

(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)
A 6 1 K	31/7088(2006.01)
A 6 1 K	35/761 (2015.01)
A 6 1 K	38/02 (2006.01)
A 6 1 K	48/00 (2006.01)
	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
	A 6 1 K 31/7088 Z N A
	A 6 1 K 35/761
	A 6 1 K 38/02
	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)	(73)特許権者	502409813
(86)(22)出願日	平成28年9月23日(2016.9.23)		ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバ
(65)公表番号	特表2018-527941(P2018-527941		ーシティ・オブ・ペンシルベニア
	A)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1
(43)公表日	平成30年9月27日(2018.9.27)		0 4 フィラデルフィア・ナインスフロア
(86)国際出願番号	PCT/US2016/053347		ー・シビックセンターブールバード 3 6
(87)国際公開番号	WO2017/053732		0 0
(87)国際公開日	平成29年3月30日(2017.3.30)	(74)代理人	110000741
審査請求日	令和1年9月20日(2019.9.20)		弁理士法人小田島特許事務所
審判番号	不服2021-10424(P2021-10424/J	(72)発明者	宋文超
	1)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0
審判請求日	令和3年8月5日(2021.8.5)		1 0 ブリンマー・コーネルドライブ 2 1
(31)優先権主張番号	62/232,008	(72)発明者	3
(32)優先日	平成27年9月24日(2015.9.24)		ガリバリ, ダモダル
(33)優先権主張国・地域又は機関			アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1
			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キャ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バリアントをコードする、組換えAAVベクター。

## 【請求項2】

前記キャプシドは、AAV1、AAV2、AAV5、AAV8、AAV\_rh64R1、AAV9又はAAV\_rh10キャプシドである、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h f Hバリアント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、デンスデポジット病及び C 3 糸球体腎炎を包含する C 3 糸球体腎症、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 4 8 のアミノ酸配列を含む、人工改変ヒト f H バリアント。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の人工改変ヒト f H バリアントがペグ化されている、ペグ化ヒト f H バリアント。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の人工改変ヒト f H バリアント、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 バリアント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】

【0 0 0 1】

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】

【0 0 0 2】

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、しかしながら他の 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糸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。

10

20

30

#### 【0004】

補体調節不全は、調節性変異/多型からのみならず、しかしながら、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一の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】

40

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ず、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。

50

## 【0006】

他のアプローチにおいて、可溶性 DAF、CR1、CR1gのような組換え調節タンパク質、並びに fH 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 [SCR] 1 - 5 及び C 末端 SCR19 - 20) 若しくは fH と CR2 の間の融合タンパク質 (TT30) 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 in vivo 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からである。

10

## 【0007】

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】

## 【0008】

【文献】米国特許公開第 2013 / 0296255 号明細書

米国特許公開第 2008 / 0221011 号明細書

## 【非特許文献】

## 【0009】

【文献】Nichols EM, Barbour TD, Pappworth IY, Wong EK, Palmer JM, Sheerin NS, Pickering MC, Marchbank KJ. Kidney Int. 2015 Jul 29. doi: 10.1038/ki.2015.233.

20

Fridkis-Hareli M, Storek M, Mazsaroff I, Risitano AM, Lundberg AS, Horvath CJ, Holers VM, Blood. 2011 Oct 27; 118 (17): 4705 - 13. doi: 10.1182/blood-2011-06-359646. Epub 2011 Aug 22.

## 【発明の概要】

30

## 【0010】

## 【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 (fH) 遺伝子を含んでなる発現力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 fH 遺伝子は補体調節機能を保持する可溶性 h fH タンパク質バリアントをコードし、前記 fH バリアントは、ショートコンセンサスリピート (SCR) 1、2、3、4、19 及び 20 と、SCR7、SCR17 及び / SCR18 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 fH バリアント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

## 【0011】

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 (fH) 遺伝子を含んでなる発現力セットをその中にパッケージングしている組換え AA V ベクターを提供し、前記 h fH 遺伝子は補体調節機能を保持する可溶性 h fH タンパク質バリアントをコードし、前記 fH バリアントは、ショートコンセンサスリピート (SCR) 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 fH バリアント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。

## 【0012】

さらなる一局面において、担体及び / 又は賦形剤、並びに fH バリアントを発現する本

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。

【0013】

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（aHUS）、加齢黄斑変性（AMD）、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（PNH）、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。

【0014】

さらなる一局面において、AMD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、PNH、aHUS、若しくは別の補体関連障害を処置するためのrAAVベクターの使用が記述される。

10

【0015】

別の局面において、リーダー配列、並びに：(a) SCR1-4、7及び19-20；(b) SCR1-4、6、7及び19-20；(c) SCR1-4、7、8及び19-20；(d) SCR1-4、6、7、8及び19-20；(e) SCR1-4、17及び19-20；(f) SCR1-4及び18-20；(g) SCR1-4及び17-20よりなるヒト補体受容体SCRを含んでなる、人工改変されたhfhバリアントが提供される。他の態様は、例えば、SCR1-4、7及び18-20；SCR1-4、6、7及び18-20；SCR1-4、7、8及び18-20；若しくはSCR1-4、6、7、8及び18-20、SCR1-4、7及び17-20；SCR1-4、6、7及び17-20；SCR1-4、7、8及び17-20；若しくはSCR1-4、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SCRの最低1個中に入人工改変される。別の局面において、人工改変されたhfhバリアントの1種がペグ化される。

20

【0016】

なお別の局面において、最低1種類の人工改変されたhfhバリアント、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。

30

【0017】

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。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】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1B-1E】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fHバリアント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（SCR）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。SCR1-20のアミノ酸配列は、配列番号3（SCR1）、5（SCR2）、7（SCR3）、9（SCR4）、11（SCR5）、13（SCR6）、14（SCR7）、16（SCR8）、17（SCR9）、19（SCR10）、21（SCR11）、23（SCR12）、25（SCR13）、27（SCR14）、29（SCR15）、31（SCR16）、33（SCR17）、35（SCR18）、37（SCR19）及び38（SCR20）にそれぞれ提供される。fHアイソフォーム1中のこれらのドメインの場所は、C.Estallieら、Eur J Immunol. 1991 Mar; 21(3): 799-802に記述される規約に基づく。定義されるSCR間のアミノ酸配列はfHの柔軟性を提供するリンクマー配列である[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]。SCR19とSCR20の間のリンクマーはわずか3アミノ酸（Leu-His-Pro）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2A】SCR1-4、6-8及び19-20を含有するヒトH因子バリアントの図解のドメイン構造を提供する。

【図2B-2C】fHバリアントSCR1-4、6-8及び19-20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(SCR)ドメインの核酸[配列番号41のnt53-1804]及びアミノ酸配列[配列番号42]を提供する。

【図3A-3B】リーダーペプチド並びにSCR1-4、6-8及び19-20を含有するヒトH因子短縮化構築物(hfH1-4.678.19-20)の完全なcDNA[配列番号41のnt53-1804]並びに5'-[配列番号41のnt1-52]及び3'-UTR[配列番号41のnt1805-2068]である。

【図4】リーダーペプチド(下線)及びSCR1-4、6-8、19-20を含有するH因子短縮化構築物(hfH1-4.678.19-20)のアミノ酸配列である[配列番号42]。

【図5A-5B】hfH1-4.678.19-20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。SCR1-4、6-8及び19-20を含有するヒトfH短縮化バリアント[配列番号41]の図2に示されるcDNA配列を真核生物発現ベクター中にクローニングし、それをその後使用してHEK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プロット分析に使用して切断型fH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HEK細胞;レーン2及び3、fH短縮化バリアントのcDNAを含有するpCMV\_Sport6ベクターでトランスフェクトされたHEK細胞;レーン4-6、fHバリアントcDNAを含有するpCBARGベクターでトランスフェクトされたHEK細胞。pCBARGベクターは、図4に示されるpAAV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HEK細胞;レーン2、対照として切断型fHバリアントのcDNAを含有するpCBARGベクターでトランスフェクトされたHEK細胞;レーン3、切断型fHバリアントのcDNAを含有するAAV8プラスミドでトランスフェクトされたHEK細胞。

【図6】組換えhfH1-4.678.19-20の精製を示すSDSゲルである。SDSゲル分析は、pCBARGベクターを使用してHEK細胞をトランスフェクトすることにより発現されたSCR1-4、6-8及び19-20を含有するヒトfH短縮化バリアントのクマシーブルー染色を介して実施した。該組換えfH短縮化タンパク質は、SCR2-3中の1エピトープを認識するヒトH因子に対するmAb(クローンOX-23)を使用して製造されたアフィニティカ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hfH1-4.678.19-20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。SCR1-4、6-8及び19-20を含有するヒトfH短縮化バリアントを、I因子に媒介されるC3b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C3bを、完全長fH(hfH)若しくは切断型fHバリアント(hfH1-4.678.19-20)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SDS-PAGE及びウエスタンプロット分析により分析した。補助因子活性はiC3b鎖フラグメントの出現により示される。

【図8】組換えhfH1-4.678.19-20(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。SCR1-4、6-8及び19-20を含有するヒトfH短縮化バリアント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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に基づき完全長ヒトfH(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fHタンパク質溶液のオーバーレイ、及び洗浄後にmAb OX-23(SCR2-3中の1エピトープに対する)による結合されたfH若しくは切断型fHの検出を使用するELISA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短縮化バリアントは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  $\mu$  g / 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10】AAV8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 の始めに未熟な終止コドンを有する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  $\times$  1 0  $^{11}$  遺伝子コピー / マウス)を含有するAAV8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あつヒト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、AAV - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 処置前(Pre)に、3f 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週後(1W)に検出された。

【図11】f H  $m/m$ マウスにおけるAAV8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(WTのレーン1を遺伝子治療前の3f 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プロット分析である。f H  $m/m$ マウスをAAV8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置した1週後、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、AAV8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  $\times$  1 0  $^{11}$  遺伝子コピーを受領した。

【図12A】S C R 1 - 4 、 6 - 8 及び 1 7 - 2 0 を含有するヒトH因子バリアント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12B - 12C】f HバリアントS C R 1 - 4 、 6 - 8 及び 1 7 - 2 0 のリーダーペプチド及び11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13】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因子バリアント(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14】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15A - 15C】変動する用量のAAV8 - h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 で処置された3f 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有する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  $\times$  1 0  $^{12}$  遺伝子コピー(G C) / マウス、3  $\times$  1 0  $^{11}$  G C / マウス及び1  $\times$  1 0  $^{11}$  G C / マウスのh f H 1 -

10

20

30

40

50

4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 を含有する A A V 8 ウィルスで後眼窩 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 m / m 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。

【図 1 6 A - 1 6 C 】 f H m / m 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プロット分析である。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 m / m 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 m / m 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。

【図 1 7 A - 1 7 C 】 マウスにおけるリーダーペプチド及び 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 バリアント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 のこのバリアントを、後の研究において h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 の in vivo 機能を試験するための代理物として使用する。

【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 短縮化バリアントの 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 短縮化バリアントの c D N A 配列を、真核生物発現ベクター p C B A R B G にクローニングし、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プ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。

【図22A】血液サンプルをfH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。fH<sup>m/m</sup>マウスは、SCR19の始めに未熟な終止コドンを運搬するfH変異体マウスの一系列である。これらマウスは痕跡量の切断型fH(SCR19-20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C3及びfB欠乏症)を有する。マウスをmfH1-4.678.19-20を含有するAAV8ウイルス(3×10<sup>12</sup>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、処理しがつ分析した。

【図22B】AAV8媒介性fH遺伝子治療1週後のfH変異体マウス(fH<sup>m/m</sup>)の血液中のmfH1-4.678.19-20のウエスタンプロット検出である。図に示されるとおり、WT及び処置されないfH<sup>m/m</sup>マウスにmfH1-4.678.19-20(およそ70kd)が存在しなかった。3匹のウイルスに感染させたfH<sup>m/m</sup>マウスM3、F10、F30(Mは雄性を示しがつFは雌性を示す)において、mfH1-4.678.19-20が明確に検出された。

【図23】fH<sup>m/m</sup>マウスにおけるAAV8媒介性fH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プロット分析である。十分な内因性fH発現の欠如により、未処置fH<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C3及びfBを消費する(WTのレーン1を遺伝子治療前のfH<sup>m/m</sup>マウスのレーン2、5、8と比較されたい)。fH<sup>m/m</sup>マウスをAAV8-mfH1-4.678.19-20で処置した後、1週(1W、レーン3、6、9)及び1か月(1M、レーン4、7、10)で血漿C3及びfBレベルがWTのレベルに回復され、AAV8媒介性fH遺伝子治療が代替経路補体活性化制御不全並びにC3及びfB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がつ最低1か月持続することを示唆する。

【図24】AAV8媒介性fH遺伝子治療が致死性C3糸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プロット分析である。プロパージンもまた欠乏しているfH<sup>m/m</sup>マウス(fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>)において、C3及びfB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。fH<sup>m/m</sup>マウスと比較して、fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスは致死性の形態のC3Gを発症し、そしてそれらは10~12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2fH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>マウスを、AAV8-mfH1-4.678.19-20、若しくは対照群(対照AAV)として空のAAV8ベクター(pAAV.TBG.rBG)で処置した。AAV8遺伝子治療1週後に血液サンプルを回収し、そしてC3及びfBレベルについてウエスタンプロットにより分析した。該パネルに示されるとおり、AAV8処置前の血液サンプル(pre)と比較して、対照AAV8処置後1週(1W)に無傷のC3若しくはfB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、AAV8-mfH1-4.678.19-20での処置1週後のマウスにおける血漿C3及びfB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AAV8(3×10<sup>12</sup>遺伝子コピー/マウス)で処置した。

【図25】AAV8-mfH1-4.678.19-20遺伝子治療で処置されたfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>(図24からのM3)の長期経過観察を示す。C3及びfB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(Pre)、並びにAAV8-mfH1-4.678.19-20での処置後1週(1W)、1、2、3、4、5及び6か月(1M、2M、3M、4M、5M、6M)の血漿C3及びfBレベルのウエスタンプロット分析。

【図26】AAV8-mfH1-4.678.19-20遺伝子治療で処置されたfH<sup>m/m</sup>P<sup>-/-</sup>(図24からのM3)の長期経過観察を示す。治療的タンパク質薬物としてのmfH1-4.678.19-20が持続的に発現されたことを示す、AAV8-mfH1-4.678.19-20で処置する前(Pre)、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27】C3糸球体腎症における腎の病理の予防におけるAAV8-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AAV8ベクターで処置されたf H<sup>m</sup>/m P<sup>-/-</sup>マウス(図24からのマウスM1)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糸球体C3沈着を示した(左パネル)。対照的に、AAV8-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23からのM3)は生き残り、そして処置後6か月でなお健康であり、その時点できそれを殺しあつ腎の組織像について分析した。糸球体C3沈着はこのマウスで検出されず(右パネル)、C3糸球体腎症がAAV8-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。

【図28A-28B】AAV8-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DAF及びCrryが欠乏しているマウスをAAV8-m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 (後眼窩経路、I.V.、3×10<sup>12</sup>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(1W)に回収してウエスタンプロットにより血漿C3(A)及びfB(B)レベルを分析した。該データにより示されるとおり、DAF/Crry二重変異体マウスは、C3及びfBレベル低下を伴う過度の代替経路補体活性化を有した(Pre)。AAV8-m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 処置後、C3及びfB双方が野生型マウスレベルに復帰し、AAV8-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、AAV8-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DAF/Crry二重変異体マウスはDAFノックアウトマウスとCrry<sup>fl/fl</sup>-Tie-2Cre+マウスの間の交雑種である。Tie-2-Cre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Crry遺伝子の生殖系列欠失につながり、全体的Crry欠失に至る。

【図29A-29B】読み出し情報としてC3回復を使用するAAV8-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AAV8-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: 1×10<sup>12</sup>遺伝子コピー/マウス(M#1、M#2)、3×10<sup>11</sup>遺伝子コピー/マウス(M#3、M#6)及び1×10<sup>11</sup>遺伝子コピー/マウス(M#4、M#5)を与えた。ウエスタンプロットを実施して、遺伝子治療前(Pre)及び1週(1W)若しくは1か月(1M)後の血漿C3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、1W及び1Mの時間点で検査される場合に血漿C3レベルを増大させることができた。

【図30A-30B】読み出し情報としてfB回復を使用するAAV8-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、C3を読み出し情報として使用した図29A-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、1W及び1Mの時間点で検査される場合に血漿fBレベルを増大させることができた。

【図31】マウスfHのSCR20中のWからRへの突然変異(位置1206、ヒトfH中の位置1183に対応する)を導入するのに使用された遺伝子ターゲッティング戦略を示す図解である。

【図32】野生型同腹仔マウス及びfH中にW1206R突然変異を有する変異体マウスの生存曲線を示す。fH変異体マウスはaHUSの特徴的病理を発現し、それらの半分近くが30週齢までに死亡した。

【図33A】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。

10

20

30

40

50

【図33B】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34A - 34C】W1206R変異体マウスの腎切片がaHUSに特徴的な病理を示したことを見た。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35A - 35D】fH中にW1206R突然変異を運搬するマウスが網膜傷害および眼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35A）と比較して、fH W1206R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35B）。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、野生型マウスの眼の全部の血管に30秒以内に達した（図35C）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35D）からである。

【図36】m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質が、 $3 \times 10^{11}$  GC / マウスのAAV8 - 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fH W1206R/W1206Rマウスの血液中でELISAにより検出されたが、しかしAAV遺伝子治療前のこれらマウスの血液中で検出されなかったことを示す。

【図37A - 37B】 $3 \times 10^{11}$  GC / マウスのAAV8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ベクターでのfH W1206R/W1206R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。AAV8 - m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 で処置された全3fH W1206R/W1206Rマウスは生存しあつ健康であった。それらの血小板数（図37A）及びヘモグロビンレベル（Hb、図37B）は増大しあつ正常範囲で維持された。対照的に、対照AAVベクターで処置された2fH W1206R/W1206R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AAV8 - 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。

#### 【0019】

##### 【発明の詳細な説明】

新規の人工改変されたH因子（fH）遺伝子及びタンパク質バリエントを本明細書に説明する。これらバリエントは、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。

#### 【0020】

多数の経路を介し、及び具体的にはrAAVベクターのような組換えベクターにより媒介されるin vivoの発現による、その必要な被験体へのこれらバリエントの送達が記述される。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ントの使用方法もまた提供される。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。

#### 【0021】

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C3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、C3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（AMD）、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（PNH）、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.ダットナイ（*B. duttonii*）；B.リカレンティス（*B. recurrentis*）；カンジダ アルビカンス（*Candida albicans*）；野兎病菌（*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バリエントが、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しうる。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糸球体腎炎（C3GN）が存在するC3糸球体腎症（以前はI型膜性増殖性糸球体腎炎若しくはMPGNIIと呼ばれる）；非典型溶血性尿毒症候群（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糸球体腎炎、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.ダットナイ（*B. duttonii*）；B.リカレンティス（*B. recurrentis*）；カンジダ アルビカンス（*Candida albicans*）；野兎病菌（*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。

【0024】

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h t t p : // 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されるドメインの場所は図1中で注釈が付けられ、かつ、C. Estallier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

【0025】

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。

【0026】

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バリアントは、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h t t p : // 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アントの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アント中に位置し得る。

20

【0027】

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」は同一ドメインを指す。

30

【0028】

本明細書で使用されるところの「機能的f Hバリアント」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バリアントを包含する。いくつかの態様において、人工改変されたf Hバリアントは野生型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バリアントが完全長ヒト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バリアントは野生型の機能的f Hの約95%未満ないし約100%を有する。

40

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】

10

機能的 f H バリアントの例は、1 個の SCR 7、SCR 17 若しくは SCR 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 SCR 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、SCR 6、SCR 8、SCR 16、SCR 17、SCR 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 SCR 1-4, 6-8, 19-20; f H SCR 1-4, 6-8, 18-20; f H SCR 1-4, 6-8, 17-20; f H SCR 1-4, 6-7, 19-20; f H SCR 1-4, 6-7, 18-20; f H SCR 1-4, 7-8, 19-20; f H SCR 1-4, 7-8, 17-20; f H SCR 1-4, 7-8, 18-20; f H SCR 1-4, 7-8, 17-20; f H SCR 1-4, 7, 19-20; f H SCR 1-4, 7, 18-20; f H SCR 1-4, 7, 17-20; SCR 1-4, 17, 19-20; SCR 1-4, 18-20; SCR 1-4, 17-20 及び/又は f H SCR 1-4, 7, 16-20 を有する。ある態様において、h f H バリアントは、付加的な h f H SCR 例えば SCR 6、SCR 8、SCR 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 SCR 5 は存在しない。しかしながら、ある態様において、h f H SCR 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 SCR 9、SCR 10、SCR 11、SCR 12、SCR 13、SCR 14 及び/又は SCR 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 SCR 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 SCR よりはむしろ SCR 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 C3b 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 SCR 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。

20

## 【0030】

30

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、ウイルスベ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 IL-2 リーダー [ 例えば <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、C3b 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。

40

## 【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、SCR 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 SCR 1- (L 1) - S

50

CR2 - (L2) - SCR3 - (L3) - SCR4 - (L4) - (SCR6 - (L4'))  
 - SCR7 - (L5) - (SCR8 - (L5')) - (SCR16 - (L5'')) - (SCR17 - (L5'')) - (SCR18 - (L5'')) - SCR19 - (L6) - SCR20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L1、L2、L3、L4、L4'、L5、L5'、L5''、L5'''、L5''''及びL6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12-18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、バリアント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、バリアントは最低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17、配列番号4、6、8、10、12、15、18、20、22、24、26、28、30、32、34及び36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fH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fHに対し異種、例えば人工であれ、合成であれ、fHバリアント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Gly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fH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変更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fHタンパク質バリアントに加え、これらfH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。これらバリアント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アントの1種若しくはそれ以上のSCR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ープログラム、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SCRの1種若しくはそれ以上を、RNA及び/又はcDNA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、EMBOSSによるbacktranseq、[http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/Gene\\_Infiniti](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/Gene_Infiniti)(h

10

20

30

40

50

[http://www.geneinfinity.org/sms-/sms\\_back\\_translation.html](http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_back_translation.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、GC Gバージョン6.1中のプログラムFastat<sup>TM</sup>を使用して比較し得る。Fastat<sup>TM</sup>はクエリ及び検索配列の間の最良の重なりの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、GC G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Fastat<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個ができることができ、そしてアミノ酸約700個までありうる。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（Mu1

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ープログラムを利用し得る。例えば、J. D. Thomsonら、Nucl. 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fHバリアントをコードする核酸配列（例えばh f Hバリアント遺伝子）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被覆ペレット、ウイルス感染及びプロトプラス融合を包含するいずれかの適する方法により送達しうる。こうした構築物を作成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、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及びSambrook、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。20

#### 【0039】

本明細書で使用されるところの「発現カセット」は、h f Hバリアント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）を包含しうる核酸分子を指し、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うる。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しうる。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の使用により達成しうる。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ッティングを有することができ、例えば、肝に対しAAV8、AAV9若しくはAAVrh10、眼に対しAAV8、AAV1若しくは他のAAV、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は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しうる。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）、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)、humAlb；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、アンチトリプシンプロモーター、LSP(845nt)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.sch1.edu/LSPD> ] を参照されたい。あるいは、別の組織へのターゲッ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 (RPE) 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 (GRK1) プロモーター (Genbank 受託番号 AY327580) である。別の態様において、プロモーターは GRK1 プロモーターの 292nt のフラグメント (位置 1793 - 2087) 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 (IRBP) 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、ロッドオプシンプロモーター、赤緑オプシンプロモーター、青オプシンプロモーター、cGMP - - ホスホジエステラーゼプロモーター、マウスオプシンプロモーター (上で引用される Beltranら 2010) 、ロドオプシンプロモーター (Mussoliniら、Gene Ther、July 2011, 18 (7) : 637 - 45) ; コーントランスデュ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 (PDE) プロモーター；網膜色素変性症 (RP1) プロモーター (Nicordら、J. Gene Med, Dec 2007, 9 (12) : 1015 - 23) ; NXNL2 / NXNL1 プロモーター (Lambardら、PLoS One, Oct. 2010, 5 (10) : e13025) 、RPE65 プロモーター；retinal degeneration slow / ペリフェリン 2 (Rds / perph2) プロモーター (Caiら、Exp Eye Res. 2010 Aug; 91 (2) : 186 - 94) ; 及び VMD2 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、ロッドオプシンプロモーター、赤緑オプシンプロモーター、青オプシンプロモーター、光受容体間結合タンパク質 (IRBP) プロモーター及び cGMP - - 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 WO 2011 / 126808 号明細書及び第 WO 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。

#### 【 0042 】

プロモーターに加え、発現力セット及び / 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デニル化 (ポリ A) シグナルのような効率的 RNA プロセシングシグナル；細胞質 mRNA 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 SV40 、ウシ成長ホルモン (bGH) 、ウサギ グロブリン及び TK 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、TTR ミニマルプロモーター / エンハンサー、LSP (TH 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。

#### 【 0043 】

これら制御配列は fH 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

10

20

30

40

50

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。

【0044】

薬物送達若しくはウイルスベクターの產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中から選択される。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。

【0045】

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產生される。「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（*gut less*）」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產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。

10

【0046】

一態様において、ウイルスベクターはアデノ隨伴ウイルス（AAV）である。アデノ隨伴ウイルス（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1:1:1:10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。

20

【0047】

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WO 2014/124282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バリエントの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 2013/0045186 A1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バリエントを選択する。例えば、AAV8キャプシドは、Kayら、Targeting Photoreceptors via Intra-vitreal 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

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)を参考されたい。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AAV8 bp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)を参考されたい。

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(DN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号明細書を参考されたい]。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]もまた参考されたく、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ント、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の使用のためのAAVcap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

#### 【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。

30

#### 【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シードタイプを产生するため)異なるAAV起源のものである、AAVの5'及び3'ITRである。一態

40

50

様において、AAV2からのITR配列若しくはその欠失バージョン（ITR）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AAV供給源からのITRを選択しうる。ITRの供給源がAAV2からでありかつAAVキャプシドが別のAAV供給源からである場合、生じるベクターはショードタイピングされたと呼ぶことができる。典型的に、AAVベクターの発現カセットは、AAV 5'ITR、コーディング配列及びいずれかの制御配列、並びにAAV 3'ITR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（trs）が欠失されているITRと命名される短縮されたバージョンの5'ITRが記載されている。他の態様において、完全長のAAV 5'及び3'ITRが使用される。

## 【0051】

「sc」という略語は自己相補性を指す。「自己相補性AAV」は、組換えAAV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鑄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、scAAV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る1個の二本鎖DNA（dsDNA）単位を即座に形成することができる。例えば、D M McCartyら、"Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis"、Gene Therapy、(August 2001)、Vol 8、Number 16、124 8-1254ページを参照されたい。自己相補性AAVは、例えば米国特許第6,596,535号明細書；同第7,125,717号明細書；及び同第7,456,683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。

## 【0052】

被験者への送達に適するAAV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7790449号明細書；米国特許第7282199号明細書；第WO 2003/042397号明細書；第WO 2005/033321号明細書、第WO 2006/110689号明細書；及び第US 7588772 B2号明細書を参照されたい]。1つのシステムでは、產生細胞株を、ITR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rep及びcap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、rep及びcapを安定して供給するパッケージング細胞株を、ITR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、AAV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產生され、汚染するウイルスからのrAAVの分離を必要とする。より最近、AAV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E1、E2a、VA及びE4若しくはヘルペスウイルスUL5、UL8、UL52及びUL29、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、ITRにより隣接されている導入遺伝子及びrep/cap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。これら產生システムに関する総説については、全般として、例えば、Zhangら、2009、"Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929（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ら、2005、“Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,”Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 199:119-145; Buningら、2008、“Recent developments in adeno-associated virus 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。

#### 【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。

#### 【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力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包含しない(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。

#### 【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れ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。場合によつ

10

20

30

40

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DNA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。DNA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70kg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、バリアントは約0.001mgないし約10mg/kgの量で送達しうる。

20

#### 【0058】

前記組換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、移入ウイルスが受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/又はバリアント並びに担体(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、エチルバニリン、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バリアントを送達する、増大された半減期を有するfhバリアント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クールの処置は、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h f Hバリアントを含有する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h f Hバリアント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、h f Hバリアント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h f Hバリアントの投与と共に使用しうる。一態様において、h f H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h f H、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、h f Hバリアントは、該バリアント中に最低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、前記バリアント中に存在するSCRの最低1個、前記バリアント中に存在するSCRの最低2個、前記バリアント中に存在する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h f Hタンパク質バリアントは、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h f Hバリアントは、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。h f Hバリアント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。h f Hバリアントの投薬量の例は、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

10

20

30

40

50

g / kg、若しくは約 1 μg / kg ないし約 20 mg / kg、若しくは約 1 μg / kg ないし約 10 mg / kg 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 μg / kg 以下、約 0.05 μg / kg 以下、又は 0.01 μg / kg 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 バリアントの量は、用量あたり約 10 μg ないし約 500 mg、若しくは約 10 μg ないし約 50 μg、約 50 μg ないし約 100 μg、約 100 μg ないし約 200 μg、約 200 μg ないし約 300 μg、約 300 μg ないし約 500 μg、約 500 μg ないし約 1 mg、約 1 mg ないし約 10 mg、約 10 mg ないし約 50 mg、約 50 mg ないし約 100 mg、約 100 mg ないし約 200 mg、約 200 mg ないし約 300 mg、約 300 mg ないし約 400 mg、若しくは用量あたり約 400 mg ないし約 500 mg である。10

#### 【 0 0 6 5 】

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 )、ニュートロトロフィン - 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 kD 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

#### 【 0 0 6 6 】

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 ) 、腔 ( 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

#### 【 0 0 6 7 】

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、及び腎炎；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、グッドパスチャーリー症候群、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

；卒中；急性呼吸窮迫症候群（A R D S）；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（E C M O）；ヘパリン誘発性体外L D L沈殿（e x t r a c o r p o r e a l L D L p r e c i p i t a t i o n）（H E L P）；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（a n）」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（a n）」）、「1若しくはそれ以上」及び「最低1」は本明細書で互換性に使用される。

10

#### 【0069】

「含んでなる（c o m p r i s e）」、「含んでなる（c o m p r i s e s）」及び「含んでなる（こと）（c o m p r i s i n g）」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（c o n s i s t）」、「からなる（こと）（c o n s i s t i n g）」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。

30

#### 【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。

#### 【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因子短縮化バリアント（h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0）の操作及びクローニング：

短縮化バリアントを、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-D N Aポリメラーゼ（カタログ番号M 0 5 3 0 S、New E n g l a n d B i o l a b s）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の鑄型として使用された完全長ヒト補体H因子c D N A p C M V S p o r t 6はT h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i cから得た（カタログ番号M H S 6 2 7 8 - 2 0 2 8 0 0 2 9 4、クローンI D 4 0 1 4 8 7 7 1）。h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0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あつAccuPrepゲル抽出キット(カタログ番号K-3035、Biioneer)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 Sport6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 and Biolabs)により平滑化しあつ精製した。このフラグメントを、pCBA B Gベクター(CMVエンハンサーを伴うニワトリアクチング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短縮化バリアントのプライマー：	
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
hfHdSCR9-18R 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

10

20

30

【0079】

ヒトH因子短縮化バリアントhfH1-4.678.17-20の操作及びクローニング：短縮化バリアントを、製造元のプロトコルに従ってPhusionハイファイディティ-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 Sport6(インバースPCRの鑄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あつAccuPrepゲル抽出キット(カタログ番号K-3035、Biioneer)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

40

50

より確認した。その後、p CMV Sport 6 中の人工改変された h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 バリアントを、infusion クローニング法 ( Clontech カタログ番号 6 3 8 9 0 9 ) により p C B A B G ベクター中に E c o R I 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のクローニングのためのプライマーが表 2 にあった。

## 【 0 0 8 0 】

## 【 表 2 】

表 2 :

h f H 短縮化バリアントのプライマー :	
h f H d S C R 5 R 配列番号 49	TGA TTT TTC TTC ACA TGA AGG CAA CGG
h f H d S C R 5 F 配列番号 50	ACC TTG AAA CCT CCT TGT GAT TAT CCA GAC A
h f H d S C R 9 - 1 6 R 配列番号 53	AGA TTT AAT GCA CGT GGG TTG AGC
h f H d S C R 9 - 1 6 F 配列番号 54	ATAAAAACAGATTGTCTCAGTTACCTAGCT
p C B A G h f H - O R F F 配列番号 55	TTTTGGCAAAGAATTGGACGTTGTGAAACAGAGTT
p C B A G h f H - O R F R 配列番号 56	CCTGAGGAGTGAATTCTATCTTTGCACAAGTTGG

10

20

30

## 【 0 0 8 1 】

## 組換え h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 タンパク質の発現及び精製 :

陽性クローニング ( p C B A R B G ベクター中の h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 ) を、h 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 H E K 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 3 5 3 0 4 6 ) 中の約 8 0 % コンフルエントの H E K 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 ( カタログ番号 1 1 6 6 8 0 1 9 、 I n v i t r o g e n ) を使用して p C B A R B G 中の h 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、ヤギ抗ヒト H 因子 I g G ( カタログ番号 A 2 3 7 、 C o m p l e m e n t t e c h ) を使用するウエスタンプ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、1 5 0 c m 盤 ( Falcon 、カタログ番号 3 5 3 0 2 5 ) 中の 8 0 % コンフルエントの H E K 細胞を、製造元の説明書に従って、 P E I ( カタログ番号 2 3 9 6 6 、 P o l y s c i e n c e s ) を用い p C B A R B G プラスミド中のエンドトキシンフリー h 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。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つつ 0 . 2  $\mu$  m フィルターで濾過し、そして P B S で平衡化された O x - 2 3 ( S C R 2 / 3 に特異的なマウス抗ヒト f H m A b 、カタログ番号 1 0 4 0 2 - 1 V L 、 S i g m a ) セファロースアブソーブイニティーカラム上に負荷した。2 5 カラム容量を伴う 5 0 0 m M N a C l を含有する P B S で洗浄した後に、結合された h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 を 1 0 0 m M グリ

40

50

シン H C 1 pH 2.7 で溶離し、そして溶離された画分（画分あたり 2 ml）を 200  $\mu$ l の 1.5 M トリス - H C 1 pH 8.5 で中和した。溶離されたタンパク質の純度を SDS - PAGE により確認し、そして純粋な画分を合わせかつ PBS を 2 回交換しながら一夜透析した。

【 0082 】

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

短縮化バリアントを、製造元のプロトコルに従い、Phusion ハイファイデリティ-DNA ポリメラーゼ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 のための鋸型として使用された pBlue script SK ( - ) 中の完全長マウス補体 H 因子 cDNA は M. Nonaka 博士（東京大学、日本、NCBI NM 009888 . 3 のスクレオチド 110 - 4361）より恵与された。m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 バリアントの生成に使用された全 PCR プライマーを表 3 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あつ AccuPrep ゲル抽出キットにより抽出した後、50 ng 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による核酸連結に使用し、そして DH5 コンピテント細胞中に形質転換した。陽性クローニングを、制限消化により若しくは特異的プライマーを使用する PCR スクリーニングによりのいずれかで確認した。その後、pBlue script SK ( - ) からの m f H 1 - 4 . 6 7 8 . - 1 9 - 2 0 挿入断片を Sma I 及び EcoR 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 pC B A R B G ベクター中に EcoR V 部位でサブクローニングした。陽性クローニングを制限消化及び PCR 法により選択した。

【 0083 】

【表 3】

表 3 :

m f H 短縮化バリアントのプライマー：	
dSCR5R 配列番号 57	TCTCTTTCTTCACAGAAAGGCTGAGAACTCC
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

10

20

30

40

【 0084 】

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

陽性クローニング (pC 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 Hepa 1 C 1 C 7 細胞（マウス肝細胞癌細胞株、ATCC（登録商標）CRL - 2026）中にトランスフェクトした。6 ウェルプレート中の約 80% コンフルエントの細胞を、製造元の説明書に従い、Lipofectamine 2000 を使用して m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 cDNA 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 IgG（参照番号 1）を使用するウエスタンプロッティングにより確認した

50

。プロットは Pierce ECL plus ウエスタンプロッティング基質（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：

pCBA RBG 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 Xba 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。陽性クローニングを 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 pCBA BG 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: ctgcggcgctcgctcactgaggccggccggccaaaggccccggcggtcgaccctttggtcgcggccggccctcagtgaggcgagcggcgccggcagaggagg-gagtgccaaactcc-atacactaggggttcccttggtagttaat、Hinc II 部位で）及び 3' 端（配列番号 62: attaactacaaggaaacccttagtgatggagttggccacccctctctgcgcgcctcgctcgcctcactgaggccggccgaccaaaggtcgcggcagccggctttggccggccgtcagtgaggcgagcgcag、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 に列挙される錫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	TCAATAATCAATGTCGACATTAACATAAGGAACCCCT
Pst I 3'ITR F 配列番号 65	GAAGATCCCTCGACCTGCAGATTAACATAAGGAACCCCT
Pst I 3'ITR R 配列番号 66	ACGCCAAGCTTGGGCTGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTC

[ 0 0 8 8 ]

スパーコイルのエンドトキシンフリー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、そしてペンシルベ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べクターコア(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的手順(<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>)を使用することにより達成した。

[ 0 0 8 9 ]

f H<sup>m/m</sup>マウスにおける h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 及び h f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 7 - 2 0 AA V の治療的有效性：

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糸球体腎症を発症し、C3、B因子(fB)及びC5消費並びにC3及びC5b-9の顕著な糸球体沈着に至る(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プロットにより血漿C3及びfBのレベルを検査した。マウス血漿(1μl)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ピングした。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。プロットを Pierce ECL Plusウエスタンプ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法を開発しつつ使用した。簡潔には、96ウェルプレート(Maxisorp)を、4μg/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。10mM 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つつ室温で1時間インキュベートし、次いで2μg/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 51-2606KC及びBD Cat 51-2607KC、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のコーテ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糸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糸球体腎症を発症し、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(1μl)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ピングした。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：

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ピングした。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 ウエスタンプロッティング基質を使用して可視化した。

#### 【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 アッセイを開発しあつ使用した。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 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 時間プロッキングした。10 mM EDTA を含有するプ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あつ室温で 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。

#### 【0094】

ウエスタンプロッ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：

ウエスタンプ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 Sepharose (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、Sepharose (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 ウエスタンプロッティング基質を使用して可視化した。

10

20

30

40

50

## 【0095】

腎におけるC3の免疫蛍光染色：

対照AAV若しくはmfH1-4.678.19-20AAV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培地で急速凍結しあつ-80で保存した。免疫蛍光研究のため、4μm切片を薄切しあつ染色に使用した。C3染色のため、FITC結合ヤギ抗マウスC3Ab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。

## 【0096】

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mfH1-4.678.19-20AAV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。

## 【0097】

## 【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

## 【0098】

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炭酸緩衝液(pH 6.9)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

10

20

30

40

50

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。

【0099】

C3b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 C3b 結合活性を試験するため、96ウェルプレートを  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  のヒト C3b (カタログ番号 A114、CompTech) で 37 度で 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 PBS 中 1% BSA で室温で 1 時間プロッキングした。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  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  のマウス抗ヒト f H mAb (OX-23) 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 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。

10

【0100】

I 因子に媒介される C3b 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：

C3b 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  $0.25 \mu\text{g}$  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  $15 \mu\text{l}$  の PBS 中の  $2 \mu\text{g}$  のヒト C3b と混合し、そして  $1 \mu\text{g}$  のヒト I 因子 (カタログ番号 A138、CompTech) をその後添加しつつ 37 度で 15 分間インキュベートした。反応を  $5 \times$  還元 SDS-PAGE サンプル緩衝液を添加することにより停止した。C3b のタンパク質分解を、還元条件下で 4 - 20% 勾配 SDS-PAGE ゲルを使用して鎖の切断並びに 41 及び 39 フラグメントの生成を分析すること、次いで HRP 結合ヤギ抗ヒト C3 IgG (1 / 4000、カタログ番号 855237、MP biologics) を使用するウエスタンプロット検出により測定した。プロットは Pierce ECL Plus ウエスタンプロッティング基質を使用して可視化した。

20

【0101】

膜補体調節物質の欠損により引き起こされる AP 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 AAV 処置が膜補体調節物質の欠損により引き起こされる AP 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 DAF 及び Crry が欠損しているマウスの一系統 (DAF / Crry 二重変異体マウス) において試験した。DAF / Crry 二重変異体マウス (DAF<sup>-/-</sup> - Crry<sup>fl/fl</sup> - Tie-2Cre<sup>+</sup>) の作出は、過度の AP 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 (Baratára, 2013)。f H<sup>m/m</sup>マウスと同様、DAF / Crry 二重変異体マウスにおいて C3 及び f B 消費が存在した (Baratára, 2013)。DAF / Crry 二重変異体マウス (10 週齢) に、m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 AAV を  $3 \times 10^1$   $\mu\text{g}$  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、ウエスタンプロット分析を使用して m f H 1 - 4 . 6 7 8 . 1 9 - 2 0 AAV 処置前及び後の血漿 C3 及び f B レベルを測定することにより評価した。ウエスタンプロットのため、マウス血漿 ( $1 \mu\text{l}$ ) 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つつ適切な抗体でプロービングした。マウス C3 及び f B 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 Biologics) 若しくはアフィニティー精製されたヤギ抗ヒト f B Ab (カタログ番号 A235、CompTech、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 HRP 結合ウサギ抗ヤギ IgG で検出した。プロットは Pierce ECL Plus ウエスタンプロッティング基質を使用して可視化した。

40

50

## 【0102】

a H U S マウスモデルの生成：

A A V 媒介性 f H 遺伝子治療の治療的有効性を試験するためのマウス a H U S モデルを創成するため、a H U S 患者で見出されるヒト f H W 1 1 8 3 R 突然変異に対応する S C R 2 0 中の 1 個の f H 点突然変異を有する変異体マウス系統を、相同意組換えに基づく遺伝子ターゲッティング技術 (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 Y 1ら、Blood. 2008 Jan 15; 111 (2): 732-40. Epub 2007 Oct 4; Kimura Y 1ら、J Clin Invest. 2010 Oct; 120 (10): 3545-54) により作成した。この実験のため、f H 遺伝子フラグメントを、遺伝子ターゲッティングベクターを構築するためには、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 C 5 7 B L / 6 マウスゲノム DNA から増幅した。ターゲッティングベクターのロングアームは、マウス f H 遺伝子の第 2 1 エキソン及び隣接するイントロン配列を含有する 6 kb 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 p ND 1 ベクター中にサブクローニングした。p ND 1 ベクターの使用は遺伝子ターゲッ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 p ND 1 ベクターは、loxP 部位、及び FLP e 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 f H 遺伝子の S C R 2 0 をコードする第 2 2 エキソン及び隣接するイントロン配列を含有する 3.85 kb 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ニ化し、そしてその後、S C R 2 0 中のヒト f H の W 1 1 8 3 R 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 G A G A A T 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 p ND 1 ベクター中にサブクローニングした。該ターゲッ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 C 5 7 B L / 6 胚性幹 (ES) 細胞 (Embryo MAX 胚性幹細胞株 - 系統 C 5 7 B L / 6、カタログ番号 CMTI 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ES細胞を電気穿孔48時間後から開始するG418選択にかけた。相同的組換えを伴うES細胞を、プライマーとして配列番号73:5' - ATAGC AT GTGCCAGGAGACAC-3'及び配列番号83:5' - AGTGTGACTCGTGGAGACCA-3'を使用して増幅される480bpの3'プローブを用いるHindIII消化後のゲノムDNAのサザンプ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12.5kb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10.2kbのフラグメントを生じた。正しく標的化されたES細胞(fH<sup>W1201R(Neo-positive)/+</sup>)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'-CTTGGGTGGAGAGGGCTATTTC-3'及び配列番号75:Neo-5プライマー:5'-AGGTTGAGATGACAGGAGATC-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。ターゲッ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(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FH標的化マウス(fH<sup>W1206R(Neo-positive)/+</sup>)をFLPe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、fH対立遺伝子からNEOを除去しつつNEO遺伝子カセットを伴わないヘテロ接合性fH変異体マウス(fH<sup>W1206R/+</sup>)を作成した。fH<sup>W1206R/+</sup>マウスを異系交配して、C57BL/6の遺伝的背景のfH<sup>W1206R/W1206R</sup>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fH対立遺伝子の検出のため使用した: WR1(FH特異的)配列番号76:5'-GATATGGTCAAATTTAGGGAAAGT、配列番号77:Neo7(NEO特異的)5'-GGGTGGGATTAGATAAATGCC-3'及び配列番号78:WR4(FH特異的)5'-TACTGTCAGCTGGTCAAT-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fH<sup>W1206R/W1206R</sup>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 ( $3 \times 10^{11}$ 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 ( $3 \times 10^{11}$ 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】

10

20

30

40

50

ホモ接合性  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  マウスが、aHUS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。 $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  マウスに存在した。

#### 【0107】

上で報告された時点で、AAV8-mfH1-4.678.19-20で処置された全3  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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AAVベクターで処置された2  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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aHUSの症状を示した。

10

#### 【0108】

$f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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：

$h\text{fH1-4.678.19-20}$  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、われわれは、4週齢のホモ接合性  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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。mfH1-4.678.19-20が  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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、mfH1-4.678.19-

20

20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つつ血清の血液尿素窒素のレベルを測定した。 $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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。 $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  マウスは、われわれがmfH1-4.678.19-20

AAV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もまた可能にするとみられる。

#### 【0109】

対照AAV及びmfH1-4.678.19-20 AAVで処置された  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  マウスにおける血小板数

30

対照AAV及びmfH1-4.678.19-20 AAVで処置された  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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EDTAとともに回収し（最終濃度：0.02M）、そしてフィラデルフィア小児病院のCTR C Translational Core Laboratory at the Children's Hospital of Philadelphia (<http://ctr.c.research.chop.edu/services-facilities/translational-core-laboratory-tcl/hematology>)でSysmex XT-2000iV自動化血液学分析装置で分析した。

40

#### 【0110】

対照AAV及びmfH1-4.678.19-20 AAVで処置された  $f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  マウスにおける血液尿素窒素（BUN）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BUN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（Sigma-Aldrich）を使用して測定した。

#### 【0111】

$f\text{H}^{W1206R/W1206R}$  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 f H W1206R/W1206R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あつパラフィン包埋のため処理し、そして他方を O C T 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、a H U S / 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> の下のフリー 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	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; SIGNAL</p> <p>&lt;222&gt; (1)..(18)</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; DOMAIN</p> <p>&lt;222&gt; (19)..(82)</p> <p>&lt;223&gt; Sushi 1</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; DOMAIN</p> <p>&lt;222&gt; (83)..(143)</p> <p>&lt;223&gt; Sushi 1</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; DOMAIN</p> <p>&lt;222&gt; (144)..(207)</p> <p>&lt;223&gt; Sushi 3</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; DOMAIN</p> <p>&lt;222&gt; (208)..(264)</p> <p>&lt;223&gt; Sushi 4</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; DOMAIN</p> <p>&lt;222&gt; (265)..(322)</p> <p>&lt;223&gt; Sushi 5</p>

【 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	
	<220> <221> DOMAIN <222> (515)..(566) <223> Sushi 9	20
	<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】

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

【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

【0117】

【表 7 - 5】

	F短縮化バリアントプライマー
56	<223> pCBAghfH-ORF Rプライマー
57	<223> dSCR5R
58	<223> dSCR5F短縮化バリアントプライマー
59	<223> dSCR9-18F短縮化バリアントプライマー
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 + イントロン
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

【0118】

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に出現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。

## 【図面】

【図 1 A】

図 1A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

【 図 1 B 】

1B

【図1C】

図 1C

【 义 1 D 】

1D

W A Q L S S P P Y Y Y G D S V E F N C S  
 gaatcatttcatacataatggacacatgtttttatcggatgtatggatgtggaccas  
 E S F T M I G H R S S I T C T I V G W T Q  
 ctccatccatgtgtgtggatataatggatgtatggatataatggatataatggatata  
 L L P Q C A I D K L K C K C S S N L I I  
 Cttggaggatataatggatataatggatgtatggatataatggatataatggatata  
 L E E H L N N K E D H D N S N I R Y R  
 tggatggatggatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggat  
 C R G N I N H T V C L R G W D P E  
 gtgtatgtgtatgtgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtat  
 V N C S M A Q I Q L L C P P P F Q Q I P N S  
 Cacaatgtatggatataatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 H N M T T I L N Y R D G E K V V S L Q  
 gaaaattatataatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgtat  
 E N T L I Q E G E E I T C R D G H W Q S  
 atactactctgtgtgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 I P F L C V K E K I P C S Q M P F Q I E H G T  
 Attatccatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 I N S S R S S Q E S Y V A R G T S L S Y T  
 tggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatgg  
 C E G R F I R S E N E T T C Y M G K W  
 agttgtatccatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatgg  
 S S P P Q C E G L B C K S P P E I S H G  
 Fttgtatgtatccatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 V V Y H A M S D S Y Q Y G E E T V T K C F  
 gaagggttttggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 E E G F G I D G P A I A C K L G E K W S H  
 ctccatgtatggatataatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 P P S C I K T D T C L S L P S F E N A I P  
 Atggatggatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggat  
 G M E K D B V Y K A Q G E Q V T Y T C A T  
 tattatccatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 Y Y K M D M G G A S N V T C I N S R W T G R  
 ccacatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 P T C R D T S C V M F P T V Y Q N A Y I V  
 Eeaggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtatggatgtat  
 S E K O M S K Y P S E S E B V R Y I C O C R E S P  
 SCR13  
 SCR14  
 SCR15  
 SCR16  
 SCR17  
 SCR18

【 図 1 E 】

図 1E

SCR19

SCR20

【図2A】

図 2A



【図2B】

2B

SCR 6

### 【図3A】

図 3A

10

20

30

40

【図3B】

図 3B

【図3C】

30

【 図 4 】

义 4

#### hfH1-4.678.19-20 タンパク質アミノ酸配列

MRLLAIIICLMLWIAVCAEDCNELPPLRRTNEITGLWSQDQTYPGETQAIYKCRPGYRSGLNVIMVCRKG  
WVAVNLPLRKCRPGHGDTPFLITGNNFVYFGVAKVTCNGQYLLGEEINRYCDDTDGWNTD  
PTEVCKVLCPVTPAENGKIVSSAMAPREYHFQGAVFVNCNSQYKIEGDEMDHCSDDGFWSKPEKPCV  
ISCKSPDVNGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYERSGDAVCTESGWPLPSCEEKSTLKPDCYDPIKHG  
GLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCDEHFTPZGQWVHDIHCTQDGWSVPLCPRKCFYFLNGY  
HGRKFVQGKSIDVCPAGVPLQATVTTMCGNSWVSPTPRCRVTCKTSKSDIISFESIQSYTALKKE  
AKYQCLKLGVYTADGETGSIRGKGDWSQAOPCTKSOKDSTGKGPPDIDNGDITSPFLSVAPASSVEQ  
CQNQYCLKRTICRNGQWSEPPKCLHCPVISREIMENYALRWTAQOKLYSRTGESFVEVKCRGYRL  
SSRSHTRLTTCV/DGKLEPTVCAKR

【図 5 A - 5 B】

5A

5B

10

20

30

40

50

【図 6】

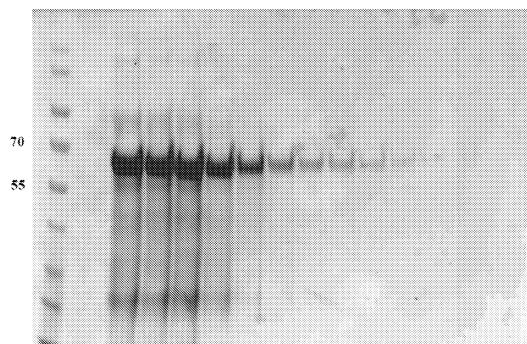


図 6

【図 7】

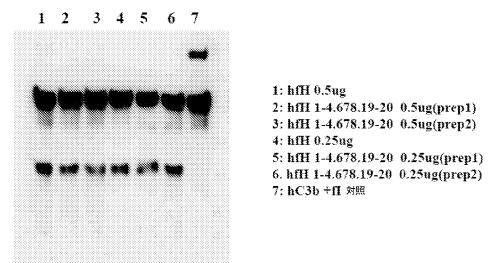


図 7

【図 8】

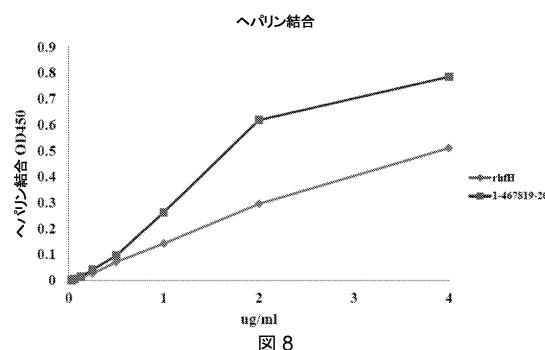


図 8

【図 9】

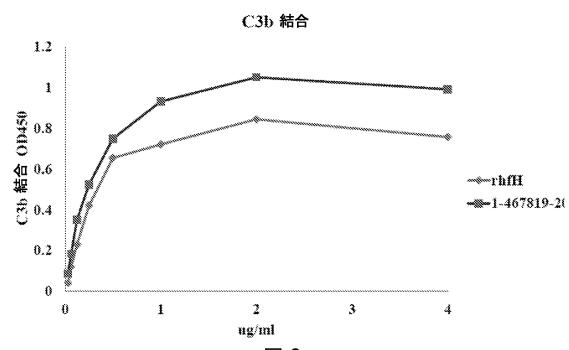


図 9

10

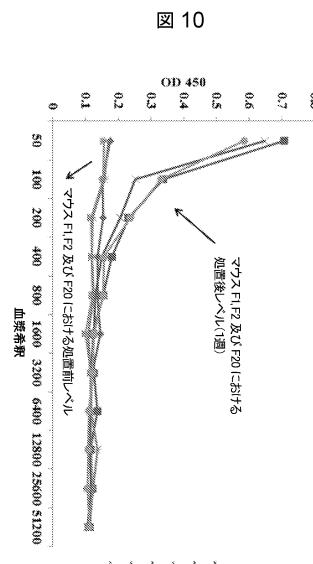
20

30

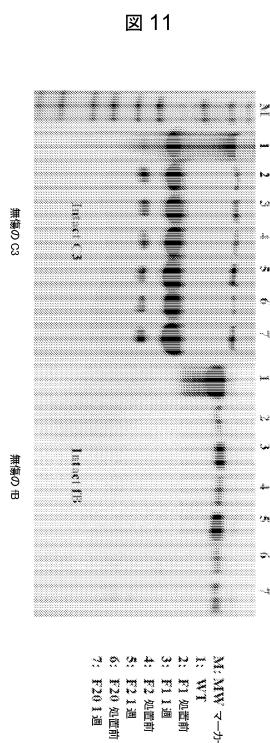
40

50

【図 10】



【図 11】



10

20

30

40

【図 12A】

図 12A



【図 12B】

図 12B

Atgagacttcttagaaaggattattttgttgcattttgtgttagcagaatg  
M R L L A K I I C L M L W A I C V A E D  
tgcataatgtttccatccaaagaataatcataatctgcacgtttccggctggacca  
C N E L P P R R N T E I L T G S W S D Q  
acataatccaaaggccccggatctataatctgcgcgcgtatataatctgttgc  
T Y P E G T Q A A I Y K C R P G Y R S L G  
aataataatgttgcggaaaggatgggtttttttatccatcataaggaaatgt  
N I I M V C R K G E W V V A L N P L R K C  
cagaaaaaggccctgtggacatctggatatactccatttttttttttttttttt  
Q K R P C G H P G D T P F G T F T L T G  
ggaaatgttt  
G N V F E Y G V R A V Y T C R E G Y Q L  
cttggatgttt  
L G E I N Y R E C D T D G N T N D I P I  
tgtggatgttt  
C E V V K C L P V T A P E N G K I V S S  
gcataatccaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
A M E P D R E Y H F G Q A V R F V C N S  
ggctacaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
G Y K I E G D E E M H C S D D G F W S K  
gagaaaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
E K P C V Z I S C K S P D V I A M G I S P  
atatttcggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
I S Q X I I Y K S N E X F Q Y K C N H G  
tatt  
Y E Y S E R G D A V C T E S C W R P L F  
tcatgtggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
S C E E K S T L R P C D Y P D I K H G G  
ctatataatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
L Y H E N N R R P Y F P V A V G K Y Y S  
tatt  
Y Y C D E H F E T P S G S Y W D H I H C  
acacaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
T Q D G W S A P V P C L R K C Y F P Y L  
gaaaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
E N Q Y N Q Y G R K F V Q G K S I D V  
ggctgcacatccctggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
A C H P G Y A L P K Q T T V T C M E N  
ggctggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
G M S P T S R C I R V K T C S K S S I D  
attggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
I E N G F I S E S Q Y T Y A L K E K A K  
tatcaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
Y Q C K L G Y V T A D G E T T S G S I T C  
ggggaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggat  
G K D G W S A Q P T C I K S I K T D C L

シングルペプチド

SCR1

SCR2

SCR3

SCR4

SCR5

SCR6

SCR7

SCR8

50

【図12C】

図 12C

【図13】

【図14】

図 14

### 【図 15A - 15C】

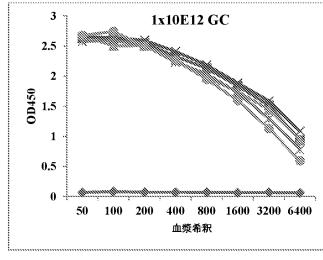


図 15A

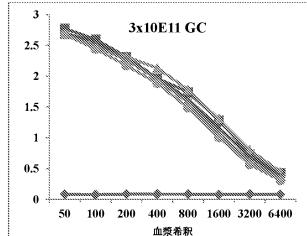


図 15B

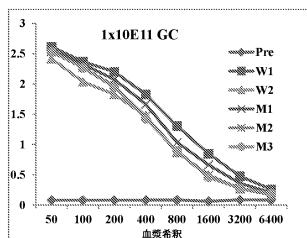


図 15C

【図16A-16C】

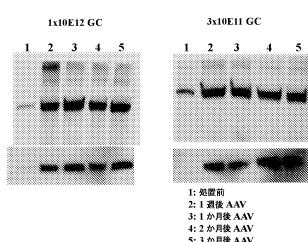


図 16A



図 16C

【図17A】

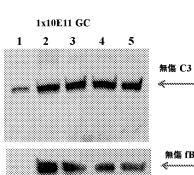


図 17A

10

20

【図17B】

図 17B

SCRS

8008

三三八

scri

【図17C】

図 17C

30

40

50

【図18A】

【図18B】

図 18A

図 18B

【図19】

【図20】

20

MMVYQHRRFLLESVGPBKQIMRLSARIWLLWTVCAAEDCKGPPPREN  
SEI1SGSWSEQLYPEGTQATYKCRPGYRTLGTIVKVKNGKWVASNP  
SRICRKPCGHGDPDFFGSSRFLAVGSOFFEGAKVVTCDGYQLLGE  
DRECGADGWINDIPLCEVKKCLPVTELENGRIVSGAAETDQEYYFG  
QVVRERECNSGFKEIGHKEIHCSENGLWNSNEKPRCVCIEILCTPPRVENG  
DG1NVKPVYKENERYHYKCKHGYVPKERGDAVCTGSGWSSQPFCEEH  
RTLKPCEPQFYGRLYEESLRPNFPSIGNKSYKCDNGFSPSGYQS  
WDLRCTAQGWPEPVCPVRKCVFHYVENGDSAYWEKVYVQGQSLK  
VQGQNGQYNSYKMTCTGWSPPRPPKCIKTCASDHSIDNGFL  
SESSSIYALNRETYSYRKQGYVTNTGEISGSITCLQNGWSPQPSCKSRA  
DSTGKCGPPPPIDNGDITSSLPVYEPSSLSEVYQCKQYVLLKGKKTIC  
RNGKWSSEPPTCLHACVPIENIMESHNIILKWRHTEKIYSHSGEDIEFG  
CKYGYKKARDSSPPFRTKINGTINYPTCV

【図 2 1】

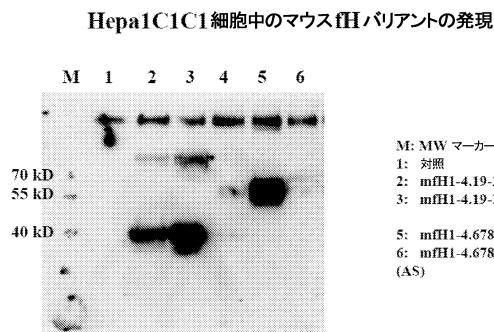


図 21

【図 2 2 A - 2 2 B】

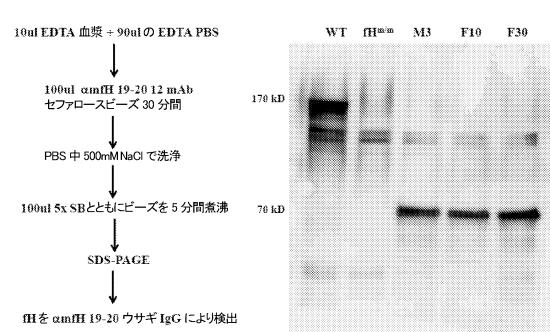


図 22A

10

図 22B

【図 2 3】

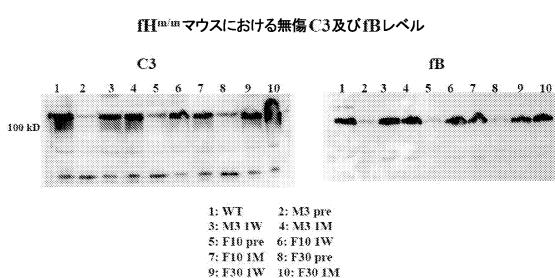


図 23

【図 2 4】

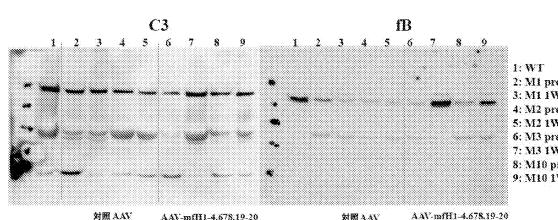


図 24

20

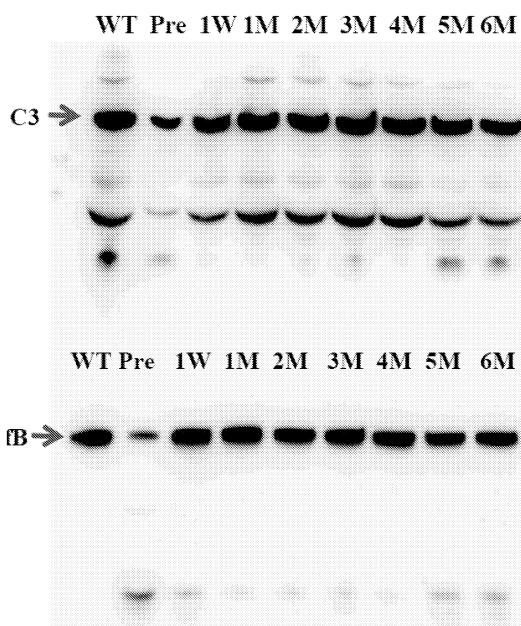
30

40

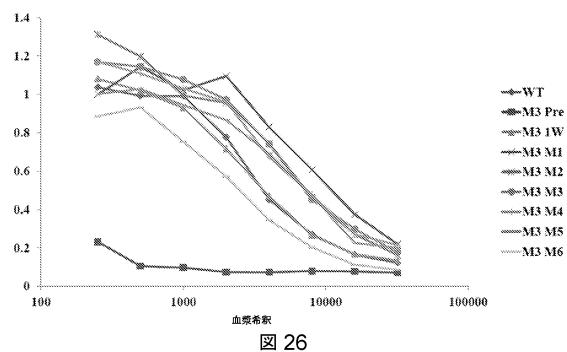
50

【図 25】

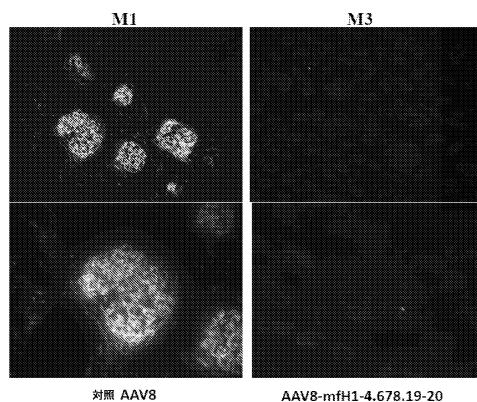
図 25



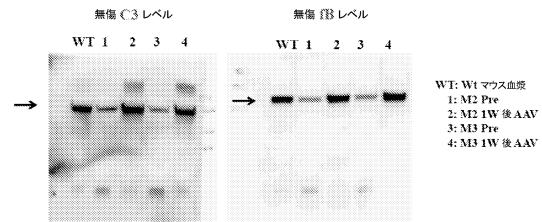
【図 26】



【図 27】



【図 28 A - 28 B】



【図 29A - 29B】

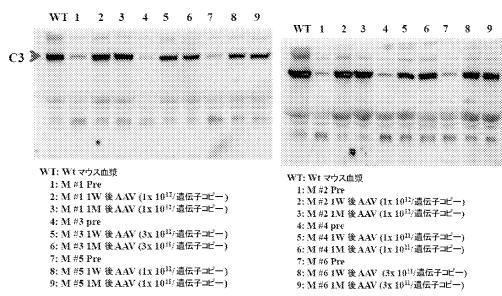


図 29A

図 29B

【図 30】

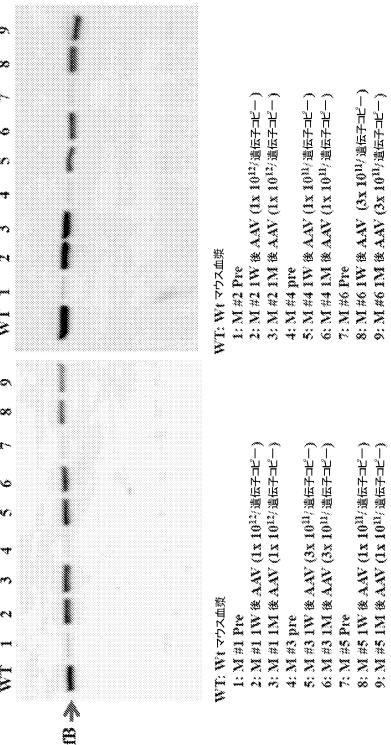


図 30

10

20

30

40

【図 31】

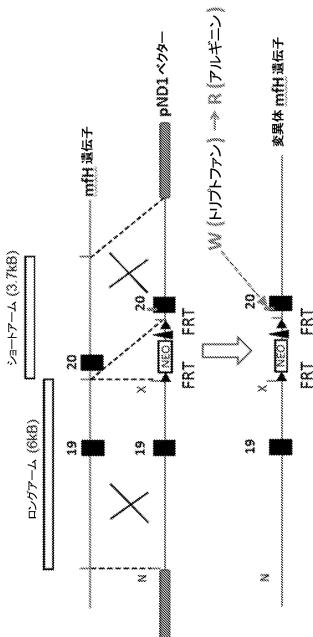
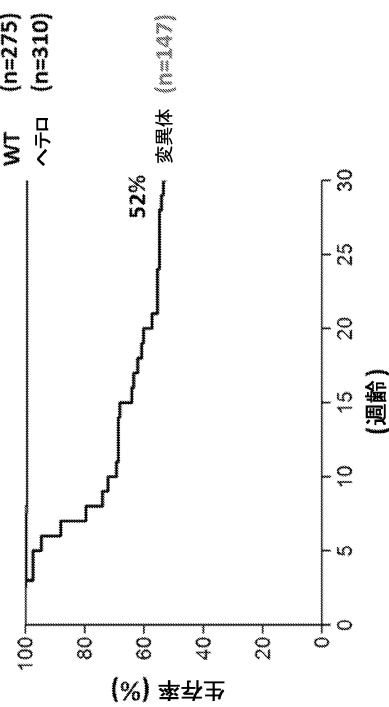


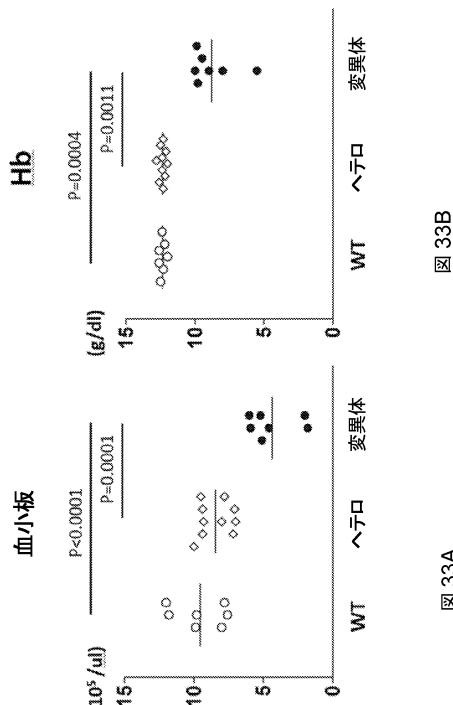
図 31

【図 32】

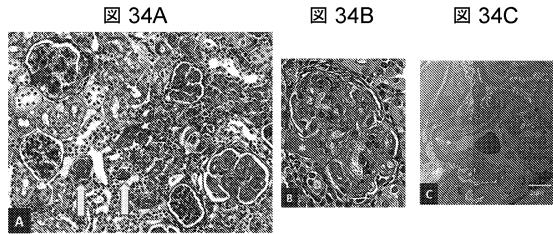


50

【図 3 3 A - 3 3 B】



【図 3 4 A - 3 4 C】



10

20

【図 3 5 A - 3 5 D】

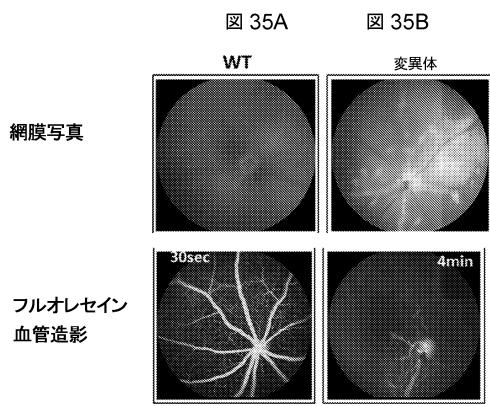
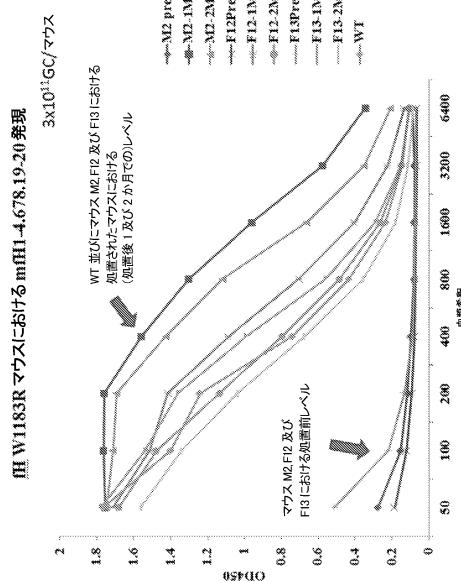


図 35A 図 35B

図 35C

図 35D

【図 3 6】

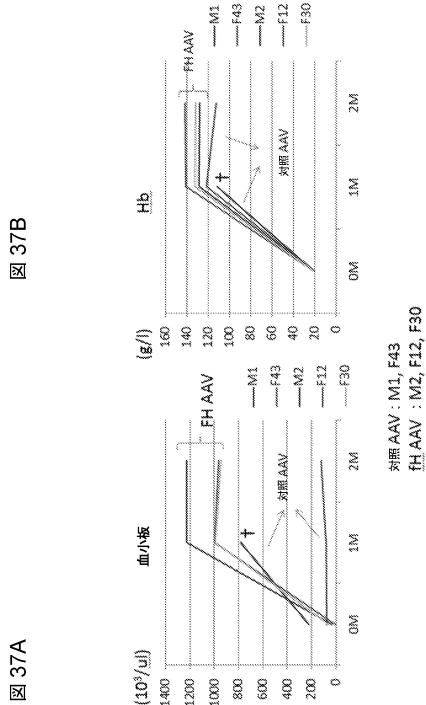


30

40

50

### 【図37A-37B】



10

20

## 【配列表】

0007261583000001.app

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 ( WO , 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 )

D r u g D i s c o v e r y S y s t e m ( 2 0 0 7 ) V o l . 2 2 - 6 , p p . 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, H e m o p h i l i a T o p i c s ( 2 0 0 7 ) V o l . 1 3 , p p . 1 - 4 , バイエル薬品株式会社 [ o n l i n e ] , [ 検索日 2 0 2 0 . 7 . 1 4 ] , U R L , &lt; h t t p s : / / p h a r m a - n a v i . b a y e r . j p / h e m o p h i l i a / s t a t i c / p d f / d i s e a s e \_ i n f o / h e m o p h i l i a \_ t o p i c s / v o l 1 3 . p d f &gt;

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , DB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