida albicans）；野兔病菌（Francisella tularensis）；インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）；髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）；化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）の動員により引き起こ

20

30

40

50



される細菌感染症を挙げることができるが、これらに限られない。こうした障害の他の例は下でより詳細に論考する。

#### 【 0 0 2 4 】

成熟「野生型」ヒト補体H因子（アイソフォーム1）のアミノ酸配列は <http://www.uniprot.org/uniprot/P08603> として本明細書で提供され、そしてh f Hアイソフォーム1のアミノ酸番号付け〔配列番号39に再現される〕のための参照としてはたらく。リーダー配列は配列番号39を参照してH因子のアミノ酸1ないし18に位置する。該リーダーのアミノ酸配列は配列番号2に提供される。成熟（分泌型）h f Hタンパク質は、配列番号39を参照してアミノ酸19ないし1231に位置する。20種のショートコンプリメントリピート（SCR）の場所の代替の決定方法が存在する。下に提供される実験で使用するドメインの場所は図1中で注釈が付けられ、かつ、C. Estallerら、Eur J Immunol. 1991 Mar; 21(3): 799-802で使用される番号付けに基づく。

10

#### 【 0 0 2 5 】

野生型ヒト補体H因子、アイソフォーム1のアミノ酸配列は配列番号39に再現される。配列番号1の特徴の欄は、20種のショートコンセンサスリピート（SCR）ドメインのそれぞれの開始/終止を同定するための代替系もまた具体的に説明する。この系において、リンカー配列はSCRのそれぞれの間に存在しない。

#### 【 0 0 2 6 】

場合によっては、本明細書で提供される人工改変されたh f Hバリエーションは、天然のh f Hリーダー配列の代わりに用いられる異種リーダー配列を有しうる。加えて、若しくは場合によっては、その配列が例えば <http://www.uniprot.org/uniprot/P08603> から入手可能である別のh f Hアイソフォーム（例えばアイソフォーム2）、及び/又は、ある障害と関連しないその中の天然のアミノ酸バリエーションの1種。配列番号40を参照されたい。以下の記述において、置換は（一文字記号により同定される第1のアミノ酸）- 残基位置番号 - （一文字記号により同定される第2のアミノ酸）として書かれることができ、これにより、第1のアミノ酸が置換されるアミノ酸であり、そして第2のアミノ酸がアイソフォーム1を参照して指定される位置の置換するアミノ酸であるが；しかしながら、慣習的アライメント段階により、アイソフォーム1の番号付けに関して本明細書で同定される対応するアミノ酸残基が、アイソフォーム2及びf Hのアイソフォーム1若しくは2のSCRの疾患を引き起こさない天然のバリエーション中に位置し得る。

20

30

#### 【 0 0 2 7 】

本明細書で使用されるところの、言及がSCR# - # #になされる場合、該ドメインは終点を包含しかつ「SCR# , . . . SCR# #」と同一である。ある態様において、ピリオドをドメイン間に使用する。例えば、SCR1 - 4は「SCR1、SCR2、SCR3及びSCR4」を指し、そして「SCR1, 2, 3, 4」若しくはSCR1. 2. 3. 4. 」と同一である。SCR19 - 20はSCR19及びSCR20を指し、そして「SCR19, 20」と同一である。例えば、「SCR6 - 8」、「SCR6. 7. 8」及び「SCR6, 7, 8」は同ドメインを指す。

40

#### 【 0 0 2 8 】

本明細書で使用されるところの「機能的f Hバリエーション」という用語は、SCR1 - 4中に位置する補体調節活性（補助因子活性）、及び場合によっては野生型f Hに特徴的な機能的C3b結合及びGAG結合能力（野生型SCR7及びSCR19 - 20内に位置する）を有することを特徴とするf Hバリエーションを包含する。いくつかの態様において、人工改変されたf Hバリエーションは野生型f H補助因子活性及び/又はGAG結合能力の100%以上を有する。例えば、図8、並びに本明細書に記述されるf Hバリエーションが完全長ヒトf Hより統計学的により高い、例えば約10%ないし40%より高いGAG及びC3b結合活性を有することを示す下の実施例を参照されたい。別の態様において、人工改変されたf Hバリエーションは野生型の機能的f Hの約95%未満ないし約100%を有する。

50



例えば、人工改変された f H バリアントは、機能的野生型 f H に存在する補助因子活性の最低 50 %、及びより望ましくは最低約 60 %、最低約 75 %、最低約 80 %、最低約 85 %、最低約 90 %、最低約 95 %、若しくは最低約 99 % を有しうる。別の態様において、人工改変された f H バリアントは、あるいは、若しくは加えて、機能的 f H の G A G 結合能力の最低 50 %、及びより望ましくは最低約 60 %、最低約 75 %、最低約 80 %、最低約 85 %、最低約 90 %、最低約 95 % 若しくは最低約 99 % を有しうる。h f H タンパク質に比較した補助因子活性、結合の測定及び/又は増大された循環半減期の測定方法は当該技術分野で既知であり、そして少なくとも 1 種のこれらのアッセイを下の実施例に具体的に説明する。

#### 【0029】

機能的 f H バリアントの例は、1 個の S C R 7、S C R 17 若しくは S C R 18 ドメインの 1 種若しくはそれ以上とともに f H タンパク質の S C R 1 - 4 及び 19 - 20 を有するものを包含する。さらなるバリアントは、S C R 6、S C R 8、S C R 16、S C R 17、S C R 18 若しくはそれらのフラグメントの 1 種若しくはそれ以上及びそれらの組合せを有するものを包含する。例えば、こうしたバリアントは、例えば、とりわけ、f H S C R 1 - 4, 6 - 8, 19 - 20; f H S C R 1 - 4, 6 - 8, 18 - 20; f H S C R 1 - 4, 6 - 8, 17 - 20; f H S C R 1 - 4, 6 - 7, 19 - 20; f H S C R 1 - 4, 6 - 7, 18 - 20; f H S C R 1 - 4, 6 - 7, 17 - 20; f H S C R 1 - 4, 7 - 8, 19 - 20; f H S C R 1 - 4, 7 - 8, 18 - 20; f H S C R 1 - 4, 7 - 8, 17 - 20; f H S C R 1 - 4, 7, 19 - 20; f H S C R 1 - 4, 7, 18 - 20; f H S C R 1 - 4, 7, 17 - 20; S C R 1 - 4, 17, 19 - 20; S C R 1 - 4, 18 - 20; S C R 1 - 4, 17 - 20 及び/又は f H S C R 1 - 4, 7, 16 - 20 を包含しうる。ある態様において、h f H バリアントは、付加的な h f H S C R 例え S C R 6、S C R 8、S C R 16 若しくはそれらの組合せをさらに含んでなる。好ましい態様において h f H S C R 5 は存在しない。しかしながら、ある態様において、h f H S C R 5 は全体若しくはその一部分が存在してもよい。ある態様において、h f H S C R 9、S C R 10、S C R 11、S C R 12、S C R 13、S C R 14 及び/又は S C R 15 が存在しないか、又は少なくとも機能的に欠失している。場合によっては、これらのバリアント中の S C R の 1 個若しくはそれ以上は、図 1 若しくは配列番号 1 の特徴で示されるところの完全長 S C R よりはむしろ S C R の「機能的フラグメント」でありうる。「機能的フラグメント」とは、補体阻害活性、ヘパリンを結合する能力及び/又は C 3 b 結合活性の 1 種若しくはそれ以上を有することを特徴とする完全長 S C R 未満のアミノ酸配列（若しくはそのコーディング配列）を意味する。

#### 【0030】

これら及び他のバリアントは他の f H 配列を包含しうる。例えば、ウイルスペクターから発現される場合、f H バリアントのコーディング配列はリーダー配列もまた包含する。こうしたリーダー配列は f H リーダーでありうる。場合によっては、リーダー配列は別の供給源から、例えば、本明細書に引用することにより組み込まれる I L - 2 リーダー [ 例え <http://www.signalpeptide.de/> に同定される哺乳動物リーダー配列の索引を参照されたい ] であり得る。一態様において、選択されるリーダー配列は長さがアミノ酸約 26 個未満（例えばアミノ酸約 1 から約 26 個まで）、より好ましくはアミノ酸 20 個未満（約 1 から約 20 アミノ酸まで）、及び最も好ましくは長さがアミノ酸約 18 個未満（約 1 から約 18 アミノ酸まで）である。「機能的欠失」により、補体阻害活性、C 3 b 結合活性を欠きかつ場合によってはヘパリン結合活性もまたさらに欠くアミノ酸配列（若しくはそのコーディング配列）を意味している。

#### 【0031】

該バリアントで、ドメインは相互に直に隣接して位置しうる（例えば 1 ドメインのカルボキシ末端が先行するドメインのアミノ末端の直後に続きうる）。あるいは、S C R ドメインの 1 若しくはそれ以上は、それらの間に配置されるアミノ酸 1 ないし約 12 ないし 18 個から構成されるリンカーを有しうる。例えば、バリアントは S C R 1 - ( L 1 ) - S

10

20

30

40

50



C R 2 - ( L 2 ) - S C R 3 - ( L 3 ) - S C R 4 - ( L 4 ) - ( S C R 6 - ( L 4 ' ) )  
 - S C R 7 - ( L 5 ) - ( S C R 8 - ( L 5 ' ) ) - ( S C R 1 6 - ( L 5 " ) ) - ( S C  
 R 1 7 - ( L 5 " ' ) ) - ( S C R 1 8 - ( L 5 " " ) ) - S C R 1 9 - ( L 6 ) - S C R 2  
 0 を含有することができ、ここで ( ) は任意の成分を示し、「L」はリンカーを指し、そ  
 して L 1、L 2、L 3、L 4、L 4'、L 5、L 5'、L 5"、L 5"'、L 5"" 及び L 6 のそ  
 れぞれは、非存在でありうるか若しくはアミノ酸約 1 ないし約 1 2 - 1 8 個のアミノ酸配  
 列から独立に選択されうる。言い換えれば、バリエーションが複数のリンカーを含有する場合  
 、リンカーのそれぞれは同一配列若しくは異なる配列を有しうる。ある態様において、バ  
 リエーションは最低 1、最低 2、最低 3、最低 4、最低 5 個のリンカー、最低 6 個のリンカー  
 を含有する。適するリンカーの例は、図 1 若しくは図 1 7、配列番号 4、6、8、1 0、  
 1 2、1 5、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4 及び 3 6 に同定さ  
 れる天然のリンカー、又は合成リンカーを包含する。これら野生型リンカーのそれぞれは  
 それらの本来の位置に位置しうる。あるいは、これら野生型リンカーの 1 種若しくはそれ  
 以上を 1 個の異なるリンカー位置若しくは複数の異なるリンカー位置で使用しうる。

#### 【0032】

場合によっては、これらのリンカーの 1 個若しくはそれ以上は f H 配列であることがで  
 きかつ独立に選択されうる。あるいは、該リンカーの 1 個若しくはそれ以上は f H に対し  
 異種、例えば人工であれ、合成であれ、f H バリエーションに適する柔軟性を付与する異なる  
 タンパク質からであれ、異なる供給源からでありうる。他の適するリンカーの例は、例え  
 ば、ポリ G l y リンカー及び適する柔軟性を提供する他のリンカーを包含しうる（例えば  
[http://parts.igem.org/Protein\\_domains/Linker](http://parts.igem.org/Protein_domains/Linker)）（本明細書に引用することにより組み込まれる）。ある態様において、リンカー  
 はいかなる f H 機能も欠く。

#### 【0033】

「アミノ酸置換」という用語及び上述されたその同義語は、あるアミノ酸を別の代わり  
 のアミノ酸で置換することによるアミノ酸配列の改変を包含することを意図している。置  
 換は保存的置換でありうる。それはまた非保存的置換でもありうる。2 種のアミノ酸に言  
 及する際の保存的という用語は、該アミノ酸が当業者により認識される共通の特性を共有  
 することを意味することを意図している。例えば、疎水性の非酸性側鎖を有するアミノ酸  
 、疎水性の酸性側鎖を有するアミノ酸、親水性の非酸性側鎖を有するアミノ酸、親水性の  
 酸性側鎖を有するアミノ酸、及び親水性の塩基性側鎖を有するアミノ酸。共通の特性は、  
 疎水性側鎖を有するアミノ酸、脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸、芳香族疎水性側鎖を  
 有するアミノ酸、極性の中性側鎖をもつアミノ酸、電気的に荷電した側鎖をもつアミノ酸  
 、電気的に荷電した酸性側鎖をもつアミノ酸及び電気的に荷電した塩基性側鎖をもつアミ  
 ノ酸の場合もまたありうる。天然に存在するアミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸の双  
 方が当該技術分野で既知であり、そして態様においてアミノ酸を置換するとして使用され  
 る。アミノ酸の置換方法は当業者に公知であり、そして前記アミノ酸配列をコードするヌ  
 クレオチド配列の突然変異を挙げることができるがこれに限られない。本明細書の「1 若  
 しくはそれ以上」への言及は、例えば 1、2、3、4、5、6 若しくはそれ以上の個別の  
 態様を包含することを意図している。

#### 【0034】

本明細書で提供される f H タンパク質バリエーションに加え、これら f H タンパク質バリア  
 ントをコードする核酸配列が提供される。これらバリエーションのコーディング配列は、リー  
 ダー配列の野生型配列及び／又はアイソフォーム 1、アイソフォーム 2 若しくは疾患に関  
 連しないバリエーションの 1 種若しくはそれ以上の S C R からの場合がある。あるいは、若し  
 くは加えて、ウェブに基づく若しくは商業的に入手可能なコンピュータプログラム、並  
 びにサービスに基づく企業を使用して、リーダー配列のアミノ酸配列及び／又は S C R の  
 1 種若しくはそれ以上を、RNA 及び／又は c D N A 双方を包含する核酸コーディング配  
 列に逆翻訳しうる。例えば、E M B O S S による `backtransseq`、[http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/;GeneInfinity\(h](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/;GeneInfinity(h)



`http://www.geneinfinity.org/sms-/sms__backtranslation.html`); ExPasy (`http://www.expasy.org/tools/`) を参照されたい。一態様において、RNA 及び / 又は cDNA コーディング配列をヒト細胞中での最適な発現のため設計する。

#### 【0035】

コドン最適化されたコーディング領域は多様な異なる方法により設計し得る。この最適化は、オンラインで入手可能である方法、公表された方法、若しくはコドン最適化サービスを提供する企業を使用して実施しうる。1つのコドン最適化方法が例えば第WO 2015/012924 A2号明細書(本明細書に引用することにより組み込まれる)に説明されている。簡潔には、生成物をコードする核酸配列を同義のコドン配列で改変する。好適には、該生成物のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長を改変する。しかしながら、いくつかの態様において、ORFの1フラグメントのみを変更しうる。これらの方法の1つを使用することにより、いずれかの所定のポリペプチド配列に頻度を適用し得、そして該ポリペプチドをコードするコドン最適化されたコーディング領域の核酸フラグメントを製造し得る。

#### 【0036】

核酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」若しくは「同一なパーセント」という用語は、対応のため整列される場合に同一である2本の配列中の塩基を指す。配列同一性比較の長さは、ゲノムの完全長、遺伝子コーディング配列の完全長、若しくは最低ヌクレオチド約500ないし5000個のフラグメント、又は所望のとおりの場合がある。しかしながら、例えば最低ヌクレオチド約9個、通常は最低ヌクレオチド約20ないし24個、最低ヌクレオチド約28ないし32個、最低ヌクレオチド約36個若しくはそれ以上のより小さいフラグメント間の同一性もまた望ましい場合がある。複数配列アライメントプログラムもまた核酸配列について利用可能である。こうしたプログラムの例は、インターネット上のウェブサーバーを通じてアクセス可能である「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「BLAST」、「MAP」及び「MEME」を包含する。こうしたプログラムの他の供給源は当業者に既知である。あるいは、Vector NTIユーティリティもまた使用される。上述のプログラムに含有されるものを包む、ヌクレオチド配列の同一性を評価するために使用し得る当該技術分野で既知の多数のアルゴリズムもまた存在する。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、GCGバージョン6.1中のプログラムFast<sup>TM</sup>a<sup>TM</sup>を使用して比較し得る。Fast<sup>TM</sup>a<sup>TM</sup>はクエリ及び検索配列の間の最良の重なり領域のアライメント及び配列同一性パーセントを提供する。例えば、核酸配列間の配列同一性パーセントは、引用することにより本明細書に組み込まれる、GCGバージョン6.1中に提供されるデフォルトのパラメータ(6個のワードサイズ(word size)及びスコアリングマトリックス(scoring matrix)についてのNOPAMファクター)を用いてFast<sup>TM</sup>a<sup>TM</sup>を使用して決定し得る。

#### 【0037】

アミノ酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」若しくは「同一のパーセント」という用語は、対応のため整列される場合に同一である2本の配列中の残基を指す。同一性パーセントは、完全長のタンパク質、ポリペプチド、アミノ酸約32個、約330個若しくはそのペプチドフラグメント、又は対応する核酸配列コーディング配列にわたるアミノ酸配列について容易に決定しうる。適するアミノ酸フラグメントは長さが最低アミノ酸約8個であることができ、そしてアミノ酸約700個まででありうる。一般に、2個の異なる配列間の「同一性」、「相同性」若しくは「類似性」を指す場合、「同一性」、「相同性」若しくは「類似性」は「整列された」配列に関して決定される。「整列された」配列若しくは「アライメント」は、参照配列に比較して欠けている若しくは付加的な塩基若しくはアミノ酸についての補正をしばしば含有する、複数の核酸配列若しくはタンパク質(アミノ酸)配列を指す。アライメントは、多様な公的に若しくは商業的に利用可能な複数配列アライメントプログラム(Mul

10

20

30

40

50



multiple Sequence Alignment Program) のいずれかを使用して実施する。配列アライメントプログラムはアミノ酸配列について利用可能であり、例えば「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」及び「Match-Box」プログラム。一般に、これらのプログラムのいずれもデフォルトの設定で使用されるとは言え、当業者は必要に応じてこれらの設定を変更し得る。あるいは、当業者は、参照されるアルゴリズム及びプログラムにより提供される同一性若しくはアライメントのレベルを少なくとも提供する別のアルゴリズム若しくはコンピュータプログラムを利用し得る。例えば、J. D. Thomson ら、Nucleic Acids Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13): 2682-2690 (1999) を参照されたい。

10

#### 【0038】

一態様において、本明細書に記述される h f H バリエーションをコードする核酸配列（例えば h f H バリエーション遺伝子）は、例えば DNA 若しくは RNA を運搬するナノ粒子、パッケージング宿主細胞中のウイルスベクターを生成するため、及び／又は被験体中の宿主細胞への送達のため、その上に運搬される h f H 配列を宿主細胞に移入するいずれかの適する遺伝要素、例えば裸の DNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、RNA 分子（例えば mRNA）、エピソームなどに人工改変される。一態様において遺伝要素はプラスミドである。選択された遺伝要素は、トランスフェクション、電気穿孔法、リポソーム送達、膜融合技術、高速 DNA 被覆ベレット、ウイルス感染及びプロトプラスト融合を包含する

20

#### 【0039】

本明細書で使用される「発現カセット」は、h f H バリエーションのコーディング配列、プロモーターを含んでなりかつそのための他の調節配列（例えば 5' 及び／又は 3' UTR 配列）を包含する核酸分子を指し、このカセットは遺伝要素に人工改変されかつ／又はウイルスベクターのキャプシド（例えばウイルス粒子）中にパッケージングされる。典型的に、ウイルスベクターを生成するためのこうした発現カセットは、ウイルスゲノムのパッケージングシグナルと、本明細書に記述される他の発現制御配列とに挟まれる本明細書に説明される h f H 配列を含有する。

30

#### 【0040】

発現カセットは典型的に発現制御配列の一部としてプロモーター配列を含有する。本明細書に記述される具体的に説明するプラスミド及びベクターはニワトリ アクチンを使用する。あるいは、別の構成的プロモーターを選択する。ある態様において、望ましくない標的細胞の脱標的化 (de-targeting) を適切なベクター要素例えばマイクロ RNA の使用により達成する。加えて、若しくは、あるいは、選択されるベクターは所望の組織に対する優先的ターゲティングを有することができ、例えば、肝に対し AA V 8、AA V 9 若しくは AA V rh10、眼に対し AA V 8、AA V 1 若しくは他の AA V、など。

40

#### 【0041】

しかしながら、所望の組織にベクターを標的化することはタンパク質の発現を最大化するために望ましい場合がある。だから、肝特異的プロモーターを選択する。適するプロモーターの例は、チロキシン結合グロブリン (TBG)、 $\alpha$ 1 アンチトリプシン (A1AT); ヒトアルブミン Miyatake ら、J. Virol., 71: 5124-32 (1997)、humA1b; 及び B 型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig ら、Gene Ther., 3: 1002-9 (1996) ]。TTR ミニマルエンハンサー / プロモーター、 $\alpha$ 1 アンチトリプシンプロモーター、LSP (845 nt) 25 (イントロ

50



ンなし s c A A V を必要とする) を包含する。あるいは他の肝特異的プロモーターを使用しうる [ 例えば、The Liver Specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor, <http://rulai.schl.edu/LSPD> を参照されたい。あるいは、別の組織へのターゲティングが望ましい場合は、異なる組織特異的プロモーターを選択しうる。プロモーターはいずれの種に由来する場合もある。例えば、眼での使用のため、例えば網膜色素上皮 ( R P E ) プロモーター若しくは光受容体プロモーターを選択しうる。別の態様において、プロモーターはヒト G タンパク質共役型受容体プロテインキナーゼ 1 ( G R K 1 ) プロモーター ( Genbank 受託番号 A Y 3 2 7 5 8 0 ) である。別の態様において、プロモーターは G R K 1 プロモーターの 2 9 2 n t のフラグメント ( 位置 1 7 9 3 - 2 0 8 7 ) である ( Beltran ら、Gene Therapy 2010 17:1162-74 ( 本明細書に引用することによりここに組み込まれる ) もまた参照されたい ) 。別の好ましい態様において、プロモーターはヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質近位 ( I R B P ) プロモーターである。別の態様において、プロモーターは発現されるべき遺伝子の本来のプロモーターである。一態様において、プロモーターは R P G R 近位プロモーターである ( Shu ら、IOVS, May 2012 ( 本明細書に引用することにより組み込まれる ) ) 。本発明で有用な他のプロモーターは、ロッドオブシンプロモーター、赤緑オブシンプロモーター、青オブシンプロモーター、c G M P - ホスホジエステラーゼプロモーター、マウスオブシンプロモーター ( 上で引用される Beltran ら 2010 ) 、ロッドオブシンプロモーター ( Mussolino ら、Gene Ther, July 2011, 18 ( 7 ) : 637-45 ) ; コントランスデュエーションの サブユニット ( Morrissey ら、BMC Dev Biol, Jan 2011, 11:3 ) ; ホスホジエステラーゼ ( P D E ) プロモーター ; 網膜色素変性症 ( R P 1 ) プロモーター ( Nicord ら、J. Gene Med, Dec 2007, 9 ( 12 ) : 1015-23 ) ; N X N L 2 / N X N L 1 プロモーター ( Lambard ら、P L o S O n e , Oct. 2010, 5 ( 10 ) : e13025 ) 、 R P E 6 5 プロモーター ; r e t i n a l d e g e n e r a t i o n s l o w / ペリフェリン 2 ( R d s / p e r p h 2 ) プロモーター ( Cai ら、Exp Eye Res, 2010 Aug; 91 ( 2 ) : 186-94 ) ; 及び V M D 2 プロモーター ( Kachi ら、Human Gene Therapy, 2009 ( 20:31-9 ) ) を包むがこれらに限定されない。光受容体特異的プロモーターの例は、ロッドオブシンプロモーター、赤緑オブシンプロモーター、青オブシンプロモーター、光受容体間結合タンパク質 ( I R B P ) プロモーター及び c G M P - ホスホジエステラーゼプロモーターを包むがこれらに限られない。あるいは、ウイルスプロモーター、構成的プロモーター、調節可能プロモーター [ 例えば第 W O 2011/126808 号明細書及び第 W O 2013/04943 号明細書を参照されたい ] 、又は生理学的合図に応答性のプロモーターのような他のプロモーターを、本明細書に記述されるベクター中で使用しうる。

#### 【 0 0 4 2 】

プロモーターに加え、発現カセット及び / 又はベクターは、他の適切な転写開始、終止、エンハンサー配列、スプライシング及びポリアダデニル化 ( ポリ A ) シグナルのような効果率的 R N A プロセッシングシグナル ; 細胞質 m R N A を安定化する配列 ; 翻訳効率を高める配列 ( 例えばコサックコンセンサス配列 ) ; タンパク質の安定性を高める配列 ; 並びに所望の場合はコードされる産物の分泌を高める配列を含有しうる。適するポリ A 配列の例は、例えば S V 4 0 、ウシ成長ホルモン ( b G H ) 、ウサギ グロブリン及び T K ポリ A を包含する。適するエンハンサーの例は、例えば、とりわけ、フェトプロテインエンハンサー、T T R ミニマルプロモーター / エンハンサー、L S P ( T H 結合グロブリンプロモーター / 1 ミクログロブリン / ビクニンエンハンサー ) を包含する。

#### 【 0 0 4 3 】

これら制御配列は f H 遺伝子配列に「操作可能に連結」される。本明細書で使用されるところの「操作可能に連結される」という用語は、目的の遺伝子と連続する発現制御配列



と、目的の遺伝子を制御するためにトランス又は遠位で作用する発現制御配列との両方を指す。

【 0 0 4 4 】

薬物送達若しくはウイルスベクターの産生に使用される発現カセットは、プラスミド上で人工改変される場合がある。適するウイルスベクターは、好ましくは複製欠損であり、そして眼細胞を標的とするもののなかから選択される。ウイルスベクターは、アデノウイルス；ヘルペスウイルス；レンチウイルス；レトロウイルス；パルボウイルスなどを含むがこれらに限られない、遺伝子治療に適するいかなるウイルスを包む場合がある。

【 0 0 4 5 】

好適には、これらのベクターの1種が生成される場合、複製欠損ウイルスベクターとして産生される。「複製欠損ウイルス」若しくは「ウイルスベクター」は、その中に目的の遺伝子を含有する発現カセットがウイルスキャプシド若しくはエンベロープ中にパッケージングされている、合成若しくは組換えウイルス粒子を指し、ここで該ウイルスキャプシド若しくはエンベロープ内にまたパッケージングされているいかなるウイルスゲノム配列も複製欠損であり；すなわち、それらは子孫ビリオンを生成し得ないがしかし標的細胞を感染させる能力を保持する。一態様において、ウイルスベクターのゲノムは複製するために必要とされる酵素をコードする遺伝子を包含しない（該ゲノムは「中身がない（gutless）」であるように人工改変される場合がある、すなわち、人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要とされるシグナルに挟まれた目的の導入遺伝子のみを含有する）が、しかしこれら遺伝子は産生中に供給されうる。従って、それは遺伝子治療における使用に安全と思われる。複製及び子孫ビリオンによる感染が、複製のため必要とされるウイルス酵素の存在下を除き発生し得ないためである。

【 0 0 4 6 】

一態様において、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）である。アデノ随伴ウイルス（AAV）ウイルスベクターは、標的細胞への送達のための核酸配列をパッケージングされているAAVタンパク質キャプシドを有するAAV DNアーゼ抵抗性粒子である。AAVキャプシドは、選択されるAAVに依存しておよそ1：1：10ないし1：1：20の比で正二十面体対称で配置される60個のキャプシドタンパク質サブユニットVP1、VP2及びVP3から構成される。

【 0 0 4 7 】

本明細書に説明される研究は、具体的に説明するベクターとしてAAV8を利用する。本明細書で使用される「AAV8キャプシド」は、本明細書に引用することにより組み込まれるGenBank受託：YP\_\_077180にコードされるアミノ酸配列を有するAAV8キャプシドを指す。GenBank受託：YP\_\_077180；米国特許第7,282,199号明細書、同第7,790,449号明細書；同第8,319,480号明細書；同第8,962,330号明細書；第US 8,962,332号明細書中の参照アミノ酸配列に対する約99%の同一性、（すなわち参照配列から約1%未満の変動）を有する配列を包含しうる、このコードされる配列からの若干の変動が本発明に含まれる。別の態様において、AAV8キャプシドは第WO2014/124282明細書（本明細書に引用することにより組み込まれる）に説明されるAAV8バリエーションのVP1配列を有しうる。キャプシド、それをコードする配列の生成方法及びrAAVウイルスベクターの製造方法が説明されている。例えば、Gaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(10)、6081-6086(2003)、第US 2013/0045186A1号明細書及び第WO 2014/124282号明細書を参照されたい。ある態様において、所望の標的細胞、例えば肝、光受容体、RPE若しくは他の眼細胞に対する親和性を示すAAV8バリエーションを選択する。例えば、AAV8キャプシドは、Kayら、Targeting Photoreceptors via Intravitreal Delivery Using Novel, Capsid-Mutated AAV Vectors、PLoS One. 2013; 8(4): e62097. 2013年4月26日オンラインで公表された（引用することにより本明細書に組み込ま

10

20

30

40

50



れる)に説明されるY447F、Y733F及びT494V突然変異(「AAV8(C&G+T494V)」及び「rep2-cap8(Y447F+733F+T494V)」ともまた呼ばれる)を有しうる。例えばMowatら、Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach、Gene Therapy 21、96-105(January 2014)(引用することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。別の態様において、AAVキャプシドは、双極細胞を優先的に標的とするAAV8bpキャプシドである。第WO 2014/024282号明細書(引用することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

10

#### 【0048】

例えばAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、rh8を包含する他のAAV血清型を、AAVウイルスベクターのキャプシド(DNAアーゼ抵抗性ウイルス粒子)の供給源として選択しうる[例えば、米国公開特許出願第2007-0036760-A1号明細書；米国公開特許出願第2009-0197338-A1号明細書；第EP 1310571号明細書を参照されたい]。第WO 2003/042397号明細書(AAV7及び他のサルAAV)、米国特許第7790449号明細書及び米国特許第7282199号明細書(AAV8)、第WO 2005/033321号明細書並びに第US 7,906,111号明細書(AAV9)、並びに第WO 2006/110689号明細書]もまた参照されたく、並びに、rh10[第WO 2003/042397号明細書]、それらの若しくはなお発見されるべきバリエーション、又はそれらに基づく組換えAAVをAAVキャプシドの供給源として使用しうる。これらの文書はAAVを生成するために選択しうる他のAAVもまた説明し、そして引用することにより組み込まれる。いくつかの態様において、ウイルスベクター中での使用のためのAAV Capは、前述のAAV Cap若しくはそのコーディング核酸の1種の突然変異誘発により(すなわち挿入、欠失若しくは置換により)生成し得る。いくつかの態様において、AAVキャプシドは、前述のAAVキャプシドタンパク質の2若しくは3若しくは4種又はそれ以上からのドメインを含んでなるキメラである。いくつかの態様において、AAVキャプシドは、2若しくは3種の異なるAAV又は組換えAAVからのVP1、VP2及びVP3単量体のモザイクである。いくつかの態様において、rAAV組成物は前述のCapの1種以上を含んでなる。

20

30

#### 【0049】

ITRは、発現カセットをビリオン中にパッケージングするために、遺伝子と同一の構築物中にシスで必要とされる唯一のAAV成分である。一態様において、複製(rep)及び/又はキャプシド(cap)のコーディング配列がAAVゲノムから除去され、そして、AAVベクターを生成するためにトランスで若しくはパッケージング細胞株により供給される。例えば、上述されたとおり、シュードタイピングされたAAVは、AAVキャプシドの供給源と異なる供給源からのITRを含有しうる。加えて、若しくは、あるいは、キメラAAVキャプシドを利用しうる。なお他のAAV成分を選択しうる。こうしたAAV配列の供給源は本明細書に説明され、そしてまた単離されうるか、又は学術的、商業的若しくは公的供給源(例えばAmerican Type Culture Collection、バージニア州マナサス)から得ることもできる。あるいは、AAV配列は、文献で、若しくは例えばGenBank(登録商標)、PubMed(登録商標)などのようなデータベースで、利用可能である公表された配列への参照により合成若しくは他の適する手段により得ることができる。

40

#### 【0050】

発現カセットをAAVウイルス粒子中にパッケージングするのに必要とされる最小配列は、キャプシドと同一AAV起源のものでありうるか若しくは(AAVシュードタイプを産生するため)異なるAAV起源のものである、AAVの5'及び3'ITRである。一態

50



様において、A A V 2 からの I T R 配列若しくはその欠失バージョン ( I T R ) を便宜的に及び規制上の承認の時期を早めるために使用する。しかしながら、他の A A V 供給源からの I T R を選択しうる。I T R の供給源が A A V 2 からでありかつ A A V キャプシドが別の A A V 供給源からである場合、生じるベクターはシュードタイピングされたと呼ぶことができる。典型的に、A A V ベクターの発現カセットは、A A V 5 ' I T R、コーディング配列及びいずれかの制御配列、並びに A A V 3 ' I T R を含んでなる。しかしながらこれら要素の他の構成が適切な場合がある。D 配列及び末端解離部位 ( t r s ) が欠失されている I T R と命名される短縮されたバージョンの 5 ' I T R が記載されている。他の態様において、完全長の A A V 5 ' 及び 3 ' I T R が使用される。

#### 【 0 0 5 1 】

「 s c 」という略語は自己相補性を指す。「自己相補性 A A V 」は、組換え A A V 核酸配列により遺伝されるコーディング領域が分子内二本鎖 DNA 鋳型を形成するよう設計されている発現カセットを有するプラスミド若しくはベクターを指す。感染に際して、第 2 の鎖の細胞を介する合成を待つよりむしろ、s c A A V の相補性のある半分 2 つが会合して、複製及び転写の準備ができていた 1 個の二本鎖 DNA ( d s DNA ) 単位を即座に形成することができる。例えば、D M M c C a r t y ら、 “ S e l f - c o m p l e m e n t a r y r e c o m b i n a n t a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s ( s c A A V ) v e c t o r s p r o m o t e e f f i c i e n t t r a n s d u c t i o n i n d e p e n d e n t l y o f D N A s y n t h e s i s ”、Gene Therapy、( A u g u s t 2 0 0 1 )、V o l 8、N u m b e r 1 6、1 2 4 8 - 1 2 5 4 ページを参照されたい。自己相補性 A A V は、例えば米国特許第 6, 5 9 6, 5 3 5 号明細書；同第 7, 1 2 5, 7 1 7 号明細書；及び同第 7, 4 5 6, 6 8 3 号明細書（それらのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）に説明されている。

#### 【 0 0 5 2 】

被験者への送達に適する A A V ウイルスベクターの生成及び単離方法は当該技術分野で既知である。例えば、米国特許第 7 7 9 0 4 4 9 号明細書；米国特許第 7 2 8 2 1 9 9 号明細書；第 W O 2 0 0 3 / 0 4 2 3 9 7 号明細書；第 W O 2 0 0 5 / 0 3 3 3 2 1 号明細書、第 W O 2 0 0 6 / 1 1 0 6 8 9 号明細書；及び第 U S 7 5 8 8 7 7 2 B 2 号明細書を参照されたい。1 つのシステムでは、産生細胞株を、I T R により隣接されている導入遺伝子をコードする構築物並びに r e p 及び c a p をコードする構築物（1 個若しくは複数）で一過性にトランスフェクトする。第 2 のシステムでは、r e p 及び c a p を安定して供給するパッケージング細胞株を、I T R により隣接されている導入遺伝子をコードする構築物で一過性にトランスフェクトする。これらのシステムのそれぞれにおいて、A A V ビリオンがヘルパーアデノウイルス若しくはヘルペスウイルスへの感染に応答して産生され、汚染するウイルスからの r A A V の分離を必要とする。より最近、A A V を回収するためにヘルパーウイルスへの感染を必要としないシステムが開発された。必要とされるヘルパー機能（すなわちアデノウイルス E 1、E 2 a、V A 及び E 4 若しくはヘルペスウイルス U L 5、U L 8、U L 5 2 及び U L 2 9、並びにヘルペスウイルスポリメラーゼ）もまた前記システムによりトランスに供給される。これらのより新しいシステムにおいて、ヘルパー機能は、必要とされるヘルパー機能をコードする構築物での細胞の一過性トランスフェクションにより供給し得るか、若しくは、細胞を、ヘルパー機能をコードする遺伝子を安定に含有するよう操作し得、その発現は転写若しくは転写後レベルで制御し得る。なお別のシステムでは、I T R により隣接されている導入遺伝子及び r e p / c a p 遺伝子を、バキュロウイルスに基づくベクターへの感染により昆虫細胞中に導入する。これら産生システムに関する総説については、全般として、例えば、Z h a n g ら、2 0 0 9、 “ A d e n o v i r u s - a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s h y b r i d f o r l a r g e - s c a l e r e c o m b i n a n t a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s p r o d u c t i o n , ” Human Gene Therapy 2 0 : 9 2 2 - 9 2 9（そのそれぞれの内容はそっくりそのまま引用する

10

20

30

40

50



ことにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。これら及び他のAAV産生システムの作成及び使用方法は以下の米国特許(それらのそれぞれの内容はそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる):第5,139,941号明細書;同第5,741,683号明細書;同第6,057,152号明細書;同第6,204,059号明細書;同第6,268,213号明細書;同第6,491,907号明細書;同第6,660,514号明細書;同第6,951,753号明細書;同第7,094,604号明細書;同第7,172,893号明細書;同第7,201,898号明細書;同第7,229,823号明細書;及び同第7,439,065号明細書にもまた説明されている。全般として、例えばGriegerとSamulski、2005、“Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,” Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99:119-145; Buningら、2008、“Recent developments in adeno-associated virus

10

vector technology,” J. Gene Med. 10:717-733; 及び下に引用される参考文献(それらのそれぞれのことはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。本発明のいずれかの態様を構築するのに使用される方法は核酸操作の当業者に既知であり、そして遺伝子工学、組換え工学及び合成技術を包含する。例えば、GreenとSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(2012)を参照されたい。同様に、rAAVビリオンの生成方法は公知であり、そして適する方法の選択は本発明を限定するものではない。例えばK. Fisherら、(1993) J. Virol.、70:520-532及び米国特許第5,478,745号明細書を参照されたい。

20

#### 【0053】

場合によっては、本明細書に説明されるfH遺伝子はrAAV以外のウイルスベクターを介して送達しうる。こうした他のウイルスベクターは、アデノウイルス;ヘルペスウイルス;レンチウイルス;レトロウイルス;などを挙げることができるが、これらに限られない、遺伝子治療に適するいかなるウイルスも包含しうるを使用しうる。好適には、これら他のベクターの1種を生成する場合、それは複製欠損ウイルスベクターとして製造される。

30

#### 【0054】

「複製欠損ウイルス」若しくは「ウイルスベクター」は、その中で目的の遺伝子を含有する発現カセットがウイルスキャプシド又はエンベロープ中にパッケージングされている合成又は人工ウイルス粒子を指し、ここでウイルスキャプシド若しくはエンベロープ内にまたパッケージングされているいかなるウイルスゲノム配列も複製欠損であり;すなわちそれらは子孫ビリオンを生成し得ないが、しかし標的細胞を感染させる能力を保持する。一態様において、ウイルスベクターのゲノムは複製するために必要とされる酵素をコードする遺伝子を含まない(該ゲノムは「中身がない(gutless)」である、すなわち人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要とされるシグナルにより隣接されている目的の導入遺伝子のみを含有するように人工改変し得る)が、しかしこれら遺伝子は産生中に供給されうる。従って、それは遺伝子治療における使用に安全と思われる。複製及び子孫ビリオンによる感染が、複製のため必要とされるウイルス酵素の存在下を除き発生し得ないためである。

40

#### 【0055】

本明細書に記載される医薬組成物は、いずれかの適する経路若しくは異なる経路の組合せ、例えば肝への直接送達(場合によっては静脈内を介し、肝動脈を介し、若しくは移植により)、経口、吸入、鼻内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内及び他の非経口投与経路によるその必要な被験体への送達のため設計される。本明細書に記述されるウイルスベクターは単一組成物若しくは複数組成物中で送達しうる。場合によっ

50



ては、2種若しくはそれ以上の異なるAAV又は複数のウイルス〔例えば第WO 2011/126808号明細書及び第WO 2013/049493号明細書を参照されたい〕を送達しうる。別の態様において、複数のウイルスは異なる複製欠損ウイルス（例えばAAV及びアデノウイルス）を含有しうる。

【0056】

前記複製欠損ウイルスは、遺伝子移入及び遺伝子治療の応用における使用のため生理学的に許容できる担体と配合し得る。AAVウイルスベクターの場合、ゲノムコピー（GC）の定量化を製剤中に含有される用量の尺度として使用しうる。当該技術分野で既知のいずれの方法も、本発明の複製欠損ウイルス組成物のゲノムコピー（GC）数を決定するのに使用し得る。AAV GC数滴定の一実施方法は以下のとおりである：精製されたAAVベクターサンプルを最初にDNアーゼで処理して、キャプシド形成されないAAVゲノムDNA若しくは汚染するプラスミドDNAを製造工程から排除する。DNアーゼ抵抗性粒子をその後熱処理にかけてキャプシドからゲノムを放出させる。放出されたゲノムをその後、ウイルスゲノムの特定の領域（通常はポリAシグナル）を標的とするプライマー/プローブ組を使用するリアルタイムPCRにより定量する。

10

【0057】

また、複製欠損ウイルス組成物は、ヒト患者について約 $1.0 \times 10^9$  GCないし約 $1.0 \times 10^{15}$  GC（体重が70 kgの平均的被験体を処置するため）、及び好ましくは $1.0 \times 10^{12}$  GCないし $1.0 \times 10^{14}$  GCの範囲にある複製欠損ウイルスの量を含有するように投薬量単位で配合し得る。別の態様において、用量は約 $1.5 \times 10^{11}$  GC/kg未満である。例えば、AAVウイルスの用量は、約 $1 \times 10^9$  GC、約 $5 \times 10^9$  GC、約 $1 \times 10^{10}$  GC、約 $5 \times 10^{10}$  GC若しくは約 $1 \times 10^{11}$  GCでありうる。別の例において、バリエーションは約0.001 mgないし約10 mg/kgの量で送達しうる。

20

【0058】

前記組換えベクターは公表された方法に従って宿主細胞に送達しうる。好ましくは生理学的に適合性の担体に懸濁されているrAAVをヒト若しくはヒト以外の哺乳動物被験体に投与しうる。適する担体は、移入ウイルスが向けられる適応症を鑑み当業者により容易に選択されうる。例えば、ある好適な担体は、多様な緩衝溶液と配合されうる生理的食塩水を包含する（例えばリン酸緩衝生理的食塩水）。他の例示的担体は、無菌生理的食塩水、乳糖、ショ糖、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ラッカセイ油、ゴマ油及び水を包含する。担体の選択は本発明を限定しない。

30

【0059】

場合によっては、本発明の組成物は、rAAV及び/又はバリエーション並びに担体（1種若しくは複数）に加え、保存剤、化学的安定化剤、懸濁化剤及び/又は界面活性剤のような他の非活性の慣習的製薬学的成分を包含する賦形剤を含有しうる。適する例示的保存剤は、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化イオウ、没食子酸プロピル、パラベン類、エチルパニリン、グリセリン、フェノール及びパラクロロフェノールを包含する。好適な化学的安定化剤はゼラチン及びアルブミンを包含する。場合によっては、タンパク質に基づく又は抗体に基づく組成物のために、例えば増量剤、ビーズ、充填剤、崩壊剤、滑剤、香料、着色料又は他の成分を包含する固体組成物に適する賦形剤を選択しうる。

40

【0060】

本明細書に記載されるウイルスベクターその他の構築物を、その必要な被験体にfHバリエーションを送達する、増大された半減期を有するfHバリエーションを被験体に供給するため、及び/又は補体関連障害を処置するための医薬品の製造において使用しうる。

【0061】

1クルルの処置は、同一ウイルスベクター（例えば1種のAAV8ベクター）又は異なるウイルスベクター（例えば1種のAAV8及び1種のAAVrh10）の反復投与を場合によっては必要としうる。例えば、肝に標的化される場合、反復投与は、18か月、2年、又は天然の肝細胞増殖により引き起こされる発現の希釈によりより長い時間の期間に

50



わたり望ましい場合がある。ウイルス及びタンパク質に基づく処置のさらに他の組合せを、本明細書に記載されるウイルスベクターを使用して選択しうる。場合によっては、本明細書に記載される組成物を、他の抗補体薬物（例えばモノクローナル抗体など）又はタンパク質に基づく治療薬（例えば本明細書に記載されるところの１種又はそれ以上のｈｆＨバリエーションを含む組成物の送達を包含する）を必要とする投与計画で組合せうる。

#### 【００６２】

例えば、本明細書に記載されるところの人工改変されたｈｆＨバリエーションはタンパク質の形態で送達しうる。場合によっては、タンパク質の形態で被験体に送達される場合、ｈｆＨバリエーションはリーダー配列を有するか、又はリーダー配列の全部若しくは一部分を欠く場合がある。場合によっては、タンパク質に基づく治療を、ウイルスに媒介されるｈｆＨバリエーションの投与と共に使用しうる。一態様において、ｈｆタンパク質は、ウイルス媒介性の送達システムからの発現の開始になんらかな遅延時間が存在することが見出される場合は、即時放出の形態のｈｆＨ、例えば約２４時間ないし約４８時間若しくはないし約７２時間以内に被験体から消失されることを開始することができるのが典型的な、投与後２時間以内の検出可能な血漿レベルを被験体に提供し得る。別の態様において、ｈｆＨバリエーションは、該バリエーション中に最低１個の糖鎖付加部位を人工改変することによりその半減期を延長するようさらに改変され、前記バリエーション中に存在するＳＣＲの最低１個、前記バリエーション中に存在するＳＣＲの最低２個、前記バリエーション中に存在するＳＣＲの最低３個若しくはそれ以上で人工改変される。例えば、糖鎖付加部位はＳＣＲ１、ＳＣＲ２、ＳＣＲ３、ＳＣＲ４、ＳＣＲ１９及び／又はＳＣＲ２０の１種又はそれ以上中に人工改変されうる。別の態様において、ＳＣＲ１７及び／又はＳＣＲ１８が付加的に又はあるいはグリコシル化される。なおさらなる一態様において、ＳＣＲ４、１７及び１８がグリコシル化される。ある態様において、糖鎖付加部位をリンカー中に人工改変する場合がある。しかしながら、こうした場合において、リンカーは好ましくは長さが最低アミノ酸６個から約１８個まで、例えば８～１８、１０～１５又は１２アミノ酸である。加えて、又は、あるいは、人工改変されたｈｆＨタンパク質バリエーションは、既知技術を使用してペグ化すなわちポリエチレングリコール部分で修飾されうる〔例えばFee, Conan J.; Van Alstine, James M. (2006). "PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues". *Chemical Engineering Science* 61(3): 924を参照されたい〕。

#### 【００６３】

本明細書で使用されるところの糖鎖付加部位は、炭素原子（Ｃ－結合）、窒素原子（Ｎ－結合）若しくは酸素原子（Ｏ－結合）へのオリゴ糖の付加、又は糖化（タンパク質の窒素原子（例えばAsn-X-Ser/Thr（式中XはProを除くいずれかのアミノ酸）の一部であるアスパラギン（Asn）側鎖の窒素原子への還元糖の非酵素的付加）の点を指す。ある態様において、Ｎ－糖鎖付加部位が望ましい。多様な技術がＮ－糖鎖付加部位を操作するために当該技術分野で既知である。例えば、Y Liuら、*Biotech Prog* 2009 Sep-Oct; 25(5): 1468-1475; Sala RJ, Griebenos K. *Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy*. *BioDrugs*. 2010 Feb 1; 24(1): 9-21を参照されたい。

#### 【００６４】

さらに、本明細書で提供されるところの人工改変されたｈｆＨバリエーションは、いずれかの適する経路による被験体への送達のために適切な担体及び／又は賦形剤と配合される場合がある。従来の懸濁液担体に加え、担体はリポソーム若しくはナノ担体でありうる。ｈｆＨバリエーションの適切な用量は補体関連障害を処置するための十分な血漿レベルを達成するものを包含する。ｈｆＨバリエーションの投与量の例は、限定されるものでないが、約０．０１μg/kgないし約３００mg/kg、若しくは約０．１μg/kgないし約４０m



g / k g、若しくは約 1  $\mu$  g / k g ないし約 20 m g / k g、若しくは約 1  $\mu$  g / k g ないし約 10 m g / k g のいずれかの投薬量範囲内の有効量を挙げることができる。例えば、眼内に投与される場合、前記組成物は、例えば約 0.1  $\mu$  g / k g 以下、約 0.05  $\mu$  g / k g 以下、又は 0.01  $\mu$  g / k g 以下を包含する低マイクログラム範囲で投与しうる。いくつかの態様において、個体に投与される h f H バリエーションの量は、用量あたり約 10  $\mu$  g ないし約 500 m g、若しくは約 10  $\mu$  g ないし約 50  $\mu$  g、約 50  $\mu$  g ないし約 100  $\mu$  g、約 100  $\mu$  g ないし約 200  $\mu$  g、約 200  $\mu$  g ないし約 300  $\mu$  g、約 300  $\mu$  g ないし約 500  $\mu$  g、約 500  $\mu$  g ないし約 1 m g、約 1 m g ないし約 10 m g、約 10 m g ないし約 50 m g、約 50 m g ないし約 100 m g、約 100 m g ないし約 200 m g、約 200 m g ないし約 300 m g、約 300 m g ないし約 400 m g、若しくは用量あたり約 400 m g ないし約 500 m g である。

10

#### 【0065】

本医薬組成物は単独で投与しうる。場合によっては、本明細書に説明される組成物は有益な効果を有することが既知の他の分子と組合せて投与しうる。例えば、有用な補助因子は、防腐剤、抗生物質、抗ウイルス及び抗真菌剤並びに鎮痛薬、抗炎症薬、麻酔薬を包含する症状を軽減する補助因子を包含する。別の態様において、眼内投与を企図している場合、網膜の付着若しくは損傷された網膜組織の処置に役立つ分子が望ましいことができる。有用な補助因子の例は、抗 V E G F 薬 ( V E G F に対する抗体のような)、塩基性線維芽細胞成長因子 ( b F G F )、毛様体神経栄養因子 ( C N T F )、アキソカイン ( a x o k i n e ) ( C N T F の変異タンパク質)、白血病阻害因子 ( L I F )、ニュートロトロフィン ( n e u t r o t r o p h i n ) 3 ( N T - 3 )、ニューロトロフィン - 4 ( N T - 4 )、神経成長因子 ( N G F )、インスリン様成長因子 I I、プロスタグランジン E 2、30 k D 生存因子、タウリン及びビタミン A を包含する。別の適切な治療薬は、抗補体抗体例えば抗補体調節物質 C 3 (例えばエクリズマブとして商業的に入手可能であるような) を包含しうる。

20

#### 【0066】

本明細書に説明される組成物 (ベクターに媒介される及びタンパク質に基づくの双方) は、静脈内 (例えば注入ポンプによる)、腹腔内、眼内、動脈内、肺内、経口、吸入、小胞内、筋肉内、気管内、皮下、眼内 (硝子体内及び網膜内を包含する)、くも膜下腔内、経皮、経胸膜、動脈内、局所、吸入 (例えばスプレーの霧として)、粘膜、(鼻粘膜を介するような)、皮下、経皮、胃腸、関節内、大槽内、脳室内、直腸 (すなわち坐剤を介して)、膣 (すなわちペッサリーを介して)、頭蓋内、尿道内、肝内及び腫瘍内を含むが、これらに限定されない、いずれかの経路を介して被験体に投与される場合がある。いくつかの態様において、組成物は全身に (例えば静脈内注入により) 投与される。いくつかの態様において、組成物は局所に (例えば動脈内若しくは眼内注入により) 投与される。

30

#### 【0067】

従って、さらなる一局面において、例えば、本明細書に説明されるような補体 H 因子関連障害、並びに：急性心筋梗塞後の虚血 - 再灌流による組織損傷、動脈瘤、卒中、出血性ショック、挫滅創、多臓器不全、循環血液量減少性ショック 腸虚血、脊髄損傷及び外傷性脳傷害；炎症性障害例えば火傷、内毒血症及び敗血症ショック、成人呼吸窮迫症候群、心肺バイパス、血液透析；アナフィラキシーショック、重度喘息、血管浮腫、クローン病、鎌形赤血球貧血、連鎖球菌感染後糸球体腎炎、膜性腎炎、及び睪炎；移植片拒絶例えば超急性異種移植片拒絶；再発性胎児消失及び妊娠高血圧腎症のような妊娠関連疾患；有害薬物反応例えば薬物アレルギー、I L - 2 誘発性血管漏出症候群及び X 線造影剤アレルギー；並びに限定されるものでないが重症筋無力症、アルツハイマー病、多発性硬化症、肺気腫、肥満、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、インスリン依存性糖尿病、急性散在性脳脊髄炎、アジソン病、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性肝炎、クローン病、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本病、特発性血小板減少性紫斑病、天疱瘡、シェーグレン症候群、及び高安動脈炎、心肺バイパス後合併症を挙げることができる自己免疫障害；心筋梗塞；虚血 / 再灌流傷害

40

50



；卒中；急性呼吸窮迫症候群（ARDS）；敗血症；熱傷；心肺バイパス及び血液透析に伴う炎症；血漿交換；血小板アフェレーシス；白血球フェレーシス；体外式膜型人工肺（ECMO）；ヘパリン誘発性体外LDL沈殿（extracorporeal LDL precipitation）（HELP）；X線造影剤誘発性アレルギー反応；移植片拒絶を含むがこれらに限定されない他の補体関連障害を包含する補体関連障害の処置における医薬組成物の使用。

#### 【0068】

「ある（a）」若しくは「ある（an）」という用語は1若しくはそれ以上を指すことに注意されるべきである。であるから、「ある（a）」（若しくは「ある（an）」）、

10

#### 【0069】

「含んでなる（comprise）」、「含んでなる（comprises）」及び「含んでなる（こと）（comprising）」という語は排他的よりはむしろ包括的に解釈されるべきである。「からなる（consist）」、「からなる（こと）（consisting）」という語及びその変形は包括的よりはむしろ排他的に解釈されるべきである。本明細中の多様な態様は「含んでなる（こと）」との文言を使用して提示される一方、他の環境下では、関連する態様は「からなる（こと）」若しくは「から本質的になる（こと）」との文言を使用して解釈及び記述されることもまた意図している。

#### 【0070】

本明細書で使用されるところの「約」という用語は、別の方法で明記されない限り、示される参照からの10%の変動可能性を意味している。

20

#### 【0071】

本明細書で使用されるところの「調節」という用語若しくはその変形は、組成物が生物学的経路の1若しくはそれ以上の成分を阻害できる能力を指す。

#### 【0072】

本明細書で別の方法で明記されない限り、ホモ接合性被験体及びヘテロ接合性被験体の双方が補体媒介性障害を有する被験体という文言に包含される。

#### 【0073】

「被験体」は、哺乳動物、例えばヒト、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、乳牛、ブタ、又はサル、チンパンジー、ヒヒ若しくはゴリラのようなヒト以外の霊長類である。

30

#### 【0074】

本明細書で使用されるところの「疾患」、「障害」、「機能障害」及び「状態」は、別の方法で明記されない限り、被験体における異常な状態を示すために互換的に使用される。

#### 【0075】

本明細で別の方法で定義されない限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、当業者により、及び本出願で使用される用語の多くに対する一般的指針を当業者に提供する刊行物の説明への参照により普遍的に理解されると同一の意味するところを有する。

#### 【0076】

以下の実施例は例示のみでありかつ本発明を限定することを意図していない。

40

#### 【実施例】

#### 【0077】

ヒトH因子短縮化バリエーション（hfH1-4.678.19-20）の操作及びクローニング：

短縮化バリエーションを、製造元のプロトコルに従い、PhusionハイフィデリティーDNAポリメラーゼ（カタログ番号M0530S、New England Biolabs）を使用するインバースPCR法により生成した。インバースPCRの鋳型として使用された完全長ヒト補体H因子cDNA pCMV Sport6はThermo Fisher Scientificから得た（カタログ番号MHS6278-202800294、クローンID 40148771）。hfH1-4.678.19-20の生成に使

50



用されたPCRプライマーを表1に列挙する。PCRフラグメントを0.8%アガロースゲル上で分離しかつAccuPrepゲル抽出キット(カタログ番号K-3035、Bioneer)により抽出した後、50ngのゲル精製されたフラグメントをRapid DNAライゲーションキット(カタログ番号K-4123、Thermo Fisher Scientific)による核酸連結のため使用し、そしてDH5 コンピテント細胞(カタログ番号1825801、Invitrogen)中に形質転換した。陽性クローンを、制限消化又は特異的プライマーを使用するPCRスクリーニングのいずれかにより確認した。その後、pCMV Sport 6からのhfH1-4.678.19-20挿入断片をEcoRI及びNotI消化により遊離し、そしてゲル精製されたフラグメントをEnd-repairモジュール(カタログ番号E6050S、New England Biolabs)により平滑化しかつ精製した。このフラグメントを、pCBABGベクター(CMVエンハンサーを伴うニワトリアクチンプロモーター及び同一遺伝子の部分的イントロン配列、並びにウサギグロブリン遺伝子ポリアデニル化シグナル配列を有する)中にEcoRV部位でサブクローニングした。陽性クローンを制限消化及びPCR法により選択した。

【0078】

【表1】

表1：

hfH 短縮化バリエーションのプライマー：	
hfHdSCR5R 配列番号 49	TGA TTT TTC TTC ACA TGA AGG CAA CGG
hfHdSCR5F 配列番号 50	ACC TTG AAA CCT TGT GAT TAT CCA GAC A
hfHdSCR9-18R 配列番号 51	AGA TTT AAT GCA CGT GGG TTG AGC
hfHdSCR9-18F 配列番号 52	AAA GAT TCT ACA GGA AAA TGT GGG CC

【0079】

ヒトH因子短縮化バリエーションhfH1-4.678.17-20の操作及びクローニング：短縮化バリエーションを、製造元のプロトコルに従ってPhusionハイフィデリティーDNAポリメラーゼ(カタログ番号M0530S、New England Biolabs)を使用するインバースPCR法により生成した。完全長ヒト補体H因子cDNA pCMV Sport 6(インバースPCRの鋳型として使用される)はThermo Fisher Scientificから得た(カタログ番号MHS6278-202800294、クローンID 40148771)。hfH1-4.678.17-20の生成に使用されたPCRプライマーを表1に列挙する。PCRフラグメントを0.8%アガロースゲル上で分離しかつAccuPrepゲル抽出キット(カタログ番号K-3035、Bioneer)により抽出した後、50ngのゲル精製されたフラグメントをRapid DNAライゲーションキット(カタログ番号K-4123、Thermo Fisher Scientific)による核酸連結のため使用し、そしてDH5 コンピテント細胞(カタログ番号1825801、Invitrogen)中に形質転換した。陽性クローンを、制限消化又は特異的プライマーを使用するPCRスクリーニングのいずれかに



より確認した。その後、pCMV Sport 6中の人工改変されたhfH1-4.678.17-20バリエントを、infusionクローニング法(Clontech カタログ番号638909)によりpCBABGベクター中にEcoRI部位でサブクローニングした。短縮化タンパク質製造及び発現ベクター中へのクローニングのためのプライマーが表2にあった。

【0080】

【表2】

表2：

hfH 短縮化バリエントのプライマー：	
hfHdSCR5R 配列番号 49	TGA TTT TTC TTC ACA TGA AGG CAA CGG
hfHdSCR5F 配列番号 50	ACC TTG AAA CCT TGT GAT TAT CCA GAC A
hfHdSCR9-16R 配列番号 53	AGA TTT AAT GCA CGT GGG TTG AGC
hfHdSCR9-16F 配列番号 54	ATAAAAACAGATTGTCTCAGTTTACCTAGCT
pCBAGhfH-ORF F 配列番号 55	TTTTGGCAAAGAATTGGACGTTGTGAACAGAGTT
pCBAGhfH-ORF R 配列番号 56	CCTGAGGAGTGAATTCTATCTTTTTGCACAAGTTGG

【0081】

組換えhfH1-4.678.19-20タンパク質の発現及び精製：

陽性クローン(pCBARB Gベクター中のhfH1-4.678.19-20)を、hfH1-4.678.19-20タンパク質の安定性及び機能的活性を評価するためHEK細胞中にトランスフェクトした。6ウェルプレート(Falcon、カタログ番号353046)中の約80%コンフルエントのHEK細胞を、製造元の説明書に従い、Lipofectamine 2000(カタログ番号11668019、Invitrogen)を使用してpCBARB G中のhfH1-4.678.19-20 cDNAでトランスフェクトした。タンパク質発現を、ヤギ抗ヒトH因子IgG(カタログ番号A237、Complement tech)を使用するウエスタンブロッティングにより確認した。タンパク質大量発現のため、150cm皿(Falcon、カタログ番号353025)中の80%コンフルエントのHEK細胞を、製造元の説明書に従って、PEI(カタログ番号23966、Polysciences)を用いpCBARB Gプラスミド中のエンドキシンプリーhfH1-4.678.19-20 cDNAでトランスフェクトした。トランスフェクション2日後に上清をプレートから回収しかつ0.2µmフィルターで濾過し、そしてPBSで平衡化されたOx-23(SCR2/3に特異的なマウス抗ヒトhfH mAb、カタログ番号10402-1VL、Sigma)セファロースアフィニティーカラム上に負荷した。25カラム容量を伴う500mM NaClを含有するPBSで洗浄した後に、結合されたhfH1-4.678.19-20を100mMグリ



シン H C l   p H 2 . 7 で溶離し、そして溶離された画分（画分あたり 2 m l ）を 2 0 0 μ l の 1 . 5 M トリス - H C l   p H 8 . 5 で中和した。溶離されたタンパク質の純度を S D S - P A G E により確認し、そして純粋な画分を合わせかつ P B S を 2 回交換しながら一夜透析した。

#### 【 0 0 8 2 】

マウス H 因子短縮化バリエーション ( m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) の操作及びクローニング：

短縮化バリエーションを、製造元のプロトコルに従い、P h u s i o n ハイフィデリティー DNA ポリメラーゼを使用するインバース P C R 法により生成した。インバース P C R のための鋳型として使用された p B l u e s c r i p t   S K ( - ) 中の完全長マウス補体 H 因子 c D N A は M . N o n a k a 博士（東京大学、日本、N C B I   N M   0 0 9 8 8 8 . 3 のヌクレオチド 1 1 0 - 4 3 6 1 ）より恵与された。m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 バリエーションの生成に使用された全 P C R プライマーを表 3 に列挙する。P C R フラグメントを 0 . 8 % アガロースゲル上で分離しかつ A c c u P r e p ゲル抽出キットにより抽出した後、5 0 n g のゲル精製されたフラグメントを R a p i d   D N A ライゲーションキットによる核酸連結に使用し、そして D H 5   コンピテント細胞中に形質転換した。陽性クローンを、制限消化により若しくは特異的プライマーを使用する P C R スクリーニングによりのいずれかで確認した。その後、p B l u e s c r i p t   S K ( - ) からの m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 挿入断片を S m a   I 及び E c o R   V 消化により遊離しそしてゲル精製した。このフラグメントを p C B A R B G ベクター中に E c o R   V 部位でサブクローニングした。陽性クローンを制限消化及び P C R 法により選択した。

#### 【 0 0 8 3 】

#### 【表 3】

表 3：

mfH 短縮化バリエーションのプライマー：	
dSCR5R 配列番号 57	TCTCTTTTCTTCACAGAAAGGCTGAGAACTCC
dSCR5F 配列番号 58	ACC TTG AAA CCA TGT GAA TTT CCA CAA TTC
dSCR9-18F 配列番号 59	CGA GAC TCA ACA GGG AAA TGT GG
dSCR9-18R 配列番号 60	AGA CTT AAT GCA TGA GGG TTG AGG T

#### 【 0 0 8 4 】

組換え m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質の発現：

陽性クローン（p C B A R B G ベクター中の m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ）を、m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質の安定性及び機能的活性を評価するために H e p a 1 C 1 C 7 細胞（マウス肝細胞癌細胞株、A T C C （登録商標）C R L - 2 0 2 6 ）中にトランスフェクトした。6 ウェルプレート中の約 8 0 % コンフルエントの細胞を、製造元の説明書に従い、L i p o f e c t a m i n e   2 0 0 0 を使用して m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0   c D N A でトランスフェクトした。タンパク質発現をウサギ抗マウス f H   I g G （参照番号 1 ）を使用するウエスタンブロッティングにより確認した



。プロットはPierce ECL plusウエスタンブロットニング基質（カタログ番号80196、Thermo Fisher Scientific）を使用して可視化した。

#### 【0085】

AAV移入プラスミド及びウイルスの生成：

pCBARBGベクターからのmfH1-4.678.19-20若しくはhfH1-4.678.19-20発現カセットをHinc II及びPst I消化により遊離し、そしてゲル精製されたフラグメントをEnd Repair Module（カタログ番号E6050S、NEB）で平滑化し、そして、Nhe I及びXho Iで消化されかつ平滑化された、ペンシルバニア大学ベクターコア（University of Pennsylvania Vector Core）<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>）からのpAAV TBG.PI.EGFP.WPRE.BGHベクター（カタログ番号PL-C-PV0146）に連結した。陽性クローンをSma I消化によりスクリーニングした。

#### 【0086】

hfH1-4.678.17-20ベクターをもつpCBABGを、Infusionクローニング方法を使用することにより発現カセットの5'端（配列番号61：ctg c g c g c t c g c t c a c t g a g g c c c g g g c a a a g c c c g g g c g t c g g g c g a c c t t t g g t c g c c c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g a g a g a g g - g a g t g g c c a a c t c c - a t c a c t a g g g g t t c c t t g t a g t t a a t、Hinc II部位で）及び3'端（配列番号62：a t t a a c t a c a a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c a c t c c c t c t c t g c g c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c c c g g g c t t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c a g、Pst I部位で）にITRs（末端逆位配列）を挿入することにより、AAV移入プラスミド中に改変した。プライマーを使用して、表4に列挙される鋳型として使用されるpENN.AAV.TBG.PI.RBGベクターからAAV ITRsを増幅した。pENN.AAV.TBG.PI.RBGベクターはペンシルバニア大学ベクターコア（University of Pennsylvania Vector Core）<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>）から得た（カタログ番号PL-C-PV1015）。

#### 【0087】

10

20

30

40

50



【表 4】

表 4

ITR 挿入プライマー	
Hinc II 5'ITR F 配列番号 63	AAGTGCCACCTGGTCGACGCTGCGCGCTCGCTCGCT
Hinc II 5'ITR R 配列番号 64	TCAATAATCAATGTGCGACATTAATACTACAAGGAACCCCT
Pst I 3'ITR F 配列番号 65	GAAGATCCCTCGACCTGCAGATTAATACTACAAGGAACCCCT
Pst I 3'ITR R 配列番号 66	ACGCCAAGCTTGGGCTGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTC

10

## 【 0 0 8 8 】

20

スーパーコイルのエンドトキシンプリー AAV プラスミドを Endo free プラスミドキット (カタログ番号 12362、Qiagen) により製造し、そしてペンシルバニア大学ベクターコア (University of Pennsylvania Vector Core) 若しくはマサチューセッツ大学遺伝子治療センターベクターコア (University of Massachusetts Gene Therapy Center Vector Core) による AAV ウイルス製造に使用した。mfH1-4.678.19-20、hfH1-4.678.19-20 若しくは hfH1-4.678.17-20 をコードする AAV のパッケージング、精製及び力価測定は、記述されるところの標準の手順 (<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>) を使用することにより達成した。

30

## 【 0 0 8 9 】

fH<sup>m/m</sup> マウスにおける hfH1-4.678.19-20 及び hfH1-4.678.17-20 AAV の治療的有効性:

C3 系球体腎症を発症した fH<sup>m/m</sup> マウスの生成は、過去に Lesher ら (2013) による論文 "Combination of factor H mutation and properdin deficiency causes severe C3 glomerulonephritis", J Am Soc Nephrol. 2013 Jan; 24(1): 53-65. Epub 2012 Nov 30 に説明されている。C3 系球体腎症の処置における hfH1-4.678.19-20 及び hfH1-4.678.17-20 の発現レベル、持続期間及び治療的有効性を試験するため、10-12 週齢 fH<sup>m/m</sup> マウスに  $3 \times 10^{12}$  遺伝子コピー/マウス (hfH1-4.678.19-20 について) 若しくは  $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$  遺伝子コピー/マウス (hfH1-4.678.17-20 について) を後眼窩経路により注入した。マウスの別個の群において、対照 AAV ベクター (pAAV.TBG.NULL.rBG) を対照として使用した。天然のヒト fH がマウスにおける代替経路 (AP) 補体活性化の阻害において機能的に活性であることが以前の研究から既知である (Fakhouri, F. ら、Kidney International (2010) 78, 279-286; 2010 年 5 月 5 日オンラインで公表された)。血液を、注入前、及び注入後 1 週 (hfH1-4.678.19-20 について) 若しくは注入後 1、2 週、1、2、3 か月 (hfH1-4.

40

50



678・17-20について)に、後眼窩出血を介して回収した。fH<sup>m/m</sup>マウスは、血漿AP補体活性化制御不全を特徴とする自然発症C3系球体腎症を発症し、C3、B因子(fB)及びC5消費並びにC3及びC5b-9の顕著な系球体沈着に至る(Lesherら 2013)。hfH1-4・678・19-20若しくはhfH1-4・678・17-20がfH<sup>m/m</sup>マウスにおいて機能的に活性である場合、C3及びfB消費の低減が期待されるであろう。従って、hfH1-4・678・19-20及びhfH1-4・678・17-20の治療的有効性についての読み出し情報として、われわれは、fH<sup>m/m</sup>マウス中へのAAV注入前及び後にウエスタンブロットにより血漿C3及びfBのレベルを検査した。マウス血漿(1 µl)をサンプル緩衝液で希釈し、そして還元条件下で4-20%勾配SDS-PAGEゲルに負荷する前に煮沸させた。サンプルをその後PVD Fメンブレンに転写しそして適切な抗体でプロ-ビングした。C3及びfBの検出のため、HRP結合ヤギ抗マウスC3 Ab(1:4000、MP Biomedicals カタログ番号0855557)若しくはアフィニティー精製されたヤギ抗ヒトfB Ab(マウスfBと交差反応する; 1:2500、カタログ番号A235、Complement Technology)を一次抗体として、次いでHRP結合ウサギ抗ヤギIgG(1:4000、カタログ番号1721034、Bio-Rad)を使用した。ブロットをPierce ECL Plusウエスタンブロッティング基質を使用して可視化した。【0090】

マウス血液中のhfH1-4・678・19-20若しくはhfH1-4・678・17-20タンパク質の検出:

AAV処置されたfH<sup>m/m</sup>マウスにおけるhfH1-4・678・19-20又はhfH1-4・678・17-20の存在を検出するため、ELISA法を開発しかつ使用した。簡潔には、96ウェルプレート(MaxiSorp)を、4 µg/mlの抗ヒトH因子mAb(OX-23)で室温で2時間前コーティングした。プレート上の占有されない結合部位をPBS中1%ウシ血清アルブミン(BSA)を使用して室温で1時間ブロッキングした。10 mM EDTAを含有するブロッキング緩衝液中の連続して希釈されたマウス血漿サンプルをウェルに添加しかつ室温で1時間インキュベートし、次いで2 µg/mlのビオチン標識抗hfH mAb(クローンL20/3、ヒトH因子のSCR19に特異的、カタログ番号518504、Bio-Legend)及び室温で1時間インキュベートした。洗浄した後、プレートをその後アビジン-HRP(1/1000、Cat 554058、BD Biosciences)とともに室温で1時間インキュベートし、そしてTMB基質試薬(Cat 51-2606 KC及びBD Cat 51-2607 KC、BD Biosciences)を使用して発色させた。

【0091】

fH<sup>m/m</sup>若しくはfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスにおけるAAVにより送達されるmfH1-4・678・19-20の治療的有効性:

hfH1-4・678・19-20の代理物としてのmfH1-4・678・19-20の治療的有効性を試験するため、fH<sup>m/m</sup>マウス及びfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスを、mfH1-4・678・19-20のコーディング配列を含有するAAVベクターに感染させた。Lesherら(Lesherら、2013、上で引用される)により過去に説明されたとおり、fH<sup>m/m</sup>マウスはC3及びfB消費を伴う致死性でないC3系球体腎症を発症した一方、二重変異体fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウス(プロパージンが欠損にされたfH<sup>m/m</sup>マウス)は悪性かつ致死性の形態のC3系球体腎症を発症し、そして10~12週齢までに死亡した(Lesherら 2013)。従って、fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスは、われわれがmfH1-4・678・19-20 AAVの治療的有効性のもう一つの読み出し情報として死亡率を使用することもまた可能にするとみられる。7週齢fH<sup>m/m</sup>若しくはfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスに対照AAV(pAAV.TBG.NULL.rBG)若しくはmfH1-4・678・19-20 AAVのいずれかを3×10<sup>12</sup>遺伝子コピー/マウスで後眼窩経路により注入した。血液を、注入前、注入後1週間以降の多様な時間点で後眼窩出血を介して回収した。血漿C3及びfBレベルを評価するため、マウス血漿(1 µl)をサンプル緩衝

10

20

30

40

50



液で希釈し、そして還元条件下で4 - 20 % 勾配SDS - PAGEゲルに負荷する前に煮沸させた。サンプルをその後PVDFメンブレンに転写し、そして適切な抗体でプロービングした。C3及びfBについて、HRP結合ヤギ抗マウスC3 Ab若しくはアフィニティー精製されたヤギ抗ヒトfB Ab (マウスfBと交差反応する)を一次抗体として使用し、次いでHRP結合ウサギ抗ヤギIgGで検出した。いくつかの場合において、処置されたマウスは、死亡の予防におけるmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 AAVの有効性並びに/若しくは読み出し情報として血漿C3及びfBレベルを使用するAP補体活性化を観察するため、6若しくは10か月間追跡した。

#### 【0092】

fH<sup>m/m</sup>マウスにおけるmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 AAVの投薬量決定:

10

治療的有効性を達成するのに必要とされるmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 AAVコピーの量を滴定することを目的とされる実験において、10 ~ 12週齢fH<sup>m/m</sup>マウス (Lesher, 2013) に $1 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 若しくは $1 \times 10^{11}$ 遺伝子コピー/マウスのAAVを後眼窩経路により注入した。血液を、注入前及び指定される時間点 (注入1週及び1か月後) に後眼窩出血を介して回収した。マウス血漿 (1 µl) をサンプル緩衝液で希釈し、そして還元条件下で4 - 20 % 勾配SDS - PAGEゲルに負荷する前に煮沸させた。サンプルをその後PVDFメンブレンに転写し、そして適切な抗体でプロービングした。C3及びfBの検出のため、HRP結合ヤギ抗マウスC3 Ab (1 : 4000、カタログ番号0855557、MP Biomedicals) 若しくはアフィニティー精製されたヤギ抗ヒトfB Ab (マウスfBと交差反応する; 1 : 2500、カタログ番号A235、Complement Technology, Inc.) を一次抗体として使用し、次いでHRP結合ウサギ抗ヤギIgG (1 : 4000、カタログ番号1721034、Bio-Rad) で検出した。プロットをPierce ECL Plusウエスタンブロットティング基質を使用して可視化した。

20

#### 【0093】

ELISAによるマウス血液中のmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 タンパク質の検出:

マウス血液中のmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 タンパク質の存在を検出するため、ELISAアッセイを開発しかつ使用した。簡潔には、96ウェルプレートを、2 µg / mlのマウス抗マウスfH SCR19 - 20 mAb (クローン12、fH<sup>m/m</sup>マウスを組換えマウスfH SCR19 - 20で免疫化することにより学内で生成された (Barata, L. ら、J. Immunol 190 (6) : 2886 - 95 (2013)) で37 °Cで1 ~ 2時間室温で前コーティングした。プレート上の占有されない結合部位をPBS中1 % BSAで室温で1時間ブロッキングした。10 mM EDTAを含有するブロッキング緩衝液中の連続して希釈されたマウス血漿サンプルをウェルに添加しかつ室温で1時間、次いでビオチン標識ウサギ抗マウスfH 抗体 (Lesher ら、2013) 室温で1時間インキュベートした。プレートをアビジン - HRPとともに室温で1時間インキュベートし、その後TMB基質試薬を使用して発色させた。

30

#### 【0094】

ウエスタンブロットティングによるマウス血漿中のmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 タンパク質の検出:

40

ウエスタンブロットによるマウス血液中のmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 タンパク質の存在を検出するため、10 µlのマウス血漿を10 mM EDTAを含有する90 µlのPBSで希釈し、そして抗マウスfH mAb (クローン12) 結合されたSephacrose (登録商標) ビーズと室温で30分間インキュベートした。500 mM NaClを含有するPBSで2回洗浄した後、Sephacrose (登録商標) ビーズをSDS - PAGEサンプル緩衝液とともに5分間煮沸し、そしてSDS - PAGE上で泳動した。サンプルをその後PVDFメンブレンに転写し、そしてmfH1 - 4 . 678 . 19 - 20 タンパク質を、BSAに前吸収されたウサギ抗マウスfH 19 - 20 Ab (Lesher ら、2013) により検出した。プロットはPierce ECL Plusウエスタンブロットティング基質を使用して可視化した。

50



## 【 0 0 9 5 】

腎におけるC3の免疫蛍光染色：

対照AAV若しくはmfH1-4.678.19-20 AAVで処置されたfH<sup>m/m</sup>若しくはfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスからの腎を、OCT培地中で急速凍結しかつ-80で保存した。免疫蛍光研究のため、4μm切片を薄切しかつ染色に使用した。C3染色のため、FITC結合ヤギ抗マウスC3 Abを使用し(1:500、カタログ番号855500、MP Biomedicals)、そして実験は説明された(Lesherら 2013)とおり実施された。

## 【 0 0 9 6 】

マウス生存分析：

以下の表は対照AAV8ベクター若しくはAAV8-mfH1-4.678.19-20ベクターで処置されたfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスの生存データの要約を提供する。対照AAV8ベクターで処置された全8fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスが処置の2~3週以内に死亡した一方、AAV8-mfH1-4.678.19-20ベクターで処置された9fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスのうち7匹が致死性C3糸球体腎症から救助された。全マウスに3×10<sup>12</sup>遺伝子コピー/マウスのそれぞれのAAVウイルスを後眼窩I.V.経路を通じ注入した。対照AAV若しくはmfH1-4.678.19-20 AAVで処置されたfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスの生存をAAV処置後10か月間記録した。データは打ち切り(安楽死)又は自然死であるとして分類し、そしてGraphPad Prism(カリフォルニア州ラホヤ)により分析した。

## 【 0 0 9 7 】

## 【表5】

AAV ベクター	処置されたマウスの数	注
AAV8-mfH1-4.678.19-20	9 匹	遺伝子治療後9か月で4匹健康(継続中) 遺伝子治療後6か月で2匹健康(6か月で屠殺された) 遺伝子治療後5か月で1匹健康(継続中) 遺伝子治療後3か月で1匹瀕死 遺伝子治療後2週で1匹瀕死
Con AAV8	8 匹	全部が注入後2-3週間で死亡した

## 【 0 0 9 8 】

ヘパリン結合アッセイ：

hfH1-4.678.19-20及びmfH1-4.678.19-20タンパク質のヘパリン結合活性を試験するため、96ウェルプレートを重ね炭酸緩衝液(pH6.9)中100μgのヘパリン(Sigma、H3393)で37で1時間前被覆した。プレート上の占有されない結合部位をPBS中1%BSAで室温で1時間ブロッキングした。多様な量のhfH1-4.678.19-20又はmfH1-4.678.19-20タンパク質を添加しそして室温で1時間、次いで2μg/mlのマウス抗ヒトfH mAb(OX-23)とともに室温で1時間インキュベートした。プレートをHRP結合ウサギ抗マウスIgG(1/4000、カタログ番号A9044、Sigma)とともに室温で



1 時間インキュベートし、その後 T M B 基質試薬を使用して発色させた。

【 0 0 9 9 】

C 3 b 結合アッセイ：

h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 及び m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質の C 3 b 結合活性を試験するため、9 6 ウェルプレートに 2  $\mu$  g / m l のヒト C 3 b ( カタログ番号 A 1 1 4 、 C o m p T e c h ) で 3 7 ° で 1 時間前コーティングした。プレート上の占有されない結合部位を P B S 中 1 % B S A で室温で 1 時間ブロッキングした。多様な量の h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 又は m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質を添加しそして室温で 1 時間、次いで 2  $\mu$  g / m l のマウス抗ヒト f H m A b ( O X - 2 3 ) 室温で 1 時間インキュベートした。プレートを H R P 結合ウサギ抗マウス I g G とともに室温で 1 時間インキュベートし、その後 T M B 基質試薬を使用して発色させた。

10

【 0 1 0 0 】

I 因子に媒介される C 3 b 切断における f H タンパク質の液相補助因子活性のアッセイ：

C 3 b の I 因子に媒介される切断における h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 及び m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質の液相補助因子活性を評価するため、0 . 5 又は 0 . 2 5  $\mu$  g の精製された h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 又は m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質を 1 5  $\mu$  l の P B S 中の 2  $\mu$  g のヒト C 3 b と混合し、そして 1  $\mu$  g のヒト I 因子 ( カタログ番号 A 1 3 8 、 C o m p T e c h ) をその後添加しかつ 3 7 ° で 1 5 分間インキュベートした。反応を 5  $\times$  還元 S D S - P A G E サンプル緩衝液を添加することにより停止した。C 3 b のタンパク質分解を、還元条件下で 4 - 2 0 % 勾配 S D S - P A G E ゲルを使用して鎖の切断並びに 4 1 及び 3 9 フラグメントの生成を分析すること、次いで H R P 結合ヤギ抗ヒト C 3 I g G ( 1 / 4 0 0 0 、 カタログ番号 8 5 5 2 3 7 、 M P b i o m e d i c a l s ) を使用するウエスタンブロット検出により測定した。プロットは P i e r c e E C L P l u s ウエスタンブロットティング基質を使用して可視化した。

20

【 0 1 0 1 】

膜補体調節物質の欠損により引き起こされる A P 補体活性化の予防における m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の治療的有効性の評価：

f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 A A V 処置が膜補体調節物質の欠損により引き起こされる A P 補体活性化の予防においてもまた有効でありうるかどうかを決定するため、m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 を、2 種の膜補体調節物質 D A F 及び C r r y が欠損しているマウスの一系統 ( D A F / C r r y 二重変異体マウス ) において試験した。D A F / C r r y 二重変異体マウス ( D A F <sup>-/-</sup> - C r r y <sup>flox/flox</sup> - T i e - 2 C r e <sup>+</sup> ) の作出は、過度の A P 補体活性化による二次的補体欠乏症の表現型で以前に説明された ( B a r a t a ら、2 0 1 3 ) 。f H <sup>m/m</sup> マウスと同様、D A F / C r r y 二重変異体マウスにおいて C 3 及び f B 消費が存在した ( B a r a t a ら、2 0 1 3 ) 。D A F / C r r y 二重変異体マウス ( 1 0 週齢 ) に、m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 A A V を 3  $\times$  1 0 <sup>12</sup> 遺伝子コピー / マウスで後眼窩経路により注入した。血液を注入前及び注入後 1 週に後眼窩出血を介して回収した。治療的有効性を、ウエスタンブロット分析を使用して m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 A A V 処置前及び後の血漿 C 3 及び f B レベルを測定することにより評価した。ウエスタンブロットのため、マウス血漿 ( 1  $\mu$  l ) をサンプル緩衝液で希釈し、そして還元条件下で 4 - 2 0 % 勾配 S D S - P A G E ゲルに負荷する前に煮沸させた。サンプルをその後 P V D F メンブレンに転写しかつ適切な抗体でプロービングした。マウス C 3 及び f B の検出のため、H R P 結合ヤギ抗マウス C 3 A b ( 1 : 4 0 0 0 、 カタログ番号 0 8 5 5 5 5 7 、 M P B i o m e d i c a l s ) 若しくはアフィニティー精製されたヤギ抗ヒト f B A b ( カタログ番号 A 2 3 5 、 C o m p T e c h 、 テキサス州、マウス f B と交差反応する ) を一次抗体として使用し、次いで H R P 結合ウサギ抗ヤギ I g G で検出した。プロットは P i e r c e E C L P l u s ウエスタンブロットティング基質を使用して可視化した。

30

40

50



## 【0102】

aHUSマウスモデルの生成：

AAV媒介性fH遺伝子治療の治療的有効性を試験するためのマウスaHUSモデルを創成するため、aHUS患者で見出されるヒトfH W1183R突然変異に対応するSCR20中の1個のfH点突然変異を有する変異体マウス系統を、相同的組換えに基づく遺伝子ターゲティング技術(Lesherら、2013; Dunkelbergerら、J Immunol. 2012 Apr 15; 188(8): 4032-4042; Takashiら、Blood. 2009 Mar 19; 113(12): 2684-2694; Kimura Y1ら、Blood. 2008 Jan 15; 111(2): 732-40. Epub 2007 Oct 4; Kimura Y1ら、J Clin Invest. 2010 Oct; 120(10): 3545-54)により作成した。この実験のため、fH遺伝子フラグメントを、遺伝子ターゲティングベクターを構築するために、Expand Long Template PCRシステム(Roche、インディアナ州インディアナポリス)を使用することによりC57BL/6マウスゲノムDNAから増幅した。ターゲティングベクターのロングアームは、マウスfH遺伝子の第21エキソン及び隣接するイントロン配列を含有する6kbフラグメントから構成された。それを、以下のプライマー：配列番号67：5'-g c g g c c g c c c t a t c c a t t a g t g a g t g t g g - 3' 及び配列番号68：5'-c t c g a g g a c a g c g a t g t a a g a a c a a t c - 3' を使用するPCRにより増幅した。PCR産物をPCR 2.1ベクター(Invitrogen)中に連結し、そして挿入断片をその後Not I及びXho I制限消化によりPCR 2.1ベクターから遊離し、精製し、そしてNEOカセットの上流のpND1ベクター中にサブクローニングした。pND1ベクターの使用は遺伝子ターゲティング実験以前の刊行物に記載されており(Lesherら(2013); Dunkelbergerら、2012; Miwaら、2009; Kimuraら、2008; Kimuraら 2012)、そしてこのベクターは、それぞれ陽性及び陰性選択のためのネオマイシン(NEO)及びジフテリア毒素(DT)カセットを含有する(Lesherら(2013); Dunkelbergerら、2012; Miwaら、2009; Kimuraら、2008; Kimuraら 2012)。該pND1ベクターは、loxP部位、及びFLPe組換え酵素によるNEOの潜在的除去のためのNEOカセットに隣接する2個のフリップパーゼ認識標的(FRT)部位もまた含有する(Rodriguez CIら、Nat Genet. 2000 Jun; 25(2): 139-40.)。

## 【0103】

ショートアーム配列は、マウスfH遺伝子のSCR20をコードする第22エキソン及び隣接するイントロン配列を含有する3.85kbのフラグメントから構成された。この配列を、以下のプライマー：配列番号69：5'-g g t a c c a a g c t t a t t g a c c a g c t a c a g a c a g t a - 3' 及び配列番号70：5'-g g t a c c c t c a c t c a g g t g t a t t a c t c - 3' を使用してPCR増幅した。PCR産物をPCR 2.1ベクター中にクローン化し、そしてその後、SCR20中のヒトfHのW1183R突然変異に対応する位置1206のトリプトファン(W)からアルギニン(R)突然変異を、以下の2種のプライマー、配列番号71：5'-G G A A T C A C A C A A T A T A A T T C T C A A A A G G A G A C A C A C T G - 3' 及び配列番号72：5'-C A G T G T G T C T C C T T T T G A G A A T T A T A T T G T G T G A T T C C - 3' とともにStratagene QuickChange部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、カリフォルニア州)を使用する部位特異的突然変異誘発により作成した。WからR突然変異を確認した後に、ショートアームフラグメントをKpn I消化によりPCR 2.1から遊離し、そして同一制限部位のNEOカセットの下流でpND1ベクター中にサブクローニングした。該ターゲティングベクターをその後Not I消化により直鎖状にし、そして電気穿孔法によりC57BL/6胚性幹(ES)細胞(EmbryoMAX胚性幹細胞株-系統C57BL/6、カタログ番号CMTI

10

20

30

40

50



- 2、Millipore) にトランスフェクトした。トランスフェクトされた E S 細胞を電気穿孔 48 時間後から開始する G 418 選択にかけた。相同的組換えを伴う E S 細胞を、プライマーとして配列番号 73: 5' - A T A G C A T G T G C C A G G A G A C A C - 3' 及び配列番号 83: 5' - A G T G T T G A C T C G T G G A G A C C A - 3' を使用して増幅される 480 bp の 3' プローブを用いる HindIII 消化後のゲノム DNA のサザンブロット分析によりスクリーニングした。野生型対立遺伝子は 12.5 kb のフラグメントを生じた一方、標的化された対立遺伝子は 10.2 kb のフラグメントを生じた。正しく標的化された E S 細胞 (f H<sup>W1201R</sup>(Neo-positive)/+) を、ペンシルバニア大学医学部トランスジェニックコア施設 (University of

Pennsylvania School of Medicine Transgenic Core Facility) で交尾 3.5 日後の C57BL/6J 胚盤胞中に注入してキメラを生成した。結果として生じるキメラは、被毛色、並びに以下の 2 種のプライマー: Neo-4 プライマー: 配列番号 74: 5' - C T T G G G T G G A G A G G C T A T T C - 3' 及び配列番号 75: Neo-5 プライマー: 5' - A G G T G A G A T G A C A G G A G A T C - 3' を使用する NEO の検出のための PCR スクリーニングの組合せにより評価される、生殖系列の伝達を生じた。ターゲティングベクター中のネオマイシン耐性カセット (NEO) は、フリッパーゼ (FLP) 組換え酵素によるその後の除去を可能にするため 2 個の FLP 組換え酵素標的 (FRT) 部位に挟まれた。ヘテロ接合性の F H 標的化マウス (f H<sup>W1206R</sup>(Neo-positive)/+) を FLP 特異的トランスジェニックマウス (C57BL/6 遺伝的背景で FLP の強化されたバージョンを発現する) と交雑して、f H 対立遺伝子から NEO を除去しかつ NEO 遺伝子カセットを伴わないヘテロ接合性 f H 変異体マウス (f H<sup>W1206R</sup>/+) を作成した。f H<sup>W1206R</sup>/+ マウスを異系交配して、C57BL/6 の遺伝的背景の f H<sup>W1206R</sup>/W1206R ホモ接合性マウスを作成した。遺伝子型判定のため、以下のプライマーを PCR による野生型及び変異された f H 対立遺伝子の検出のため使用した: WR1 (F H 特異的) 配列番号 76: 5' - G A T A T G G T C A A T T T A G G G A A A G T、配列番号 77: Neo7 (NEO 特異的) 5' - G G G T G G G A T T A G A T A A A T G C C - 3' 及び配列番号 78: WR4 (F H 特異的) 5' - T A C T G T C T G T A G C T G G T C A A T 3'。

#### 【0104】

以下の表は、対照 AAV 若しくは AAV8 - mfH1 - 4.678.19 - 20 ベクターを  $3 \times 10^{11}$  GC / マウスで受領する f H<sup>W1206R</sup>/W1206R マウスの処置の転帰を要約する。

#### 【0105】

##### 【表 6】

AAV ベクター	処置されたマウスの数	転帰
AAV8-mfH1-4.678.19-20 (3x 10 <sup>11</sup> GC/マウス)	3 匹	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 全 3 匹が現時点 (遺伝子治療 2 か月後) に生存かつ健康である</li> <li>・ 全部が正常な血小板数を有する</li> </ul>
Con AAV8 (3x 10 <sup>11</sup> GC/マウス)	2 匹	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 1 匹が処置の 4 週後に死亡した</li> <li>・ 残存するマウスは生存しているがしかし低い血小板数を有する</li> </ul>

#### 【0106】



ホモ接合性 f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスは、4～6週齢で明らかになる有意に低い体重及び30週までの50%近い死亡率を伴い、元気に育つことができなかった。全 f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスが、a H U S の特徴的な特徴、すなわち腎傷害（上昇された血液尿素窒素レベル及び/又は糸球体中の血栓性微小血管症の組織学的徴候）、血小板減少症及び貧血の1又はそれ以上を示した。f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスの約3分の1は卒中を暗示する重度の神経学的症状も発症した。腎糸球体における血栓性微小血管症に加え、複数器官（肝、肺、脾、腎、脳及び眼）における多数の大血管血栓が f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスに存在した。

#### 【0107】

上で報告された時点で、A A V 8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置された全 3 f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスは、正常な血小板数を伴い生存かつ健康であった一方、対照 A A V ベクターで処置された 2 f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスの1匹が死亡し（処置後4週で）及び残存するマウスは血小板減少症を包含する a H U S の症状を示した。

10

#### 【0108】

f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスにおける A A V により送達される m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の治療的有効性：

h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の代理物としての m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の治療的有効性を試験するため、われわれは、4週齢のホモ接合性 f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスに  $3 \times 10^{11}$  遺伝子コピー/マウスを後眼窩経路により注入した。m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 が f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスにおいて機能的に活性である場合、血小板減少症及び腎傷害の低下を期待するであろう。従って、m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 -

20

2 0 の治療的有効性の読み出し情報として、われわれは血小板の数を計数しかつ血清の血液尿素窒素のレベルを測定した。f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスは、4～6週齢で明白な有意に低い体重及び30週までに50%近い死亡率を伴い、元気に育つことができなかったためである。f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスは、われわれが m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0

A A V の治療的有効性についてのもう一つの読み出し情報として死亡率を使用することにもまた可能にするとみられる。

#### 【0109】

30

対照 A A V 及び m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 A A V で処置された f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスにおける血小板数

対照 A A V 及び m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 A A V で処置された f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスにおける血小板数を測定するため、血液を、注入前及び注入後1か月で開始する多様な時間点で、後眼窩出血を介して E D T A とともに回収し（最終濃度：0.02 M）、そしてフィラデルフィア小児病院の C T R C トランスレーショナルコア検査室（C T R C T r a n s l a t i o n a l C o r e L a b o r a t o r y a t t h e C h i l d r e n ' s H o s p i t a l o f P h i l a d e l p h i a）（<https://ctrc.research.chop.edu/services-facilities/translational-core-laboratory-tcl/hematology>）で Sysmex X T - 2 0 0 0 i V 自動化血液学分析装置で分析した。

40

#### 【0110】

対照 A A V 及び m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 A A V で処置された f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスにおける血液尿素窒素（B U N）測定：

血液尿素窒素の血清レベルを測定するため、血液サンプルを注入前及び注入後1か月で開始する多様な時間点で後眼窩出血を介して回収した。血清 B U N レベルを、製造元の説明書に従うことにより尿素窒素試薬（S i g m a - A l d r i c h）を使用して測定した。

#### 【0111】

f H<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスの腎及び他の器官の組織学的検査：

50



腎及び他の器官の1対をfH<sup>W1206R/W1206R</sup>マウスから収集した。一方をホルマリン溶液中で一夜固定しかつパラフィン包埋のため処理し、そして他方をOCTコンパウンド(Sakura Finetek)中で急速凍結した。腎及び他の器官を、光学顕微鏡検査並びに免疫蛍光及び免疫ペルオキシダーゼを包含する免疫組織化学を使用して、aHUS/血栓性微小血管症の徴候について組織学的に評価した。

【配列表フリーテキスト】

【0112】

以下の情報は数字見出し<223>の下フリーテキストを含む配列について提供される。

【0113】

10

20

30

40

50



【表 7 - 1】

配列番号 (フリーテキスト を含む)	<223> の下のフリーテキスト
39	<220> <221> SIGNAL <222> (1)..(18)  <220> <221> DOMAIN <222> (19)..(82) <223> Sushi 1  <220> <221> DOMAIN <222> (83)..(143) <223> Sushi 1  <220> <221> DOMAIN <222> (144)..(207) <223> Sushi 3  <220> <221> DOMAIN <222> (208)..(264) <223> Sushi 4  <220> <221> DOMAIN <222> (265)..(322) <223> Sushi 5

10

20

30

40

【 0 1 1 4 】



【表 7 - 2】

	<220> <221> DOMAIN <222> (324)..(386) <223> Sushi 6	
	<220> <221> DOMAIN <222> (387)..(444) <223> Sushi 7	10
	<220> <221> DOMAIN <222> (446)..(507) <223> Sushi 8	20
	<220> <221> DOMAIN <222> (515)..(566) <223> Sushi 9	
	<220> <221> DOMAIN <222> (576)..(625) <223> Sushi 10	30
	<220> <221> DOMAIN <222> (628)..(686) <223> Sushi 11	
	<220> <221> DOMAIN	40

【 0 1 1 5 】



【表 7 - 3】

	<222> (689)..(746) <223> Sushi 12	
	<220> <221> DOMAIN <222> (751)..(805) <223> Sushi 13	10
	<220> <221> DOMAIN <222> (809)..(866) <223> Sushi 14	
	<220> <221> DOMAIN <222> (868)..(928) <223> Sushi 15	20
	<220> <221> DOMAIN <222> (929)..(986) <223> Sushi 16	
	<220> <221> DOMAIN <222> (987)..(1045) <223> Sushi 17	30
	<220> <221> DOMAIN <222> (1046)..(1104) <223> Sushi 18	
		40

【 0 1 1 6 】



【表 7 - 4】

	<220> <221> DOMAIN <222> (1107)..(1165) <223> Sushi 19  <220> <221> DOMAIN <222> (1170)..(1230) <223> Sushi 20	
41	<223> 操作された hfH1-4.678.19-20 バリアント cDNA	
42	<223> hfH1-4.678.19-20タンパク質	
43	<223> マウス fH1-4.678.19-20	
44	<223> マウス H 因子短縮化構築物 mFH1-4.678.19-20	
45	<223> 操作された fH SCR1-4, 6-8, 17-20	
46	<223> 合成構築物	
47	<223> リーダー及び 5' UTR を含有する hfH1-4.678.17-20	
48	<223> hFH 1-4.678.17-20	
49	<223> hfHdSCR5R短縮化バリアントプライマー	
50	<223> hfHdSCR5F短縮化プライマー	
51	<223> hfHdSCR9-18R短縮化バリアントプライマー	
52	<223> hfHdSCR9-18F短縮化バリアントプライマー	
53	<223> hfHdSCR9-16R短縮化バリアントプライマー	
54	<223> hfHdSCR9-16F短縮化バリアントプライマー	
55	<223> pCBAGhfH-ORF	

10

20

30

40

【 0 1 1 7 】

50



【表 7 - 5】

	F短縮化バリエーションプライマー
56	<223> pCBAghfH-ORF Rプライマー
57	<223> dSCR5R
58	<223> dSCR5F短縮化バリエーションプライマー
59	<223> dSCR9-18F短縮化バリエーションプライマー
60	<223> dSCR9-18R短縮化プライマー
61	<223> AAV 5' ITR
62	<223> AAV 3' ITR
63	<223> Hinc II 5'ITR F 挿入プライマー
64	<223> Hinc II 5'ITR R 挿入プライマー
65	<223> Pst I 3'ITR F 挿入プライマー
66	<223> Pst I 3'ITR R 挿入プライマー
67	<223> mFHプライマー第 21 エキソン + イン ロン
68	<223> RプライマーmFH 第 21 エキソン + イン トロン
69	<223> Fプライマー mFH SCR20 (エキソ ン 22)
70	<223> RプライマーmFH SCR20 (エキソン 22)
71	<223> FプライマーW1183R 突然変異 hFH
72	<223> RプライマーW1183R 突然変異
73	<223> 480 bp 3'プローブの F プライマー
74	<223> Neo-4プライマー
75	<223> Neo-5プライマー
76	<223> mfH1-4.678.19-20
77	<223> NEO 特異的
78	<223> WR4 (FH 特異的)
81	<223> mfH1-4.678.19-20

10

20

30

40

## 【 0 1 1 8 】

本明細で引用される全部の刊行物は引用することにより本明細書に組み込まれる。2015年9月24日に出願された米国仮出願第62/232,008号明細書もまた引用することにより組み込まれる。同様に、本明細書で参照されかつ添付される配列表中出现する配列番号は引用することにより組み込まれる。本発明は特定の態様に関して説明された一方、改変が本発明の技術思想から離れることなくなされ得ることが認識される場合がある。こうした改変は、添付される請求の範囲の範囲内であることを意図している。



[illegible]

10

20

[illegible]

SCR6

SCR7

SCR8

SCR9

doi:10.1017/S0022292412001911

SCRX

SCR.

[illegible]

30

40

50



【図 1 E】

図 1E

batgaattgtttggggatggaagaagtgtatgtgtttaaattgggaactgggaagggaacacac  
Y E M F G D E E V M C L N G N W T E F F  
caattgc **aaagattctacaggaataattggtggcccccctccacatttgacaattggggacatt**  
Q < K D S T G K C G P P P P I D N G D I  
Acttoattccocgttgtcagtatatgtctccagcttccatcagttgagtaaccaatgocagaa  
T S F P L S V Y A P A S S V E Y Q C Q N  
ttgtatcaacttgagggttaacaagcaataacatgttagaattggacaattggtcagaacca  
L Y Q L E G N F R I T C R N G Q W S E P  
ccaaaatgottacatccgtgtgttaatatcccgagaatttatggaaattataacatagca  
P K C L H P C V I S R E I M E N Y N I A  
Ttaaggtgggaacgcaaaacagaagctttattogagaacaggtgaatcagttgaatttgtg  
L R W T A K Q K L Y S R T G E S V E F V  
tgtaaaaggggatatcgtcttctccatccgcttctccacacattgogagaacacattgttgggat  
C K R G Y R L S S R S H T L R T T C W D  
gggaactggagtatccaaactgtgtcaaaaagtag  
G K L E Y P T C A K R -

SCR19

SCR20

【図 2 A】

図 2A



10

【図 2 B】

図 2B

Atgagacttctagcaaaagtatttttgccttatgttbatgggttatgtgtgtgtagcagaagat  
M R L L A K I I C L M L W A I C V A E D  
tgcaatgaaacttctccagaagaataacagaabttctgacaggttccctggtcttgaccaa  
C N E L F E R R N T E I L T G S W S D Q  
Acclatacagaaggaaggaaggaatataaaatgocgocctggatagatctcttggg  
T Y F E G T Q A I Y K C R P G Y R S L G  
aatataataatgtgtgtcaggaagggagaattgggtgtgtcttataatcattaaaggaattg  
N I I M V C R K G E W A L N E L R K C  
cagaaaagccocctgtgggaactcctgggagatactccttttggtaatttttacccttaccagga  
Q K R P C G H P G D T P F G E F T L T G  
Ggaatgtgtgttgaataatgtgttaaaagctgtgtatatactgtaatgaggggtatcaattg  
G N V F E Y G V K A V Y T C N E G Y Q L  
ctaggtgagatttaattaccgtgaattgtgacacagatggatggacacacattgatatctctata  
L S E I N Y R E C D T D G W T N D I P I  
tgtgaagttgtgaagttgtttaccagtgacagcaccagagaattggaaaaattgtcagtgat  
C E V V K C L P V T A P E N G K I V S S  
Gaatgggaacagatcgggaataacatttttggacaagcagtaacggtttgtatgttaactoa  
A H E P D R E Y H F G Q A V R F V C N S  
ggctacagagattgaaggagatgaagaaattgcatgtgttcagaagatgggttttggagtaaa  
G Y K I E G D E E M H C S D D G F W S R  
gagaacacaaagtgtgtggaatttccatggaaaatcccccagtggttataaaatggatctcct  
E K E K C V E I S C K S E D V I N G S P  
Atatctcaggaagatttattataagggagattgaacgatttccatataaatgttaacatgggt  
I S Q K I T Y K E N E R F Q Y R C N H G  
tatgaatcagctgaagagagagatgtgttatgtcactgaaatggatggcgtcgtcgtcgtcgt  
Y E Y S E R G D A V C T E S G N R P L F  
Taatgtgaaagaaaatca  
S C E E K S  
acottgaaaoccttgtgtattccagacattaaacatggaggtcttatatcatgagaatag  
T L K P C D Y P D I K H G G L Y H E N M  
Cgtagacatactttccagtagctgttaggaataattactcctattactgtgatgaacat  
R R E Y F P V A V G K Y Y S Y Y C D E H  
tttgagaactcgtcaggaagttatcgggatacacttccattgacacacagatggatgggtgtg

Edgma1 Peptide

SCR1

SCR2

SCR3

SCR4

SCR6

【図 3 A】

図 3A

1 GGACGTTGTGAACAGAGTTACGTTACGTTAAATGTCTCTTAAAGATCCAAAA 52  
atgagacttctagcaaaagtattttgoccttatgttatgggtcattttgtgtgtagcagaagattgcaat  
122.....  
ttcctccagaagaataacagaatctctgacaggttccctggtctgacacacacataccagaaggca  
192  
Ggctatctataaatgcgcocctgggatagatctcttggaaatataaatggtagcagaagggg  
262  
Tgggttgcctottaatccattaaaggaattgcaaaaagggccctgtggacatcctggagatactcct  
332  
Gtaacttttaacoccttacaggaggaattgtgttgaatatggtgtaaaagctgtgtataoatgtatg  
402  
Gtatacaattgtcaggtgagattaattacogtgaattgtgacacagatggatggacaacatgatatcc  
472  
Tgtgaagttgtgaagtggtttaccagtgacagcaccagagaattggaaaaattgtcagtagtgcactg  
542  
Cagatcgggaatacacttttggacaagcagtaacggtttgtatgttaactcagggtacaaagtgaag  
612  
Tgaagaaatgcattgttcaagcagtggtttttggagtaaaagagaaccaaagtgtgtggaatttc  
682  
Aaatccocagatgttataaatggatctcctatactcagaagattatttataaggagaatgaacga  
752  
Aatataaatgttaacatgggttatgaatacagtgaaagaggagatgctgtatgcactgaaatctggat  
822  
Tccgttgccttcattgtgaagaaaaatcaacottgaaaoccttgtgattatccagacattaaacatgg  
892  
Ctatataoatgagaatatgogtagaacatactttccagtagctgtaggaaaaattatctcctattac  
962  
Atgaacattttgagactcogtccaggaagttaactgggatacacttccattgacacacagatggatgg  
1032  
Agcagtaaccatgocccagaataatttttctcatttttggaaaatggataataacaaatcattgg  
1102  
Aagtttgtacagggtaaatctatagacgttgcctgcactcctggcactcctcctcctcctcctcctc  
1172  
Cagttacatgtatggagaatggotgggtctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc  
1242

20

30

40

50



【図 3 B】

図 3B

```

Aagtatagatatggaaatgggtttatttctgaatctcagttacatagtccttaaaagaaaagcgaaa
1312
Tatcaatgcaaaataggatatgtaaacagcagatgggtgaaacatcaggtaoattagatgtgggaagatg
1382
Gatggtoagctcaacccaogtgcattaaatctaaagattctacaggaaaatgtgggccccctccacctat
1452
Tgcaaatggggacattacttacttccogttgtcagttatgtctccagcttactcagttgagtaaccaatgc
1522
Cagaacttgatcaaatggagggttaacaagogaataaacatgtgagaaatggcaaatggtaagaacaccaa
1592
Aatgcttacatcogtgggtgtaataatcccgagaattatggaaaattataacatagcattaggtggacgc
1662
Caacacgaagcttattatcgagaacaggtgaatcagttgaatttgggtgtaaacggggatctcgtctttca
1732
Tcagttctccacacattggaacaaacatgttgggagtggaacactggagttccaaacttggtaaaaagat
1802
agAATCAATCATAAATGCACACCTTTATTCAGAACTTTAGATTAAATCAGTTCTCAATTTCAATTTT
1872
ATGTATTOTTTTACTCTCTTTTATTATCATACGTAAATTTTGGATTAAATTTGTGAAATGTAATTATAAC
1942
TGGACCCCTGGCTCTCTCTTTAAAGCACCATATTAAATCTCGAAAACATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2012
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2068

```

【図 3 C】

図 3C

```

F E T P S G S Y W D H I H C T Q D G W S
ccagcagttacatgctcagaaaatgtttatttctgaatctcagttacatgctcagaaaatgggataataaa
P A V P C L R K C Y F P Y L E N G Y N Q
Aattatggaaagaaagtttctacagggtaaatctatagagcttggcttgccttctggcttgc
N Y G R K F V Q G R S I D V A C H P G Y
gctcttccaaaagcagcagcagcagttacatgcttgggagaaatgggtggtctctcctcctcctc
A L E K A Q T T V T C N E N G W S P T F
agatgcacatcogtggtaaaaactgttccaaatcagttatagatatttgagaatgggtttattt
R C I R V K T C S K S S I D I E N G F I
Tctgaatctcagttacatgcttgaagaaaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
S E S Q Y T Y A L K E E A K Y Q C K L G
tatgttaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
Y V T A D G E T S G S I T C G K D G W S
gctcaaacccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
A Q E T C I K S
aaagattctacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
K D S T G K C G P P P P I D N G D I
Aactcattccogtgggtgagttatgctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
T S F P L S V Y A F A S S V E Y Q C Q N
ttgtatacaactggagggttaacaagogaataaacatgtgagaaatggcaaatggtaagaacaccaa
L Y Q L E G N K R I T C R N G Q W S E P
ccaaatgcttactcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
P K C L H P C V I S R E I M E N Y N I A
Ttaagtggtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
L R N T A K Q K L Y S R T G E S V E F V
tgtaaacggggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
C E R B Y R L S S R S H T L R T T C W D
gggaactgggtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
G K L E Y P T C A K R -

```

10

【図 4】

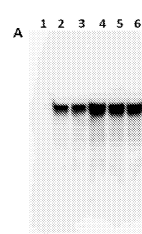
図 4

hfH1-4.678.19-20 タンパク質アミノ酸配列

MRLLAKIICLMILWAIQVAFDCNELPPRRNTEITGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE  
WVALNPLRKCQKRCGHGPGDTFFGFTTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLEINRECDTGWNTNDI  
PICEVVKCLPVTAPENGKIIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSEKPKCYE  
ISCKSPDVINGSPISQIYKENERFQYKCNMGYYSERGDVCTESGWRPLPSCEESTLKPCTDYPDIKHG  
GLYHENMRRPYPFVAVGKYYSYCDHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQN  
HGRKFVQKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPPTPCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQYTYALKEK  
AKYQCKLGVYTDGETSGSIRCGKDGWSAQPTCIKSKDSTGKCGPPPIIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQ  
CQNLVQLEGNKRTCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAQKLYSRTGESVEFVCKRGYRL  
SSRSHTLRTTCWDGKLEYPCTAKR

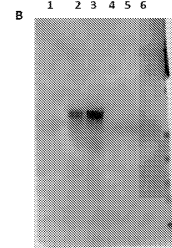
【図 5 A - 5 B】

図 5A



1:Con  
2:pCMV Sport6-1  
3:pCMV Sport6-2  
4:pCBARBG-1  
5:pCBARBG-2  
6:pCBARBG-3

図 5B



1:Con  
2:pCBARBG-1  
3:pAAV C1  
4:pAAV C2  
5:pAAV C3  
6:pAAV C4

20

30

40

50



【 図 6 】

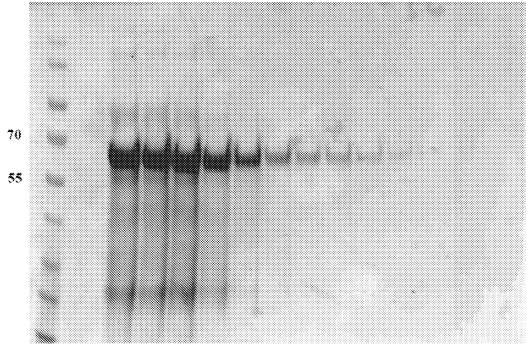


図 6

【 図 7 】

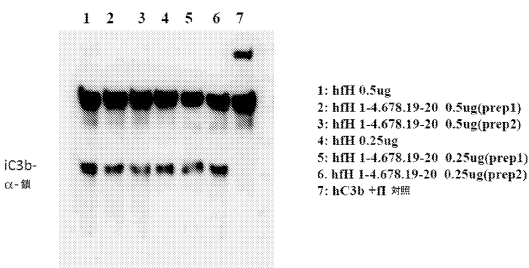


図 7

10

【 図 8 】

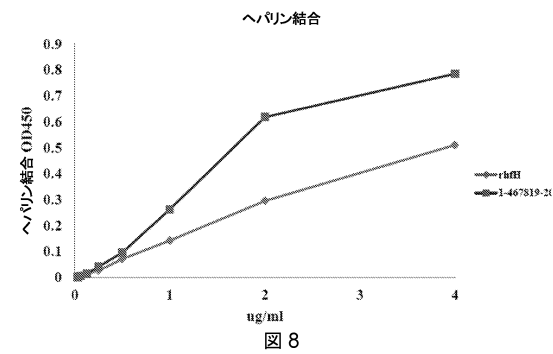


図 8

【 図 9 】

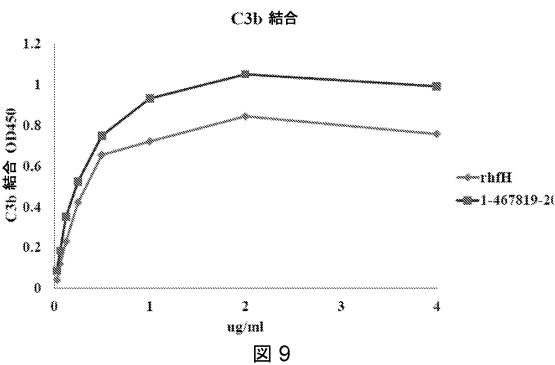


図 9

20

30

40

50







【 図 1 2 C 】

図 12C

[illegible]

SER17

5088

SCR19

SCR20

【 図 1 3 】

[illegible]

10

図 13

【 図 1 4 】

R	L	A	P	Y	I	L	M	L	W	A	C	V	A	D
N	E	P	G	C	R	R	E	K	I	T	S	R	S	Q
M	P	V	C	G	A	R	V	T	C	P	P	O	E	G
P	F	V	C	G	R	K	D	A	G	N	F	I	L	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
E	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
M	P	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R	V	C	C
P	F	V	E	I	E	F	E	A	F	G	R			

【 図 1 5 A - 1 5 C 】

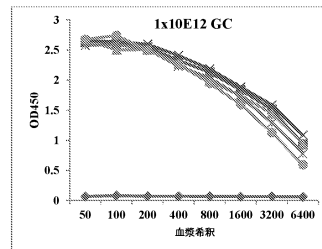


図 15A

20

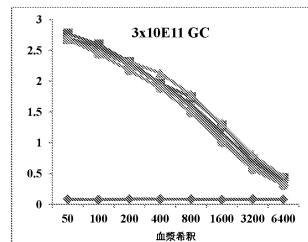


図 15B

30

图 14

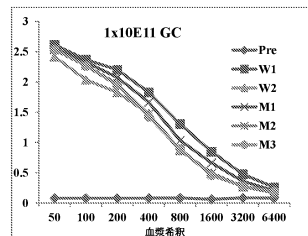


図 15C

40

50



【圖 17 A】



10

20

図 16C

【圖 17 C】



30

40







【 図 2 1 】

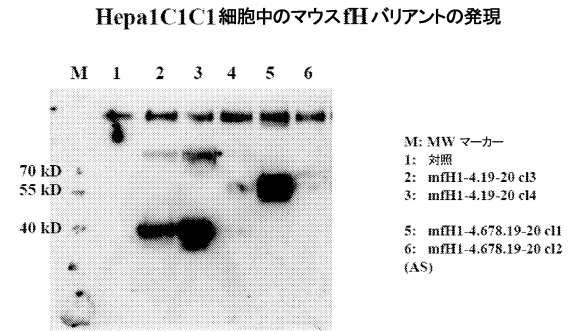


図 21

【 図 2 2 A - 2 2 B 】

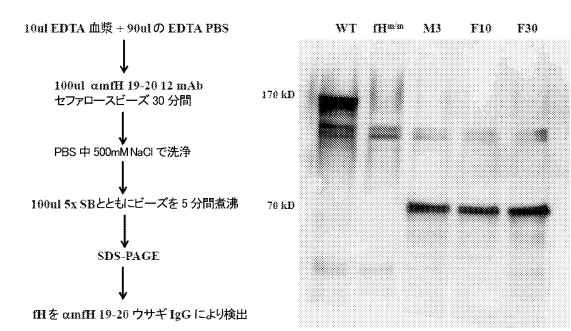


図 22A

図 22B

10

【 図 2 3 】

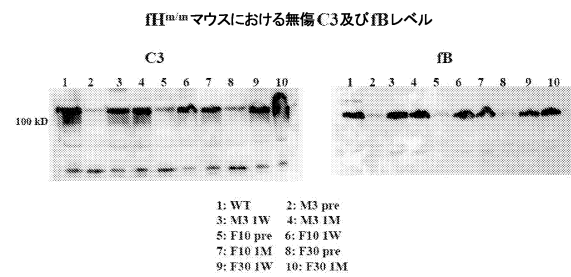


図 23

【 図 2 4 】

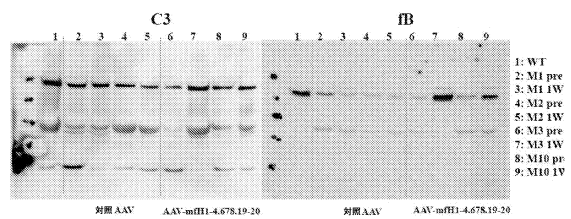


図 24

20

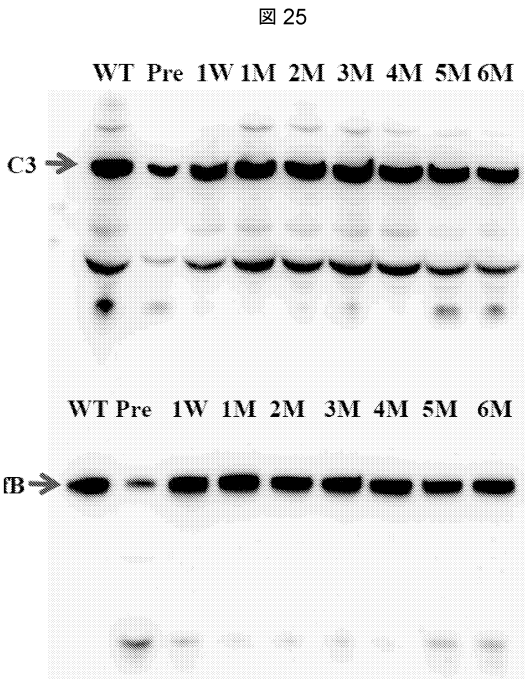
30

40

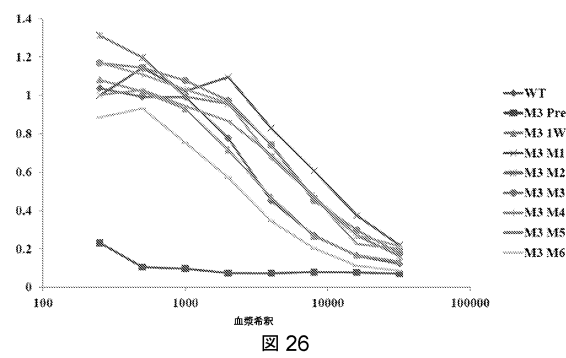
50



【図 2 5】



【図 2 6】



10

20

【図 2 7】

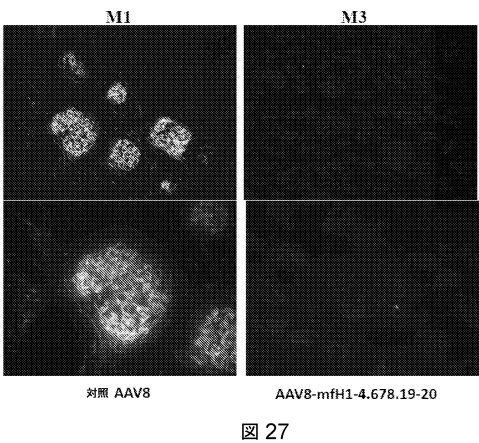


図 27

【図 2 8 A - 2 8 B】

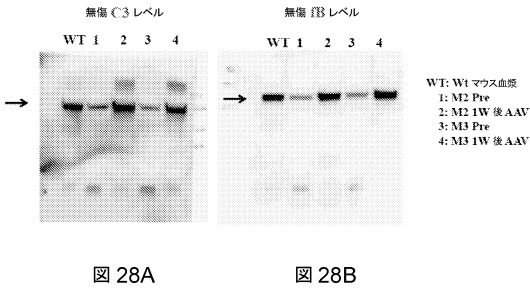


図 28A

図 28B

30

40

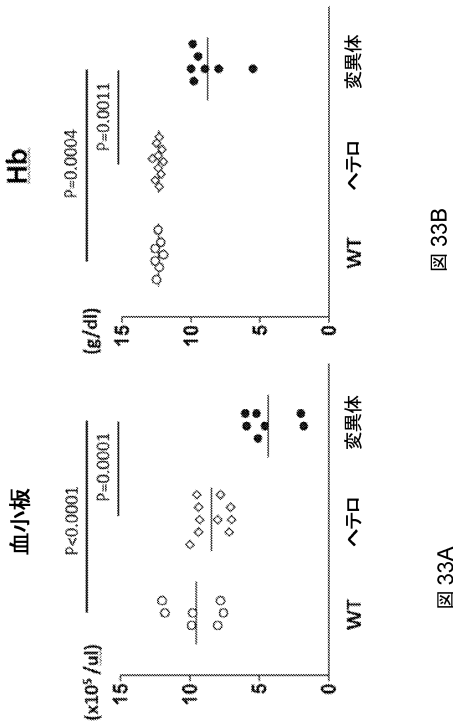
50



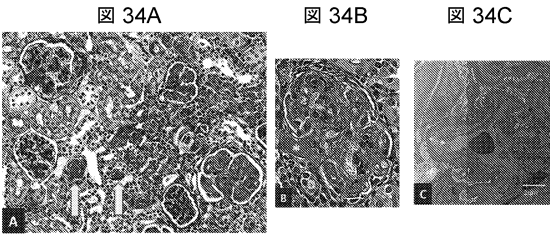




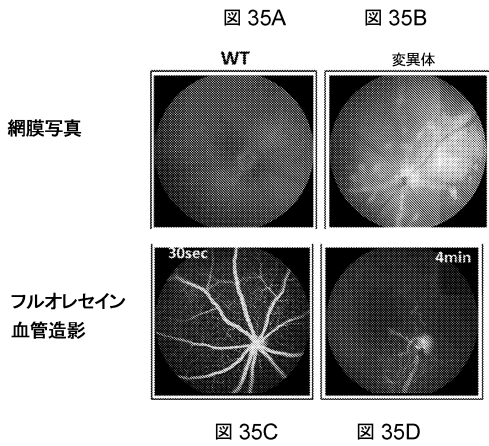
【 図 3 3 A - 3 3 B 】



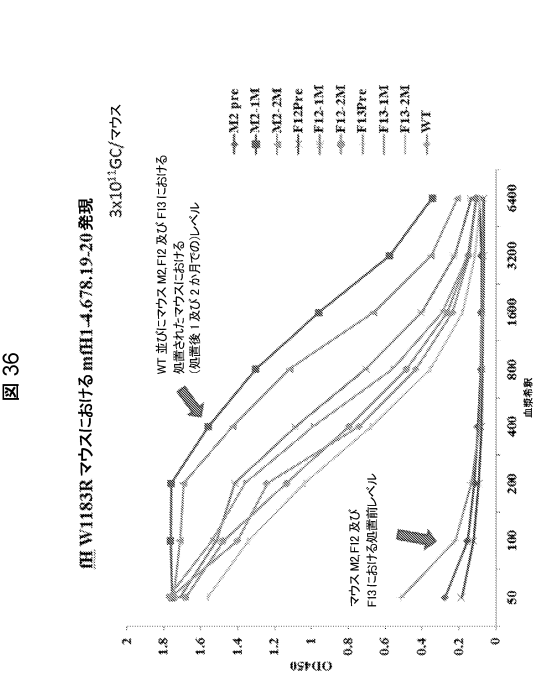
【 図 3 4 A - 3 4 C 】



【 図 3 5 A - 3 5 D 】



【 図 3 6 】



10


20

30

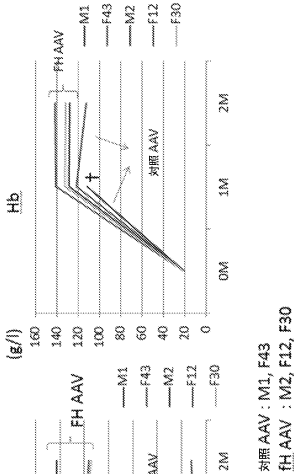
40

50

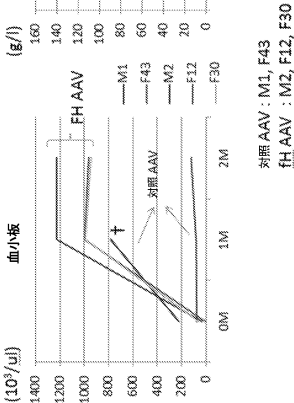


【 3 7 A - 3 7 B 】

 37B



 37A



【配列表】

[0007261583000001.app](#)

10

20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	13/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47

Z N A

米国(US)

0 4 フィラデルフィア・アパートメント ナンバービー・ウッドランドアベニュー 4 0 0 7

## (72)発明者

三輪隆史

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 0 4 ベラカヌイド・ユニット 3 2 3 ・プレジデンシャルブールバード 1 9 1

合議体

審判長 森井 隆信

審判官 富永 みどり

審判官 馬場 亮人

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 2 3 3 5 ( W O , A 2 )

特表 2 0 1 3 - 5 1 5 4 7 4 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 1 0 7 6 6 ( U S , A 1 )

Drug Discovery System ( 2 0 0 7 ) Vol . 2 2 - 6 , pp . 6 4 3 - 6 5 0

坂田洋一, 血友病遺伝子治療の最新情報と展望, Hemophilia Topics ( 2 0 0 7 ) Vol . 1 3 , pp . 1 - 4 , バイエル薬品株式会社 [ online ] , [ 検索日 2 0 2 0 . 7 . 1 4 ] , URL , &lt; https : / / pharma - navi . bayer . jp / hemophilia / static / pdf / disease \_ i n f o / hemophilia \_ topics / vol 1 3 . pdf &gt;

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00

C07K14/00

A61K38/00

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d