

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号
WO 2023/197930 A1

(43) 国际公布日
2023 年 10 月 19 日 (19.10.2023)

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/47 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/086593

本国际公布:

(22) 国际申请日: 2023 年 4 月 6 日 (06.04.2023)

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(25) 申请语言: 中文

— 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210374811.2 2022 年 4 月 11 日 (11.04.2022) CN

(71) 申请人: 天辰生物医药 (苏州) 有限公司 (LONGBIO PHARMA (SUZHOU) CO., LTD.) [CN/
CN]; 中国上海市浦东新区碧波路 518 号
304 室, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 马海立 (MA, Haili); 中国上海市浦东新区碧波路 518 号 317 室, Shanghai 201203 (CN)。
刘恒 (LIU, Heng); 中国上海市浦东新区碧波路
518 号 317 室, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW
OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街 26
号新时代大厦 7 层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧
亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

(54) Title: COMPLEMENT-INHIBITING HYBRID PROTEIN

(54) 发明名称: 补体抑制杂合蛋白

(57) Abstract: Provided are a hybrid protein containing a CFH functional unit and a DAF functional unit, an encoding nucleic acid thereof, and a method and use thereof for treating related diseases or disorders of a complement system.

(57) 摘要: 提供一种包含 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。



WO 2023/197930 A1

补体抑制杂合蛋白

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：

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。

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 © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-06595-9>, 第 30 章)。

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 © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-06595-9>, 第 25 章)。

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：

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。

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。

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。

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。

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。

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。

在一些实施方案中，本发明涉及以下具体的项：

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、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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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

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，

(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、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，

(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、实施方案 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、实施方案 1-13 中任一项的杂合蛋白，其中所述标签例如纯化的标签，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、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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

22、药物组合产品，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

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。

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。

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

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：

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

图 2 显示各待测蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

图 3 显示了各待测蛋白的 CP 抑制活性

图 4 显示了各待测蛋白的 AP 抑制活性

图 5 显示了各待测蛋白的 C3b 沉积抑制活性

发明详述

I. 定义：

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。

➤ 衰变加速因子 (DAF)

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。

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基磷脂 (GPI) 锚。

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。

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。

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

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。

➤ 因子 H(CFH 或 FH)

“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。

因子 H 主要是单体，但自身缔合性较弱 ($KD = 28 \mu M$)，并且可能在糖胺聚糖或高浓度金属离子存在的条件下寡聚化。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。

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。

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 4 nm，短轴约为 2 nm，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。

在一些实施方案中，CFH 是人 CFH，例如人天然 CFH。在一些实施方案中，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。

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。

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

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。

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。

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。

➤ 其它定义

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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)。

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。

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。

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(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

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。

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。

“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%。

“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。

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。

II. 杂合蛋白

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。

A. DAF 功能单元

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

SEQ ID NO:7:

KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECRE

SEQ ID NO:8:

CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECRE。

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

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。

SEQ ID NO:9:

IYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG。

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。

SEQ ID NO:10:人 DAF CCP3-4

KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDN
GIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG

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

CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII
QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG

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。

B. CFH 功能单元

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路途径 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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

在一些实施方案中, 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。

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)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKQCQRP

SEQ ID NO:13: 人 CFH CCP1(CCP1)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKQCQK

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)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKQCQRP

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

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKQCQK

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。

C. 其他单元

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。

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。

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

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

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。

D. 杂合蛋白的实例

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。。

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。

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。

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。

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

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 GHHHHHH。

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。

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。

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。

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。

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

- (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。

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

- (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。

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。

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

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCKQKRPCNP
GEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDH
YGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:18)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCKQKSCPNP
GEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDH
YGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:19)

>人 CFH CCP1 或 SCR1 - 人 DAF/CD55 CCP3-4 或 SCR3-4(黑体)，包含 V62I 突变:

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCKQKSCPNPGEIRN
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:20)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCKQKRPCNPGEIRN
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:21)

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。

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

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCKQKRPCNPGEIRN

GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH* (SEQ ID NO:22)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKQKSCPNPGEIRN
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH* (SEQ ID NO:23)

>人 CFH CCP1 或 SCR1 - 人 DAF/CD55 CCP3-4 或 SCR3-4 (黑体) -6×His (斜体):
包含 V62I 突变:

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKQKSCPNPGEIRN
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH* (SEQ ID NO:24)

EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKQKRPCPNPGEIRN
GQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH* (SEQ ID NO:25)

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。

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

MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH*
(SEQ ID NO:26)

MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH*
(SEQ ID NO:27)

>信号肽-人 CFH CCP1 或 SCR1 - 人 DAF/CD55 CCP3-4 或 SCR3-4 (黑体) -6×His (斜体):
包含 V62I 突变:

MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGE
WVALNPLRKQKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH*
(SEQ ID NO:28)

MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGE
WVALNPLRKQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI
YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNDEGEWSGPPPECRG *GH*
(SEQ ID NO:29)

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。

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

MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREI

YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:30)

MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKQCQKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREI

YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:31)

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

包含 V62I 突变:

MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGE
WVALNPLRKQCQKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREI

YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:32)

MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGE
WVALNPLRKQCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREI

YCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRG (SEQ ID NO:33)

III. 多核苷酸、载体和宿主

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NSO、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。

IV. 本发明分子的生产和纯化

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。

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。

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。

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。

V. 测定法

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。

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。

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。

VI. 药物组合物、药物联合和试剂盒

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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：

- 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；
- 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）。

VII. 用途和方法

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。

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。

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。

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。

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。

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）。

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。

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。

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是根据已知方法，例如，注射或输注。

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

实施例 1. 分子构建

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: MGWSCIILFLVATATGVHS 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。

各蛋白的氨基酸序列如下:

>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

QCNAPewLPfARPTNLTDEFEPiGTyLYECrPGYyGRPFsIIcLKNSVwTGAKDRcRRKSCRNPpDPVNGMVH
VIKDIqFGsQIKYsCTKGYRLIGSSsATCIISGNTVIWdNETPiCDRIPcGLPPTITNGdFISTNRENfHYGSVvTYRC
NPGSGGRKVFELVGEPsiYCTsNDdQVGiWsgPAPQCI GHHHHHHH

>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

SCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTvVEYECrPGYrREPSLSPKLtCLQNLKwSTAVEfCKKkSCPNpGEIRN
GQIDVPgGILFGATISfSCNTGYKLFGSTSSfCLISGSSVQwSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSV
TYACNKgFTMIGEHsiYCTvNNDEGEWsgPPPECRG GHHHHHHH

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

EDCNELPPRRNTEILtGSWSDQTYEGTQAIYKCRPGYrSLGNIIMVCRKGEWwALNPLRKcQKRPCGHpGDTpF
GTFTLTGGNVfEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINyRECDtDGTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIvSSAMEPDREYHfGQ
AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGfWSKEKPKCvEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERfQYKCNMGYEYsERGDAVC
TESGWRPLPSCEEKSCDNpyIPNGDYsPLRIKHRTGDEITyQCRNGfYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPGHHHHH
H

>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

>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

>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

GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPiGTSLKYECrPEYyGRPFsITCLDNLVSSPKDVCKRKsCPNPpGEIRNGQI
DVPGGILFGATISfSCNTGYKLFGSTSSfCLISGSSVQwSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYA
CNKGFTMIGEHsiYCTvNNDEGEWsgPPPECRG GHHHHHHH

>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

EDCNELPPRRNTEILtGSWSDQTYEGTQAIYKCRPGYrSLGNIIMVCRKGEWwALNPLRKcQKRPCGHpGDTpF
GTFTLTGGNVfEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINyRECDtDGTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIvSSAMEPDREYHfGQ
AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGfWSKEKPKCvEIS GHHHHHHH

>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

DCGLPPDVPNAQPALEGRTSPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTLNSASL
KQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISF
SCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYC
TVNNDEGEWSGPPPECRGKS *GHHHHHH*

实施例 2. 蛋白表达

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。

实施例 3. 蛋白纯度检测 (SDS-PAGE)

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。

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。

实施例 4. 补体抑制活性检测

4.1 补体经典途径 (CP) 抑制活性检测

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。

实验过程简述如下:

(1) 蛋白梯度稀释: 用 GVB++ 缓冲液(含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 的明胶弗洛拿缓冲液, 货号: 25-02080, 天恩泽)将蛋白配制成 12000 nM 的溶液, 然后进行 4 倍梯度稀释, 一共 7 个梯度;

(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%;

(3) 绵羊红细胞的激活: 将绵羊红细胞(南京森贝伽生物)用 GVB++ 缓冲液洗涤至澄清透明, 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;

(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 3000 nM, 血清浓度为 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);

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

终止反应；

(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；

(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：

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%

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。

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。

3.2 补体替代途径 (AP) 抑制活性检测

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。

实验过程简述如下：

(1) 蛋白梯度稀释：用 GVBMG 缓冲液 (含 Mg^{2+} 及 EGTA 的明胶弗洛拿缓冲液，货号：25-02090，天恩泽) 将蛋白配制成 28000 nM 溶液，然后进行 4 倍梯度稀释，一共 7 个梯度；

(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%；

(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；

(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 7000 nM，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)；

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

(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；

(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：

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%

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。

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。

3.3 补体 C3b 沉积抑制活性检测

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。

实验过程简述如下：

(1) 蛋白梯度稀释：用 GVBMG 缓冲液 (含 Mg^{2+} 及 EGTA 的明胶弗洛拿缓冲液，货号：25-02090，天恩泽) 将蛋白配制成 1400 nM 溶液，然后进行 3 倍梯度稀释，一共 7 个梯度；

(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-Dpl NHS (Complement Technology) 从 -70°C 冰箱中取出，在 4°C 下自然解冻后用 GVBMG 稀释至 40%；

(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；

(4) 孵育：将稀释好的蛋白与血清各取 25 μL 于 96 孔板中混合，然后加入 50 μL 步骤 (3) 中获得的红细胞悬浮液，使蛋白起始终浓度为 350 nM，血清终浓度为 10%，充分混匀后将其放在 37°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)；

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

(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°C 孵育 30 分钟后将细胞再次清洗 3 次，使用流式细胞仪 (Cytotflex, Beckman) 检测各样品 APC 荧光 MFI (平均荧光强度)，并保存数据；

(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：

$$\text{沉积率 (\%)} = \text{实验组 MFI 值} / \text{阳性对照 MFI 值} * 100\%$$

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。

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。

序列表

SEQ ID NO:1	MTVARPSVPAALPLLGLPRLLLLVLLCLPAVWGDCLPPDPVNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVI CLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCK KKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGER DHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTT TKTTTTNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNKGSGTTS GTTRLLSGHTCFTLTGLLGLTVMGLLT
SEQ ID NO:2	ATGACCGTCGCGCGGCCGAGCGTGCCCGCGGCGCTGCCCCCTCTCGGGGAGCTGCCCCGGCTGCTGCTGCTGG TGCTGTTGTGCCTGCCGGCCGTGTGGGGTGACTGTGGCCTTCCCCAGATGTACCTAATGCCAGCCAGCTTTGG AAGGCCGTACAAGTTTTCCCGAGGATACTGTAATAACGTACAAATGTGAAGAAAGCTTTGTGAAAATTCCTGGCG AGAAGGACTCAGTGATCTGCCTTAAGGGCAGTCAATGGTCAGATATTGAAGAGTTCTGCAATCGTAGCTGCGAG GTGCCAACAAGGCTAAATTCTGCATCCCTCAAACAGCCTTATATCACTCAGAATTATTTCCAGTCGGTACTGTTGT GGAATATGAGTGCCGTCCAGGTTACAGAAGAGAACCTTCTCTATCACCAAAAATACTTGCCTTCAGAATTTAAAA TGGTCCACAGCAGTCGAATTTGTAAAAAGAAATCATGCCCTAATCCGGGAGAAATACGAAATGGTCAGATTGAT GTACCAGGTGGCATATTATTTGGTGCAACCATCTCCTTCTCATGTAACACAGGGTACAAATTATTTGGCTCGACTTC TAGTTTTTGTCTTATTTTCAGGCAGCTCTGTCCAGTGGAGTGACCCGTTGCCAGAGTGACAGAGAAATTATTGTCCA GCACCACCACAAATTGACAATGGAATAATTCAAGGGGAACGTGACCATTATGGATATAGACAGTCTGTAACGTATG CATGTAATAAAGGATTACCATGATTGGAGAGCACTCTATTTATTGTACTGTGAATAATGATGAAGGAGAGTGGAG TGGCCCACCACCTGAATGCAGAGGAAAATCTCTAAGTCCCAAGTCCCAACAGTTCAGAAACCTACCACAGT AAATGTTCCAACTACAGAAGTCTCACCAACTCTCAGAAAACCAACCAAAAACCAACCAACCAATGCTCAAGC AACACGGAGTACACCTGTTTCCAGGACAACCAAGCATTTTCATGAAACAACCCCAAATAAAGGAAGTGAACCA CTTCAGGTACTACCCGTCTTCTATCTGGGCACACGTGTTTCACGTTGACAGGTTTGCTTGGGACGCTAGTAACCAT GGGCTTGCTGACTTAG
SEQ ID NO:3	MRLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKLPVTAPEN GKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWWSKEPKCIVEISCKSPDVINGSPISQKIYKENER FQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCT STGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCDHEFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLR KCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQY TYALKEKAKYQCKLGVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHDGYES NTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGELVKFSCKPGFTIVGPNVQCYHFLSPDLP ICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYCNPRFLMKGPNIQCVDGWTTLPVCIVEESTCGDIPELEH GWAQLSPPYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSITCIHGVTQLPQCVAIDKLKCKSSNLILIEHLKNKKEFDHNSNIR YRCRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNC SMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNYRDGEKVS VLCQENYLIQEGEITCK DGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSQESYAHGTKLSYTCGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKS PPEISHGVVAHMSDSYQYGEVYTKFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKDVYKAG EQVTYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSVNPPTVQNAIVSRQMSKYPGERVRYQCRSPYEMFGD EEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLQLEGNKRITCRNGQWSEPPK CLHPCVISREIMENYNIALRWTAQKQKLSRTGESVEFVCKRGYRLSSRSHTLR TTCWDGKLEYPTCAKR
SEQ ID NO:4	ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGCAATGAACTTCCTCC AAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAA ATGCCGCCCTGGATATAGATCTCTTGAAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTTAATCCA TTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCTTTTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGA AATGTGTTTGAATATGGTGTAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCG

TGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTACCAGTGACAGCACCA
GAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACCAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGT
TGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGAAGAAATGCATTGTTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAA
ACCAAAGTGTGTGGAAATTCATGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTTATAA
GGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAA
TCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATTCCAAATGGTGACTACTCACC
TTTAAGGATTAAACACAGAAGTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGG
AAATACAGCAAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAAACCTTGATGATTATCCAGAC
ATTAAACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGAAAAATATTACTCCTAT
TACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTACTGGGATCACATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGC
CAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTTCTTATTGGAAAATGGATATAATCAAAATCATGGAAGAAAGTTT
GTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTA
TGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAAACATGTTCCAAATCAAGTATAGATATTGAGAAT
GGGTTTTATTCTGAATCTCAGTATACATATGCCTTAAAAGAAAAAGCGAAATATCAATGCAAACTAGGATATGTAAC
AGCAGATGGTGAAACATCAGGATCAATTACATGTGGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGTGCATTAAATC
TTGTGATATCCCAGTATTATGAATGCCAGAATAAAATGACTTCACATGGTTAAGCTGAATGACACATTGGACT
ATGAATGCCATGATGGTTATGAAAGCAATACTGGAAGCACCCTGGTTCCATAGTGTGTGGTTACAATGGTTGGTC
TGATTTACCATATGTTATGAAAGAGAATGCGAACTTCTAAAATAGATGTACACTTAGTTCTGATCGCAAGAAAG
ACCAGTATAAAGTTGGAGAGGTGTTGAAATCTCCTGCAAACCAGGATTTACAATAGTTGGACCTAATTCCGTTCA
GTGCTACCACTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCAATATGTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAAC
TCCTCAATGGGAATGTTAAGGAAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAGTGGTGGAATATTATTGCAATC
CTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATTCATGTGTTGATGGAGAGTGGACAACCTTACCAGTGTGTATTGT
GGAGGAGAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACTTGAACATGGCTGGGCCCAGCTTCTTCCCCTCCTTATTACTAT
GGAGATTCAGTGGAATTCAATTGCTCAGAATCATTTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTATTATCATGGAGT
ATGGACCCAACCTCCCCAGTGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAAATCATCAAATTTAATTATACTTGAG
GAACATTTAAAAACAAGAAGGAATTCGATCATAATTCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGATG
GATACACACAGTCTGCATAAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAAGTCTCAATGGCACAATAACAATTATGCCC
ACCTCCACCTCAGATTCCCAATTCTACAATATGACAACCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTATCTGTTC
TTTGCCAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAGAAGAAATTACATGCAAAGATGGAAGATGGCAGTCAATACCAC
TCTGTGTTGAAAAAATTCATGTTACAACCACCTCAGATAGAACACGGAACCATTAATTCATCCAGGTCTTCACA
AGAAAGTTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTTTCAGGATATCTGAAGAAAATGAAAC
AACATGCTACATGGGAAAAATGGAGTTCTCCACCTCAGTGTGAAGGCCTCCTTGTAATCTCCACCTGAGATTCT
CATGGTGTGTAGCTCACATGTCAGACAGTTATCAGTATGGAGAAGAAGTTACGTACAAATGTTTTGAAGGTTTTG
GAATTGATGGGCCTGCAATTGCAAAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCTCCATCATGCATAAAACAGATT
GTCTCAGTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACCCATGGGAGAGAAGAAGGATGTGTATAAGGCGGGTGAGCAA
GTGACTTACACTTGTGCAACATATTACAAAATGGATGGAGCCAGTAATGTAACATGCATTAATAGCAGATGGACAG
GAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCCTGTGTGAATCCGCCCACAGTACAAAATGCTTATATAGTGTGAGACAGA
TGAGTAAATATCCATCTGGTGAGAGAGTACGTTATCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTTGGGGATGAAGAAGT
GATGTGTTTAAATGGAACTGGACGGAACCACCTCAATGCAAAGATTCTACAGGAAAAATGTGGGCCCCCTCCACC
TATTGACAATGGGGACATTACTTCATTCCCCTGTGTCAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTACCAATGCCAGA
ACTTGTATCAACTGAGGGTAACAAGCGAATAACATGTAGAAATGGACAATGGTCAGAACCACCAAAATGCTTAC
ATCCGTGTGTAATATCCCGAGAAATTATGGAAAATTATAACATAGCATTAAAGGTGGACAGCCAAACAGAAGCTTTA
TTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAACGGGGATATCGTCTTTCATCACGTTCTCACACATTGCCGA
ACAACATGTTGGGATGGGAACTGGAGTATCCAACCTGTGCAAAAAGATAG

SEQ ID NO:5	MRLAKIICMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPEN GKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENER FQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCT STGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCDHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLR KCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGSPTPRCIRVSFTL
SEQ ID NO:6	ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGCAATGAACTTCCTCC AAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAA ATGCCGCCCTGGATATAGATCTCTTGGAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTGCTCTTAATCCA TTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTTTTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGA AATGTGTTTGAATATGGTGAAAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCG TGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGACAGCACCA GAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACCAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTA TGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGAAGAAATGCATTGTTTACAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAA ACCAAAGTGTGTGGAAATTCATGCAAATCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTTATAA GGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAA TCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATCCAAATGGTGACTACTCACC TTTAAGGATTAAACACAGAACTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGG AAATACAGCAAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAAACCTTGTGATTATCCAGAC ATTAAACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGAAAAATATTACTCCTAT TACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCACATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGC CAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTCTTATTTGGAAAATGGATATAATCAAAATCATGGAAGAAAGTTT GTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTA TGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCAGATGCATCCGTGTGAGCTTTACCCTCTGA
SEQ ID NO:7	KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECRE
SEQ ID NO:8	CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECRE
SEQ ID NO:9	IYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:10	KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERD HYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG
SEQ ID NO:11	CPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHY GYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPPECRG
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

SEQ ID NO:17	MGWSCIIILFVATATGVHS
SEQ ID NO:18	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNG QIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYAC NKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:19	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKSCPNPGEIRNGQ IDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACN KGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:20	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKSCPNPGEIRNGQI DVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACN KGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:21	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNGQI DVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACN KGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:22	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNG QIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYAC NKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:23	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKSCPNPGEIRNGQ IDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACN KGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:24	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKKSCPNPGEIRNGQI DVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACN KGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:25	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCPNPGEIRNGQI DVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACN KGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:26	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNLP RRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:27	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNLP RRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:28	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNLP RRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPL RKCQKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:29	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNLP RRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:30	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNLP RRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:31	MGWSCIIILFVATATGVHSEDCNLP RRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPL RKCQKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG

SEQ ID NO:32	MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPL RKCQKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:33	MGWSCILFLVATATGVHSEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPL RKCQKRPCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRG
SEQ ID NO:34	QCNAPewLPFARPTNLTDEFEPiGTyLkYECrPGYyGRPFsiCLKNSVWTGAKDRCRKSCRNPDPVNGMVHVI KDIQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIISGNTVIWDNETPICDRIPCGLPPTITNGDFISTNRENFHYGSVVTYRCNPGS GGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIGHHHHHH
SEQ ID NO:35	SCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKKSCPNPGEIRNGQID VPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNK GFTMIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:36	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGT FTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQ AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIYKENERFYKCNMGYEYSERGA VCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPGHHH HHH
SEQ ID NO:37	GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSLKYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSCPNPGEIRNGQIDVP GGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFT MIGEHSIYCTVNNDGEWWSGPPPECRGGHHHHHH
SEQ ID NO:38	EDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGT FTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQ AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISGHHHHHH
SEQ ID NO:39	DCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYI TQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTG YKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNND EGEWWSGPPPECRGKSGHHHHHH

权利要求

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。

图 1

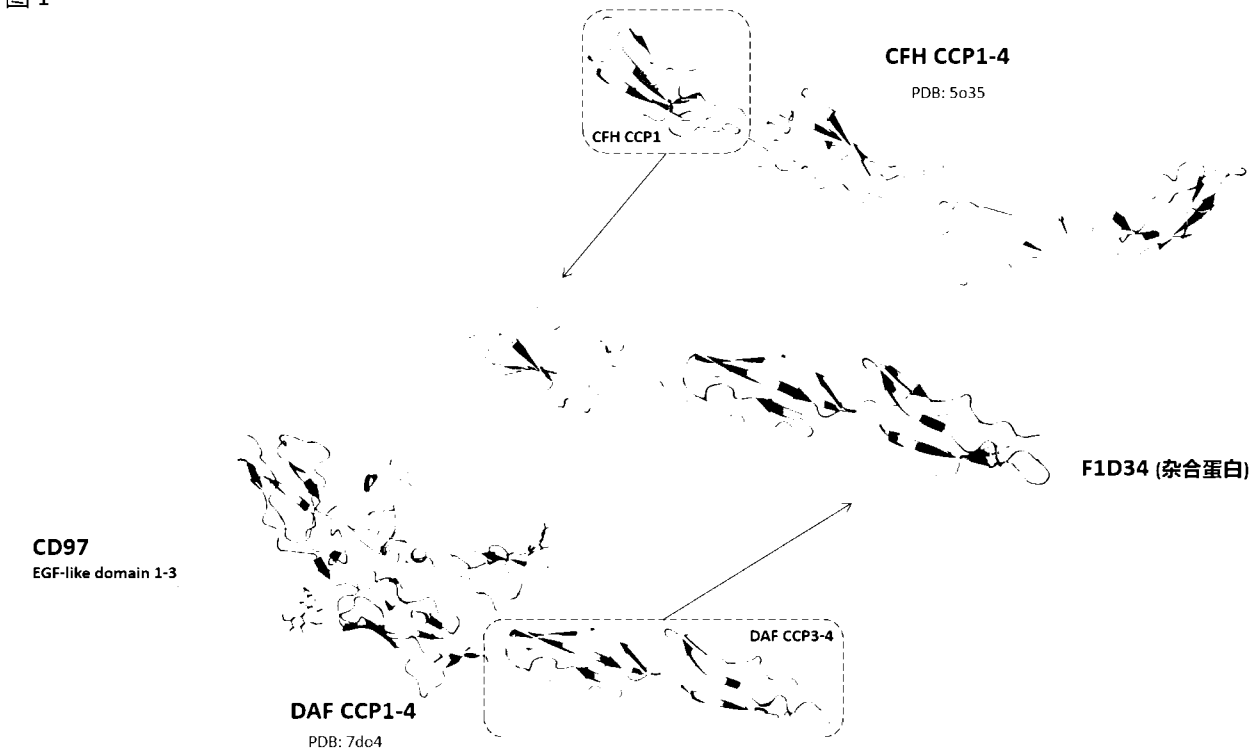


图 1

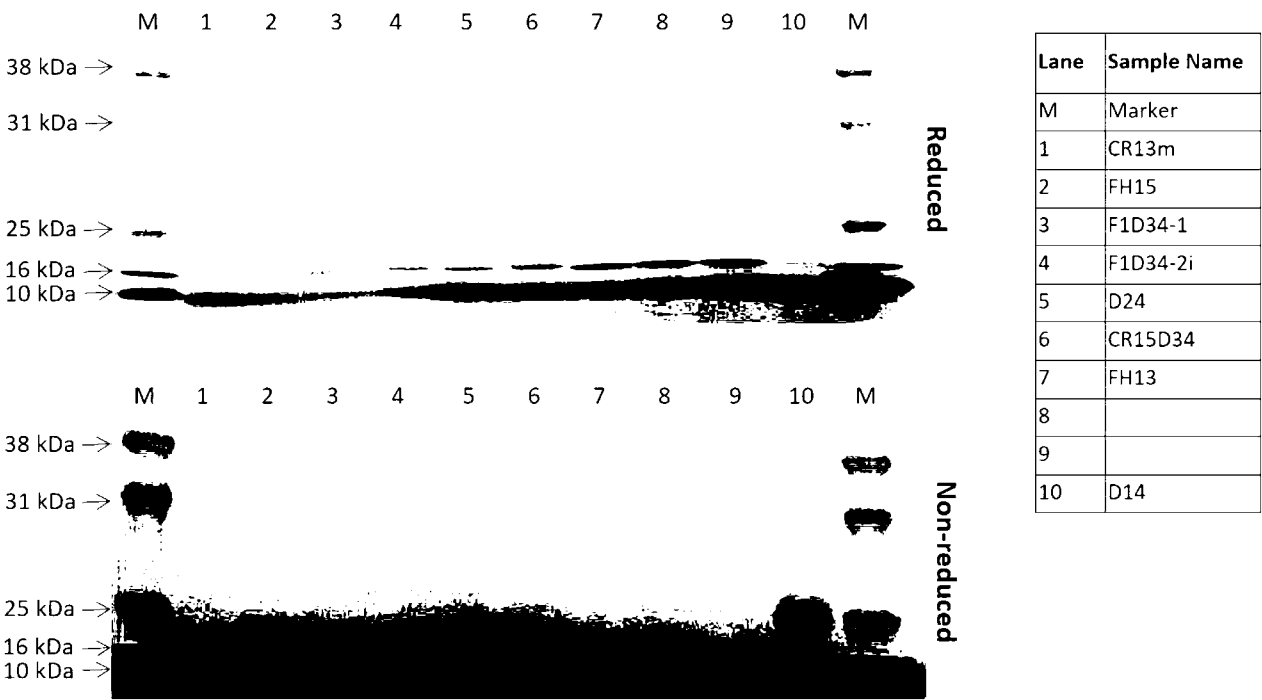


图 2

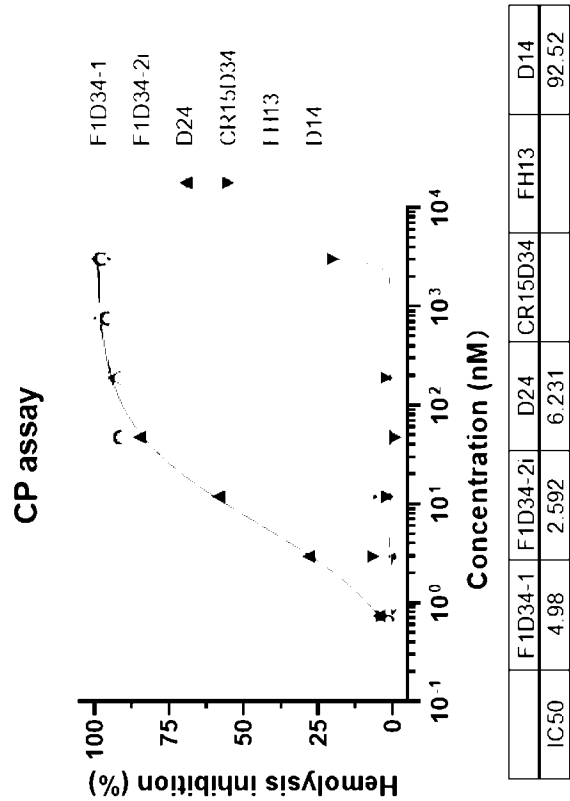
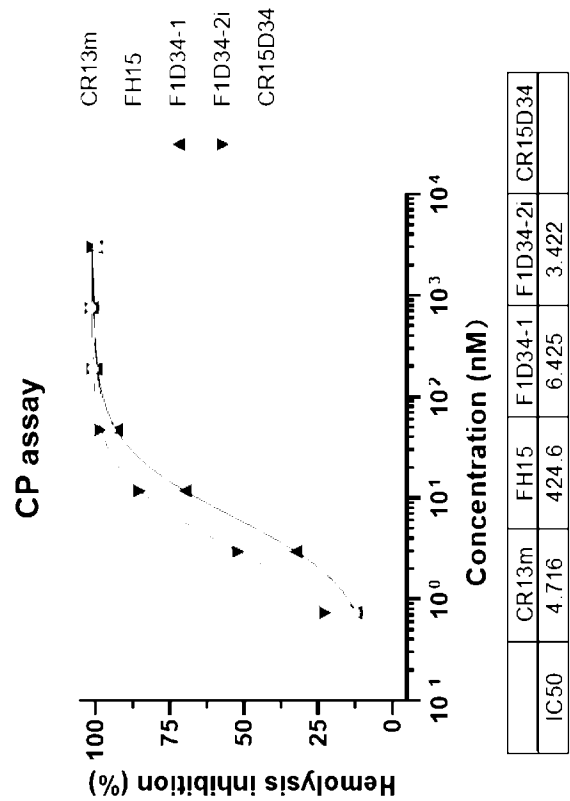


Figure 3



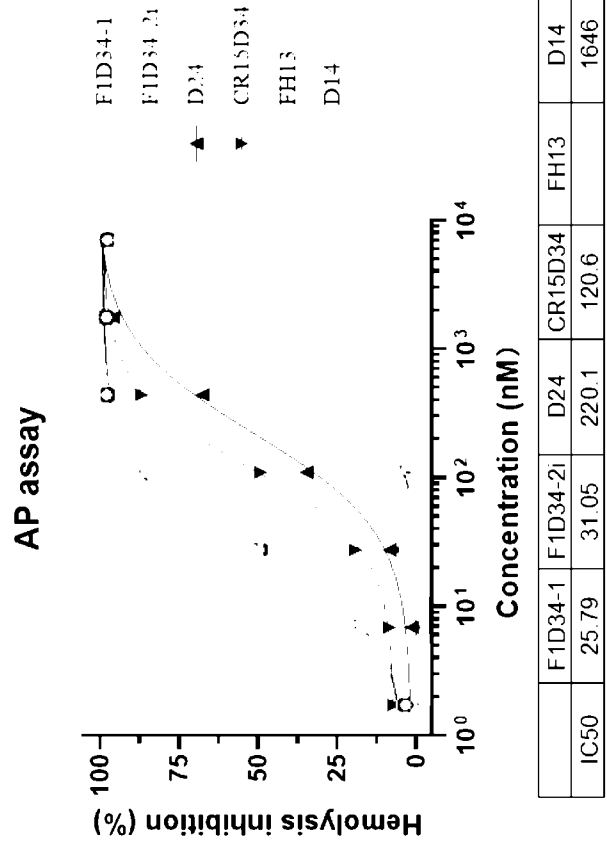
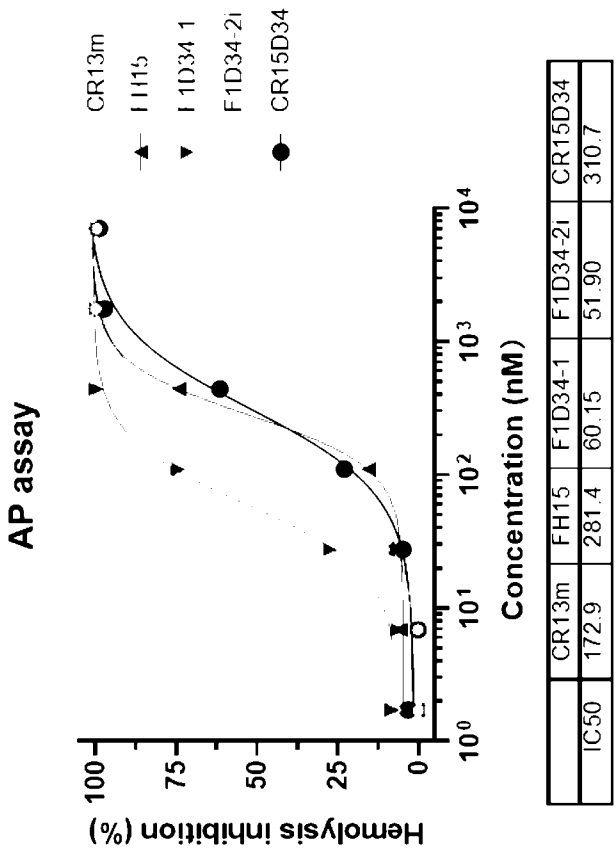


图 4

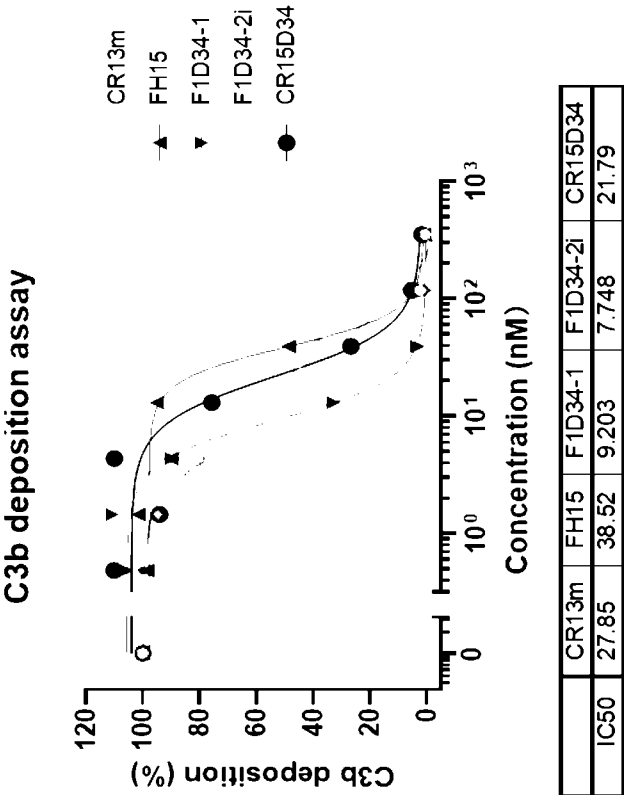
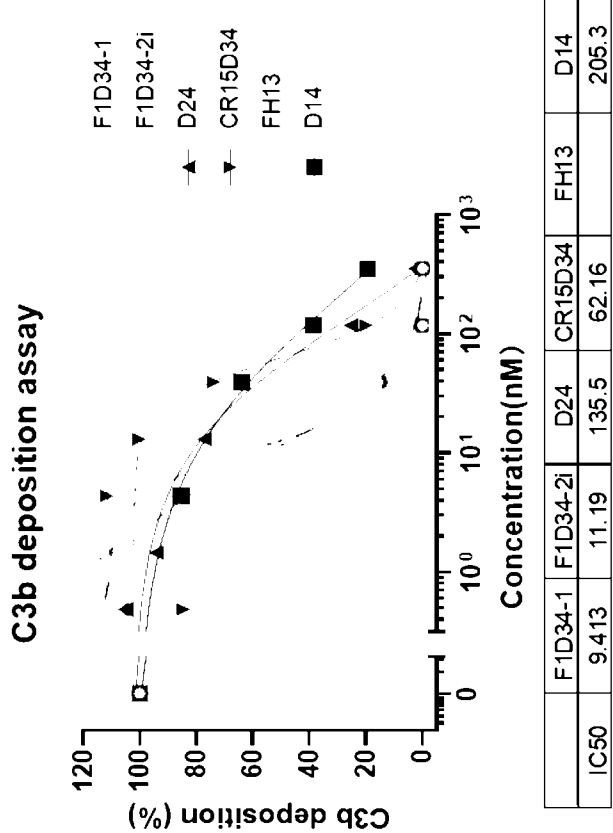


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/086593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/47(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; A61K38/17(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K,C12N,A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, 万方数据库, WANFANG DATABASE, CNKI, PubMed, ISI web of Knowledge, GenBank, EBI, STN: 补体因子, 衰变加速因子, 衰变加快因子, 促衰变因子, 融合, 杂合, 重复模块, 重复片段, 补体控制蛋白, 补体途径, CCP, DAF, CFH, FH, SCR, decay accelerating factor, CD55, complement factor H protein, H因子, complement component, complement control protein repeats, SEQ ID NOs: 1-33, 申请人, applicant(s), 发明人, inventor(s)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 109689084 A (UNIVERSITAT ULM) 26 April 2019 (2019-04-26) claims 1-24	1-26
Y	CN 113365648 A (UNIVERSITAT ULM) 07 September 2021 (2021-09-07) claims 1-17	1-26
A	WO 2018197873 A1 (UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPONTYNE) 01 November 2018 (2018-11-01) entire document	1-26
A	WO 2020219922 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al.) 29 October 2020 (2020-10-29) entire document	1-26
A	WO 2005069726 A2 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 04 August 2005 (2005-08-04) entire document	1-26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 June 2023

Date of mailing of the international search report

20 June 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/086593

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JÖNSEN, A. et al. "Mutations in Genes Encoding Complement Inhibitors CD46 and CFH Affect the Age at Nephritis Onset in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." <i>Arthritis Research & Therapy</i> , Vol. vol. 13, 15 December 2011 (2011-12-15), R206 pages 1-9	1-26
A	SAGE, M.A.G. et al. "A Factor H-Fc Fusion Protein Increases Complement-Mediated Opsonophagocytosis and Killing of Community Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus" <i>PloS One</i> , Vol. 17, No. (3), 24 March 2022 (2022-03-24), e0265774	1-26
A	WU, J. et al. "Structure of Complement Fragment C3b-factor H and Implications for Host Protection by Complement Regulators" <i>Nature Immunology</i> , Vol. 10, No. (7), 07 June 2009 (2009-06-07), pp. 728-733	1-26
A	PARENTE, R. et al. "Complement Factor H in Host Defense and Immune Evasion" <i>Cellular and Molecular Life Sciences</i> , Vol. vol. 74, 10 December 2016 (2016-12-10), pp. 1605-1624	1-26
A	KAMALA, O. et al. "Homodimeric Minimal Factor H: In Vivo Tracking and Extended Dosing Studies in Factor H Deficient Mice" <i>Frontiers in Immunology</i> , Vol. vol. 12, 09 December 2021 (2021-12-09), Article 752916	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/086593

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **23-26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 23-26 relate to a method for preventing or treating a complement system-related disease or condition in a subject, that is, claims 23-26 relate to subject matter for which a search is not required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1: (4) methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. The international search is conducted on the basis of the use in the preparation of a drug for prevention or treatment.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/086593

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109689084	A	26 April 2019	WO	2018002131	A1	04 January 2018
				AU	2017289214	A1	24 January 2019
				AU	2017289214	B2	18 November 2021
				CA	3029106	A1	04 January 2018
				MX	2019000059	A	07 September 2020
				PL	3474883	T3	19 September 2022
				US	2019202878	A1	04 July 2019
				IL	263949	A	31 January 2019
				JP	2019523238	A	22 August 2019
				JP	7068203	B2	16 May 2022
				ES	2925466	T3	18 October 2022
				EP	3474883	A1	01 May 2019
				EP	3474883	B1	25 May 2022
				KR	20190039090	A	10 April 2019
				DK	3474883	T3	29 August 2022
CN	113365648	A	07 September 2021	US	2021355178	A1	18 November 2021
				WO	2019243586	A1	26 December 2019
				EP	3810166	A1	28 April 2021
				EP	3586860	A1	01 January 2020
				JP	2021527439	A	14 October 2021
WO	2018197873	A1	01 November 2018	None			
WO	2020219922	A1	29 October 2020	None			
WO	2005069726	A2	04 August 2005	US	2008188404	A1	07 August 2008
				US	8124097	B2	28 February 2012
				US	2012226020	A1	06 September 2012
				US	8932601	B2	13 January 2015
				WO	2005069726	A3	18 January 2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/086593

A. 主题的分类

C07K14/47(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; A61K38/17(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K, C12N, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, 万方数据库, CNKI, PubMed, ISI web of Knowledge, GenBank, EBI, STN; 补体因子, 衰变加速因子, 衰变加快因子, 促衰变因子, 融合, 杂合, 重复模块, 重复片段, 补体控制蛋白, 补体途径, CCP, DAF, CFH, FH, SCR, decay accelerating factor, CD55, complement factor H protein, H 因子, complement component, complement control protein repeats, SEQ ID NOs:1-33, 申请人, 发明人

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 109689084 A (乌尔姆大学) 2019年4月26日 (2019 - 04 - 26) 权利要求1-24	1-26
Y	CN 113365648 A (乌尔姆大学) 2021年9月7日 (2021 - 09 - 07) 权利要求1-17	1-26
A	WO 2018197873 A1 (UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPONTYNE) 2018年11月1日 (2018 - 11 - 01) 全文	1-26
A	WO 2020219922 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA等) 2020年10月29日 (2020 - 10 - 29) 全文	1-26
A	WO 2005069726 A2 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 2005年8月4日 (2005 - 08 - 04) 全文	1-26

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年6月7日

国际检索报告邮寄日期

2023年6月20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

黎舒婷

电话号码 (+86) 010-53961957

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	JÖNSEN, A. 等. "Mutations in genes encoding complement inhibitors CD46 and CFH affect the age at nephritis onset in patients with systemic lupus erythematosus." ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY., 第13卷, 2011年12月15日 (2011 - 12 - 15), R206 第1-9页	1-26
A	SAGE, M. A. G. 等. "A Factor H-Fc fusion protein increases complement-mediated opsonophagocytosis and killing of community associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus" PLOS ONE., 第17卷, 第3期, 2022年3月24日 (2022 - 03 - 24), e0265774	1-26
A	WU, J. 等. "Structure of complement fragment C3b - factor H and implications for host protection by complement regulators" NATURE IMMUNOLOGY, 第10卷, 第7期, 2009年6月7日 (2009 - 06 - 07), 第728-733页	1-26
A	PARENTE, R. 等. "Complement factor H in host defense and immune evasion" CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, 第74卷, 2016年12月10日 (2016 - 12 - 10), 第1605-1624页	1-26
A	KAMALA, O. 等. "Homodimeric Minimal Factor H: In Vivo Tracking and Extended Dosing Studies in Factor H Deficient Mice" FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 第12卷, 2021年12月9日 (2021 - 12 - 09), Article 752916	1-26

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 23-26
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求23-26涉及一种在受试者中预防或治疗补体系统相关疾病或病症的方法，也即权利要求23-26涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于在制备预防或治疗药物中的用途作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/086593

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109689084	A	2019年4月26日	WO	2018002131	A1	2018年1月4日
				AU	2017289214	A1	2019年1月24日
				AU	2017289214	B2	2021年11月18日
				CA	3029106	A1	2018年1月4日
				MX	2019000059	A	2020年9月7日
				PL	3474883	T3	2022年9月19日
				US	2019202878	A1	2019年7月4日
				IL	263949	A	2019年1月31日
				JP	2019523238	A	2019年8月22日
				JP	7068203	B2	2022年5月16日
				ES	2925466	T3	2022年10月18日
				EP	3474883	A1	2019年5月1日
				EP	3474883	B1	2022年5月25日
				KR	20190039090	A	2019年4月10日
				DK	3474883	T3	2022年8月29日
CN	113365648	A	2021年9月7日	US	2021355178	A1	2021年11月18日
				WO	2019243586	A1	2019年12月26日
				EP	3810166	A1	2021年4月28日
				EP	3586860	A1	2020年1月1日
				JP	2021527439	A	2021年10月14日
WO	2018197873	A1	2018年11月1日	无			
WO	2020219922	A1	2020年10月29日	无			
WO	2005069726	A2	2005年8月4日	US	2008188404	A1	2008年8月7日
				US	8124097	B2	2012年2月28日
				US	2012226020	A1	2012年9月6日
				US	8932601	B2	2015年1月13日
				WO	2005069726	A3	2007年1月18日