

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115976105 A

(43) 申请公布日 2023.04.18

(21) 申请号 202211039079.X

(22) 申请日 2016.09.23

(30) 优先权数据

62/232008 2015.09.24 US

(62) 分案原申请数据

201680064219.5 2016.09.23

(71) 申请人 宾夕法尼亚州大学信托人

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 宋文超 D.吉利帕利 三轮隆史

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 李波 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 15/864 (2006.01)

权利要求书1页 说明书33页

C12N 15/12 (2006.01)

序列表(电子公布) 附图40页

(54) 发明名称

用于治疗补体介导的疾病的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗补体介导的疾病的组合物和方法。提供了具有表达盒的重组载体，所述表达盒包含修饰的人因子H(hfH)基因，其中所述hfH基因编码hfH蛋白变体，所述hfH蛋白变体包含SCR1-4、19-20和以下的一个或多个：SCR7、SCR17和/或SCR18。也提供了包含该载体的药物组合物及其在治疗AMD和/或其它补体相关疾病中的用途。

1. 重组载体,其中包装了表达盒,所述表达盒包含工程化的人补体调节因子H(hfH)基因,所述基因可操作性连接于指导其表达的表达控制序列,其中所述hfH基因编码保持补体调节功能的可溶性hfH蛋白变体,其中所述fH变体包含:

短共有重复序列(SCR) 1、2、3、4、19、20和以下的一个或多个:SCR7、17和/或18,其中在给受试者施用所述载体并表达之后,所述hfH变体的可检测血浆水平在所述受试者中存在至少一周。

2. 权利要求1的重组载体,其中所述hfH变体进一步包含另外的hfH SCR,所述另外的hfH SCR由SCR5、SCR6、SCR8、SCR16或其组合组成。

3. 权利要求1或2的重组载体,其中所述fH基因缺乏至少SCR5、SCR9、SCR10、SCR11、SCR12、SCR13、SCR14和/或SCR15的编码序列。

4. 权利要求1的重组载体,其中所述fH变体在一个或多个所述SCRs中包含至少一个糖基化位点。

5. 权利要求1的重组载体,其中所述fH变体包含选自以下的一个或多个的SCR结构域的组合:

- (a) SCR1、2、3、4、7和19-20;
- (b) SCR1- 4、6、7和19-20;
- (c) SCR1-4、7、8和19-20;
- (d) SCR1-4、6、7、8和19-20;
- (e) SCR1-4、17、19-20;
- (f) SCR1-4和18-20;
- (g) SCR1-4和17-20;
- (h) SCR1-4、7和18-20;
- (i) SCR1-4、6、7和18-20;
- (j) SCR1-4、7、8和18-20;
- (k) SCR1-4、6-8和18-20,
- (l) SCR1-4、7和17-20;
- (m) SCR1-4、6、7和17-20;
- (n) SCR1-4、7、8和17-20;或
- (o) SCR1-4、6-8和17-20。

6. 权利要求5的重组载体,其中表达的hfH变体具有图4的氨基酸序列[SEQ ID NO:43]。

7. 权利要求1-6的任一项的重组载体,其中所述载体选自腺伴随病毒载体、腺病毒载体、RNA病毒载体、慢病毒载体和痘苗病毒载体。

8. 重组AAV载体,其中包装了表达盒,所述表达盒包含工程化的人补体调节因子H(fH)基因,所述基因可操作性连接于指导其表达的表达控制序列,其中所述hfH基因编码保持补体调节功能的可溶性hfH蛋白变体,其中所述fH变体包含:

短共有重复序列(SCR) 1、2、3、4、19和20,其中在给受试者施用所述载体并表达之后,所述hfH变体的可检测的治疗上有用的血浆水平在所述受试者中存在至少约一个月。

9. 权利要求8的重组载体,其中所述hfH变体的可检测的血浆水平存在至少约6个月。

10. 权利要求8的重组载体,其中可检测的血浆水平存在至少约10个月。

用于治疗补体介导的疾病的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2016年9月23的中国专利申请201680064219.5“用于治疗补体介导的疾病的组合物和方法”的分案申请。

[0002] 关于联邦资助的研究或开发的声明

本发明是在国立卫生研究院奖励的补助金No.AI085596下通过政府支持完成的。政府在本发明中具有某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物技术领域。具体地，本发明涉及具有表达盒的重组载体，所述表达盒包含修饰的人因子H(hfH)基因，其中所述hfH基因编码hfH蛋白变体，所述hfH蛋白变体包含SCR1-4、19-20和以下的一个或多个：SCR7、SCR17和/或SCR18。本发明还涉及包含该载体的药物组合物及其在治疗AMD和/或其它补体相关疾病中的用途。

背景技术

补体系统是在宿主防御中起关键作用的先天免疫的一部分。补体可以由三种不同的途径，即经典、旁路和凝集素途径活化。在它们中，旁路途径是独特的，因为它不仅代表一种独立的途径，通过该途径，补体通过“慢速运转(tick-over)”机制被活化，而且它也放大由另外两种途径起始的补体活化。旁路途径要求C3、因子B(fB)、因子D(fD)和备解素(fP)的参与。所有途径在C3活化步骤汇合，由此旁路途径放大环开始起作用。无论发生哪种途径的补体活化，活化的补体产生三种类型的效应物功能：用C3b/iC3b/C3d对靶的调理作用，以促进吞噬作用和清除、促炎介质C3a和C5a的产生，以及通过终末补体活化效应物C5b-9，也称作膜攻击复合物(MAC)的直接细胞攻击。通过B细胞和小结树突细胞上的补体受体(CRs)如CR2，以及白细胞如巨噬细胞和单核细胞上的过敏毒素受体C3a受体(C3aR)和C5a受体(C5aR)的活化，补体也与适应性免疫系统相互作用并交叉调节适应性免疫系统，并由此在B和T细胞免疫中起调节作用。

[0005] 许多人类疾病是由补体失调导致的，所述补体失调导致补体介导的自体组织损伤。补体失调可以产生自补体调节物或调节物相关基因中的体细胞或种系突变，所述突变使得这些调节物不再正常起作用。这种类型的实例包括造血干细胞中编码GPI锚生物合成中的关键酶的PIG-A基因的突变，并且所述突变导致阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)患者的血细胞上DAF和CD59的表达缺乏。因此，PNH患者的红细胞和血小板不能受到保护以避免补体攻击，并且他们发生血管内溶血和血小板活化，导致贫血和血栓形成发作。第二个实例是膜调节物MCP或液相调节物fH或fI中的突变，其使得肾中补体的旁路途径过度活化，导致C3肾小球病或非典型溶血尿毒综合征(aHUS)的发病机理。除了导致DAF、CD59、fH、fI和MCP的表达缺乏或功能障碍的这种罕见和高外显率突变(high penetrant mutations)，在fH中存在单核苷酸多态性(SNP)，其更普遍且外显率更低，但仍然被鉴定出通过补体介导的机理促成疾病发病机理。一个非常充分表征的实例是fH中的Y420H多态性与年龄相关性黄斑变性(AMD)的强关联。因此，补体调节物功能障碍或序列变异可能导致常见以及罕见人类疾病。

[0006] 补体失调可能不仅产生自调节性突变/多态性,也产生自编码旁路途径的关键成分,即C3和fB的基因中的突变,以及由抗调节物或补体蛋白如fH、C3或fB的自身抗体的存在而产生。目前理解,C3或fB中的某些突变将得到当活化时形成异乎寻常稳定的旁路途径C3转化酶C3bBb的蛋白,所述C3转化酶C3bBb抗调节蛋白的调节,这继而导致补体失调和过度活化。在抗补体调节物的自身抗体的情况下,它们通常模拟编码所述蛋白的基因中的突变,结果是所述蛋白在液相中或在细胞表面上的功能性效力降低。分开地,称作C3肾炎因子(C3 nephritic factors,C3nef)的抗C3b自身抗体能够结合和稳定所述旁路途径C3转化酶C3bBb,由此实现与C3或fB基因突变产生的作用相同的延长该转化酶的半衰期和活性的作用。总体上,存在由补体活化级联的失调引起的过度补体活化导致的常见和罕见人类疾病。补体失调的基础机理是可变的,一些是由于基因突变,另一些是由于自身抗体,并且突变的基因或自身抗体的靶可以是旁路途径的调节蛋白或成分。

[0007] 目前的治疗方法致力于开发结合并阻断特定旁路途径或终末途径(terminal pathway)补体成分的试剂例如mAbs、肽或其它小分子。一个临幊上验证的实例是依库珠单抗(Eculizumab),即一种抗补体C5的人源化mAb,其已被批准用于PNH和aHUS的治疗。其它已被描述的方法包括抗fB、fD或fP的mAbs,和结合并抑制C3的环肽。这些方法的限制是它们需要患者的重复和不方便的IV给药。此外,由于它们阻断旁路途径或终末途径,它们具有损害宿主防御的风险。实际上,进行依库珠单抗治疗的患者必须进行针对导致致死性脑膜炎的细菌菌株的接种,并且这些患者在用批准的mAb药物治疗前也进行预防性抗生素治疗。

[0008] 在其它方法中,测试了重组调节蛋白,如可溶性DAF、CR1、CRIg和包含fH的最小结构域(N末端短共有重复序列[SCR]1-5和C末端SCR 19-20)的蛋白或fH和CR2之间的融合蛋白(TT30)。参见,例如,美国专利公开号US2013/0296255;美国专利公开号2008/0221011。但是,所述蛋白作为治疗性药物的大规模异源表达需要显著的努力,并且动物研究显示了它们在施用之后的体内清除速度快(Nichols EM,Barbour TD,Pappworth IY,Wong EK,Palmer JM,Sheerin NS,Pickering MC,Marchbank KJ.Kidney Int.2015 Jul 29.doi:10.1038/ki.2015.233.;Fridkis-Hareli M,Storek M,Mazsaroff I,Risitano AM,Lundberg AS,Horvath CJ,Holers VM,Blood.2011 Oct 27;118(17):4705-13.doi:10.1182/blood-2011-06-359646.Epub 2011 Aug 22.),使得所述治疗策略麻烦和较不实用,因为将需要多次和频繁施用所述蛋白药物。

[0009] 本领域仍然需要可用于以更高和持续时间更长的效力治疗补体介导的疾病的组合物。

发明内容

一方面,本发明提供重组载体,其中包装了表达盒,所述表达盒包含工程化的人补体调节因子H(fH)基因,所述基因可操作性连接于指导其表达的表达控制序列,其中所述hfH基因编码保持补体调节功能的可溶性hfH蛋白变体,其中所述fH变体包含短共有重复序列(short consensus repeat,SCR)1、2、3、4、19和20,以及以下的至少一个:SCR7、SCR17和/或SCR18,其中在给受试者施用所述载体并表达之后,所述hfH变体的可检测血浆水平在所述受试者中存在至少一周。

[0011] 另一方面,本发明提供重组AAV载体,其中包装了表达盒,所述表达盒包含工程化

的人补体调节因子H(fH)基因,所述基因可操作性连接于指导其表达的表达控制序列,其中所述hfH基因编码保持补体调节功能的可溶性hfH蛋白变体,其中所述fH变体包含短共有重复序列(SCR)1、2、3、4、19和20,其中在给受试者施用所述载体并表达之后,所述hfH变体的可检测的治疗上有用的血浆水平在所述受试者中存在至少约一个月。

[0012] 另一方面,提供了药物组合物,其包含载体(carrier)和/或赋形剂和本文描述的重组载体(vector),所述重组载体表达fH变体。

[0013] 另一方面,提供了用于通过给受试者送递本文描述的载体而治疗补体相关病症的方法。补体相关病症可以是膜性增生性肾小球肾炎、非典型溶血尿毒综合征(aHUS)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、微血管病性溶血性贫血、血小板减少症、急性肾功能衰竭、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、精神分裂症、缺血性中风和/或由细菌病原体的募集导致的细菌感染,等等。

[0014] 另一方面,提供了重组载体用于治疗AMD的用途。另一方面,描述了rAAV载体用于治疗PNH,aHUS或另外的补体相关病症的用途。

[0015] 另一方面,提供了工程化的hfH变体,其包含前导序列和人补体受体SCRs,所述SCRs由以下组成:(a) SCR1-4、7和19-20;(b) SCR1-4、6、7和19-20;(c) SCR1-4、7、8和19-20;或(d) SCR1-4、6、7、8和19-20;(e) SCR1-4、17和19-20;(f) SCR1-4和18-20;(g) SCR1-4和17-20。其它实施方案包括例如SCR1-4、7和18-20;SCR1-4、6、7和18-20;SCR1-4、7、8和18-20;或SCR1-4、6、7、8和18-20、SCR1-4、7和17-20;SCR1-4、6、7和17-20;SCR1-4、7、8和17-20;或SCR1-4、6、7、8和17-20。任选地,将至少一个糖基化位点工程化到至少一个所述SCRs中。另一方面,所述工程化的hfH变体之一是聚乙二醇化的。

[0016] 另一方面,提供了包含至少一种类型的所述工程化的hfH变体、载体和/或赋形剂的药物组合物。所述组合物可以单独使用或与另外的治疗,特别是例如本文描述的载体治疗组合。

[0017] 从下文的发明详述可以容易地明白本发明的其它方面和益处。

附图说明

图1A提供了成熟的人因子H蛋白的结构域结构的示意图。

[0019] 图1B-1E提供了前导肽的核酸和氨基酸序列,并且确定了用于产生下文实施例举例说明的fH变体的20个短共有重复序列(SCR)结构域的位置。SEQ ID N0:1提供了核酸序列;SEQ ID N0:2提供了信号肽的氨基酸序列。SCR1-20的氨基酸序列分别提供在SEQ ID N0:3 (SCR1)、5 (SCR2)、7 (SCR3)、9 (SCR4)、11 (SCR5)、13 (SCR6)、14 (SCR7)、16 (SCR8)、17 (SCR9)、19 (SCR10)、21 (SCR11)、23 (SCR12)、25 (SCR13)、27 (SCR14)、29 (SCR15)、31 (SCR16)、33 (SCR17)、35 (SCR18)、37 (SCR19) 和38 (SCR20) 中。这些结构域在fH同种型1中的位置是基于C.Estaller et al、Eur J Immunol. 1991 Mar; 21 (3): 799-802中描述的惯例。定义的SCRs之间的氨基酸序列是接头序列,其提供fH柔性[分别为SEQ ID N0:4、6、8、10、12、15、18、20、22、24、26、28、30、32、34和36]。SCR19和SCR20之间的接头仅仅是3个氨基酸(Leu-His-Pro),因此不由序列表中的特征产生。

[0020] 图2A提供了包含SCR1-4、6-8和19-20的人因子H变体的示意结构域结构。

[0021] 图2B-2C提供了fH变体SCR1-4、6-8和19-20的前导肽和9个短共有重复序列(SCR)

结构域的核酸[SEQ ID NO:41的nt 53-1804]和氨基酸序列[SEQ ID NO:42]。

[0022] 图3A-3B是包含前导肽和SCR1-4、6-8和19-20的人因子H截短构建体(hfH1-4.678.19-20)的完整cDNA[SEQ ID NO:41的nt 53-1804]以及5' -[SEQ ID NO:41的nt 1-52]和3' -UTR[SEQ ID NO:41的nt 1805-2068]序列。

[0023] 图4是包含前导肽(加下划线的)和SCR1-4、6-8、19-20的因子H截短构建体(hfH1-4.678.19-20)的氨基酸序列[SEQ ID NO:42]。

[0024] 图5A和5B是凝胶,其提供hfH1-4.678.19-20的蛋白表达和稳定性的证明。将图2显示的包含SCR1-4、6-8和19-20的人fH截短变体的cDNA序列[SEQ ID NO:41]克隆到真核表达载体中,随后将该载体用于转染HEK细胞。将细胞培养物上清液用于蛋白印迹分析以检测截短的fH蛋白表达。图片A:第1泳道,未转染的HEK细胞;第2和3泳道,用包含所述fH截短变体cDNA的pCMV Sport6载体转染的HEK细胞;第4-6泳道,用包含所述fH变体cDNA的pCBARG载体转染的HEK细胞。pCBARG载体与图4中显示的pAAV载体构建体包含相同的5' 和3' 调节元件。图片B:第1泳道,未转染的HEK细胞;第2泳道,作为对照的、用包含所述截短的fH变体cDNA的pCBARG载体转染的HEK细胞;第3泳道,用包含所述截短的fH变体cDNA的AAV8质粒转染的HEK细胞。

[0025] 图6是SDS-凝胶,其显示重组hfH1-4.678.19-20的纯化。通过包含SCR1-4、6-8和19-20的人fH截短变体的考马斯蓝染色进行SDS-凝胶分析,所述变体是通过用pCBARG载体转染HEK细胞而表达的。通过流经亲和柱,从上清液纯化重组fH截短蛋白,所述亲和柱是用抗人因子H的mAb(克隆OX-23)制备的,所述mAb识别SCR2-3中的表位。蛋白分子量标记的大小和位置显示在左侧。

[0026] 图7是凝胶,显示重组hfH1-4.678.19-20保持了补体调节活性(辅因子活性)。测试了包含SCR1-4、6-8和19-20的人fH截短变体对于因子I介导的C3b切割的辅因子活性。对于该测定,将人C3b与因子I在存在(第1-6泳道)或不存在(第7泳道)全长fH(hfH)或截短的fH变体(hfH1-4.678.19-20)的情况下混合。温育反应混合物,然后通过SDS-PAGE和蛋白印迹分析进行分析。iC3ba-链片段的出现表明辅因子活性。

[0027] 图8是线图,显示重组hfH1-4.678.19-20(正方形,顶部的线)具有强的肝素结合活性。包含SCR1-4、6-8和19-20的人fH截短变体保持了肝素结合活性。其肝素结合活性是剂量依赖性的,并且当以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计与全长人fH(菱形,下面的线)进行比较时,它显示更高的活性。通过ELISA评估肝素结合活性,所述ELISA使用平板上包被的肝素,覆盖全长或截短的fH蛋白溶液,并且,在洗涤后,通过mAb OX-23(抗SCR2-3中的表位)检测结合的fH或截短的fH。

[0028] 图9是线图,显示重组hfH1-4.678.19-20(正方形,顶部的线)具有强的C3b结合活性。包含SCR1-4、6-8和19-20的人fH截短变体保持了C3b结合活性。其C3b结合活性是剂量依赖性的,并且当以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计与全长人fH(菱形,底部的线)进行比较时,它显示更高的活性。通过ELISA评估C3b结合活性,所述ELISA使用平板上包被的C3b,覆盖全长或截短的fH蛋白溶液,并且,在洗涤后,通过mAb OX-23(抗SCR2-3中的表位)检测结合的fH或截短的fH。

[0029] 图10是线图,显示在AAV8介导的fH基因治疗后一周3只不同的fH突变小鼠(fH^{m/m}; F1,F2,F20)血液中的hfH1-4.678.19-20的ELISA检测。fH^{m/m}小鼠是一种fH突变小鼠品系,其携带在SCR19处起始的提前终止密码子(premature stop codons)。这些小鼠产生痕量截短的fH(缺乏SCR19-20)并且具有不受控制的液相旁路途径补体活化和消耗(继发性C3和fB缺

乏)。用包含hfH1-4.678.19-20的AAV8病毒通过眼眶后(retro-orbital)静脉注射感染小鼠(3×10^{11} 个基因拷贝/小鼠),并且在一周后,采集并处理血样用于人fH蛋白检测。对于ELISA测定,将mAb OX-23用作捕获抗体(识别人fH SCR2-3中的表位),并且将生物素化的mAb L20/3用作检测抗体(识别人fH SCR19)。如图中所示,在AAV-hfH1-4.678.19-20治疗前(Pre)3只fH^{m/m}小鼠(F1,F2,F20)的血液中没有hfH1-4.678.19-20,但治疗后一周(W)检测到了hfH1-4.678.19-20。

[0030] 图11是蛋白印迹分析,证明fH^{m/m}小鼠中的AAV8介导的人fH基因治疗抑制由于缺乏足够的内源性小鼠fH表达导致的旁路途径补体活化,未治疗的fH^{m/m}小鼠具有不受控制的液相旁路途径补体活化,因此它们消耗血浆C3和fB(比较野生型的第1泳道与基因治疗前3只fH^{m/m}小鼠的第2、4、6泳道)。用AAV8-hfH1-4.678.19-20治疗fH^{m/m}小鼠后一周,血浆C3和fB水平与治疗前水平相比显著增加,表明AAV8介导的人fH基因治疗抑制了不受控制的旁路途径补体活化以及C3和fB消耗。所有3只小鼠(F1、F2和F20)通过眼眶后静脉注射各自接受 3×10^{11} 个基因拷贝。

[0031] 图12A提供了包含SCR1-4、6-8和17-20的人因子H变体的示意结构域结构,N-糖基化位点的位置用箭头说明。

[0032] 图12B-12C提供了fH变体SCR1-4、6-8和17-20的前导肽和11个短共有重复序列(SCR)结构域的核酸和氨基酸序列[分别为SEQ ID NO:45和46]。

[0033] 图13是包含前导肽和SCR1-4、6-8和17-20的人因子H变体(hfH1-4.678.17-20)的完整cDNA和5' UTR序列(5' UTR以大写字母表示)[SEQ ID NO:47]。

[0034] 图14是包含前导肽(加下划线的)和SCR1-4、6-8、17-20的因子H截短构建体(hfH1-4.678.17-20)的氨基酸序列[SEQ ID NO:48]。

[0035] 图15A-15C显示用不同剂量的AAV8-hfH1-4.678.17-20治疗的3只fH突变小鼠的血浆中hfH1-4.6-8.17-20蛋白水平的ELISA检测。fH^{m/m}小鼠是一种fH突变小鼠品系,其携带在SCR19处起始的提前终止密码子。这些小鼠产生痕量截短的fH(缺乏SCR19-20)并且具有不受控制的液相旁路途径补体活化和消耗(继发性C3和fB缺乏)。通过分别用三种剂量,即 1×10^{12} 个基因拷贝(GC)/小鼠、 3×10^{11} GC/小鼠和 1×10^{11} GC/小鼠的包含hfH1-4.678.17-20的AAV8病毒眼眶后静脉注射感染小鼠。在AAV治疗前(pre)或在AAV治疗后一周(W1)、两周(W2)、一个月(M1)、两个月(M2)或3个月(M3)采集血浆样品用于ELISA测定。对于ELISA测定,将mAb OX-23用作捕获抗体(识别人fH SCR2-3中的表位),并且将生物素化的mAb L20/3用作检测抗体(识别人fH SCR19)。如图中所示,在AAV-hfH1-4.678.17-20治疗前(Pre),fH^{m/m}小鼠的血液中没有hfH1-4.678.17-20,但AAV治疗后检测到了高水平的hfH1-4.678.17-20,并且hfH1-4.678.17-20表达保持稳定至少3个月。

[0036] 图16A-16C是蛋白印迹分析,证明用AAV8-hfH1-4.678.17-20基因治疗对fH^{m/m}小鼠进行的治疗,抑制了旁路途径补体活化。由于缺乏足够的内源性小鼠fH表达,未治疗的fH^{m/m}小鼠具有不受控制的液相旁路途径补体活化,因此它们消耗血浆C3和fB(第1泳道)。在通过眼眶后静脉注射分别用 1×10^{12} 个基因拷贝(GC)/小鼠(图16A)、 3×10^{11} 个基因拷贝(GC)/小鼠(图16B)和 1×10^{11} 个基因拷贝(GC)/小鼠(图16C)治疗的3只fH^{m/m}小鼠中,当在AAV8-hfH1-4.678.17-20基因治疗后一周(W)、一个月(M1)、两个月(M2)和3个月(M3)检查治疗的小鼠时,旁路途径补体活化被阻止,并且伴有血浆C3和fB的相应恢复。在每个治疗剂量和时间点

(第2、3、4、5泳道), 血浆C3和fB在AAV8-hfH1-4.678.17-20基因治疗后显著高于治疗前(Pre, 第1泳道)。

[0037] 图17A-17C显示小鼠中前导肽和20个短共有重复序列(SCR)结构域的核酸和氨基酸序列[分别为SEQ ID NO:79和80]。定义的SCRs之间的氨基酸序列是接头序列, 其提供fH柔性。

[0038] 图18A-18B提供小鼠fH变体的前导肽和9个短共有重复序列(SCR)结构域的核酸和氨基酸序列[分别为SEQ ID NO:81和82]。定义的SCRs之间的氨基酸序列是接头序列, 其提供fH蛋白柔性。这种小鼠fH的变体用作在后续研究中测试hfH1-4.678.19-20的体内功能的替代物。

[0039] 图19提供包含前导肽(加下划线的)和SCR1-4、6-8、19-20的小鼠因子H截短构建体(mfH1-4.678.19-20)的编码以及5'和3'-UTR序列[SEQ ID NO:43]。

[0040] 图20提供包含前导肽(加下划线的)和SCR1-4、6-8、19-20的小鼠因子H截短构建体(mfH1-4.678.19-20)的氨基酸序列[SEQ ID NO:44]。

[0041] 图21是凝胶, 其显示mfH1-4.19-20和mfH1-4.678.19-20的蛋白表达和稳定性的证明。将包含SCR1-4、678和19-20的小鼠fH截短变体的cDNA序列或包含SCR1-4和19-20的另一种fH截短变体的cDNA序列克隆到真核表达载体pCBARG中, 随后将该载体用于转染一种小鼠肝细胞系, 即Hepa1C1C7细胞。将细胞培养物上清液用于蛋白印迹分析以检测截短的小鼠fH蛋白表达。M: 分子量标记; 第1泳道, 未转染的Hepa1C1C7细胞(对照); 第2和3泳道, 用pCBARG-mfH1-4.19-20克隆3或克隆4转染的Hepa1C1C7细胞, 第5和6泳道, 用pCBARG-mfH1-4.678.19-20克隆1(有义)或克隆2(反义)转染的Hepa1C1C7细胞。

[0042] 图22A是流程图, 显示如何采集和处理血样以用于fH蛋白检测。fH^{m/m}小鼠是一种fH突变小鼠品系, 其携带在SCR19处起始的提前终止密码子。这些小鼠产生痕量截短的fH(缺乏SCR19-20)并且具有不受控制的液相旁路途径补体活化和消耗(继发性C3和fB缺乏)。通过用包含mfH1-4.678.19-20的AAV8病毒眼眶后静脉注射感染小鼠(3×10^{12} 个基因拷贝/小鼠), 并且在一周后, 采集、处理和分析血样, 如流程图所示。

[0043] 图22B是AAV8介导的fH基因治疗后一周fH突变小鼠(fH^{m/m})的血液中mfH1-4.678.19-20的蛋白印迹检测。如图中所示, 在野生型(WT)和未治疗的fH^{m/m}小鼠中没有mfH1-4.678.19-20(大约70kd)。在三只病毒感染的fH^{m/m}小鼠M3、F10、F30(M表示雄性, F表示雌性)中清楚地检测到了mfH1-4.678.19-20。

[0044] 图23是蛋白印迹分析, 证明fH^{m/m}小鼠中的AAV8介导的fH基因治疗防止不受控制的旁路途径补体活化。由于缺乏足够的内源性fH表达, 未治疗的fH^{m/m}小鼠具有不受控制的液相旁路途径补体活化, 因此它们消耗血浆C3和fB(比较野生型的第1泳道与基因治疗前fH^{m/m}小鼠的第2、5、8泳道)。用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗fH^{m/m}小鼠后, 在一周(1W, 第3、6、9泳道)和一个月(1M, 第4、7、10泳道)时, 血浆C3和fB水平恢复到WT水平, 表明AAV8介导的fH基因治疗防止了不受控制的旁路途径补体活化以及C3和fB消耗, 并且早在一周时疗效就是明显的, 且持续至少一个月。

[0045] 图24是蛋白印迹分析, 证明AAV8介导的fH基因治疗防止致死性C3肾小球病的小鼠模型中的不受控制的旁路途径补体活化。在也缺乏备解素的fH^{m/m}小鼠(fH^{m/m} P^{-/-})中, 发生相似的不受控制的旁路途径补体活化, 伴有C3和fB消耗。与fH^{m/m}小鼠相比, fH^{m/m}P^{-/-}小鼠

发生致死形式的C3G，并且它们到10-12周龄时死亡。在该实验中，给两只大约7周龄的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠各自用AAV8-mfH1-4.678.19-20或作为对照组的空AAV8载体(pAAV.TBG.rBG)(对照AAV)进行治疗。AAV8基因治疗后一周，采集血样并通过蛋白印迹分析C3和fB水平。如图片中所示，与AAV8治疗前的血样(pre)相比，在对照AAV8治疗后一周(1W)完整的C3或fB水平没有差异(第2-5泳道)。但是，用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗后一周的小鼠中的血浆C3和fB水平显著增加(第6-9泳道)，表明通过基因治疗抑制了不受控制的旁路途径补体活化。通过眼眶后静脉注射用AAV8(3x10¹²个基因拷贝/小鼠)治疗小鼠。

[0046] 图25显示用AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗进行治疗的fH^{m/m}P^{-/-}(来自图24的M3)的长期随访。基因治疗前(Pre)和用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗后一周(1W)、1、2、3、4、5和6个月(1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M)时的血浆C3和fB水平的蛋白印迹分析显示C3和fB在基因治疗后持续升高至野生型小鼠水平，表明疗效是长效的。

[0047] 图26显示用AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗进行治疗的fH^{m/m}P^{-/-}(来自图24的M3)的长期随访。用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗前(Pre)和治疗后一周、1、2、3、4、5和6个月(M)时mfH1-4.678.19-20蛋白的血浆水平的ELISA分析显示作为治疗性蛋白药物的mfH1-4.678.19-20是持续表达的。

[0048] 图27显示AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗在防止C3肾小球病中的肾病理中的效力。用对照AAV8载体治疗的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠(来自图24的小鼠M1)在治疗两周内是濒死的，并且它的肾的免疫染色显示如以前对未治疗的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠描述过的强肾小球C3沉积(左侧图片)。相比之下，用AAV8-mfH1-4.678.19-20载体治疗的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠(来自图23的M3)存活，并且在治疗后6个月仍然健康，此时将其处死并分析肾组织学。在该小鼠中没有检测到肾小球C3沉积(右侧图片)，表明AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗防止了C3肾小球病。

[0049] 图28A和28B证明AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗防止膜调节物功能障碍导致的旁路途径补体活化。在该实验中，用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗缺乏两种膜调节物，即DAF和Crpy的小鼠(眼眶后途径，静脉注射，3x10¹²个基因拷贝/小鼠)。在基因治疗之前和之后一周(1W)，采集血浆样品以通过蛋白印迹分析血浆C3(A)和fB(B)水平。如数据所示，DAF/Crpy双突变小鼠具有过度的旁路途径补体活化，伴有低C3和fB水平(Pre)。AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗后，C3和fB都恢复到野生型小鼠水平，表明AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗能够纠正膜补体调节物导致的病理。该数据表明，无论基础的调节机理缺陷是什么，AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗对不受控制的旁路途径补体调节导致的补体介导的疾病是广泛有效的。该研究中使用的DAF/Crpy双突变小鼠是DAF敲除小鼠和Crpy^{flox/flox}-Tie-2Cre⁺小鼠之间的杂交物种。由于Tie-2-Cre在生殖细胞中表达，它导致一些后代中Crpy基因的种系缺失，从而导致总体(global)Crpy缺失。

[0050] 图29A-29B提供了使用C3恢复作为读出结果的AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗的剂量比较。在该实验中，给fH^{m/m}小鼠施用不同剂量的AAV8-mfH1-4.678.19-20(眼眶后途径，静脉注射)。两只小鼠各自给予以下剂量：1x10¹²个基因拷贝/小鼠(M#1, M#2)、3x10¹¹个基因拷贝/小鼠(M#3, M#6)和1x10¹¹个基因拷贝/小鼠(M#4, M#5)。进行蛋白印迹以分析基因治疗之前(Pre)和之后一周(1W)或1个月(1M)的血浆C3水平。如所示的，当在1W和1M时间点检查时，测试的所有剂量都能够增加血浆C3水平。

[0051] 图30提供了使用fB恢复作为读出结果的AAV8-mfH1-4.678.19-20基因治疗的剂量

比较。基本如图29A-B中所描述的(其中C3作为读出结果)进行蛋白印迹。如所示的,当在1W和1M时间点检查时,测试的所有剂量都能够增加血浆fB水平。

[0052] 图31是示意图,显示用于将W到R的突变引入小鼠fH的SCR20中(第1206位,对应于人fH第1183位)的基因靶向策略。

[0053] 图32显示野生型同窝出生小鼠和携带fH中的W1206R突变的突变小鼠的存活曲线。fH突变小鼠产生aHUS的特征性病理,并且到30周龄时它们中的近一半死亡。

[0054] 图33A显示野生型、杂合和纯合突变小鼠中的血小板计数比较。纯合的突变小鼠显示低血小板计数,表明它们患有慢性血小板减少症。

[0055] 图33B显示野生型、杂合和纯合突变小鼠的血红蛋白水平比较。纯合的突变小鼠显示低血红蛋白水平,表明它们患有慢性溶血性贫血。

[0056] 图34A-34C显示W1206R突变小鼠的肾切片,其显示了aHUS的特征性病理。病理特征包括肾小球膜扩张和毛细血管腔变窄(图片A),小血管中的血栓,如图片A和图片C中的箭头所示。电子显微镜检查显示,肾小球毛细血管壁表现出带有蓬松的颗粒状电子透明物质的内皮下扩张,以及双轮廓和新肾小球基底膜的形成。

[0057] 图35A-35D显示携带fH中的W1206R突变的小鼠也发生视网膜损伤和眼中的凝血。与野生型小鼠的正常外观视网膜(图35A)相比,在fH W1206R突变小鼠的视网膜中存在很多白色斑块、视网膜水肿和扩张的血管(图35B)。此外,荧光素血管造影显示突变小鼠视网膜没有充分灌注,因为染料在30秒内到达了野生型小鼠眼中的所有血管(图35C),但它甚至在4分钟时还没有到达突变小鼠视网膜的大量区域(图35D)。

[0058] 图36显示在用AAV8-mfH1-4.678.19-20载体以 3×10^{11} GC/小鼠治疗后1个月和2个月时在fH^{W1206R/W1206R}小鼠的血液中通过ELISA检测到了mfH1-4.678.19-20蛋白,但在AAV基因治疗前在这些小鼠的血液中没有检测到。

[0059] 图37A和37B是线图,显示用AAV8-mfH1-4.678.19-20载体以 3×10^{11} GC/小鼠对fH^{W1206R/W1206R}小鼠的治疗使它们的血小板计数正常化。用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗的全部3只fH^{W1206R/W1206R}小鼠都是存活和健康的。它们的血小板计数(图37A)和血红蛋白水平(Hb,图37B)增加并且保持在正常范围。与之相比,用对照AAV载体治疗的两只fH^{W1206R/W1206R}小鼠之一死亡(在治疗后4周),剩余的小鼠具有持续的低血小板计数和波动的血红蛋白水平,其低于用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗的小鼠的血红蛋白水平。

具体实施方式

本文描述了新的工程化因子H(fH)基因和蛋白变体。这些变体的特征在于在治疗与因子H相关的状况和其它补体病症中的增加的半衰期和增加的效力。

[0061] 描述了通过许多途径,特别是通过由重组载体如rAAV载体介导的体内表达将这些变体递送至需要其的受试者。也提供了在用于治疗因子H相关病症的方案中使用这些变体的方法。有利地,本文提供的组合物对于同时靶向多个途径和/或治疗或调节由多种因素导致的不受控制的旁路途径补体调节是有用的。

[0062] 如本文使用的,术语“治疗补体因子H病症”可以包括缓解、减轻和/或改善与补体因子H病症相关的症状,和/或预防与补体因子H病症相关的另外的症状的发生,所述补体因子H病症可以显示为一些不同的表型,包括无症状的、复发的细菌感染和肾功能衰竭。其特

征通常在于因子H、补体成分C3的血清水平降低和其它终末补体成分的减少,表明旁路补体途径的活化。这种病症与多种肾疾病相关,所述肾疾病具有可变的临床表现和进展,包括C3肾小球病和非典型溶血尿毒综合征。本文也提供了组合物和方法,它们用于治疗年龄相关性黄斑变性(AMD)、非典型溶血尿毒症(包括例如综合征微血管病性溶血性贫血、血小板减少症、急性肾功能衰竭)、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、精神分裂症、缺血性中风中的一种或多种,和/或预防或治疗由细菌病原体(如曲霉属物种(*Aspergillus spp.*) ;布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*) ;达氏疏螺旋体(*B. duttonii*) ;回归热疏螺旋体(*B. recurrentis*) ;白色念珠菌(*Candida albicans*) ;土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*) ;流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) ;脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*) ;酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) ,或布氏疏螺旋体的五种因子H结合蛋白之一(CRASP-1、CRASP-2、CRASP-3、CRASP-4或CRASP-5))的募集导致的细菌感染,等等。

[0063] 如本文使用的,术语“治疗补体相关病症”包括缓解、减轻和/或改善上文确定的补体因子H病症以及与不受控制的旁路途径补体调节相关的其它病症这两者的症状。更特别地,本文提供的数据表明,无论基础的调节机理缺陷是什么,至少一种AAV介导的fH变体对不受控制的旁路途径补体调节导致的补体介导的疾病是广泛有效的。参见例如图23。

[0064] “补体介导的病症”可以包括与补体失调相关的症状,所述补体失调可以显示为一些不同的表型,包括无症状的、复发的细菌感染和多种组织损伤,包括但不限于肾疾病。除非另有说明,纯合受试者和杂合受试者这两者都包括在该定义中。补体失调通常由补体调节蛋白中的功能丧失突变或抗补体调节蛋白的自身抗体导致,所述补体调节蛋白包括但不限于fH、因子I(fI)和膜辅因子蛋白(MCP),或由其它补体蛋白的功能获得突变导致,所述其它补体蛋白包括但不限于C3和因子B(fB)。补体失调的特征通常(尽管不总是)在于因子H、补体成分C3、FB的血清水平降低和其它终末补体成分的减少,表明旁路和/或终末补体途径的活化。可以由本发明的组合物和方法治疗的补体介导的病理包括但不限于以下具有可变的临床表现和进展的疾病:C3肾小球病(以前称作II型膜性增生性肾小球肾炎或MPGNII),其通常有两种已知的形式-致密沉积物病(DDD)和C3肾小球肾炎(C3GN);血栓形成性微血管病(TMA),包括但不限于非典型溶血尿毒综合征(aHUS)、产生志贺样毒素的大肠杆菌HUS(STEC-HUS)和血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP);视网膜变性眼病,包括年龄相关性黄斑变性(AMD)、RPE变性、脉络膜视网膜变性、光感受器变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、所有器官和环境(settings)的缺血再灌注损伤、类风湿性关节炎、血液透析、糖尿病肾病、糖尿病血管病、哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)、缺血性中风、腹主动脉瘤(AAA)、抗中性粒细胞细胞质抗体(ANCA)介导的血管炎(ANCA血管炎)、ANCA介导的出血性肺损伤和疾病、ANCA肾小球肾炎、移植物抗宿主病(GvHD)、器官移植中的急性或延迟性移植物排斥、克罗恩氏病、牛皮癣、多发性硬化、抗磷脂综合征、先兆子痫、动脉粥样硬化、视神经脊髓炎(NMO)、自身免疫性皮肤发疱疾病(autoimmune skin-blistering disease)、大疱性类天疱疮(BP)、阿尔茨海默病(AD),以及由细菌病原体(如曲霉属物种;布氏疏螺旋体;达氏疏螺旋体;回归热疏螺旋体;白色念珠菌;土拉热弗朗西丝氏菌;流感嗜血杆菌;脑膜炎奈瑟氏菌;酿脓链球菌)的募集导致的细菌感染。所述病症的其它实例在下文更详细讨论。

[0065] 成熟的“野生型”人补体因子H(同种型1)的氨基酸序列在本文提供为<http://>

www.uniprot.org/uniprot/P08603, 并且作为hfH同种型1的氨基酸编号的参照物[在SEQ ID NO:39中重现]。参照SEQ ID NO:39, 前导序列位于因子H的氨基酸1-18。前导序列的氨基酸序列提供在SEQ ID NO:2中。参照SEQ ID NO:39, 成熟的(分泌的)hfH蛋白位于氨基酸19-1231。存在确定20个短互补重复序列(SCRs)的位置的替代方法。在下文提供的实验中使用的结构域的位置在图1中注释, 并且是基于C.Esteller et al, Eur J Immunol. 1991 Mar; 21(3):799-802中使用的编号。

[0066] 野生型人补体因子H同种型1的氨基酸序列在SEQ ID NO:39中重现。SEQ ID NO:1的特征部分也说明了用于确定20个短共有重复序列(SCR)结构域中每一个的起始/终止的替代系统。在该系统中, 在每一个SCR之间不存在接头序列。

[0067] 任选地, 本文提供的工程化fH变体可以具有异源前导序列, 其取代了天然hfH前导序列。另外地, 或任选地, 另一种hfH同种型(例如同种型2), 其序列可以从例如<http://www.uniprot.org/uniprot/P08603>获得, 和/或其中的天然氨基酸变体之一与病症无关。参见SEQ ID NO:40。在下面的说明书中, 取代可以写作(由单字母代码确定的第一个氨基酸)-残基位置编号-(由单字母代码确定的第二个氨基酸), 从而在参照同种型1的指定位置上, 第一个氨基酸是被取代的氨基酸, 并且第二个氨基酸是取代氨基酸; 但是, 通过常规比对步骤, 本文中针对同种型1的编号确定的相应氨基酸残基可以位于fH的同种型2中, 和fH的同种型1或2的SCRs的非致病天然变体中。

[0068] 如本文中使用的, 当提及SCR#-##时, 结构域包括端点, 并且与“SCR#, ... SCR##”相同。在某些实施方案中, 在结构域之间使用句点。例如, SCR1-4是指“SCR1、SCR2、SCR3和SCR4”, 并且与“SCR1,2,3,4”或“SCR1.2.3.4.”相同。SCR19-20是指SCR19和SCR20, 并且与“SCR19,20”相同。例如“SCR6-8”、“SCR6.7.8”和“SCR6,7,8”是指相同的结构域。

[0069] 如本文使用的, 术语“功能性fH变体”包括这样的fH变体: 其特征在于具有位于SCR1-4的补体调节活性(辅因子活性)并任选具有野生型fH的特征性的功能性C3b结合和GAG结合能力(位于野生型SCR7和SCR19-20内)。在一些实施方案中, 工程化的fH变体具有高于100%的野生型fH辅因子活性和/或GAG结合能力。参见例如图8和下文实施例, 其证明本文描述的fH变体具有统计学上高于全长人fH的GAG和C3b结合活性, 例如, 高约10%至40%。在另一实施方案中, 工程化的fH变体具有小于约95%至约100%的野生型功能性fH。例如, 工程化的fH变体可以具有功能性野生型fH中存在的辅因子活性的至少50%, 更理想地, 至少约60%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%。在另一实施方案中, 工程化的fH变体可以替代地或额外地具有功能性fH的GAG结合能力的至少50%, 更理想地至少约60%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%。确定辅因子活性、结合和/或确定与hfH蛋白相比增加的循环半衰期的方法是本领域已知的, 并且下文实施例说明了这些测定中的至少一种。

[0070] 功能性fH变体的实例包括具有fH蛋白的SCR1-4和19-20的那些, 其带有SCR7、SCR17或SCR18结构域的一个或多个。另外的变体包括具有SCR6、SCR8、SCR16、SCR17、SCR18或其片段中的一个或多个, 及其组合的那些。例如, 所述变体可以包括例如fH SCR1-4, 6-8, 19-20; fH SCR1-4, 6-8, 18-20; fH SCR1-4, 6-8, 17-20; fH SCR1-4, 6-7, 19-20; fH SCR1-4, 6-7, 18-20; fH SCR1-4, 6-7, 17-20; fH SCR1-4, 7-8, 19-20; fH SCR1-4, 7-8, 18-20; fH SCR1-4, 7-8, 17-20; fH SCR1-4, 7, 19-20; fH SCR1-4, 7, 18-20; fH SCR1-4, 7, 17-20; SCR1-

4,17,19-20;SCR1-4,18-20;SCR1-4,17-20和/或fH SCR1-4,7,16-20,等等。在某些实施方案中,hfH变体进一步包含另外的hfH SCRs,例如SCR 6、SCR8、SCR16或其组合。在优选实施方案中,不存在hfH SCR5。但是,在某些实施方案中,hfH SCR5可以完整或以其部分存在。在某些实施方案中,hfH SCR9、SCR10、SCR11、SCR12、SCR13、SCR14和/或SCR15是不存在的,或至少是功能上缺失的。任选地,这些变体中的SCRs中的一个或多个可以是SCRs的“功能性片段”,而不是图1或SEQ ID NO:1的特征所示的全长SCR。“功能性片段”表示少于全长SCR的氨基酸序列(或其编码序列),其特征在于具有补体抑制活性、结合肝素的能力和/或C3b结合活性中的一种或多种。

[0071] 这些和其它变体可以包含其它fH序列。例如,当从病毒载体表达时,fH变体的编码序列也包含前导序列。所述前导序列可以是fH前导序列。任选地,前导序列可以来自另外的来源,如IL-2前导序列,[参见例如<http://www.signalpeptide.de/>中确定的哺乳动物前导序列的索引],通过引用并入本文。在一个实施方案中,选择的前导序列长度小于约26个氨基酸(例如约1至约26个氨基酸),更优选小于20个氨基酸(约1至约20个氨基酸),最优选地,长度小于约18个氨基酸(约1至约18个氨基酸)。“功能缺失”表示缺乏补体抑制活性、C3b结合活性并任选地进一步缺乏肝素结合活性的氨基酸序列(或其编码序列)。

[0072] 对于所述变体,结构域的位置可以彼此紧邻(例如,一个结构域的羧基末端可以紧接着前面的结构域的氨基末端)。或者,SCR结构域中的一个或多个可以具有位于它们之间的、由1至约12至18个氨基酸组成的接头。例如,变体可以包含SCR1-(L1)-SCR2-(L2)-SCR3-(L3)-SCR4-(L4)-(SCR6-(L4'))-SCR7-(L5)-(SCR8-(L5'))-(SCR16-(L5")))-(SCR17-(L5''))-(SCR18-(L5'')))-SCR19-(L6)-SCR20,其中()表示任选的成分,"L"是指接头,且L1、L2、L3、L4、L4'、L5、L5'、L5''、L5'''和L6中的每一个可以不存在或独立地选自约1至约12-18个氨基酸的氨基酸序列。也就是说,当变体含有多个接头时,接头中的每一个可以具有相同的序列或不同的序列。在某些实施方案中,变体含有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个接头、至少六个接头。合适的接头的实例包括在图1或图17中确定的天然接头,即SEQ ID NO:4、6、8、10、12、15、18、20、22、24、26、28、30、32、34和36,或合成接头。这些野生型接头中的每一个可以位于它们的天然位置。或者,这些野生型接头中的一个或多个可以用于一个不同的接头位置,或用于多个不同的接头位置。

[0073] 任选地,这些接头中的一个或多个可以是fH序列并且是独立选择的。或者,接头中的一个或多个可以与fH是异源的,例如,来自不同的来源,无论是人工的、合成的,还是来自给fH变体赋予合适的柔性的不同蛋白。其它合适的接头的实例可以包括例如聚甘氨酸接头和提供合适的柔性的其它接头(例如http://parts.igem.org/Protein_domains/Linker),其通过引用并入本文。在某些实施方案中,接头缺乏任何fH功能。

[0074] 术语“氨基酸取代”及上文描述的其同义词意欲包括通过用另一种取代氨基酸替换一种氨基酸而对氨基酸序列进行的修饰。该取代可以是保守性取代。它也可以是非保守性取代。在提到两个氨基酸时,术语保守性意欲表示所述氨基酸共有由本领域技术人员认识到的共同性质。例如,具有疏水性非酸性侧链的氨基酸、具有疏水性酸性侧链的氨基酸、具有亲水性非酸性侧链的氨基酸、具有亲水性酸性侧链的氨基酸和具有亲水性碱性侧链的氨基酸。共同性质还可以是具有疏水性侧链的氨基酸、具有脂族疏水性侧链的氨基酸、具有芳族疏水性侧链的氨基酸、具有极性中性侧链的氨基酸、具有带电荷侧链的氨基酸、具有带

电荷的酸性侧链的氨基酸和具有带电荷的碱性侧链的氨基酸。天然存在和非天然存在的氨基酸二者均是本领域已知的并且在实施方案中可以用作取代氨基酸。替换氨基酸的方法是本领域技术人员公知的，并且包括但不限于编码氨基酸序列的核苷酸序列的突变。本文提到“一个或多个”意欲包括例如1、2、3、4、5、6或更多个的各个实施方案。

[0075] 除了本文提供的fH蛋白变体，还提供了编码这些fH蛋白变体的核酸序列。这些变体的编码序列可以来自同种型1、同种型2的前导序列和/或一个或多个SCRs的野生型序列，或非疾病相关变体。替代地或额外地，可以使用基于网络的或商业上可获得的计算机程序，以及基于服务的公司来将前导序列和/或一个或多个SCRs的氨基酸序列反向翻译为核酸编码序列，包括RNA和/或cDNA两者。参见，例如EMBOSS提供的backtranseq, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>; Gene Infinity (http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html) ; ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>)。在一个实施方案中，设计RNA和/或cDNA编码序列用于人类细胞中的最优表达。

[0076] 可以通过多种不同的方法来设计密码子优化的编码区。可以使用可在线获得的方法、公布的方法或提供密码子优化服务的公司进行这种优化。一种密码子优化方法描述于例如WO 2015/012924 A2，其通过引用并入本文。简言之，用同义密码子序列修饰编码产物的核酸序列。合适地，修饰产物的可读框(ORF)的整个长度。然而，在一些实施方案中，可以仅改变该ORF的片段。通过使用这些方法之一，人们可以将频率应用于任何给定的多肽序列，并且产生编码该多肽的密码子优化的编码区的核酸片段。

[0077] 核酸序列的上下文中的术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比同一的”是指当进行一致性比对时，两个序列中相同的碱基。序列同一性比较的长度可以是在基因组的全长、基因编码序列的全长或至少约500至5000个核苷酸的片段上或根据需要。但是，也可能需要更小片段，如至少约9个核苷酸，通常至少约20至24个核苷酸、至少约28至32个核苷酸、至少约36或更多个核苷酸的片段之间的同一性。对于核酸序列也可获得多种序列比对程序。这种程序的实例包括“Clustal W”、“CAP Sequence Assembly”、“BLAST”、“MAP”和“MEME”，它们可用通过互联网上的网络服务器存取。这种程序的其它来源是本领域技术人员已知的。或者，也使用Vector NTI工具。也有许多本领域已知的算法可以用于测量核苷酸序列同一性，包括上文描述的程序中包含的那些。作为另一个实例，可以使用GCG 6.1版中的程序FastaTM比较多核苷酸序列。FastaTM提供了查询序列与检索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性。例如，可以使用GCG 6.1版(通过引用并入本文)中提供的采用其默认参数(评分矩阵的字长6和NOPAM因数)的FastaTM测定核酸序列之间的百分比序列同一性。

[0078] 氨基酸序列的上下文中的术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比同一的”是指当进行一致性比对时，两个序列中相同的残基。可以容易地在蛋白、多肽的全长、约32个氨基酸、约330个氨基酸或其肽片段或编码测序物的对应核酸序列上测定氨基酸序列的百分比同一性。合适的氨基酸片段的长度可以是至少约8个氨基酸，并且可以最多达约700个氨基酸。通常，当提到两个不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“相似性”时，“同一性”、“同源性”或“相似性”是针对“比对的”序列测定的。“比对的”序列或“比对”是指多个核酸序列或蛋白(氨基酸)序列，其通常含有对与参照序列相比缺少或附加的碱基或氨基酸的校正。使用许多公开或商业上可获得的多序列比对程序中的任一种进

行比对。序列比对程序可供用于氨基酸序列,这些程序例如“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”、以及“Match-Box”程序。一般地,任何这些程序均以默认设置使用,尽管本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。或者,本领域技术人员可以利用另外的算法或计算机程序,该算法或程序至少提供与所提及的算法和程序提供的同一性或比对水平一致的同一性或比对水平。参见,例如,J.D.Thomson et al,Nucl.Acids.Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27 (13) :2682-2690 (1999)。

[0079] 在一个实施方案中,将本文描述的编码fH变体的核酸序列(如hfH变体基因)工程化到任何合适的遗传元件,如裸DNA、噬菌体、转座子、黏粒、RNA分子(如mRNA)、附加体等中,所述元件将其上携带的hfH序列转移到宿主细胞,例如用于在包装宿主细胞中产生携带DNA或RNA病毒载体的纳米颗粒和/或用于送递到受试者中的宿主细胞。在一个实施方案中,所述遗传元件是质粒。选择的遗传元件可以通过任何合适的方法送递,所述方法包括转染、电穿孔、脂质体送递、膜融合技术、高速DNA包被的丸粒(hight velocity DNA-coated pellets)、病毒感染以及原生质体融合。用于制备此类构建体的方法对核酸操作技术人员而言是已知的并且包括基因工程、重组工程和合成技术。参见,例如,Green and Sambrook, Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor, NY (2012)。

[0080] 如本文使用的,“表达盒”是指包含hfH变体编码序列、启动子,并且可以包含用于其的其它调节序列(如5' 和/或3' UTR序列)的核酸分子,所述盒可以工程化到遗传元件中和/或包装到病毒载体(如病毒颗粒)的衣壳中。通常,用于产生病毒载体的所述表达盒包含本文描述的hfH序列,其侧翼是病毒基因组的包装信号和其它表达控制序列,如本文描述的那些。

[0081] 表达盒通常含有启动子序列作为表达控制序列的一部分。本文描述的作为示例的质粒和载体使用鸡β-肌动蛋白。或者,可以选择另外的组成型启动子。在某些实施方案中,可以通过使用合适的载体元件,如微RNAs,实现不期望的靶细胞的脱靶(de-targeting)。额外地或替代地,选择的载体可以对期望的组织具有优先靶向作用,例如对肝具有优先靶向作用的AAV8、AAV9或AAVrh10、对眼具有优先靶向作用的AAV8、AAV1或其它AAV,等等。

[0082] 但是,将载体靶向到期望的组织对于使蛋白的表达最大化是可能是理想的。这样,可以选择肝特异性启动子。合适的启动子的实例包括甲状腺素结合球蛋白(TBG)、α1抗胰蛋白酶(A1AT);人白蛋白Miyatake et al., J.Viro., 71:512432 (1997), humAlb;和乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig et al., Gene Ther., 3:10029 (1996)]、TTR最小增强子/启动子、α-抗胰蛋白酶启动子、LSP(845nt) 25(要求无内含子的scAAV)。或者,可以使用其它肝特异性启动子[参见例如肝特异性基因启动子数据库,Cold Spring Harbor, <http://rulai.sch1.edu/LSPD>。或者,当期望靶向另外的组织时,可以选择不同的组织特异性启动子。启动子可以来源于任何物种。例如,为了用于眼,可以选择例如视网膜色素上皮(RPE)启动子或光感受器启动子。在另一实施方案中,启动子是人G蛋白偶联的受体蛋白激酶1(GRK1)启动子(Genbank编号AY327580)。在另一实施方案中,启动子是GRK1启动子的292nt片段(第1793-2087位)(也参见Beltran et al, Gene Therapy 201017:1162-74,其通过引用并入本文)。在另一优选实施方案中,启动子是人光感受器间类视黄醇结合蛋白近侧

(IRBP) 启动子。在另一实施方案中,启动子是要表达的基因的天然启动子。在一个实施方案中,启动子是RPGR近侧启动子(Shu et al, IOVS, 2012年5月,其通过引用并入本文)。在本发明中有用的其它启动子包括但不限于视杆视蛋白启动子、红-绿视蛋白启动子、蓝视蛋白启动子、cGMP-β-磷酸二酯酶启动子、小鼠视蛋白启动子(上文引用的Beltran et al 2010)、视紫红质启动子(Mussolino et al, Gene Ther, July 2011, 18 (7) :637-45);视锥转导蛋白的α亚基(Morrissey et al, BMC Dev Biol, Jan 2011, 11:3);β磷酸二酯酶(PDE)启动子;色素性视网膜炎(RP1)启动子(Nicord et al, J. Gene Med, Dec 2007, 9 (12) :1015-23);NXNL2/NXNL1启动子(Lambard et al, PLoS One, Oct. 2010, 5 (10) :e13025)、RPE65启动子;视网膜变性慢/外周蛋白2(Rds/perph2)启动子(Cai et al, Exp Eye Res. 2010 Aug; 91 (2) :186-94);和VMD2启动子(Kachi et al, Human Gene Therapy, 2009 (20):31-9))。光感受器特异性启动子的实例包括但不限于视杆视蛋白启动子、红-绿视蛋白启动子、蓝视蛋白启动子、光感受器间结合蛋白(IRBP)启动子和cGMP-β-磷酸二酯酶启动子。或者,可以在本文描述的载体中使用其它启动子,如病毒启动子、组成型启动子、可调节的启动子[参见例如WO 2011/126808和WO 2013/04943]或应答于生理暗示的启动子。

[0083] 除了启动子,表达盒和/或载体可以包含其它合适的转录起始、终止、增强子序列、有效的RNA加工信号如剪接和多腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强转录效率的序列(如Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;以及当期望时,增强编码的产物的分泌的序列。合适的polyA序列的实例包括例如SV40、牛生长激素(bGH)、兔β球蛋白和TK polyA。合适的增强子的实例包括例如甲胎蛋白增强子、TTR最小启动子/增强子、LSP(TH结合球蛋白启动子/α1-微球蛋白/尿抑胰酶素增强子),等等。

[0084] 这些控制序列“可操作性连接”于fH基因序列。如本文使用的,术语“可操作性连接”是指与感兴趣的基因邻接的表达控制序列和反式作用或隔开一定距离作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列这两者。

[0085] 表达盒可以工程化到用于药物递送或用于病毒载体生产的质粒上。合适的病毒载体优选是复制缺陷的,并且选自靶向眼细胞的那些。病毒载体可以包括任何适用于可使用的基因治疗的病毒,包括但不限于腺病毒;疱疹病毒;慢病毒;逆转录病毒;细小病毒等。

[0086] 合适地,当产生这些载体之一时,其作为复制缺陷病毒载体产生。“复制缺陷病毒”或“病毒载体”是指合成或重组的病毒颗粒,其中含感兴趣的基因的表达盒包装在病毒衣壳或被膜中,其中也包装在病毒衣壳或被膜中的任何病毒基因组序列是复制缺陷的,即,它们不能产生后代病毒体,但保持了感染靶细胞的能力。在一个实施方案中,病毒载体的基因组不包含编码复制所需的酶的基因(基因组可以工程化为“无内容的”-仅仅含有侧翼为人工基因组的扩增和包装所需信号的感兴趣的转基因),但是这些基因可以在生产过程中提供。因此,认为它对于在基因治疗中使用是安全的,因为除了存在复制所需的病毒酶,不能发生后代病毒体的复制和感染。

[0087] 在一个实施方案中,病毒载体是腺伴随病毒(AAV)。腺伴随病毒(AAV)病毒载体是AAV DNA酶抗性颗粒,其具有AAV蛋白衣壳,该衣壳中包装了用于递送到靶细胞的核酸序列。AAV衣壳由60个衣壳蛋白亚基,即取决于选择的AAV,以大约1:1:10至1:1:20的比例以二十面体对称排列的VP1、VP2和VP3组成。

[0088] 本文描述的研究利用AAV8作为示例的载体。如本文使用的,“AAV8衣壳”是指具有

GenBank编号:YP_077180(其通过引用并入本文)的编码的氨基酸序列的AAV8衣壳。本发明包括从该编码的序列的一些变异,其可以包括与GenBank编号:YP_077180;美国专利7,282,199,7,790,449;8,319,480;8,962,330;US 8,962,332中提到的氨基酸序列具有约99%同一性的序列(即,与提到的序列有小于约1%变异)。在另一实施方案中,AAV8衣壳可以具有W02014/124282(其通过引用并入本文)中描述的AAV8变体的VP1序列。已经描述了生产衣壳、其编码序列的方法和用于生产rAAV病毒载体的方法。参见例如Gao, et al, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100(10),6081-6086(2003),US 2013/0045186A1和WO 2014/124282。在某些实施方案中,选择对期望的靶细胞,如肝、光感受器、RPE或其它眼细胞显示趋向性的AAV8变体。例如,AAV8衣壳可以具有Y447F、Y733F和T494V突变(也称作"AAV8(C&G+T494V)"和"rep2-cap8(Y447F+733F+T494V)"),如2013年4月26日在线公开的Kay et al, Targeting Photoreceptors via Intravitreal Delivery Using Novel,Capsid-Mutated AAV Vectors,PLoS One.2013;8(4):e62097(其通过引用并入本文)的描述。参见例如Mowat et al,Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach,Gene Therapy 21,96-105(2014年1月),其通过引用并入本文。在另一实施方案中,AAV衣壳是AAV8bp衣壳,其优先靶向双极细胞。参见WO 2014/024282,其通过引用并入本文。

[0089] 可以选择其它AAV血清型作为AAV病毒载体(DNA酶抗性病毒颗粒)的衣壳的来源,包括例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、rh8[参见例如美国公开专利申请号2007-0036760-A1;美国公开专利申请号2009-0197338-A1;EP 1310571]。也参见WO 2003/042397(AAV7和其它猿猴AAV),美国专利7790449和美国专利7282199(AAV8),WO 2005/033321和US 7,906,111(AAV9),以及WO 2006/110689],和rh10[WO 2003/042397]、其变体、或有待发现的、或基于其的重组AAV,可以用作AAV衣壳的来源。这些文件也描述了可以选择用于产生AAV的其它AAV,并且通过引用并入本文。在一些实施方案中,可以通过前述AAV Caps之一或其编码核酸的诱变(即通过插入、缺失或取代)产生用于病毒载体的AVV cap。在一些实施方案中,AAV衣壳是嵌合的,包含来自两种或三种或四种或更多种前述AAV衣壳蛋白的结构域。在一些实施方案中,AAV衣壳是来自两种或三种不同的AAVs或重组AAVs的VP1、VP2和VP3单体的镶嵌型。在一些实施方案中,rAAV组合物包含多于一种前述Caps。

[0090] 为了将表达盒包装到病毒体中,ITRs是仅有的需要以顺式与基因存在于同一构建体中的AAV成分。在一个实施方案中,从AAV基因组除去复制(rep)和/或衣壳(cap)的编码序列,并且反式提供或通过包装细胞系提供以产生AAV载体。例如,如上文所述,假型AAV可以包含来自与AAV衣壳的来源不同的来源的ITRs。额外地或替代地,可以使用嵌合AAV衣壳。可以选择其它的AAV成分。所述AAV序列的来源在本文中描述并且也可以分离自或获自学术、商业或公共来源(如美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA)。或者,可以通过参考公开序列如文献或数据库中可获得的那些,通过合成或其它合适的方法获得AAV序列,所述数据库例如,如GenBank®、PubMed®等等。

[0091] 将表达盒包装到AAV病毒颗粒中所需的最小序列是AAV 5' 和3' ITRs,其可以与衣壳具有相同的AAV来源,或具有不同的AAV来源(以产生AAV假型)。在一个实施方案中,为了方便以及加速管理机构批准,使用来自AAV2的ITR序列或者其缺失形式(Δ ITR)。然而,可以

选择来自其它AAV来源的ITRs。在ITRs的来源是来自AAV2并且AAV衣壳是来自另一种AAV来源的情况下,所得载体可以被称为假型。通常,AAV载体的表达盒包含AAV 5' ITR、编码序列和任何调节序列,以及AAV 3' ITR。但是,这些元件的其它构型也可以是合适的。已经描述过5' ITR的缩短形式,其称作 Δ ITR,其中缺失了D-序列和末端决定位点(terminal resolution site,trs)。在其它实施方案中,使用全长AAV 5' 和3' ITRs。

[0092] 缩写“sc”是指自身互补的。“自身互补的AAV”是指具有表达盒的质粒或载体,所述表达盒中由重组AAV核酸序列携带的编码区已被设计为形成分子内双链DNA模板。一旦感染,不是等待细胞介导的第二条链合成,而是scAAV的两个互补的一半将缔合以形成准备立即复制和转录的一条双链DNA(dsDNA)。参见例如D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (2001年8月),第8卷,第16号,第1248-1254页。自身互补的AAVs描述于例如美国专利号6,596,535;7,125,717;以及7,456,683,这些专利各自通过全文引用并入本文。

[0093] 用于产生和分离适用于送递至受试者的AAV病毒载体的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利7790449;美国专利7282199;W0 2003/042397;W0 2005/033321、W0 2006/110689;以及US 7588772 B2]。在一个系统中,用编码侧翼为ITRs的转基因的构建体以及编码rep和cap的构建体瞬时转染生产细胞系。在第二系统中,用编码侧翼为ITRs的转基因的构建体瞬时转染稳定提供rep和cap的包装细胞系。在这些系统的每种系统中,反应于用辅助腺病毒或疱疹病毒感染而产生AAV病毒体,需要从污染病毒中分离rAAVs。最近以来,已开发了不需要用辅助病毒感染来回收AAV的系统—通过该系统还反式提供需要的辅助功能(即,腺病毒E1、E2a、VA和E4或疱疹病毒UL5、UL8、UL52和UL29、以及疱疹病毒聚合酶)。在这些较新的系统中,可以通过用编码需要的辅助功能的构建体瞬时转染细胞来提供辅助功能,或者细胞可以被工程化为稳定包含编码辅助功能的基因,所述基因的表达可以被控制在转录水平或转录后水平。在另一种系统中,通过用基于杆状病毒的载体进行感染来将侧翼为ITRs的转基因和rep/cap基因引入到昆虫细胞中。关于这些产生系统的综述,通常参见,例如,Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929,这些文献各自的内容通过全文引用并入本文。用于制备和使用这些和其它AAV产生系统的方法还描述于以下美国专利中,这些美国专利各自的内容通过全文引用并入本文:5,139,941;5,741,683;6,057,152;6,204,059;6,268,213;6,491,907;6,660,514;6,951,753;7,094,604;7,172,893;7,201,898;7,229,823;和7,439,065。通常参见例如Grieger&Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv.Biochem.Engin/Biotechnol. 99:119-145; Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J.Gene Med. 10:717-733;以及下文引用的参考文献,所述文献各自通过全文引用并入本文。用于构建本发明的任何实施方案的方法对核酸操作技术人员而言是已知的并且包括基因工程、重组工程和合成技术。参见例如Green and Sambrook et al, Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY(2012)。类似地,生产rAAV病毒体的方法是公知的,并且合

适方法的选择不是对本发明的限制。参见例如K.Fisher et al, (1993) J.Virol., 70:520-532和美国专利号5,478,745。

[0094] 任选地,可以通过rAAV之外的病毒载体送递本文描述的fH基因。所述其它的病毒载体可以包括任何适用于可使用的基因治疗的病毒,包括但不限于腺病毒;疱疹病毒;慢病毒;逆转录病毒;等等。合适地,当制备这些其它载体之一时,其作为复制缺陷病毒载体产生。

[0095] “复制缺陷病毒”或“病毒载体”是指合成或人工的病毒颗粒,其中含感兴趣的基因的表达盒包装在病毒衣壳或被膜中,其中也包装在病毒衣壳或被膜中的任何病毒基因组序列是复制缺陷的,即,它们不能产生后代病毒体,但保持了感染靶细胞的能力。在一个实施方案中,病毒载体的基因组不包含编码复制所需的酶的基因(基因组可以工程化为“无内容的”-仅仅含有侧翼为人工基因组的扩增和包装所需信号的感兴趣的转基因),但是这些基因可以在生产过程中提供。因此,认为它对于在基因治疗中使用是安全的,因为除了存在复制所需的病毒酶,不能发生后代病毒体的复制和感染。

[0096] 本文描述的药物组合物被设计用于送递到需要其的受试者,所述送递是通过任何合适的途径或不同途径的组合,例如直接送递到肝(任选通过静脉内、通过肝动脉或通过移植)、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内和其它肠胃外施用途径。本文描述的病毒载体可以在单一组合物或多个组合物中送递。任选地,可以送递两种或更多种不同的AAV,或多种病毒[参见例如WO 2011/126808和WO 2013/049493]。在另一实施方案中,多种病毒可以包括不同的复制缺陷病毒(如AAV和腺病毒)。

[0097] 可以用生理学可接受的载体配制复制缺陷病毒,以用于基因转移和基因治疗应用。在AAV病毒载体的情况下,可以将基因组拷贝(GC)的定量用作制剂中包含的剂量的测量标准。可以用本领域已知的任何方法测定本发明的复制缺陷病毒组合物的基因组拷贝(GC)数。一种用于进行AAV GC数滴定的方法如下:首先用DNA酶处理纯化的AAV载体样品以从生产过程除去未包被衣壳的AAV基因组DNA或污染性质粒DNA。然后使DNA酶抗性颗粒进行热处理以从衣壳释放基因组。然后使用靶向病毒基因组的特定区域(通常是多腺苷酸化信号)的引物/探针组通过实时PCR对释放的基因组进行定量。

[0098] 复制缺陷病毒组合物也可以配制为剂量单位,以对于人患者包含范围为约 1.0×10^9 GC至约 1.0×10^{15} GC(用于治疗体重为70kg的普通受试者),优选 1.0×10^{12} GC至 1.0×10^{14} GC的量的复制缺陷病毒。在另一实施方案中,剂量小于约 1.5×10^{11} GC/kg。例如,AAV病毒的剂量可以是约 1×10^9 GC,约 5×10^9 GC,约 1×10^{10} GC,约 5×10^{10} GC,或约 1×10^{11} GC。在另一实例中,可以以约0.001mg至约10mg/kg的量送递变体。

[0099] 可以根据公开的方法将上文描述的重组载体送递到宿主细胞。rAAV(优选地悬浮于生理相容的载体中)可以施用于人或非人哺乳动物受试者。合适的载体可以由本领域技术人员根据转移病毒所针对的适应症容易地选择。例如,一种合适的载体包括可以用多种缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)配制的盐水。其他示例性载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油以及水。载体的选择不是本发明的限制。

[0100] 任选地,除了rAAV和/或变体和载体,本发明的组合物可以包含赋形剂,包括其它非活性常规药学成分,如防腐剂、化学稳定剂、悬浮剂和/或表面活性剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯类、乙基香兰

素、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。任选地，对于基于蛋白或基于抗体的组合物，可以选择适于固体组合物的赋形剂，包括例如，填充剂、珠、膨胀剂、崩解剂、助流剂、香料、着色剂或其它成分。

[0101] 本文描述的病毒载体和其它构建体可以用于制备药物，所述药物用于将fH变体递送至需要其的受试者、给受试者提供具有增加的半衰期的fH变体，和/或用于治疗补体相关病症。

[0102] 疗程可以任选包括重复施用相同的病毒载体(如AAV8载体)或不同的病毒载体(如AAV8和AAVrh10)。例如，当靶向于肝时，由于天然肝细胞增殖导致的表达稀释，重复施用可能理想的是超过18个月、两年或更长时间段。可以使用本文描述的病毒载体选择病毒治疗和基于蛋白的治疗的其它组合。任选地，本文描述的组合物可以组合在包括其它抗补体药物(如单克隆抗体等)或基于蛋白的治疗(包括例如递送包含本文描述的一种或多种fH变体的组合物)的方案中。

[0103] 例如，可以以蛋白形式递送本文描述的工程化的hfH变体。任选地，当以蛋白形式递送至受试者时，fH变体可以具有前导序列，或可以缺乏全部或部分前导序列。任选地，基于蛋白的治疗可以与病毒介导的hfH变体的施用一起使用。在一个实施方案中，fH蛋白可以给受试者提供立即释放形式的hfH，例如，施用后2小时内的可检测的血浆水平，其通常在约24至约48小时内，或至约72小时内(如果发现从病毒介导的递送系统开始表达存在任何延迟时间)开始从受试者清除。在另一实施方案中，进一步修饰hfH变体以延长其半衰期，这是通过将至少一个糖基化位点工程化到变体中，工程化到变体中存在的至少一个SCRs中、变体中存在的至少两个SCRs中、变体中存在的至少三个SCRs，或更多个SCRs中。例如，可以将糖基化位点工程化到SCR1、SCR2、SCR3、SCR4、SCR19和/或SCR20的一个或多个中。在另一实施方案中，SCR17和/或SCR18被额外地或替代地糖基化。在另一实施方案中，SCR4、17和18被糖基化。在某些实施方案中，糖基化位点可以工程化到接头中。但是，在这种情况下，接头优选是至少6个氨基酸的长度至约18个氨基酸的长度，如8-18、10-15或12个氨基酸。额外地或替代地，工程化的hfH蛋白变体可以聚乙二醇化，即，使用已知技术用聚乙二醇部分修饰[参见例如Fee,Conan J.;Van Alstine,James M.(2006)."PEG-proteins:Reaction engineering and separation issues".Chemical Engineering Science 61(3):924]。

[0104] 如本文使用的，糖基化位点是指寡糖与碳原子(C-连接的)、氮原子(N-连接的)或氧原子(O-连接的)连接的位点，或糖化(将还原糖非酶促连接到蛋白的氮原子(如作为Asn-X-Ser/Thr的部分的天冬酰胺(Asn)侧链的氮原子，其中X是除pro之外的任何氨基酸)的位点。在某些实施方案中，N-糖基化位点是理想的。本领域已知多种用于工程化N-糖基化位点的技术。参见例如Y Liu et al,Biotech Prog 2009 Sep-Oct;25(5):1468-1475;Sala RJ, Griebenow K.Glycosylation of therapeutic proteins:an effective strategy to optimize efficacy.BioDrugs.2010 Feb 1;24(1):9-21。

[0105] 此外，可以用合适的载体和/或赋形剂配制本文提供的工程化的hfH变体，用于通过任何合适的途径递送至受试者。除了常规的悬浮液载体，载体可以是脂质体或纳米载体。hfH变体的合适剂量包括实现用于治疗补体相关病症的足够血浆水平的那些。hfH变体的剂量的实例包括但不限于约0.01μg/kg至约300mg/kg、或约0.1μg/kg至约40mg/kg内、或约1μg/kg至约20mg/kg内、或约1μg/kg至约10mg/kg内中任意一个的剂量范围内的有效量。例如，

当眼内施用时,组合物可以以低微克范围施用,包括例如约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或更低、约0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或更低,或0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或更低。在一些实施方案中,给个体施用的hFH变体的量是约10 μg 至约500mg每剂、或约10 μg 至约50 μg 、约50 μg 至约100 μg 、约100 μg 至约200 μg 、约200 μg 至约300 μg 、约300 μg 至约500 μg 、约500 μg 至约1mg、约1mg至约10mg、约10mg至约50mg、约50mg至约100mg、约100mg至约200mg、约200mg至约300mg、约300mg至约400mg、或约400mg至约500mg每剂。

[0106] 药物组合物可以单独施用。任选地,本文描述的组合物可以与已知具有有益效果的其它分子组合施用。例如,有用的辅因子包括缓解症状的辅因子,包括杀菌剂、抗生素、抗病毒剂和抗真菌剂以及镇痛剂、抗炎药、麻醉剂。在另一实施方案中,在考虑眼内施用的情况下,有助于视网膜附着或治疗受损视网膜组织的分子可能是理想。有用的辅因子的实例包括抗VEGF剂(如抗VEGF的抗体)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、axokine(CNTF的一种突变蛋白)、白血病抑制因子(LIF)、神经营养蛋白3(NT-3)、神经营养蛋白-4(NT-4)、神经生长因子(NGF)、胰岛素样生长因子II、前列腺素E2、30kD存活因子、牛磺酸和维生素A。另外的合适的治疗剂可以包括抗补体抗体,如抗补体调节物C3(例如,诸如可作为依库珠单抗商业上获得)。

[0107] 本文描述的组合物(载体介导的和基于蛋白的两者)可以通过任何途径施用于受试者,所述途径包括但不限于静脉内(例如通过输液泵)、腹膜内、眼内、动脉内、肺内、口服、吸入、囊内(intravesicular)、肌肉、气管内、皮下、眼内(包括玻璃体内和视网膜内)、鞘内、经皮、经胸膜、动脉内、局部、吸入(如作为喷雾)、粘膜(如经鼻粘膜)、皮下、经皮、胃肠道、关节内、脑池内、心室内、直肠(即通过栓剂)、阴道(即通过阴道栓)、颅内、尿道内、肝内和肿瘤内。在一些实施方案中,组合物是全身施用(例如通过静脉注射)。在一些实施方案中,组合物是局部施用(例如通过动脉内或眼内注射)。

[0108] 因此,另一方面,药物组合物在治疗补体相关病症中的用途,所述补体相关病症包括例如,补体因子H相关病症,诸如本文描述的,和其它补体相关病症,包括但不限于:由于急性心肌梗塞后的缺血-再灌注导致的组织损伤、动脉瘤、中风、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭、低血容量性休克肠缺血、脊髓损伤和创伤性脑损伤;炎性病症,如烧伤、内毒素血症和感染性休克、成人呼吸窘迫综合征、心肺转流术、血液透析;过敏性休克、严重哮喘、血管性水肿、克罗恩氏病、镰状细胞贫血、链球菌感染后肾小球肾炎、膜性肾炎和胰腺炎;移植排斥,如超急性异种移植排斥;妊娠相关疾病如复发性流产和先兆子痫;不良药物反应,如药物过敏、IL-2诱导的血管渗漏综合征和放射摄影造影介质过敏;以及自身免疫病,包括但不限于重症肌无力、阿尔茨海默病、多发性硬化、肺气肿、肥胖、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、胰岛素依赖性糖尿病、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、抗磷脂抗体综合征、自身免疫性肝炎、克罗恩氏病、古德帕斯彻综合征、格雷夫斯病、格-巴综合征、桥本氏病、特发性血小板减少性紫癜、天疱疮、干燥综合征和高安动脉炎、心肺转流术后并发症;心肌梗塞;缺血/再灌注损伤;中风;急性呼吸窘迫综合征(ARDS);脓毒症;烧伤;与心肺转流术和血液透析相关的炎症;血浆置换;血小板分离;白细胞分离;体外膜式人工氧合法(ECMO);肝素诱导的体外LDL沉淀(HELP);放射摄影造影介质诱导的过敏反应;移植排斥。

[0109] 应该注意,术语“一个”或“一种”是指一个或多个。因此,术语“一个(或一种)”、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可以互换使用。

[0110] 词语“包括”、“包含”和“含有”意欲解释为开放式而不是封闭式。词语“组成”、“由…组成”及其变化形式意欲解释为封闭式而不是开放式。尽管说明书中的很多实施方案是使用“包含”语言介绍的，在其它情况下，相关实施方案也意欲使用“由…组成”或“基本由…组成”语句解释和描述。

[0111] 如本文使用的，除非另有说明，术语“约”表示从给定的参照值的10%的变化。

[0112] 本文使用的术语“调节”或其变化形式是指组合物抑制生物途径的一个或多个成分的能力。

[0113] 除非本文中另有说明，纯合受试者和杂合受试者两者都包括在短语具有补体介导的病症的受试者的范围内。

[0114] “受试者”是哺乳动物，如人、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪或非人灵长类动物，如猴、黑猩猩、狒狒或大猩猩。

[0115] 如本文使用的，除非另有说明，“疾病”、“病症”、“功能障碍”和“状况”可以互换使用，用于表示受试者中的异常状况。

[0116] 除非本说明书中另有定义，本文使用的技术和科学术语与本领域普通技术人员和对公开文本的引用所通常理解的含义相同，所述公开文本给本领域技术人员提供了对本申请使用的很多术语的一般指导。

[0117] 以下实施例仅仅是用作说明的，并且不意欲限制本发明。

实施例

[0118] 人因子H截短变体(hfH1-4.678.19-20)的工程化和克隆：

根据制造商的流程，使用Phusion高保真度DNA聚合酶(目录号M0530S, New England Biolabs)通过反向PCR方法制备截短变体。用作反向PCR的模板的全长人补体因子H cDNA pCMV Sport6获自Thermo Fisher Scientific(目录号MHS6278-202800294, 克隆ID40148771)。用于制备hfH1-4.678.19-20的PCR引物列于表1。在0.8%琼脂糖凝胶上分离并且通过AccuPrep凝胶提取试剂盒(目录号K-3035,Bioneer)提取PCR片段后，将50ng凝胶纯化的片段用于通过快速DNA连接试剂盒(目录号K-4123,Thermo Fisher Scientific)连接并且转化到DH5 α 感受态细胞(目录号1825801, Invitrogen)中。通过限制酶切消化或通过使用特异性引物的PCR筛选，证实阳性克隆。然后，通过EcoR I和Not I消化从pCMV Sport6释放hfH1-4.678.19-20插入片段，并且通过末端修复组件(目录号E6050S, New England Biolabs)将凝胶纯化的片段平端化，并且纯化。将该片段在EcoR V位点亚克隆到pCBABG载体(其具有带有CMV增强子的鸡 β -肌动蛋白启动子和同一基因的部分内含子序列，和兔 β -球蛋白基因多腺苷酸化信号序列)中。通过限制酶切消化和PCR方法选择阳性克隆。

[0119] 表1：

hfH截短变体引物:	
hfHdSCR5R SEQ ID NO:49	TGA TTT TTC TTC ACA TGA AGG CAA CGG
hfHdSCR5F SEQ ID NO:50	ACC TTG AAA CCT TGT GAT TAT CCA GAC A
hfHdSCR9-18R SEQ ID NO: 51	AGA TTT AAT GCA CGT GGG TTG AGC
hfHdSCR9-18F SEQ ID NO: 52	AAA GAT TCT ACA GGA AAA TGT GGG CC

[0120] 人因子H截短变体hfH1-4.678.17-20的工程化和克隆：

根据制造商的流程, 使用Phusion高保真度DNA聚合酶(目录号M0530S, New England Biolabs)通过反向PCR方法制备截短变体。全长人补体因子H cDNA pCMV Sport6(用作反向PCR的模板)获自Thermo Fisher Scientific(目录号MHS6278-202800294, 克隆ID 40148771)。用于制备hfH1-4.678.17-20的PCR引物列于表1。在0.8%琼脂糖凝胶上分离并且通过AccuPrep凝胶提取试剂盒(目录号K-3035, Bioneer)提取PCR片段后, 将50ng凝胶纯化的片段用于通过快速DNA连接试剂盒(目录号K-4123, Thermo Fisher Scientific)连接并且转化到DH5 α 感受态细胞(目录号1825801, Invitrogen)中。通过限制酶切消化或通过使用特异性引物的PCR筛选, 证实阳性克隆。然后, 通过infusion克隆方法(Clontech目录号638909), 将pCMV Sport6中的工程化的hfH1-4.678.17-20变体在EcoRI位点亚克隆到pCBABG载体中。用于截短蛋白制备和克隆到表达载体中的引物示于表2中。

[0121] 表2:

hfH截短变体引物:	
hfHdSCR5R SEQ ID NO: 49	TGA TTT TTC TTC ACA TGA AGG CAA CGG
hfHdSCR5F SEQ ID NO: 50	ACC TTG AAA CCT TGT GAT TAT CCA GAC A
hfHdSCR9-16R SEQ ID NO: 53	AGA TTT AAT GCA CGT GGG TTG AGC
hfHdSCR9-16F SEQ ID NO: 54	ATAAAAACAGATTGTCTCAGTTACCTAGCT
pCBAGhfH-ORF F SEQ ID NO: 55	TTTTGGCAAAGAATTGGACGTTGTGAAACAGAGTT
pCBAGhfH-ORF R SEQ ID NO: 56	CCTGAGGAGTGAATTCTATCTTTGCACAAGTTGG

[0122] 重组hfH1-4.678.19-20蛋白的表达和纯化:

将阳性克隆 (pCBARG载体中的hfH1-4.678.19-20) 转染到HEK细胞中,以评估 hfH1-4.678.19-20蛋白的稳定性和功能活性。根据制造商的说明书,使用Lipofectamine 2000(目录号11668019, Invitrogen),用pCBARG中的hfH1-4.678.19-20cDNA转染6孔板(Falcon, 目录号353046) 中的约80%汇合的HEK细胞。使用山羊抗人因子H IgG(目录号A237, Complement tech), 通过蛋白印迹证实蛋白表达。为了大规模蛋白表达,根据制造商的说明书, 使用无内毒素的、pCBARG质粒中的hfH1-4.678.19-20cDNA与PEI(目录号23966, Polysciences)一起转染150cm²培养皿(Falcon, 目录号353025) 中的80%汇合的HEK细胞。转染后两天,从平板收集上清液,通过0.2μm过滤器进行过滤,并且加样到PBS平衡的Ox-23(对SCR 2/3特异的小鼠抗人fH mAb, 目录号10402-1VL, Sigma) 琼脂糖亲和柱上。用25倍柱体积的含有500mM NaCl的PBS洗涤后,用100mM甘氨酸盐酸盐pH2.7洗脱结合的hfH1-4.678.19-20,并且用200μl的1.5M Tris-HCl pH 8.5中和洗脱的组分(每组分2ml)。通过SDS-PAGE检查洗脱的蛋白纯度,合并纯的组分,用PBS(更换两次)透析过夜。

[0123] 小鼠因子H截短变体(mfH1-4.678.19-20)的工程化和克隆:

根据制造商的流程,使用Phusion高保真度DNA聚合酶通过反向PCR方法制备截短变体。用作反向PCR的模板的pBluescript SK(-)中的全长小鼠补体因子H cDNA由M. Nonaka博士馈赠(日本东京大学, NCBI NM 009888.3的核苷酸110-4361)。用于制备mfH1-4.678.19-20变体的所有PCR引物列于表3。在0.8%琼脂糖凝胶上分离并且通过AccuPrep凝胶提取试剂盒提取PCR片段后,将50ng凝胶纯化的片段用于通过快速DNA连接试剂盒连接并且转化到DH5α感受态细胞中。通过限制酶切消化或通过使用特异性引物的PCR筛选,证实阳性克隆。然后,通过Sma I和EcoR V消化释放来自pBluescript SK(-)的mfH1-4.678.-19-20插入片段并且凝胶纯化。将该片段在EcoR V位点亚克隆到pCBABG载体中。通过限制酶切消化和PCR方法选择阳性克隆。

[0124] 表3:

mfH截短变体引物:	
dSCR5R SEQ ID NO: 57	TCTCTTTCTTCACAGAAAGGCTGAGAACTCC
dSCR5F SEQ ID NO: 58	ACC TTG AAA CCA TGT GAA TTT CCA CAA TTC
dSCR9-18F SEQ ID NO: 59	CGA GAC TCA ACA GGG AAA TGT GG
dSCR9-18R SEQ ID NO: 60	AGA CTT AAT GCA TGA GGG TTG AGG T

[0125] 重组mfH1-4.678.19-20蛋白的表达:

将阳性克隆 (pCBARG载体中的mfH1-4.678.19-20) 转染到Hepa1C1C7细胞(小鼠肝细胞瘤细胞系, ATCC® CRL-2026) 中,以评估mfH1-4.678.19-20蛋白的稳定性和功能活性。根据制造商的说明书, 使用Lipofectamine 2000, 用mfH1-4.678.19-20cDNA转染6孔板中的约80%汇合的细胞。使用兔抗小鼠fH IgG(Ref#1), 通过蛋白印迹证实蛋白表达。使用

Pierce ECLplus蛋白印迹底物(目录号80196,Thermo Fisher Scientific)显现印迹。

[0126] AAV转移质粒和病毒的制备:

通过Hinc II和Pst I消化,释放来自pCBARG载体的mfH1-4.678.19-20或hfH1-4.678.19-20表达盒,并且用末端修复组件(目录号E6050S,NEB)将凝胶纯化的片段平端化,并连接到Nhe I和Xho I消化并平端化的pAAV TBG.PI.EGFP.WPRE.BGH载体(目录号PL-C-PV0146)中,所述载体来自宾夕法尼亚大学载体中心(Vector Core)(<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>)。通过Sma I消化筛选阳性克隆。

[0127] 通过使用Infusion克隆方法在表达盒的5'末端(SEQ ID NO:61:ctgcgcgctcgctc gctcaactgaggcccccggcaaagcccggtcgacccggcgttcggcgtttggcccccggcctcagtgagcgagcgagcg cgcagagagg-gagtggccaactcc-atcacttagggttcctttagttaat,在HincII位点)和3'末端(SEQ ID NO:62:attaaactacaaggaaccctagtatggagttggccactccctctcgccgcgtcgctcactgaggccggcgaccaaaggctgc ccgacgccccggcttgcggcggcctcagtgagcgagcgagcg cag,在Pst I位点)插入ITRs(反向末端重复序列),将携带hfH1-4.678.17-20的pCBABG载体修饰为AAV转移质粒。用于扩增用作模板的来自pENN-AAV.TBG.PI.RBG载体的AAV ITRs的引物列于表4。pENN-AAV.TBG.PI.RBG载体获自宾夕法尼亚大学载体中心(<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>) (目录号PL-C-PV1015)。

[0128] 表4

ITR 插入引物	
Hinc II 5'ITR F SEQ ID NO: 63	AAGTGCCACCTGGTCGACGCTGCGCGCTCGCTCGCT
Hinc II 5'ITR R SEQ ID NO: 64	TCAATAATCAATGTCGACATTAACATAAGGAACCCCT
Pst I 3'ITR F SEQ ID NO: 65	GAAGATCCCTCGACCTGCAGATTAACATAAGGAACCCCT
Pst I 3'ITR R SEQ ID NO:66	ACGCCAAGCTTGGGCTGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTC

[0129] 通过无内毒素质粒试剂盒(目录号12362,Qiagen)制备超螺旋的无内毒素AAV质粒,并且用于由宾夕法尼亚大学载体中心或马萨诸塞大学基因治疗中心载体中心生产AAV病毒。编码mfH1-4.678.19-20、hfH1-4.678.19-20或hfH1-4.678.17-20的AAV的包装、纯化和滴度测定是通过使用描述的标准程序完成的(<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/production.shtml>)。

[0130] hfH1-4.678.19-20和hfH1-4.678.17-20AAV在fH^{m/m}小鼠中的疗效:

发生C3肾小球病的fH^{m/m}小鼠的制备以前已经描述于以下文献中:Lesher et al (2013)"Combination offactor H mutation andproperdin deficiency causes severe C3 glomerulonephritis",J Am Soc Nephrol.2013Jan;24(1):53-65,Epub 2012年11月30日。为了测试hfH1-4.678.19-20和hfH1-4.678.17-20在治疗C3肾小球病中的表达水平、持续时间和疗效,通过眼眶后途径给10-12周龄的fH^{m/m}小鼠注射3x 10¹²个基因拷贝/小鼠(对

于hfH1-4.678.19-20)或 1×10^{11} - 1×10^{12} 个基因拷贝/小鼠(对于hfH1-4.678.17-20)。在分开的小鼠组中,对照AAV载体(pAAV.TBG.NULL.rBG)用作对照。从以前的研究知道天然的人fH在抑制小鼠中的旁路途径(AP)补体活化中是功能上有活性的(Fakhouri,F.,et al,Kidney International(2010)78,279-286;2010年5月5日在线公开)。在注射前和注射后1周(对于hfH1-4.678.19-20)或注射后1、2周、1、2、3个月(对于hfH1-4.678.17-20)通过眼眶后放血采集血液。发生自发性C3肾小球病的fH^{m/m}小鼠的特征在于不受控制的血浆AP补体活化,导致C3、因子B(fB)和C5消耗以及C3和C5b-9的显著肾小球沉积(Lesher et al 2013)。如果hfH1-4.678.19-20或hfH1-4.678.17-20在fH^{m/m}小鼠中是功能上有活性的,人们会预期C3和fB消耗的减少。因此,作为hfH1-4.678.19-20和hfH1-4.678.17-20的疗效的读出结果,我们在AAV注射到fH^{m/m}小鼠之前和之后通过蛋白印迹检查了血浆C3和fB的水平。用样品缓冲液稀释小鼠血浆(1μl),煮沸,然后在还原条件下加样到4-20%梯度的SDS-PAGE凝胶上。然后将样品转移到PVDF膜上,并且用合适的抗体探测。为了检测C3和fB,将HRP缀合的山羊抗小鼠C3 Ab(1:4000,MP Biomedicals目录号0855557)或亲和纯化的山羊抗人fB Ab(与小鼠fB交叉反应;1:2500,目录号A235,Complement Technology)用作第一抗体,然后是HRP缀合的兔抗山羊IgG(1:4000,目录号1721034,Bio-Rad)。使用Pierce ECL Plus蛋白印迹底物显现印迹。

[0131] 小鼠血液中hfH1-4.678.19-20或hfH1-4.678.17-20蛋白的检测:

为了检测AAV治疗的fH^{m/m}小鼠中hfH1-4.678.19-20或hfH1-4.678.17-20的存在,开发和使用了ELISA方法。简言之,将96孔板(MaxiSorp)用4μg/ml的抗人因子H mAb(OX-23)在室温下预包被2小时。使用PBS中的1%牛血清白蛋白(BSA)将平板上的未占据的结合位点在室温下封闭1小时。将含有10mM EDTA的封闭缓冲液中的系列稀释的小鼠血浆样品添加到孔中,并且室温下温育1小时,然后加入2ug/ml生物素标记的抗hfH mAb(克隆L20/3,对人因子H的SCR19具有特异性,目录号518504,Bio-Legend),在室温下温育1小时。洗涤后,然后用亲和素-HRP(1/1000,目录554058,BD Biosciences)将平板在室温下温育1小时,并且用TMB底物试剂(目录51-2606KC和BD目录51-2607KC,BD Biosciences)显影。

[0132] 由AAV递送的mfH1-4.678.19-20在fH^{m/m}或fH^{m/m}P^{-/-}小鼠中的疗效:

为了测试mfH1-4.678.19-20作为hfH1-4.678.19-20的替代物的疗效,用含有mfH1-4.678.19-20的编码序列的AAV载体感染fH^{m/m}小鼠和fH^{m/m}P^{-/-}小鼠。如之前Lesher等人(上文引用的Lesher et al,2013)的描述,尽管fH^{m/m}小鼠发生伴有C3和fB消耗的非致死性肾小球病,双突变fH^{m/m}P^{-/-}小鼠(使得缺乏备解素的fH^{m/m}小鼠)发生加重和致死形式的C3肾小球病,并且到10-12周龄时死亡(Lesher et al,2013)。因此,fH^{m/m}P^{-/-}小鼠也能允许我们使用死亡率作为mfH1-4.678.19-20AAV的疗效的另一读出结果。通过眼眶后途径给7周龄的fH^{m/m}或fH^{m/m}P^{-/-}小鼠注射 3×10^{12} 个基因拷贝/小鼠的对照AAV(pAAV.TBG.NULL.rBG)或mfH1-4.678.19-20AAV。在注射前在从注射后1周开始的多个时间点通过眼眶后放血采集血液。为了评估C3和fB水平,用样品缓冲液稀释小鼠血浆(1μl),煮沸,然后在还原条件下加样到4-20%梯度的SDS-PAGE凝胶上。然后将样品转移到PVDF膜上,并且用合适的抗体探测。对于C3和fB,将HRP缀合的山羊抗小鼠C3 Ab或亲和纯化的山羊抗人fB Ab(与小鼠fB交叉反应)用作第一抗体,然后用HRP缀合的兔抗山羊IgG检测。在一些情况下,对经治疗的小鼠随访6或10个月,以用血浆C3和fB水平作为读出结果,观察mfH1-4.678.19-20AAV在防止死亡和/或

AP补体活化中的效力。

[0133] fH^{m/m}小鼠中mfH1-4.678.19-20AAV的剂量测定：

在目的为滴定实现疗效所需的mfH1-4.678.19-20AAV拷贝量的实验中,通过眼眶后途径给10-12周龄的fH^{m/m}小鼠(Lesher, 2013)注射1x 10¹²、3x 10¹¹或1x 10¹¹个基因拷贝/小鼠的AAV。在注射前和指出的时间点(注射后1周和1个月)通过眼眶后放血采集血液。用样品缓冲液稀释小鼠血浆(1μl),煮沸,然后在还原条件下加样到4-20%梯度的SDS-PAGE凝胶上。然后将样品转移到PVDF膜上,并且用合适的抗体探测。为了检测C3和fB,将HRP缀合的山羊抗小鼠C3 Ab(1:4000,目录号0855557,MP Biomedicals)或亲和纯化的山羊抗人fB Ab(与小鼠fB交叉反应;1:2500,目录号A235,Complement Technology, Inc.)用作第一抗体,然后用HRP缀合的兔抗山羊IgG(1:4000,目录号1721034,Bio-Rad)检测。使用Pierce ECLPlus蛋白印迹底物显现印迹。

[0134] 通过ELISA检测小鼠血液中的mfH1-4.678.19-20蛋白：

为了检测小鼠血液中mfH1-4.678.19-20蛋白的存在,开发和使用了ELISA测定。简言之,将96孔板用2μg/ml的小鼠抗小鼠fH SCR19-20 mAb(克隆-12,通过用重组小鼠fH SCR19-20(Barata,L.,et al,J. Immunol 190(6):2886-95(2013)免疫fH^{m/m}小鼠内部制备)37°C下在室温下预包被2小时。使用PBS中的1%BSA将平板上的未占据的结合位点在室温下封闭1小时。将含有10mM EDTA的封闭缓冲液中的系列稀释的小鼠血浆样品添加到孔中,室温下温育1小时,然后加入生物素标记的兔抗小鼠fH Ab(Lesher et al,2013),室温下1小时。用亲和素-HRP将平板在室温下温育1小时,然后用TMB底物试剂显影。

[0135] 通过蛋白印迹检测小鼠血浆中的mfH1-4.678.19-20蛋白：

为了通过蛋白印迹检测小鼠血液中mfH1-4.678.19-20蛋白的存在,用90uL含10mM EDTA的PBS稀释10μl小鼠血浆,并且用抗小鼠fH mAb(克隆-12)偶联的Sepharose®珠在室温下温育30分钟。用含500mM NaCl的PBS洗涤两次后,用SDS-PAGE样品缓冲液将Sepharose®珠煮沸5分钟,并且在SDS-PAGE上运行。然后将样品转移到PVDF膜上,并且通过BSA预先吸附的兔抗小鼠fH 19-20Ab(Lesher et al,2013)检测mfH1-4.678.19-20蛋白。使用Pierce ECLPlus蛋白印迹底物显现印迹。

[0136] 肾中C3的免疫荧光染色:

将来自对照AAV或mfH1-4.678.19-20AAV治疗的fH^{m/m}或fH^{m/m}P^{-/-}小鼠的肾速冻在OCT介质中,并且在-80°C下保存。为了免疫荧光研究,切出4μm切片并且用于染色。为了C3染色,使用了FITC缀合的山羊抗小鼠C3 Ab(1:500,目录号855500,MP Biomedicals),并且如描述的进行实验(Lesher et al 2013)。

[0137] 小鼠存活分析:

下表提供了用对照AAV8载体或AAV8-mfH1-4.678.19-20载体治疗的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠的存活数据概要。用对照AAV8载体治疗的全部8只fH^{m/m}P^{-/-}小鼠都在治疗的2-3周内死亡,而9只用AAV8-mfH1-4.678.19-20载体治疗的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠中的7只被从致死性C3肾小球病挽救。所有小鼠都是通过眼眶后静脉注射途径注射3x 10¹²个基因拷贝/小鼠的各自的AAV病毒。AAV治疗后记录对照AAV或mfH1-4.678.19-20AAV治疗的fH^{m/m}P^{-/-}小鼠的存活,持续10个月。数据分类为截尾的(censored)(安乐死的)或自然死亡,并且通过GraphPad Prism(La Jolla, CA)分析。

AAV 载体	治疗的小鼠数目	注释
AAV8-mfH1-4.678.19-20	9 只小鼠	4 只-在基因治疗后 9 个月健康（继续） 2 只-在基因治疗后 6 个月健康（在 6 个月时处死） 1 只-在基因治疗后 5 个月健康（继续） 1 只-在基因治疗后 3 个月濒死 1 只-在基因治疗后两周濒死
对照 AAV8	8 只小鼠	全部在注射后 2-3 周死亡

[0138] 肝素结合测定：

为了测试hfH1-4.678.19-20和mfH1-4.678.19-20蛋白的肝素结合活性,用碳酸氢盐缓冲液(pH9.6)中的100μg肝素(Sigma,H3393)将96孔板在37℃下预先包被1小时。用PBS中的1%BSA将平板上的未占据的结合位点在室温下封闭1小时。加入不同量的hfH1-4.678.19-20或mfH1-4.678.19-20蛋白,在室温下温育1小时,然后加入2μg/ml的小鼠抗人fH mAb(OX-23),室温下1小时。用HRP缀合的兔抗小鼠IgG(1/4000,目录号A9044,Sigma)将平板在室温下温育1小时,然后用TMB底物试剂显影。

[0139] C3b结合测定：

为了测试hfH1-4.678.19-20和mfH1-4.678.19-20蛋白的C3b结合活性,用2μg/ml人C3b(目录号A114,CompTech)将96孔板在37℃下预先包被1小时。用PBS中的1%BSA将平板上的未占据的结合位点在室温下封闭1小时。加入不同量的hfH1-4.678.19-20或mfH1-4.678.19-20蛋白,在室温下温育1小时,然后加入2μg/ml的小鼠抗人fH mAb(OX-23),室温下1小时。用HRP缀合的兔抗小鼠IgG将平板在室温下温育1小时,然后用TMB底物试剂显影。

[0140] fH蛋白在因子I介导的C3b切割中的液相辅因子活性的测定：

为了评估hfH1-4.678.19-20和mfH1-4.678.19-20蛋白在因子I介导的C3b切割中的液相辅因子活性,将0.5或0.25μg纯化的hfH1-4.678.19-20或mfH1-4.678.19-20蛋白与15μl PBS中的2μg人C3b混合,并随后加入1μg人因子I(目录号A138,CompTech),并且在37℃下温育15分钟。通过加入5x还原SDS-PAGE样品缓冲液终止反应。通过分析α链的切割以及α41和α39片段的产生来确定C3b的蛋白水解,所述分析使用还原条件下的4-20%梯度SDS-PAGE凝胶,随后是使用HRP缀合的山羊抗人C3 IgG(1/4000,目录号855237,MP biomedicals)的蛋白印迹检测。使用Pierce ECLPlus蛋白印迹底物显现印迹。

[0141] mfH1-4.678.19-20在防止由膜补体调节物缺陷导致的AP补体活化中的疗效评估：为了确定fH1-4.678.19-20AAV治疗是否也可以有效防止由膜补体调节物缺陷导致的AP补体活化,在缺乏两种膜补体调节物即DAF和Crery的小鼠品系(DAF/Crery双突变小鼠)中测试mfH1-4.678.19-20.DAF/Crery双突变小鼠(DAF^{-/-}-Crery^{flox/flox}-Tie-2Cre⁺)的产生以前描述为具有由过量AP补体活化导致的继发性补体缺乏的表型(Barata et al,2013)。与fH^{m/m}小鼠相似,DAF/Crery双突变小鼠中存在C3和fB消耗(Barata et al,2013)。通过眼眶后途径给DAF/Crery双突变小鼠(10周龄)注射3x 10¹²个基因拷贝/小鼠的mfH1-4.678.19-20AAV。在注射前和注射后1周通过眼眶后放血采集血液。通过使用蛋白印迹分析在mfH1-4.678.19-20AAV治疗前和治疗后测量血浆C3和fB水平来评估疗效。对于蛋白印迹,用样品缓冲液稀释小鼠血浆(1μl),煮沸,然后在还原条件下加样到4-20%梯度的SDS-PAGE凝胶上。然后将样

品转移到PVDF膜上，并且用合适的抗体探测。为了检测小鼠C3和fB，将HRP缀合的山羊抗小鼠C3 Ab(1:4000, 目录号0855557, MPBiomedicals)或亲和纯化的山羊抗人fB Ab(目录号A235, CompTech, Texas, 与小鼠fB交叉反应)用作第一抗体，然后用HRP缀合的兔抗山羊IgG检测。使用Pierce ECLPlus蛋白印迹底物显现印迹。

[0142] aHUS小鼠模型的制备：

为了建立用于测试AAV介导的fH基因治疗的疗效的鼠aHUS模型，通过基于同源重组的基因靶向技术(Lesher et al, 2013; Dunkelberger, et al, J Immunol. 2012 Apr 15; 188(8):4032-4042; Takashi et al, Blood. 2009 Mar 19; 113(12):2684-2694; Kimura Y1, et al., Blood. 2008 Jan 15; 111(2):732-40. Epub 2007 Oct 4; Kimura Y1, et al, J Clin Invest. 2010 Oct; 120(10):3545-54)建立突变小鼠品系，该突变小鼠品系携带对应于aHUS患者中发现的人fH W1183R突变的SCR20中的fH点突变。对于该实验，通过使用Expand Long Template PCR系统(Roche, Indianapolis, IN)从C57BL/6小鼠基因组DNA扩增fH基因片段，从而构建基因靶向载体。靶向载体的长臂由包含小鼠fH基因的第21个外显子和侧翼内含子序列的6 kb片段组成。使用以下引物通过PCR将它扩增：SEQ ID NO:67:5' - g c g g c c g c c c t a t c c a t t a g t g a g t g t g g - 3' 和 SEQ ID NO:68:5' - c t c g a g g a c a g c g a t g t a a g a a c a a t c - 3'。将PCR产物连接到PCR 2.1载体(Invitrogen)中，然后通过使用Not I和XhoI限制酶切消化从PCR2.1载体释放插入片段，纯化并亚克隆到pND1载体中NEO盒上游。pND1载体的使用已经描述于基因靶向实验的在先出版物中(Lesher et al (2013); Dunkelberger et al, 2012; Miwa et al, 2009; Kimura et al, 2008; Kimura et al 2012)并且该载体包含分别用于阳性和阴性选择的新霉素(NEO)和白喉毒素(DT)盒(Lesher et al (2013); Dunkelberger et al, 2012; Miwa et al, 2009; Kimura et al, 2008; Kimura et al 2012)。pND1载体也包含loxP位点和NEO盒侧翼的两个翻转酶识别靶(FRT)位点，从而有可能通过FLPe重组酶除去ENO(Rodríguez CI, et al, Nat Genet. 2000 Jun; 25(2):139-40.)。

[0143] 短臂序列由3.85kb片段组成，所述3.85kb片段包含小鼠fH基因的编码SCR20的第22个外显子和侧翼内含子序列。使用以下引物PCR扩增该序列：SEQ ID NO:69:5' - ggtacca agcttattgaccagctacagacagta - 3' 和 SEQ ID NO:70:5' - ggtaccctcactcagggttattactc - 3'。将PCR产物克隆到PCR 2.1载体中，随后通过位点定向诱变产生SCR20中位于第1206位的色氨酸(W)至精氨酸(R)突变，该突变对应于人fH的W1183R突变，所述位点定向诱变使用具有以下两种引物的Stratagene QuickChange位点定向诱变试剂盒(Agilent Technologies, CA)：SEQ ID NO:71:5' - ggAATCACACAATAATTCTCAAAAggAgACACACTg - 3' 和 SEQ ID NO:72:5' - CAgTgTgTCTCCTTTgAgAATTATATTgTgTgATTCC - 3'。证实W至R突变后，通过Kpn I消化从PCR2.1释放短臂片段，并且在相同的限制位点亚克隆到pND1载体中NEO盒的下游。然后通过Not I消化使靶向载体线性化，并且通过电穿孔方法转染到C57BL/6胚胎干(ES)细胞(EmbRoMAX胚胎干细胞系-C57BL/6株，目录号CMTI-2, Millipore)中。从电穿孔后48小时开始使转染的ES细胞接受G418选择。在HindIII消化后通过基因组DNA的DNA印迹分析筛选具有同源重组的ES细胞，所述DNA印迹分析采用480bp3'探针，所述探针是使用SEQ ID NO:73:5' - ATAGCATGTGCCAGGAGACAC - 3' 和 SEQ ID NO:83:5' - AGTGTGACTCGTGGAGACCA - 3' 作为引物扩增的。野生型等位基因产生12.5kb片段，而被靶向的等位基因产生10.2kb片段。在宾夕法

尼大学医学院转基因核心设施(University of Pennsylvania School of Medicine Transgenic Core Facility)将正确靶向的ES细胞(fH^{W1201R(Neo-阳性)/+})注射到性交后3.5天的C57BL/6J胚泡以产生嵌合体。得到的嵌合体产生种系传递,这是通过皮毛颜色和用于检测NEO的PCR筛选的组合评估的,所述PCR筛选使用以下两种引物:Neo-4引物:SEQ ID NO:74:5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' 和SEQ ID NO:75:Neo-5引物:5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'。靶向载体中的新霉素抗性盒(NEO)的侧翼是两个翻转酶(FLP)重组酶靶(FRT)位点,以使其随后能够被FLP重组酶除去。杂合的fH靶向的小鼠(fH^{W1206R(Neo-阳性)/+})与FLPe转基因小鼠(表达FLP的增强形式,在C57BL/6遗传背景上)杂交以从fH等位基因除去NEO,并且产生不含NEO基因盒的杂合fH突变小鼠(fH^{W1206R/+})。fH^{W1206R/+}小鼠互交以产生C57BL/6遗传背景上的fH^{W1206R/W1206R}纯合小鼠。对于基因型分型,将以下引物用于通过PCR检测野生型和突变的fH等位基因:WR1(FH特异性的)SEQ ID NO:76:5'-GATATGGTCAATTAGGGAAAGT,SEQ ID NO:77:Neo7(NEO特异性的)5'-gggTgggATTAgATAAATgCC-3' 和SEQ ID NO:78:WR4(FH特异性的)5'-TACTGTCTGTAGCTGGTCAAT 3'。

[0144] 下表概括了接受 3×10^{11} GC/小鼠的对照AAV或AAV8-mfH1-4.678.19-20载体的fH^{W1206R/W1206R}小鼠的治疗结果。

AAV 载体	治疗的小鼠数目	结果
AAV8-mfH1-4.678.19-20 (3×10^{11} GC/小鼠)	3 只小鼠	截止日期时全部 3 只小鼠存活并健康 (基因治疗后 2 个月) 全部具有正常血小板计数
对照 AAV8(3×10^{11} GC/ 小鼠)	2 只小鼠	1 只在治疗 4 周后死亡 剩余的小鼠存活但具有低血小板计数

[0145] 纯合fH^{W1206R/W1206R}小鼠没能茁壮生长,其具有在4-6周龄时显示的显著更低的体重,和到30周时接近50%的死亡率。所有fH^{W1206R/W1206R}小鼠显示aHUS的特有特征,即肾损伤(升高的血尿素氮水平和/或肾小球中血栓形成性微血管病的组织学标志)、血小板减少症和贫血中的一种或多种。约三分之一的fH^{W1206R/W1206R}小鼠也发生表明中风的严重的神经学症状。除了肾小球中的血栓形成性微血管病,在fH^{W1206R/W1206R}小鼠中存在多个器官(肝、肺、脾、肾、脑和眼)中的许多大血管血栓。

[0146] 截止到上文报道的时间点,全部3只用AAV8-mfH1-4.678.19-20治疗的fH^{W1206R/W1206R}小鼠存活并且健康,其具有正常化的血小板计数,而2只用对照AAV载体治疗的fH^{W1206R/W1206R}小鼠中的1只死亡(在治疗后4周),剩余的小鼠表现aHUS的症状,包括血小板减少症。

[0147] AAV送递的mfH1-4.678.19-20在fH^{W1206R/W1206R}小鼠中的疗效:

为了测试mfH1-4.678.19-20作为hfH1-4.678.19-20的替代物的疗效,我们通过眼眶后途径给4周龄的纯合fH^{W1206R/W1206R}小鼠注射 3×10^{11} 个基因拷贝/小鼠。如果mfH1-4.678.19-20在fH^{W1206R/W1206R}小鼠中是功能上有活性的,人们会预期血小板减少症和肾损伤的减少。因此,作为mfH1-4.678.19-20的疗效的读出结果,我们计数了血小板数目并测量了血清血尿素氮水平。由于fH^{W1206R/W1206R}小鼠没能茁壮生长,其具有在4-6周龄时明显的显著更低的体重,和到30周时接近50%的死亡率。fH^{W1206R/W1206R}小鼠也允许我们使用死亡率作为mfH1-4.678.19-20AAV的疗效的另一读出结果。

[0148] 对照AAV和mfH1-4.678.19-20AAV治疗的fH^{W1206R/W1206R}小鼠中的血小板计数为了测

定对照AAV和mfH1-4.678.19-20AAV治疗的fH^{W1206R/W1206R}小鼠中的血小板计数,在注射前和从注射后1个月开始的多个时间点通过眼眶后放血用EDTA(终浓度:0.02M)采集血液,并且在费城儿童医院的CTRC翻译核心实验室(CTRC Translational Core Laboratory at the Children's Hospital of Philadelphia,<https://ctrcc.research.chop.edu/services-facilities/translational-core-laboratory-tcl/hematology>)在Sysmex XT-2000iV自动化血液学分析仪上分析。

[0149] 对照AAV和mfH1-4.678.19-20AAV治疗的fH^{W1206R/W1206R}小鼠中的血尿素氮(BUN)测量:

为了测量血尿素氮的血清水平,在注射前和从注射后1个月开始的多个时间点通过眼眶后放血采集血样。按照生产商的说明书,使用尿素氮试剂(Sigma-Aldrich)测量血清BUN水平。

[0150] fH^{W1206R/W1206R}小鼠的肾和其它器官的组织学检查:

从fH^{W1206R/W1206R}小鼠采集成对的肾和其它器官。一个固定在福尔马林溶液中过夜并加工用于石蜡包埋,另一个速冻在OCT化合物(Sakura Finetek)中。使用光学显微镜检查和包括免疫荧光和免疫过氧化物酶的免疫组织化学,组织学评价肾和其它器官的aHUS/血栓形成性微血管病的标志。

[0151] (序列表自由文本)

给包含数字标识符<223>下的自由文本的序列提供以下信息。

SEQ ID NO: (包含自由文本)	<223>下的自由文本
39	<p><220></p> <p><221> 信号</p> <p><222> (1)..(18)</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (19)..(82)</p> <p><223> Sushi 1</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (83)..(143)</p> <p><223> Sushi 1</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (144)..(207)</p> <p><223> Sushi 3</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (208)..(264)</p> <p><223> Sushi 4</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (265)..(322)</p> <p><223> Sushi 5</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (324)..(386)</p> <p><223> Sushi 6</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (387)..(444)</p> <p><223> Sushi 7</p> <p><220></p> <p><221> 结构域</p> <p><222> (446)..(507)</p> <p><223> Sushi 8</p> <p><220></p>

<221> 结构域
<222> (515)..(566)
<223> Sushi 9
<220>
<221> 结构域
<222> (576)..(625)
<223> Sushi 10
<220>
<221> 结构域
<222> (628)..(686)
<223> Sushi 11
<220>
<221> 结构域
<222> (689)..(746)
<223> Sushi 12
<220>
<221> 结构域
<222> (751)..(805)
<223> Sushi 13
<220>
<221> 结构域
<222> (809)..(866)
<223> Sushi 14
<220>
<221> 结构域
<222> (868)..(928)
<223> Sushi 15
<220>
<221> 结构域
<222> (929)..(986)
<223> Sushi 16
<220>
<221> 结构域
<222> (987)..(1045)
<223> Sushi 17
<220>
<221> 结构域
<222> (1046)..(1104)
<223> Sushi 18
<220>

	<221> 结构域 <222> (1107)..(1165) <223> Sushi 19 <220> <221> 结构域 <222> (1170)..(1230) <223> Sushi 20
41	<223> 工程化的 hfH1-4.678.19-20 变体 cDNA
42	<223> hfH1-4.678.19-20 蛋白
43	<223> 鼠 fH1-4.678.19-20
44	<223> 小鼠因子 H 截短构建体 mFH1-4.678.19-20
45	<223> 工程化的 fH SCR1-4, 6-8, 17-20
46	<223> 合成构建体
47	<223> 包含前导序列和 5' UTR 的 hfH1-4.678.17-20
48	<223> hFH 1-4.678.17-20
49	<223> hfHdSCR5 反向截短变体引物
50	<223> hfHdSCR5 正向截短引物
51	<223> hfHdSCR9-18 反向截短变体引物
52	<223> hfHdSCR9-18 正向截短变体引物
53	<223> hfHdSCR9-16 反向截短变体引物
54	<223> hfHdSCR9-16 正向截短变体引物
55	<223> pCBAGhfH-ORF 正向截短变体引物
56	<223> pCBAGhfH-ORF 反向引物
57	<223> dSCR5 反向
58	<223> dSCR5 正向截短变体引物
59	<223> dSCR9-18 正向截短变体引物
60	<223> dSCR9-18 反向截短引物
61	<223> AAV 5' ITR
62	<223> AAV 3' ITR
63	<223> Hinc II 5'ITR 正向插入引物
64	<223> Hinc II 5'ITR 反向插入引物
65	<223> Pst I 3'ITR 正向插入引物
66	<223> Pst I 3'ITR 反向插入引物
67	<223> mFH 引物第 21 个外显子+内含子
68	<223> 反向引物 mFH 第 21 个外显子+内含子
69	<223> 正向引物 mFH SCR20 (外显子 22)
70	<223> 反向引物 mFH SCR20 (外显子 22)
71	<223> 正向引物 W1183R 突变 hFH
72	<223> 反向引物 W1183R 突变

73	<223> 480 bp 3'探针的正向引物
74	<223> Neo-4 引物
75	<223> Neo-5 引物
76	<223> mfH1-4.678.19-20
77	<223> NEO 特异性的
78	<223> WR4 (FH 特异性的)
81	<223> mfH1-4.678.19-20

[0152] 本说明书中引用的所有出版物通过引用并入本文。2015年9月24日提交的美国临时申请号62/232,008也通过引用并入本文。类似地，本文提到的和所附序列表中出现的SEQ ID N0s通过引用并入。尽管针对特定实施方案描述了本发明，应该理解可以在不偏离本发明精神的情况下进行修改。这种修改意欲落入所附权利要求的范围。



图1A

图1B

图1C

W A Q L S S P P Y Y Y G D S V E F N C S
 gaatcaatttacastgattggacacagatcaattcgtgtattcatggagatggacccaa
 E S F T M I G H R S I T C I H G V W T Q
 cttocccacgtgtgtggcaatacgataaaacttaagaagtgcacaaatcaaaattttattata
 L P Q C V A I D K L K K C X S S N L I I
 Cttgaggaacatttaaaaacaagaaggaaattcgatcataatcttacataaggatcaga SCR13
 L E K H L X N K K E F D H N S N I R Y R
 ttagaggaaaagaaggatggatcacacacgtotgcataatggaaaggatggatccacaa
 C R G X S G W I H Y V C I N G R W D P E
 gtgaactgtcaatggcacaaatataattatgcccacacctccacatggatccccattct
 V N C S M A Q I Q L C P P P P Q I P N S
 Cacaatatgacaaccacactgaattatggatggagaaaaaagtatctgttcttgccaa SCR14
 H N M T T I L N Y R D G E X V S V L C Q
 gaaaattatataattcaggaaggagaagsaattacatgcacaaagatggaaaggatggcagtc
 E N Y L I Q E G E E I T C K D G R W Q S
 ataccacatgtgttggatggatccatgttccacacatgcataatggaaacacggaaacc
 I P L C V E X I P C S Q P P Q I E H G T SCR15
 Attaattcatccaggatccatgcacaaagatgttatgcacatggactaaattggatatact
 I N S S R S S Q E S Y A H G T X L S Y T
 tggatggatggatggatccatgcacaaagatggatggatggatggatggatggatggatgg
 C E G G F R I S E E N E T T C Y M G K W SCR16
 agttatccacatgcacatgtgtgaaggatccatgcacaaatgcacatggatggatggatgg
 S S P P Q C E G L P C K S P P E I S H G
 Gttgttagctcacatgtcagacagttatcgttatggagaaggatgttacatggatggatgg
 V V A H M S D S Y Q Y G E E V T Y X C F SCR17
 gaaggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 E G F G I D C P A I A K C L G E K W S H
 cctccatcatgcataaaaacagattgttacatgcataatggatggatggatggatggatgg
 P P S C I K T D C L S L P S F E N A I P
 Atggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 M G E K K D V Y K A G E Q V T Y T C A T SCR18
 tattacaaaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 X Y K M D S A S N V T C I N S R W T G R
 ccaacatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgc
 P T C R D T S C V W P P T V Q N A Y I V
 Tggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 S R Q M S X Y P S G E R V R T Q C R S P

图1D

图1E



图2A

A t g a g a c t t e t a g c a a a g a t t b i g o c t t a t g b h a t g p p g e t a t t b g b g t a g o c a g a a g a t M R L L A E I I C L M L W A I C V A E D	信号肽
T y c a a t g a a c t t c e t c c a a g a a g a a a s t a c a g a a a a t t c t g a c a g g t b c t g g y b c t g a c c e a a C N E L P P R R N T E I I T G S W S D Q	
A c a t a t c o o s a a g y c a c o c c a g g c b a t o t a a a t g o a g e c c t g g a t e t a g a t c b t t b g a T Y F E G T Q A I Y K C R P G Y R S L G	SCRI
a a t a t a a t s a t t g g t a t g o a g g a s a g g g a g a t t g g g t t g c t a t a a t c o a t t a a g g a a s t g t W I I M V C R X G Z W V A L N F L R K C	
c a g a a a a g g c c o c t g t g y a c a t e c t g g a g a t a c b c t t t t g g a c t t t t a c c o t t a c a g g a Q K R P C G H P G D T P F G Y F T L T G	
G g a a t g t g t t g a a s t a t g g t g t a s s a g o t g t g b a t a c a t g t a a t g s q g g g b a t m a a t t g G N V F E Y G V K A V Y T C N E G Y Q L	SCR2
c t a g g t g a g a t t a a t t a c c g t g a a t b g t g a c a c a g a t g g a t g y a c c o a t g a t a t t n c t a t a L G E I N Y R E C D T D G W T N D I P I	
t g t g a a g t t g a a g t g t t a c c a g t g a c a g o a c c c a g a g a a t g g x x x a t t g t c a g t a g t C E V V K C L P V T A P E N G X I V S S	
G c a a t g y g a s o c c a g a t c g g a a t a c c o a t t t g g a c a a g c a g t a c c g t t t g t a c t o a A M E P D R E Y H F G Q A V R F V C N S	SCR3
y g c t a c a a g a t t g a a g g a g a t g a a g a a s t g c a t t g t t c a g a c g a t g g t t t b g g a y t a a a G Y K I E G D E E N H C S D D G F W S X	
y a g a a a c c a a a g t g t g g a a a t t t c a t g o x x x b u u u c c a g a t b y t h a t a a t g g a b u a a t E K F X C V E I S C K S P D V I M G S P	
A t a b o t u x g a a g a t b a t t t a a g g y w e s t g x a c o g a t t b o s a t a t u a t y t a a c a t g g y t I S Q K I I Y X E N M R F Q Y R C N W G	SCR4
t a t g q a a t c a c g t g a a s a g g a g a t b y t g t a t g c a c t g a a t b t g g a t b q g g g y t c o g k b g o o t Y E Z S Z R G D A V C T E S S N X P L F	
T e a t g t g a a g a a a a t o a S C E E K S	
a c c t t g a a a c c t t g t g a t t a t c c a g a c a t t a a a c a t g g a g g t c t a t a t c a t g a g a a t a t g T L K P C D Y P D I K H G G L Y N E N M	SCR5
C y t a g a c c a t a c t t c c a g t g a c t g t g a g g a a a t t a t t a c t c t a t t a c t g t g a c a s c a t R R F Y F P V A V G K Y Y S Y Y C D E N	
t t t g a c a c t c c g t d a g g a a g t t a c t g g c a t c a c t t c a t t g c a c a c s a g a t g a t c o g G	SCR6

图2B

图2C

1 CGACGTTTGTAAACAGAGTTAACCTGGTAATGTCCCTCTTAAAGAATGCCAAAAA 52
atgagacttcttagcaaagattattgccttatgttatggctatttgttagcagaagatgtcaat:
122
ttccatccaaqaqaaaatacagaaaatttcacaggttatggatgaccacataatccagaaggca:
192

Ggcatactataaatgcgcgcctggatatacatatgttggaaatataataatggatgcaggaaggg:
262

Tgggttgcgtttaatccatataaggaaatgtcagaaaaggccctgtggacatccctggagatacttc:
332

Gtactttacccttacaggaggaaatgtgtttgaatatggtgtaaaagctgtgtatacatgtaatg:
402

Gtataattgttaggtgagattaattaccgtaatgtgacacagatggatggacaaatgtatcc:
472

Tgtgaagtgtgaagtgttaccagtgcacagcaccagagaatggaaaaattgtcagtagtgcaatg:
542

Cagatggaaataccatttggacaagcagtaaggtttatgtactcaggctacaagattgaag:
612

Tgaagaaatgcattgttcaagacatgggtttttggagtaaagagaaaaccaaaagtgtgtggaaatttc:
682

Aaatccccagatgttataaatggatctctatctcagaagattttataaggagaatgaacuga:
752

Aatataaaatgtaacatgggttatgaatacagtgaaagagggagatgtgtatgcactgaatctggat:
822

Tccgttgccttcatgtgaagaaaaatcaacccctgaaacccitgtgattatccagacatccatgg:
892

Ctatacatgagaatatgcccgttagaccatacttccagtagctgttaggaaaatattactctattac:
962

Atgaacatttgagactccgtcaggaagttactggatcacattoattgcacacaagatggatgg:
1032

Agcagtaccatgcctcagaaaatgttatttccttatttgaaaatggatataatccaaatcatgg:
1102

Aagtttgcacaggtaaatctatacgttgcctgccttgcatacgcttccaaaazgcgcag:
1172

Cagttacatgtatggagaatggatggatgttactccagatgcatacgtgtcaaaacatgttcca:
1242

图3A

Aagtatacatattgagaatgggttatttcgtaaatctcagtatacatatgcctaaaagaaaaagcggaaa
1312

Tatcaatgcacaaacttaggatatgtaacagcagatggtaaaacatcaggatcaattagatgtggaaaagatq
1382

Gatggtcagtcacccacgtgcattaaatctaaagattctacaggaaaatgtggccccctccacat
1452

Tgacaatggggacattacttcattccgttgtcagtatatgcacatcagttgatgaccatgc
1522

Cagaacttgtatcaacttgaggtaacaagcataacatgttagaaatggacaatggcagaaccaccaa
1592

Aatgottacatcogtgtataatcccgaaaattatggaaaattataacatagoattaagggtggacagc
1662

Caaacagaagcttattcggaaacaggtaatcagttgaatttgtgttaaoggggatategtttca
1732

Tcacggttcacacattgcgaaacaacatgttggatggaaactggagtatecaacttgtgeaaaaagat
1802

agaATCAATCATAAAU TOCACACCTTTATTCAAGAACTTTAGTATTAAATCAGTTCTCAATTTCATTTTT
1872

ATGTATTGTTTAACTCCTTTATTCAACGTTAAATTTCATTAAATTTCATTAAATGTAAATTATAAGC
1942

TGAGACCCCGTGGCTCTCTTCTTAAACGCCATATTAAATCCTGGAAAAACTAAAAAAA
2012

AAA 2066

图3B

MRLLAKIICMLWAICVAEDCNE_LPPRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRK**C**QKRPGHPGDTPFGTFTLGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDGTWTNDI
PICEVVKCLPVTAPENKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSEKPKCVE
ISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSTLKPCDYPDIKG
GLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQN
HGRKFVQGKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSSIDIENGFISESQTYALKEK
AKYQCKLGYYTADGETSGSIRCGKDGWSAQPTCISKDSTGKCGPPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQ
CQNLYCLEGNKRTCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFVCKRGYRL
SSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR

图4

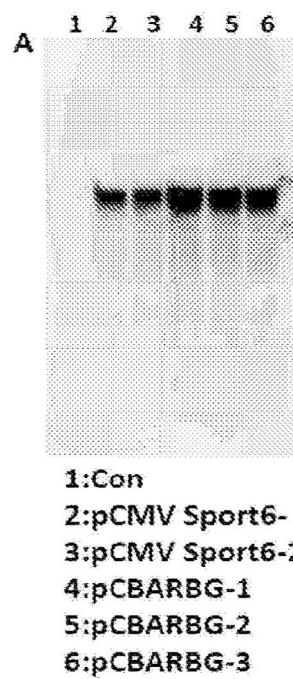


图5A

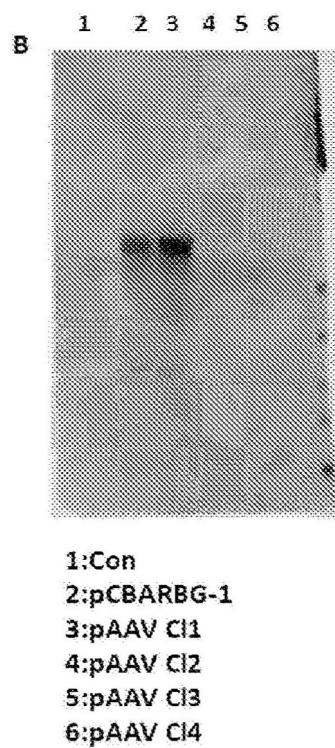


图5B

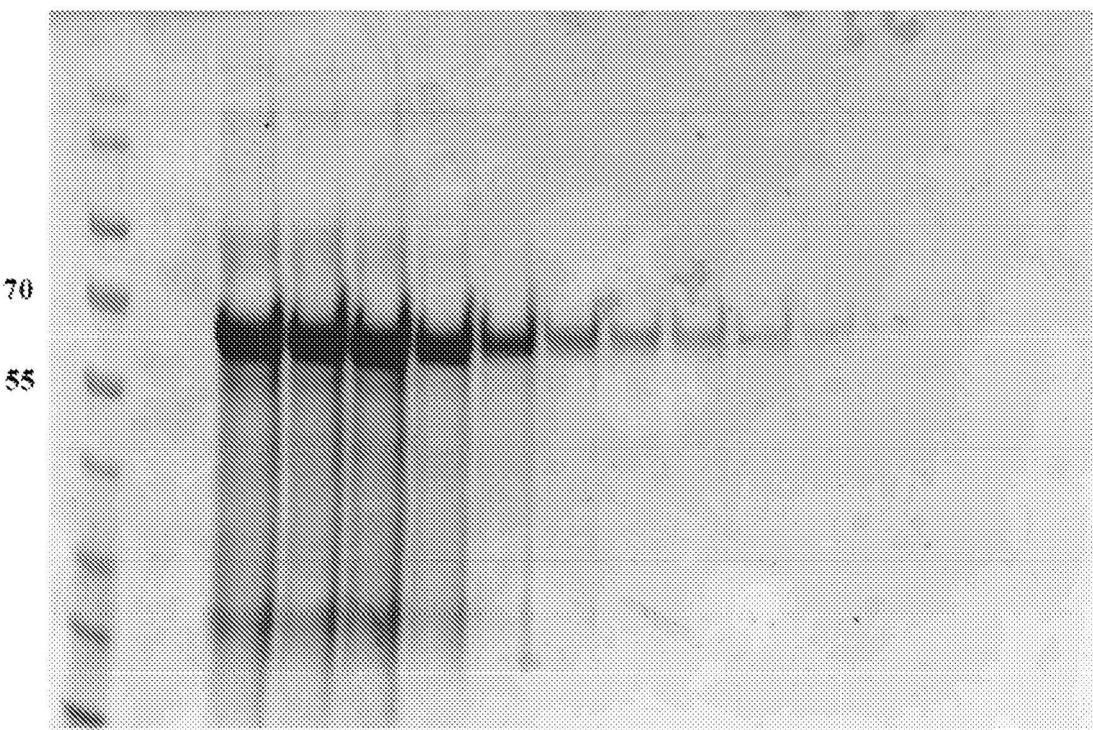


图6

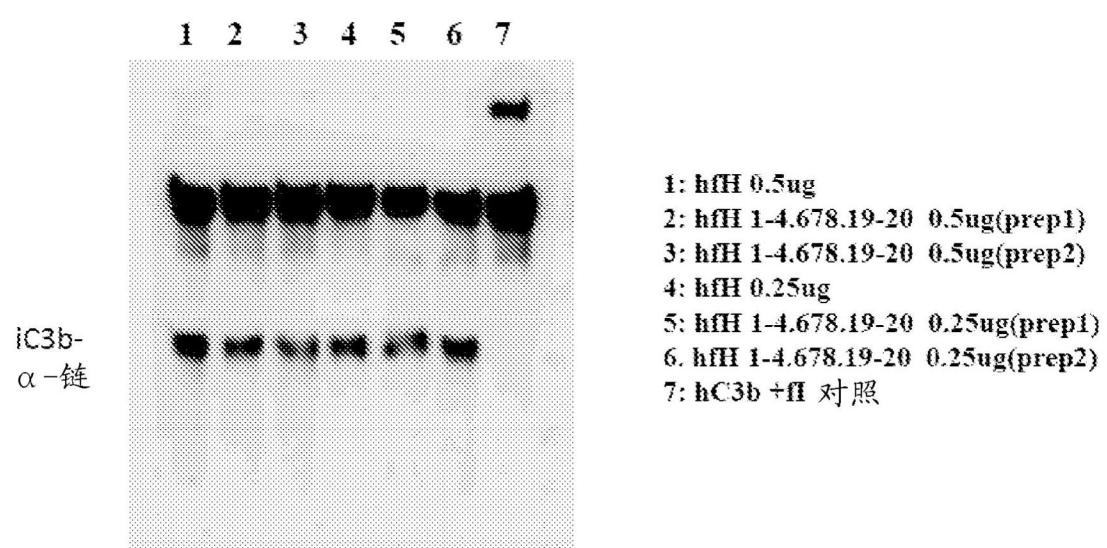


图7

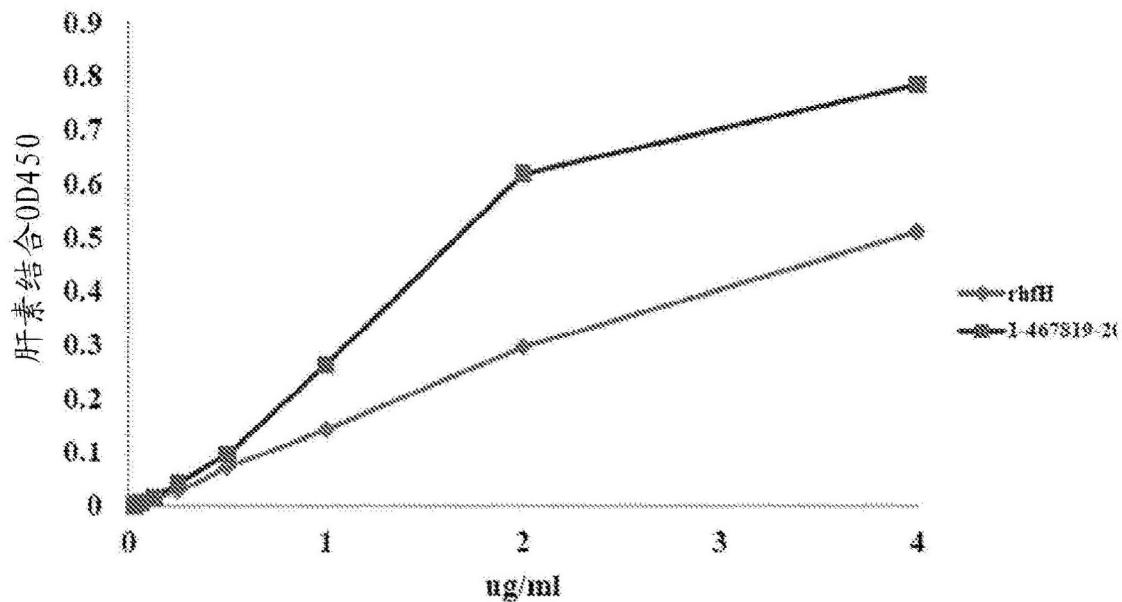


图8

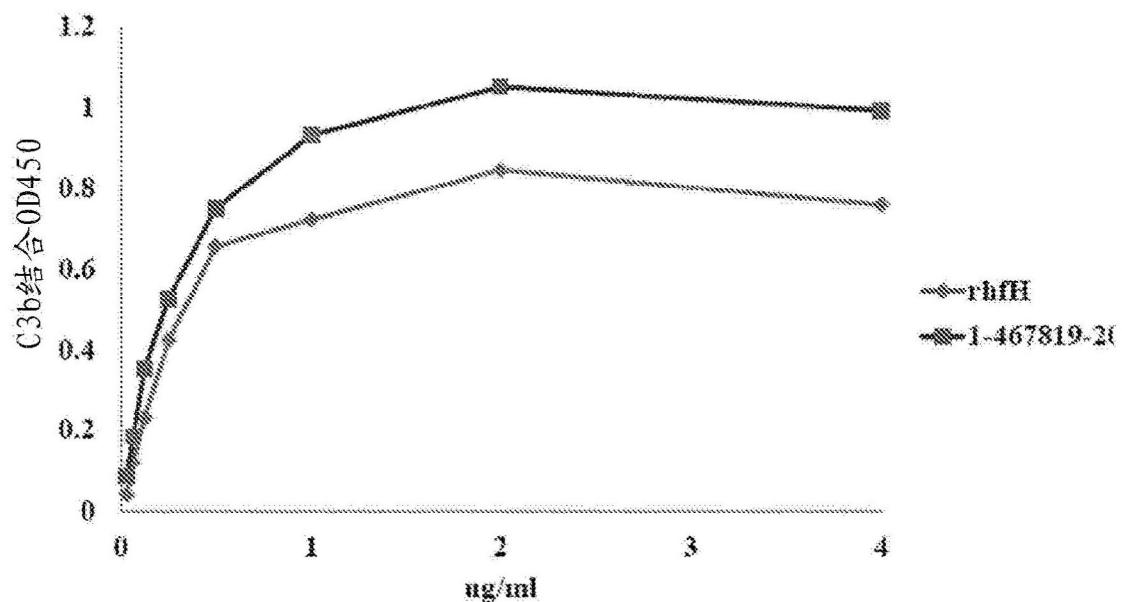


图9

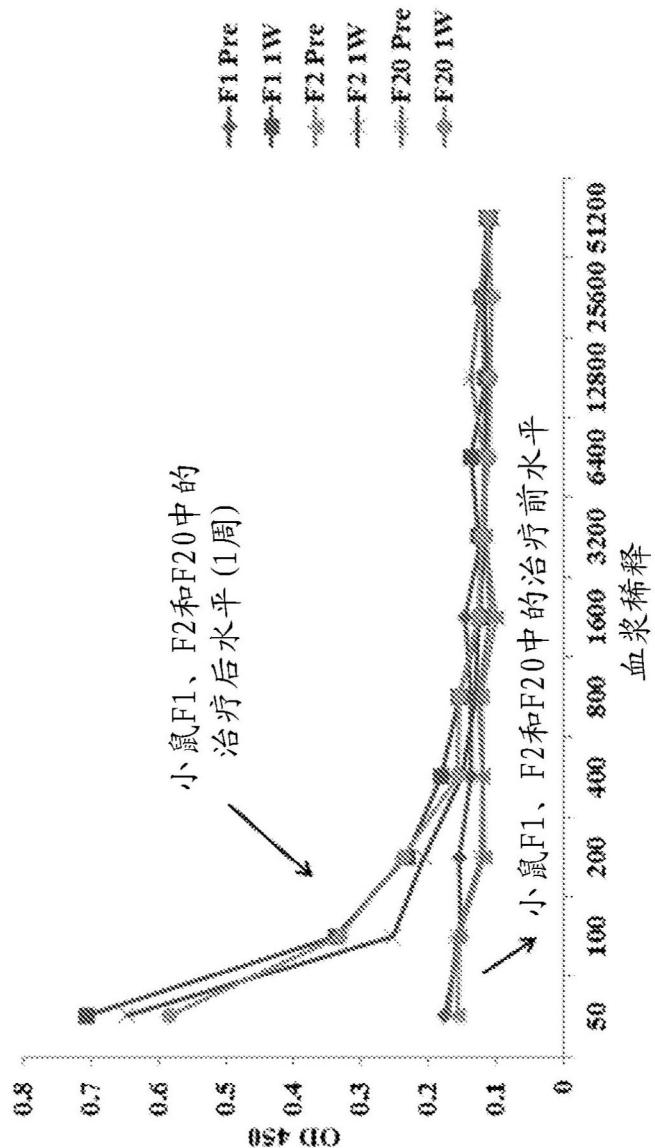


图10

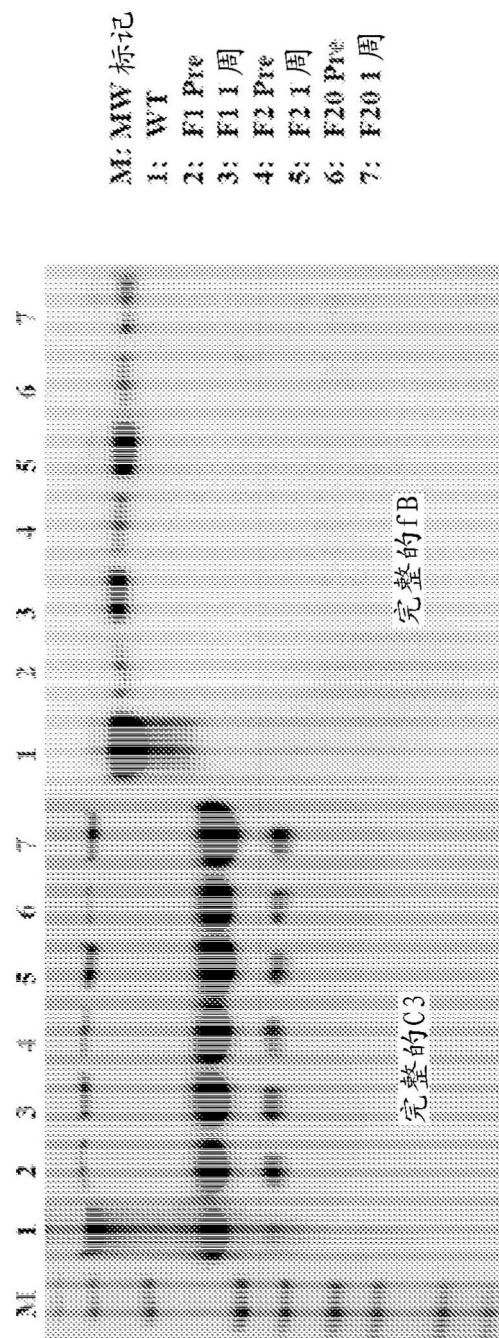


图11

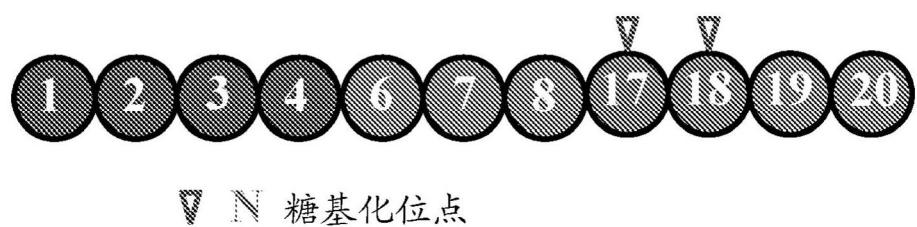


图12A

Atgagacttcttagcaaaaggattatggccttatgttatggcttatttgttagcagaagat
 M R L L A K I I C L M L W A I C V A E D
 tgcataatgaacttcctccaaaggaaatcacagaaaattctgcacaggttctggctqaccas
 C N E L P P R R N T E I L Y G S W S D Q
 acatataatccagaaggccccaggctatctataaatgcgcgcctggataatagatctttgg
 T Y P E G T Q A I Y K C R P G Y R S L G
 satataataatggtatgcaggaaggggagaatgggttgcttaatccattaaggaaatgt
 N I I M V C R K G E W V A L N P L R E C
 cagaaaaaggccctgtggacatacttggagatacteettttgtacttttacccttacayga
 Q K R P C G H P G D T P F G T P T L T G
 gyaatgtgtttgaatatgtgtaaaacgtgtgtatacatgtataatgaggggtatcaatttg
 G N V F E Y G V K A V Y T C N E G Y Q L
 cttaggtgagattaaattaccgtgaatgtgacacagatggatggaccataatccata
 L G E I N Y R E C D T D G W T N D I P I
 tgtgaagtgtgaagtgtttaccagtgtacagcaccagagaatggaaaaattgtcagtagt
 C E V V K C L P V T A P E N G K I V S S
 gcaatggaaaccagatcggaaataccatttggacaaggcagtacggttgtatgtactca
 A M E P D R E Y H F G Q A V R F V C N S
 ggctacaagattgaaggagatgaagaatgcattgttcagacgatgggtttggagtaaa
 G Y K I E G D E E M H C S D D G F W S E
 gagaaaaaccaaaatgtgtggaaaatttcatgcataatcccagatgttataatggatcteet
 E K P K C V E I S C K S P O V I N G S P
 atatctcagaaatattataaggegaatgaacgatticataataatgtacatgggt
 I S Q X I I Y K E H E R F Q Y K C N M G
 tatgaatacagtgaagggagatgtgtatgcactgttatggatggcgtccgttgcct
 Y E Y S S R G D A V C T E S G W R P L P
 tcaatgtgaagaaaaatcaaccttgaacacctgtgtattatccagacataaacatggaggt
 S C E E K S T L K P C D Y P D I K H G G
 ctatatcatgagaatatgcgttagaccatactttcagtagctgttagaaaaatattactcc
 L Y H E N M R R P Y F P V A V G K Y Y S
 tattactgtgtatgcacatggactccgtcaggaagttactggatcacattattgc
 Y Y C D E H F E T P S G S Y W D H I H C
 acacaagatggatggcgtccagcgtaccatgcctcagaaaaabgttattttcttatttg
 T Q D G W S P A V P C L R K C Y F P X L
 gaaaaatggatataatccaaaattatggaaaggtttgtacagggttaatctatagacgtt
 E N G Y N O N Y G R K F V Q G K S I D V
 gctgcctatctggctacgcgtttccaaaaggcgccgcacccacagttacatgtatggagaat
 A C H P G Y A L P K A Q T T V T C M E N
 ggcgtggatctacttcccgatgtatccgtgtccaaaacatgttccaaatcaagtatagat
 G W S P T P R C I R V K T C S K S S I D
 attgagaatgggttatttctgaatctcagttatacatatgccttttttttttttttttttt
 I E N G F I S E S Q Y T Y A L K E K A K
 tatcaatgcacactggatgtatgtacacagcagatggtaaacatcaggatcaattacatgt
 Y Q C K L G Y V T A D G E T S G S I T C
 gggaaaatggatggatggcgtcaaccacgtgtcattaaatctataaaaacagatgttgc
 G K D G W S A Q P T C I K S I K T D C L

信号肽

SCR1

SCR2

SCR3

SCR4

SCR5

SCR6

SCR7

SCR8

图12B

图12C

图13

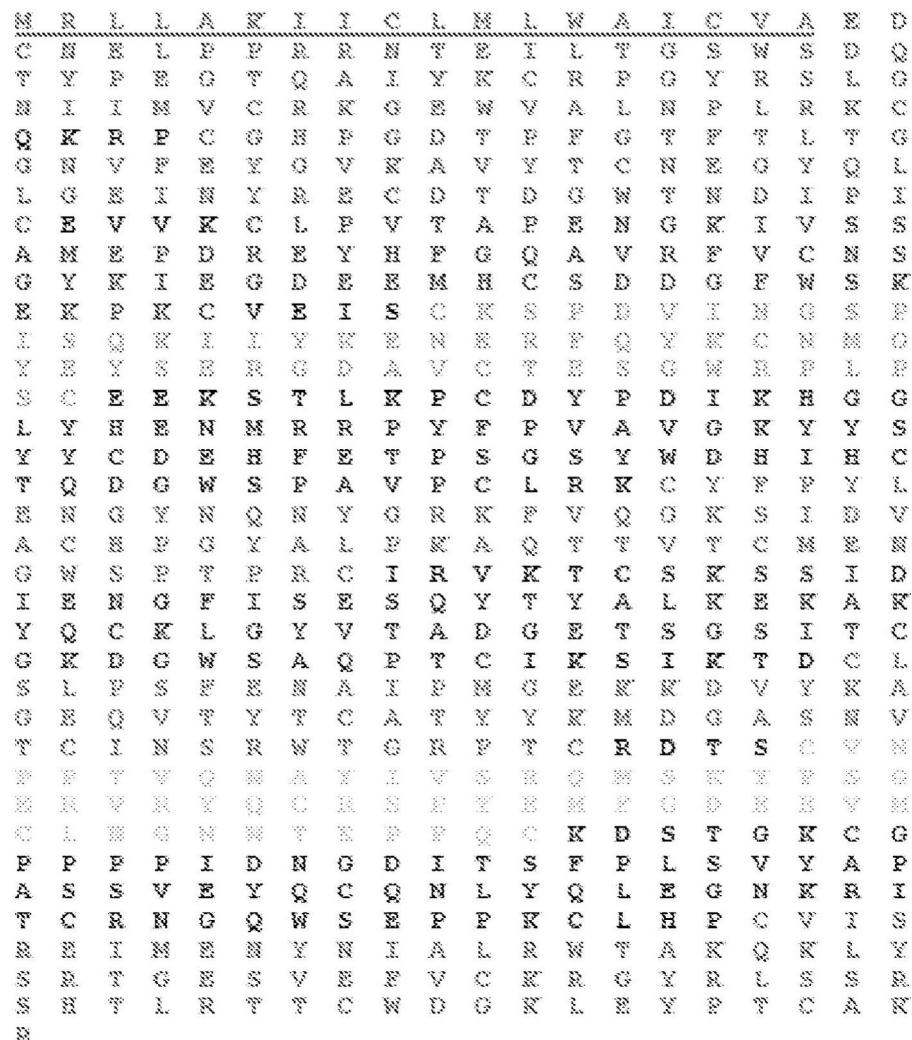


图14

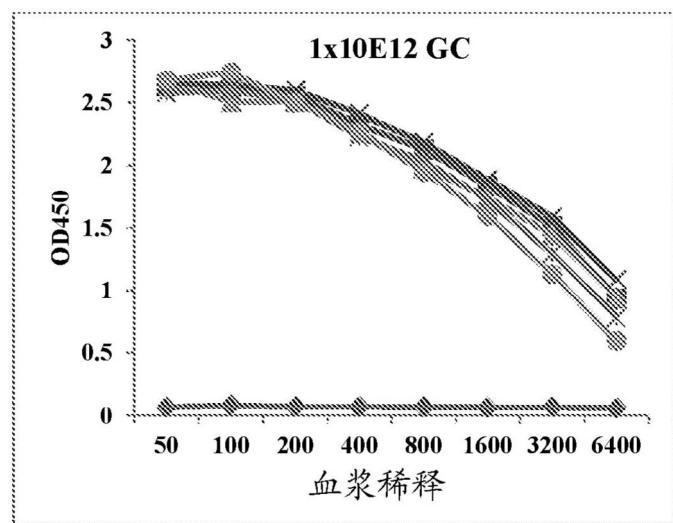


图15A

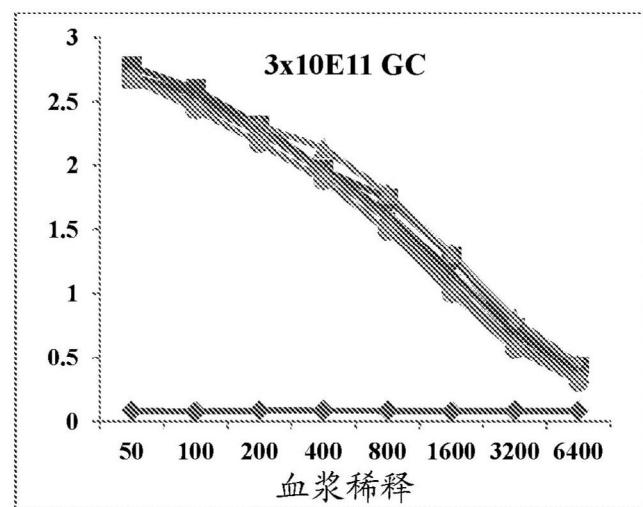


图15B

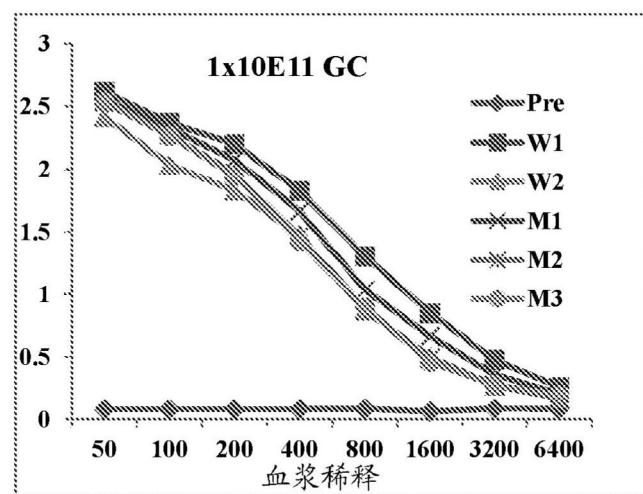


图15C

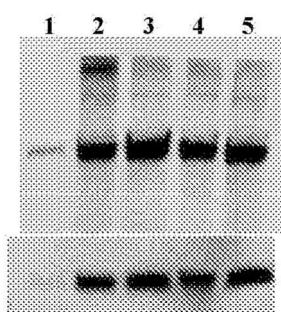


图16A

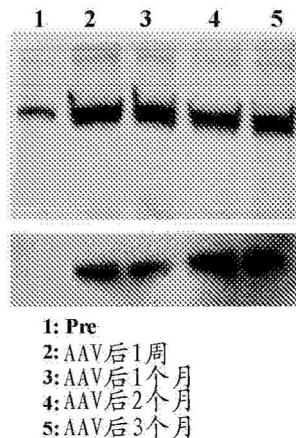


图16B

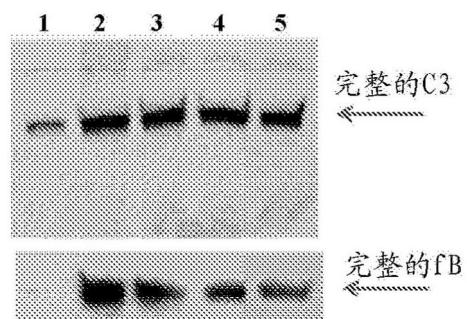


图16C

图17A

V P C V R K C V F H Y V E N G D S A Y W
 gaaaaagtatgtgcagggtcagtctttaaaagtccagtgatcataatggctatagtctt
 E X V Y V Q G Q S L K V Q C Y N G Y S L
 caaaatggtaaagcacacatgacatgtacagagaatggctggtecccttcctcccaaattgc
 Q N G Q D T M T C T E N G W S P P P X C
 Atccgtatcaagacatgttcagcatcagatatacattgacaatggattttcttctgaz SCRS
 I R I X T C S A S D I H I D N G F L S E
 ttttttttatatatgtctataatagagaacatccatataatgttaaagcagggatatgtg
 S S S I Y A L N R E T S Y R C K Q G Y V
 scaaaaatctggagaastatcaggatccaaatgtccatccaaaatggatggtcacccca
 T N T G E I S G S I T C L Q N G W S P Q
 Cccatcatgtcatataatgttgcctgtatttggaaattctataactaagaataact SCRS
 P S C I K S C D M P V F E N S I T K N T
 aggacatggtttaagctcaatgacaatttagactatgaatgtctcggtgattgaaaat
 R T W F K L N D K L D X E C L V G F E N
 gaatataaacataccaaaggctctataacatgtacttattatggatggctgatacaccc
 E Y K N T K G S I T C T Y Y G W S D T P
 Tcatgttatgaaagagaatycagtgtcccaactctagaccgaaaactagtcgttcccc
 S C Y E R E C S V P T L D R E L V V S P
 agaaaaagaaaaatacagaggtggagatttggaaattctctgtccattcaggacacaga
 R K E K Y R V G D L L E F S C H S G H R
 gttggggccagattcagtgcataatgttaccactttggatggcttccatgt
 V C F D S V Q C X H F G W S P G F P T C
 Aaangytcaagtgcatctyhycccccacccatggaaatttttttttttttttttttttt
 R G Q V A S C A P P L E I L H G E I N G
 gaaaaaaaatgtcaatcagccatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 A K K V E Y S H G E V V K Y D C E P R F
 ctactgtggggccccaataaaaaatcccaatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 L L K G F N K I Q C V D G N W T T L P V
 Tgtattgaggaggagaacatgtggagacatgtggagacatgtggagacatgtggagac
 C I E E R T C G D I P E L E H G S A K
 tggttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt
 C S V P Y H N G D S V Z W I C S E N F
 scaatgtttggacatgggtcaagtttttgtcaatgtggaaaaatggaccccgatcttaas
 T M I C H S S V S C I S C K N T Q L P K
 Tgtgttgtcaacagaccaactggagaagtgttagagtgtcaactggcatagaagca
 C V A T D Q L E K C R V L K S T G I E A
 ataaaaaccacaaattgtactgaatttacgcataactccaccatggattacaatgttagagac
 I K P E L T E F T H N S T M D Y K C R D
 aagcaggagtgacgacgctcaatctgtatcaatggaaaaatggatctgtcaacccaaactgt
 K Q E Y E R S I C I N G X W D P E P N C

图17B

图17C

图18A

图18B

图19

MVQHRFLLSEVGPRKIQIMRLSARIWLLWTVCAAEDCKGPPREN
SEILSGSWSEQLYYPEGTQATYKCRPGYRTLGLGTIVKVCKNGKWWVASNP
 SRICRKPCGHPGDTPFGSFRLAVGSSQFEFGAKVVYTCDGGYQLLGEI
 DYRECAGADGWINDIPLCEVVKCLPVTTELNGRIIVSGAAETDQEYYFG
 QVVRFECNSGFFKIEGHKEIHCSENGGLWSNEKPRRCVVEILCTPPRVENG
 DGINVKPVYKENERYHYKCKHGYVPKERGDAVCTGSWGSSQQPFCEEK
 RTLKPCEFPPQFKYGRLYYEESLRPNFPVSIGNKYSYKCDNGFSPPSGYS
 WDYLRCTAQGWEPREVPCVRKCVFHYYVENGDSAWEEKVYYVQGQSLK
 VQCYNNGYSLQNGQDTMTCTENGWSPPPCKIRIKTCSASDIHIDONGFL
 SESSSIYALNRETSYRCKAQGYVTNTGEISGSITCLQNGWSPQAPSCKSR
 DSTGKCGPPPIIDNGDITSLSLPVYEPPLSSVEYQCQKYYLLKGKKTTC
 RNGKWWSEPPPTCLHACVIPENIMESHNIIILKWRHTEKIYSHSGEDIEFG
 CKYGYKARDSSPPFRTKCINGTINYPTCV

图20

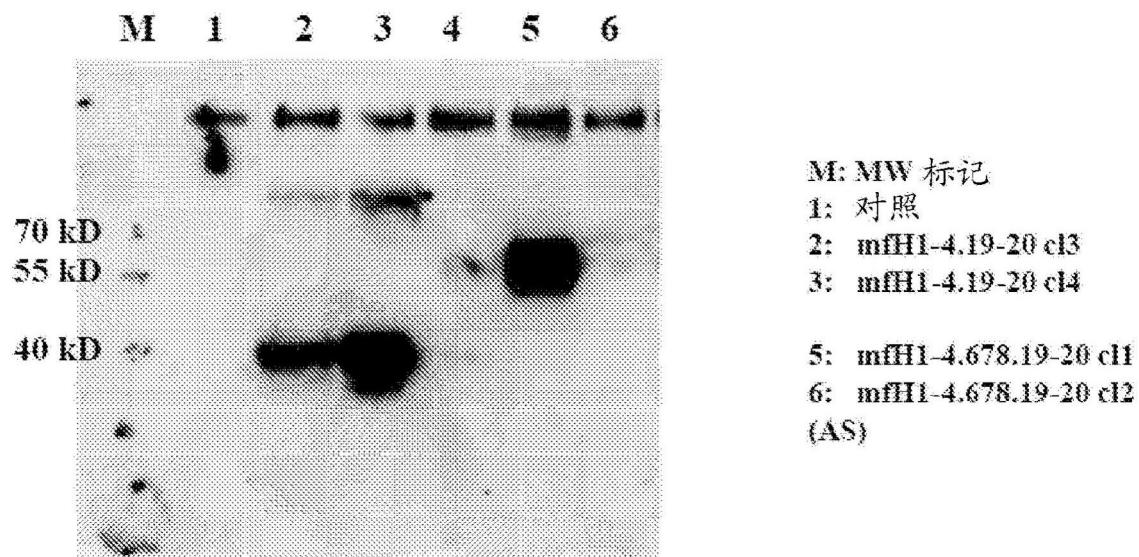


图21

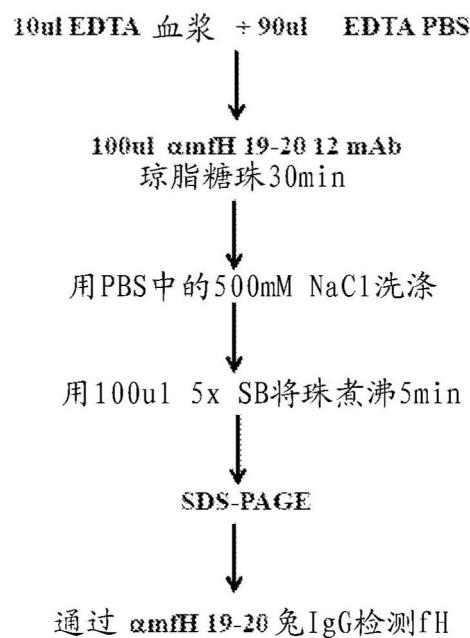


图22A

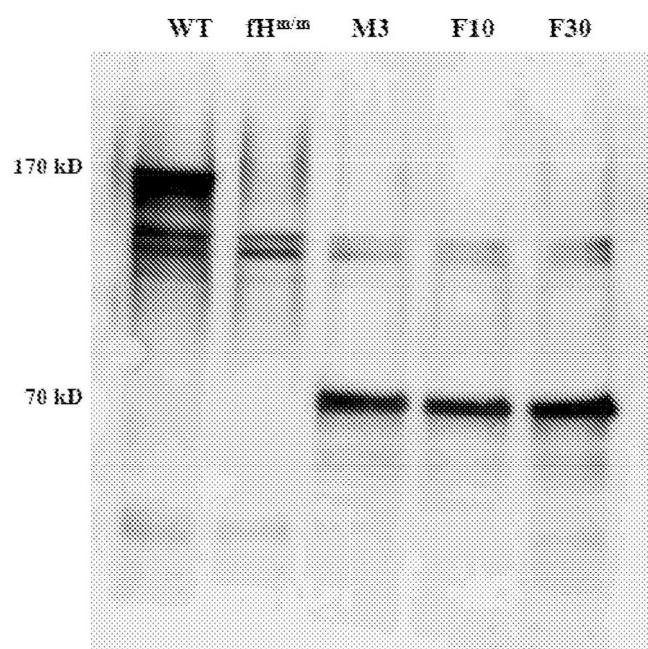


图22B

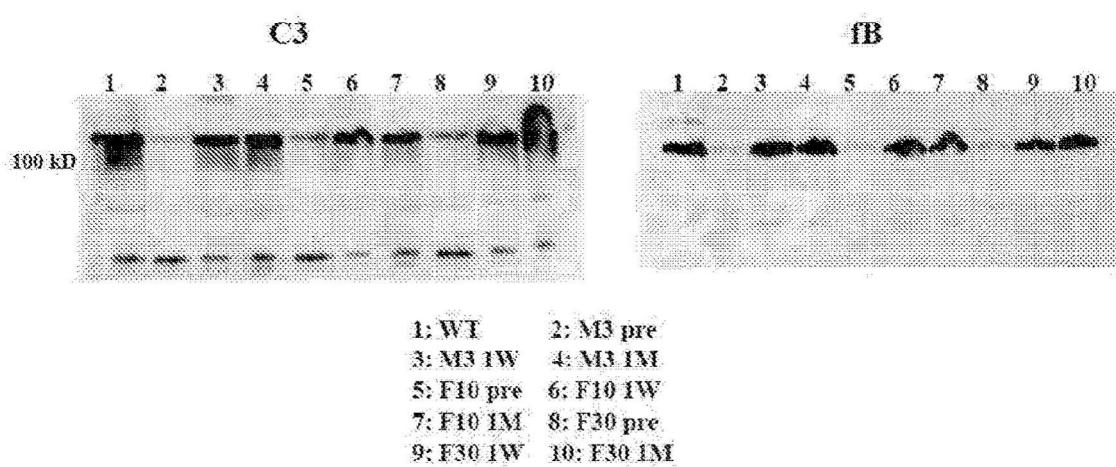


图23

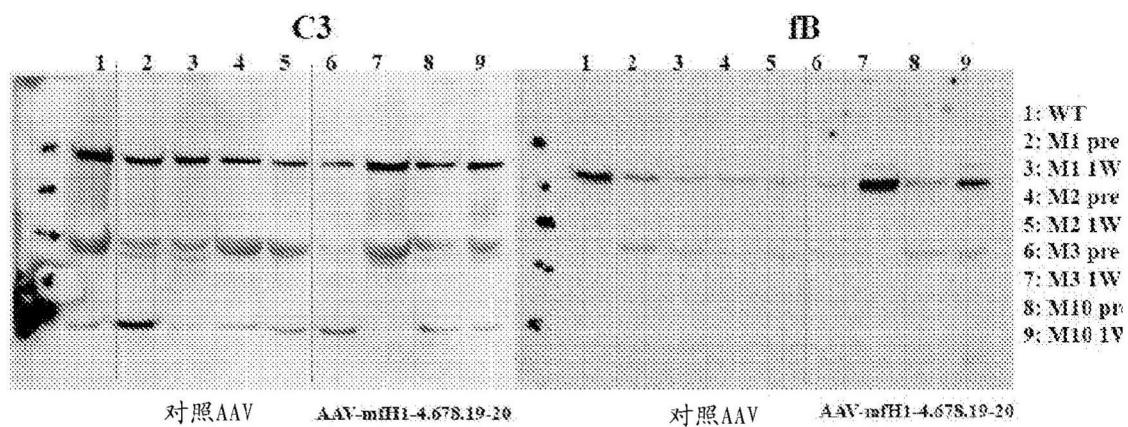


图24

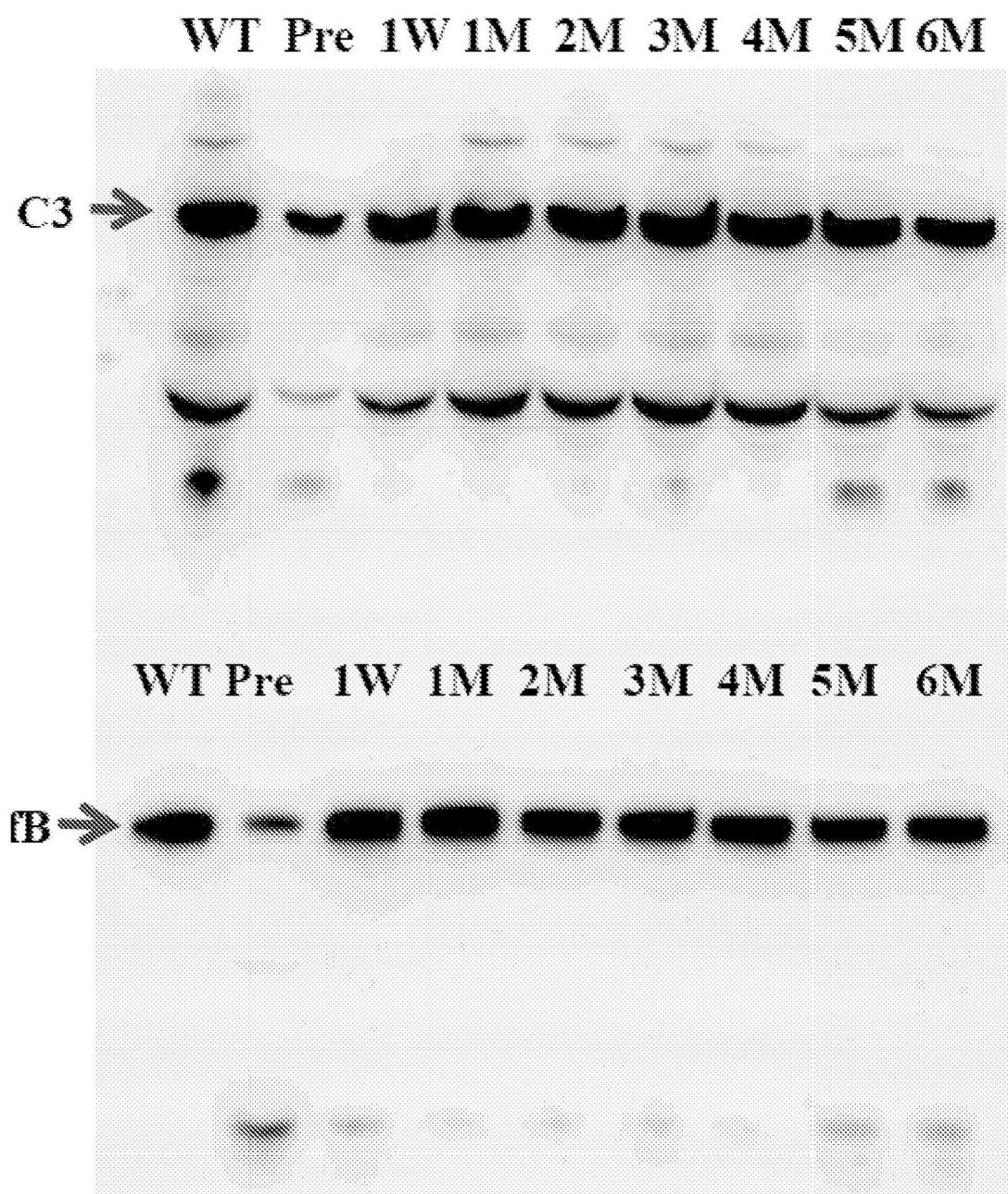


图25

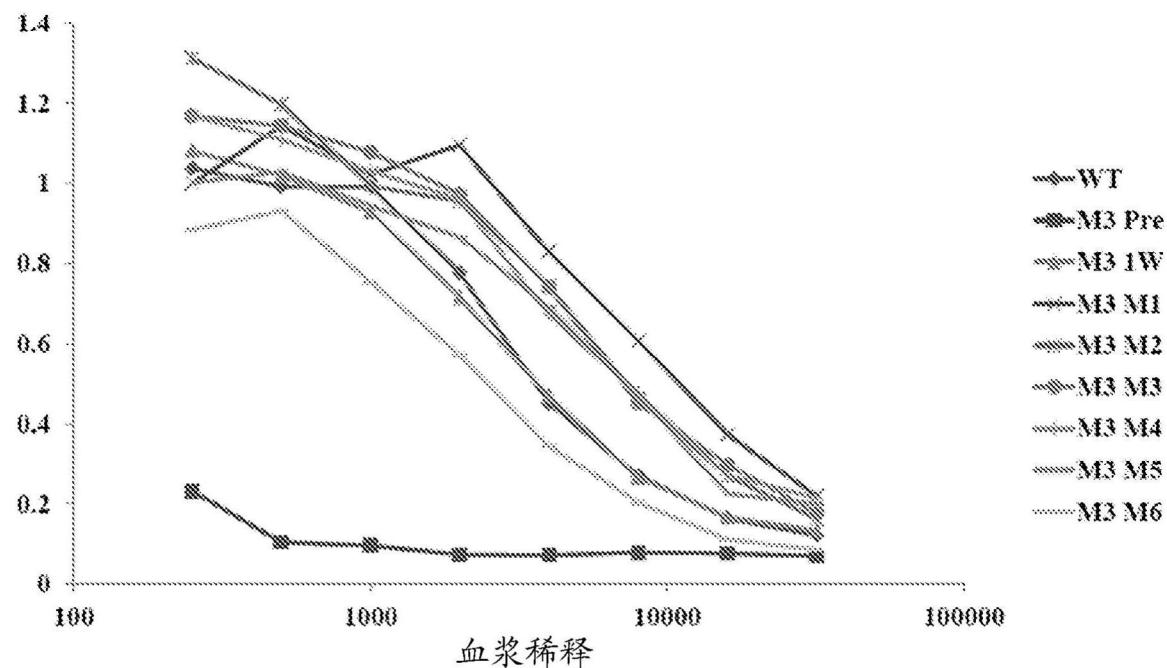


图26

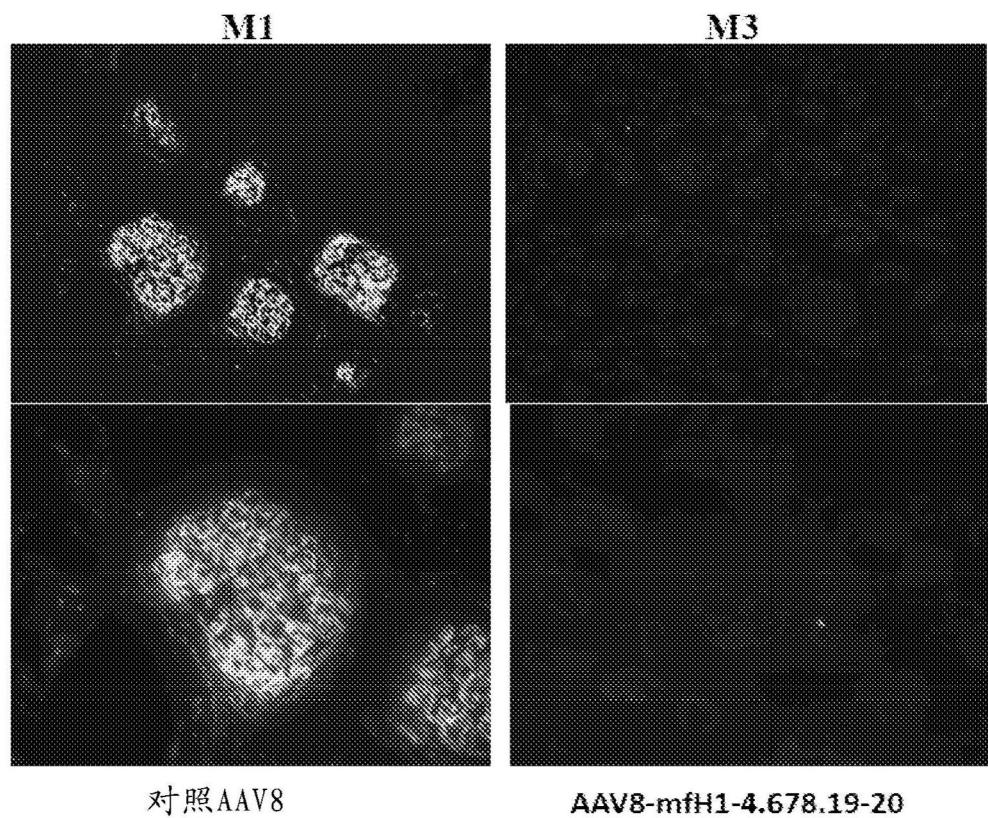


图27

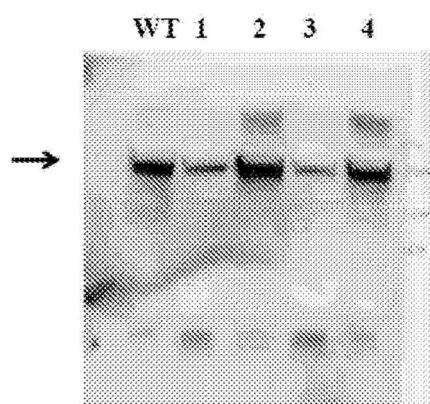


图28A

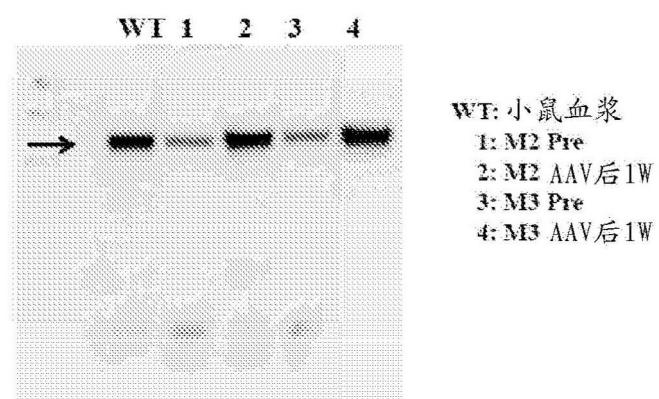
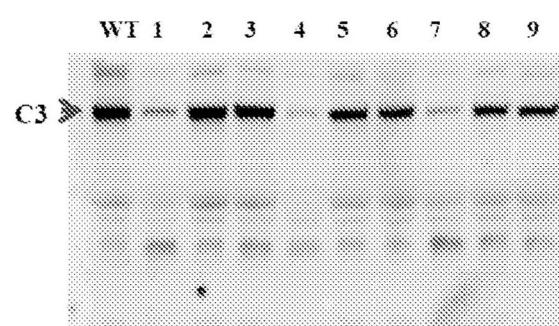
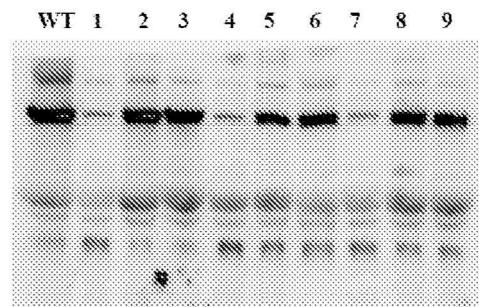


图28B



WT: Wt 小鼠血浆
 1: M #1 Pre
 2: M #1 AAV后 1W (1x 10¹¹/ 基因拷贝)
 3: M #1 AAV后 1M (1x 10¹²/ 基因拷贝)
 4: M #3 pre
 5: M #3 AAV后 1W (3x 10¹¹/ 基因拷贝)
 6: M #3 AAV后 1M (3x 10¹²/ 基因拷贝)
 7: M #5 Pre
 8: M #5 AAV后 1W (1x 10¹¹/ 基因拷贝)
 9: M #5 AAV后 1M (1x 10¹²/ 基因拷贝)

图29A



WT: Wt 小鼠血浆

- 1: M #2 Pre
- 2: M #2 AAV后 1W (1x 10¹¹/ 基因拷贝)
- 3: M #2 AAV后 1M (1x 10¹²/ 基因拷贝)
- 4: M #4 pre
- 5: M #4 AAV后 1W (1x 10¹¹/ 基因拷贝)
- 6: M #4 AAV后 1M (1x 10¹²/ 基因拷贝)
- 7: M #6 Pre
- 8: M #6 AAV后 1W (3x 10¹¹/ 基因拷贝)
- 9: M #6 AAV后 1M (3x 10¹²/ 基因拷贝)

图29B

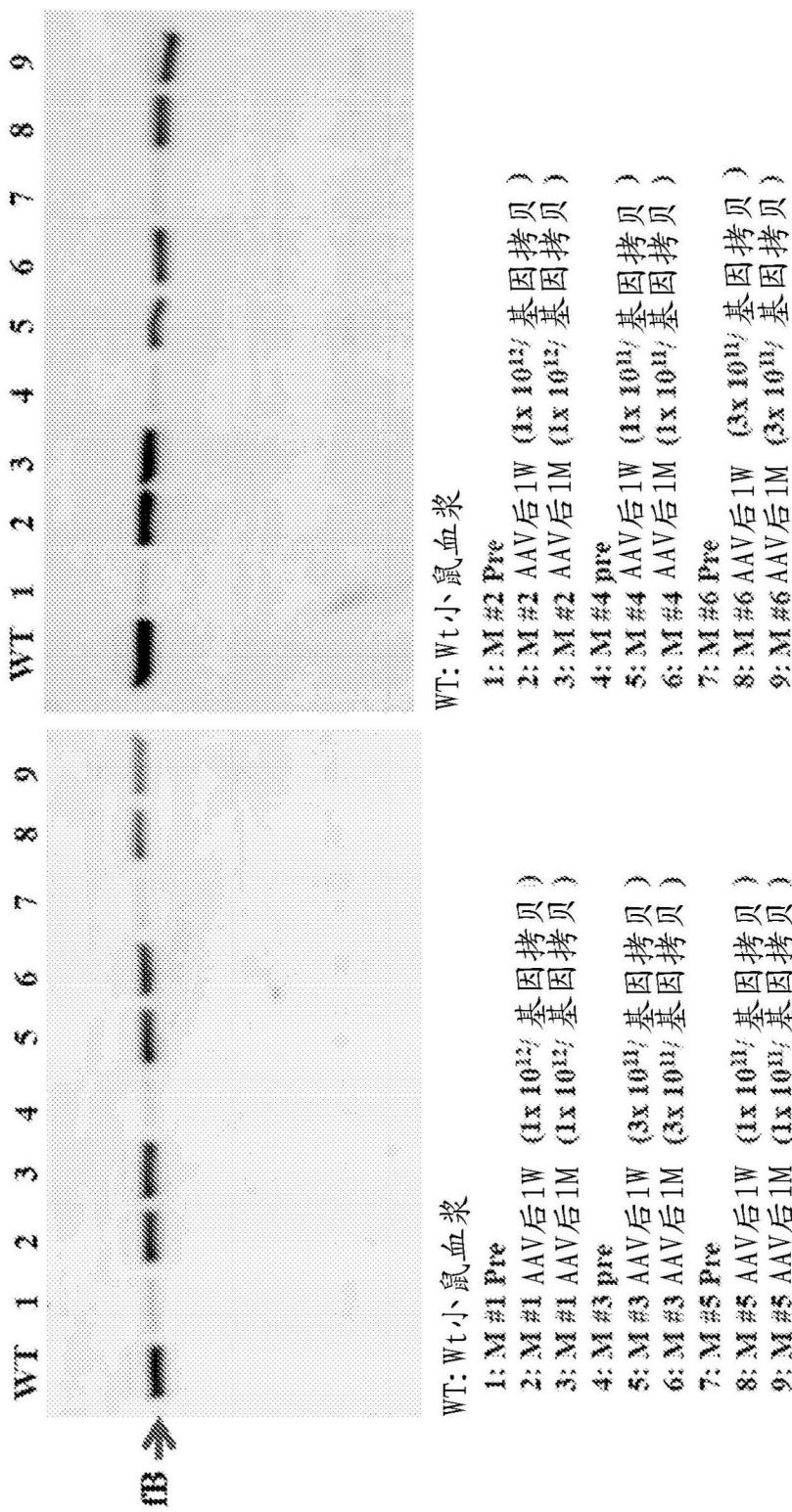


图30

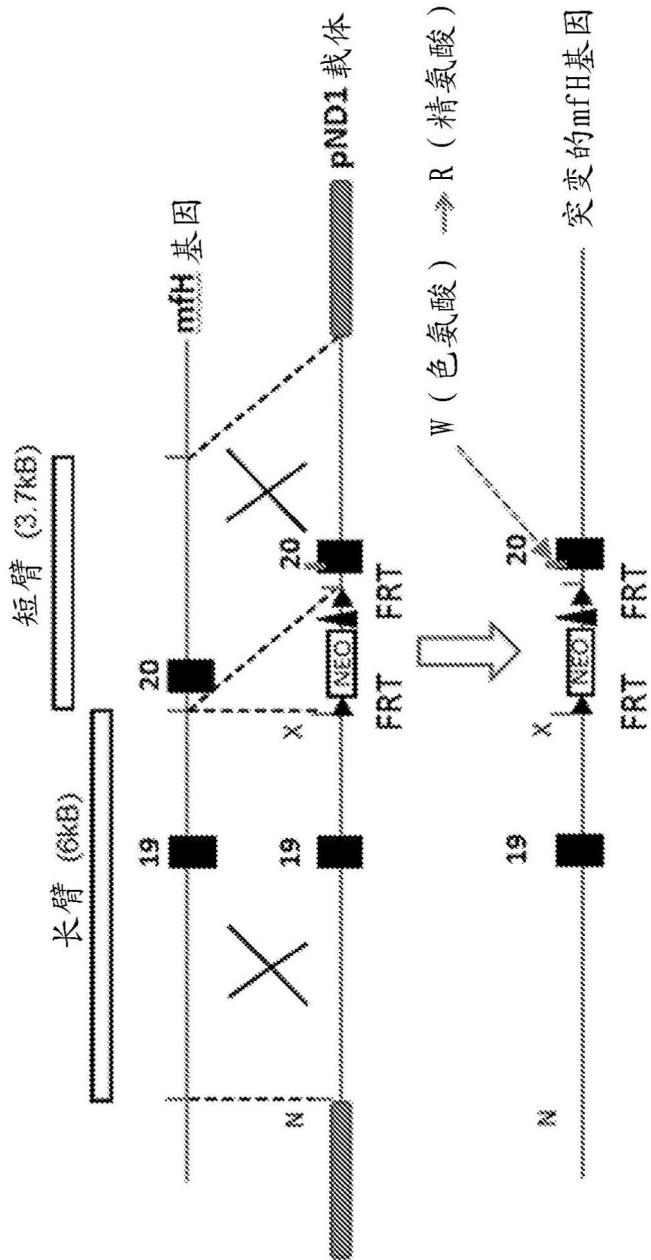


图31

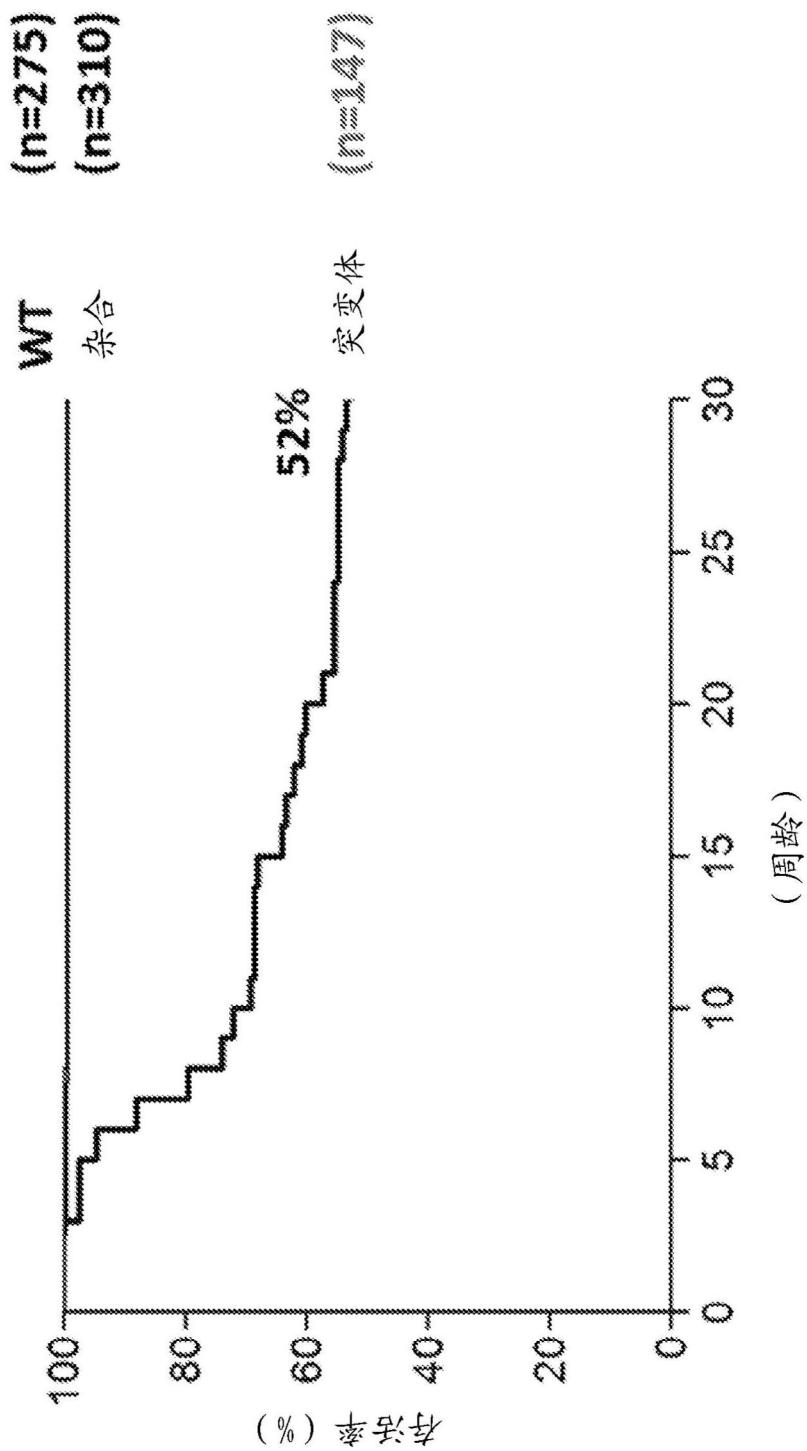


图32

血小板

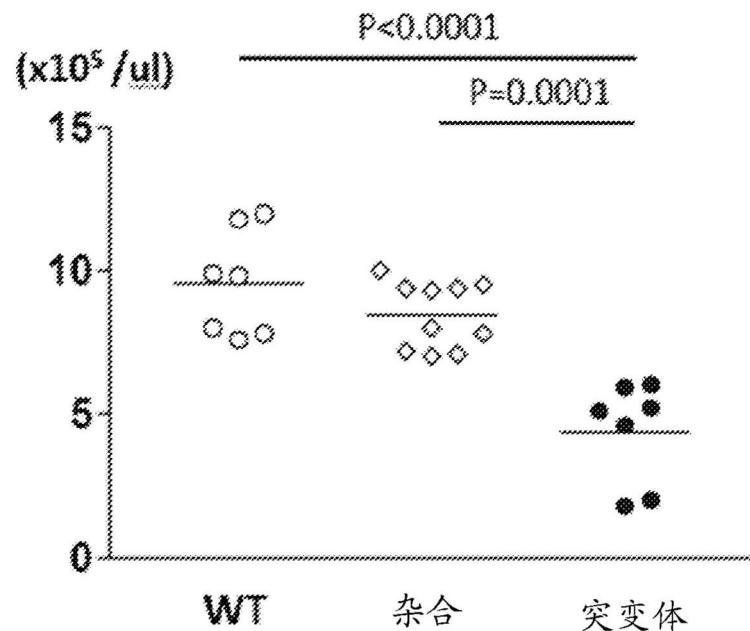


图33A

Hb

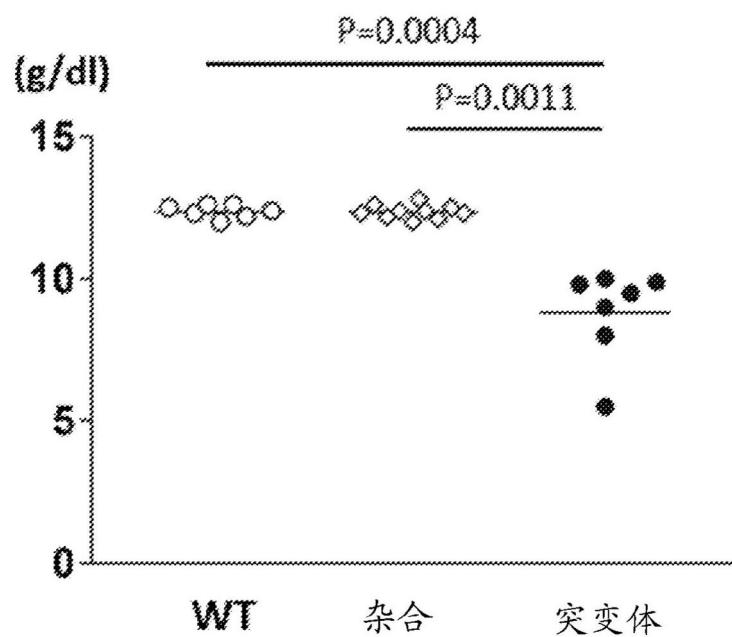


图33B

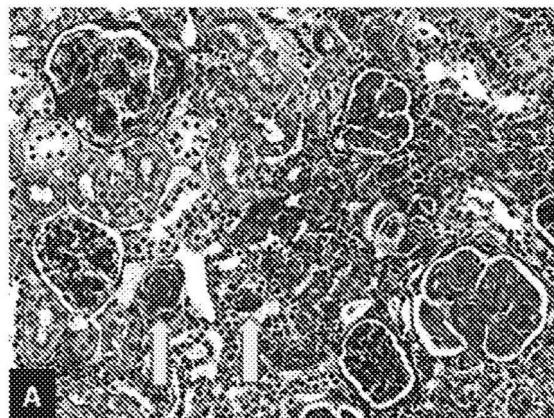


图34A

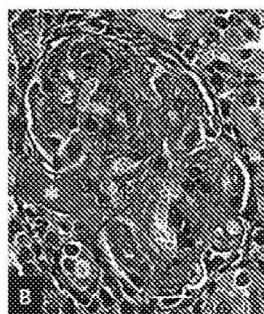


图34B

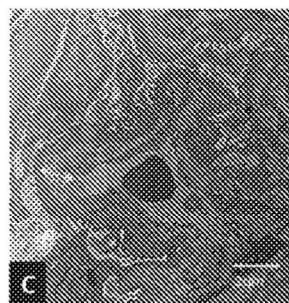


图34C

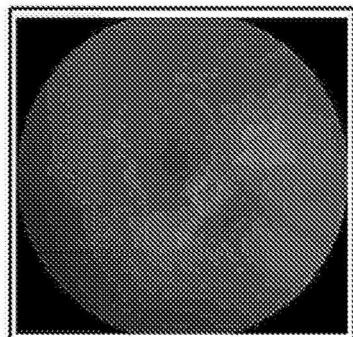


图35A

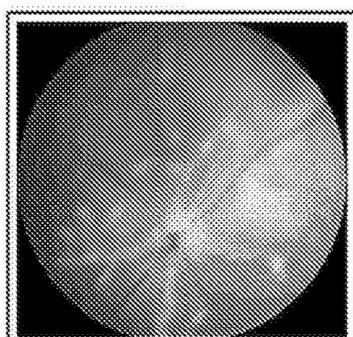


图35B

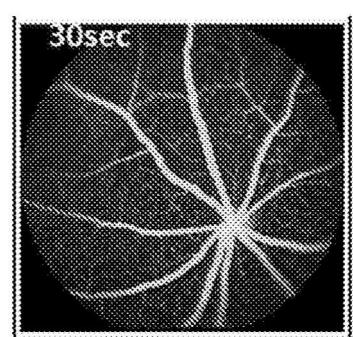


图35C

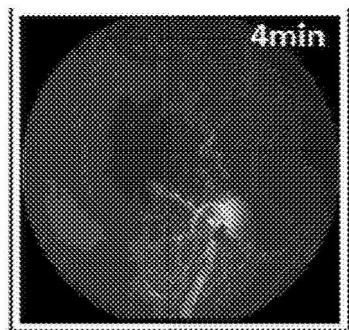


图35D

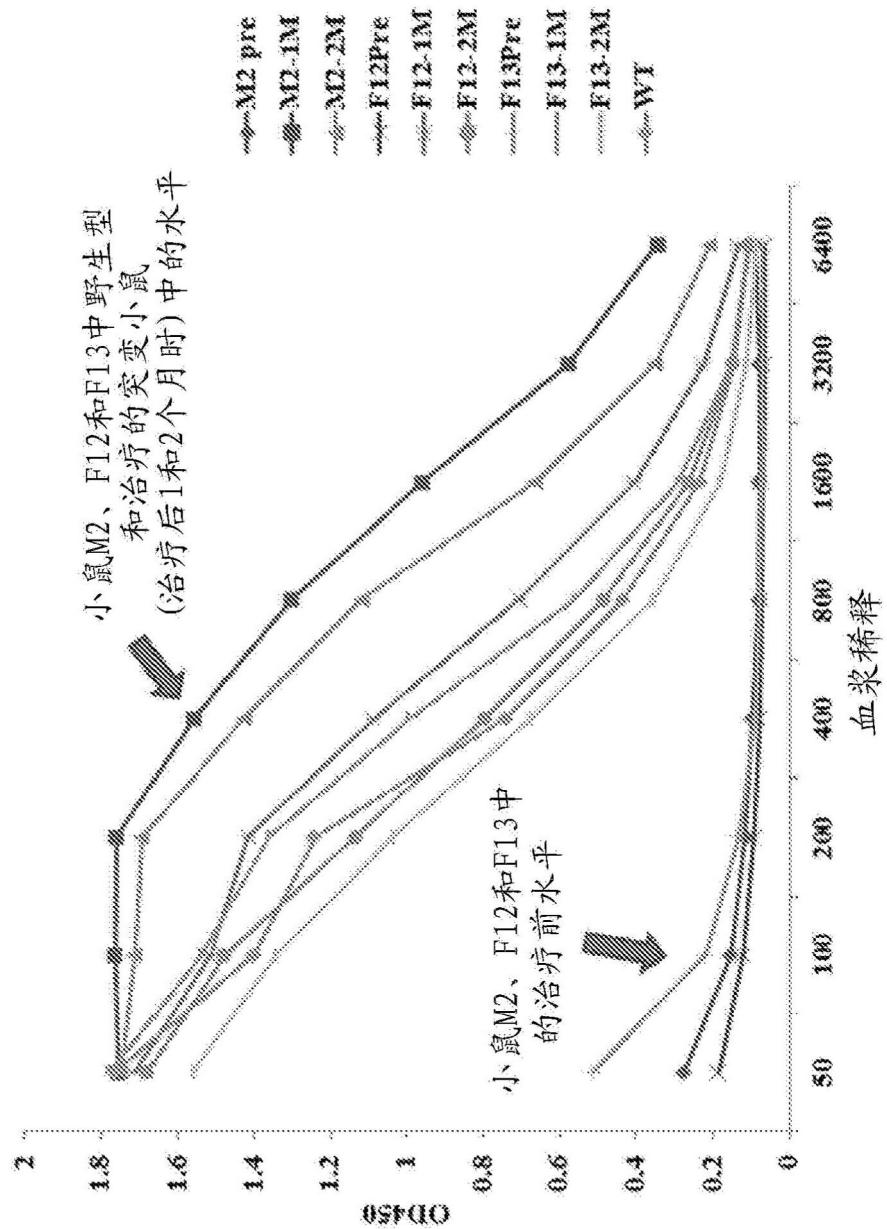


图36

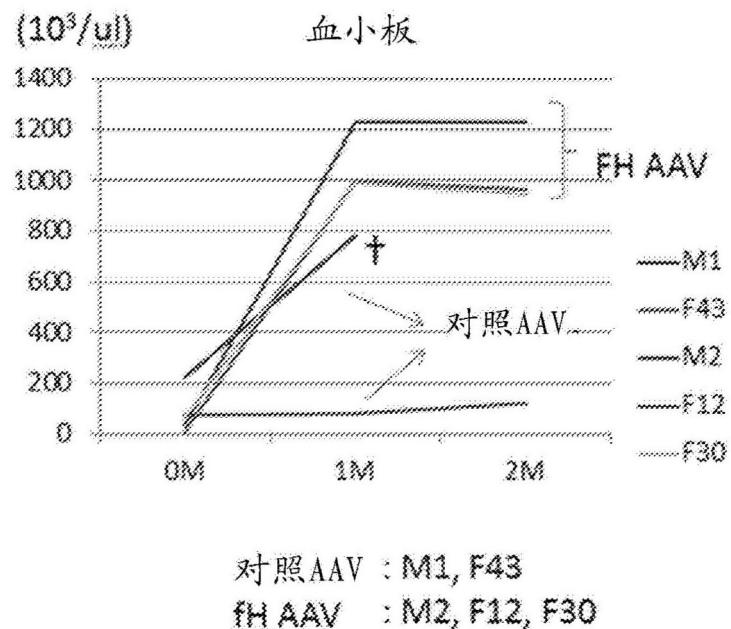


图37A

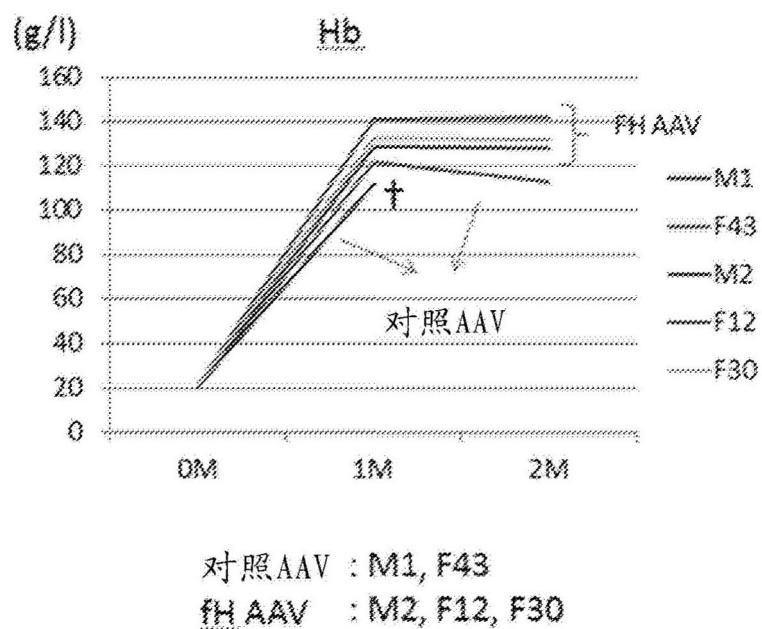


图37B