



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116891533 A

(43) 申请公布日 2023.10.17

(21) 申请号 202310376695.2

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.10

A61K 38/17 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61P 7/04 (2006.01)

202210374811.2 2022.04.11 CN

A61P 43/00 (2006.01)

(71) 申请人 天辰生物医药(苏州)有限公司

地址 201203 上海市浦东新区碧波路518号
304室

(72) 发明人 马海立 刘恒

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 史文静 黄革生

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书3页 说明书26页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

补体抑制杂合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及包含CFH功能单元和DAF功能单元的杂合蛋白,其编码核酸以及其治疗补体系统相关疾病或病症的方法和用途。

1. 杂合蛋白,其包含
 - (i) 人补体因子H(CFH)的CCP1,
 - (ii) 人衰变加速因子(DAF)的CCP3和CCP4,以及
任选地信号肽和/或标签;
或由上述组成。
2. 权利要求1的杂合蛋白,其中DAF的CCP3和CCP4直接连接在一起构成CCP3-4。
3. 权利要求1或2的杂合蛋白,其中人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-82位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,任选地,所述CCP1包含V62I突变,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。
4. 权利要求1或2的杂合蛋白,其中人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-84位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,任选地,所述CCP1包含V62I突变,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。
5. 权利要求1-4中任一项的杂合蛋白,其中人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第161-222的氨基酸序列或由其组成,和/或人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。
6. 权利要求1-4中任一项的杂合蛋白,其中人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第163-222的氨基酸序列或由其组成,和/或人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。
7. 权利要求2的杂合蛋白,其中人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第161-285位的氨基酸序列,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。
8. 权利要求2-4中任一项的杂合蛋白,其中人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第163-285位的氨基酸序列,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。
9. 权利要求2的杂合蛋白,其中
 - (1) 人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-82位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第161-222的氨基酸序列或由其组成,和人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成;
 - (2) 人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-84位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第163-222的氨基酸序列或由其组成,和人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成;
 - (3) 人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-82位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第161-285位的氨基酸序列,或由其组成;或
 - (4) 人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-84位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第163-285位的氨基酸序列,或由其组成;其中人CFH蛋白的氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号,且人DAF蛋白的氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。
10. 权利要求9的杂合蛋白,其中人CFH的CCP1具有V62I突变。
11. 权利要求1-10中任一项的杂合蛋白,其中人CFH蛋白是人天然CFH蛋白或其包含
 - (i) SEQ ID NO:3或5所示的氨基酸序列,

(ii) SEQ ID NO:4或6所示的核酸序列所编码的氨基酸序列；
(iii) 与(i)或(ii)所示的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列；

或有所述(i)至(iii)中任一项所示的氨基酸序列组成。

12. 权利要求1-11中任一项的杂合蛋白，其中人DAF蛋白是人天然DAF蛋白或其包含

(i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列，

(ii) SEQ ID NO:2所示的核酸序列所编码的氨基酸序列；

(iii) 与(i)或(ii)所示的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列；

或有所述(i)至(iii)中任一项所示的氨基酸序列组成。

13. 权利要求1-12中任一项的杂合蛋白，其中

所述人CFH的CCP1包含SEQ ID NO:12、13、14或15的氨基酸序列，或包含与SEQ ID NO:12、13、14或15的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

所述人DAF的CCP3包含SEQ ID NO:7或8的氨基酸序列，或包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

所述人DAF的CCP4包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，或包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

所述人DAF的CCP3-4包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列，或包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

14. 权利要求1-13中任一项的杂合蛋白，其中所述标签为例如纯化的标签，例如六组氨酸标签或生物素标记，例如其包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

15. 权利要求1-14中任一项的杂合蛋白，其中所述信号肽为分泌性信号肽，例如其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

16. 权利要求1-15中任一项的杂合蛋白，其中所述杂合蛋白包含SEQ ID NO:18-33中任一项的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列，或由其组成。

17. 核酸分子，其编码权利要求1-16中任一项所述的杂合蛋白。

18. 表达载体，其包含权利要求17的核酸分子，优选地，所述表达载体为pCDNA3.1。

19. 宿主细胞，其包含权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如293细胞，例如Expi293细胞。

20. 制备权利要求1-16中任一项所述的杂合蛋白的方法，所述方法包括，在适合所述杂合蛋白表达的条件下，培养权利要求19的宿主细胞，和任选地还包括从所述宿主细胞或所述宿主细胞培养基分离所述蛋白，和/或纯化所述蛋白。

21. 药物组合物或药物或制剂，其包含权利要求1-16中任一项所述的杂合蛋白或编码其的核酸分子，或权利要求17所述的核酸分子，以及任选地药用辅料。

22. 药物组合产品,其包含

权利要求1-16中任一项所述的杂合蛋白或编码其的核酸分子,或权利要求17所述的核酸分子;以及

其它治疗剂。

23. 在受试者中预防或治疗补体系统相关疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的权利要求1-16中任一项所述的杂合蛋白或编码其的核酸分子;或权利要求17所述的核酸分子;或权利要求21的药物组合物或制剂;或权利要求22的药物组合产品。

24. 权利要求23的方法,其中所述疾病或病症是由于补体系统的异常激活或补体系统失调导致的。

25. 权利要求24的方法,其中所述补体系统的异常激活或补体系统的失调是由于例如微生物感染或自身免疫抗体的增加,或者是由于补体调节蛋白减少、缺失、失能或功能被干扰、阻断。

26. 权利要求23的方法,其中所述补体系统相关疾病或病症选自需要溶血抑制的疾病,例如需要抑制补体免疫经典途径和/或补体免疫旁路途径的溶血的疾病;或需要抑制C3b沉积活性的疾病,例如致密物沉积病DDD。

补体抑制杂合蛋白

[0001] 本发明涉及包含CFH功能单元和DAF功能单元的杂合蛋白,其编码核酸以及其治疗补体系统相关疾病或病症的方法和用途。

背景技术:

[0002] 补体系统是先天免疫系统的一部分,由30余种可溶性蛋白分子组成,是天然免疫系统的一部分,其组成成分包括补体固有成分、多种调节因子和补体受体等30多种分子。已知补体系统直接作用于病原体;促进病原体特异性适应性免疫反应;参与细胞分化和极化、组织再生、脂质代谢、清除免疫复合物和凋亡等作用。补体激活缺乏调节或激活不当会导致宿主组织受损,因此补体系统受到一系列蛋白质的严格调节。其中,补体激活调节因子(RCA)家族蛋白主要负责补体调节。RCA蛋白包括膜蛋白,例如衰变加速因子(DAF;CD55)、膜辅因子蛋白(MCP;CD46)和补体受体1(CR1;CD35)以及液相蛋白例如因子H(FH或CFH)和C4b-结合蛋白(C4BP)。在结构上,RCA蛋白由补体控制蛋白重复(CCP)模块组成,其中2-4个连续模块有助于称为衰减加速活性(DAA)和辅因子活性(CFA)的调节功能。RCA蛋白通过靶向补体途径的中心酶C3/C5转化酶发挥作用。为了使这些酶失活,RCA蛋白与这些转化酶或其非催化亚基结合并使它们失活。在DAA中,RCA蛋白与转化酶结合并将其不可逆地解离为其亚基,而在CFA中,RCA蛋白与转化酶的非催化亚基(C3b/C4b)结合并募集丝氨酸蛋白酶因子I(FI)切割并使其失活,从而停止其形成C3转化酶的能力。

[0003] H因子抑制C3b扩增。它是因子I催化的C3b裂解为iC3b的辅助因子,是补体受体2和3的调理素和配体。它加速旁路途径C3转化酶C3bBb的不可逆解离,还可能与因子B竞争在转化酶原形成过程中与C3b结合。FH是可溶性对于保护表面(包括胞外基质ECM)很重要。因子H与肾上腺髓质素(一种肽激素)结合,并可能阻止其降解。FH在管理细胞衰老、应激或损伤中的作用通过与C反应蛋白、五聚蛋白、DNA、组蛋白、膜联蛋白II、蛋白质的丙二醛乙醛加合物和氧化脂质的相互作用。FHL1还具有因子I辅因子活性和C3bBb加速衰减活性(The Complement FactsBook.Edited by:Scott Barnum and Theresa Schein, Copyright © 2018Elsevier Ltd.All rights reserved.<https://doi.org/10.1016/C2015-0-06595-9>,第30章)。

[0004] DAF通过阻止经典和旁路C3和C5转化酶的形成和加速其衰变,从而抑制C3和C5的切割,从本质上保护宿主细胞免受自体补体攻击。当将纯化的DAF添加到细胞中时,它能够整合到细胞膜中并显示出功能活性。DAF还被发现可以调节T细胞耐受性,从而负调节多种自身免疫性疾病的动物模型(The Complement FactsBook.Edited by:Scott Barnum and Theresa Schein, Copyright © 2018Elsevier Ltd.All rights reserved.<https://doi.org/10.1016/C2015-0-06595-9>,第25章)。

[0005] 本发明涉及具有更好的补体调节活性的杂合蛋白,希望这种杂合蛋白能够具有更好的疗效等优势。

发明内容：

[0006] 本发明涉及一种CFH和DAF的杂合蛋白，其中CFH的CCP1/SCR1与DAF的CCP（例如DAF的CCP3-4/SCR3-4）杂合形成杂合蛋白。

[0007] 该杂合蛋白具有更好的补体抑制活性，包括抑制旁路途径（AP）、经典途径（CP）和/或C3b沉积的活性。

[0008] 在一些实施方案中，所述杂合蛋白能够有效阻断人补体溶血活性。

[0009] 在一些实施方案中，本发明的杂合蛋白能够有效抑制人补体经典途径溶血和/或人补体旁路途径溶血。

[0010] 在一些实施方案中，本发明的杂合蛋白能够有效抑制C3b沉积。

[0011] 例如，本发明的杂合蛋白在包含CFH的CPP1/SCR1的基础上，进一步包含较少的DAF的CCP，可以获得分子量较小的杂合蛋白。所述杂合蛋白，当作为治疗应用时，相比其它分子量更大的常用的补体调节蛋白（特别是相比还包含CFH的其他CCP的杂合蛋白），在相同的质量浓度给药剂量下摩尔浓度剂量更高，具有更好疗效或更长给药间隔的潜力，如眼科、脑科用药。在另一些情况下，较小的分子量也更利于组织穿透，如肿瘤组织、血脑屏障等。

[0012] 在一些实施方案中，本发明涉及以下具体的项：

[0013] 1、杂合蛋白，其包含（i）人补体因子H（CFH）的CCP1，

[0014] （ii）人衰变加速因子（DAF）的CCP3和CCP4，以及

[0015] 任选地信号肽和/或标签；

[0016] 或由上述组成。

[0017] 2、实施方案1的杂合蛋白，其中DAF的CCP3和CCP4直接连接在一起构成CCP3-4。

[0018] 3、实施方案1或2的杂合蛋白，其中人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-82位的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，任选地，所述CCP1包含V62I突变，其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。

[0019] 4、实施方案1或2的杂合蛋白，其中人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-84位的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，任选地，所述CCP1包含V62I突变，其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。

[0020] 5、实施方案1-4中任一项的杂合蛋白，其中人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第161-222的氨基酸序列或由其组成，和/或人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成，其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0021] 6、实施方案1-4中任一项的杂合蛋白，其中人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第163-222的氨基酸序列或由其组成，和/或人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成，其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0022] 7、实施方案2的杂合蛋白，其中人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第161-285位的氨基酸序列，或由其组成，其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0023] 8、实施方案2-4中任一项的杂合蛋白，其中人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第163-285位的氨基酸序列，或由其组成，其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0024] 9、实施方案2的杂合蛋白，其中

[0025] （1）人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-82位的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列

组成,且人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第161-222的氨基酸序列或由其组成,和人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成;

[0026] (2)人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-84位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3包括人DAF蛋白的第163-222的氨基酸序列或由其组成,和人DAF的CCP4包括人DAF蛋白的第223-285的氨基酸序列或由其组成;

[0027] (3)人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-82位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第161-285位的氨基酸序列,或由其组成;或(4)人CFH的CCP1包含人CFH蛋白的第19-84位的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且人DAF的CCP3-4包含人DAF蛋白的第163-285位的氨基酸序列,或由其组成;

[0028] 其中人CFH蛋白的氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号,且人DAF蛋白的氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0029] 10、实施方案9的杂合蛋白,其中人CFH的CCP1具有V62I突变。

[0030] 11、实施方案1-10中任一项的杂合蛋白,其中人CFH蛋白是人天然CFH蛋白或其包含(i)SEQ ID NO:3或5所示的氨基酸序列,

[0031] (ii)SEQ ID NO:4或6所示的核酸序列所编码的氨基酸序列;

[0032] (iii)与(i)或(ii)所示的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列;

[0033] 或有所述(i)至(iii)中任一项所示的氨基酸序列组成。

[0034] 12、实施方案1-11中任一项的杂合蛋白,其中人DAF蛋白是人天然DAF蛋白或其包含(i)SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,

[0035] (ii)SEQ ID NO:2所示的核酸序列所编码的氨基酸序列;

[0036] (iii)与(i)或(ii)所示的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列;

[0037] 或有所述(i)至(iii)中任一项所示的氨基酸序列组成。

[0038] 13、实施方案1-12中任一项的杂合蛋白,其中

[0039] 所述人CFH的CCP1包含SEQ ID NO:12、13、14或15的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:12、13、14或15的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列,或由所述序列组成;

[0040] 所述人DAF的CCP3包含SEQ ID NO:7或8的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列,或由所述序列组成;

[0041] 所述人DAF的CCP4包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列,或由所述序列组成;和/或所述人DAF的CCP3-4包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列,或由所述序列组成。

[0042] 14、实施方案1-13中任一项的杂合蛋白,其中所述标签为例如纯化的标签,例如六组氨酸标签或生物素标记,例如其包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0043] 15、实施方案1-14中任一项的杂合蛋白,其中所述信号肽为分泌性信号肽,例如其

包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0044] 16、实施方案1-15中任一项的杂合蛋白,其中所述杂合蛋白包含SEQ ID NO:18-33中任一项的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列,或由其组成。

[0045] 17、核酸分子,其编码实施方案1-16中任一项所述的杂合蛋白。

[0046] 18、表达载体,其包含实施方案17的核酸分子,优选地,所述表达载体为pCDNA3.1。

[0047] 19、宿主细胞,其包含实施方案17所述的核酸分子或实施方案18所述的表达载体,优选地,所述宿主细胞是原核的或真核的,例如293细胞,例如Expi293细胞。

[0048] 20、制备实施方案1-16中任一项所述的杂合蛋白的方法,所述方法包括,在适合所述杂合蛋白表达的条件下,培养实施方案19的宿主细胞,和任选地还包括从所述宿主细胞或所述宿主细胞培养基分离所述蛋白,和/或纯化所述蛋白。

[0049] 21、药物组合物或药物或制剂,其包含实施方案1-16中任一项所述的杂合蛋白或编码其的核酸分子,或实施方案17所述的核酸分子,以及任选地药用辅料。

[0050] 22、药物组合产品,其包含

[0051] 实施方案1-16中任一项所述的杂合蛋白或编码其的核酸分子,或实施方案17所述的核酸分子;以及

[0052] 其它治疗剂。

[0053] 23、在受试者中预防或治疗补体系统相关疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的一实施方案1-16中任一项所述的杂合蛋白或编码其的核酸分子;或实施方案17所述的核酸分子;或实施方案21的药物组合物或制剂;或实施方案22的药物组合产品。

[0054] 24、实施方案23的方法,其中所述疾病或病症是由于补体系统的异常激活或补体系统失调导致的。

[0055] 25、实施方案24的方法,其中所述补体系统的异常激活或补体系统的失调是由于例如微生物感染或自身免疫抗体的增加,或者是由于补体调节蛋白减少、缺失、失能或功能被干扰、阻断

[0056] 26、实施方案23的方法,其中所述补体系统相关疾病或病症选自需要溶血抑制的疾病,例如需要抑制补体免疫经典途径和/或补体免疫旁路途径的溶血的疾病;或需要抑制C3b沉积活性的疾病,例如致密物沉积病DDD。

附图说明:

[0057] 图1显示CFH CCP1-5和DAF CCP1-4晶体结构及杂合蛋白的结构模型

[0058] 图2显示各待测蛋白的SDS-PAGE电泳图

[0059] 图3显示了各待测蛋白的CP抑制活性

[0060] 图4显示了各待测蛋白的AP抑制活性

[0061] 图5显示了各待测蛋白的C3b沉积抑制活性

[0062] 发明详述

[0063] I. 定义:

[0064] 应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂,因为这些可以变化。

还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案,而并不意图限制本发明的范围,其

仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

[0065] ▶衰变加速因子(DAF)

[0066] 衰变加速因子(DAF,CD55)是一种膜相关调节蛋白,可保护自身细胞免受其表面自体补体的激活。DAF通过快速解离C3和C5转化酶(级联的中心酶)起作用。DAF具有最有效的与补体调节相关的蛋白质的衰减加速活性,并且作用于经典途径(C4b2a和C4b2a3b)和替代途径(C3bBb和C3BbC3b)酶。然而,DAF没有辅因子功能。

[0067] DAF的结构分析表明,从其N端开始,它由4个~60个氨基酸长的单元组成,随后是一个富含高度O-糖基化的丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的片段(STP),其后连接翻译后添加的糖肌醇磷脂(GPI)锚。

[0068] 在一些实施方案中,DAF是具有如下登录号的人DAF:Genbank登录号M31516、M15799、M64653、S72858或M643567。

[0069] 在一些实施方案中,DAF是人DAF。在一些实施方案中,人DAF是人天然DAF。在一些实施方案中,人天然DAF的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,其各个模块如下表1所示。四个60个氨基酸长的重复单元称为补体控制蛋白重复(CCP)或短共有重复(SCR)。CCP1包括氨基酸35-96。CCP2包括氨基酸96-160;CCP3包括氨基酸161-222,CCP4包括氨基酸223-285。它们提供DAF的所有调节活性。高度O-糖基化区域充当缓冲区,其将CCP定位在表面膜上方适当距离处。GPI锚允许DAF在质膜平面内自由移动,使其能够在转化酶复合物组装的任何地方失活转化酶复合物。在本文中,提及DAF的模块的氨基酸位置时,均为对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0070] 表1:DAF的蛋白质模块(UniProt划分方式)

SEQ ID NO:1的氨基酸位置	模块
1-34	前导序列
35-96	CCP1
96-160	CCP2
161-222	CCP3
223-285	CCP4
287-356	STP

[0072] 在一些实施方案中,编码DAF的cDNA的核苷酸序列如SEQ. ID NO:2所示。

[0073] ▶因子H(CFH或FH)

[0074] “补体因子H”、“因子H”、“FH”、“CFH蛋白”或“CFH”可以互换使用,是指大约150kDa的蛋白质,其是补体激活家族的调节物的成员并且是补体对照蛋白质。CFH是大的可溶性糖蛋白,其在人血浆中循环并用于调节补体系统的旁路途径,确保补体系统针对病原体或其它危险物质并且不损害宿主组织。

[0075] 因子H主要是单体,但自身缔合性较弱(KD=28μM),并且可能在糖胺聚糖或高浓度金属离子存在的情况下寡聚化。CFH由20个称为补体控制蛋白重复(CCP)(SCR或sushi结构域)的同源单元组成,其中一些重复起细胞附着的作用,而其他重复的功能是从细胞表面消除C3b。20个SCR各自约60个氨基酸长,以头尾相连排列,含有4个半胱氨酸残基,每个模块形成2个二硫键。SCR 19和20参与C3b的结合。

[0076] 剪接变体FHL-1由前7个CCP组成,随后是C末端序列Ser-Pro-Leu-Thr。每个CCP包含约60个残基,包括四个不变的半胱氨酸,形成Cys^I-Cys^{III}、Cys^{II}-Cys^{IV}二硫化物。相邻模块由三到八个残基的序列连接。

[0077] 在负染色电子显微照片中,FH分子采用多种构象,但主要是对折的;分析超速离心、小角度X射线散射(沉积在PDB中的模块,例如3GAV)和化学交联也表明模块链本身弯曲。确定了如下几个FH片段的高分辨率结构,单独或与其他分子复合(在后括号中提供PDB标识符):CCP 1-2(2RLP)、2-3(2RLQ)、1-4(2WII)、5、6-7(例如,2W80、2YBY)、7(2JGW和2JGX)、6-8(2UWN和2V8E)、9(4K12)、10-11(4B2R)、11-12(4B2S)、12-13(2KMS)、15(1HFI)、16(1HCC)、15-16(1HFH)、18-20(3SWO)、19-20(例如,2BZM、2G7I和4ONT)。每个CCP都类似于一个扁长球体,长轴约为4nm,短轴约为2nm,并且包含与长轴大致对齐的反平行片中的β链。它的N和C末端位于其长轴的任一端,促进具有可变模块间接触、倾斜和扭曲的串联CCP的端到端布置。

[0078] 在一些实施方案中,CFH是人CFH,例如人天然CFH。在一些是实施方案中,CFH的氨基酸序列具有如下登录号:HGNC:HGNC:4883、Ensembl:ENSG00000000971、HPRD:00601、MIM:134370或Vega:OTTHUMG00000035607。

[0079] 在一些实施方案中,CFH的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。在一些实施方案中,CFH的各个模块对应的氨基酸位置如下表2所示。

[0080] 表2:CFH的蛋白质模块(Uniprot划分方式)

SEQ ID NO:3 的氨基酸位置	模块
1 - 18	前导肽
19-82	CCP1
83-143	CCP2
144-207	CCP3
208-264	CCP4
265-322	CCP5
324-386	CCP6
387-444	CCP7
446-507	CCP8
515-566	CCP9
567-625	CCP10
628-686	CCP11
689-746	CCP12
751-805	CCP13
809-866	CCP14
868-928	CCP15
929-986	CCP16
987-1045	CCP17
1046-1104	CCP18
1107-1165	CCP19
1170-1230	CCP20

[0083] 在一些实施方案中,编码CFH的cDNA的核苷酸序列如SEQ. ID NO:4所示。

[0084] 在一些实施方案中,编码CFH的剪接变体FHL-1的蛋白质序列如SEQ ID NO:5所示。在一些实施方案中,编码CFH的剪接变体FHL-1的cDNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0085] 在本文中,提及CFH的模块的氨基酸位置时,均为对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。

[0086] ▶其它定义

[0087] 为了解释本说明书,将使用以下定义,并且只要适当,以单数形式使用的术语也可以包括复数,并且反之亦然。要理解,本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案,并且不意欲是限制性的。

[0088] 术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

[0089] 如本文所用,术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

[0090] 如本文所用,术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤,但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中,当使用术语“包含”或“包括”时,除非另有指明,否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如,当提及“包含”某个具体序列的蛋白质时,也旨在涵盖由该具体序列组成的蛋白质。

[0091] 如本文所用,术语“杂合蛋白”与“嵌合多肽”可互换使用,是指由至少两个异源多肽序列,任选地通过接头,融合形成的更多肽。杂合蛋白可以通过重组表达产生。

[0092] 氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后,并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时,候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。在一些实施方案中,本发明考虑本发明蛋白质或多肽的变体,所述变体相对于在本文中具体公开的多肽或蛋白质而言具有相当程度的同一性,例如同一性为至少80%,85%,90%,95%,97%,98%或99%或更高。所述变体可以包含保守性改变。

[0093] 对于多肽序列,“保守性改变”包括对多肽序列的置换、缺失或添加,但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。例如,保守性置换常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下列出了8组含有互为保守替换的氨基酸:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中,术语“保守序列改变”用于指不显著影响或改变亲本杂合蛋白活性的氨基酸修饰。例如保守修改变体相对于亲本多肽或杂合蛋白保持至少80%,85%,90%,95%,98%,99%或更高,例如100-110%或更高的活性。

[0094] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明杂合蛋白的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞,也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

[0095] 术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,其包含有效连接要表达的核苷酸

序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒（例如，裸的或包含在脂质体中）和病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

[0096] 术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物（例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马）、灵长类（例如，人和非人灵长类如猴）、兔和啮齿类（例如，小鼠和大鼠）。特别地，个体是人。

[0097] 术语“治疗”包括施用组合物或杂合多肽以预防或延迟疾病的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。

[0098] 术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂（例如弗氏佐剂（完全和不完整的））、赋形剂、载体或稳定剂等。

[0099] 术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0100] 术语“有效量”指本发明的杂合蛋白或编码其的核酸或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

[0101] “治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中杂合蛋白或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数或改善可度量参数至少约40%、甚至更优选地至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至100%。

[0102] “预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

[0103] 本发明的这些以及其它方面和实施方案在附图（附图简述紧随其后）和以下的发明详述中得到描述并且示例于以下实施例中。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

[0104] II. 杂合蛋白

[0105] 本发明涉及一种CFH和DAF的杂合蛋白，其包含至少一个来自CFH的功能单元以及至少一个来自DAF的功能单元。

[0106] A. DAF功能单元

[0107] 在某些实施方案中，本发明的杂合蛋白优选包含来自DAF的功能单元。这种功能单元能够解离C3和C5转化酶，和/或加速针对经典途径C3转化酶和/或旁路途径C3转化酶的衰变加速活性。在一些实施方案中，DAF功能单元包含DAF的CCP3和4。

[0108] 此类CCP的氨基酸序列可以与DAF的天然或天然存在的氨基酸序列相同。或者，此类CCP的氨基酸序列可以稍微改变，特别是在氨基或羧基末端。当限制酶位点掺入编码CCP的多核苷酸时，就会发生这种改变。当从功能单元的N末端或C末端缺失氨基酸时，也会发生

这种改变。例如,在一些实施方案中,可以在CCP3的N末端缺失1-2个氨基酸。

[0109] 还可以在不影响功能活性的情况下引入序列中的一些氨基酸取代,优选地保守取代。保守取代可以是例如带电荷的氨基酸彼此替代或亲水性氨基酸彼此替代、疏水性氨基酸彼此替代和相似质量的氨基酸彼此替代来进行。

[0110] 在一个实施方案中,DAF功能单元包含与人DAF蛋白质的CCP 3和/或4(或由CCP3的C末端与CCP4的N末端直接连接在一起的CCP3-4)具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列。在一些实施方案中,DAF功能单元包含人DAF蛋白质的CCP3和/或4(由CCP3的C末端与CCP4的N末端直接连接在一起的CCP3-4)。在一些实施方案中,DAF功能单元包括人DAF蛋白质的CCP3和4。在一些是实施方案中,DAF功能单元是由CCP3的C末端与CCP4的N末端直接连接在一起的CCP3-4。

[0111] 在一些实施方案中,人DAF蛋白质是人天然DAF蛋白质。在一些实施方案中,人天然DAF蛋白质包含如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由所述序列组成。DAF包含SEQ ID NO:2所示的DNA序列所编码的氨基酸序列或由所述序列组成。

[0112] 在一些实施方案中,CCP3包含DAF的氨基酸161至222或由其组成。在一些实施方案中,为了连接其他功能单元,可以缺失CCP3的N末端的1-2个氨基酸,例如CCP3包含DAF的氨基酸163至222或由其组成。

[0113] 在一些实施方案中,CCP3包含SEQ ID NO:7或8的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列,或由所述序列组成。

[0114] SEQ ID NO:7:

[0115] KSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECRE

[0116] SEQ ID NO:8:

[0117] CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECRE。

[0118] 在一些实施方案中,CCP4包含DAF的氨基酸223至285或由其组成。

[0119] 在一些实施方案中,CCP4包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列,或由所述序列组成。

[0120] SEQ ID NO:9:

[0121] IYCPAPPQIDNGI IQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG。

[0122] 在一些实施方案中,CCP3-4包含DAF的氨基酸161至285或氨基酸163至285或由其组成。在一些实施方案中,DAF功能单元CCP3-4包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的统一性的氨基酸序列,或由所述序列组成。

[0123] SEQ ID NO:10:人DAF CCP3-4

[0124] KSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAP
PQIDN GIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG

[0125] SEQ ID NO:11:人DAF CCP3-4(CCP3的N末端缺失2个氨基酸)

[0126] CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQ
IDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG

[0127] 当提及DAF的氨基酸位置时,所述氨基酸序列位置对应于SEQ ID NO:1的氨基酸位置。

[0128] B.CFH功能单元

[0129] 在某些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含来自CFH的功能单元。这种功能单元能够解离旁途径C3转化酶C3bBb和/或结合C3b。在优选的实施方案中,CFH功能单元包含CFH的CCP1。

[0130] 此类CFH的CCP的氨基酸序列可以与CFH的天然或天然存在的氨基酸序列相同。或者,此类CCP的氨基酸序列可以稍微改变,特别是在氨基或羧基末端。当限制酶位点掺入编码CCP的多核苷酸时,就会发生这种改变。当从功能单元的N末端或C末端缺失或添加氨基酸时,也会发生这种改变。

[0131] 例如,在一些实施方案中,可以在CCP1的C末端缺失1-2个氨基酸。

[0132] 在一些实施方案中,还可以将CCP1的C末端添加CCP2的1-2个氨基酸用于连接DAF的功能单元,因此,本文所述的“CCP1”涵盖在C末端添加氨基酸(例如CCP2的1-2个氨基酸)的CCP1。例如在DAF的功能单元的N末端缺失1-2个氨基酸的情况下,可以将CCP1的C末端添加1-2个CCP2的氨基酸用于连接DAF的功能单元。在一些实施方案中,DAF的CCP3缺失KS,而CFH的CCP1的C末端添加RP,连接获得杂合蛋白。

[0133] 还可以在不影响功能活性的情况下引入序列中的一些氨基酸取代,优选地保守取代。保守取代可以是例如带电荷的氨基酸彼此替代或亲水性氨基酸彼此替代、疏水性氨基酸彼此替代和相似质量的氨基酸彼此替代来进行。例如,本发明的CFH的CCP1可以包含V62I突变。

[0134] 在一个实施方案中,CFH功能单元包含与人CFH蛋白质的CCP 1具有至少95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CFH功能单元包含人CFH蛋白质的CCP1。

[0135] 在一些实施方案中,人CFH蛋白质是人天然CFH蛋白质。在一些实施方案中,人天然CFH蛋白质包含如SEQ ID NO:3或5所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中,CFH包含SEQ ID NO:4或6所示的DNA序列所编码的氨基酸序列或由所述序列组成。

[0136] 在一些实施方案中,CCP1包含CFH的氨基酸19至82或由其组成。在一些实施方案中,CCP1包含CFH的氨基酸19至84或由其组成。

[0137] 在一些是实施方案中,CFH功能单元包含SEQ ID NO:12、13、14或15的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:12、13、14或15的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列,或由所述序列组成。

[0138] SEQ ID NO:12:人CFH CCP1(CCP1的C末端添加2个CCP2的N末端氨基酸RP)

[0139] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP

[0140] SEQ ID NO:13:人CFH CCP1(CCP1)

[0141] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQK

[0142] SEQ ID NO:14:人CFH CCP1(CCP1的C末端添加2个CCP2的N末端氨基酸RP且包含V62I)

[0143] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP

[0144] SEQ ID NO:15:人CFH CCP1(CCP1包含V62I)

[0145] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQK

[0146] 当提及CFH的氨基酸位置时,所述氨基酸序列位置对应于SEQ ID NO:3的氨基酸位置。

[0147] C. 其他单元

[0148] 任选地,本发明的杂合蛋白可以进一步包括标签,优选约2至10个氨基酸,其被添加到杂合蛋白的氨基或羧基末端,例如羧基末端。通常,进行此类添加以稳定蛋白质或便于杂合蛋白的分泌表达或纯化。此类标签在本领域中是已知的。此类标签的代表性实例包括编码一系列组氨酸残基(例如2-10个组氨酸,例如2、3、4、5、6或7个组氨酸)、表位标签FLAG、单纯疱疹糖蛋白D、 β -半乳糖苷酶、麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S-转移酶的序列。

[0149] 在一些实施方案中,所述标签是组氨酸残基,其可以添加在杂合蛋白的氨基末端或羧基末端,例如羧基末端。

[0150] 在一些实施方案中,所述标签是GHHHHHHH(SEQ ID NO:16)的6xHis标签。

[0151] 任选地,本发明的杂合蛋白还可以包含信号肽,例如MGWSCIIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:17)。

[0152] 本发明还涵盖其中一个或多个氨基酸通过翻译后过程或合成方法改变的杂合蛋白。此类修饰的实例包括但不限于糖基化、碘化、肉豆蔻酰化和聚乙二醇化。

[0153] D. 杂合蛋白的实例

[0154] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含至少一个来自CFH的功能单元以及至少一个来自DAF的功能单元。。

[0155] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含CFH的CCP1和DAF的CCP3和CCP4。在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白由CFH的CCP1和DAF的CCP3和CCP4组成。在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含CFH的CCP1和DAF的CCP3-4,或由其组成。

[0156] 在一些实施方案中,CFH的CCP1在其C末端添加1-2个氨基酸(例如CCP2的N末端的1-2个氨基酸)。在一些实施方案中,DAF的CCP3或CCP3-4在其N末端缺失1-2个氨基酸。

[0157] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含CFH的CCP1和DAF的CCP3-4,其中CCP1在其C末端添加CCP2的N末端的1-2个氨基酸且DAF的CCP3在其N末端相应的缺失1-2个氨基酸。在一些具体的实施方案中,本发明的杂合蛋白包含CFH的CCP1和DAF的CCP3-4,其中CCP1在其C末端添加CCP2的N末端的氨基酸RP且DAF的CCP3在其N末端相应的缺失氨基酸KS。

[0158] 在一些实施方案中,本发明的CFH的CCP1可以包含V62I突变。

[0159] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白还在其N末端包含信号肽,例如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,和/或在其C末端包含标签,例如组氨酸标签,例如6×His标签,例如GHHHHHHH。

[0160] 在一些实施方案中,DAF的CCP3包括DAF蛋白的氨基酸161-222或由其组成和/或CCP4包括DAF蛋白的氨基酸223-285或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。在一些实施方案中,DAF的CCP3在其N末端缺失2个氨基酸,例如包含DAF蛋白的氨基酸163-222,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。在一些实施方案中,DAF的CCP3-4包含DAF蛋白的氨基酸161-285,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。在一些实施方案中,DAF的CCP3-4在其N末端缺失2个氨基酸,例如包含DAF蛋白的氨基酸163-285,或由其组

成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号。

[0161] 在一些实施方案中,CFH的CCP1包含CFH蛋白的氨基酸19-82或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。在一些实施方案中,CFH的CCP1包含CFH蛋白的氨基酸19-84或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。

[0162] 在一些实施方案中,DAF的CCP3-4包含DAF蛋白的氨基酸161-285,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号;且CFH的CCP1包含CFH蛋白的氨基酸19-82或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。

[0163] 在一些实施方案中,DAF的CCP3-4包含DAF蛋白的氨基酸163-285,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置编号;且CFH的CCP1包含CFH蛋白的氨基酸19-84,或由其组成,其中所述氨基酸位置对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸位置编号。

[0164] 在一些具体的实施方案中,DAF是人DAF蛋白,例如人天然DAF蛋白。在一些具体的实施方案中,DAF蛋白包含

[0165] (i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,

[0166] (ii) SEQ ID NO:2所示的核酸序列所编码的氨基酸序列;

[0167] (iii) 与(i)或(ii)所示的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列;

[0168] 或有所述(i)至(iii)中任一项所示的氨基酸序列组成。

[0169] 在一些具体的实施方案中,CFH是人CFH蛋白,例如人天然CFH蛋白。在一些具体的实施方案中,CFH蛋白包含

[0170] (i) SEQ ID NO:3或5所示的氨基酸序列,

[0171] (ii) SEQ ID NO:4或6所示的核酸序列所编码的氨基酸序列;

[0172] (iii) 与(i)或(ii)所示的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列;

[0173] 或有所述(i)至(iii)中任一项所示的氨基酸序列组成。

[0174] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含SEQ ID NO:18-21中任一项的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列,或由其组成。

[0175] >人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体):

**EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNP
GEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDH
YGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWVSGPPPECRG (SEQ ID NO:18)**

[0176]

**EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNP
GEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDH
YGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWVSGPPPECRG (SEQ ID NO:19)**

[0177] >人CFHCCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体),包含V62I突变:

[0178] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKS**CPNPGEIRN**
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG (SEQ ID NO:20)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP**CPNPGEIRN**
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG (SEQ ID NO:21)

[0179] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含SEQ ID NO:22-25中任一项的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列,或由其组成。

[0180] >人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体) -6×His(斜体):

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP**CPNPGEIRN**
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG*GGHHHHH* (SEQ ID NO:22)

[0181] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKS**CPNPGEIRN**
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG*GGHHHHH* (SEQ ID NO:23)

[0182] >人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体) -6×His(斜体):

[0183] 包含V62I突变:

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKS**CPNPGEIRN**
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG*GGHHHHH*(SEQ ID NO:24)

[0184] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP**CPNPGEIRN**
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG*GGHHHHH*(SEQ ID NO:25)

[0185] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含SEQ ID NO:26-29中任一项的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列,或由其组成。

[0186] >信号肽-人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体) -6×His(斜体):

MGWSCIIIFLVATATGVHSEDCNLPPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRP**CPNPGEIRN****GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI**
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG*GGHHHHH*
 (SEQ ID NO:26)

[0187] MGWSCIIIFLVATATGVHSEDCNLPPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKKS**CPNPGEIRN****GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI**
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWGGPPPECRG*GGHHHHH*
 (SEQ ID NO:27)

[0188] >信号肽-人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体) -6×His(斜体):

[0189] 包含V62I突变:

MGWSCIIFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHHH
 (SEQ ID NO:28)

[0190]

MGWSCIIFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHHH
 (SEQ ID NO:29)

[0191] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白包含SEQ ID NO:30-33中任一项的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列,或由其组成。

[0192] >信号肽-人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体):

MGWSCIIFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:30)

[0193]

MGWSCIIFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:31)

[0194] >信号肽-人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4(黑体):

[0195] 包含V62I突变:

MGWSCIIFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:32)

[0196]

MGWSCIIFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:33)

[0197] III. 多核苷酸、载体和宿主

[0198] 本发明提供编码以上任何本发明杂合蛋白的核酸。还提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中,载体是表达载体(例如pCDNA载体,例如pCDNA3.1)。还提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中,宿主细胞选自酵母细胞或哺乳动物细胞(例如CHO细胞或293细胞,例如Expi293细胞)。在另一个实施方案中,宿主细胞是原核的。

[0199] 在一方面,本发明提供编码以上任何杂合蛋白的核酸。当从适宜的表达载体表达时,由所述核酸编码的多肽能够具有DAF和/或CFH的功能,例如解离C3和/或C5转化酶,加速针对经典途径C3转化酶和/或旁路途径C3转化酶的衰变加速活性,解离旁路途径C3转化酶C3bBb,或结合C3b,以及具有补体抑制活性,包括抑制旁路途径(AP)、经典途径(CP)和/或C3b沉积的活性。

[0200] 为了便于生产和纯化,杂合蛋白可以在N端融合分泌性信号肽,和/或利于纯化的

标签肽,如六组氨酸标签或生物素标记。

[0201] 如本领域技术人员明了的,因为密码子简并性,每一个杂合蛋白可以由多种核酸序列编码。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的核酸包含编码选自SEQ ID NO:18-33中任一项所示氨基酸序列的核酸,或编码与选自SEQ ID NO:18-33中任一项所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

[0203] 编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法,例如通过从头固相DNA合成,或通过PCR扩增而产生。

[0204] 在一个实施方案中,提供包含本发明核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中,载体是表达载体,例如原核表达载体或真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案,表达载体是pCDNA,例如pCDNA3.1。

[0205] 在一个实施方案中,提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中,提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。如本文所用,术语“宿主细胞”指可以工程化以产生本发明的蛋白的任何种类的细胞系统。适于复制和支持本发明的蛋白表达的宿主细胞是本领域熟知的。根据需要,这类细胞可以用特定表达载体转染或转导,并且可以培育大量含有载体的细胞用于接种大规模发酵器以获得足够量的本发明蛋白用于临床应用。

[0206] 合适的宿主细胞包括原核微生物,如大肠杆菌,真核微生物如丝状真菌或酵母,或各种真核细胞,如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(HEK 293或293F细胞或293FT细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(Hep G2)、CHO细胞、NS0细胞、骨髓瘤细胞系如YO、NS0、P3X63和Sp2/0等。本领域已知适合产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系。在一个优选的实施方案中,所述宿主细胞是CHO或HEK293细胞或Expi293细胞。

[0207] IV. 本发明分子的生产 and 纯化

[0208] 再一方面,本发明提供用于生产本发明杂合蛋白的方法,所述方法包括:在适于表达所述杂合蛋白的条件下培养包含编码所述蛋白的核酸分子的宿主细胞,任选地还包括从所述宿主细胞或所述宿主细胞培养基分离所述蛋白,和/或纯化所述蛋白。

[0209] 为了重组生产,可以将编码本发明蛋白的多核苷酸插入载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。一旦已经制备了用于表达的包含本发明的多核苷酸的表达载体,则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的,例如,原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

[0210] 如本文所述制备的蛋白可以通过已知的现有技术如镍柱、高效液相色谱、亲和层析、离子交换层析、凝胶电泳等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于如净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

[0211] 可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的蛋白的纯度和定量。

[0212] V. 测定法

[0213] 可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的杂合蛋白进行鉴定,筛选,或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

[0214] 对于本发明杂合蛋白的抑制溶血的作用,可以通过本领域已知的方法,诸如体外试验和/或体内动物实验来测量。例如,可以使用溶血实验,例如实施例4.1和4.2所示的方法,并检测分子对补体免疫经典途径和/或补体免疫旁路途径的溶血抑制作用。

[0215] 对于本发明杂合蛋白的补体C3b沉积抑制活性,可以通过本领域已知的方法,诸如体外试验和/或体内动物实验来测量。例如,可以使用溶血实验,例如实施例4.3所示的方法,并检测分子对C3b在红细胞表面的沉积的抑制作用。

[0216] VI. 药物组合物、药物联合和试剂盒

[0217] 在一个方面,本发明提供了组合物,例如,药物组合物、药物或制剂,所述组合物包含本发明杂合蛋白或编码其的核酸分子。

[0218] 在一个实施方案中,所述组合物还包含药用辅料,如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂,包括缓冲剂。

[0219] 如本文所用,“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。对于药用辅料的使用及其用途,亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第八版,R.C.Rowe,P.J.Seskey和S.C.Owen,Pharmaceutical Press,London,Chicago。

[0220] 本发明的组合物或药物或制剂可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型,如液态溶液剂(例如,注射液)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

[0221] 本发明的组合物或药物或制剂还可以除了本发明的杂合蛋白或编码其的核酸外,包含其它的治疗剂,所述其它的治疗剂是被治疗的特定适应证所需的,优选不会彼此不利的影响活性。因此,在一个实施方案中,组合物或制剂或药物,例如,药物组合物,包含一种或多种本发明分子,以及一种或多种其它治疗剂的组合。

[0222] 本发明的组合物或药物或制剂可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型,如液态溶液剂(例如,注射液)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。本发明的组合物或药物或制剂适于静脉推注、静脉输注、腹膜内、皮内、肌肉内、皮下和鼻内途径施用(例如,通过注射或输注)。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

[0223] 本发明还提供了药物组合或药物组合产品,其包含本发明的杂合蛋白或编码其的核酸和一种或多种其它治疗剂。

[0224] 本发明还提供了包含所述药物组合的成套药盒,例如所述成套药盒在同一包装内包含:

[0225] -含有包含本发明的杂合蛋白或编码其的核酸的药物组合物的第一容器;

[0226] -任选地,还含有包含一种或多种其它治疗剂的药物组合物的第二容器(在一些实施方案中,两种或多种其它治疗剂处于相同的容器中,或分别处于不同的容器中)。

[0227] VII. 用途和方法

[0228] 本发明一方面提供了在受试者中预防或治疗补体系统相关疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的本发明的杂合蛋白或编码其的核酸,或包含其的组合物或药物或

制剂。

[0229] 在一些实施方案中,所述补体系统相关疾病是由于补体系统的异常激活或补体系统失调导致的。在一些实施方案中,补体系统的异常激活或补体系统的失调是由于例如微生物感染或自身免疫抗体的增加,或者是由于补体调节蛋白减少、缺失、失能或功能被干扰、阻断等。

[0230] 在一些实施方案中,所述疾病治疗将受益于抑制补体系统的活性。

[0231] 在其他方面,本发明提供本发明的分子或包含其的组合物在生产或制备药物中的用途,所述药物用于本文所述的用途,例如用于预防或治疗本文提及的补体系统相关疾病或病症。

[0232] 在一些实施方案中,所述补体系统相关疾病或病症可以是需要溶血抑制的疾病,例如需要抑制补体免疫经典途径和/或补体免疫旁路途径的溶血的疾病。

[0233] 在一些实施方案中,所述补体系统相关疾病或病症是需要抑制C3b沉积活性的疾病,例如致密物沉积病(DDD)。

[0234] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白或编码其的核酸或包含所述蛋白或核酸的组合物或药物或制剂会延迟病症和/或与病症相关的症状的发作。

[0235] 在一些实施方案中,本发明的杂合蛋白或编码其的核酸或包含所述蛋白或核酸的组合物或药物或制剂还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用,用于本文所述的用途,例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

[0236] 本发明的杂合蛋白或编码其的核酸或包含所述蛋白或核酸的组合物或药物或制剂的施用途径是根据已知方法,例如,注射或输注。

[0237] 本发明进一步涵盖本发明的杂合蛋白或编码其的核酸或包含所述蛋白或核酸的组合物或制剂在制备药物中的用途,所述药物用于本文所述的用途,例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

实施例

[0238] 实施例1.分子构建

[0239] 为构建本发明涉及的杂合分子和现有技术的补体调节分子的蛋白表达载体,运用常规分子克隆技术的方法,以合成的基因DNA(苏州金唯智生物/上海生工生物合成)为模板,将编码各蛋白的DNA亚克隆至pCDNA3.1表达载体(购自生物风),质粒经测序验证正确后,用于蛋白瞬时表达。各编码蛋白均在N末端加入了信号肽:MGWSCIIILFLVATATGVHS和C末端加入GHHHHHH的6xHis标签,方便后续使用哺乳动物细胞分泌表达和镍柱纯化。

[0240] 各蛋白的氨基酸序列如下:

[0241] >CR13m(人CR1 CCP1-3或SCR1-3,包含N29K,S37Y,G79D和D109N突变,序列来源于专利US9988611_B2):SEQ ID NO:34

[0242] QCNAPEWLPFARPTNLTDEFEFPIGTYLKYECRPGYYGRPFSSIIICLNKNSVWTGAKDRCRRKSCRNPPD
PVNGMVH VIKDIQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIISGNTVIWDNETPICDRIPCGLPPTITNGDFISTNREN
FHYGSVVTYRC NPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSPAPQCIGHHHHHH

[0243] >D24(人DAF/CD55 CCP2-4或SCR2-4,序列参考Hui-fen Zhang等THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,Vol.276,No.29,Issue of July 20,pp.27290-27295,2001):SEQ

ID NO:35

[0244] SCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKKSCP
NPGEIRN GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGE
RDHYGYRQSV TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSPPEPCRGGHHHHH

[0245] >F15(人CFH CCP1-5或SCR1-5,包含V62I突变,序列参考Masha Fridkis-Hareli等
Blood.2011Oct 27;118(17):4705-4713和Agustín Tortajada等Hum Mol
Genet.2009September 15;18(18):3452-3461):SEQ ID NO:36

[0246] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGH
PGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEP
DREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGY
EYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAP
RCTLKPGHHHHH

[0247] >F1D34-1(本发明杂合分子1,人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4):
SEQ ID NO:22,其在N末端连接有信号肽的序列是SEQ ID NO:26

[0248] >F1D34-2i(本发明杂合分子2,人CFH CCP1或SCR1-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-4,
包含V62I突变):SEQ ID NO:24,其在N末端连接有信号肽的序列是SEQ ID NO:28

[0249] >CR15D34(本发明杂合分子3,人CR1 CCP15或SCR15-人DAF/CD55 CCP3-4或SCR3-
4):SEQ ID NO:37

[0250] GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSLKYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSCPNG
EIRNGQI DVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDH
YGYRQSVTYA CNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSPPEPCRGGHHHHH

[0251] >FH13(人CFH CCP1-3或SCR1-3,包含V62I突变,C末端多两个氨基酸用于连接His
纯化标签):SEQ ID NO:38

[0252] EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGH
HPGDTPF GTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSA
MEPDREYHFGQ AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISGHHHHH

[0253] >D14(人DAF/CD55 CCP1-4或SCR1-4,无前导序列,C末端多两个氨基酸用于连接
His纯化标签):SEQ ID NO:39

[0254] DCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPT
RLNSASLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKKSCP NPGEIRNGQIDVPGGI
LFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKG
FTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSPPEPCRGGKSGHHHHH

[0255] 实施例2. 蛋白表达

[0256] 质粒经DH5 α 菌株(翊圣生物)扩增后,使用NucleoBond Xtra Midi Plus
(MACHEREY-NAGEL,详见产品手册)质粒中抽试剂盒制备质粒。制备好的质粒使用PEI
(PolyScience)转染Expi293细胞(购自Thermo fisher),瞬时表达蛋白(方法参考Jäger,V.,
等.BMC Biotechnol 13,52,2013.)。收获的上清经镍离子预装柱亲和纯化(GE life
sciences,HisTrap HP,详见产品手册),用PBS透析换液,换液蛋白样品通过0.2 μ m滤器过滤
除菌,使用NanoDrop(Thermofisher)A280法根据理论消光系数进行蛋白定量。

[0257] 实施例3. 蛋白纯度检测(SDS-PAGE)

[0258] 各取2.5 μ g蛋白按比例分别加入含有还原剂和不含还原剂的上样缓冲液(生工生物),加含有还原剂上样缓冲液的样品,经95 $^{\circ}$ C煮沸5分钟,使蛋白充分变性,加不含有还原剂上样缓冲液的样品,不进行热处理。使用10% Precast-Gel Tris-Glycine电泳预制胶(生工生物),在Mini-PROTEAN[®]Tetra电泳系统(BioRad)中进行电泳,完成电泳后,胶使用0.1%考马斯亮蓝染色液进行染色,使用乙醇-冰乙酸溶液进行脱色。

[0259] SDS-PAGE电泳结果显示,除D14蛋白条带略有弥散外,其余蛋白条带均较为清晰,说明各蛋白在还原和非还原条件下纯度良好(如图2所示)。另外,由于蛋白还原、变性和修饰状态以及电泳条件的差异,电泳分子量与理论分子量存在一定的差异。

[0260] 实施例4. 补体抑制活性检测

[0261] 4.1补体经典途径(CP)抑制活性检测

[0262] 本实验通过检测不同浓度待测蛋白,对由正常人血清补体活性引起的溶血素介导的绵羊红细胞溶血的抑制程度,分析并比较各蛋白对补体CP的抑制活性。

[0263] 实验过程简述如下:

[0264] (1)蛋白梯度稀释:用GVB++缓冲液(含Ca²⁺及Mg²⁺的明胶弗洛拿缓冲液,货号:25-02080,天恩泽)将蛋白配制成12000nM的溶液,然后进行4倍梯度稀释,一共7个梯度;

[0265] (2)血清的稀释:将正常人血清NHS(上海儒百生物)从-70 $^{\circ}$ C冰箱中取出,在4 $^{\circ}$ C下自然解冻后用GVB++缓冲液将血清稀释至4%;

[0266] (3)绵羊红细胞的激活:将绵羊红细胞(南京森贝伽生物)用GVB++缓冲液洗涤至上清透明,然后用GVB++缓冲液重悬,向红细胞悬液中1:4000加入溶血素(BM351Y,北京博尔西),在4 $^{\circ}$ C孵育15分钟激活绵羊红细胞,激活后的绵羊红细胞用GVB++洗涤2次后,用GVB++缓冲液重悬;

[0267] (4)孵育:将稀释好的蛋白与血清各取25 μ L于96孔板中混合,然后加入50 μ L步骤(3)中获得的红细胞悬浮液,使蛋白起始浓度为3000nM,血清终浓度为1%,充分混匀后将其放在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育1小时,并设置阴性对照(仅含血清)和阳性对照(仅含血清和红细胞);

[0268] (5)终止:孵育结束以后,向每个反应孔中加入100 μ L 20mM EDTA-GVB buffer (GVBE)终止反应;

[0269] (6)读值:将96孔板3000rpm离心5分钟,取100 μ L上清至新的96孔平底板中,在多功能读板机中检测OD405nm处的吸光值,并保存数据;

[0270] (7)数据处理:将所得的OD405nm读值代入以下公式计算红细胞溶血抑制率,其计算公式为:

[0271] 溶血抑制率(%) = (阳性对照读值 - 实验组读值) / (阳性对照读值 - 阴性对照读值) * 100%

[0272] 然后以蛋白终浓度为横坐标,溶血抑制率为纵坐标,进行四参数拟合作图,计算蛋白的IC₅₀值。结果见图3。

[0273] CP溶血抑制活性实验检测结果显示,CFH与DAF的杂合蛋白F1D34-1和F1D34-2i均具有强效的CP抑制活性,其活性与CR1活性增强片段CR13m和DAF片段D24相当,明显优于CFH片段FH15和DAF片段D14,也远远优于CR1与DAF的杂合蛋白CR15D34,CR15D34仅检测到微弱

的CP抑制活性,而CFH片段FH13则基本没有活性(如图3所示)。说明通过结构域杂合获得的杂合蛋白具有优异的CP抑制活性。

[0274] 3.2补体替代途径(AP)抑制活性检测

[0275] 本实验通过测定不同浓度待测蛋白,对正常人血清补体活性引起的兔红细胞溶血的抑制程度,分析并比较各蛋白对补体AP的抑制活性。

[0276] 实验过程简述如下:

[0277] (1) 蛋白梯度稀释:用GVBMG缓冲液(含Mg²⁺及EGTA的明胶弗洛拿缓冲液,货号:25-02090,天恩泽)将蛋白配制成28000nM溶液,然后进行4倍梯度稀释,一共7个梯度;

[0278] (2) 血清的稀释:将正常人血清NHS(上海儒百生物)从-70℃冰箱中取出,在4℃下自然解冻后用GVBMG稀释至60%;

[0279] (3) 兔红细胞准备:将兔红细胞(南京森贝伽生物)用GVBMG洗涤至上清透明,然后用GVBMG重悬红细胞;

[0280] (4) 孵育:将稀释好的蛋白与血清各取25μL于96孔板中混合,然后加入50μL步骤(3)中获得的红细胞悬浮液,使蛋白起始终浓度为7000nM,血清终浓度为15%,充分混匀后将其放在37℃恒温培养箱中孵育1小时,并设置阴性对照(仅含血清)和阳性对照(仅含血清和红细胞);

[0281] (5) 终止:孵育结束以后,向每个反应孔中加入100μL 10mM EDTA-GVB buffer (GVBE)终止反应;

[0282] (6) 读值:将96孔板3000rpm离心5分钟,取100μL上清至新的96孔平底板中,在多功能读板机中检测OD405nm处的吸光值,并保存数据;

[0283] (7) 数据处理:将所得的OD405nm读值代入以下公式计算红细胞溶血抑制率,其计算公式为:

[0284] 溶血抑制率(%) = (阳性对照读值 - 实验组读值) / (阳性对照读值 - 阴性对照读值) * 100%

[0285] 然后以蛋白终浓度为横坐标,溶血抑制率为纵坐标,进行四参数拟合作图,计算抗体的IC₅₀值。结果见图4。

[0286] AP溶血抑制活性实验检测结果显示,CFH与DAF的杂合蛋白F1D34-1和F1D34-2i均具有强效的AP抑制活性,优于CFH片段FH15、FH13和DAF片段D24、D14,也优于CR1与DAF的杂合蛋白CR15D34以及CR1活性增强片段CR13m(如图4所示)。说明通过结构域杂合获得的杂合蛋白具有更优的AP抑制活性。

[0287] 3.3补体C3b沉积抑制活性检测

[0288] 本实验通过检测不同补体调节蛋白抑制人补体激活后C3b在兔红细胞表面的沉积,分析并比较各蛋白对C3b沉积的抑制活性。

[0289] 实验过程简述如下:

[0290] (1) 蛋白梯度稀释:用GVBMG缓冲液(含Mg²⁺及EGTA的明胶弗洛拿缓冲液,货号:25-02090,天恩泽)将蛋白配制成1400nM溶液,然后进行3倍梯度稀释,一共7个梯度;

[0291] (2) 血清的稀释:为防止补体激活造成兔红细胞溶血破裂,导致无法精确检测C3b在细胞表面的沉积,使用C5去除的正常人血清用于实验。将C5-Dp1 NHS (Complement Technology)从-70℃冰箱中取出,在4℃下自然解冻后用GVBMG稀释至40%;

[0292] (3) 兔红细胞准备:将4%兔红细胞(南京森贝伽生物)用GVBMG洗涤至上清透明,然后用GVBMG重悬至细胞密度 1×10^7 细胞/mL;

[0293] (4) 孵育:将稀释好的蛋白与血清各取25 μ L于96孔板中混合,然后加入50 μ L步骤(3)中获得的红细胞悬浮液,使蛋白起始终浓度为350nM,血清终浓度为10%,充分混匀后将其放在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育1小时,并设置阴性对照(仅含补体灭活血清和红细胞)和阳性对照(仅含正常血清和红细胞);

[0294] (5) 终止:孵育结束以后,向每个反应孔中加入100 μ L 10mM EDTA-GVB buffer (GVBE)终止反应;

[0295] (6) 检测:将孵育好的细胞用PBS清洗3次后加入荧光素标记的抗人C3b/iC3b抗体进行染色(APC anti-complement C3b/iC3b Antibody, Biolegend), 4 $^{\circ}$ C孵育30分钟后将细胞再次清洗3次,使用流式细胞仪(Cytoflex, Beckman)检测各样品APC荧光MFI(平均荧光强度),并保存数据;

[0296] (7) 数据处理:使用以下公式计算C3b在红细胞表面的沉积率,其计算公式为:

[0297] 沉积率(%) = 实验组MFI值/阳性对照MFI值*100%

[0298] 然后以蛋白终浓度为横坐标,沉积率为纵坐标,进行四参数拟合作图,计算抗体的IC50值。结果见图5。

[0299] C3b沉积的实验检测结果显示,CFH与DAF的杂合蛋白F1D34-1和F1D34-2i均具有强效的C3b沉积抑制活性,优于CFH片段FH15、FH13和DAF片段D24、D14,也优于CR1与DAF的杂合蛋白CR15D34以及CR1活性增强片段CR13m(如图5所示)。说明通过结构域杂合获得的杂合蛋白具有更优的C3b沉积抑制活性。

[0300] 序列表

[0301]

SEQ ID NO:1	MTVARPSVPAALPLLGELPRLLLVLLCLPAVWDCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVI CLKGSQWSDIEEFCNRSEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKSTAVEFCK KKSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGER DHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTT TKTTTPNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNKGSGTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGLTVTMGLLT
SEQ ID NO:2	ATGACCGTCGCGCGGCCGAGCGTGCCCGCGGCGCTGCCCTCCTCGGGGAGCTGCCCGGCTGCTGCTGCTGG TGCTGTTGTGCTGCCGCGCGTGTGGGGTACTGTGGCCTTCCCCAGATGTACCTAATGCCAGCCAGCTTTGG AAGGCCGTACAAGTTTTCCGAGGATACTGTAATAACGTACAAATGTGAAGAAAGCTTTGTGAAAATTCCTGGCG AGAAGGACTCAGTGATCTGCCTTAAGGGCAGTCAATGGTCAGATATTGAAGAGTTCTGCAATCGTAGCTGCGAG GTGCCAACAAAGGCTAAATTCTGCATCCCTCAAACAGCCTTATATCACTCAGAATTATTTCCAGTCGGTACTGTTGT GGAATATGAGTGCCGTCAGGTTACAGAAGAGAACCTTCTCTATCACCAAAACCTAAGTGCCTTCAGAAATTAATA TGGTCCACAGCAGTCGAATTTGTAAAAGAAATCATGCCCTAATCCGGGAGAAATACGAAATGGTCAGATTGAT GTACCAGGTGGCATATTATTTGGTGAACCATCTCCTTCTCATGTAACACAGGGTACAAATTTTGGCTCGACTTC TAGTTTTTGTCTTATTTCCAGGCAGCTCTGTCCAGTGGAGTGACCCGTTGCCAGAGTGACAGAGAAATTTATTGTCCA GCACCACCAAAATGACAATGGAATAATCAAGGGGAACGTGACCATTATGGATATAGACAGTCTGTAACGTATG CATGTAATAAAGGATTACCATGATTGGAGAGCACTTATTTATTGTACTGTGAATAATGATGAAGGAGAGTGGAG TGGCCACACCTGAATGCAGAGGAAAATCTCTAACTCCAAGGTCCCACCAACAGTTCAGAAACCTACCACAGT AAATGTTCCAACACAGAAGTCTCACAACCTCTCAGAAAACACCACAAAACACCACACCAATGCTCAAGC AACACGGAGTACACCTGTTCCAGGACAACCAAGCATTTTCATGAAACAACCCCAATAAAGGAAGTGAACCA CTTCAGTACTACCCGCTCTCTATCTGGGCACACGTGTTTACGTTGACAGGTTTGTCTGGGACGCTAGTAACCAT GGGCTTGCTGACTAG
SEQ ID NO:3	MRLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCGHPGDTDFGFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLEINRECDTDGWTNDIPICEVVKLPTVAPEN GKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCWEISCKSPDIVNGSPISQKIIYKENER FQYKCNMGYEYSERGDVCTESGWRPLPSCCEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNATKCT STGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCYDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPVAPCLR KCYFPYLENGYNQNYGRKFVQKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQY TYALKEKAKYQCKLGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDLDYECHDGYES NTGSTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVEVLKFSCKPGFTIVGPNVQCYHFLSPDLP ICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYCNPRFLMKGNKIQCVDGEWTTLPVCIVEESTCGDIPELEH GWAQLSSPPYYGDSVEFNCSSEFTMIGHRSITCIHGVWTLQPQCVAIDKLLKCKSSNLIIEHLKKNKKEFDHNSNIR YRCRKGEGWIHTVCINGRWDPVNCMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNRYRDEKQVSVLQCENYLIQEGEEITCK DGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYTCGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKS PPEISHGVVAHMSDSYQYGEVYKCFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGKEDVYKAG EQVYTCATYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSVNPPTVQNAIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSPYEMFGD EEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLQLEGNKRITCRNGQWSEPPK CLHPCVISREIMENYNIALRWTAQKLYSRTGESVEFVCKRGYRLSSRSHTLRITTCWDGKLEYPTCAKR
SEQ ID NO:4	ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGCAATGAACTTCTCC AAGAAGAAATACAGAAATCTGACAGGTTCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAA ATGCCGCCCTGGATATAGATCTCTTGGAAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTTAATCCA TTAAGGAAATGCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCTGGAGATACTCTTTTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGA AATGTGTTTGAATATGGTGTAAAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCG

[0302]

TGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTACCAGTGACAGCACCA
GAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGAATGGAACCAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTGTA
TGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGAAGAAATGCATTGTTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAA
ACCAAAGTGTGTGGAAATTCATGCAAATCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTATAA
GGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAACATGGGTATGAATACAGTGAAGAGGAGATGCTGTATGCACCTGAA
TCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATCCAAATGGTGACTACTCACC
TTTAAGGATTAACACAGAAGTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGG
AAATACAGCAAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAACCTTGTGATTATCCAGAC
ATTAACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTCCAGTAGCTGTAGGAAAATATTACTCCTAT
TACTGTGATGAACATTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCACATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCCG
CAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTCTTATTGGAAAATGGATATAATCAAAATCATGGAAGAAAATTT
GTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCCTGCCTCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTA
TGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAACATGTTCCAAATCAAGTATAGATATTGAGAAT
GGGTTTTATTCTGAATCTCAGTATACATATGCCCTAAAAGAAAAAGCGAAATATCAATGCAAACCTAGGATATGTAAC
AGCAGATGGTGAACATCAGGATCAATTACATGTGGGAAAGATGGATGGTCCAGCTCAACCCACGTGCATTAATC
TTGTGATATCCCAGTATTATGAATGCCAGAATAAAAATGACTTCACATGGTTAAGCTGAATGACACATTGGACT
ATGAATGCCATGATGGTTATGAAAGCAACTGGAAGCACCCTGGTCCATAGTGTGTGGTTACAATGGTTGGTC
TGATTTACCATATGTTATGAAAGAGAATGCGAACTTCTAAAATAGATGTACTTAGTTCTGTATCGCAAGAAAG
ACCAGTATAAAGTTGGAGAGGTGTGAAATTCCTGCAAAACCAGGATTACAATAGTTGGACCTAATTCGGTTCA
GTGCTACCACCTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCAATATGTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAAC
TCCTCAATGGGAATGTTAAGGAAAAACGAAAGAAGAAATATGGACACAGTGAAGTGGTGAATATTATTGCAATC
CTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAAATCAATGTGTGATGGAGAGTGGACAACCTTACCAGTGTGATTGT
GGAGGAGAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACCTGAAACATGGCTGGGCCAGCTTTCTCCCTCCTTATTACTAT
GGAGATTCAGTGAATCAATTGCTCAGAATCATTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGATTATCATGGAGT
ATGGACCAACTTCCCAGTGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAATCATCAAATTAATTATACTTGAG
GAACATTTAAAAACAAGAAGGAATTCGATCATAATCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAAGAAGGATG
GATACACACAGTCTGCATAAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAAGTGTCAATGGCACAATAACAATTATGCC
ACCTCCACCTCAGATCCCATTCTCACAATATGACAACCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTATCTGTTT
TTTGCAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAGAAGAAATACATGCAAAGATGGAAGATGGCAGTCAATACCAC
TCTGTGTGAAAAAATTCATGTTCAACACCCTCAGATAGAACACGGAACCATAATTATCCAGGTCTTCACA
AGAAAATTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTGTGAGGGTGGTTTCAGGATATCTGAAGAAAATGAAAC
AACATGTACATGGGAAAATGGAGTTCTCACCTCAGTGTGAAGGCCTTCTTGAAATCTCCACCTGAGATTTCT
CATGGTGTGTAGTCCATGTCAGACAGTTATCAGTATGGAGAAGAAGTTACGTACAAATGTTTTGAAGGTTTTG
GAATTGATGGGCCTGCAATTGCAAAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCTCCATCATGCATAAAAAACAGATT
GTCTCAGTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACCCATGGGAGAGAAGAAGGATGTGTATAAGGCGGGTGAACAA
GTGACTTACACTTGTGCAACATATTACAAAATGGATGGAGCCAGTAATGTAACATGCATTAATAGCAGATGGACAG
GAAGGCCAATGCAGAGACCTCCTGTGTGAATCCGCCACAGTACAAAATGCTTATATAGTGTGAGAGACAGA
TGAGTAAATATCCATCTGGTGAAGAGTACGTTATCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTGGGGATGAAGAAGT
GATGTGTTTAAATGGAACTGGACGGAACCCTCAATGCAAAGATTCTACAGGAAAATGTGGGCCCTCCACC
TATTGACAATGGGGACATTACTTCATCCCGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTACCAATGCCAGA
ACTTGTATCAACTTGAGGGTAAACAAGCGAATAACATGTAGAAATGGACAATGGTTCAGAACCACAAAATGCTTAC
ATCCGTGTGTAATATCCCGAGAAATATGGAAAATATAACATAGCATTAAAGTGGACAGCCAAACAGAAGCTTTA
TTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAACGGGGATATCGTCTTCATCACGTTCTCACACATTGCGA
ACAACATGTTGGGATGGGAACTGGAGTATCCAACCTGTGCAAAAAGATAG

[0303]

SEQ ID NO:5	MRLLAIIICMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTDFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPEN GKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWKSKEPKCWEISCKSPDVINGSPISQKIYKENER FQYKCNMGYEYSERGDVAVCTESGWRPLPSCCEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCT STGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCDHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPLR KCYFPYLENGYNQNYGRKFVQKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVSFTL
SEQ ID NO:6	ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGCAATGAACTTCCTCC AAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGTTCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTACTATAA ATGCCGCCCTGGATATAGATCTCTTGGAAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTTAATCCA TTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCTTTTGGTACTTTTACCTTACAGGAGGA AATGTGTTTGAATATGGTGTAAAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCG TGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCATATATGTAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGACAGACCA GAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGAATGGAACAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTGTA TGTAACTCAGGTACAAGATTGAAGGAGATGAAGAAATGCATTGTTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAA ACCAAAGTGTGTGAAATTTTCATGCAAATCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTATAA GGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAACATGGGTATGAATACAGTGAAGAGGAGATGCTGTATGCACCTGAA TCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATCCAAATGGTGACTACTCACC TTTAAGGATTAACACAGAAGTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTATCCTGCAACCCGGGG AAATACAGCAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTGAAACCTTGTGATTATCCAGAC ATTAACATGGAGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTCCAGTAGCTGAGGAAAATATTACTCCTAT TACTGTGATGAACATTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCACATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCCG CAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTCTTATTGGAAAATGGATATAATCAAATCATGGAAGAAAAGTTT GTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCCTCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTA TGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAGCTTTACCCTCTGA
SEQ ID NO:7	KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECRE
SEQ ID NO:8	CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECRE
SEQ ID NO:9	IYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:10	KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERD HYGRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:11	CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHY GYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:12	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP
SEQ ID NO:13	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQK
SEQ ID NO:14	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRP
SEQ ID NO:15	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQK
SEQ ID NO:16	GHHHHHH

[0304]

SEQ ID NO:17	MGWSCIIILFVATATGVHS
SEQ ID NO:18	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:19	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:20	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:21	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:22	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:23	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:24	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:25	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:26	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:27	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:28	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:29	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGGHHHHH
SEQ ID NO:30	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:31	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG

[0305]

SEQ ID NO:32	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRCPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:33	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRCPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:34	QCNAPWLPFARPTNLDEFEPYIGTYLKYECRPGYRPFISIICLNKNSVWTGAKDRRCRRKSCRNPDPVNGMVHVIKDIQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIIISGNTVIWDNETPICDRIPCGLPPTITNGDFISTNRENFHYGSSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSPAPQCIGHHHHHH
SEQ ID NO:35	SCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKSCPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:36	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRCPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCSNGYKIEGDEEMHCSDDGFWWSKEPKKVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFYKCNMGYEYERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPGHHHHH
SEQ ID NO:37	GHCQAPDHFLFAKLTQTNASDFPIGTSKLYECRPEYGRPFISITCLDNLVWSSPKDVCKRSCPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:38	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRCPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCSNGYKIEGDEEMHCSDDGFWWSKEPKKVEISGHHHHHH
SEQ ID NO:39	DCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKSCPCNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRGKSGHHHHHH

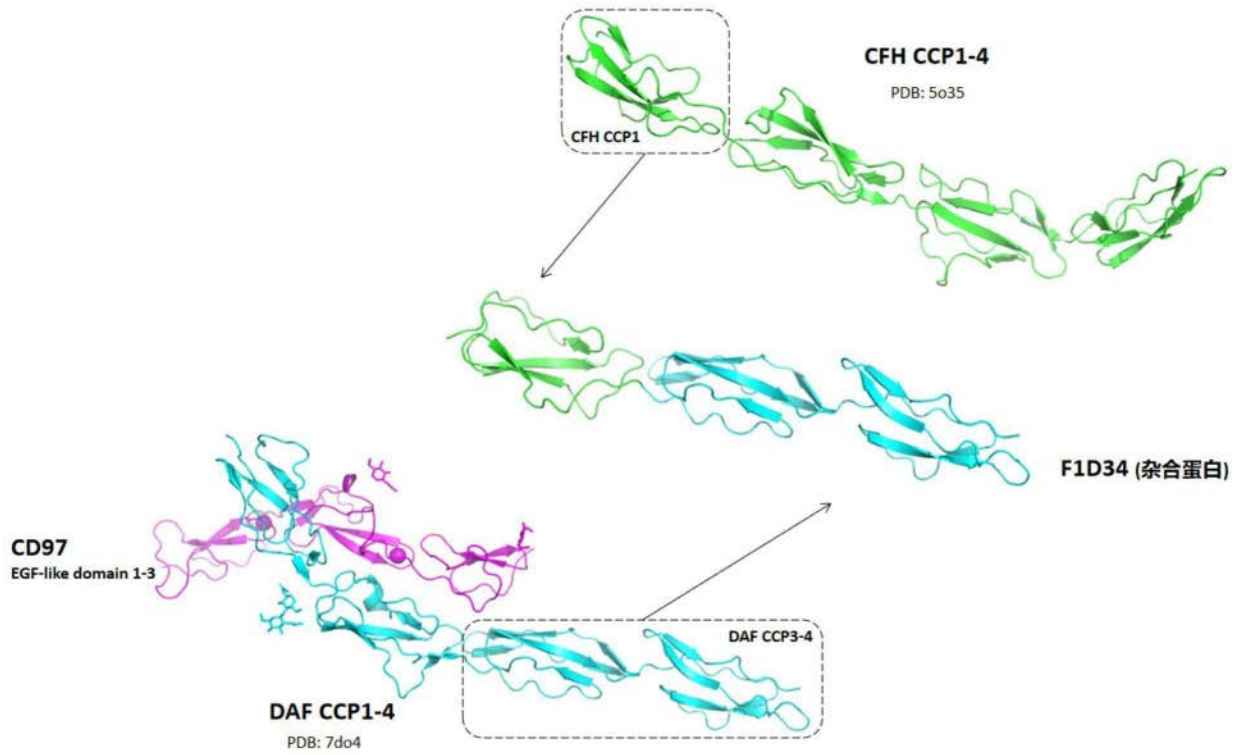


图1

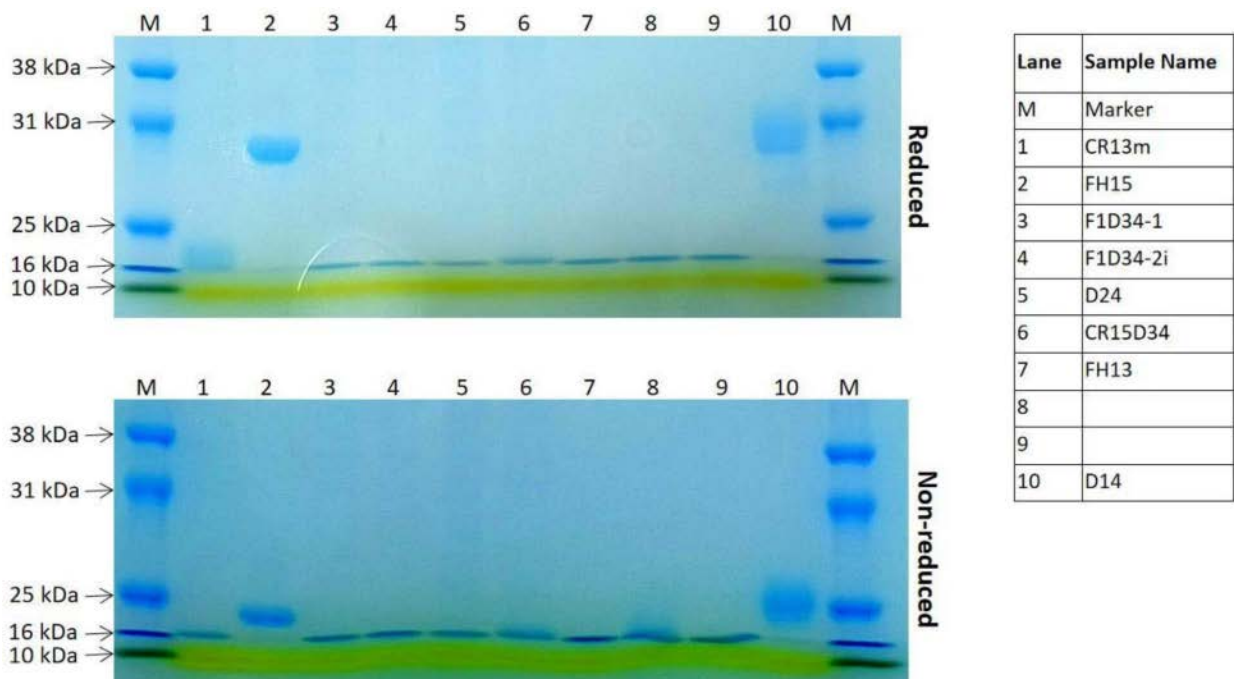


图2

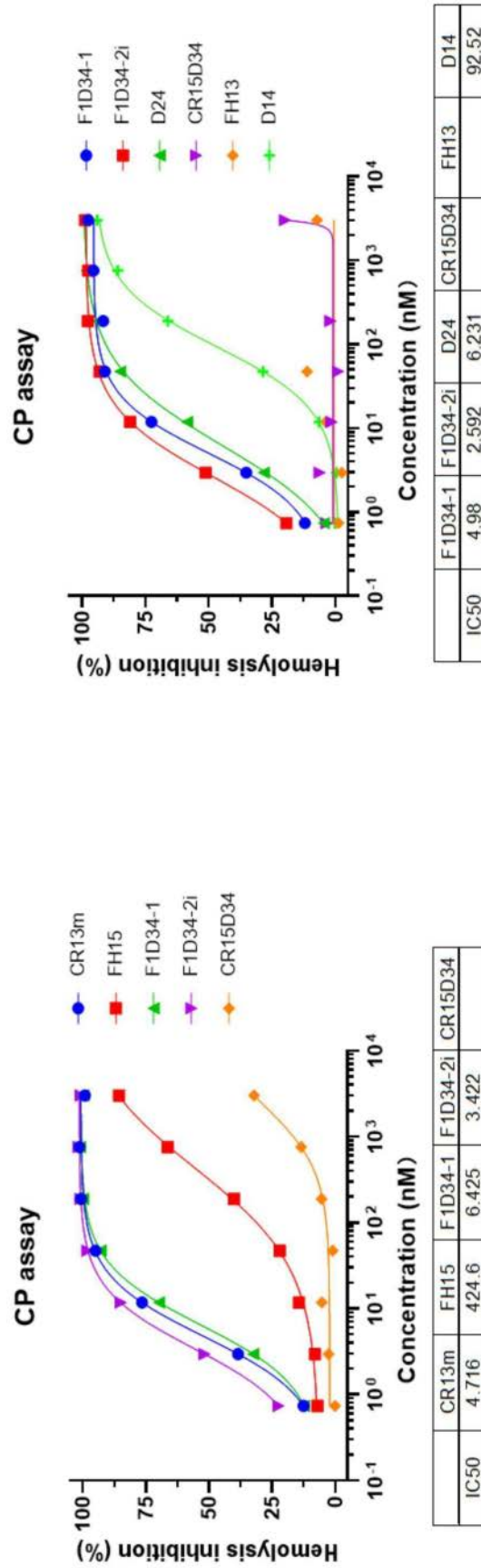


图3

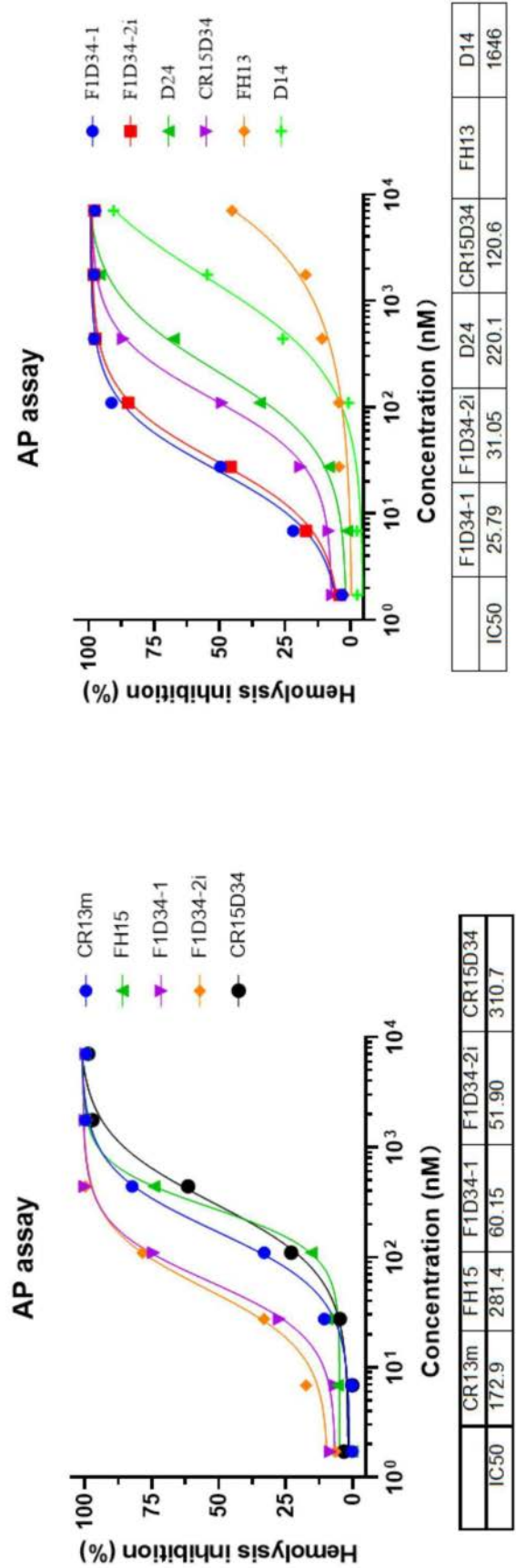


图4

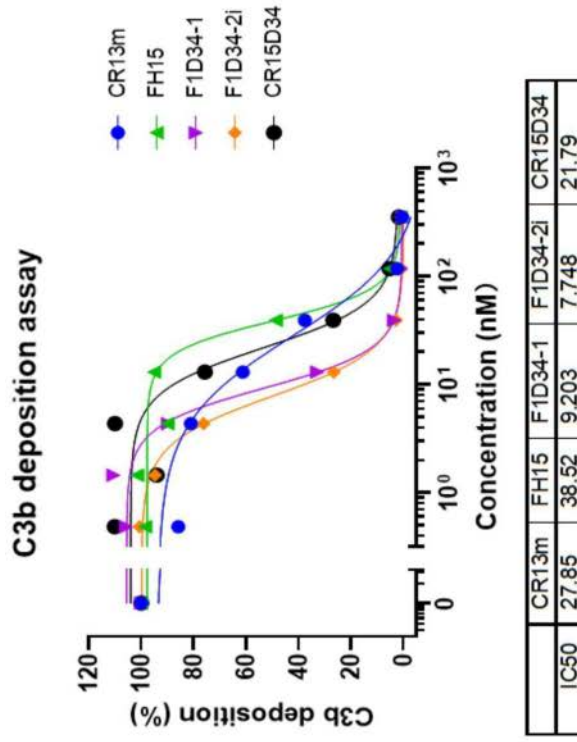
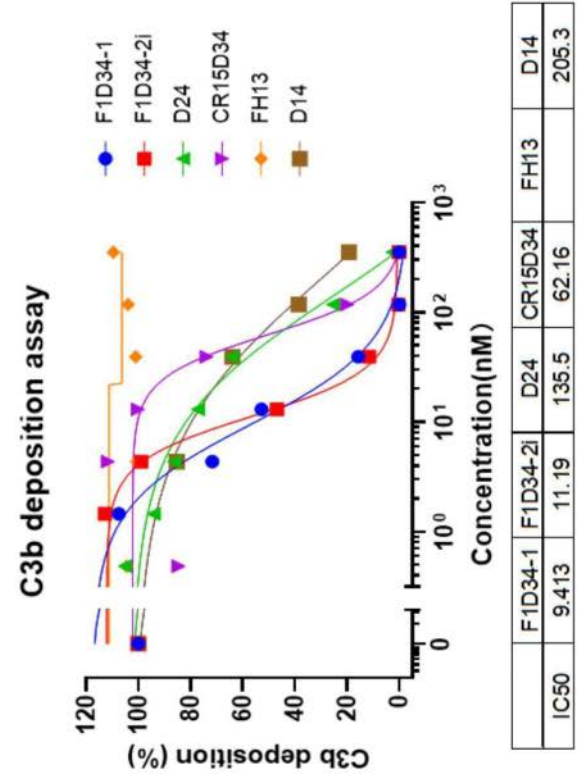


图5