

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7169979号

(P7169979)

(45)発行日 令和4年11月11日(2022.11.11)

(24)登録日 令和4年11月2日(2022.11.2)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

Z

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/15

Z

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

Z

請求項の数 28 (全57頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-546343(P2019-546343)

(86)(22)出願日 平成30年2月26日(2018.2.26)

(65)公表番号 特表2020-510827(P2020-510827
A)

(43)公表日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/019651

(87)国際公開番号 WO2018/157027

(87)国際公開日 平成30年8月30日(2018.8.30)

審査請求日 令和3年2月15日(2021.2.15)

(31)優先権主張番号 62/464,262

(32)優先日 平成29年2月27日(2017.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/529,916

(32)優先日 平成29年7月7日(2017.7.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 597160510

リジェネロン・ファーマシューティカル
ズ・インコーポレイテッドREGENERON PHARMACE
UTICALS, INC.

アメリカ合衆国10591-6707ニ

ューヨーク州タリータウン、オールド・

ソー・ミル・リバー・ロード777番

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(74)代理人 100152489

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 補体関連腎症および肝線維症の候補治療剤の治療有効性を評価する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

補体関連腎症の治療に使用するための薬剤のインビボでの治療有効性を評価する方法であって、前記方法が、

(a) ゲノムがC3遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類C3遺伝子座において、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列による置換を含むことで修飾C3遺伝子を形成している齧歯類に前記薬剤を投与することであって、

(i) 前記ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、前記ヒトC3遺伝子のエクソン2からエクソン41を含み、かつ前記修飾C3遺伝子の発現が、前記内因性齧歯類C3遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあるか、または

(ii) 前記ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、前記ヒトC3遺伝子のエクソン1からエクソン41を含み、

前記齧歯類はマウスまたはラットであり、かつ前記腎症の一つまたは複数の症状を示す、投与することと、

(b) 前記薬剤が投与されていない対照齧歯類と比較して、前記腎症の一つまたは複数の症状を阻害するかどうかを評価することと、を含む方法。

【請求項2】

前記齧歯類が、マウスC3タンパク質を発現する能力を有しないマウスである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

10

20

前記齧歯類が、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記薬剤が、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記薬剤が、抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記薬剤が、モノクローナル抗体またはその機能的結合断片である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記薬剤が、阻害性核酸である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記阻害性核酸が、s i R N A、s h R N A、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記腎症の一つまたは複数の症状が自然死を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、体重減少、骨密度の減少、体脂肪の減少、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、糸球体腎炎、好塩基球細管、硬化糸球体、蛋白円柱を有する拡張細管、メサングウム基質増加、糸球体肥大、および単核間質性炎症からなる群の一つまたは複数から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、腎臓における C 3 タンパク質沈着を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、腎臓における C 5 b - 9 膜侵襲複合体沈着を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、高血中尿素窒素 (B U N)、血清リパーゼ、血清シスタチン C、または血清非高密度リポタンパク質のうちの一つまたは複数を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、尿アルブミンまたは C 5 a の増加を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記腎症の一つまたは複数の症状が、腎症シグネチャー遺伝子の一つまたは複数の発現を決定することに基づいて評価される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

肝線維症の治療に使用するための薬剤のインビボでの治療有効性を評価する方法であって、前記方法が、

(a) C 3 遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類 C 3 遺伝子座において、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列による置換を含むことで修飾 C 3 遺伝子を形成している齧歯類に前記薬剤を投与することであって、

(i) 前記ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、前記ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 1 を含み、かつ前記修飾 C 3 遺伝子の発現が、前記内

10

20

30

40

50

因性齧歯類 C 3 遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあるか、または
 (i i) 前記ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、前記ヒト C
 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含み、
 前記齧歯類はマウスまたはラットであり、かつ肝線維症の一つまたは複数の症状を示す、
 投与することと、

(b) 前記薬剤が投与されていない対照齧歯類と比較して、前記肝線維症の一つまたは
 複数の症状を阻害するかどうかを評価することと、を含む方法。

【請求項 1 8】

前記齧歯類が、マウス C 3 タンパク質を発現する能力を有しないマウスである、請求項
 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記齧歯類が、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を
 発現するマウスである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記薬剤が、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される、請求
 項 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記薬剤が、抗体である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記薬剤が、モノクローナル抗体またはその機能的結合断片である、請求項 2 1 に記載
 の方法。

【請求項 2 3】

前記薬剤が、阻害性核酸である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記阻害性核酸が、s i R N A、s h R N A、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレ
 オチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される、
 請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記肝線維症の一つまたは複数の症状が、高アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L
 T)、高アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T)、または高アルカリホスフ
 ァターゼ (A L P) のうちの一つまたは複数である、請求項 1 7 ~ 2 4 のいずれか一項に
 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記肝線維症の一つまたは複数の症状が、肝線維症シグネチャー遺伝子の一つまたは複
 数の発現を決定することに基づいて評価される、請求項 1 7 ~ 2 4 のいずれか一項に記載
 の方法。

【請求項 2 7】

ゲノムが C 3 遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類 C 3 遺伝子座に
 おいて、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列による置換を含むこ
 とで修飾 C 3 遺伝子を形成している齧歯類における補体関連腎症の症状を阻害する薬剤を
 特定するための方法であって、(i) 前記ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを
 含む核酸配列は、前記ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 1 を含み、かつ前記修
 飾 C 3 遺伝子の発現が、前記内因性齧歯類 C 3 遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下
 にあるか、または (i i) 前記ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配
 列は、前記ヒト C 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含み、前記齧歯類はマウスま
 たはラットであり、かつ補体関連腎症の一つまたは複数の症状を示し、前記方法が、(a
) 前記齧歯類に前記薬剤を投与することと、(b) 前記薬剤が前記齧歯類における前記補
 体関連腎症の一つまたは複数の症状を阻害する場合、補体関連腎症の症状を阻害する薬剤
 として前記薬剤を特定することと、を含む方法。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

ゲノムがC3遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類C3遺伝子座において、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列による置換を含むことで修飾C3遺伝子を形成している齧歯類における肝線維症を阻害する薬剤を特定するための方法であって、(i)前記ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、前記ヒトC3遺伝子のエクソン2からエクソン41を含み、かつ前記修飾C3遺伝子の発現が、前記内因性齧歯類C3遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあるか、または(ii)前記ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、前記ヒトC3遺伝子のエクソン1からエクソン41を含み、前記齧歯類はマウスまたはラットであり、かつ肝線維症の一つまたは複数の症状を示し、前記方法が、(a)前記齧歯類に前記薬剤を投与することと、(b)前記薬剤が前記齧歯類中の前記肝線維症の一つまたは複数の症状を阻害する場合、肝線維症を阻害する薬剤として前記薬剤を特定することと、を含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年2月27日出願の米国仮特許出願第62/464,262号、2017年7月7日出願の米国仮特許出願第62/529,916号、および2017年11月9日出願の米国仮特許出願第62/583,780号の利益を主張するものであり、これらの仮特許出願の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

配列表の参照による組み込み

2018年2月12日に作製され、EFS-Webを介して米国特許商標庁に提出された35469__10207US01__SequenceListing.txtという名称の6KBのASCIIテキストファイルの配列表が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本明細書では、特に、補体関連腎症および肝臓の線維症を治療するための候補治療剤または化合物をスクリーニングするために、全体的または部分的にヒトであるC3遺伝子を含む遺伝子組み換え非ヒト動物を使用する方法、ならびに補体関連腎症と診断されたかまたはこれを有すると考えられる個体を治療する方法を提供する。

30

【背景技術】

【0004】

補体タンパク質C3は、様々なヒト疾患、障害、および状態の治療のための治療標的である。特定のC3コンバーターゼによるC3のタンパク質切断は、補体経路活性化に大きな役割を果たす。C3コンバーターゼはC3bの形態を生成し、これは次に新しいC3コンダクターゼ分子の可能性のある成分であり、それによって補体カスケードを刺激および増幅する。

【0005】

代替的な補体経路の不必要な活性化は、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)などの腎症ならびにデンスデポジット病(DDD)およびC3系球体腎炎(C3GN)を包含する膜性増殖性系球体腎炎の形態であるC3系球体症(C3G)の考えられる原因として提唱されてきた。進行すると、これらの疾患は腎機能を害し、劣化させる。系球体膜には、補体経路活性化を阻害する可能性のある内因性補体調節膜タンパク質がないため、補体関連腎症を持つ個体のこの部位でC3の連続的かつ未制御の切断が起こり、補体活性化産物の沈着、系球体基底膜のC3コンバーターゼ媒介損傷、上皮細管および内皮細胞の損傷、細胞外マトリックスの沈着による膜の肥厚、補体系の成分の沈着(例えば、C3切断産物)ならびに最終的には過不良(タンパク尿)および腎不全をもたらす。

40

【0006】

補体関連腎症の治療のためのヒトC3タンパク質を特異的に標的とする候補治療用分子

50

の薬物動態学（PK）および薬力学（PD）の評価は、非ヒト動物、例えば、齧歯類、例えば、マウスまたはラットでルーチンに遂行されている。しかしながら、ある特定の非ヒト動物では、これらの治療用分子は内因性C3タンパク質または遺伝子を標的としないため、かかる治療用分子のPDを適正に判定することができない。

【0007】

従って、非ヒト動物のC3遺伝子が全体的または部分的にヒト化した、あるいはヒトまたはヒト化C3タンパク質をコードする配列を含むヒトC3遺伝子で（例えば、内因性非ヒト遺伝子座において）置換された非ヒト動物、例えば齧歯類、例えばネズミ科の動物、例えばマウスまたはラットに対するニーズがある。かかる動物は、腎臓の病理学的レベルのC3沈着による代替補体経路の過剰な活性化に関連するものなど、補体関連腎症の治療のための候補治療剤の有効性を評価するための理想的なモデルとして役立つ可能性があり、特に操作された非ヒト動物は、ヒト疾患で観察される症状に対応するこれらの症状を示す。

10

【0008】

本明細書全体を通して、様々な特許、特許出願、およびその他の種類の刊行物（例えば、ジャーナル物品、電子データベース入力、など）が参照されている。

本明細書に引用されるすべての特許、特許出願、およびその他の出版物の開示は、全ての目的に対してその全体が参照により本明細書に援用される。

【発明の概要】

【0009】

20

本明細書では、特に、スクリーニングのために補体関連腎症および/または肝線維症を有するヒトで観察される症状に対応する一つまたは複数の症状を示す、または補体関連腎症および/または肝線維症の治療のための候補治療化合物または治療剤を特定する、全体または一部がヒトであるC3遺伝子を含む遺伝子組み換え非ヒト動物を使用する方法を提供する。また、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体における腎機能を改善する方法が本明細書に提供される。

【0010】

従って、一部の態様では、本明細書では、補体関連腎症の治療に使用するための薬剤のインピボでの治療有効性を評価する方法であって、（a）ゲノムがヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列とC3遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類C3遺伝子座での置換を含む齧歯類に薬剤を投与して、修飾C3遺伝子を形成することと、ここで修飾C3遺伝子の発現は、内因性齧歯類C3遺伝子座での齧歯類調節エレメントの制御下にある、形成することと；および（b）薬剤を投与されていない対照齧歯類と比較して、腎症の一つまたは複数の症状を阻害する（例えば、防止、改善、または軽減する）かどうかを評価することと、を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒトC3遺伝子のエクソン1からエクソン41を含む。一部の実施形態では、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒトC3遺伝子のエクソン2からエクソン41を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウスC3タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウスC5遺伝子によってコードされたマウスC5タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、薬剤は、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、薬剤は抗体である。一部の実施形態では、薬剤はモノクローナル抗体またはその機能的結合断片である。一部の実施形態では、薬剤は阻害性核酸である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、siRNA、shRNA、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状が自然死を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状には、体重減少、骨密度の減少、体脂肪の減少、またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、糸球体腎炎、好塩基球細管、硬化糸球体、

30

40

50

蛋白円柱を有する拡張細管、メサングウム基質増加、糸球体肥大、および単核間質炎症からなる群の一つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、腎臓におけるC3タンパク質沈着を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、腎臓におけるC5b-9膜侵襲複合体の形成を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、高血中尿素窒素(BUN)、血清リパーゼ、血清シスタチンC、または血清非高密度リポタンパク質のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、C3糸球体症の一つまたは複数の症状は、尿アルブミンまたは尿路C5aの増加を含む。一部の実施形態では、補体関連腎症の一つまたは複数の症状は、一つまたは複数の疾患シグネチャー遺伝子、すなわち補体関連腎症を伴わない野生型齧歯類と比較して、補体関連腎症を有する齧歯類において、相補的に発現する遺伝子の発現を決定することによって評価される。

10

【0011】

別の態様では、本明細書では、肝臓の線維症の治療に使用するための薬剤のインビボでの治療有効性を評価する方法であって、(a)ゲノムがヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列とC3遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類C3遺伝子座での置換を含む齧歯類に薬剤を投与して、修飾C3遺伝子を形成することと、ここで修飾C3遺伝子の発現は、内因性齧歯類C3遺伝子座での齧歯類調節エレメントの制御下にある、形成することと；および(b)薬剤を投与されていない対照齧歯類と比較して、肝線維症の一つまたはそれ以上の症状を阻害する(例えば、防止、改善、または軽減する)かどうかを評価することと、を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒトC3遺伝子のエクソン1からエクソン41を含む。一部の実施形態では、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒトC3遺伝子のエクソン2からエクソン41を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウスC3タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウスC5遺伝子によってコードされたマウスC5タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、薬剤は、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、薬剤は抗体である。一部の実施形態では、薬剤はモノクローナル抗体またはその機能的結合断片である。一部の実施形態では、薬剤は阻害性核酸である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、siRNA、shRNA、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状が、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、またはアルカリホスファターゼ(ALP)のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状は、一つまたは複数の疾患シグネチャー遺伝子、すなわち肝線維症のない野生型齧歯類と比較して肝線維症を有する齧歯類で差次的に発現される遺伝子の発現を決定することにより評価される。

20

30

【0012】

さらなる態様では、本明細書では、ゲノムがヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列を有するC3遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類C3遺伝子座での置換を含み、修飾C3遺伝子を形成する、齧歯類における補体関連腎症の症状を阻害する薬剤を特定するための方法であって、修飾C3遺伝子の発現が、内因性齧歯類C3遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあり、(a)齧歯類に薬剤を投与することと、(b)薬剤が齧歯類における補体関連腎症の一つまたは複数の症状を阻害する場合、補体関連腎症の症状を阻害する薬剤としての薬剤を特定することと、を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒトC3遺伝子のエクソン1からエクソン41を含む。一部の実施形態では、ヒトC3遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒトC3遺伝子のエクソン2からエクソン41を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウスC3タンパク質を発現する能力を有しな

40

50

いマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、薬剤は、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、薬剤は抗体である。一部の実施形態では、薬剤はモノクローナル抗体またはその機能的結合断片である。一部の実施形態では、薬剤は阻害性核酸である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、s i R N A、s h R N A、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状が自然死を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状には、体重減少、骨密度の減少、体脂肪の減少、またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、糸球体腎炎、好塩基球細管、硬化糸球体、蛋白円柱を有する拡張細管、メサンギウム基質増加、糸球体肥大、および単核間質炎症からなる群の一つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、腎臓における C 3 タンパク質沈着を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、腎臓における C 5 b - 9 膜侵襲複合体の形成を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、高血中尿素窒素 (B U N)、血清リパーゼ、血清シスタチン C、または血清非高密度リポタンパク質のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、C 3 糸球体症の一つまたは複数の症状は、尿アルブミンまたは尿路 C 5 a の増加を含む。一部の実施形態では、補体関連腎症の一つまたは複数の症状は、疾患シグネチャー遺伝子の一つまたは複数の発現を決定することによって評価される。

10

20

【 0 0 1 3 】

さらなる他の態様では、本明細書では、齧歯類のゲノムが内因性 C 3 遺伝子で修飾 C 3 遺伝子を含み、修飾 C 3 遺伝子は、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列を含み、修飾 C 3 の発現は、内因性齧歯類 C 3 遺伝子座での齧歯類調節エレメントの制御下にある、ヒト補体関連腎症の齧歯類モデルを提供する。一部の実施形態では、核酸配列は、齧歯類 C 3 遺伝子座で内因性齧歯類 C 3 プロモーターに動作可能に連結されている。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウス C 3 タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、自然死、体重の減少、骨密度の減少、体脂肪の減少、糸球体腎炎、好塩基球細管、硬化糸球体、蛋白円柱を有する拡張細管、メサンギウム基質増加、糸球体肥大、単核間質炎症、腎臓内 C 3 タンパク質沈着、腎臓内 C 5 b - 9 膜侵襲複合体の形成、高血中尿素窒素 (B U N)、高血清リパーゼ、高血清シスタチン C、高血清非高密度リポタンパク質、尿アルブミンの増加、尿 C 5 a の増加、および疾患遺伝子シグネチャーからなる群から選択されるヒト補体関連腎症の一つまたは複数の症状を示す。

30

【 0 0 1 4 】

別の態様では、本明細書では、(a) ゲノムがヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列を有する C 3 遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類 C 3 遺伝子座での置換を含み、修飾 C 3 遺伝子を形成する齧歯類であって、修飾 C 3 遺伝子の発現が、内因性齧歯類 C 3 遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあり、齧歯類が補体関連腎症の一つまたは複数の症状を示す、齧歯類と、(b) 一つまたは複数の候補治療剤とを含む、補体関連腎症の症状を阻害する候補治療剤の治療効果を評価するための齧歯類モデルを提供する。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 から

40

50

エクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウス C 3 タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、薬剤は、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、薬剤は抗体である。一部の実施形態では、薬剤はモノクローナル抗体またはその機能的結合断片である。一部の実施形態では、薬剤は阻害性核酸である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、s i R N A、s h R N A、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状が自然死を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状には、体重減少、骨密度の減少、体脂肪の減少、またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、糸球体腎炎、好塩基球細管、硬化糸球体、蛋白円柱を有する拡張細管、メサンギウム基質増加、糸球体肥大、および単核間質炎症からなる群の一つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、腎臓における C 3 タンパク質沈着を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、腎臓における C 5 b - 9 膜侵襲複合体の形成を含む。一部の実施形態では、腎症の一つまたは複数の症状は、高血中尿素窒素 (B U N)、血清リパーゼ、血清シスタチン C、または血清非高密度リポタンパク質のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、C 3 糸球体症の一つまたは複数の症状は、尿アルブミンまたは尿路 C 5 a の増加である。一部の実施形態では、補体関連腎症の一つまたは複数の症状は、疾患シグネチャー遺伝子の一つまたは複数の発現を決定することによって評価される。

10

20

【 0 0 1 5 】

さらなる態様では、本明細書では、ゲノムがヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列を有する C 3 遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類 C 3 遺伝子座での置換を含み、修飾 C 3 遺伝子を形成する、齧歯類における肝線維症を阻害する薬剤を特定するための方法であって、修飾 C 3 遺伝子の発現が、内因性齧歯類 C 3 遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあり、(a) 齧歯類に薬剤を投与することと、(b) 薬剤が齧歯類中の肝線維症の一つまたは複数の症状を阻害する場合、肝線維症を阻害する薬剤としての薬剤を特定することと、を含む方法を提供する。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、ヒト C 3 タンパク質をコードするヒト C 3 遺伝子は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 1 までを含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウス C 3 タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。本明細書に開示される実施形態のいずれかのうちの一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、薬剤は、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、薬剤は抗体である。一部の実施形態では、薬剤はモノクローナル抗体またはその機能的結合断片である。一部の実施形態では、薬剤は阻害性核酸である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、s i R N A、s h R N A、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状が、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T)、またはアルカリホスファターゼ (A L P) のうちの一つまたは複数である。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状は、疾患シグネチャー遺伝子の一つまたは複数の発現を決定することによって評価される。

30

40

【 0 0 1 6 】

別の態様では、本明細書では、齧歯類のゲノムが内因性 C 3 遺伝子で修飾 C 3 遺伝子を含み、修飾 C 3 遺伝子は、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列を含み、修飾 C 3 の発現は、内因性齧歯類 C 3 遺伝子座での齧歯類調節エレメントの制御下

50

にある、ヒト肝線維症の齧歯類モデルを提供する。一部の実施形態では、核酸配列は、齧歯類 C 3 遺伝子座で内因性マウス C 3 プロモーターに動作可能に連結されている。一部の実施形態では、核酸配列は、齧歯類 C 3 遺伝子座で内因性齧歯類 C 3 プロモーターに動作可能に連結されている。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウス C 3 タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、高アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、高アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、および高アルカリホスファターゼ (ALP) からなる群から選択される肝線維症の一つまたは複数の症状を示す。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状は、疾患シグネチャー遺伝子の一つまたは複数の発現を決定することによって評価される。

【0017】

さらなる態様では、本明細書では、(a) ゲノムがヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列を有する C 3 遺伝子のエクソンを含む齧歯類遺伝子配列の内因性齧歯類 C 3 遺伝子座での置換を含み、修飾 C 3 遺伝子を形成する齧歯類であって、修飾 C 3 遺伝子の発現が、内因性齧歯類 C 3 遺伝子座で齧歯類調節エレメントの制御下にあり、齧歯類が肝線維症の一つまたは複数の症状を示す、齧歯類と、(b) 一つまたは複数の候補治療剤とを含む、肝線維症の症状を阻害する候補治療剤の治療効果を評価するための齧歯類モデルを提供する。一部の実施形態では、当該齧歯類はマウスまたはラットである。一部の実施形態では、ヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、ヒト C 3 タンパク質をコードするヒト C 3 遺伝子の少なくとも一つのエクソンを含む核酸配列は、ヒト C 3 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 1 を含む。一部の実施形態では、齧歯類は、マウス C 3 タンパク質を発現する能力を有しないマウスである。一部の実施形態では、齧歯類は、内因性マウス C 5 遺伝子によってコードされたマウス C 5 タンパク質を発現するマウスである。一部の実施形態では、薬剤は、小分子化学物質、ペプチド、および抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、薬剤は抗体である。一部の実施形態では、薬剤はモノクローナル抗体またはその機能的結合断片である。一部の実施形態では、薬剤は阻害性核酸である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、siRNA、shRNA、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、およびリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状が、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、またはアルカリホスファターゼ (ALP) のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、肝線維症の一つまたは複数の症状は、疾患シグネチャー遺伝子の一つまたは複数の発現を決定することによって評価される。

【0018】

さらなる態様では、本明細書では、個体に対する臨床的に有効な量の治療剤の投与を含む、補体関連腎症、または肝線維症と診断されたか、またはこれを有すると考えられる個体を治療するための方法を提供する。個体への治療的投与は、例えば、C 5 の発現または活性を阻害する薬剤、C 3 の発現または活性を阻害する薬剤、および C 3 (C 3 a または C 3 b) のタンパク質切断産物の活性を阻害する薬剤を含む。投与は、腎機能または肝臓機能を改善し、補体関連腎症または肝線維症の一つまたは複数の症状を改善する。

【0019】

一部の実施形態では、本明細書では、補体関連腎症と診断されたか、またはこれを有すると考えられる個体において、臨床的に有効な量の治療剤の投与を含む、腎機能を改善するための方法であって、投与が治療剤を投与されてこなかった補体関連腎症と診断された

10

20

30

40

50

個体に対して腎機能を改善する方法が提供される。一部の実施形態では、改善された腎機能は、血中尿素窒素（BUN）濃度の減少、血清シスタチンC濃度の減少、および/または尿C5a濃度の減少のうちの一つまたは複数を含む。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与され、BUNは個体で約10～50%減少する。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与され、血清シスタチンC濃度は個体で約10～60%減少する。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与され、尿C5a濃度は個体で約40～85%減少する。

【0020】

他の実施形態では、本明細書では、補体関連腎症と診断されたか、またはこれを有すると考えられる個体において、臨床的に有効な量の治療剤の投与を含む、糸球体膜侵襲複合体（MAC）形成を減少させるための方法であって、投与が治療剤を投与されてこなかった補体関連腎症と診断された個体に対して糸球体MAC形成を減少させる方法が提供される。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与され、MAC形成は個体で約5～20%減少する。本明細書に開示される実施形態のいずれか一部の実施形態では、MAC形成は、個体の糸球体係蹄のC9沈着によって決定される。

10

【0021】

なお他の実施形態では、本明細書では、補体関連腎症と診断されたか、またはこれを有すると考えられる個体において、臨床的に有効な量の治療剤の投与を含む、腎糸球体または腎間質への免疫細胞浸潤を減少させるための方法であって、投与が治療剤を投与されてこなかった補体関連腎症と診断された個体に対して腎臓の免疫細胞浸潤を減少させる方法が提供される。一部の実施形態では、免疫細胞は、糸球体に浸潤する好中球である。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与されると、糸球体の好中球浸潤は約50～100%減少する。一部の実施形態では、免疫細胞は、間質を浸潤するマクロファージである。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与されると、間質のマクロファージ浸潤は約30～70%減少する。

20

【0022】

一部の実施形態では、本明細書では、補体関連腎症と診断されたか、またはこれを有すると考えられる個体の腎臓において、臨床的に有効な量の治療剤の投与を含む、糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加を減少させるための方法であって、この投与が、治療剤を投与されてこなかった補体関連腎症と診断された個体に対して個体の腎臓における糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加を減少させる方法が提供される。一部の実施形態では、C5の発現または活性を阻害する治療剤が投与され、糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加が約15～30%減少する。

30

【0023】

本明細書に開示される実施形態のいずれか一部の実施形態では、補体関連腎症は、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）またはC3糸球体症（C3G）である。一部の実施形態では、C3Gは、デンスデポジット病（DDD）またはC3糸球体腎炎（C3GN）を含む。

【0024】

本明細書に開示される実施形態のいずれか一部の実施形態では、治療剤（例えば、C5の発現もしくは活性を阻害する薬剤、C3の発現もしくは活性を阻害する薬剤、またはC3aもしくはC3bの活性を阻害する薬剤）は、抗体、阻害性核酸、抗体結合ポリペプチド、または小分子化学物質のうちの一つまたは複数である。一部の実施形態では、阻害性核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、マイクロRNA（miR）、またはリボザイムからなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤は、抗体またはその機能的断片である。一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化（camelised）抗体、キメラ抗体、CDR融合抗体、単鎖Fvs（scFv）、ジスルフィド結合型Fvs（sdFv）、Fab断片、およびF(ab')断片からなる群から選択される。一部の実施形態では、個体は、約50mg/kgの抗体（例えば、抗C5

40

50

抗体または抗 C 3 b 抗体) を投与される。一部の実施形態では、個体は週三回抗体を投与される。一部の実施形態では、個体は、抗体 (例えば、抗 C 5 抗体または抗 C 3 b 抗体) を約 9 週間投与される。

【 0 0 2 5 】

さらなる態様では、補体関連腎症または肝線維症の治療における使用のための治療法が本明細書に開示されている。治療剤は、例えば、C 5 の発現または活性を阻害する薬剤、C 3 の発現または活性を阻害する薬剤、および C 3 (C 3 a または C 3 b) のタンパク質切断産物の活性を阻害する薬剤を含む。一部の実施形態では、治療剤は抗 C 5 抗体である。一部の実施形態では、治療剤は抗 C 3 b 抗体である。一部の実施形態では、治療における治療剤の使用は、治療剤を使用しない治療と比較して、腎機能 (例えば、血中尿素窒素 (BUN) 濃度の減少、血清シスタチン C 濃度の減少、および / または尿中 C 5 a 濃度の減少、またはそれらの組み合わせ) を改善する。一部の実施形態では、治療における治療剤の使用は、治療剤を使用しない治療と比較して、糸球体 MAC 形成を減少させる。一部の実施形態では、治療における治療剤の使用は、治療剤を使用しない治療と比較して、腎臓内の免疫細胞浸潤を減少させる。一部の実施形態では、治療における治療剤の使用は、治療剤を使用しない治療と比較して、腎臓内の糸球体サイズおよび / またはメサンギウム基質増加を減少させる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

特許または出願の書類は、色付きで描かれた少なくとも一つの図面を含有する。色付きの図面 (複数含む) を伴う本特許または特許出願公開の写しは、要求により、および必要な料金を支払うことにより当局から提供される。

【図 1】図 1 A は、マウス (mC3) およびヒト化 (hC3) C3 ゲノム遺伝子座のノンスケールの例示を提供する。5' 調節エレメントおよびエクソン 1 からエクソン 4 1 までのコード領域にわたるマウス C3 遺伝子は削除され、ヒト C3 遺伝子の 5' 調節エレメントおよびエクソン 1 からエクソン 4 1 までのコード領域および loxP 部位によって置換され、それぞれ太線および矢印で示される。図 1 B は、マウス (mC3) およびヒト化 (hC3) C3 ゲノム遺伝子座のノンスケールの例示を提供する。イントロン 1 の一部およびエクソン 2 からエクソン 4 1 までのコード領域にわたるマウス C3 遺伝子は削除され、ヒト C3 遺伝子のイントロン 1 の一部およびエクソン 2 からエクソン 4 1 までのコード領域および loxP 部位によって置換され、それぞれ太線および矢印で示される。

【図 2】図 2 A および図 2 B は、マウス C3 (図 2 A) またはマウス C3 a (図 2 B) に対して実施された MAID 6 1 5 6 および MAID 6 1 4 9 ホモ接合性マウスに由来する、血清および血漿の ELISA 分析の結果を示すグラフである。丸は 6 1 4 9 または 6 1 5 6 野生型 (WT) 対照を表し、正方形は MAID 6 1 5 6 および MAID 6 1 4 9 ホモ接合性マウス (HO) を表し、ひし形は C3 ノックアウト (ヌル) 動物を表し、および三角形は、正常なヒト血漿 (NHP) または正常なヒト血清 (NHS) を表す。ND = 検出されず。

【図 3】図 3 A および図 3 B は、ヒト C3 (図 3 A) またはヒト C3 a (図 3 B) に対して実施された MAID 6 1 5 6 および MAID 6 1 4 9 ホモ接合性マウスに由来する、血清および血漿の ELISA 分析の結果を示すグラフである。丸は 6 1 4 9 または 6 1 5 6 野生型 (WT) 対照を表し、正方形は MAID 6 1 5 6 および MAID 6 1 4 9 ホモ接合性マウス (HO) を表し、ひし形は C3 ノックアウト動物を表し、および三角形は、正常なヒト血漿 (NHP) または正常なヒト血清 (NHS) を表す。ND = 検出されず。

【図 4】図 4 は、マウス血清アミロイド A タンパク質 (mSAA) に対して行われた MAID 6 1 5 6 および MAID 6 1 4 9 ホモ接合性マウスに由来する血清および血漿の ELISA 分析の結果を示すグラフである。丸は 6 1 4 9 または 6 1 5 6 野生型 (WT) 対照を表し、正方形は MAID 6 1 5 6 および MAID 6 1 4 9 ホモ接合性マウス (HO) を表し、ひし形は C3 ノックアウト動物由来の血漿を表す。

【図 5】図 5 は、MAID 6 1 4 9 (図 5 A) および MAID 6 1 5 6 ホモ接合性マウス

(図5B)由来の血清に対して実施されたウエスタンブロットを示す。本試験で使用される抗ヒトC3抗体は、マウスC3と交差反応性である。

【図6】図6は、MAID6149(左)およびMAID6156ホモ接合性マウス(右)のF2、F3、およびF4世代の生存曲線を経時的に示す。

【図7】図7は、MAID6149(左)およびMAID6156(右)ホモ接合性(HO)および野生型(WT)マウスの経時的な体重損失/獲得を表すグラフを示す。

【図8】図8Aおよび図8Bは、野生型(WT)、ならびにMAID6149(図8A)およびMAID6156(図8B)ホモ接合性(HO)マウスで実施された体脂肪分析の結果を表すグラフを示す。

【図9】図9Aおよび図9Bは、野生型(WT)、ならびにMAID6149(図9A)およびMAID6156(図9B)ホモ接合性(HO)マウスで実施された骨密度および骨塩量分析の結果を表すグラフを示す。

【図10】図10Aは、正常なマウスから得られた、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色された腎臓組織の断面を示す。図10Bは、MAID6156ホモ接合性(HO)マウスから得られたH&E染色腎臓組織を示す。

【図11】図11Aは、野生型(WT)およびホモ接合性ヒト化C3マウス(huC3)MAID6149マウスから得られた過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色腎臓組織の断面を示す。画像はその部分の平均的な病理を表す。矢印は硬化性糸球体の例を示す。図11Bは、野生型(C3wt)マウスと比較して、ヒト化C3マウス(huC3)マウスの腎臓におけるメサンギウム基質増加の数量化を表すグラフを示す。糸球体糸球体領域の増加は、糸球体肥大を示していた。糸球体内のPAS染色領域の増加は、メサンギウム基質増加を示していた。

【図12-1】図12は、野生型(WT)とMAID6149およびMAID6156ホモ接合性(HO)マウスとの間のナトリウム、カリウム、塩化物、カルシウム、グルコース、総タンパク質、クレアチニン、クレアチンキナーゼ、アルブミン、アミラーゼ、総ビリルビン、マグネシウム、無機リン酸、尿酸、リン、非エステル化脂肪酸、総コレステロール、トリグリセリド、高密度リポタンパク質(HDL)、および低密度リポタンパク質(LDL)レベルの血清化学パネル分析の結果を表すグラフを示す。

【図12-2】同上。

【図12-3】同上。

【図13】図13Aは、野生型(WT)とMAID6149とMAID6156ホモ接合性(HO)マウスとの間の血中尿素窒素、非高密度リポタンパク質(非HDL)、およびリパーゼレベルの血清化学パネル解析の結果を表すグラフを示す。図13Bは、野生型(WT)とMAID6149とMAID6156ホモ接合性(HO)マウスとの間のアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、ALT/AST比、およびアルカリホスファターゼ(ALP)レベルの肝臓酵素分析の結果を表すグラフを示す。

【図14】図14Aは、野生型(WT)およびヒト化C3(huC3)MAID6149マウスのアルブミンの尿パネル分析の結果を表すグラフを示す。図14Bは、野生型(WT)およびヒト化C3(huC3)マウスの血清BUNおよびシスタチンCの分析を示す。

【図15-1】図15Aは、ヒトC3タンパク質染色した、野生型(WT)およびホモ接合性(HO)ヒト化C3 MAID6149マウスから得られた腎臓組織の断面を表す免疫蛍光顕微鏡写真を示す。図15Bは、C5b-9膜侵襲複合体(赤)染色した、野生型(WT)およびヒト化C3(huC3)マウスから得られた腎臓組織の断面を表す免疫蛍光顕微鏡写真を示す。DNAはDAPIで青に染色されている。

【図15-2】図15Cは、野生型(WT)およびヒト化C3(huC3)MAID6149マウスから得られた尿C5aレベルを示す。

【図16】図16は、MAID6149およびMAID6156ホモ接合性(HO)マウスにおけるRNA発現の器官特異的大域変化を表す棒グラフを示す。

【図17】図17は、MAID6149およびMAID6156ホモ接合性(HO)マウ

10

20

30

40

50

スの肝臓対野生型 (WT) マウスの肝臓における RNA シグネチャーの重複を示す遺伝子シグネチャーマップおよび表を示す。

【図 18】図 18 は、MAID 6 1 4 9 および MAID 6 1 5 6 ホモ接合性マウスの肝臓における上位濃縮遺伝子発現経路を表す表を示す。

【図 19 - 1】図 19 は、MAID 6 1 5 6 ホモ接合性マウスの肝臓で上方制御 (黄色で強調表示) または下方制御 (青色で強調表示) された線維症遺伝子シグネチャーを表す表を示す。統計的有意性に達しなかった変化は、「-」で識別されている。

【図 19 - 2】同上。

【図 20】図 20 は、MAID 6 1 4 9 および MAID 6 1 5 6 ホモ接合性 (HO) マウスの腎臓対野生型 (WT) マウスの腎臓における RNA シグネチャーの重複を示す遺伝子シグネチャーマップおよび表を示す。

10

【図 21 - 1】図 21 A は、野生型 (WT) マウスと比較して、MAID 6 1 4 9 ヒト化 C3 (huC3) マウスにおける腎臓特異的遺伝子発現の変化を表す棒グラフを示す。

【図 21 - 2】図 21 B は、野生型 (WT) マウスと比較して、ヒト化 C3 (huC3) マウスにおける腎毒性遺伝子発現の変化を示す。図 21 C は、野生型 (WT) マウスと比較して、ヒト化 C3 (huC3) マウスにおける細胞外基質遺伝子発現の変化を示す。図 21 D は、野生型 (WT) マウスと比較して、ヒト化 C3 (huC3) マウスにおけるサイトカイン遺伝子発現の変化を示す。図 21 E は、野生型 (WT) マウスと比較して、ヒト化 C3 (huC3) マウスにおけるケモカイン遺伝子発現の変化を示す。図 21 B ~ 図 21 E は、黄色の強調表示の数値は、最新の発現を表し、青色の強調表示の数値は、下方制御された発現を表し、空白のままのセルは統計的有意性に達しなかった変化を表す。

20

【図 21 - 3】同上。

【図 21 - 4】同上。

【図 21 - 5】同上。

【図 22】図 22 は、アイソタイプ対照で処置された野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) の生存曲線を示す。

【図 23】図 23 は、アイソタイプ対照で処置された野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N (HumIn C3 + M1M17628N) で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウスの体重のグラフを示す。

30

【図 24】図 24 A および図 24 B は、アイソタイプ対照で処置された野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N (HumIn C3 + M1M17628N) で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウスの腎機能のマーカーのレベルを示す。図 24 A は、血中尿素窒素 (BUN) を、図 24 B は、血清シスタチン C 濃度を示す。

【図 25】図 25 は、アイソタイプ対照で処置された野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) の尿中 C5a レベル (左) および正常化 C5a レベル (右) を表すグラフを示す。

40

【図 26】図 26 は、アイソタイプ対照で処置された野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N (HumIn C3 + M1M17628N) で処置された C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウスの糸球体膜侵襲複合体 (MAC) 含有量 (C5b-9) の免疫蛍光染色を数量化したグラフを示す。

【図 27 - 1】図 27 A は、アイソタイプ対照で処置した野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置した C3 ヒト化 MAID 6 1 4 9 マウス (Hum

50

In C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) における糸球体 Gr-1⁺ 好中球浸潤を表すグラフ (上)、ならびにアイソタイプ対照で処置した野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) 由来の腎組織中の Gr-1⁺ 好中球の免疫組織化学染色 (下) を示す。

【図 27 - 2】図 27 B は、アイソタイプ対照で処置した野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) における間質 F4/80 + マクロファージ浸潤を表すグラフ (上)、ならびにアイソタイプ対照で処置した野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置した C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) 由来の腎組織中の F4/80 + マクロファージの免疫組織化学染色 (下) を示す。

【図 28】図 28 は、アイソタイプ対照で処置された野生型マウス (WT + Ctl Ab)、およびアイソタイプ対照で処置された C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + Ctl Ab) または抗 C5 抗体 M1M17628N で処置された C3 ヒト化 MAID6149 マウス (HumIn C3 + M1M17628N) の糸球体サイズ (左) およびメサンギウム基質増加 (右、PAS により評価) の数量化を表すグラフを示す。

【図 29 - 1】図 29 A、29 B、および 29 C は、抗 C5 治療が、ヒト化 C3 マウス (MAID6149) の疾患遺伝子シグネチャーの深部の救済をもたらしたことを示している。図 29 A は、ヒト化 C3 マウスにおいて、抗 C5 抗体治療が、疾患シグネチャー遺伝子を逆転したことを示す。図 29 B は、救済された疾患シグネチャーは、免疫、細胞外基質、サイトカイン、補体、および代謝関連遺伝子が含まれることを示す。図 29 C は、ヒト化 C3 マウスにおいて上方制御された免疫細胞型マーカーが、その後、抗 C5 抗体処置によって弱毒化されることが表されていることを示す。

【図 29 - 2】同上。

【図 29 - 3】同上。

【図 29 - 4】同上。

【図 30】図 30 は、C5 の連続的遮断が、ヒト化 C3 MAID6149 マウスの生存を延長することを示す。

【図 31 - 1】図 31 A ~ 31 C は、C3b の遮断がまた、ヒト化 C3 MAID6149 マウスにおける保護も提供していることを示す。図 31 A は、抗 C3b 遮断抗体がヒト化 C3 マウスの生存を改善することを示す。図 31 B ~ 31 C は、抗 C3b 遮断抗体がヒト化 C3 マウスにおける体重も改善したことを示す。

【図 31 - 2】同上。

【図 31 - 3】同上。

【発明を実施するための形態】

【0027】

補体系は自然免疫系の必須成分であり、侵入する病原体に対する防御メカニズムとして重要な役割を果たし、適応免疫応答を刺激し、免疫複合体とアポトーシス細胞の除去を助ける。補体系は、多くの保護免疫機能において重要な役割を果たしているが、補体活性化は、補体関連腎症を含む多様な自己免疫性および炎症性疾患プロセスにおける組織損傷の重要なメディエータである。

【0028】

本開示は、特に、血清中でヒトまたはヒト化 C3 タンパク質を発現する非ヒト動物を提供する。驚くべきことに、本発明者らは、ヒトまたはヒト化 C3 遺伝子に対してホモ接合性の齧歯類が高率で自然死する傾向があり、さらに腎臓における病理学的 C3 タンパク質

蓄積、例えば、C3系球体症などを特徴とする補体関連腎症によく似た生理学的、形態学的、および組織学的症状を示すことを発見した。従って、本明細書に記載の非ヒト動物は、ヒトで観察される補体関連腎症の症状を再現できる最初のモデル生物を表すと考えられ、これらの障害の治療のための候補化合物または薬剤の治療効果を評価するために使用できる。さらに、発明者らは、これらの齧歯類が肝線維症と一致する症状を呈することも発見した。従って、本開示は、ヒトまたはヒト化C3タンパク質をコードする核酸配列を含む非ヒト動物を使用して、補体関連腎症および/または肝線維症の治療に使用する薬剤のインビボでの治療有効性を評価する方法を提供する。

【0029】

I. 用語の定義

「補体関連腎症」または「補体関連ネフローゼ」という用語は、本明細書で使用する場合、これらに限定されないが、腎組織におけるC3および/またはC5b-9膜侵襲複合体、具体的にはネフロン、より具体的には糸球体などの望ましくない代替補体経路活性化および/または補体活性化産物の沈着に関連する疾患/障害を含む、腎臓の損傷、または疾患もしくは障害を指す。一部の実施形態では、補体関連腎症は、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)および/またはC3系球体症(C3G)、デンスデポジット病(DDD)およびC3系球体炎(C3GN)を包含する膜性増殖性糸球体腎炎の形態として知られる一つまたは複数の状態を含む。

【0030】

本明細書において使用される場合、「齧歯類」という用語は、分類学的に齧歯目の任意のメンバーを指す。齧歯類の例としては、限定されないが、マウス、ラット、リスル、プレーリードッグ、ヤマアラシ、ビーバー、モルモット、およびハムスターが挙げられる。一実施形態では、齧歯類はラットである。別の実施形態では、齧歯類はマウスである。

【0031】

「個体」または「対象」は、脊椎動物、哺乳動物、またはヒトであり得る。哺乳類としては、限定されないが、家畜(ウシなど)、スポーツ動物、ペット、霊長類、マウスおよびラットが挙げられる。個体はまた、これに限定されないが、イヌおよびネコを含むコンパニオンアニマルも含む。一態様では、個体はヒトである。

【0032】

「有効量」は、所望の治療的または予防的な結果を生成するために有効である、単回投与または一連の投与の一部として個体に投与される補体関連腎症の治療などの治療化合物の量を指す。

【0033】

「治療有効量」または「臨床的に有効な量」は、特定の障害の測定可能な改善を示すために必要な、少なくとも最低濃度である。本明細書の治療有効量は、患者の病状、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する治療剤の能力などの要因によって異なり得る。治療有効量はまた、治療の毒作用または有害効果が、治療の有益効果を上回る量である可能性がある。補体関連腎症の場合、治療有効量は、全体的な腎機能を増加または改善し、腎細胞死を防止し、または腎細胞、糸球体、もしくはそれに関連する成分に対する損傷を改善または防止し得る。

【0034】

II. 補体関連腎症

A. C3および補体系

免疫系の必須成分である補体は、三つのリンクされた生化学的カスケード、古典的経路、レクチン経路および代替経路に関与する、30を超える循環性タンパク質および細胞タンパク質からなる。補体は、免疫系を補助して、侵入した微生物を破壊し、組織のホメオスタシスを維持するために機能する。ヒトにおけるC3欠損症は、細菌感染症の感受性の増加と関連する。しかしながら、補体の過剰または未制御の活性化は、組織損傷に寄与し、異常な補体活性化によって特徴付けられる様々なヒトの疾患、障害、および状態に関連付けられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

C 3 遺伝子は、血清補体タンパク質 C 3 をコードし、これは古典的、レクチン、および代替補体活性化経路の活性化において中心的な役割を果たす。ヒト C 3 遺伝子は、染色体 1 9 上で 1 9 p 1 3 . 3 - p 1 3 . 2 に位置する。ヒト C 3 遺伝子は、4 1 個のエクソンを有し、2 2 個のアミノ酸シグナルペプチド、6 4 5 固のアミノ酸鎖および 9 9 2 個のアミノ酸鎖を含む、1 6 6 3 個のアミノ酸の前駆体ポリペプチドをコードする。補体活性化の間、鎖は切断され、それによって 7 7 個のアミノ酸 C 3 a タンパク質を含む 9 種類のペプチドを生成し、これは強力な炎症誘発性アナフィラトキシンである。

【 0 0 3 6 】

C 3 遺伝子は、例えば、チンパンジー、アカゲザルなどの霊長類、例えば、イヌ、ウシなどの他の哺乳類、例えば、マウスなどの齧歯類、ニワトリ、ゼブラフィッシュおよびカエルを含む、いくつかの種間で保存される。マウス C 3 遺伝子は、染色体 1 7 上で 1 7 2 9 . 7 2 c M 1 9 に位置する。マウス C 3 遺伝子は、4 1 個のエクソンを有し、2 4 個のアミノ酸シグナルペプチド、6 4 2 固のアミノ酸鎖および 9 9 3 個のアミノ酸鎖を含む、1 6 6 3 個のアミノ酸の前駆体ポリペプチドをコードする。ヒトと同様に、マウスの補体活性化は、鎖の切断をもたらし、それにより強力な炎症誘発性アナフィラトキシンである 7 8 個のアミノ酸 C 3 a を含む 9 種類のペプチドを生成する。C 3 ノックアウトマウスは、当該技術分野で公知の標準的な手順に従って生成された（参照、例えば、Drouin ら (2001) Cutting edge: the absence of 3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy J Immunology 167: 4141 - 4144）。

【 0 0 3 7 】

B . 腎特異的、C 3 媒介性、補体関連疾患

いくつかの補体関連腎症は、腎臓、特にネフロンの糸球体に異常に高いレベルの C 3 沈着を伴うことが知られている。

【 0 0 3 8 】

1 . 非典型 H U S

溶血性尿毒症症候群（または haemolytic - uraemic syndrome）は、H U S と短縮され、溶血性貧血（赤血球の破壊によって生じる貧血）、急性腎不全（尿症）、および低血小板数（血小板減少）によって特徴付けられる疾患である。それは主に子どもたちに影響するが、子どもたちに限らない。ほとんどの症例の前には、食中毒として、または大腸菌 O 1 5 7 : H 7、その他の非 O 1 5 7 : H 7 大腸菌血清型、赤痢菌、およびカンピロバクターによって引き起こされる汚染された給水から生じる感染性の、時には出血を伴う下痢が発症する。

【 0 0 3 9 】

患者の推定 3 3 ~ 4 0 % は、支持療法の使用にもかかわらず、死亡または a H U S の最初の臨床症状を伴う末期腎疾患（E S R D）になり、患者の 6 5 % は、血漿交換または血漿注入（P E / P I）療法にもかかわらず、診断後一年以内に死亡、透析を要する、または持続性腎臓損傷を有する。a H U S の現在の兆候と症状を生き延びた患者は、慢性的な血栓および炎症状態に耐え、突然の血液凝固、腎不全、および早死を含むその他の重篤な合併症の高リスクに生涯にわたってさらされる。

【 0 0 4 0 】

2 . D D D、C 3 糸球体腎炎、および C 3 糸球体症

デンスデポジット病（D D D）は、腎糸球体中の大量の C 3 の蓄積によって特徴付けられる希少な障害である。この状態は、透過電子顕微鏡を使用して、糸球体基底膜（G B M）中に過剰に蓄積された非常に高密度の沈着物にちなんで命名された。2 0 1 3 年には、コンセンサス会議の結果として、科学者らは新しい表題「C 3 糸球体症」の下で D D D をサブグループ化することを推奨している（C 3 G ; Pickering ら。Kidney

10

20

30

40

50

Int'l., 2013, 84:1079-89)。この新しい用語は、DDDを思わせる腎生検で糸球体疾患を示す患者の別のグループがあるという認識によってもたらされた。これらの個体では、C3沈着は、電子顕微鏡を使用して見ると、より薄い色であり、より広範囲にある。しかしながら、免疫蛍光評価では、DDD患者と同様に、腎糸球体に大量のC3が存在する。従って、これらの患者は、「C3糸球体腎炎」または「C3GN」と診断されている。それらの症候性類似性を認識すると、DDDおよびC3GNの両方が、C3Gのサブタイプとして分類される。

【0041】

III. ヒト化C3非ヒト動物の生成

本明細書に開示される方法で使用されるヒト化C3動物は、当該技術分野で公知の方法論を使用して生成することができる（一般に、“Gene Targeting: A Practical Approach”, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000)を参照のこと）。一実施形態では、マウスの生成は、マウスC3遺伝子の破壊、およびヒトまたはヒト化C3をコードする遺伝子のマウスゲノムへの導入を任意に含み得る。一実施形態では、ヒトまたはヒト化C3をコードする遺伝子の導入は、内因性マウスC3遺伝子と同じ位置にある。

【0042】

本明細書に開示される方法で使用される遺伝子組み換え非ヒト動物（ヒト化C3動物）は、導入遺伝子を動物の生殖細胞系統に導入することによって生成することができる。様々な発達段階における胚性標的細胞を使用して導入遺伝子を導入することができる。胚性標的細胞の発達段階に応じて、異なる方法が使用される。本方法で使用される任意の動物の特定の系統は、一般的に良好な健康状態、良好な胚収量、胚における良好な前核視認性、および良好な生殖適合性のために選択される。遺伝子組み換えマウスを作製する場合、C57BL/6またはC57BL/6×DBA/2 F1またはFVB系統などの系統がよく使用される（Charles River Labs社、Boston, Mass, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me., またはTaconic Labsから市販されている）。

【0043】

導入遺伝子の胚の導入は、例えば、マイクロ注射、エレクトロポレーション、またはリポフェクションなど、当該技術分野で公知の任意の手段によって達成することができる。例えば、導入遺伝子は、受精した哺乳動物の卵の前核に構築物をマイクロインジェクションすることにより哺乳動物に導入し、構築物の一つまたは複数のコピーを発達中の哺乳動物の細胞に保持させることができる。受精卵への導入遺伝子構築物の導入に続いて、卵をさまざまな時間インビトロでインキュベートするか、代理宿主に再移植するか、またはその両方を行うことができる。インビトロでの成熟までのインキュベーションは、本開示の範囲内である。ある一般的な方法は、種に応じて約1～7日間、インビトロで、胚をインキュベートしてから、代理宿主に再移植することである。

【0044】

再移植は、標準的な方法を使用して達成される。通常、代理宿主は麻酔され、胚は卵管に挿入される。特定の宿主に移植された胚の数は、種によって異なるが、通常、種が自然に生産する子孫の数に匹敵する。

【0045】

レトロウイルス感染は、導入遺伝子を非ヒト動物に導入するためにも使用され得る。発達中の非ヒト胚をインビトロで胚盤胞期まで培養することができる。この間、卵割球はレトロウイルス感染の標的となり得る（Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264）。卵割球の効率的な感染は、透明帯を除去する酵素処置によって得られる（Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986）。導入遺伝子の導入に使用されるウイルスベクターシステムは、通常、導入遺伝子を運ぶ複製欠損レトロウイルスである（Jah

10

20

30

40

50

nerら。(1985)。PNAS 82:6927~6931; Van der Puttenら。(1985) PNAS 82:6148-6152)。

【0046】

導入遺伝子導入のための第三のタイプの標的細胞は、胚性幹(ES)細胞である。導入遺伝子は、DNAトランスフェクションによって、またはレトロウイルス媒介性形質導入によって、ES細胞に効率的に導入することができる。そのような形質転換されたES細胞を、その後、非ヒト動物から胚盤胞と組み合わせることができる。ES細胞はその後、胚をコロニー形成し、得られたキメラ動物の生殖系列に貢献する。

【0047】

ヒト化C3を含む遺伝子組み換え動物は、他の動物と交配することができる。調製の方法は、一連の哺乳動物を生成することであり、それぞれが所望の構築物または導入遺伝子の一つを含む。このような哺乳動物は、一連の交配、戻し交配、および選択によって一緒に交配され、最終的には、すべての所望の構築物および/または導入遺伝子を含む単一の哺乳類を生成し、それ以外の場合、哺乳動物は、所望の構築物および/または導入遺伝子の存在を除いて、野生型に類遺伝子性(遺伝的に同一)である。一実施形態では、ヒトまたはヒト化C3遺伝子を含むマウスはこの方法で生成される。

10

【0048】

典型的には、交配および戻し交配は、育成経過の各特定の工程の目的に応じて、兄弟または親株を子孫に交配することによって達成される。特定の場合、適切な染色体位置に各ノックアウト構築物および/または導入遺伝子を含む、単一の子孫を生成するために、多数の子孫を生成することが必要であり得る。さらに、最終的に望ましい遺伝子型を得るために、数世代にわたって交配または戻し交配が必要になる場合がある。

20

【0049】

一態様では、ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現する例えば、マウスまたはラットなどの遺伝子組み換え齧歯類が提供され、ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現する齧歯類は、正常な補体系を含む。すなわち、ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現する齧歯類の血液、血漿または血清中の補体タンパク質のレベルは、機能的な内因性C3タンパク質を発現する齧歯類の血液、血漿または血清中の補体タンパク質のレベルに類似している。一実施形態では、齧歯類はマウスである。一実施形態では、齧歯類はラットである。

【0050】

一態様では、本明細書に記載されるような遺伝子組み換えを含む、多能性または全能性の非ヒト動物、例えば、齧歯類、例えば、マウスまたはラットなどの細胞が提供される。一実施形態では、細胞は齧歯類細胞である。一実施形態では、細胞はマウス細胞である。一実施形態では、細胞は齧歯類ES細胞である。一実施形態では、細胞はマウスES細胞である。

30

【0051】

一態様では、非ヒト動物、例えば、齧歯類、例えば、マウスまたはラットなどの卵子が提供され、非ヒト動物の卵子は異所性非ヒト動物染色体を含み、異所性非ヒト動物染色体は本明細書に記載されるような遺伝子組み換えを含む。一実施形態では、非ヒト動物は齧歯類である。一実施形態では、齧歯類はマウスである。一実施形態では、齧歯類はラットである。

40

【0052】

一態様では、ヒトC3遺伝子を含むように遺伝子組み換えされたマウスの胚、卵子、または細胞は、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BU6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、およびC57BL/Olaから選択されるC57BL系統のマウスのものである。別の実施形態では、マウスは129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例えば、129S1/SV、129S1/Sv1m)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S

50

8、129T1、129T2の系統からなる群から選択される129系統である(参照、例えば、Festingら。(1999) Revised nomenclature for strain 129 mice、Mammalian Genome 10:836、Aubalachら(2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Linesも参照のこと)。特定の実施形態では、遺伝子組み換えマウスは、前述の129系統と前述のC57BL/6系統との混合である。別の特定の実施形態では、マウスは前述の129系統の混合、または前述のBL/6系統の混合である。特定の実施形態では、上記混合の129系統は129S6(129/SvEvTac)系統である。別の実施形態では、マウスはBALB系統、例えばBALB/c系統、である。さらに別の実施形態では、マウスはBALB系統と別の前述の系統との混合である。一実施形態では、マウスはスイスマウスまたはスイスウェプスターマウスである。

10

【0053】

ヒト化C3齧歯類および同じ作製方法に関するさらなる情報は、米国特許出願公開第20150313194号に見出すことができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0054】

このように、本明細書では、ヒト化C3遺伝子からC3タンパク質を発現する遺伝子組み換え齧歯類、例えば、マウスまたはラットが提供され、齧歯類はその血清中にヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現する。一実施形態では、齧歯類はマウスである。一実施形態では、齧歯類はラットである。ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現する齧歯類の血清は、機能性内因性C3タンパク質を発現する齧歯類、例えば、野生型のマウスまたはラットとほぼ同じレベルのC3タンパク質を有することができる。一実施形態では、マウスは血清中にヒトまたはヒト化C3タンパク質(hC3)を、機能性内因性C3タンパク質を発現するが内因性マウスC3遺伝子座における内因性C3遺伝子のヒトC3遺伝子またはその断片による置換を含まない同齡のマウスの血清中に存在するC3タンパク質のレベルの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%または200%の濃度で発現する。

20

30

【0055】

一実施形態では、齧歯類は血清中にヒトC3タンパク質を、機能性内因性C3タンパク質を発現するが内因性マウスC3遺伝子座における内因性C3遺伝子のヒトC3遺伝子またはその断片による置換を含まない同齡のマウスの血清中に存在するマウスC3タンパク質のレベルの約1%~約5%、約3%~約7%、約5%~約15%、約10%~約20%、約10%~約200%、約20%~約150%、または約30%~約100%の濃度で発現する。

【0056】

一実施形態では、齧歯類は血清中にヒトまたはヒト化C3タンパク質を、約1 μ g/ml~約5 μ g/ml、約3 μ g/ml~約7 μ g/ml、約5 μ g/ml~約15 μ g/ml、約10 μ g/ml~約20 μ g/ml、約15 μ g/ml~約30 μ g/ml、約20 μ g/ml~約40 μ g/ml、約30 μ g/ml~約60 μ g/ml、約50 μ g/ml~約100 μ g/ml、約75 μ g/ml~約125 μ g/ml、約100 μ g/ml~約1500 μ g/ml、約100 μ g/ml~約1500 μ g/ml、約200 μ g/ml~約1250 μ g/ml、または約300 μ g/ml~約1000 μ g/mlの濃度で発現する。別の実施形態では、マウスは血清中にヒトまたはヒト化C3タンパク質を、少なくとも約1 μ g/ml、2 μ g/ml、3 μ g/ml、4 μ g/ml、5 μ g/ml、6 μ g/ml、7 μ g/ml、8 μ g/ml、9 μ g/ml、10 μ g/ml、1

40

50

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、これらの濃度の間に入る値と範囲を含めた濃度で発現する。

【0057】

IV．補体関連腎症を治療することができる薬剤の治療有効性をインビボで特定または評価するためのヒト化C3非ヒト動物の使用

10

A．補体関連腎症または肝線維症を改善する薬剤の特定

一部の態様では、1)候補薬剤を特定する方法(すなわち、化合物または治療剤分子)または2)補体関連腎症、例えば、これらに限定されないが、aHUS、DDD、C3系球体腎炎、および/またはC3系球体症などの治療における使用のための候補薬剤の治療有効性をインビボで評価する方法が本明細書に提供される。本方法は、本明細書に開示されるヒト化C3非ヒト動物(例えば、マウスまたはラット)のいずれかを利用する。一部の実施形態では、候補化合物は、補体関連腎症の症状を示す非ヒト動物に直接投与され、薬剤または化合物が補体関連腎症および/または肝線維症の一つまたは複数の症状を軽減できるかどうかを決定する。その他の実施形態では、候補化合物は、これら非ヒト動物から得られた血清と接触し、補体活性は、一般的に使用されるいかなるインビトロでの評価技術(CH50アッセイなどがあるがこれに限定されない)を用いて評価される。

20

【0058】

一部の実施形態では、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載されるヒト化C3非ヒト動物(例えば、齧歯類、例えばマウスまたはラット)の腎臓または肝臓における、補体活性化(例えば、代替経路補体活性化および/またはC3介在性補体経路活性化などがあるがこれらに限定されない)またはC3タンパク質の切断および/または沈着を、縮小、減少、または阻害することによって、補体活性化を調節することができる。化合物または薬剤は、本明細書に開示される非ヒト動物のいずれかにおける補体活性化またはC3タンパク質切断および/または沈着を、候補化合物または薬剤で処置しない対照非ヒト動物と比較して、約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%縮小することができる。

30

【0059】

別の実施形態では、候補化合物は、本明細書に記載されるヒト化C3非ヒト動物(例えば、齧歯類、例えばマウスまたはラット)のいずれかの腎臓または肝臓における、補体活性化(例えば、代替経路補体活性化またはC3介在性補体経路活性化などがあるがこれらに限定されない)またはC3タンパク質の切断および/または沈着を、最大1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、66時間、72時間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、または三週間(これらの値の間のいかなる期間も含む)縮小、減少、または阻害することができる。

40

【0060】

50

候補化合物は、さらに、本明細書に記載されるヒト化C3非ヒト動物（例えば、齧歯類、例えばマウスまたはラット）のいずれかの腎臓または肝臓における、補体活性化（例えば、代替経路補体活性化またはC3介在性補体経路活性化などがあるがこれらに限定されない）を、増加、増幅、または活性化することによって、他の実施形態において補体活性化を調節することができる。化合物は、本明細書に開示されるいずれかの齧歯類における補体活性化を、候補化合物または薬剤で処置しない対照非ヒト動物と比較して、約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%増加させることができる。

【0061】

別の実施形態では、候補化合物は、本明細書に記載されるヒト化C3非ヒト動物（例えば、齧歯類、例えばマウスまたはラット）のいずれかの腎臓または肝臓における、補体活性化（例えば、代替経路補体活性化またはC3介在性補体経路活性化などがあるがこれらに限定されない）を、最大1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、66時間、72時間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、または三週間（これらの値の間のいかなる期間も含む）増加、増幅、または活性化することができる。

【0062】

その他の実施形態では、候補薬剤または化合物は、候補薬剤または化合物を投与されていない対照非ヒト動物と比較して、非ヒト動物（例えば、齧歯類、例えばマウスまたはラット）における補体関連腎症または肝線維症の一つまたは複数の症状を改善または治療する。「改善する」または「治療する」という用語は、別段の指定がない限り、補体関連腎症（aHUS、DDD、C3系球体腎炎、および/またはC3系球体症などがあるがこれらに限定されない）または肝線維症に関連する一つまたは複数の症状を、除去する、発症を遅延する、または罹患率、頻度、もしくは重症度を低減することを意味する。

【0063】

一部の実施形態では、補体関連腎症（例えば、aHUS、DDD、C3系球体腎炎、および/またはC3系球体症などがあるがこれらに限定されない）の一つまたは複数の症状は、自然死である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載されるヒト化C3非ヒト動物（例えば、齧歯類、例えばマウスまたはラット）のいずれかにおける自然死の発生を、候補化合物または薬剤で処置しない対照非ヒト動物と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%改善することができる。

【 0 0 6 4 】

下記の実施例 2 に示すように、本明細書に記載のホモ接合性ヒト化 C 3 齧歯類は、ヒトまたはヒト化 C 3 タンパク質を発現しない野生型同腹子または齧歯類と比較して、体重の減少（すなわち、正常に体重を増やすことができない）、骨密度および／またはミネラル含有量の減少、および／または体脂肪の減少を示す。従って、一部の実施形態では、候補薬剤または化合物によって改善された補体関連腎症（例えば、a H U S、D D D、C 3 系球体腎炎、および／または C 3 系球体症などがあるがこれらに限定されない）の一つまたは複数の症状は、体重減少、骨密度減少、または体脂肪減少の一つまたは複数である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化 C 3 非ヒト動物（マウスまたはラットなど）のいずれかにおける、低体重、骨密度またはミネラル含有量の減少、および／または体脂肪の減少のうちの一つまたは複数を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 改善することができる。体重減少または増加、骨密度またはミネラル含有量、および体脂肪の決定は、ルーチンであり、当技術分野で周知の方法に従って達成できる。

10

20

【 0 0 6 5 】

さらに、以下の実施例 4 に記載されるように、本明細書に記載のホモ接合性ヒト化 C 3 齧歯類は、ヒトまたはヒト化 C 3 タンパク質を発現しない野生型同腹子または齧歯類と比較して、腎臓内、特にネフロン内（例えば、系球体）で高レベルの C 3 タンパク質沈着を示す。従って、一部の実施形態では、候補薬剤または化合物によって改善された補体関連腎症（例えば、a H U S、D D D、C 3 系球体腎炎、および／または C 3 系球体症などがあるがこれらに限定されない）の一つまたは複数の症状は、腎臓内の C 3 タンパク質沈着である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化 C 3 非ヒト動物（マウスまたはラットなど）のいずれかにおける腎臓 C 3 タンパク質沈着を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 改善することができる。腎臓 C 3 タンパク質沈着の決定は、免疫組織化学、免疫蛍光法、および電子顕微鏡（免疫電子顕微鏡を含む）を含むがこれに限定されない、当技術分野で公知の任意の数の手段によって解析することができる。

30

40

【 0 0 6 6 】

実施例 4 はまた、活性化された補体経路を示す、ヒトまたはヒト化 C 3 タンパク質を発現しない野生型同腹子または齧歯類に対するヒト化 C 3 齧歯類の腎系球体における増加した C 5 b - 9 膜侵襲複合体の沈着も示した。従って、一部の実施形態では、候補薬剤または化合物によって改善された補体関連腎症（例えば、a H U S、D D D、C 3 系球体腎炎

50

、および／またはC3系球体症などがあるがこれらに限定されない)の一つまたは複数の症状は、C5b-9膜侵襲複合体形成の増加である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化C3非ヒト動物(マウスまたはラットなど)のいずれかにおけるC5b-9膜侵襲複合体形成を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%改善することができる。C5b-9膜侵襲複合体形成は、免疫組織化学、免疫蛍光法(免疫蛍光標識抗C9抗体など)、および電子顕微鏡(免疫電子顕微鏡を含む)を含むがこれに限定されない、当技術分野で公知の任意の数の手段によって決定され得る。

【0067】

実施例3に示すように、本明細書に記載のホモ接合性ヒト化C3齧歯類は、ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現しない野生型同腹子または齧歯類と比較して、血中尿素窒素(BUN)、リパーゼ、シスタチン、および非高密度リポタンパク質の血清および／または血漿レベルの上昇を示す。従って、一部の実施形態では、候補薬剤または化合物によって改善された補体関連腎症(例えば、aHUS、DDD、C3系球体腎炎、および／またはC3系球体症などがあるがこれらに限定されない)の一つまたは複数の症状は、BUN、リパーゼ、シスタチン、および非高密度リポタンパク質の血清および／または血漿レベルの上昇である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化C3非ヒト動物(マウスまたはラットなど)のいずれかにおけるBUN、リパーゼ、シスタチン、および非高密度リポタンパク質の血清および／または血漿レベルの上昇を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%改善することができる。BUN、リパーゼ、シスタチン、および非高密度リポタンパク質の血清および／または血漿レベルを評価することは、当技術分野で周知の任意の数の方法を使用して達成できる。

【0068】

実施例3は、本明細書に記載されるホモ接合性ヒト化C3齧歯類が、ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現しない野生型同腹子または齧歯類と比較して、尿アルブミン濃度の上昇を示すことをさらに示す。実施例4は、本明細書に記載されるホモ接合性ヒト化C3齧歯類が、ヒトまたはヒト化C3タンパク質を発現しない野生型同腹子または齧歯類と比較して、尿中C5aレベルの上昇を示すことを示す。従って、一部の実施形態では、候補薬剤または化合物によって改善された補体関連腎症(例えば、aHUS、DDD、C3系球体腎炎、および／またはC3系球体症などがあるがこれらに限定されない)の一つまたは複数の症状は、尿アルブミンおよび／またはC5aの増加である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化C3非ヒト動物(マウスまたはラットなど)のい

10

20

30

40

50

いずれかにおける尿アルブミンおよび／またはC5aのレベルの上昇を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%改善することができる。尿アルブミンレベルの評価は、当技術分野で周知の任意の数の方法を使用して達成することができる。

10

【0069】

本明細書に記載されるホモ接合性ヒト化C3齧歯類は、肝損傷または線維症と一致する症状をさらに呈する。線維症は、修復または反応プロセスの器官または組織における過剰な繊維結合組織の形成である。生理学的に、線維症は結合組織を沈着する働きをし、結合組織は基礎となる器官または組織の構造および機能を消滅させる可能性がある。細胞外基質（ECM）タンパク質の病理学的蓄積によって定義される線維症は、患部組織の癒着化および肥厚をもたらし、本質的に正常臓器機能を妨害する誇張された創傷治癒反応である。肝臓の線維症は多くの場合、肝硬変と呼ばれ、アルコール肝疾患（ALD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、慢性C型肝炎、慢性B型肝炎、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、遺伝性ヘモクロマトーシス、ウィルソン病、1アンチトリプシン欠損症、ガラクトース血症、糖原病IV型、嚢胞性繊維症、または肝毒性の薬物または毒素への暴露など、他にも多数あるが、これら多くの症状を引き起こし得る。

20

【0070】

実施例3は、本明細書に記載されるホモ接合性ヒト化C3齧歯類が、肝臓酵素アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、またはアルカリホスファターゼ（ALP）のレベルの上昇を示すことをさらに示す。従って、一部の実施形態では、候補薬剤または化合物によって改善された肝線維症の一つまたは複数の症状は、ALT、AST、またはALPのレベルの上昇である。よって、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化C3非ヒト動物（マウスまたはラットなど）のいずれかにおけるALT、AST、および／またはALPのレベルの上昇を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%改善することができる。ALT、AST、またはALP肝酵素レベルの評価は、当技術分野で周知の任意の数の方法を使用して達成することができる。

30

40

【0071】

一部の実施形態では、補体関連腎症または肝線維症の一つまたは複数の症状は、疾患遺伝子シグネチャー、すなわち、疾患の遺伝子シグネチャー特性、すなわち、補体関連腎症または肝線維症によって反映される。疾患遺伝子シグネチャーは、疾患のない野生型対照対象と比較して、疾患を有する対象（例えば、齧歯類）では差次的に発現する遺伝子のセ

50

ットを含む。「差次的に発現する」とは、シグネチャー遺伝子の発現が、疾患を伴わない野生型対照のシグネチャー遺伝子の発現と比較して、少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上増加もしくは減少することを意味する。一部の実施形態では、補体関連肝線維症の遺伝子シグネチャーは、図17に列挙された遺伝子の一つもしくは複数、または図19の差次的に発現する遺伝子の一つもしくは複数を含む。一部の実施形態では、補体関連腎症の遺伝子シグネチャーは、図21Bに列挙された腎毒性遺伝子の一つもしくは複数、図21Cに列挙された細胞外基質(ECM)遺伝子の一つもしくは複数、図21Dに列挙されたサイトカイン遺伝子の一つもしくは複数、図21Eに列挙されたケモカイン遺伝子の一つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、補体関連腎症および肝線維症の遺伝子シグネチャーは、例えば、Timp1、Spp1、Col13a1、Mmp14、Tgfb1、Mmp2、Col1a1、およびTncからなる群から選択される一つまたは複数のECM遺伝子、Ccl22、Ccr1、Tnfsf8、Il1f6、Ccl5、Il1rn、Tlr1、Itgb2、Ccr2、C3ar1、およびFosからなる群から選択される一つまたは複数のサイトカイン遺伝子および受容体遺伝子、Btl1a、Cd86、Cd3e、Icos、H2-Ab1、Cd14、Cd28、H2-Eb1、Tyrobp、Tlr8、Cd200r1、Itgam、Cd2、Cd84、Klrk1、C1qc、H2-Oa、およびH2-Aaからなる群から選択される一つまたは複数の免疫シグナル伝達分子、Cd4、Cd3g、Lcp2、H2-Oa、H2-Aa、Cd247、Ptprc、およびLckからなる群から選択される一つまたは複数のT細胞関連遺伝子、C5ar1、Cfi、C3ar1、C6、C1qc、C7、C1qa、C1qb、Serpine1、F13a1、およびCfhからなる群から選択される一つまたは複数の補体および凝固遺伝子、Cyp7b1、Akr1c188、Agps、およびLplからなる群から選択される一つまたは複数の脂質代謝遺伝子などの図29Cに列挙された一つまたは複数の遺伝子を含む。一部の実施形態では、補体関連腎症および肝線維症の遺伝子シグネチャーは、例えば、Ms4a1、Cd79a、Cd79b、Cd19、Cd3d、Cd3e、Cd3g、Cd8a、Cd8b1、Cd4、Foxp3、Prf1、Gzma、Kird1、Kirk1、Ncr1、Ccl22、Clec9a、Cd207、Adam23、Marco、Msr1、C1qb、Ms4a7、Cxcr2、Csfr3、Robo4、Tek、Tie1、Cdh5、Kdr、Esam、Tagln、Acta2、Fap、およびTncからなる群から選択されるマーカーなどの図29Bに列挙される一つまたは複数の免疫細胞型マーカーを含む。

【0072】

一部の実施形態では、補体関連腎症または肝線維症の一つまたは複数の症状は、疾患シグネチャー遺伝子の一つまたは複数、例えば、複数または集団の発現を決定することによって評価される。候補化合物は、実施例7に示すように、疾患シグネチャー遺伝子の発現の上昇または低下を改善する、すなわち完全にまたは部分的に逆転させる能力において評価することができる。例えば、候補化合物または薬剤は、本明細書に記載のヒト化C3非ヒト動物(マウスまたはラットなど)のいずれかにおける疾患遺伝子シグネチャーのセットにおける一つまたは複数の遺伝子の発現レベルの上昇または低下を、候補化合物または薬剤で処置されない対照非ヒト動物と比較して、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%

10

20

30

40

50

%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%改善することができる。

【0073】

B．候補薬剤または化合物

候補治療剤または化合物は、限定されないが、小分子化学物質、抗体、タンパク質、阻害性核酸、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

【0074】

1．抗体

一部の態様では、候補薬剤または化合物は、補体タンパク質（C5、C3、またはそのタンパク質分解産物（例えば、C3aまたはC3b）など）および抗体に結合（例えば、優先的に結合）する。「抗体（antibody）」および「抗体（antibodies）」という用語は、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化（camelised）抗体、キメラ抗体、CDR融合抗体、単鎖Fvs（scFv）、ジスルフィド結合型Fvs（sdFv）、Fab断片、F(ab)断片、および前述のいずれかの抗原結合断片を指す。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の抗原結合活性断片、すなわち抗原結合部位を含有する分子を含む。こうした断片は、それに限定されないが、Fc領域またはその断片を含む別の免疫グロブリンドメインに融合されてもよく、または融合されなくてもよい。当業者であれば、scFv-Fc融合物、可変領域（例えばVLおよびVH）-Fc融合物、およびscFv-scFv-Fc融合物を含むがこれらに限定されない、その他の融合生成物が生成され得ることを理解するであろう。免疫グロブリン分子は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgYを含む任意のタイプ、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂を含む任意のクラス、または任意のサブクラスであり得る。一部の実施形態では、抗体はC5および/またはC3拮抗薬であり、補体活性化（例えば、腎臓または肝臓における代替的補体経路活性化など）を減少させ得る。その他の実施形態では、抗体はC5および/またはC3作動薬であり、補体活性化を増加させ得る。

【0075】

抗体の変異体は、抗体の活性に実質的に影響を与えることなく、当技術分野で知られている情報に基づいても作製され得る。例えば、抗体変異体は、異なる残基によって置換された抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基を有することができる。抗体の場合、置換変異誘発に最も関心のある部位には一般的に超可変領域が含まれるが、フレームワーク領域（FR）の変更も考えられる。

【0076】

抗体の場合、置換変異体の一つのタイプは、親抗体の一つまたは複数の超可変領域残基を置換することを含む（例えばヒト化またはヒト抗体）。一般的に、さらなる開発のために選択された結果として得られる変異体は、それらが生成される親抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。このような置換変異体を生成するための都合の良い方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を伴う。簡潔に述べると、いくつかの超可変領域部位（例えば6～7部位）を変異させて、各部位での可能性のあるすべてのアミノ酸置換を生成する。こうして生成された抗体は、各粒子内に包装されたM13の遺伝子産物への融合物として繊維状ファージ粒子から表示される。次に、ファージディスプレイされた変異体は、本明細書に開示されるように、それらの生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾のための候補超可変領域部位を識別するために、アラニンスキャニング変異誘発を実行して、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基を識別することができる。

【0077】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該技術分野で公知の様々な方法によって調製され得る。これらの方法には、天然源からの単離（天然発生アミノ酸配列変異体の場合）またはオリゴヌクレオチド媒介性（または部位特異的）変異誘発による調製、PCR変異誘発、および以前に調製された抗体の変異体または非変異体バージョンのカセット変異誘発が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

免疫グロブリンポリペプチドのFc領域に一つまたは複数のアミノ酸修飾を導入することによって、Fc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジシステインのアミノ酸位置を含む一つまたは複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば置換）を含む、ヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域）を含み得る。

【 0 0 7 9 】

修飾（改善または縮小）C1q結合および/または補体依存性細胞障害（CDC）を伴うFc領域変異体は、国際特許出願公開番号WO99/51642（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。かかる変異体は、Fc領域の一つまたは複数のアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を含み得る。Fc領域変異体に関しては、Duncan & Winter、Nature 322:738-40（1988）、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、および国際特許出願公開番号WO94/29351も参照のこと。それぞれの開示は本明細書に参照により組み込まれる。

10

【 0 0 8 0 】

2. 非抗体結合ポリペプチド

一部の態様では、候補化合物は、補体タンパク質（C5、C3、またはそのタンパク質分解産物（例えば、C3aまたはC3b）など）に結合（例えば、優先的に結合）し、非抗体結合ポリペプチドである。一部の実施形態では、非抗体結合ポリペプチドは、C5および/またはC3拮抗薬であり、補体活性化（例えば、腎臓または肝臓における代替的補体経路活性化など）を減少させ得る。その他の実施形態では、非抗体結合ポリペプチドは、C5および/またはC3作動薬であり、補体活性化を増加させ得る。

20

【 0 0 8 1 】

結合ポリペプチドは、公知のポリペプチド合成方法を用いて化学的に合成されてもよく、または組み換え型技術を用いて調製および精製されてもよい。結合ポリペプチドは、通常、少なくとも約5アミノ酸長、別の方法として、少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100アミノ酸長もしくはそれ以上であり、かかる結合ポリペプチドは、本明細書に記載する任意の補体タンパク質（例えばC5、C3、C3a、またはC3bなど）などの標的に結合することができる。

30

【 0 0 8 2 】

結合ポリペプチドは、公知の技術を使用して過度の実験なしに特定され得る。これに関して、ポリペプチド標的に結合することができるポリペプチドを結合するためのポリペプチドライブラリーのスクリーニング技術は、当技術分野で公知であることに留意されたい（例えば、米国特許第5,556,762号、第5,750,373号、第4,708,871号、第4,833,092号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,571,689号、第5,663,143号；PCT出願公開WO84/03506およびWO84/03564、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、81:3998-4002（1984）；Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、82:178-182（1985）；Geysenら、J. Immunol. Meth. 102:259-274（1987）；Clackson、T.ら、（1991）Nature、352:624；Kang、A. S.ら、（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、88:8363、およびSmith、G. P.（1991）Current Opin. Biotechnol. 2:6

40

50

68を参照のこと)。それぞれの開示は本明細書に組み込まれる。

【0083】

ペプチドライブラリーを生成し、これらライブラリーをスクリーニングする方法については、米国特許第5,723,286号、第5,432,018号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,498,530号、第5,770,434号、第5,734,018号、第5,698,426号、第5,763,192号、および第5,723,323号に開示されており、それぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0084】

結合ポリペプチドは、阻害性および/または治療効果(例えば、親和性の向上、半減期、安定性、およびクリアランス率などの薬物動態特性の改善、毒性の低下など)を高めるために修飾され得る。このような修飾には、グリコシル化、ペグ化、非天然であるが機能的に同等なアミノ酸による置換、連結基などが含まれるがこれらに限定されない。

10

【0085】

3. 小分子化学物質

一部の態様では、候補化合物は、補体タンパク質(C5、C3、またはそのタンパク質分解産物(例えば、C3aまたはC3b)など)に結合(例えば、優先的に結合)し、小分子である。一部の実施形態では、小分子はC5および/またはC3であり、補体活性化(例えば、腎臓または肝臓における代替的補体経路活性化など)を減少させ得る。その他の実施形態では、小分子はC5および/またはC3作動薬であり、補体活性化を増加させ得る。

20

【0086】

小分子は、本明細書に定義される結合ポリペプチドまたは抗体以外の有機分子であることが好ましい。有機小分子は、公知の方法を使用して特定および化学的に合成され得る(例えば、PCT出願公開WO 00/00823およびWO 00/39585を参照のこと)。有機小分子は、通常、サイズが約2000ダルトン未満であり、代替的に約1500、750、500、250または200ダルトン未満のサイズであり、本明細書に記載されるポリペプチドに結合することができる有機小分子は、公知の技術を使用して過度の実験なしに特定され得る。これに関して、ポリペプチド標的に結合することができる分子用の有機小分子ライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該技術分野で公知であることに留意されたい(例えば、PCT出願公開WO 00/00823およびWO 00/39585を参照のこと)。

30

【0087】

有機小分子は、例えば、アルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、スルホン酸アルキル、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物などであり得る。

40

【0088】

一部の態様では、小分子化学物質は、コンビナトリアル化学ライブラリーの成分である。コンビナトリアル化学ライブラリーは、より小さなサブユニットまたはモノマーからなる複数種の化学物質の集合である。コンビナトリアルライブラリーには、数百から数十万種類の化学物質の範囲の様々なサイズがある。また、炭水化物、オリゴヌクレオチド、および有機小分子などの化合物からなるオリゴマーおよびポリマーライブラリーを含む、様々なライブラリータイプもある。こうしたライブラリーは、化学物質の固定化およびクロマトグラフィー分離、ならびに標的分子(例えば、C5、C3、C3aまたはC3b)を

50

結合することができるリガンドを特定および特徴付けるための使用、または対象の生物学的活性（例えば、補体活性の阻害または活性化などがあるがこれらに限定されない）を媒介するための使用など、様々な用途を持つ。

【 0 0 8 9 】

固相サポート上で化合物のライブラリーを合成するための様々な技術が当技術分野で公知である。固相サポートは、通常、表面がサブユニットまたはモノマーと結合してライブラリーの化合物を形成するように機能化された表面を持つ高分子体である。一つのライブラリーの合成は一般に、多数の固相サポートを伴う。コンビナトリアルライブラリーを作るには、固相サポートを、注意深く制御された所定の化学反応の配列で、化合物の一つまたは複数のサブユニットおよび一つまたは複数の試薬と反応させる。言い換えれば、ライブラリーサブユニットは、固相サポート上で「成長」する。ライブラリーが大きいほど、必要とされる反応数が大きくなり、ライブラリーを構成する化合物の複数種の化学組成を追跡する作業を複雑にする。一部の実施形態では、小分子は、サイズが約 2 0 0 0 ダルトン未満であり、代替的に約 1 5 0 0、7 5 0、5 0 0、2 5 0 または 2 0 0 ダルトン未満のサイズである。

【 0 0 9 0 】

本明細書のいずれかの態様に記載された小分子剤は、固相サポート上で実施できる任意のタイプの化学反応から誘導され得る。こうした化学反応には、ブタジエンの捕捉を含む 2 + 2 環化付加、イソキサゾリン、フランおよび修飾ペプチドの合成を含む [2 + 3] 環化付加、ジオール、アルデヒドおよびケトンの固定化を含むアセタール形成、アルデヒドの誘導体化、プロパンジオールの合成を含むアルドール凝縮、アルデヒドの誘導体化を含むベンゾイン縮合、ベンゾジアゼピンおよびヒダントイン、チアゾリジン、ターンミメテイクス、ポルフィリン、フタロシアニンを含む環化縮合、ジエステルの環化を含むディークマン環化、アクリル酸の誘導体化を含むデス・アルダー (Des - Alder) 反応、アルコールのアルケンへの添加を含む求電子付加、アルデヒドの誘導体化を含むグリニヤール反応、二置換アルケンの合成を含むヘック反応、in situでのニトリル酸化物の合成を含むヘンリー反応 (2 + 3 環化付加を参照)、フェロモンおよびペプチドの合成を含む触媒水素化 (アルケンの水素化)、スルファニルケトン、ビスクロ [2 . 2 . 2] オクタンの合成を含むマイケル反応、アリールエーテル、ペプチジルホスホナート、およびチオエーテルの合成を含むミツノブ反応、キノロンの合成を含む核性芳香族置換、アルデヒドおよびケトンの合成を含む酸化、ペンティノールを用いたノルボルエナジンの環化を含む、Pausen - Khand 環化付加、ヘリセンの合成を含む光化学環化、アルデヒドおよび塩化アシルの誘導体化を含む有機金属化合物との反応、カルボニル、カルボン酸、エステルおよびニトロ基の減少を含む複雑な水素化合物および錫化合物を用いた減少、カルボキシル基の減少を含む Soai 反応、ビフェニル誘導体の合成を含む Still 反応、置換シクロヘキサノンの合成を含む Stork 反応、キノロンの合成を含む還元的アミノ化、フェニル酢酸誘導体の合成を含むスズキ反応、アルデヒド、フェロモンおよびスルファニルケトンの反応を含む、ウィット・ホーナー (Wittig - Horner) 反応が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 1 】

化学ライブラリーの合成およびそれらのライブラリーの個々の化合物の個々の固相サポートへの逆重畳積分を開示する参考文献は、米国特許出願番号第 2 0 0 9 / 0 0 3 2 5 9 2 号、Needelsら、(1 9 9 3)、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国 9 0 : 1 0 7 0 0 ~ 1 0 7 0 4、および PCT 出願公開 WO 9 7 / 1 5 3 9 0 に見出すことができ、その開示は本明細書に参照により組み込まれる。

【 0 0 9 2 】

4 . 阻害性核酸

本開示の一態様では、候補補体調節化合物は、補体系の成分 (mRNA など) を標的とする一つまたは複数のオリゴヌクレオチドである。阻害性核酸は、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小型の抑制性 RNA (siRNA)、またはリボザイムと

10

20

30

40

50

することができる。

【0093】

本開示のオリゴヌクレオチドは、補体系のタンパク質成分をコードするmRNAであってもよい。オリゴヌクレオチドは、それらの破壊を媒介することによって、またはタンパク質への翻訳を防止することによって、mRNAに結合し、それらの機能に干渉する。絶対的な相補性は好ましいが、必須ではない。本明細書で言及されるRNAの一部に「相補的」なオリゴヌクレオチド配列は、RNAとハイブリダイズして安定な二重鎖を形成できる十分な相補性を有する配列を意味する。ハイブリダイズする能力は、オリゴヌクレオチドの相補性および長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長ければ長いほど、それが含むRNAとの塩基ミスマッチが多くなり、それでも安定した二重鎖を形成する。当業者であれば、ハイブリダイズされた複合体の融点を決定する標準的手順を使用することによって、許容可能な程度の不一致を確認することができる。

10

【0094】

一般的に、補体系のタンパク質のmRNAとハイブリダイズするように製造された相補的オリゴヌクレオチドは、mRNAの5つの非翻訳領域、AUG開始コドンの補体、または3'非翻訳領域を含む、mRNAの任意の領域に対して標的化される。

【0095】

オリゴヌクレオチドは、限定されないが、ホスホロチオエート(Magら、Nucleic Acids Res. 19:1437-1441、1991; および米国特許第5,644,048号)、ペプチド核酸またはPNA(Egholm、Nature、368:566-568、1993; および米国特許第6,656,687号)、ホスホラミド(Beaucage、Methods Mol. Biol. 20:33-61、1993)、ジオチリン酸(Capaldiら、Nucleic Acids Res.、28:E40、2000)などのヌクレオシド間の結合を交互に有することができる。その他のオリゴヌクレオチド類似体には、限定されないが、モルホリノ(Summerston、Biochim. Biophys. Acta.、1489:141-158、1999)、ロックされたオリゴヌクレオチド(Wahlestedtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97:5633-5638、2000)、ペプチド核酸追加またはPNA(Nielsenら、1993、HyrupおよびNielsen、1996)または2'-O-(2'-メトキシル)エチル修飾5' および3' 末端オリゴヌクレオチド(Mckayら、J. Biol. Chem.、274:1715-1722、1999)が含まれる。これらの参考文献のすべては、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。核酸は、デオキシリボおよびリボヌクレオチドの任意の組み合わせ、およびウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサタニンヒポキサタニン(xanthanine hypoxanthine)、イソシトシン、イソグアニンなどを含む塩基の任意の組み合わせを含み得る。

20

30

【0096】

本開示による相補的オリゴヌクレオチドは、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、偽性ウラシル(pseudouracil)、ケオシン(queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオルウラシル、4-チオウラシル、

40

50

5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N² - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない群から選択される少なくとも一つの修飾塩基部分を含んでもよい。

【0097】

相補的オリゴヌクレオチドはまた、アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースを含むがこれに限定されない群から選択される少なくとも一つの修飾糖部分も含み得る。

【0098】

相補的オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド長でなければならず、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50ヌクレオチド長などの10～約50ヌクレオチド長の範囲であってもよい。

【0099】

V. 補体関連腎症の治療

さらに、本明細書には、一つまたは複数の補体関連神経障害（例えば、非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) またはC3系球体症 (デンスデポジット病 (DDD) またはC3系球体腎炎 (C3GN) などのC3Gなど) を治療するための方法が提供される。実施例6～7に示されるように、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤による補体関連腎症の一つまたは複数の症状を示すヒト化C3マウスの治療は、生存率および腎機能の改善、腎臓の組織学的徴候および補体関連神経障害に関連する系球体損傷の減少、および疾患シグネチャー遺伝子発現の完全または部分的な逆転をもたらし得る。さらに、実施例9に示すように、C3の活性の発現、またはそのタンパク質切断産物 (C3a またはC3b) の活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を伴う補体関連神経障害の一つまたは複数の症状を示すヒト化C3マウスの治療は、生存率の改善にもつながり得る。

【0100】

本明細書で使用される場合、「C5の発現または活性を阻害する治療剤」は、補体因子5 (C5) の生物学的機能または活性を阻害する能力を有する任意の薬剤を指す。これには、補体経路で通常行われるようにC5タンパク質が機能するのを防ぐ、C5遺伝子の発現を防ぐ、C5 pre-RNAの成熟mRNAへのプロセッシングを防ぐ、C5 mRNAのC5ポリペプチドへの翻訳を防ぐ、その正常な生理学的機能に必要なC5ポリペプチドの翻訳後修飾またはプロセッシングを防ぐ、および/またはC5タンパク質の活性をブロックまたは妨害する薬剤、物質、または化合物が含まれる。

【0101】

本明細書で使用される場合、「C3の発現または活性を阻害する治療剤」は、補体因子3 (C3) の生物学的機能または活性を阻害する能力を有する任意の薬剤を指す。これには、補体経路で通常行われるようにC3タンパク質が機能するのを防ぐ、C3遺伝子の発現を防ぐ、C3 pre-RNAの成熟mRNAへのプロセッシングを防ぐ、C3 mRNAのC3ポリペプチドへの翻訳を防ぐ、その正常な生理学的機能に必要なC3ポリペプチドの翻訳後修飾またはプロセッシングを防ぐ、および/またはC3タンパク質の活性をブロックまたは妨害する薬剤、物質、または化合物が含まれる。

【0102】

「C3aまたはC3bの活性を阻害する治療剤」は、C3aまたはC3bの生物学的機能または活性を阻害する能力を有する任意の薬剤を指す。

一部の実施形態では、治療剤は、本明細書で議論される、抗体、阻害性核酸 (アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、マイクロRNA (miR)、またはリボザイムなどがあるがこれらに限定されない)、もしくは非抗体結合ポリペプチドなどの阻害性核酸、非抗体結合ポリペプチド、または小分子化学物質のうちの一つまたは複数である。

【0103】

10

20

30

40

50

その他の実施形態では、治療剤は、抗体またはその機能的断片（例えば、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化（*camelised*）抗体、キメラ抗体、CDR融合抗体、単鎖Fv（*scFv*）、ジスルフィド結合Fv（*sdFv*）、Fab断片、またはF（*ab'*）断片）である。抗体は個体に、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、週に一回、または二週間に一回投与することができる。一部の例では、抗体の約40mg/kg～約60mg/kgを、補体関連腎症と診断された、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に（約40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg、50mg/kg、51mg/kg、52mg/kg、53mg/kg、54mg/kg、55mg/kg、56mg/kg、57mg/kg、58mg/kg、59mg/kg、60mg/kg、またはそれ以上のいずれかなど）投与することができる。抗体投与は、限定されないが、注射、動脈送達、ガス注入、摂取、または坐薬を介して、当該技術分野で公知の任意の手段を介して行うことができる。抗C5抗体療法は、8～56週間（約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、または56週間）、1～5年間または無期限に継続することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示される治療方法のいずれかにおける使用に適した抗C5抗体は、例えば、米国特許出願第15/621,689号に記載されるように、公知の方法を用いて作製することができる、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書に開示される治療方法のいずれかにおける使用に適した抗C3、抗C3a、または抗C3b抗体は、公知の方法を使用して作製することができる。

【0104】

補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体における腎機能を改善する方法が本明細書に提供される。方法は、上述の治療剤のいずれかなど、臨床的に有効な量の治療剤を投与することを含む。治療剤の投与は、治療剤を投与されていない補体関連腎症と診断された個体と比較して、腎機能改善をもたらす。一部の実施形態では、腎機能の改善は、血中尿素窒素（BUN）レベルの減少によって示されることがある。具体的には、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体のBUNレベルと比較して、約10%～50%のBUNレベルが減少した（約10%、11%、12%、13%、15%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、または50%のいずれかのBUNレベル減少など）。BUNの測定は、当技術分野ではルーチンであり、公知の手段によって実施され得る。

【0105】

他の実施形態では、腎機能の改善は、血清シスタチンC濃度の減少によって示され得る。例えば、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の血清シスタチンC濃度と比較して、約10%～60%の血清シスタチンC濃度が減少した（約10%、11%、12%、13%、15%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、または60%のいずれかの血清シスタチンC濃度の減少など）。血清シスタチンC

濃度の測定は、当技術分野ではルーチンであり、公知の手段によって実施され得る。

【0106】

さらなる実施形態では、腎機能の改善は、尿C5a濃度の減少によって示され得る。具体的には、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の尿C5a濃度と比較して、約40%～85%の尿C5a濃度が減少した（約40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、56%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、または85%のいずれかの尿C5a濃度の減少など）。尿C5a濃度の測定は、当技術分野ではルーチンであり、公知の手段によって実施され得る。

10

【0107】

また、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体における糸球体膜侵襲複合体(MAC)形成の減少方法も本明細書に提供される。方法は、上述の治療剤のいずれかなど、臨床的に有効な量の治療剤を投与することを含む。治療剤の投与は、治療剤を投与されていない補体関連腎症と診断された個体における糸球体MAC形成と比較して、糸球体MAC形成の減少をもたらす。例えば、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体のMAC形成と比較して、約5%～20%のMAC形成が減少した（約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、15%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%のいずれかのMAC形成の減少など）。MAC形成の測定は、当技術分野ではルーチンであり、任意の公知の手段（例えば、個体から腎臓組織における糸球体係蹄のMACのC9成分の免疫組織化学染色などがあるが、これに限定されない）によって実施され得る。

20

【0108】

さらに、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体の腎臓の糸球体または間質の中への免疫細胞浸潤を減少するための方法が提供されている。方法は、上述の治療剤のいずれかなど、臨床的に有効な量の治療剤を投与することを必要とする。治療の投与は、治療剤を投与されていない補体関連腎症と診断された個体の腎臓における免疫細胞浸潤と比較して、個体の腎臓における免疫細胞浸潤の減少につながる。一部の実施形態では、免疫細胞は、糸球体に浸潤する好中球である。免疫細胞はまた、間質を浸潤するマクロファージであってもよい。例えば、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の腎臓における糸球体好中球浸潤と比較して、約50%～100%の糸球体好中球浸潤が減少した（約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、56%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のいずれかの糸球体好中球浸潤の減少など）。別の例として、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の腎臓における間質マクロファージ浸潤と比較して、約30%～70%の間質マクロファージ浸潤が減少した（約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36

30

40

50

%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、56%、66%、67%、68%、69%、または70%のいずれかの間質マクロファージ浸潤の減少など)。免疫細胞浸潤の測定は、当該技術分野で一般的に知られており、任意の公知の手段(例えば、限定されないが、好中球の表面上のGr-1の免疫組織化学的染色またはマクロファージの表面上のF4/80の染色)によって実施されてもよい。

【0109】

さらに、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体の腎臓における、糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加を減少させる方法が本明細書に提供される。方法は、上述の治療剤のいずれかなど、臨床的に有効な量の治療剤を投与することを含む。治療剤の投与により、治療剤を投与されていない補体関連腎症と診断された個体の腎臓における糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加と比較して、糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加の減少につながる。具体的には、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加と比較して、約15%~30%の糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加が減少した(約15%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、または30%のいずれかの糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加の減少など)。糸球体サイズおよび/またはメサンギウム基質増加の測定は、当該技術分野ではルーチンであり、任意の公知の手段(個体に由来する腎臓組織の染色および顕微鏡的評価によるなど)によって実施され得る。

【0110】

また、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個人における平均余命を改善する方法が本明細書に提供される。方法は、上述の治療剤のいずれかなど、臨床的に有効な量の治療剤を投与することを含む。治療剤の投与は、治療剤を投与されていない補体関連腎症と診断された個体の平均余命と比較して、平均余命の増加をもたらす。具体的には、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の平均余命と比較して、約10%~70%の平均余命が増加した(約10%、11%、12%、13%、15%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、56%、66%、67%、68%、69%、または70%のいずれかの平均余命の増加など)。

【0111】

補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体における体重損失を減少する方法が本明細書にさらに提供される。方法は、上述の治療剤のいずれかなど、臨床的に有効な量の治療剤を投与することを含む。治療剤の投与は、治療剤を投与されていない補体関連腎症と診断された個体と比較して、体重損失の減少をもたらす。具体的には、補体関連腎症と診断されたか、または補体関連腎症を有すると考えられる個体に、C5の発現または活性を阻害する臨床的に有効な量の治療剤を投与することにより、C5の発現または活性を阻害する治療剤を投与しなかった補体関連腎症と診断された個体の体重損失と比較して、約10%~70%の体重損失が減少した(約10%、11%、12%、13%、15%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、

22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、56%、66%、67%、68%、69%、または70%のいずれかの体重損失の減少など)。

【0112】

本明細書に開示される方法は、例示のために提供される以下の実施例を参照することによってさらに理解することができ、これは限定することを意味するものではない。

【実施例】

【0113】

実施例1：ヒトC3遺伝子による内因性マウスC3遺伝子の置換

(I) MAID6149 HOおよびMAID6156 HOマウスの作製

MAID6149マウス-ヒトC3プロモーターおよびコーディングエクソン1~41を用いた置換：5'調節エレメントおよびヒトC3遺伝子のコーディングエクソン1~41のすべてを含むヒトC3遺伝子は、5'調節エレメントおよびコーディングエクソン1~41のすべてにわたるマウスC3遺伝子座を置換した(図1A)。

【0114】

予備的に、25kbのマウスC3遺伝子の標的化欠失は、ポリアデニル化部位へ900bp 3'を含むコーディングエクソン2~41を、フロックス化(floxed)されたネオカセットで置換することによって、マウスES細胞で生じた。結果として得られるマウスES細胞、12132ES細胞は、ヘテロ接合性C3ノックアウトである。12132細胞を使用して、当該技術分野で公知の手順に従ってC3ノックアウトマウスを生成した。

【0115】

コーディングエクソン1からコーディングエクソン41の上流の5'調節エレメントから延びるヒトC3配列に隣接するマウスC3上流および下流相同アーム、および3'非翻訳領域、およびフロックス化されたhygro選択カセットを含む標的化構築物が生成され、12132ES細胞に電気穿孔された。適正に標的化されたES細胞(MAID6148)を、薬剤選択カセットを除去するために一過性Cre発現ベクターを用いてさらに電気穿孔した。薬剤カセット(MAID6149)を有しない標的化されたES細胞クローンを、8細胞期のマウス胚に導入した。ヒト化C3遺伝子を有するドナーES細胞に完全に由来するF0マウスを、対立遺伝子アッセイの修飾を用いてマウス対立遺伝子の消失およびヒト対立遺伝子の獲得について遺伝子型を決定することによって同定した(Valenzuelaら(2003))。MAID6149マウスは、ヒトC3エクソン1の上流約9kb、約42.8kbのヒトC3遺伝子全体、およびポリAシグナルの下流のヒト配列約1.5kbを含む、約53.4kbのヒト配列を含有し、この53.4kbのヒト配列は、マウスC3エクソン1の上流の約6.5kbのマウス配列を含む約30.6kbのマウス配列、およびエクソン1の開始から終止コドンまでの約24.1kbのマウスC3遺伝子を置換した。

【0116】

フロックス化されたネオカセットがC3ノックアウト12132ES細胞内の欠失マウスC3遺伝子配列を置換したことを確認することは、以下のプライマープロベセット(5'から3'に記載される)を含むTaqMan(商標)qPCRアッセイによって確認された：12132TU、マウスC3イントロン1：フォワードプライマー、GGCCCTGATTACATGGACCTGTCTC(配列番号1)；リバープライマー、CCCAAGGCTTTGGCTGGGAATGT(配列番号2)；プローブ、FAM-TGTCCACTCTGGGAAGCCCAAGGC-BHQ(配列番号3)；12132TD、マウスC3エクソン41の3'：フォワードプライマー、GCCAGGAGAGGAAGCTGGAG(配列番号4)；リバープライマー、TGGCTCAGCA GTAAAGAA

10

20

30

40

50

C A C (配列番号 5) ; プローブ、F A M - A C A G A T T G C T G T G A G C T G C C A A A - B H Q (配列番号 6) ; ネオカセット：フォワードプライマー、G G T G A G A G G C T A T T C G G C (配列番号 7) ; リバースプライマー、G A A C A C G G C G G C A T C A G (配列番号 8) ; プローブ、F A M - T G G G C A C A A C A G A C A A T C G G C T G - B H Q (配列番号 9) 。

【 0 1 1 7 】

ヒト C 3 遺伝子配列が、ヒト化対立遺伝子内の欠失マウス C 3 遺伝子配列を置換したことを確認することは、以下のプライマープロブセット (5' から 3' に記載される) を含む T a q M a n (商標) q P C R アッセイによって確認された：m C 3 - 1、マウス C 3 プロモーター：フォワードプライマー、G C C A G C C T T A C C C T T T C A (配列番号 10) ; リバースプライマー、G C C A C C C A T C C C A G T T C T (配列番号 11) ; プローブ、F A M - C A G C C C A G G C C C T T T A G A T T G C A - B H Q (配列番号 12) ; m C 3 - 2、マウス C 3 3' 非翻訳領域、フォワードプライマー、T A C G G T G T T A G G T T C A C T A T T G G T (配列番号 13) ; リバースプライマー、G T C G C C A G C A G T C T C A T A C A G (配列番号 14) ; C A L O r a n g e - A G T G G G C A T C C C T T G C C A G G C - B H Q (配列番号 26) ; h y g r o カセット：フォワードプライマー、T G C G G C C G A T C T T A G C C (配列番号 15) ; リバースプライマー、T T G A C C G A T T C C T T G C G G (配列番号 16) ; プローブ、F A M - A C G A G C G G G T T C G G C C C A T T C - B H Q (配列番号 27) ; h C 3 - 1、ヒト C 3 プロモーター：フォワードプライマー、G G G C C T C C T A A G T T T G T T G A G T A T C (配列番号 17) ; リバースプライマー、C A G G G C T G G T T C C C T A G A A A T C (配列番号 18) ; プローブ、F A M - T A C A A T A G C A G G C A C A G C A C C C A - B H Q (配列番号 19) ; h C 3 - 2、ヒト C 3 イントロン 1：フォワードプライマー、G G C T G A G A G T G G G A G T C A T G (配列番号 20) ; リバースプライマー、G C A C T T G C C A A T G C C A T T A T C (配列番号 21) ; プローブ、F A M - C T G C T G T C C T G C C C A T G T G G T T G - B H Q (配列番号 22) ; h C 3 - 3、ヒト C 3 エクソン 4 1：フォワードプライマー、C G A A T G C C A A G A C G A A G A G A A C (配列番号 23) ; リバースプライマー、G G G C A C C C A A A G A C A A C C A T (配列番号 24) ; プローブ、C A L O r a n g e - C A G A A A C A A T G C C A G G A C C T C G G C - B H Q (配列番号 25) 。

【 0 1 1 8 】

標的化された E S 細胞に由来するマウスについて、尾部の生検から精製された D N A をアッセイして、それらの C 3 遺伝子型を決定し、ヒト化 C 3 対立遺伝子が生殖系列を通じて伝達されたことを確認するために、同一の L O N A アッセイを使用する。置換についてヘテロ接合性の二匹の子を交配して、ヒト C 3 遺伝子による内因性マウス C 3 遺伝子の置換についてホモ接合性であるマウスを生じさせる。表現型決定のために、置換についてホモ接合性である子を使用する。

【 0 1 1 9 】

米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 3 1 3 1 9 4 号に記載されるように、マウス C 3 遺伝子座の接合部の配列とヒト C 3 遺伝子を含む配列、ヒト C 3 遺伝子とフロックス化された h y g r o 選択カセットを含む配列の接合部、およびフロックス化された h y g r o 選択カセットとマウス C 3 遺伝子座の配列の接合部が決定され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 2 0 】

M A I D 6 1 5 6 マウス - ヒト C 3 コーディングエクソン 2 ~ 4 1 を用いた置換：ヒト C 3 遺伝子のコーディングエクソン 2 ~ 4 1 を含むヒト C 3 遺伝子は、コーディングエクソン 2 ~ 4 1 にわたるマウス C 3 遺伝子座を置換した。上述の方法は、マウス C 3 遺伝子配列をヒト C 3 遺伝子配列と置換するために基本的に使用された (図 1 B) 。

【 0 1 2 1 】

予備的に、25 kbのマウスC3遺伝子の標的化欠失は、ポリアデニル化部位へ900 bp 3'を含むコーディングエクソン2~41を、フロックス化(floxed)されたネオカセットで置換することによって、マウスES細胞で生じた。結果として得られるマウスES細胞、12132 ES細胞は、ヘテロ接合性C3ノックアウトである。

【0122】

コーディングエクソン2からコーディングエクソン41の上流から延びるヒトC3配列に隣接するマウスC3上流および下流相同アーム、および3'非翻訳領域、およびフロックス化されたhygro選択カセットを含む標的化構築物が生成され、12132 ES細胞に電気穿孔された。適正に標的化されたES細胞(MAID6155)を、薬剤選択カセットを除去するために一過性Cre発現ベクターを用いてさらに電気穿孔した。薬剤カセット(MAID6156)を有しない標的化されたES細胞クローンを、8細胞期のマウス胚に導入した。ヒト化C3遺伝子を有するドナーES細胞に完全に由来するF0マウスを、マウス対立遺伝子の消失およびヒト対立遺伝子の獲得について遺伝子型を決定することによって上記のように同定した。

【0123】

フロックス化されたネオカセットが、C3ノックアウト12132 ES細胞内の欠失マウスC3遺伝子配列を置換したこと、およびヒトC3遺伝子配列が、ヒト化対立遺伝子内の欠失マウスC3遺伝子を置換したことを確認することは、MAID6149マウスについて上述したとおり、同じプライマープローブセット(5'から3'に記載される)を含むTaqMan(商標)qPCRアッセイによって確認された。

【0124】

標的化されたES細胞に由来するマウスについて、尾部の生検から精製されたDNAをアッセイして、それらのC3遺伝子型を決定し、ヒト化C3対立遺伝子が生殖系列を通じて伝達されたことを確認するために、同一のLONAアッセイを使用する。置換についてヘテロ接合性の二匹の子を交配して、ヒトC3遺伝子による内因性マウスC3遺伝子の置換についてホモ接合性であるマウスを生じさせる。表現型決定のために、置換についてホモ接合性である子を使用する。

【0125】

マウスC3遺伝子座とヒトC3遺伝子を含有する配列との接合部、ヒトC3遺伝子を含む配列とフロックス化されたhygro選択カセットとの接合部、およびフロックス化されたhygro選択カセットの配列とマウスC3遺伝子座との接合部の配列が上述のように決定される。

【0126】

(II) C3血清濃度のアッセイ。

ELISAおよびウエスタンブロットを使用して、血清C3濃度をMAID6149マウスおよびMAID6156マウスに分析した。簡潔に述べると、ウエスタンブロット分析を以下のように行った：マウスまたは正常なヒト血清(NHS)をPBS中で希釈した。精製ヒトC3bタンパク質(Calbiochem)を陽性対照として使用した。マウスC3欠損血清を陰性対照として使用した。血清または精製されたhC3タンパク質を、メルカプトエタノールおよびSDSを含む電気泳動サンプルロード緩衝液に加え、還元/変性条件下でポリアクリルアミドゲル上で処理し、次いでニトロセルロース膜上に移した。ブロットをブロックし、ポリクローナルヤギ抗マウスC3一次抗体(Abnova)またはヒトC3(Guidel)に対するポリクローナルヤギ抗血清のいずれかでプローブし、その後、抗ヤギIgG HRP(Santa Cruz)を検出した。Thermo Scientific Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrateを使用してブロットを展開した。イメージングには、GE Image Quant LAS4000を使用した。血清C3濃度は、製造業者の指示に従って、補体C3ヒトELISAキットおよび補体C3マウスELISAキット(Abcam)で決定された。以下のように、ELISAによりタンパク質レベルをアッセイした：マウスおよびヒトC3は、それぞれ製造業者の指示に従って、補体C3マウ

10

20

30

40

50

ス E L I S A キット (A b c a m) および補体 C 3 ヒト E L I S A キット (A b c a m) で測定された。ヒト C 3 a を、B D O p t E I A (商標) ヒト C 3 a E L I S A キット (B D B i o s c i e n c e s) で測定した。マウス C 3 a は、B D B i o s c i e n c e s の以下の試薬で測定した。製造業者の指示に従って、精製ラット抗マウス C 3 a 抗体、ビオチンラット抗マウス C 3 a 抗体、および精製マウス C 3 a タンパク質 (未変性) 。

【 0 1 2 7 】

図 2 に示されるように、E L I S A アッセイにより、マウス C 3 (図 2 A) とマウス C 3 a (図 2 B) の両方が、野生型対照と比較して、6 週齢と 10 週齢の 6 1 5 6 ホモ接合性マウスと 6 1 4 9 ホモ接合性マウスに由来する血清と血漿から検出不能であったことが明らかになった。対照的に、図 3 は、ヒト C 3 (図 3 A) およびヒト C 3 a (図 3 B) が、正常なヒト血漿または血清中のこれらのタンパク質について観察されたものよりも低濃度であるが、6 1 5 6 のホモ接合性マウスおよび 6 1 4 9 ホモ接合性マウスからに由来する血漿および血清で検出されたことを示す。マウス血清アミロイド A タンパク質 (m S A A) の存在についてアッセイした対照実験では、C 3 ヒト化ホモ接合性マウスで発現する匹敵するレベルが、対応する野生型と比較して見つかった。M A I D 6 1 4 9 および M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性動物の両方から由来の血清で実施されたウエスタンブロットは、ヒト C 3 タンパク質を発現するが、マウス C 3 タンパク質は発現しないことを示した。これらの実験で使用される抗 h C 3 抗体は、マウス C 3 タンパク質と相互反応している (図 5 A および図 5 B) 。

【 0 1 2 8 】

まとめると、本実施例は、ヒト化 C 3 マウスの作成を示す。M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性マウスおよび M A I D 6 1 4 9 ホモ接合性マウスの両方が、ヒト C 3 タンパク質を発現し、マウス C 3 タンパク質を発現しない。

【 0 1 2 9 】

実施例 2 : C 3 ヒト化マウスの寿命と肉眼形態

(I) C 3 ヒト化マウス対野生型の平均死亡年齢および体重。

これらの実験については、死亡率および死亡年齢を動物施設の記録から取得した。さらに、M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性マウスおよび M A I D 6 1 4 9 ホモ接合性マウスの体重は、マウスのコホートでモニターされた。最後に、除脂肪組織体積、全身脂肪体積、および脂肪体積 % は、以下のように決定された : マウスをインビボ Q u a n t u m μ C T システム (P e r k i n E l m e r) を用いてスキャンした。X 線源は、電流 1 6 0 μ A、電圧 9 0 k V p に設定された。マウスをイソフルランで麻酔し、頭部を除いた全身を 6 0 m m \times 1 2 0 m m の視野でスキャンした。スキャンは 3 4 秒かかり、ボクセルサイズは 2 4 0 μ m であった。結像を解析ソフトウェア (M a y o C l i n i c) により解析した。骨、脂肪、および除脂肪組織を灰色の値で区分し、組織体積、脂肪体積画分、骨ミネラル密度 (B M D) および骨ミネラル含有量を計算した。

【 0 1 3 0 】

M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性マウスおよび M A I D 6 1 4 9 ホモ接合性マウスの両方が、特に F 2 世代において高い自然死の発生率を示した。ただし、生存率は後続世代で増加することが観察された (F 3 および F 4、図 6) 。

【 0 1 3 1 】

さらに、マウスの両方の系統は、同年齢の野生型マウスと比較して体重の減少を示した (図 7)。特に、M A I D 6 1 4 9 マウスは 20 週目頃に体重が減少し始めた。同様に、マウスの両方の系統は、野生型と比較して、除脂肪組織体積、全身脂肪体積、および体脂肪率の減少を示した (図 8 A および図 8 B)。図 9 に示されるように、M A I D 6 1 4 9 (図 9 A) および M A I D 6 1 5 6 (図 9 B) ホモ接合性マウスの両方は、野生型と比較して、骨密度の低下と骨ミネラル含有量の減少の両方を示した。

【 0 1 3 2 】

まとめると、この実施例は、ヒト化 C 3 マウスが、野生型と比較して、高い自然死発生

率、体重減少、体脂肪率、骨密度および骨ミネラル含有量の減少を示すことを実証する。

(I I) C 3 ヒト化マウス対野生型の肉眼形態

M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性 C 3 ヒト化マウスにおいて肉眼形態を評価したのち、有資格獣医師により自然死が判断された。死後検査により、ホモ接合性マウスは脆い骨（肋骨、頭蓋骨およびその他すべての骨）を呈し、野生型と比較して皮下脂肪の顕著な欠如が明らかになった。

【 0 1 3 3 】

実施例 3：C 3 ヒト化マウスにおける腎臓および肝臓の損傷の特徴付け

(I) 腎病理組織学

簡潔に述べると、ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）染色には、ヘマトキシリンでの染色、酸アルコールでの分化、それに続くエオシンでの染色が含まれる。腎臓切片の過ヨウ素酸シッフ（P A S）染色は、商業ベンダー（H i s t o s e r v I n c .）を使用して実施した。簡潔に述べると、5 ミクロンの薄い切片を、腎臓のすべての解剖学的領域を含むように、矢状面に沿ってホルマリン固定、パラフィン包埋されたマウス腎臓組織から作製した。切片を脱パラフィンし、P A S で染色して、組織中の糖タンパク質、糖脂質、およびムチンを検出した。P A S 染色切片におけるメサングウム基質増加の定量決定を以下のように行った。簡潔に述べると、P A S 染色された切片を、40 倍の対物レンズの A p e r i o A T 2 スライドスキャナーで撮像した。メサングウム細胞基質増加の測定については、切片あたり少なくとも 25 個の糸球体を P A S 陽性領域の測定に供した。I n d i c a L a b s A r e a Q u a n t i f i c a t i o n アルゴリズムの修飾を使用して、各糸球体係蹄に光学密度ベースの閾値が適用し、シッフ陽性基質（明るい紫）から核染色（暗い青色）および背景（薄いピンク）を分離した。基質および総係蹄の面積を測定し、係蹄面積の割合としてのメサングウム細胞基質とともに報告した。

【 0 1 3 4 】

通常の腎臓（図 10 A）と M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性マウス（図 10 B）の腎臓との間の組織学的比較により、単核間質炎症と関連付けられた、好塩基球細管、硬化糸球体、および蛋白円柱を有する拡張細管を含む糸球体腎炎の証拠が明らかになった。自発性腎症は、観察したマウスの 6 / 7 に存在した。これらのマウスのうち 3 匹は、糸球体腎炎が有意であり、マウスの若い年齢を考えると、この状態の早期発症と考えられた。さらに、ホモ接合性マウスは、脾臓およびパイエル板でリンパ球数の減少が観察され、免疫抑制の証拠を示した。さらに、図 11 A に示し、図 11 B に定量化するように、ヒト化 C 3 マウス由来の過ヨウ素酸 - シッフ（P A S）染色腎臓は、野生型マウスと比較してメサングウム基質増加を示した。図 11 B に示す定量に関して、増加した糸球体係蹄領域は糸球体肥大を示していた。糸球体内の P A S 染色領域の増加は、メサングウム基質増加を示していた。

【 0 1 3 5 】

(I I) 血清、肝臓、および尿の化学

ナトリウム、カリウム、塩化物、カルシウム、グルコース、B U N、リパーゼ、総タンパク質、クレアチニン、クレアチンキナーゼ、アルブミン、アミラーゼ、ビリルビン、マグネシウム、リン酸、尿酸、亜リン酸、遊離脂肪酸、コレステロール、トリグリセリド、H D L、非 H D L、および L D L の血清レベルが以下のように決定された。簡潔に述べると、製造業者の指示に従って、A D V I A C h e m i s t r y S y s t e m で血清を試験した。同様に、製造業者の指示に従って、A D V I A C h e m i s t r y S y s t e m で血清肝酵素を試験した。

【 0 1 3 6 】

尿アルブミン、尿クレアチニン（E x o c e l l I n c .）、B U N（B i o A s s a y S y s t e m s）および血清シスタチン C（B i o V e n d o r）をメーカーの指示に従って測定した。

【 0 1 3 7 】

野生型とヒト化 C 3 マウスの間で、ナトリウム、カリウム、塩化物、カルシウム、グルコース、総タンパク質、クレアチニン、クレアチンキナーゼ、アルブミン、アミラーゼ、

総ビリルビン、マグネシウム、無機リン酸、尿酸、リン、非エステル化脂肪酸、総コレステロール、トリグリセリド、HDL、およびLDLの血清化学パネル解析に差異は見出されなかった(図12)。しかしながら、野生型と比較して、ヒト化C3マウスから得られた血清では、血中尿素窒素(BUN)の上昇ならびにリパーゼおよび非HDLのレベルの上昇が観察された(図13A)。これらの結果は、腎機能障害を示しており、うっ血性心不全または最近の心筋梗塞などの心血管状態にも関連している。さらに、肝臓酵素パネルの結果は、肝臓損傷を示す、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、およびアルカリホスファターゼレベルの上昇を示した(図13B)。尿解析は、野生型と比較して、ヒト化C3マウスでアルブミンが上昇したことを示し、腎機能障害を示唆した(図14A)。さらなる経時的な血清分析によって、腎不全を示すヒト化C3マウスで、血清BUNおよびシスタチンCが増加したことが明らかになった(図14B)。

10

【0138】

結論として、ヒト化C3マウスの血清、肝臓酵素、および尿解析の結果は、腎機能障害および/または不全、ならびに線維症と一致する肝障害を示す。

実施例4：C3ヒト化マウスにおける腎臓内の異常な補体沈着

MAID6149ホモ接合性および野生型のマウスからの腎臓組織の断面を、以下のプロトコルに従い、C3沈着およびC5b-9膜侵襲複合体の存在について免疫蛍光性で評価した。簡潔に述べると、矢状切片は、凍結OCT組み込み腎臓から作製され、ラット-抗マウスC3モノクローナル抗体(Abcam)またはウサギポリクローナルC5b-9抗体(Abcam)のどちらかで染色された。Cy3ロバ抗ラット(Jackson ImmunoResearch)またはCy3ロバ抗ウサギ二次抗体(Jackson ImmunoResearch)を使用して、染色をそれぞれ可視化した。蛍光画像はそれぞれ、Leica DM5500またはDM6000顕微鏡を使用して撮影された。

20

【0139】

蛍光染色により、ヒト化C3マウスの腎臓におけるC3沈着の大きなポケットが見られた(図15A)。追加染色は、huC3マウスの腎系球体におけるC3b-9膜侵襲複合体沈着の増加を示し、これは活性化された補体経路を示す(図15B)。これらの所見によって示唆された代替的な補体経路の異常な調節、ならびに系球体C3断片の沈着、および前述のメサンギウム基質および電子密度沈着物の増加は、C3系球体症などの腎症と相關する。尿C5aレベルは、メーカーのプロトコルに従い、Mouse Complement Component C5a DuoSet(R&D systems)を使用してhuC3マウスで測定された。尿C5aレベルは、WTマウスと比較して、huC3マウスで高度に上昇する(図15C)。

30

【0140】

尿C5aレベルの上昇に加えて腎臓内のC5b-9染色の増加は、huC3マウスの腎臓における補体経路の局所活性化を示唆する。

実施例5：C3ヒト化マウスのRNA配列シグネチャー

MAID6149とMAID6156の両方のホモ接合性マウスを互いに比較するとともに、野生型と比較する発現RNA配列シグネチャーの決定を以下に行った。

40

【0141】

トランスクリプトームシーケンシングデータ生成およびマッピングの読み取り：総RNAを、MagMAXキット(Life tech, Carlsbad, CA)を用いてマウスの組織試料から抽出した。mRNAをDynabeads(登録商標)mRNA精製キット(Invitrogen, Waltham, MA)を使用して、4μgの総RNAから精製した。鎖特異的RNA-seqライブラリーは、ScriptSeq(商標)mRNA-Seqライブラリー調製キット(Epicentre)を使用して調製し、その後12回のPCR増幅サイクルを行った。シーケンシングを、33サイクルで多重化された単一読み取り実行により、Illumina HiSeq(登録商標)2000(Illumina)で実施した。Illumina HiSeq2000イメージファイル

50

(B C L ファイル) のシーケンス読み取りは、 I l l u m i n a C a s a v a 1 . 8 . 2 を介して F A S T Q 形式に変換した。読み取りはバーコードに基づいてデコードされ、個々のサンプルごとにマージされた。サンプルごとの全体的な読み取り品質を F a s t Q C で評価し、十分な品質を持つサンプルのみを保持した。続いて、市販のソフトウェア C L C B i o を使用して、一つのミスマッチを含むマウスゲノム (ビルド m m 1 0) に読み取りをマッピングした。

【 0 1 4 2 】

差次的に発現する遺伝子の統計解析：各遺伝子について、遺伝子のセンス鎖エクソンにマッピングされたリードを特定し、カウントした。検出可能な遺伝子は、遺伝子レベルで要約された総エクソンセンス鎖読み取りカウントに基づいてフラグが付けられる。10の経験的最小エクソン読み取りカウントを適用して、各サンプルの遺伝子の有無を判定した。サンプルの二つのグループ間の比較のために、遺伝子は、高発現グループのすべてのサンプルに存在するものとしてフラグが付けられていない場合、排除された。次に、比較に関連付けられた倍数変化および p 値は、D E S e q パッケージ [G e n o m e B i o l o g y 2 0 1 0、1 1 : R 1 0 6] を使用して計算された。有意に攪乱した遺伝子シグネチャーとして、両方向の倍率変化 (すなわち、比率) が 1 . 5 で、p 値が < 0 . 0 1 の遺伝子を選択した。

【 0 1 4 3 】

図 1 6 に示すように、RNA 発現の器官特異的解析では、野生型と比較して、ヒト化 C 3 マウスでは、肝臓で最も多くの、また数は少ないが腎臓でも遺伝子発現の変化があったことを示す。また分析は、M A I D 6 1 5 6 マウスで観察されたものと比較して、M A I D 6 1 4 9 マウスの方が、心臓での遺伝子発現の変化が多いことも示した。

【 0 1 4 4 】

M A I D 6 1 4 9 と M A I D 6 1 5 6 マウスとの間の肝臓遺伝子発現シグネチャーの比較は、二つのマウス系統の間で上方制御または下方制御される遺伝子数で顕著な重複を示した (図 1 7)。二つの系統の間で最も攪乱している遺伝子発現経路は、細胞外基質の産生、創傷に対する応答、および小分子の膜透過輸送に関連するものである (図 1 8)。特に、肝臓の線維症に関連する遺伝子発現パターンは、M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性マウスにおいて特に高いことが示された (図 1 9)。

【 0 1 4 5 】

腎臓に対して実施された類似の比較は、限定的な遺伝子シグネチャー重複を示したが、全体的に M A I D 6 1 4 9 および M A I D 6 1 5 6 マウスは、RNA 発現の攪乱傾向 / パターンの一貫性を共有した (図 2 0)。特に、腎臓損傷に関連する遺伝子は、ヒト化 C 3 系統の両方で濃縮された。

【 0 1 4 6 】

全体的に、RNA 発現の分析は、肝臓遺伝子が、M A I D 6 1 4 9 および M A I D 6 1 5 6 ホモ接合性マウス系統の両方で最も攪乱していることを示す。M A I D 6 1 5 6 系統に関しては、細胞サイクルおよび線維症、ならびに炎症に関連する遺伝子が、最も有意なシグネチャーを有していた。炎症およびステロイド代謝遺伝子シグネチャーを、M A I D 6 1 4 9 ホモ接合性マウスで濃縮した。特に、T n f s f 1 4 遺伝子は、ヒト化 C 3 マウスの両系統の肝臓で高度に上方制御された。この T n f s f 1 4 遺伝子は、T N F スーパーファミリーの分泌タンパク質である、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 1 4 (T N F S F 1 4) としても知られる L I G H T タンパク質をコードする。しかしながら、この遺伝子は、マウスゲノムの C 3 の 3 ' 近傍にあるため、その過剰発現はアーチファクトである可能性がある。血管新生および発達に関連するタンパク質をコードする遺伝子である P r o k 1 は、これはホモ接合性マウス系統間の上方下方制御された遺伝子であった。

【 0 1 4 7 】

進行腎症 (これらのマウスの B U N レベルは、W T マウスの 2 0 ~ 3 5 m g / d l と比較して、6 0 ~ 1 2 0 m g / d l である) を有する h u C 3 マウスの腎臓における遺伝子発現のさらなる特徴付けは、R N A S e q によって実施された。h u C 3 マウスは、いく

10

20

30

40

50

つかの上方制御または下方制御された遺伝子発現の変化を示した(図21A)。データのさらなる分析により、いくつかの腎毒性遺伝子(図21B)、ECM遺伝子(図21C)、サイトカイン(図21D)およびケモカイン(図21E)の上方制御された発現が明らかになった。

【0148】

全体的に、進行腎症を有するh u C 3マウスの腎臓の遺伝子発現データは、継続的な傷害および炎症を示す。

実施例6：補体関連腎症の治療における抗C5抗体の有効性

上述のように、C3にヒト化されたマウスは、自然死、正常から低い溶血活性、低循環C3(正常なマウスで見られる1000ug/mLに対して約40ug/mL)、ならびに腎臓炎症および腎臓内のC3沈着の存在を含む多臓器病理を有することが見いだされた。

【0149】

この実施例では、8週齢のC3ヒト化マウスを、50mg/kgの抗C5抗体M1M17628Nまたはアイソタイプ対照で、週三回、9週間、皮下処置した。上述のように、死亡率、血中尿素窒素、血清シスタチンC、尿アルブミンおよびC5aレベルが試験された。C3およびC5b-9は、上述のように病理組織学的染色によって試験された。

【0150】

抗C5抗体での治療により、ヒト化C3マウスにおける生存率が著しく改善され、抗C5抗体で処置したマウスは、アイソタイプ対照で処置したマウスの81%の死亡率と比較して、たったの20%の死亡率しか示さなかった(図22)。抗C5抗体での治療は、ヒト化C3マウスにおける体重を改善し(図23)、BUN(図24A)および血清シスタチンC(図24B)などの腎機能のマーカーを改善した。尿アルブミンには効果は見られなかった(データ非表示)が、抗C5抗体を用いた治療において、尿C5aレベルは減少した(図25)。

【0151】

病理組織学的染色は、抗C5抗体で処置したC3ヒト化マウスおよびアイソタイプ対照で処置した野生型マウスと比較して、アイソタイプ対照で処置したC3ヒト化マウスにおける糸球体膜侵襲複合体(MAC)含有量(C5b-9)の増加を示した(図26)。抗C5抗体を用いた処置は、ヒト化C3動物の腎臓への糸球体好中球(図27A)および間質マクロファージ浸潤(図27B)を有意に減少させた。さらに、抗C5抗体で処置したC3ヒト化マウスおよびアイソタイプ対照で処置した野生型マウスと比較して、アイソタイプ対照で処置したC3ヒト化マウスは、糸球体サイズの増加とメサンギウム基質増加を示した(図28)。

【0152】

結論として、結果は、抗C5療法が死亡率および腎機能を著しく改善でき、補体関連腎症の症状を呈する齧歯類の腎臓における損傷の組織学的兆候を減少させ得ることを示す。

実施例7：抗C5治療が、ヒト化C3マウス(MAID6149)の疾患遺伝子シグネチャーの深部の救済をもたらした。

【0153】

ヒト化C3マウス(MAID6149)を、マウス抗マウスC5抗体、またはアイソタイプ対照抗体(n=16)のいずれかで処置し、8週齢から開始した。野生型マウスをアイソタイプ対照(n=5)で処置した。抗体を50mg/kgで、週三回、皮下投与した。治療は17週齢まで続けた。試験終了時に生存したマウスの腎臓における次世代シーケンシング(NGS)によって遺伝子発現を調べた。

【0154】

図29Aに示されるように、ヒト化C3 MAID6149マウスにおいて、抗C5抗体治療が、疾患シグネチャー遺伝子を逆転した。救済された疾患シグネチャーには、免疫、細胞外基質、サイトカイン、補体、および代謝関連遺伝子が含まれる(図29B)。ヒト化C3マウスにおいて上方制御された免疫細胞型マーカーが、その後、抗C5抗体処置によって弱毒化されることが示された(図29C)。

【 0 1 5 5 】

実施例 8 : C 5 の連続的遮断は、ヒト化 C 3 マウスの生存を延長するために必要とされ得る (M A I D 6 1 4 9) 。

ヒト化 C 3 マウスを、マウス抗マウス C 5 抗体、またはアイソタイプ対照抗体 (n = 1 5) のいずれかで処置し、8 週齢から開始した。抗体を 5 0 m g / k g で、週三回、皮下投与した。治療は 2 4 週齢で停止した。

【 0 1 5 6 】

1 6 週間の治療期間中 (8 ~ 2 4 週齢) 、 1 5 匹のマウスのうち 2 匹のみが抗 C 5 抗体で死亡した。同時期に、アイソタイプ対照群の 1 6 匹中 1 3 匹が死亡した (図 3 0) 。治療中止後四週間以内に、抗 C 5 抗体治療中の数匹のマウスが死亡した (残り 1 3 匹中 1 2 匹) 。このデータは、C 5 の連続的遮断は、ヒト化 C 3 M A I D 6 1 4 9 マウスの生存を延長するために必要とされ得ることを示唆する。

10

【 0 1 5 7 】

実施例 9 : C 3 b の遮断はまた、ヒト化 C 3 マウスにおける保護も提供している。

ヒト化 C 3 マウス (M A I D 6 1 4 9) を、抗 C 3 b 結合 / 遮断抗体 (n = 1 4) またはアイソタイプ対照抗体 (n = 1 4) のいずれかで処置し、8 週齢から開始した。抗体を 5 0 m g / k g で、週三回、皮下投与した。治療は、1 8 週齢まで続く (合計 1 0 週間の治療期間) 。

【 0 1 5 8 】

1 0 週間の試験期間中、アイソタイプ対照を用いて 1 4 匹中 1 1 匹のマウスが死亡した (図 3 1 A) 。同時期に抗 3 b 抗体を用いて 1 4 匹中 1 匹のみが死亡したことから、C 3 b 遮断がヒト化 C 3 M A I D 6 1 4 9 マウスにおいて有意な生存率を提供したことを示唆する。抗 C 3 b 遮断抗体は、ヒト化 C 3 マウスの体重も改善し、健康状態の改善を示唆した (図 3 1 B および図 3 1 C) 。全体的に、これらのデータは、C 5 の上流の C 3 b の阻害を示し、ヒト化 C 3 マウスにおける保護も提供する。

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

図 1A

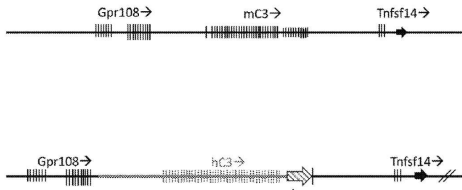
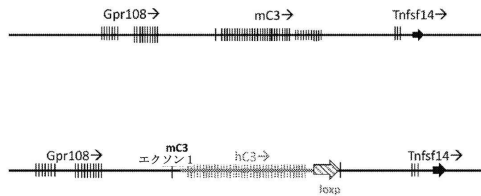


図 1B



【図 2】

図 2A

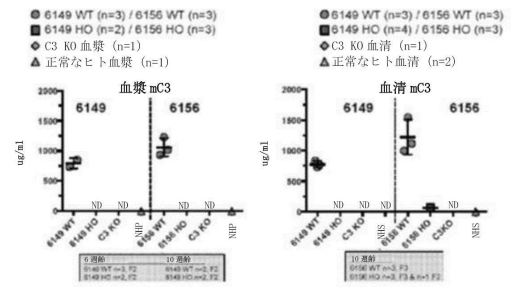
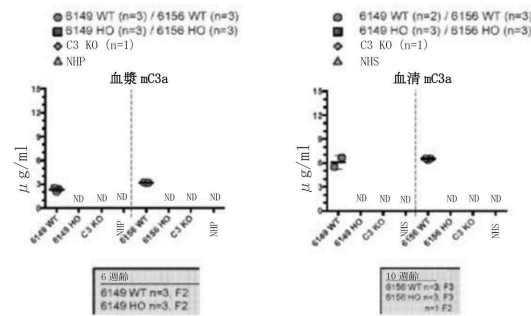


図 2B



【図 3】

図 3A

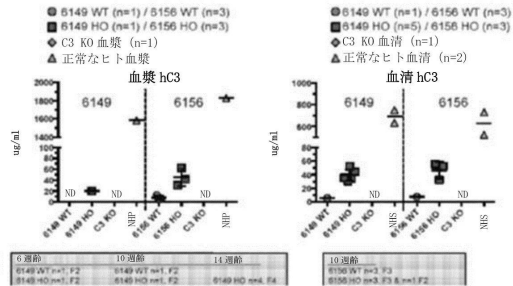
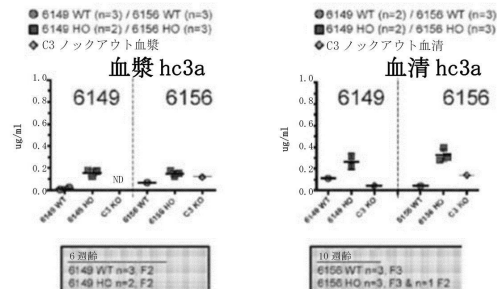
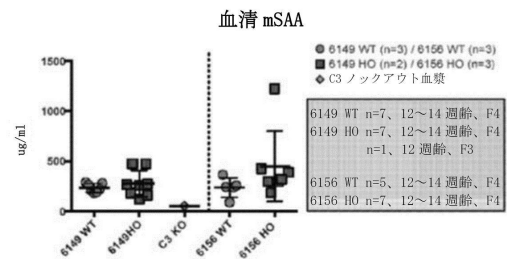


図 3B



【図 4】

図 4



10

20

30

40

50

【 図 5 】

図 5A

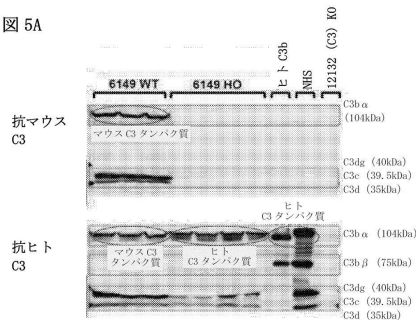
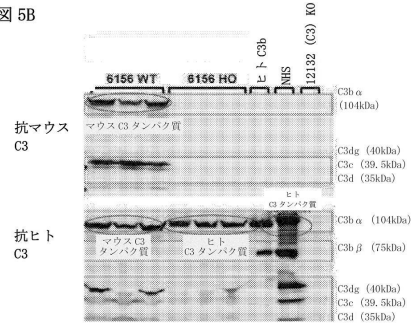
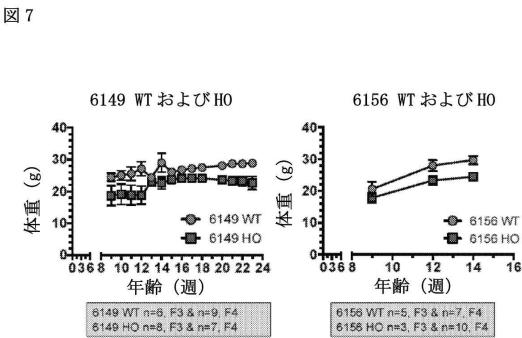


図 5B



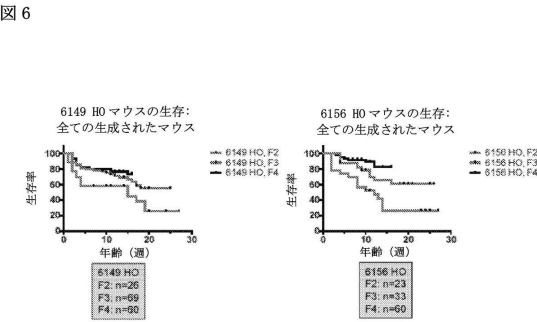
【 図 7 】

図 7



【 図 6 】

図 6

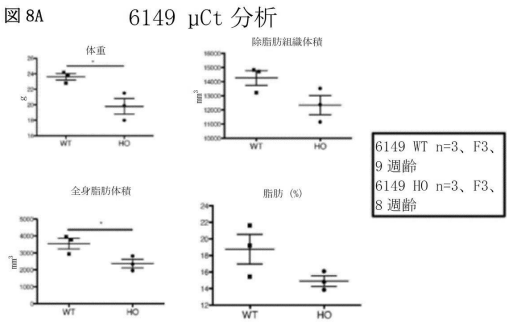


10

20

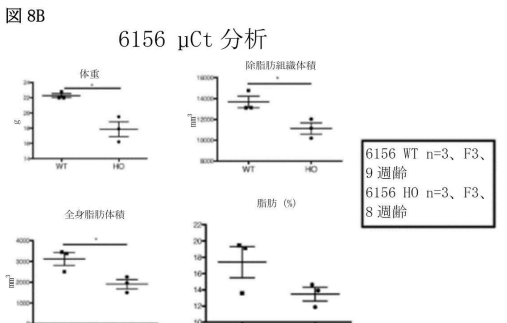
【 図 8 】

図 8A



30

図 8B



40

50

【図 9】

図 9A

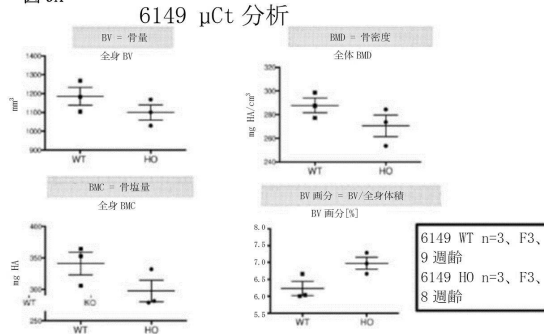
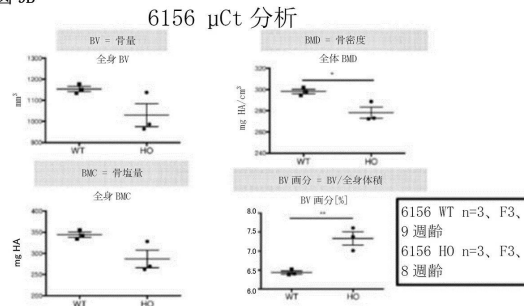


図 9B



【図 10】

図 10A

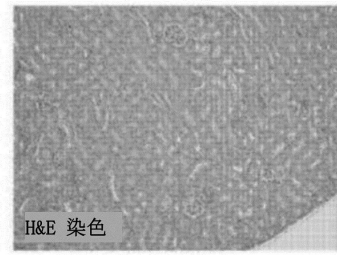
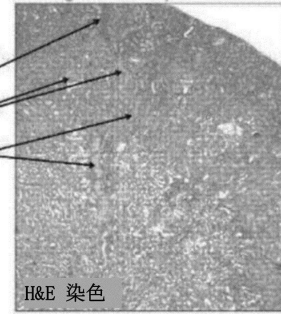


図 10B

中程度の糸球体腎炎
好塩基球細管
硬化性糸球体
蛋白円柱を有する拡張細管
(単核間質性炎症に関連する)



【図 11】

図 11A

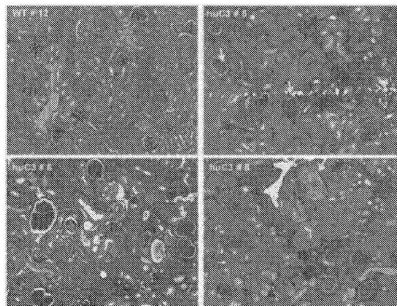
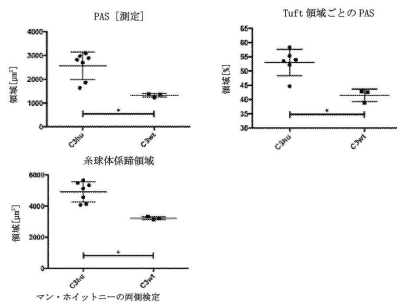
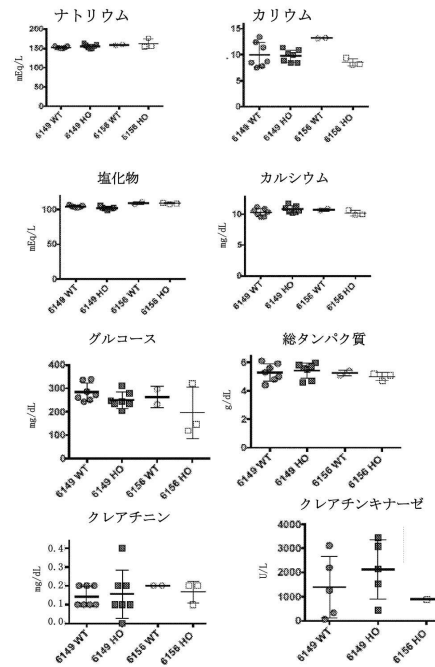


図 11B



【図 12 - 1】

図 12



10

20

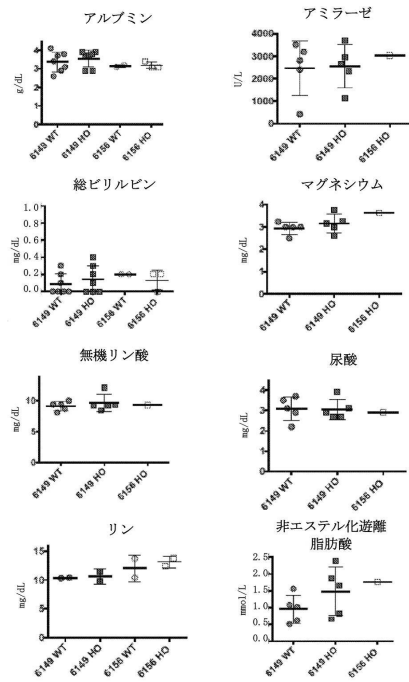
30

40

50

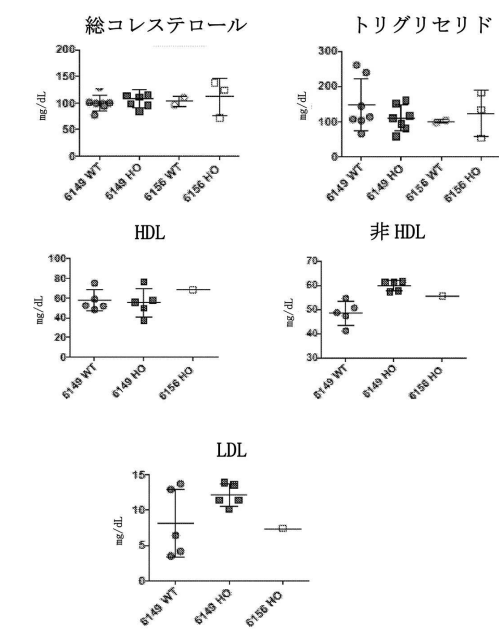
【図 12 - 2】

図 12 (続き)



【図 12 - 3】

図 12 (続き)



10

20

【図 13】

図 13A

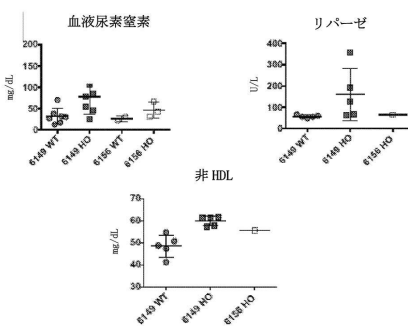
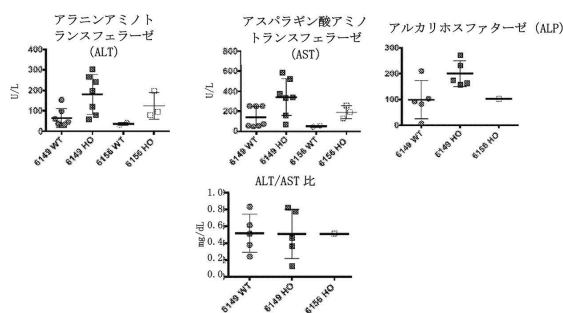


図 13B



【図 14】

図 14A

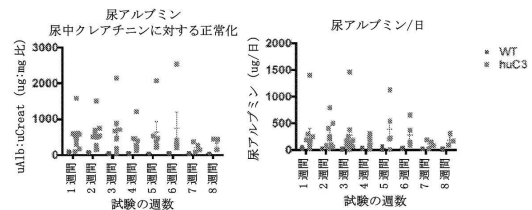
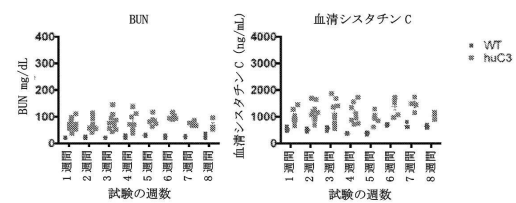


図 14B



30

40

50

【図 15 - 1】

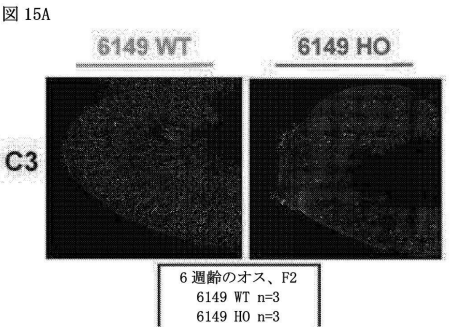
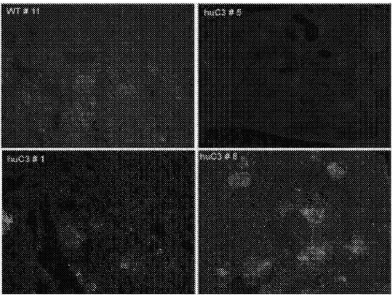
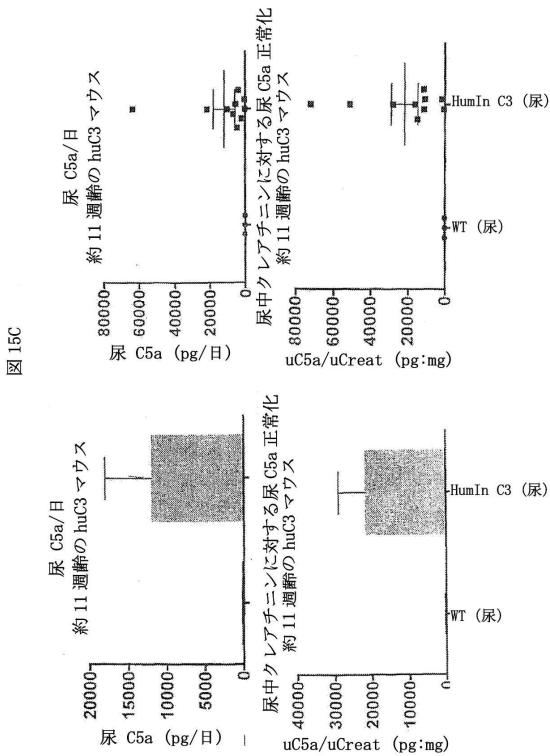


図 15B



【図 15 - 2】



【図 16】

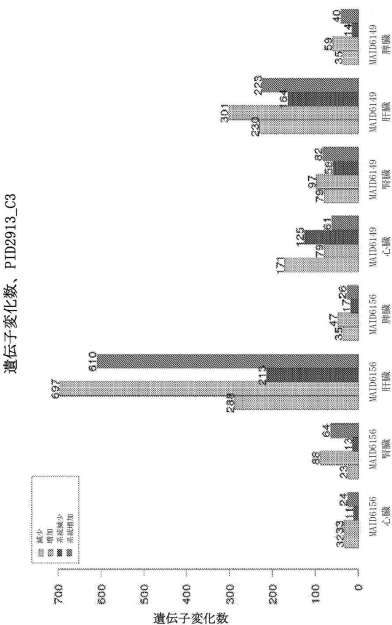
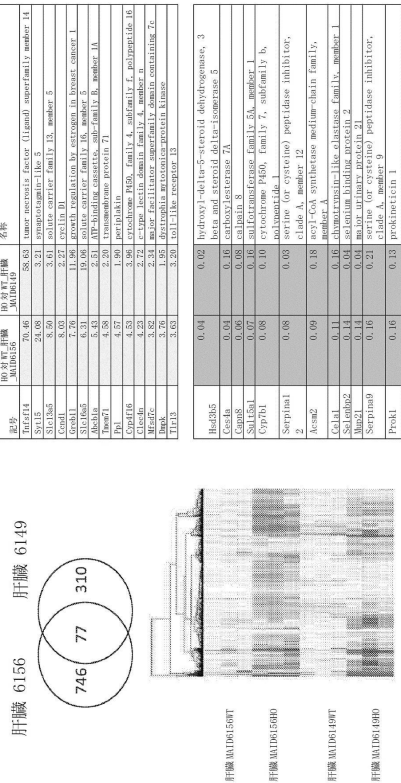


図 16

【図 17】



10

20

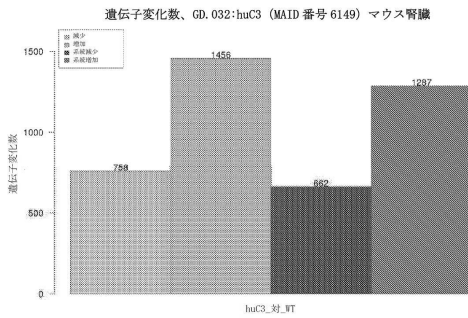
30

40

50

【図 2 1 - 1】

図 21A



【図 2 1 - 2】

図 21B

記号	huC3_対_WT	名称
Gpmb	24.38	glycoprotein (transmembrane) nmb
Lcn2	20.02	lipocalin 2
Timpl	19.13	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Havcr1	15.19	hepatitis A virus cellular receptor 1
Fgb	15.09	fibrinogen beta chain
Cd44	10.24	CD44 antigen
Ugt1a1	9.69	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
Vcam1	9.31	vascular cell adhesion molecule 1
Socs3	7.07	suppressor of cytokine signaling 3
Ctss	5.62	cathepsin S
Atf3	5.24	activating transcription factor 3
Ugt1a6a	5.07	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6A
Mgp	4.97	matrix Gla protein
Cdkn1a		cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
Sppl	4.81	secreted phosphoprotein 1
Gc	4.16	group specific component
Vim	4.04	vimentin
Fn1	4.02	fibronectin 1
Abcb1a	3.94	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A
Bmp1	3.92	bone morphogenetic protein 1
Cp	3.84	ceruloplasmin
Cxcl10		chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Lgals3	3.09	lectin, galactose binding, soluble 3
Tmsb10	2.75	thymosin, beta 10
Ngol	2.56	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
Btg2	2.32	B cell translocation gene 2, anti-proliferative
Clu	2.28	clusterin
Tnfrsf12a	2.13	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a
Sprr1a		small proline-rich protein 1A
Anxa5	1.86	annexin A5
Cd24a	1.86	CD24a antigen
Hmox1	1.83	heme oxygenase (decycling) 1
Mt1		methallothionein 1
Rtn4	1.49	reticulon 4
Cst3	1.44	cystatin C
Gpx8		glutathione peroxidase 8 (putative)
Uchl1		ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
G6pdx		glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked
Mcm6		minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)
Gadd45a		growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha

10

20

【図 2 1 - 3】

図 21C

記号	huC3_対_WT	名称	sec. tm	chrom
Timpl	19.13	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	S	X
Cd44	10.24	CD44 antigen	PM	2
Mmp12	9.43	matrix metalloproteinase 12	S	9
Vcam1	9.31	vascular cell adhesion molecule 1	PM	3
Itgam	8.77	integrin alpha M		7
Thbs2	8.58	thrombospondin 2		17
Col1a1	7.02	collagen, type I, alpha 1	S	11
Mmp2	6.86	matrix metalloproteinase 2	C, M, N, MT, S	8
Col3a1		collagen, type III, alpha 1	S	1
Mmp14	6.56	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	C, V, PM	14
Itgax	5.81	integrin alpha M	PM	7
Col6a1	4.87	collagen, type VI, alpha 1	S	10
Sppl	4.81	secreted phosphoprotein 1	S	5
Cntnl		contactin 1	PM	15
Cdh3	4.48	cadherin 3	PM	8
Adamts2	4.19	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	S	11
Itgb2	4.19	integrin beta 2	PM	10
Tnc	4.19	tenascin C	S	4
Fn1	4.02	fibronectin 1	S	1
Tgfb1	3.83	transforming growth factor, beta induced	S	13
Postn		periostin, osteoblast specific factor	G, S	3
Thbs3	3.75	thrombospondin 3		3
Col5a1	3.38	collagen, type V, alpha 1	S	2
Fbln1	3.26	fibulin 1	S	15
Entpd1	3.08	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	PM	19
Itga4	3.06	integrin alpha 4	PM	2
Ctgf		connective tissue growth factor	S	10
Mmp11		matrix metalloproteinase 11	S	10
Sparc	2.87	glycoprotein	S	11
Timp2	2.85	tissue inhibitor of metalloproteinase 2		11
Emilin1	2.75	elastin microfibril interfacer 1	S	5
Itgb4	2.74	integrin beta 4		11
Adamts1	2.70	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	S	16
Itga5	2.66	integrin alpha 5 (fibronectin receptor)	PM	15
Itgb3		integrin beta 3	PM	11
Itga1		integrin alpha 1		7
Itgae		integrin alpha E, epithelial-associated	PM	11
Ncam1		neural cell adhesion molecule 1	PM	9
Icam1	2.34	intercellular adhesion molecule 1	PM	9
Thbs1	2.06	thrombospondin 1		2
Lama2	2.00	laminin, alpha 2	S	10
Col4a2	1.98	collagen, type IV, alpha 2	S	8

(部分的遺伝子リストを表示、倍率変化でソート)

【図 2 1 - 4】

図 21D

記号	huC3_対_WT	名称
Serpina3n		serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N
Ccl2	31.35	chemokine (C-C motif) ligand 2
Il1rn	19.28	interleukin 1 receptor antagonist
PRLR	9.74	prolactin receptor
Tlr8	9.30	toll-like receptor 8
Siglec1	8.98	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
C3ar1	8.96	complement component 3a receptor 1
Gfra2	8.33	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
Ptafr	7.38	platelet-activating factor receptor
Cxcl1	6.18	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Tnfrsf13b	5.94	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
Cd4		CD4 antigen
Ccr2	4.96	chemokine (C-C motif) receptor 2
Tlr1	4.91	toll-like receptor 1
Csf3r	4.90	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
Il17r	4.88	interleukin 7 receptor
Sppl	4.81	secreted phosphoprotein 1
Il18rap		interleukin 18 receptor accessory protein
Cx3cr1	4.45	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
Dock2	4.34	dedicator of cyto-kinesis 2
Il1rl2	4.33	interleukin 1 receptor-like 2
Nfaml	4.32	Nfat activating molecule with ITAM motif 1
Fos	4.29	FBJ osteosarcoma oncogene
Itgb2	4.19	integrin beta 2
Lbp	4.14	lipopolysaccharide binding protein
Il1rl1	4.09	interleukin 1 receptor-like 1
Fn1	4.02	fibronectin 1
Osmr	4.02	oncostatin M receptor
Cd74	4.01	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
Scub1		signal peptide, CUB domain, EGF-like 1
Ly86	3.93	lymphocyte antigen 86
Il18r1	3.82	interleukin 18 receptor 1
Ccr5	3.63	chemokine (C-C motif) receptor 5
Cxcl10		chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Tlr2	3.46	toll-like receptor 2
Aif1	3.45	allograft inflammatory factor 1
Il10ra	3.43	interleukin 10 receptor, alpha
Il21r	3.41	interleukin 21 receptor
Cybb	3.40	cytochrome b-245, beta polypeptide
Tlr9	3.32	toll-like receptor 9

(部分的遺伝子リストを表示、倍率変化でソート)

30

40

50

【図 2 1 - 5】

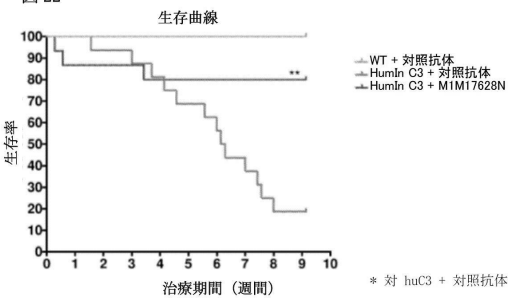
図 21E

記号	huC3_対_WT	名称
Ccl2	31.35	chemokine (C-C motif) ligand 2
Cxcl1	6.18	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Adcy7	5.81	adenylate cyclase 7
Pik3r5	5.27	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101
Ccr2	4.96	chemokine (C-C motif) receptor 2
Nefl	4.77	neutrophil cytosolic factor 1
Fgr	4.70	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog
Cx3cr1	4.45	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
Dock2	4.34	dedicator of cyto-kinesis 2
Pik3cg	3.96	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
Vav1	3.77	vav 1 oncogene
Ccr5	3.63	chemokine (C-C motif) receptor 5
Cxcl10		chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Rac2	3.41	RAS-related C3 botulinum substrate 2
Plcb2	3.37	phospholipase C, beta 2
Itk	3.20	IL2 inducible T cell kinase
Hck	3.14	hemopoietic cell kinase
Was	3.13	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human)
Pik3cd	2.87	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide
Elmol	2.84	engulfment and cell motility 1
Adcy3		adenylate cyclase 3
Prkcb	2.48	protein kinase C, beta
Cxcl9		chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Stat3	2.22	signal transducer and activator of transcription 3
Gnb4	2.14	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4
Xcr1		chemokine (C motif) receptor 1
Prex1	2.06	factor 1
Arrb2	2.04	arrestin, beta 2
Cxcr4		chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cxcl12		chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Adcy5	2.00	adenylate cyclase 5
Grk5	2.00	G protein-coupled receptor kinase 5
Gng2		guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
Cxcl16	1.81	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Jak3	1.77	Janus kinase 3
Akt3	1.71	thymoma viral proto-oncogene 3
Cx3cl1	1.68	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Vav3	1.68	vav 3 oncogene
Nfkb1	1.67	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells
Cxcl14		chemokine (C-X-C motif) ligand 14

(部分的遺伝子リストを表示、倍率変化でソート)

【図 2 2】

図 22

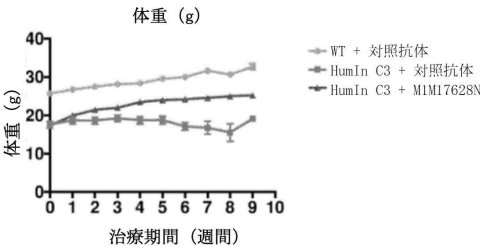


10

20

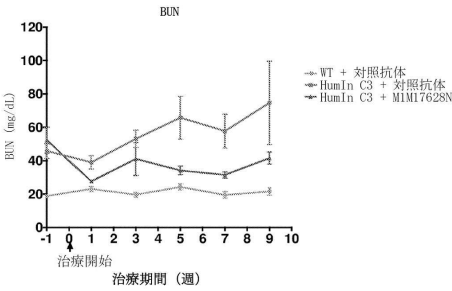
【図 2 3】

図 23



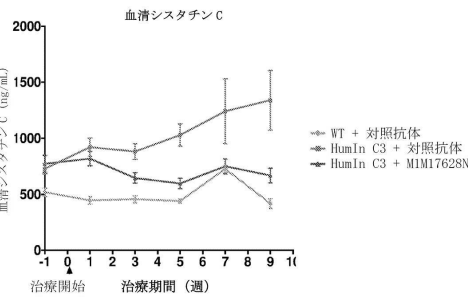
【図 2 4】

図 24A



30

図 24B

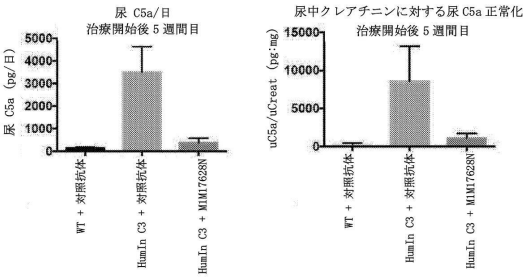


40

50

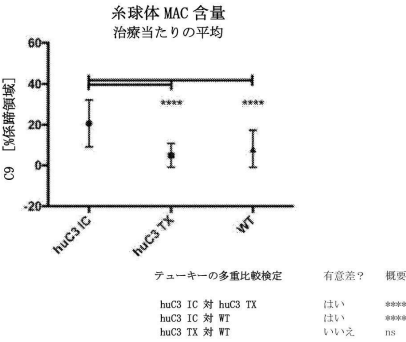
【図 2 5】

図 25

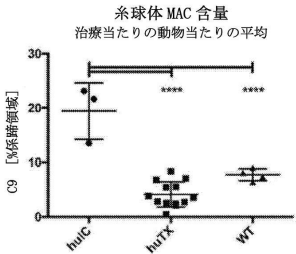


【図 2 6】

図 26



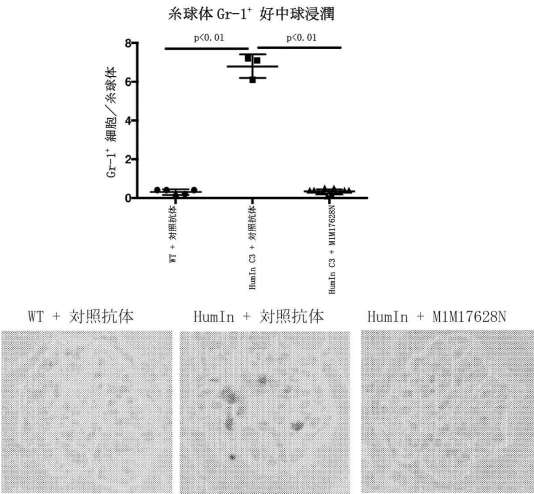
10



20

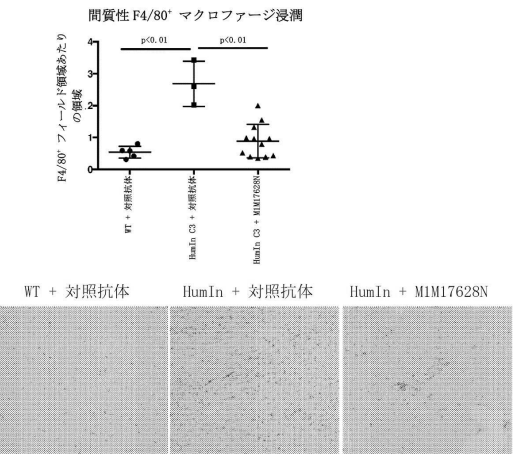
【図 2 7 - 1】

図 27A



【図 2 7 - 2】

図 27B



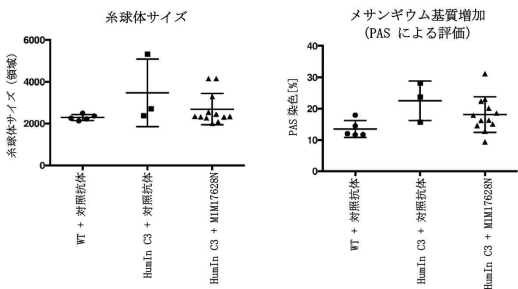
30

40

50

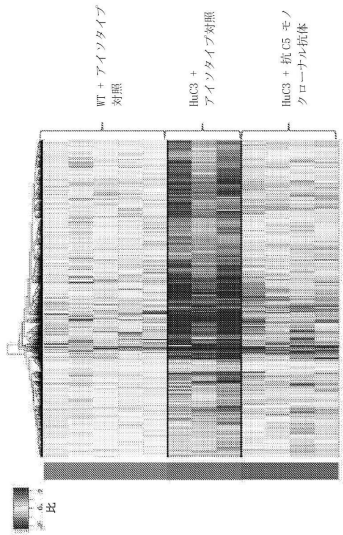
【図 28】

図 28



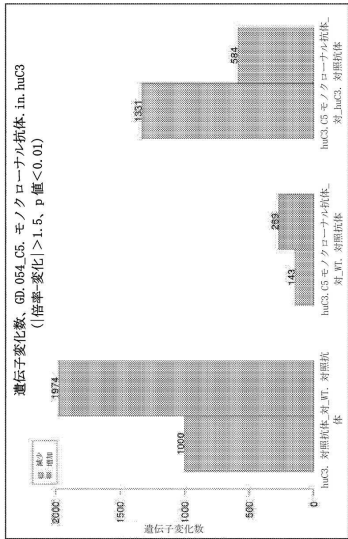
【図 29 - 1】

図 29A



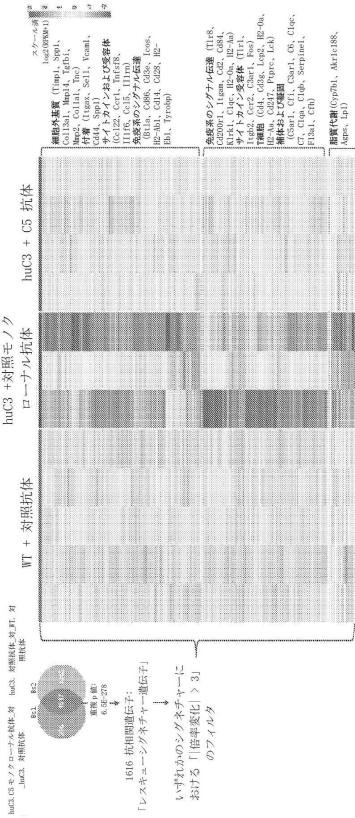
【図 29 - 2】

図 29A (続き)

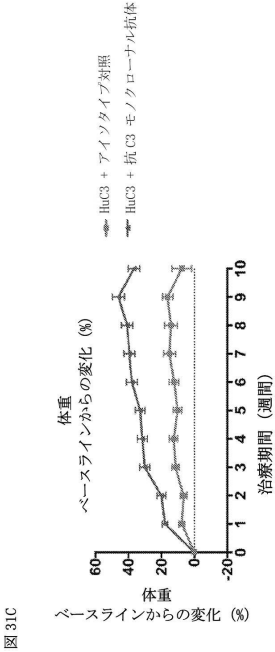


【図 29 - 3】

図 29B



【図 3 1 - 3】



10

20

【配列表】

[0007169979000001.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	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 0 1 K	67/027(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 1 2 N	15/113(2010.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N	15/115(2010.01)	A 0 1 K	67/027	Z N A
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	15/115	Z
		C 1 2 N	15/12	
		C 1 2 P	21/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/583,780

(32)優先日 平成29年11月9日(2017.11.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 デバララジャ - ナラシンハ、キショル

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソウ ミル リバ
ー ロード 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 モートン、ロリ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソウ ミル リバ
ー ロード 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ルオ、イーファン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソウ ミル リバ
ー ロード 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ファン、コン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソウ ミル リバ
ー ロード 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ミーガー、カロリーナ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソウ ミル リバ
ー ロード 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 カサノバ、サラ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソウ ミル リバ
ー ロード 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 7 1 5 2 3 (WO , A 1)

B de Vries et al , Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reper
fusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation , Transplantation , vol15 , 2003
年12月31日 , 375-382Chia-chao Wu et al , Experimental model of membranous nephropathy in mice: sequence of
histological and biochemical events , Laboratory Animals , 2008年01月01日 , vol 42 , 35
0-359

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

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