

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和4年9月1日(2022.9.1)

【国際公開番号】WO2020/056122
 【公表番号】特表2022-500047(P2022-500047A)
 【公表日】令和4年1月4日(2022.1.4)
 【出願番号】特願2021-514036(P2021-514036)
 【国際特許分類】

A 0 1 K 67/027(2006.01)
 C 1 2 N 15/12(2006.01)
 C 1 2 N 15/09(2006.01)
 C 1 2 N 5/10(2006.01)
 C 1 2 N 9/16(2006.01)
 G 0 1 N 33/15(2006.01)
 G 0 1 N 33/50(2006.01)
 C 1 2 N 5/0735(2010.01)

10

【F I】

A 0 1 K 67/027 Z N A
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/09 1 0 0
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 9/16
 G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 33/50 Z
 C 1 2 N 5/0735

20

【手続補正書】

【提出日】令和4年8月24日(2022.8.24)

【手続補正1】

30

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

不活性化された内因性C f h遺伝子座を含む遺伝子改変ラットであって、前記不活性化された内因性C f h遺伝子座に対してホモ接合性である、遺伝子改変ラット。

【請求項2】

前記不活性化された内因性C f h遺伝子座において、前記内因性C f h遺伝子座の開始コドンが変異または欠失している、請求項1に記載の遺伝子改変ラット。

40

【請求項3】

前記不活性化された内因性C f h遺伝子座において、前記内因性C f h遺伝子座の前記開始コドンが欠失している、請求項2に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項4】

前記不活性化された内因性C f h遺伝子座において、前記内因性C f h遺伝子座の第1のエクソンにおけるコード配列が欠失している、請求項3に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項5】

前記不活性化された内因性C f h遺伝子座において、前記内因性C f h遺伝子座の第1のイントロンにおけるスプライドナー部位が欠失している、請求項4に記載の遺伝子改

50

変ラット。

【請求項 6】

前記ラットが雄または雌であり、C3系球体症(C3G)の1つまたは複数の症状を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 7】

野生型ラットと比較して低下した循環C3レベルを有する、請求項1から6のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 8】

(I)前記循環C3レベルが、約200 μ g/mL未満であり、必要に応じて前記循環C3レベルが、約100 μ g/mL未満である、および/または

10

(II)約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して低下した循環C3レベルを有する、

請求項7に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 9】

野生型ラットと比較して、増加した血中尿素窒素レベル、増加した血清中シスタチンCレベル、または増加した尿中アルブミンレベルを有する、請求項1から8のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 10】

野生型ラットと比較して、増加した血中尿素窒素レベル、増加した血清中シスタチンCレベル、および増加した尿中アルブミンレベルを有する、請求項9に記載の遺伝子改変ラット。

20

【請求項 11】

(I)前記血中尿素窒素レベルが、約10mg/dLを超えるか、約20mg/dLを超えるか、約30mg/dLを超えるか、約40mg/dLを超えるか、約50mg/dLを超えるか、約60mg/dLを超えるか、約70mg/dLを超えるか、約80mg/dLを超えるか、約90mg/dLを超えるか、または約100mg/dLを超える、および/または

(II)前記血清中シスタチンCレベルが、約1000ng/mLを超えるか、約1100ng/mLを超えるか、約1200ng/mLを超えるか、約1300ng/mLを超えるか、約1400ng/mLを超えるか、約1500ng/mLを超えるか、約1600ng/mLを超えるか、約1700ng/mLを超えるか、約1800ng/mLを超えるか、約1900ng/mLを超えるか、または約2000ng/mLを超える、および/または

30

(III)1日当たりの前記尿中アルブミンが、約1000 μ g/日を超えるか、約2000 μ g/日を超えるか、約3000 μ g/日を超えるか、約4000 μ g/日を超えるか、約5000 μ g/日を超えるか、約6000 μ g/日を超えるか、約7000 μ g/日を超えるか、約8000 μ g/日を超えるか、約9000 μ g/日を超えるか、もしくは約10000 μ g/日を超える、

(IV)尿中アルブミンの尿中クレアチニンに対する比が、約100 μ g:mgを超えるか、約200 μ g:mgを超えるか、約300 μ g:mgを超えるか、約400 μ g:mgを超えるか、約500 μ g:mgを超えるか、約600 μ g:mgを超えるか、約700 μ g:mgを超えるか、約800 μ g:mgを超えるか、約900 μ g:mgを超えるか、約1000 μ g:mgを超えるか、約1100 μ g:mgを超えるか、約1200 μ g:mgを超えるか、約1300 μ g:mgを超えるか、約1400 μ g:mgを超えるか、約1500 μ g:mgを超えるか、約1600 μ g:mgを超えるか、約1700 μ g:mgを超えるか、約1800 μ g:mgを超えるか、約1900 μ g:mgを超えるか、または約2000 μ g:mgを超える、および/または

40

(V)約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して、増加した血中尿素窒素レベル、増加した血清中シスタチンCレベル、または増加した尿中アルブミンレベルを有する、

50

請求項 9 または 10 に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 12】

野生型ラットと比較して腎臓における C3 沈着が増加しており、必要に応じて約 7 週齢から約 17 週齢の間で、前記野生型ラットと比較して前記腎臓における C3 沈着が増加している、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 13】

野生型ラットと比較して前記腎臓における C5b-9 沈着が増加しており、必要に応じて約 7 週齢から約 17 週齢の間で、前記野生型ラットと比較して前記腎臓における C5b-9 沈着が増加している、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 14】

野生型ラットと比較して増加した糸球体病理を有し、前記増加した糸球体病理が、前記野生型ラットと比較して、増加した糸球体基底膜厚、増加した有足細胞足突起幅、または減少した有足細胞足突起数を含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 15】

前記増加した糸球体病理が、前記野生型ラットと比較して、増加した糸球体基底膜厚、増加した有足細胞足突起幅、および減少した有足細胞足突起数を含む、請求項 14 に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 16】

(I) 糸球体基底膜厚の増加が、前記野生型ラットと比較して、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 6 倍、少なくとも約 7 倍、少なくとも約 8 倍、少なくとも約 9 倍、もしくは少なくとも約 10 倍である、および/または

(II) 前記遺伝子改変ラットの糸球体における平均糸球体基底膜厚が、少なくとも約 0.2 ミクロン、少なくとも約 0.3 ミクロン、少なくとも約 0.4 ミクロン、少なくとも約 0.5 ミクロン、少なくとも約 0.6 ミクロン、少なくとも約 0.7 ミクロン、少なくとも約 0.8 ミクロン、少なくとも約 0.9 ミクロン、少なくとも約 1.0 ミクロン、少なくとも約 1.1 ミクロン、少なくとも約 1.2 ミクロン、少なくとも約 1.3 ミクロン、少なくとも約 1.4 ミクロン、少なくとも約 1.5 ミクロン、少なくとも約 1.6 ミクロン、少なくとも約 1.7 ミクロン、もしくは少なくとも約 1.8 ミクロンである、および/または

(III) 有足細胞足突起幅の増加が、前記野生型ラットと比較して、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 6 倍、もしくは少なくとも約 7 倍である、および/または

(IV) 前記遺伝子改変ラットの糸球体における足突起幅の平均が、少なくとも約 0.4 ミクロン、少なくとも約 0.5 ミクロン、少なくとも約 0.6 ミクロン、少なくとも約 0.7 ミクロン、少なくとも約 0.8 ミクロン、少なくとも約 0.9 ミクロン、少なくとも約 1.0 ミクロン、少なくとも約 1.5 ミクロン、少なくとも約 2.0 ミクロン、もしくは少なくとも約 2.5 ミクロンである、および/または

(V) 有足細胞足突起数の減少が、前記野生型ラットと比較して、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3.5 倍、もしくは少なくとも約 3.8 倍である、および/または

(VI) 前記遺伝子改変ラットにおける 1 ミクロンの長さ当たりの有足細胞足突起数の平均が、約 2.5 未満、約 2 未満、約 1.5 未満、約 1 未満、約 0.9 未満、もしくは約 0.8 未満である、および/または

(VII) 約 7 週齢から約 17 週齢の間で、前記野生型ラットと比較して増加した糸球体病理を有する、

請求項 14 または 15 に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項 17】

野生型ラットと比較して減少した寿命を有し、必要に応じて前記遺伝子改変ラットの寿

10

20

30

40

50

命の中央値が、約150日未満である、請求項1から16のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

【請求項18】

C3系球体症(C3G)の処置において使用するための薬剤の*in vivo*治療有効性を評価する方法であって、

(a)前記薬剤を、請求項1から17のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラットに投与するステップと、

(b)前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおけるC3Gの1つまたは複数の症状を、前記薬剤を投与されていない対照遺伝子改変ラットと比較して評価するステップと

10

を含む、方法。

【請求項19】

ステップ(b)が、

(i)循環C3レベル、

(ii)血中尿素窒素レベル、

(iii)血清中シスタチンCレベル、

(iv)尿中アルブミンレベル、

(v)腎臓におけるC3沈着、

(vi)前記腎臓におけるC5b-9沈着、

(vii)系球体基底膜厚、

(viii)有足細胞足突起幅、

(ix)有足細胞足数、

(x)寿命、または

(xi)これらの組合せ

20

を評価するステップを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記遺伝子改変ラットの年齢が、約7週齢から約17週齢の間である、請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】

(I)ステップ(b)が、循環C3レベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける循環C3レベルの増加が、推定C3G治療剤の治療効果を示す、および/または

30

(II)ステップ(b)が、血中尿素窒素レベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける血中尿素窒素レベルの低下が、前記推定C3G治療剤の治療効果を示す、および/または

(III)ステップ(b)が、血清中シスタチンCレベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける血清中シスタチンCレベルの低下が、前記推定C3G治療剤の治療効果を示す、および/または

(IV)ステップ(b)が、尿中アルブミンレベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける尿中アルブミンレベルの低下が、前記推定C3G治療剤の治療効果を示す、および/または

40

(V)ステップ(b)が、前記腎臓におけるC3沈着を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける前記腎臓におけるC3沈着レベルの低下が、前記推定C3G治療剤の治療効果を示す、および/または

(VI)ステップ(b)が、前記腎臓におけるC5b-9沈着を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける前記腎臓におけるC5b-9沈着レベルの低下が、前記推定C3G治療剤の治療効果を示す、および/または

50

(V I I) ステップ (b) が、系球体基底膜厚を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける系球体基底膜厚の減少が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、および / または

(V I I I) ステップ (b) が、有足細胞足突起幅を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける有足細胞足突起幅の減少が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、および / または

(I X) ステップ (b) が、有足細胞足突起数を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける有足細胞足突起数の増加が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、および / または

(X) ステップ (b) が、寿命を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける寿命の増加が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、

10

請求項 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

(a) ラット胚性幹 (E S) 細胞中に、前記内因性 C f h 遺伝子座の前記開始コドンに近接する第 1 の標的配列を標的とする第 1 のヌクレアーゼ剤を導入するステップであって、前記ヌクレアーゼ剤が前記第 1 の標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット E S 細胞を生じる、ステップと、

(b) 前記遺伝子改変ラット E S 細胞をラット宿主胚中に導入するステップと、

(c) 前記ラット宿主胚を代理ラット母に懐胎させるステップであって、前記代理ラット母が、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む F 0 子孫遺伝子改変ラットを生じる、ステップと

20

を含む、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラットを作製する方法。

【請求項 2 3】

(a) ラット 1 細胞期胚中に、前記内因性 C f h 遺伝子座の前記開始コドンに近接する第 1 の標的配列を標的とする第 1 のヌクレアーゼ剤を導入するステップであって、前記ヌクレアーゼ剤が前記第 1 の標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット 1 細胞期胚を生じる、ステップと、

(b) 前記遺伝子改変ラット 1 細胞期胚を代理ラット母に懐胎させるステップであって、前記代理ラット母が、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む F 0 子孫遺伝子改変ラットを生じる、ステップと

30

を含む、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラットを作製する方法。

【請求項 2 4】

不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット細胞であって、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座に対してホモ接合性である、遺伝子改変ラット細胞。

【請求項 2 5】

不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット細胞を作製する方法であって、ラット細胞中に、前記内因性 C f h ゲノム遺伝子座の開始コドンに近接する標的配列を標的とするヌクレアーゼ剤を導入するステップを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む前記遺伝子改変ラット細胞を生じる、方法。

40

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 1】

まとめると、ラットの寿命の非常に早期に起こる自然死亡率が C f h ノックアウトラットにおいて観察された。C f h ノックアウトラットにおける C 3 レベルがより低いことは、制御されていない補体副経路活性化による消費を示唆する。C f h ノックアウトラット

50

の腎組織病理は、C3およびC5b-9沈着、ならびに糸球体硬化および尿細管病理と一致する。血中尿素窒素および血清中シスタチンCは、その両方がGFRマーカーであり、Cfhノックアウトラットにおいて上昇し、腎不全を示唆した。さらに、Cfhノックアウトラットでは尿中アルブミンが上昇した。まとめると、これらの表現型は、CfhノックアウトラットがC3系球体症(C3G)様疾患を提示し、新たな潜在的C3G治療法を評価するのにより効率的かつ有効な前臨床研究を可能とする急速進行性の疾患経過を示すことを実証する。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

不活性化された内因性Cfh遺伝子座を含む遺伝子改変ラット。

10

(項目2)

前記不活性化された内因性Cfh遺伝子座において、前記内因性Cfh遺伝子座の開始コドンが変異または欠失している、項目1に記載の遺伝子改変ラット。

(項目3)

前記不活性化された内因性Cfh遺伝子座において、前記内因性Cfh遺伝子座の前記開始コドンが欠失している、項目2に記載の遺伝子改変ラット。

(項目4)

前記不活性化された内因性Cfh遺伝子座において、前記内因性Cfh遺伝子座の第1のエクソンにおけるコード配列が欠失している、項目3に記載の遺伝子改変ラット。

(項目5)

前記不活性化された内因性Cfh遺伝子座において、前記内因性Cfh遺伝子座の第1のイントロンにおけるスプライスドナー部位が欠失している、項目4に記載の遺伝子改変ラット。

20

(項目6)

前記ラットが雄である、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目7)

前記ラットが雌である、項目1から5のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目8)

前記ラットが、前記不活性化された内因性Cfh遺伝子座に対してホモ接合性である、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

30

(項目9)

前記ラットが、C3系球体症(C3G)の1つまたは複数の症状を有する、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目10)

野生型ラットと比較して低下した循環C3レベルを有する、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目11)

前記循環C3レベルが、約200 μg/mL未満である、項目10に記載の遺伝子改変ラット。

(項目12)

前記循環C3レベルが、約100 μg/mL未満である、項目11に記載の遺伝子改変ラット。

40

(項目13)

約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して低下した循環C3レベルを有する、項目10から12のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目14)

野生型ラットと比較して、増加した血中尿素窒素レベル、増加した血清中シスタチンCレベル、または増加した尿中アルブミンレベルを有する、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目15)

50

野生型ラットと比較して、増加した血中尿素窒素レベル、増加した血清中シスタチンCレベル、および増加した尿中アルブミンレベルを有する、項目14に記載の遺伝子改変ラット。

(項目16)

前記血中尿素窒素レベルが、約10mg/dLを超えるか、約20mg/dLを超えるか、約30mg/dLを超えるか、約40mg/dLを超えるか、約50mg/dLを超えるか、約60mg/dLを超えるか、約70mg/dLを超えるか、約80mg/dLを超えるか、約90mg/dLを超えるか、または約100mg/dLを超える、項目14または15に記載の遺伝子改変ラット。

(項目17)

前記血清中シスタチンCレベルが、約1000ng/mLを超えるか、約1100ng/mLを超えるか、約1200ng/mLを超えるか、約1300ng/mLを超えるか、約1400ng/mLを超えるか、約1500ng/mLを超えるか、約1600ng/mLを超えるか、約1700ng/mLを超えるか、約1800ng/mLを超えるか、約1900ng/mLを超えるか、または約2000ng/mLを超える、項目14から16のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目18)

(I) 1日当たりの前記尿中アルブミンが、約1000 μ g/日を超えるか、約2000 μ g/日を超えるか、約3000 μ g/日を超えるか、約4000 μ g/日を超えるか、約5000 μ g/日を超えるか、約6000 μ g/日を超えるか、約7000 μ g/日を超えるか、約8000 μ g/日を超えるか、約9000 μ g/日を超えるか、もしくは約10000 μ g/日を超える；および/または

(II) 尿中アルブミンの尿中クレアチニンに対する比が、約100 μ g : mgを超えるか、約200 μ g : mgを超えるか、約300 μ g : mgを超えるか、約400 μ g : mgを超えるか、約500 μ g : mgを超えるか、約600 μ g : mgを超えるか、約700 μ g : mgを超えるか、約800 μ g : mgを超えるか、約900 μ g : mgを超えるか、約1000 μ g : mgを超えるか、約1100 μ g : mgを超えるか、約1200 μ g : mgを超えるか、約1300 μ g : mgを超えるか、約1400 μ g : mgを超えるか、約1500 μ g : mgを超えるか、約1600 μ g : mgを超えるか、約1700 μ g : mgを超えるか、約1800 μ g : mgを超えるか、約1900 μ g : mgを超えるか、または約2000 μ g : mgを超える、

項目14から17のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目19)

約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して、増加した血中尿素窒素レベル、増加した血清中シスタチンCレベル、または増加した尿中アルブミンレベルを有する、項目14から18のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目20)

野生型ラットと比較して腎臓におけるC3沈着が増加している、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目21)

約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して前記腎臓におけるC3沈着が増加している、項目20に記載の遺伝子改変ラット。

(項目22)

野生型ラットと比較して前記腎臓におけるC5b-9沈着が増加している、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目23)

約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して前記腎臓におけるC5b-9沈着が増加している、項目22に記載の遺伝子改変ラット。

(項目24)

野生型ラットと比較して増加した糸球体病理を有する、いずれかの先行する項目に記載

10

20

30

40

50

の遺伝子改変ラット。

(項目25)

前記増加した系球体病理が、前記野生型ラットと比較して、増加した系球体基底膜厚、増加した有足細胞足突起幅、または減少した有足細胞足突起数を含む、項目24に記載の遺伝子改変ラット。

(項目26)

前記増加した系球体病理が、前記野生型ラットと比較して、増加した系球体基底膜厚、増加した有足細胞足突起幅、および減少した有足細胞足突起数を含む、項目25に記載の遺伝子改変ラット。

(項目27)

(I)系球体基底膜厚の増加が、前記野生型ラットと比較して、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、もしくは少なくとも約10倍である、および/または

(II)前記遺伝子改変ラットの系球体における平均系球体基底膜厚が、少なくとも約0.2ミクロン、少なくとも約0.3ミクロン、少なくとも約0.4ミクロン、少なくとも約0.5ミクロン、少なくとも約0.6ミクロン、少なくとも約0.7ミクロン、少なくとも約0.8ミクロン、少なくとも約0.9ミクロン、少なくとも約1.0ミクロン、少なくとも約1.1ミクロン、少なくとも約1.2ミクロン、少なくとも約1.3ミクロン、少なくとも約1.4ミクロン、少なくとも約1.5ミクロン、少なくとも約1.6ミクロン、少なくとも約1.7ミクロン、もしくは少なくとも約1.8ミクロンである、
項目25または26に記載の遺伝子改変ラット。

(項目28)

(I)有足細胞足突起幅の増加が、前記野生型ラットと比較して、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、もしくは少なくとも約7倍である、および/または

(II)前記遺伝子改変ラットの系球体における足突起幅の平均が、少なくとも約0.4ミクロン、少なくとも約0.5ミクロン、少なくとも約0.6ミクロン、少なくとも約0.7ミクロン、少なくとも約0.8ミクロン、少なくとも約0.9ミクロン、少なくとも約1.0ミクロン、少なくとも約1.5ミクロン、少なくとも約2.0ミクロン、もしくは少なくとも約2.5ミクロンである、

項目25から27のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目29)

(I)有足細胞足突起数の減少が、前記野生型ラットと比較して、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、もしくは少なくとも約3.8倍である、および/または

(II)前記遺伝子改変ラットにおける1ミクロンの長さ当たりの有足細胞足突起数の平均が、約2.5未満、約2未満、約1.5未満、約1未満、約0.9未満、もしくは約0.8未満である、

項目25から28のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目30)

約7週齢から約17週齢の間で、前記野生型ラットと比較して増加した系球体病理を有する、項目24から29のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラット。

(項目31)

野生型ラットと比較して減少した寿命を有する、いずれかの先行する項目に記載の遺伝子改変ラット。

(項目32)

前記遺伝子改変ラットの寿命の中央値が、約150日未満である、項目31に記載の遺伝子改変ラット。

(項目33)

10

20

30

40

50

C 3系球体症 (C 3 G) の処置において使用するための薬剤の *i n v i v o* 治療有効性を評価する方法であって、

(a) 前記薬剤を、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラットに投与するステップと、

(b) 前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける C 3 G の 1 つまたは複数の症状を、前記薬剤を投与されていない対照遺伝子改変ラットと比較して評価するステップと

を含む、方法。

(項目 3 4)

ステップ (b) が、

(i) 循環 C 3 レベル、

(i i) 血中尿素窒素レベル、

(i i i) 血清中シスタチン C レベル、

(i v) 尿中アルブミンレベル、

(v) 腎臓における C 3 沈着、

(v i) 前記腎臓における C 5 b - 9 沈着、

(v i i) 系球体基底膜厚、

(v i i i) 有足細胞足突起幅、

(i x) 有足細胞足数、

(x) 寿命、または

(x i) これらの組合せ

を評価するステップを含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記遺伝子改変ラットの年齢が、約 7 週齢から約 1 7 週齢の間である、項目 3 3 または 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

ステップ (b) が、循環 C 3 レベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける循環 C 3 レベルの増加が、推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

ステップ (b) が、血中尿素窒素レベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける血中尿素窒素レベルの低下が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

ステップ (b) が、血清中シスタチン C レベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける血清中シスタチン C レベルの低下が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

ステップ (b) が、尿中アルブミンレベルを評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける尿中アルブミンレベルの低下が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

ステップ (b) が、前記腎臓における C 3 沈着を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける前記腎臓における C 3 沈着レベルの低下が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 4 1)

ステップ (b) が、前記腎臓における C 5 b - 9 沈着を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける前記腎臓における C 5 b - 9 沈着レベルの低下が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

ステップ (b) が、糸球体基底膜厚を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける糸球体基底膜厚の減少が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

ステップ (b) が、有足細胞足突起幅を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける有足細胞足突起幅の減少が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

ステップ (b) が、有足細胞足突起数を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける有足細胞足突起数の増加が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

ステップ (b) が、寿命を評価するステップを含み、前記対照遺伝子改変ラットに対する、前記薬剤を投与された前記遺伝子改変ラットにおける寿命の増加が、前記推定 C 3 G 治療剤の治療効果を示す、項目 3 3 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

(a) ラット胚性幹 (E S) 細胞中に、前記内因性 C f h 遺伝子座の前記開始コドンに近接する第 1 の標的配列を標的とする第 1 のヌクレアーゼ剤を導入するステップであって、前記ヌクレアーゼ剤が前記第 1 の標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット E S 細胞を生じる、ステップと、

(b) 前記遺伝子改変ラット (E S) 細胞をラット宿主胚中に導入するステップと、

(c) 前記ラット宿主胚を代理母に懐胎させるステップであって、前記代理母が、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む F 0 子孫遺伝子改変ラットを生じる、ステップと

を含む、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラットを作製する方法。

(項目 4 7)

(a) ラット 1 細胞期胚中に、前記内因性 C f h 遺伝子座の前記開始コドンに近接する第 1 の標的配列を標的とする第 1 のヌクレアーゼ剤を導入するステップであって、前記ヌクレアーゼ剤が前記第 1 の標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット 1 細胞期胚を生じる、ステップと、

(b) 前記遺伝子改変ラット 1 細胞期胚を代理母に懐胎させるステップであって、前記代理母が、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む F 0 子孫遺伝子改変ラットを生じる、ステップと

を含む、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変ラットを作製する方法。

(項目 4 8)

前記第 1 のヌクレアーゼ剤の前記第 1 の標的配列が、前記内因性 C f h 遺伝子座の第 1 のエクソン、第 1 のイントロン、または 5 ' U T R 中に存在する、項目 4 6 または 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記第 1 のヌクレアーゼ剤が、C a s 9 タンパク質およびガイド R N A である、項目 4 6 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目50)前記第1の標的配列が、配列番号12または13を含む、項目49に記載の方法。(項目51)ステップ(a)が、前記ラットES細胞または前記ラット1細胞期胚中に、前記内因性Cfh遺伝子座の停止コドンに近接する第2の標的配列を標的とする第2のヌクレアーゼ剤を導入するステップをさらに含む、項目46から50のいずれか一項に記載の方法。(項目52)前記第2の標的配列が、前記内因性Cfh遺伝子座の最後から2番目のイントロン、最後から2番目のエクソン、最後のイントロン、最後のエクソン、または3'UTR中に存在する、項目51に記載の方法。(項目53)前記第2の標的配列が、配列番号14または15を含む、項目52に記載の方法。(項目54)ステップ(a)が、前記ラットES細胞または前記ラット1細胞期胚中に、前記第1の標的配列とは異なる前記内因性Cfh遺伝子座の前記開始コドンに近接する第2の標的配列を標的とする第2のヌクレアーゼ剤を導入するステップをさらに含む、項目46から50のいずれか一項に記載の方法。(項目55)前記第1の標的配列および前記第2の標的配列が、前記内因性Cfh遺伝子座の前記開始コドンに隣接している、項目54に記載の方法。(項目56)前記第1の標的配列が、前記内因性Cfh遺伝子座の前記第1のエクソンまたは前記5'UTR中に存在し、前記第2の標的配列が、前記内因性Cfh遺伝子座の前記第1のエクソンまたは前記第1のイントロン中に存在する、項目54または55に記載の方法。(項目57)前記第1の標的配列が配列番号12を含み、前記第2の標的配列が配列番号13を含む、項目56に記載の方法。(項目58)ステップ(a)が、前記ラットES細胞または前記ラット1細胞期胚中に、第3のヌクレアーゼ剤および/または第4のヌクレアーゼ剤を導入するステップであって、前記第3および第4のヌクレアーゼ剤が、それぞれ、前記内因性Cfh遺伝子座の前記停止コドンに近接する第3および第4の標的配列を標的とし、前記第3および第4の標的配列が異なる、ステップをさらに含む、項目54から57のいずれか一項に記載の方法。(項目59)前記第3および第4の標的配列が、前記内因性Cfh遺伝子座の前記最後から2番目のイントロン、前記最後から2番目のエクソン、前記最後のイントロン、前記最後のエクソン、または前記3'UTR中に存在する、項目58に記載の方法。(項目60)前記第3および第4の標的配列が、それぞれ、配列番号14および15を含む、項目59に記載の方法。(項目61)ステップ(a)が、前記ラットES細胞または前記ラット1細胞期胚中に、前記内因性Cfh遺伝子座の5'標的配列にハイブリダイズする5'相同性アームおよび前記内因性Cfh遺伝子座の3'標的配列にハイブリダイズする3'相同性アームを含む外因性ドナー核酸を導入するステップであって、前記外因性ドナー核酸が前記内因性Cfh遺伝子座の前記開始コドンを変異または欠失させるように設計されている、ステップをさらに含む、項目46から60のいずれか一項に記載の方法。(項目62)前記5'標的配列および前記3'標的配列が、前記内因性Cfh遺伝子座の前記開始コドンに隣接している、項目61に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 6 3)

前記 5 ' 標的配列および前記 3 ' 標的配列が、前記内因性 C f h 遺伝子座の前記コード配列に隣接している、項目 6 1 または 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット細胞。

(項目 6 5)

不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラットゲノム。

(項目 6 6)

ラット C f h 遺伝子を不活性化する標的遺伝子改変を含む前記ラット C f h 遺伝子。

(項目 6 7)

ラット C f h 遺伝子を不活性化するために使用するためのヌクレアーゼ剤であって、前記 C f h 遺伝子のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、切断する、ヌクレアーゼ剤。

(項目 6 8)

不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラット細胞を作製する方法であって、ラット細胞中に、前記内因性 C f h ゲノム遺伝子座の開始コドンに近接する標的配列を標的とするヌクレアーゼ剤を導入するステップを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む前記遺伝子改変ラット細胞を生じる、方法。

(項目 6 9)

不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む遺伝子改変ラットゲノムを作製する方法であって、ラットゲノムを、前記内因性 C f h ゲノム遺伝子座の開始コドンに近接する標的配列を標的とするヌクレアーゼ剤と接触させるステップを含み、前記ヌクレアーゼ剤が前記標的配列を切断して、前記不活性化された内因性 C f h 遺伝子座を含む前記遺伝子改変ラットゲノムを生じる、方法。

(項目 7 0)

不活性化されたラット C f h 遺伝子を作製する方法であって、ラット C f h 遺伝子を、前記内因性 C f h ゲノム遺伝子座の開始コドンに近接する標的配列を標的とするヌクレアーゼ剤と接触させるステップを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的配列を切断して、前記不活性化されたラット C f h 遺伝子を生じる、方法。

10

20

30

40

50