(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119698286 A
(43)申请公布日 2025.03.25

(21)申请号 202380045885.4
(22)申请日 2023.05.04
(30)优先权数据
63/338,392 2022.05.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066620 2023.05.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/215840 EN 2023.11.09
(71)申请人 弗特克斯药品有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 G·E·布鲁斯 N·勒蒙 T·努森
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 38/16(2006.01)
A61K 31/7028(2006.01)
A61K 38/48(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)

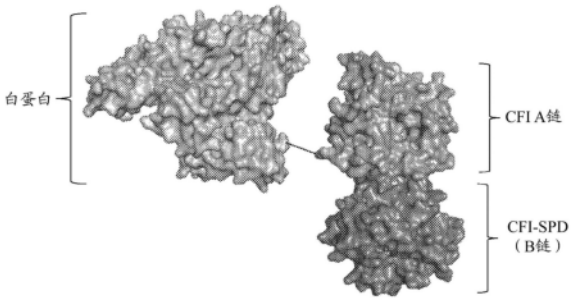
权利要求书2页 说明书27页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

用于治疗眼部疾病的补体因子I给药方案

(57)摘要

本文提供了用于治疗诸如年龄相关性黄斑变性(AMD)的眼部病症的给药方案。这些方案包括以指定剂量和频率向有需要的受试者施用包含补体因子I(CFI)和结合配偶体的融合构建体。



CN 119698286 A

1.一种治疗或预防有需要的人类受试者的眼部病症的方法,包括:

向所述受试者施用融合构建体,所述融合构建体包含

(a)包含SEQ ID NO.5的氨基酸序列的补体因子I(CFI)或其变体,和

(b)结合配偶体,

其中施用途径是眼内,并且其中所述融合构建体以下述方式施用:

(a)约0.1mg每只眼至约10mg每只眼的剂量;和/或

(b)约每1个月至约4个月的频率。

2.根据权利要求1所述的方法,其中CFI的所述变体与SEQ ID NO.5的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性。

3.根据权利要求2所述的方法,其中CFI的所述变体包括包含取代T377G、N422K、E457G和N531G中的一个或多个的SEQ ID NO:5的CFI。

4.根据权利要求2所述的方法,其中CFI的所述变体包括包含取代N422K、E457G和N531G的SEQ ID NO:5的CFI。

5.根据权利要求2所述的方法,其中CFI的所述变体包括包含取代T377G、E457G和N531G的SEQ ID NO:5的CFI。

6.根据权利要求1所述的方法,其中融合蛋白包含补体因子I(CFI),所述补体因子I包含SEQ ID NO.5的氨基酸序列。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述结合配偶体是包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。

8.根据权利要求7所述的方法,其中血清白蛋白的所述变体与SEQ ID NO.7的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述融合构建体与SEQ ID NO.21的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述融合构建体包含SEQ ID NO.21的氨基酸序列。

11.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述结合配偶体是CFI的辅因子。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述结合配偶体包括包含SEQID NO.22或SEQ ID NO:23的氨基酸序列的因子H辅因子、其结构域或其结构域的一部分。

13.根据权利要求11所述的方法,其中所述结合配偶体包括CR1、其结构域或其结构域的一部分。

14.根据权利要求11-13中任一项所述的方法,包括包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。

15.根据权利要求14所述的方法,其中血清白蛋白的所述变体与SEQ ID NO.7的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述眼部病症是干性年龄相关性黄斑变性(AMD)。

17.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述眼部病症是湿性AMD。

18.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述眼部病症是地图状萎缩(GA)。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述受试者表现出地图状萎缩

(GA)。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述人类受试者携带CFI的一个或多个选自由以下组成的组的突变:G119R、L131R、V152M、G162D、R187Y、R187T、T203I、A240G、A258T、G287R、A300T、R317W、R339Q、V412M、P553S、K441R、R339Ter、R317Q、G261D、R187Q和R187Ter。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述剂量为约0.1mg每只眼至约10mg每只眼、约0.5mg每只眼至约10mg每只眼、约1mg每只眼至约10mg每只眼、约1.5mg每只眼至约10mg每只眼、约2mg每只眼至约10mg每只眼、约2.5mg每只眼至约10mg每只眼、约3mg每只眼至约10mg每只眼、约3.5mg每只眼至约10mg每只眼、约4mg每只眼至约10mg每只眼、约4.5mg每只眼至约10mg每只眼、约5mg每只眼至约10mg每只眼、约5.5mg每只眼至约10mg每只眼、约6mg每只眼至约10mg每只眼、约6.5mg每只眼至约10mg每只眼、约7mg每只眼至约10mg每只眼、约7.5mg每只眼至约10mg每只眼、约8mg每只眼至约10mg每只眼、约8.5mg每只眼至约10mg每只眼、约9mg每只眼至约10mg每只眼或约9.5mg每只眼至约10mg每只眼。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述剂量为约0.1mg每只眼、0.5mg每只眼、1mg每只眼、5mg每只眼或10mg每只眼。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述频率为约每1个月。

24.根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述频率为约每2个月、3个月或4个月。

25.根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中将所述融合构建体施用于一只眼。

26.根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中将所述融合构建体施用于双眼。

27.根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中将所述融合构建体依次施用于双眼。

28.根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中将所述融合构建体同时施用于双眼。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述受试者的眼内压在治疗后是稳定的。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述受试者的视网膜厚度在治疗后是稳定的。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的方法,其中在施用后,所述融合构建体在所述受试者中所表现出的活性至少等同于内源CFI所表现出的活性。

32.根据权利要求1至30中任一项所述的方法,其中在施用后,基线CFI水平保持高于未接受注射的参考受试者的基线CFI水平。

用于治疗眼部疾病的补体因子I给药方案

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年5月4日提交的美国临时申请号63/338,392的优先权,其内容以引用方式整体并入本文。

[0003] 电子序列表的参考

[0004] 电子序列表(VTEX_708_01WO_SeqList_ST26.xml;大小:18,753字节;和创建日期:2023年5月3日)的内容以引用方式整体并入本文。

背景技术

[0005] 补体系统包括经典途径、凝集素途径和旁路途径,并且由多种调节因子紧密控制。补体因子I(CFI)是一种此类调节因子,并且用于通过切割C4b蛋白和C3b蛋白,从而使这些蛋白失活来调节补体系统。此类切割分别导致经典途径、凝集素途径和旁路途径的抑制,从而最终阻止C3转化酶和C5转化酶的组装。CFI被编码为酶原,然后该酶原通过蛋白水解切割被活化为异二聚体糖蛋白,该异二聚体糖蛋白具有通过二硫键连接的重链(A链)和轻链(B链)。CFI在翻译后通过弗林蛋白酶加工成其活性形式以产生双链成熟蛋白。

[0006] CFI失调、CFI突变和功能失调(即遗传变体)或CFI缺乏与涉及补体系统的疾病有关。补体系统的失调或过度活化与诸如年龄相关性黄斑变性(AMD)的眼部疾病相关。AMD的进展导致黄斑损伤、视网膜色素上皮(RPE)萎缩和光感受器丧失,从而导致视力模糊并最终丧失视力。携带CFI的罕见遗传变体和/或低CFI水平与AMD和该疾病的进展相关。根据美国国立卫生研究院(NIH)的国立眼科研究所(National Eye Institute),AMD是成人视力丧失的主要原因,2020年全球有超过1.9亿人受到影响。存在两种类型的AMD:湿性AMD和干性AMD。湿性AMD不太常见,并且其特征在于眼睛后部血管异常生长,从而损害黄斑。干性AMD的特征在于黄斑变薄,并且可进展成地图状萎缩(GA),其特征在于视网膜组织的进行性且不可逆的损失。GA是失明的主要原因,并且在全球有超过500万人受到影响。需要用于调节或抑制补体系统以维持调节平衡以用于治疗诸如AMD和GA的眼部疾病的方法。本文提供了解决补体系统中的功能障碍和/或失调的组合物和方法。

发明内容

[0007] 在一个方面,本文提供了一种治疗或预防有需要的人类受试者的眼部病症的方法,该方法包括向受试者施用融合构建体,该融合构建体包含含有SEQ ID NO.5的氨基酸序列的补体因子I或其变体和结合配偶体,其中施用途径是眼内,并且其中融合构建体以约0.1mg每只眼至约10mg每只眼的剂量施用和/或以约每1个月至4个月的频率施用。在一些实施方案中,结合配偶体是包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。在一些实施方案中,CFI变体与SEQ ID NO.5的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的同一性。在一些实施方案中,CFI变体包括包含取代T377G、N422K、E457G和N531G中的一个或多个的SEQ ID NO:5的CFI;包括包含取代N422K、E457G和N531G的SEQ ID NO:5的CFI;或包括包含取代T377G、E457G和N531G的SEQ ID NO:5的CFI。在一些实施方案中,结合

配偶体是CFI的辅因子,例如因子H(FH)或补体受体1(CR1)。在一些实施方案中,因子H结合配偶体包括SEQ ID NO.22或SEQ ID NO:23的氨基酸序列、其结构域或其结构域的一部分。在一些实施方案中,结合配偶体包括CR1、其结构域或其结构域的一部分。CFI-FH融合蛋白还可包含血清白蛋白,例如包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。CFI-CR1融合蛋白还可包含血清白蛋白,例如包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。在一些实施方案中,施用途径是玻璃体内。在一些实施方案中,眼部病症是干性年龄相关性黄斑变性(AMD)。在一些实施方案中,眼部病症是湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)。在一些实施方案中,眼部病症是地图状萎缩(GA)。在一些实施方案中,受试者表现出GA。在一些实施方案中,人类受试者携带CFI基因的一个或多个选自由以下组成的组的突变:G119R、L131R、V152M、G162D、R187Y、R187T、T203I、A240G、A258T、G287R、A300T、R317W、R339Q、V412M、P553S、K441R、R339Ter、R317Q、G261D、R187Q和R187Ter。在一些实施方案中,眼部病症是由受试者的CFI基因的一个或多个突变引起的,所述突变选自由以下组成的组:Phe13Val、Val20Ile、His40Arg、Cys43Phe、Asp44Asn、Pro50Ala、Cys54Arg、Cys54*、Ile55Phe、Pro64Leu、Asn70Thr、Thr72Ser、Phe82Ser、Pro83Gln、Ser90Asn、Cys106Arg、Thr107Ala、Glu109Ala、His118Arg、Gly119Arg、Gly125Arg、Val127Ala、Val129Gly、Leu131Arg、Met138Val、Met138Ile、Trp145*、Asn151Ser、Val152Met、Gly162Asp、Asp164Val、Asn177Ile、His183Arg、Val184Met、Arg187*、Arg187Gln、Gly188Ala、Phe198Leu、Arg202Ile、Thr203Ile、Tyr206Asn、Gln217His、Ser221Tyr、Asp224Asn、Cys229Arg、Val230Met、Val230Glu、Ala240Gly、Cys247Gly、Gly248Glu、Asp249Glu、Ala258Thr、Gly261Ser、Gly261Asp、Gly263Val、Lys267Asn、Gly280Asp、Gly287Arg、Glu290Asp、Ala300Thr、Glu303Lys、Glu305*、Ile306Val、Ile306Ser、Asp310Glu、Arg317Trp、Arg317Gln、Cys327Arg、Gly328Arg、Arg339*、Arg339Gln、Ile340Thr、Gly342Glu、Arg345Gln、Gly349Arg、Val355Met、Ala356Pro、Ile357Met、Gly362Ala、Tyr369Ser、Trp374Cys、Arg389His、Trp399Arg、Pro402Ser、Asp403Asn、Arg406Cys、Arg406His、Tyr411*、Val412Met、Ile416Leu、His418Leu、Gly424Asp、Asp429Glu、Ala431Thr、Ile433Val、Ile433Thr、Lys441Arg、Arg448Cys、Ala452Ser、Trp456Leu、Tyr459Ser、Gln462His、Cys467Arg、Arg474*、Arg474Gln、Asp477His、Gly487Cys、Ile492Leu、Gly500Arg、Arg502Cys、Gly512Ser、Asp519Asn、Lys522Thr、Asp524Val、Met532Val、Asn536Lys、Trp541*、Gly542Ser、Val543Ala、Trp546*、Glu548Gln、Pro553Ser、Glu554Val、Ser570Thr、Ile578Thr和Gln580*。在一些实施方案中,剂量为约0.1mg每只眼至约10mg每只眼。在一些实施方案中,剂量为约0.1mg每只眼、0.5mg每只眼、1mg每只眼、5mg每只眼或10mg每只眼。在一些实施方案中,频率为约每1个月。在一些实施方案中,频率为约每2个月、3个月或4个月。在一些实施方案中,将融合构建体施用于一只眼。在一些实施方案中,将融合构建体依次施用于双眼。在一些实施方案中,将融合构建体同时施用于双眼。在一些实施方案中,受试者的眼内压在治疗后是稳定的。在一些实施方案中,受试者的视网膜厚度在治疗后是稳定的。在一些实施方案中,融合构建体在受试者中所表现出的活性至少等同于血浆衍生的或天然存在的CFI蛋白所表现出的活性。

附图说明

[0008] 图1是描绘包含与CFI融合的血清白蛋白的示例性CFI-白蛋白(例如血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA))融合构建体的模型的图,其中CFI包括野生型CFI。

[0009] 图2A是示出在非洲绿猴(AGM)灵长类动物模型中玻璃体内注射(IVT)250μg或500μg剂量的包含野生型CFI和人血清白蛋白的融合构建体(CFI-HSA)后在来自玻璃体液的样品中检测到的C3a的量的图。

[0010] 图2B是示出在AGM灵长类动物模型中玻璃体内注射(IVT)1.0mg剂量的包含野生型CFI和人血清白蛋白的融合构建体(CFI-HSA)后在来自玻璃体液的样品中检测到的C3b/iC3b比率的图。

[0011] 图3A是描绘AGM中的玻璃体药代动力学(PK)的图。将包含CFI-HSA的构建体以0.25mg每只眼或1mg每只眼进行玻璃体内注射。随着时间的推移测量所注射的构建体的量。图3B是描绘基于针对AGM测量的PK的人体中的玻璃体PK建模的图。

[0012] 图4A是描绘在非人灵长类动物中通过裂隙灯获得的玻璃体内注射CFI-HSA的临床评分的图。图4B是描绘在玻璃体内注射CFI-HSA后在非人灵长类动物中随着时间的推移测量的眼内压的图。图4C是描绘在玻璃体内注射CFI-HSA后在非人灵长类动物中随着时间的推移测量的视网膜厚度的图。

具体实施方式

[0013] 本公开提供了包含CFI和结合配偶体(包括例如HSA、因子H或CR1)的融合构建体的剂量方案,其可用于调节眼部系统中的补体系统的信号传导和扩增。本公开还提供了制备和使用这些融合构建体的方法,例如用于治疗与补体失调相关的眼部疾病或病症,诸如干性年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD和地图状萎缩(GA)。

[0014] I.补体因子I融合构建体

[0015] 本文提供了补体因子I(CFI)融合构建体,此类融合构建体包含:

[0016] (a)野生型CFI或其变体,和

[0017] (b)结合配偶体。

[0018] 在一些实施方案中,结合配偶体包括血清白蛋白或其变体。在一些实施方案中,结合配偶体包括CFI的辅因子,例如因子H或CR1。

[0019] 在一些实施方案中,融合构建体包含:

[0020] (a)包含SEQ ID NO.5的氨基酸序列的补体因子I或其变体,和

[0021] (b)包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。

[0022] 在一些实施方案中,融合构建体包含:

[0023] (a)包含SEQ ID NO.5的氨基酸序列的补体因子I或其变体,

[0024] (b)包含SEQ ID NO.22或23的氨基酸序列的因子H辅因子或其结构域,以及

[0025] (c)任选的包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。

[0026] 在一些实施方案中,融合构建体包含:

[0027] (a)包含SEQ ID NO.5的氨基酸序列的补体因子I或其变体,

[0028] (b)CR1辅因子或其结构域,以及

[0029] (c)任选的包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列的血清白蛋白或其变体。

[0030] 如本文所用,野生型CFI是指任何天然存在的全长或几乎全长CFI,它是非致病的CFI,具有或不具有信号序列,并且可以是任何物种的。

[0031] 在一些实施方案中,野生型CFI是血浆衍生的。在一些实施方案中,野生型CFI是人野生型CFI。在一些实施方案中,具有信号序列的野生型人CFI包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列(如下表1中所示)。在一些实施方案中,野生型CFI是人CFI。在一些实施方案中,野生型人CFI不包含信号序列。在一些实施方案中,没有信号序列的野生型CFI包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列(如下表1中所示)。

[0032] 野生型CFI包含重链和轻链,它们也分别被称为A-链和B-链。图1描绘了示出这两条链的CFI的示意图。

[0033] 表1中提供了用作CFI融合构建体的组分的示例性基础分子。表1的基础分子用于产生本文公开的CFI融合构建体。表1的基础分子可以是融合构建体的另一部分,在下文进一步描述。

[0034] 本文提供了包含CFI的变体的融合构建体,所述变体包含相对于野生型CFI的一个或多个修饰,在本文中被称为“CFI变体”。如本文所用,相对于野生型CFI的“修饰”包括:一个或多个氨基酸残基的缺失、一个或多个结构域的缺失、一个或多个氨基酸残基的取代、一个或多个氨基酸残基的插入(即添加)、一个或多个结构域的插入(即添加)、一个或多个结构域的倒位和一个或多个结构域的取代。

[0035] CFI的变体可以包括对经典途径、凝集素途径和旁路途径中的一种或多种赋予额外的CFI活性的那些变体。在一些实施方案中,相对于野生型CFI的修饰包括以下中的任一者或多者:一个或多个氨基酸残基的缺失、一个或多个CFI结构域的缺失、一个或多个氨基酸残基的取代、一个或多个氨基酸残基的插入、一个或多个CFI结构域的插入和一个或多个CFI结构域的交换。PCT/US2021/037278和PCT/US2022/082179提供了CFI的变体,并且通过引用整体并入本文。

[0036] 在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的CFI的任一个或多个结构域:丝氨酸蛋白酶结构域(SPD)、因子I膜攻击复合物(FIMAC)结构域、SRCR结构域、低密度脂蛋白受体1(LDLr1)结构域和低密度脂蛋白受体2(LDLr2)结构域。

[0037] 在一些实施方案中,CFI变体包含与野生型人CFI相对应的至少一个修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含与野生型非人CFI相对应的至少一个修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含与野生型CFI相对应的至少一个修饰,该野生型CFI具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施方案中,CFI变体是包含来自人CFI的一个或多个结构域的嵌合体,并且其中人CFI还包含一个或多个氨基酸残基对来自非人物种CFI的对应区域的氨基酸残基的取代。在一些实施方案中,非人物种是小鼠。在一些实施方案中,CFI变体是嵌合体,并且其中修饰包括用来自非CFI丝氨酸蛋白酶的对应区域的氨基酸残基取代CFI的一个或多个氨基酸残基。在一些实施方案中,非CFI丝氨酸蛋白酶是胰蛋白酶。

[0039] 在一些实施方案中,CFI变体包含A链和B链,其中CFI变体在A链和B链的界面处包含一个或多个修饰。

[0040] 在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置K14、Y20、D26、F29、R35、E38、M220、K221、S250、L304、P305、K306、L307和S308相对应的

任一个或多个位置处包含修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的一个或多个取代:K14A、Y20A、Y20F、D26A、F29A、R35A、E38A、M220A、K221Q、S250A、S250L、L304G、P305G、K306G、L307G和S308G,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。在一些实施方案中,CFI变体包含取代M220A;K221Q和L304G;P305G;K306G;L307G;S308G的组合中的一个或多个;其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0041] 在一些实施方案中,CFI变体在CFI变体的C末端区域包含一个或多个修饰。在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置T377、W381、P384、Y403、A405、G406、Y408、Q409、D425、G556、R557、P558、P559、I560和Y563相对应的任一个或多个位置处包含修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的一个或多个取代:T377G、W381A、P384A、P384G、Y403F、A405S、G406R、G406A、Y408L、Q409D、Q409H、D425A、D425K、D425R、G556A、G556S、R557A、R557K、P558G、P558L、P558S、F559L、I560V和Y563H和/或P384的缺失,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0042] 在一些实施方案中,CFI变体在CFI的一个或多个N-连接的糖基化位点处包含一个或多个修饰。在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置N52、N85、N159、N446、N476和N518相对应的任一个或多个位置处包含修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的一个或多个取代:N52Q、N85Q、N159Q、N446Q、N476Q和N518Q,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的取代的组合中的一个或多个:N52Q;N85Q;N159Q、N446Q;N476Q;N518Q;其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0043] 在一些实施方案中,CFI变体在CFI的SPD结构域中包含一个或多个修饰。在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置K14、K312、R314、I322、V323、K326、R327、A328、K340、D341、G344、I345、T346、A361、L364、Y372、W381、P384、V390、N402、N404、G406、Y408、Q409、E416、K418、N422、D425、E457、K458、R456、E461、R462、F464、S465、Q467、W468、G469、T495、Y496、D497、S499、I500、A502、K504、D506、S507、E530、N531、E530、N531、G533、K534、P535、E536和F537相对应的任一个或多个位置处包含修饰。

[0044] 在一些实施方案中,CFI变体包含CFI的自溶环对胰蛋白酶的自溶环的取代,其中自溶环出现在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置456和位置465相对应的位置之间。

[0045] 在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的一个或多个取代:K14A、K312A、R314A、I322T、I322Y、I322V、V323I、V323G、V323A、K326A、R327A、R327P、R327N、A328C、K340G、D341A、G344R、G344K、G344Y、I345G、T346R、T346K、T346H、A361G、L364G、Y372G、W381K、W381G、P384A、P384G、V390G、N402E、N404G、G406D、G406E、G406F、G406H、G406I、G406K、G406L、G406M、G406N、G406P、G406Q、G406S、G406T、G406V、G406W、G406Y、Y408L、Y408F、Y408G、Y408P、Y408D、Y408A、Y408N、Y408T、Y408K、Y408R、Y408H、Y408I、Y408E、Y408M、Y408Q、Y408S、Y408W、Y408V、Q409G、E416A、K418G、N422K、D425A、D425K、D425R、D425G、R456A、R456N、E457G、E457A、E457D、E457F、E457H、E457I、E457K、E457L、E457M、

E457N、E457P、E457Q、E457R、E457S、E457T、E457W、E457Y、E457V、K458A、E461Q、E461K、E461R、E461H、E461G、E461A、E461D、E461F、E461I、E461L E461M、E461N、E461P、E461S、E461T、E461W、E461Y、E461V、R462K、R462A、R462D、F464Y、S465G、Q467K、Q467R、W468C、G469L、T495F、Y496L、D497E、S499G、I500K、A502S、K504Q、K504E、K504R、K504A、K504G、K504L、K504P、K504H、K504D、K504F、K504I、K504M、K504N、K504S、K504T、K504V、K504W、K504Y、D506A、D506V、D506E、D506G、S507A、E530D、E530G、E530F、E530Y、N531G、N531A、E530D、E530G、E530F、E530Y、E530R、E530K、N531D、N531E、N531F、N531H、N531I、N531K、N531L、N531M、N531P、N531Q、N531R、N531S、N531T、N531V、N531W、N531Y、G533A、K534Q、P535A、P535K、E536N、E536A、F537K和F537R,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0046] 在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下组合取代中的一个或多个:K326A;R327A、N531G;P535A、E457G;E461Q;R462K;F464Y、Y408L;N531G;E457G、Y408L;N531G;E457G;E461Q、Y408L;N531G;E457G;E461Q-R462K;F464Y、Y408L;N531G;P535A、K14A;D425R、E530D;N531G;G533A;K534Q;P535K;E536N、A502S;K504Q;F537K、T495F;Y496L;D497E;S499G;I500K、G533A;K534Q;P535K;E536N;F537K、T495F;Y496L;D497E;S499G;I500K;G533A;K534Q;P535K;E536N;F537K、Q467K;F537K、E530G;N531G、E530D;F537K、E457G;E461Q、E457G;E461G、Y408L;N531G;E457G;E461Q、N531G;E457G;E461Q、I322V;V323I、I322V;V323I;R327P、A328C;W468C、A328C;W468C;K326Y;R327N、Y408L;N531G;E461Q、Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K、Y408L;N531G;E457G;E461Q;F464Y、Y408L;N531G;E457G;R462K;F464Y、Y408L;N531G;E461Q;R462K;F464Y、Y408L;E457G;E461Q;R462K;F464Y、E457G;N531G;E461Q;R462K;F464Y、Y408L;E457G;E461Q;R462K、N531G;E457G;E461Q;F464Y、E416A;D425R、Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y;S507A、E457G;E461G、K312A;R314A、G469L;R456N;E457T;K458A、G469L;R456N;K458A、G469L;R456N;K458A;E461G、G469L;R456N;K458A;E461G;F537K、G406D;Y408L、G406D;N531G、G406D;P535A、G406D;Y408L;N531G、G406D;Y408L;P535A、G406D;N531G;P535A、G406D;Y408L;N531G;P535A、K340G;I345G、L364G;Y372G、W381G;V390G、W381G;P384A;V390G、W381G;P384G;V390G、N404G;Q409G、K418G;D425G、T346R;K504E;E530R、T346K;K504D;E530K、G344R;Y408L;N531G、G344K;Y408L;N531G、T346R;Y408L;N531G、T346K;Y408L;N531G、K504D;Y408L;N531G、K504E;Y408L;N531G、Y408L;E530R;N531G、Y408L;E530K;N531G、T346R;Y408L;K504E;E530R;N531G、T346K;Y408L;K504D;E530K;N531G、Y408L;S507A;N531G、Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y;S507A、E457G;S507A和N531G;P535A;S507A;其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0047] 在一些实施方案中,CFI变体在CFI的活性位点处包含一个或多个修饰。在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置S507相对应的位置处包含修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含取代S507A,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置S507相对应。

[0048] 在一些实施方案中,CFI变体包含A链和B链,其中CFI变体包含从N末端到C末端为(A链)-(任选的接头)-(B链)的结构排列。在一些实施方案中,CFI变体包含A链和B链,其中CFI变体包含从N末端到C末端为(B链)-(任选的接头)-(A链)的结构排列。在一些实施方案

中,CFI变体在C309和C435中的一个或多个处包含修饰,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0049] 在一些实施方案中,CFI变体包含取代C309S;C435S,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。在一些实施方案中,B链和A链进一步通过二硫键连接。

[0050] 在一些实施方案中,与野生型CFI相比,CFI变体更易活化。在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置I317、R318、R319、K320和R321相对应的任一个或多个位置处包含修饰。在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的一个或多个取代:I317D、R318D、R319D、K320D和R321K,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0051] 在一些实施方案中,CFI变体包含取代I317D、R318D、R319D、K320D和R321K,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0052] 在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的取代的组合中的一个或多个:Y408;N531G、E38A;D425R、Y20F;D425R、S250A;D425R、Y408F;N531G、Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、K14A;Y20F、K14A;E38A、K14A;S250A、K14A;D425A、Y20F;E38A、Y20F;S250A、Y20F;D425A、E38A;S250A、E38A;D425A、S250A;D425A、K14A;N531G;P535A、Y20F;N531G;P535A、E38A;N531G;P535A、S250A;N531G;P535A、D425A;N531G;P535A、Y20F;Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、E38A;Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、S250A;Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、D425R;Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、Y20F;E38A;S250A;D425A、Y20F;E38A;S250A;D425A;Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、Y20F;E38A;S250A;D425A;Y408L;N531G;E457G;E461Q、I317D;R318D;R319D;K320D;R321K;E457G;E461Q-R462K;F464Y、I317D;R318D;R319D;K320D;R321K;E457G;E461Q-R462K;F464Y、I317D;R318D;R319D;K320D;R321K;Y408L;N531G;E457G;E461Q;R462K;F464Y、K504D;Y408L;N531G、K504E;Y408L;N531G、E457G;N531G;D425K、Y408F;N531G、Y408L;E457G;N531G;D425K、Y408L;E457G;P535G;D425K、Y408L;E457G;N531G;K534Q、Y408L;N531G、R462K;F464Y和Y408L;P535G;D425K,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0053] 在一些实施方案中,CFI变体在与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置K14、K312、R314、I322、V323、K326、R327、A328、T377、K340、D341、G344、I345、T346、A361、L364、Y372、W381、P384、V390、N402、N404、G406、Y408、Q409、E416、K418、N422、D425、E457、K458、R456、E461、R462、F464、S465、Q467、W468、G469、T495、Y496、D497、S499、I500、A502、K504、D506、S507、E530、N531、E530、N531、G533、K534、P535、E536和F537相对应的任一个或多个位置处包含修饰或由其组成。

[0054] 在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的任一个或多个取代或由其组成:K14A、K312A、R314A、I322T、I322Y、I322V、V323I、V323G、V323A、K326A、R327A、R327P、R327N、A328C、T377G、K340G、D341A、G344R、G344K、G344Y、I345G、T346R、T346K、T346H、A361G、L364G、Y372G、W381K、W381G、P384A、P384G、V390G、N402E、N404G、G406D、G406E、G406F、G406H、G406I、G406K、G406L、G406M、G406N、G406P、G406Q、G406S、G406T、G406V、G406W、G406Y、Y408L、Y408F、Y408G、Y408P、Y408D、Y408A、Y408N、Y408T、Y408K、Y408R、Y408H、

Y408I、Y408E、Y408M、Y408Q、Y408S、Y408W、Y408Y、Y408V、Q409G、E416A、K418G、N422K、D425A、D425K、D425R、D425G、R456A、R456N、E457G、E457A、E457D、E457F、E457H、E457I、E457K、E457L、E457M、E457N、E457P、E457Q、E457R、E457S、E457T、E457W、E457Y、E457V、K458A、E461Q、E461K、E461R、E461H、E461G、E461A、E461D、E461F、E461I、E461L E461M、E461N、E461P、E461S、E461T、E461W、E461Y、E461V、R462K、R462A、R462D、F464Y、S465G、Q467K、Q467R、W468C、G469L、T495F、Y496L、D497E、S499G、I500K、A502S、K504Q、K504E、K504R、K504A、K504G、K504L、K504P、K504H、K504D、K504F、K504I、K504M、K504N、K504S、K504T、K504V、K504W、K504Y、D506A、D506V、D506E、D506G、S507A、E530D、E530G、E530F、E530Y、N531G、N531A、E530D、E530G、E530F、E530Y、E530R、E530K、N531D、N531E、N531F、N531H、N531I、N531K、N531L、N531M、N531P、N531Q、N531R、N531S、N531T、N531V、N531W、N531Y、G533A、K534Q、P535A、P535K、E536N、E536A、F537K和F537R,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。

[0055] 在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的组合取代中的任一个或多个或由其组成:N422K+E457G+N531G、T377G+E457G+N531G、K326A+327A R327A、E457G+N531G、N531G+P535A、E457G+E461Q+R462K+F464Y、Y408L+N531G+E457G、Y408L+N531G+E457G+E461Q、Y408L+N531G+E457G+E461Q-R462K+F464Y、Y408L+N531G+P535A、K14A+D425R、E530D+N531G+G533A+K534Q+P535K+E536N、A502S+K504Q+F537K、T495F+Y496L+D497E+S499G+I500K、G533A+K534Q+P535K+E536N+F537K、T495F+Y496L+D497E+S499G+I500K+G533A+K534Q+P535K+E536N+F537K、Q467K+F537K、E530G+N531G、E530D+F537K、E457G+E461Q、E457G+E461G、Y408L+N531G+E457G+E461Q、N531G+E457G+E461Q、I322V+V323I、I322V+V323I+R327P、A328C+W468C、A328C+W468C+K326Y+R327N、Y408L+N531G+E461Q、Y408L+N531G+E457G+E461Q+R462K、Y408L+N531G+E457G+E461Q+F464Y、Y408L+N531G+E457G+R462K+F464Y、Y408L+N531G+E461Q+R462K+F464Y、Y408L+E457G+E461Q+R462K+F464Y、E457G+N531G+E461Q+R462K+F464Y、Y408L+E457G+E461Q+R462K、N531G+E457G+E461Q+F464Y、E416A+D425R、Y408L+N531G+E457G+E461Q+R462K+F464Y+S507A、E457G+E461G、K312A+R314A、G469L+R456N+E457T+K458A、G469L+R456N+K458A、G469L+R456N+K458A+E461G、G469L+R456N+K458A+E461G+F537K、G406D+Y408L、G406D+N531G、G406D+P535A、G406D+Y408L+N531G、G406D+Y408L+P535A、G406D+N531G+P535A、G406D+Y408L+N531G+P535A、K340G+I345G、L364G+Y372G、W381G+V390G、W381G+P384A+V390G、W381G+P384G+V390G、N404G+Q409G、K418G+D425G、T346R+K504E+E530R、T346K+K504D+E530K、G344R+Y408L+N531G、G344K+Y408L+N531G、T346R+Y408L+N531G、T346K+Y408L+N531G、K504D+Y408L+N531G、K504E+Y408L+N531G、Y408L+E530R+N531G、Y408L+E530K+N531G、T346R+Y408L+K504E+E530R+N531G、T346K+Y408L+K504D+E530K+N531G、Y408L+S507A+N531G、Y408L+N531G+E457G+E461Q+R462K+F464Y+S507A、E457G+S507A和N531G+P535A+S507A,其中所述位置与具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CFI中的位置相对应。例如,在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的取代或由其组成:N422K+E457G+N531G。例如,在一些实施方案中,CFI变体包含选自以下的取代或由其组成:T377G+E457G+N531G。

[0056] 在一些实施方案中,融合构建体包含CFI和白蛋白,并且白蛋白是人血清白蛋白(HSA),并且CFI是野生型CFI,并且此类融合构建体在本文中被称为“CFI-HSA”。本公开的示

例性CFI-HSA具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.21的氨基酸序列具有至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的序列。

[0057] 在一些实施方案中,融合构建体的CFI包含SEQ ID NO.5的氨基酸序列或其变体。在一些实施方案中,变体与SEQ ID NO.5的氨基酸序列具有至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0058] 在一些实施方案中,融合构建体的血清白蛋白包含SEQ ID NO.7的氨基酸序列或其变体。在一些实施方案中,变体与SEQ ID NO.7的氨基酸序列具有至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0059] 在一些实施方案中,融合构建体中的CFI的结合配偶体包括补体受体1(CR1)的至少一个结构域或结构域的一部分。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1的CCP结构域15-17。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1的CCP结构域1-3。在一些实施方案中,包含至少一个CR1结构域的本公开的融合构建体还包括与白蛋白的融合体。在一些实施方案中,包含至少一个CR1结构域和/或因子H的至少一个结构域的本公开的融合构建体还包括与白蛋白的融合体。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1 CCP结构域15。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1 CCP结构域16。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1 CCP结构域17。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1 CCP结构域15-16。在一些实施方案中,所述至少一个CR1结构域包括CR1 CCP结构域16-17。在一些实施方案中,示例性融合构建体包含与CR1的CCP结构域15-17融合的具有修饰N531G的CFI。在一些实施方案中,示例性融合构建体包含与CR1的CCP结构域融合的CFI,并且进一步与白蛋白融合。

[0060] 在一些实施方案中,融合构建体中的CFI的结合配偶体包括因子H的至少一个结构域或结构域的一部分。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域包括因子H的补体控制蛋白(CCP)结构域1-20中的任一个或多个。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域的氨基酸序列是或衍生自SEQ ID NO:22(表1)所示的序列。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域包括因子H的CCP结构域1-20中的每一个。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域包括CCP1、CCP2、CCP3和CCP4。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域包括CCP2、CCP3和CCP4。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域包括CCP2和CCP3。在一些实施方案中,因子H的至少一个结构域的氨基酸序列是或衍生自SEQ ID NO:23(表1)所示的序列。在一些实施方案中,所述至少一个因子H结构域包括因子H的CCP结构域1-4和19-20。在一些实施方案中,示例性融合构建体包含与FH的CCP结构域融合的CFI,并且进一

步与白蛋白融合。

[0061] 本公开的示例性CFI-HSA融合构建体包括,如N末端至C末端所示:

[0062] (a)N末端HSA-GGSSGG接头(SEQ ID NO:6)-包含取代N422K、E457G和N531G的CFI SEQ ID NO:5。

[0063] (b)N末端HSA-GGSSGG接头(SEQ ID NO:6)-包含取代T377G、E457G和N531G的CFI SEQ ID NO:5。

[0064] 本公开的示例性含CR1融合构建体包括HSA、CFI和人CR1结构域。此类融合构建体的示例是:

[0065] (a)N末端HSA-GGSSGG接头(SEQ ID NO:6)-包含取代N422K、E457G和N531G的CFI SEQ ID NO:5-

[0066] GGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGG接头(SEQ ID NO:24)-人CR1结构域CCP15、CCP16和CCP17。

[0067] 本公开的融合构建体的组分(CFI和结合配偶体)可以通过任选的接头保持在一起。它们可具有至少一个氨基酸的任何合适的长度。接头可以是柔性接头,并且可以是长度为约1至约20个氨基酸残基的肽,其中氨基酸残基可包括甘氨酸残基。接头还可任选地包含丝氨酸残基。示例性柔性接头可包括但不限于甘氨酸聚合物、甘氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物或本领域已知的任何其他合适的柔性接头。示例性接头是$(GGSS)^{n}GG$(SEQ ID NO:25),其中n是约1至约25的任何数。在一些实施方案中,接头是蛋白酶敏感性可切割接头。连接融合构建体的示例性接头的长度可为1-50、5-50、10-50、15-50、20-22、22-24、20-50、25-50、1-20、2-20、3-20、4-20、5-20、6-20、7-20、8-20、9-20、10-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、4-15、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-15、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-15、6-10、6-9、6-8或6-7个氨基酸。

[0068] 在一些实施方案中,相对于不是融合构建体的一部分的CFI,CFI-HSA可以具有延长的半衰期。示例性CFI-HSA构建体可通过用柔性接头将白蛋白与野生型CFI连接而产生。在一些实施方案中,CFI-HSA包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或包含与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的序列。

[0069] 在一些实施方案中,融合构建体包含从N末端至C末端为(白蛋白)-(任选的接头)-(WT CFI)的结构排列。

[0070] 在一些实施方案中,融合构建体包含从N末端至C末端为(WT CFI)-(任选的接头)-(白蛋白)的结构排列。

[0071] 在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或其与SEQ ID NO:5具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的变体,其中融合构建体包含从N末端至C末端为(SEQ ID NO:7)-(任选的接头)-(SEQ ID NO:5)的结构排列。在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中融合构建体包含从N末端至C末端为(SEQ ID NO:7)-(接头)-(SEQ ID NO:5)的结构排列。在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中融合构建体包含从N末端至C末端为(SEQ ID NO:7)-(SEQ ID NO:6)-(SEQ ID NO:5)的结构排列。在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中融合构建体包含从N末端至C末端为(SEQ ID NO:

5)-(任选的接头)-(SEQ ID NO:7)的结构排列。在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中融合构建体包含从N末端至C末端为(SEQ ID NO:5)-(接头)-(SEQ ID NO:7)的结构排列。在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中融合构建体包含从N末端至C末端为(SEQ ID NO:5)-(SEQ ID NO:6)-(SEQ ID NO:7)的结构排列。

[0072] 在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或与其具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,融合构建体由SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,融合构建体包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,注意到白蛋白与野生型CFI的融合(例如N末端白蛋白融合)提供可溶性并促进CFI-HSA的活化。当用弗林蛋白酶将CFI活化为成熟双链蛋白在翻译后进行并且在CFI-HSA与不含白蛋白的野生型CFI(WT-CFI)之间进行活化的比较时,观察到弗林蛋白酶显著更好地并且几乎完全地活化CFI-HSA。观察到CFI-HSA蛋白保持为单体,没有聚集体的证据。氨基末端HSA融合对于维持CFI-HSA构建体的可溶性、单分散性和有效的弗林蛋白酶活化具有显著和意想不到的益处。通过例如改善的半衰期,存在生物利用度的显著改善。

[0073] 因此,本文提供了增加CFI活化的方法,该方法包括将HSA与野生型CFI融合,其中融合是用弗林蛋白酶活化之前的N末端融合;以及用弗林蛋白酶活化。在一些实施方案中,在重组产生本公开的CFI融合构建体期间,在细胞中进行使用弗林蛋白酶的活化。在一些实施方案中,用弗林蛋白酶活化在体外进行。

[0074] 转向表1,SEQ ID NO:1是野生型血浆衍生的人CFI(称为“CFI-PD”)的氨基酸序列,并具有前导序列。用于与第二组分融合的野生型CFI可包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,其不包含SEQ ID NO:1中存在的前导序列。小鼠Igκ链V-III区MOPC 63前导序列(SEQ ID NO:2)反而可用于重组产生本文提供的CFI融合构建体中的任一种。在一些实施方案中,本文提供了包含至少一个CFI结构域的CFI融合构建体,其中所述至少一个CFI结构域包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

[0075] 表1:示例性CFI融合构建体的组分

[0076]

描述	序列
野生型血浆衍生的人 CFI（CFI-PD）	MKLLHVFLLFLCFHLRFCKVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDK VFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKS LECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQD KTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLSINSTEC LHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDD FFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDQSDELCCKACQGKGFHCKSG VCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAER RRIKSLLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDAS GITCGGIYIGGCWILTAAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRI VIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACV PWSPYLFQPNDTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFY GNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWG VVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV（SEQ ID NO: 1）
前导序列（小鼠 CFI-HSA 的前导序列）	METDTLLLWVLLLWVPGSTG（SEQ ID NO: 2）
人 CFI 前导序列	MKLLHVFLLFLCFHLRFC（SEQ ID NO: 3）
无信号序列的野生型 SEQ ID NO 1 的 CFI	KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKL PYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTA EGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREANVA CLDLGFQQGADTQRRFKLSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTFT KRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKACD GINDCGDQSDELCCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGE DEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRM HIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAA HCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGT YQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDTCIVSG WGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYD GSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV（SEQ ID NO: 5）
接头	GGSSGG（SEQ ID NO: 6）

[0077]

描述	序列
人血清白蛋白（HSA）	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL （SEQ ID NO: 7）
与 CFI 连接的 HSA（CFI-HSA）	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSS GGKVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVC KLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTC TAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREAN VACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECT FTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKAC DGINDCGDQSDELCCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCIT GEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNR MHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAG TYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDTCIVS GWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTY DGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPG VYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV（SEQ ID NO: 21）

[0078]

描述	序列
人因子 H（FH）	MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGT QAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDT PFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTN DIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGY KIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKEN ERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNG DYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCT LKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYYCDEHFETPSG SYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGK SIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIEN GFISESQYTYALKEKAKYQCKLGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQ PTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHDGYESNTGSTT GSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGEVL KFSCKPGFTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSCGPPPELLNGN VKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCI VEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSIT CIHGVWTQLPQCVAIDKLKKCKSSNLIILEEHLKNKKEFDHNSNIRY RCRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTT TLNYRDGEKVSVLCQENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQ PPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEENETTCYMGK WSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVTYKCFEGFGI DGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKDVYKAG EQVTYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVNPPTVQN AYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPP QCKDSTGKCGPPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQLEGN KRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRT GESVEFVCKRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR (SEQ ID NO: 22)
人微小因子 H（微小 FH）	MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGT QAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDT PFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTN DIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGY KIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKEN ERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEAGGGGGGGGG GGGGKCGPPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQLEGNKRI TCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGES VEFVCKRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKRENLYFQGHHH HHH (SEQ ID NO: 23)

[0079] II.CFI融合构建体的产生

[0080] 可开发细胞系以表达本文所述的CFI融合构建体的产生。用于产生融合构建体的细胞系可使用能够表达本文所述的融合构建体的任何宿主细胞来产生。宿主细胞可以是哺乳动物细胞、昆虫细胞、真菌细胞、植物细胞和/或细菌细胞。为了表达CFI融合构建体，可用编码融合构建体的表达载体瞬时或稳定转染或转导宿主细胞系。载体可以是例如质粒或病毒载体。在一些实施方案中，宿主细胞系是哺乳动物细胞系。在一些实施方案中，宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0081] 本文所述的CFI融合构建体可在本领域已知的用于产生生物制品的哺乳动物细胞系(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中重组地表达。可使用本领域已知的任何方法，用编码本文所述的融合构建体的表达载体转染或转导哺乳动物细胞。

[0082] 本文提供了用于产生和纯化本文所述的CFI融合构建体的方法。本文所述的CFI融合构建体可通过本领域已知的标准方法从条件培养基中纯化。在一些实施方案中,CFI融合构建体可通过在亲和基质上层析来纯化。在一些实施方案中,亲和基质是CaptureSelect™人白蛋白亲和基质。在一些实施方案中,CFI融合构建体可通过在阳离子和/或阴离子交换基质上层析以及任选的尺寸排阻色谱法来纯化。CFI融合构建体可最佳地被缓冲液置换到本领域已知的任何合适的缓冲液中。纯度可通过本领域已知的任何方法(包括凝胶电泳、正交HPLC方法、染色和分光光度技术)评估。

[0083] III.CFI融合构建体-使用方法

[0084] A.用途

[0085] 本公开的CFI融合构建体可以用于调节眼中的补体系统。

[0086] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够调节眼中的经典和凝集素补体途径。

[0087] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够调节眼中的旁路补体途径。

[0088] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够降低眼中的补体系统的扩增。

[0089] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中C3b的切割。

[0090] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中C4b的切割。

[0091] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中C4c的产生。

[0092] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中iC3b的产生。

[0093] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中从iC3b产生C3dg。

[0094] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中从iC3b产生C3c。

[0095] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够降低眼中C3bα-链的水平。

[0096] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中肽底物的水解。

[0097] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够增加眼中大分子蛋白质底物的蛋白水解。

[0098] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够降低眼中膜攻击复合物(MAC)的水平或功能。

[0099] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够减少眼中所观察到的溶血。

[0100] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够在眼中不存在

辅因子的情况下例如以不依赖于辅因子的方式增加C3b的切割。

[0101] 如本文所讨论的,在一些实施方案中,本公开的CFI融合构建体能够在眼中不存在辅因子的情况下例如以不依赖于辅因子的方式增加C4b的切割。

[0102] 本公开的CFI融合构建体可以用于受试者的眼部疗法。如本文所用,受试者包括任何哺乳动物受试者,并且包括灵长类动物、啮齿类动物、家畜、动物园动物和宠物。在一些实施方案中,哺乳动物受试者是人类受试者。在一些实施方案中,哺乳动物受试者是非人灵长类动物。

[0103] B.眼部病症的治疗

[0104] 本文提供的CFI融合构建体可用于治疗受试者的眼部病症。在一些实施方案中,本文提供了一种治疗有需要的受试者的眼部病症的方法,该方法包括以约0.1mg每只眼至约10mg每只眼的剂量和/或以约每1个月至约4个月的频率向受试者眼内施用治疗有效量的本文提供的任何CFI融合构建体或其药物组合物。

[0105] 在一些实施方案中,眼部病症的特征在于CFI的缺乏。在一些实施方案中,眼部病症的特征在于补体系统的失调。

[0106] 在一些实施方案中,眼部病症的特征在于存在功能失调CFI基因。在一些实施方案中,眼部病症的特征在于补体系统的失调和低CFI水平。

[0107] 在一些实施方案中,眼部病症选自由以下组成的组:糖尿病性黄斑水肿(DME)、糖尿病性视网膜病变、青光眼、角膜结膜炎、视神经脊髓炎谱系障碍(NMOSD)、开角型青光眼、息肉状脉络膜血管病变、Stargardt病、眼色素层炎和玻璃体视网膜病变以及年龄相关性黄斑变性(AMD)。

[0108] 在一些实施方案中,眼部病症是干性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是早期干性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是中期干性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是晚期干性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是已进展为湿性AMD的晚期干性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是已进展为地图状萎缩(GA)的晚期干性AMD。

[0109] 在一些实施方案中,眼部病症是湿性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是早期湿性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是中期湿性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是晚期湿性AMD。在一些实施方案中,眼部病症是已进展为新生血管性AMD的晚期湿性AMD。

[0110] 在一些实施方案中,眼部病症是地图状萎缩(GA)。在一些实施方案中,眼部病症是从干性AMD进展而来的GA。在一些实施方案中,GA与晚期AMD相关。在一些实施方案中,GA与晚期AMD不相关。

[0111] 在一些实施方案中,眼部病症是由受试者的CFI基因的一个或多个突变引起的,所述突变选自由以下组成的组:G119R、L131R、V152M、G162D、R187Y、R187T、T203I、A240G、A258T、G287R、A300T、R317W、R339Q、V412M、P553S、K441R、R339Ter、R317Q、G261D、R187Q和R187Ter。

[0112] 在一些实施方案中,眼部病症是由受试者的CFI基因的一个或多个突变引起的,所述突变选自由以下组成的组:Phe13Val、Val20Ile、His40Arg、Cys43Phe、Asp44Asn、Pro50Ala、Cys54Arg、Cys54*、Ile55Phe、Pro64Leu、Asn70Thr、Thr72Ser、Phe82Ser、Pro83Gln、Ser90Asn、Cys106Arg、Thr107Ala、Glu109Ala、His118Arg、Gly119Arg、Gly125Arg、Val127Ala、Val129Gly、Leu131Arg、Met138Val、Met138Ile、Trp145*、

Asn151Ser、Val152Met、Gly162Asp、Asp164Val、Asn177Ile、His183Arg、Val184Met、Arg187*、Arg187Gln、Gly188Ala、Phe198Leu、Arg202Ile、Thr203Ile、Tyr206Asn、Gln217His、Ser221Tyr、Asp224Asn、Cys229Arg、Val230Met、Val230Glu、Ala240Gly、Cys247Gly、Gly248Glu、Asp249Glu、Ala258Thr、Gly261Ser、Gly261Asp、Gly263Val、Lys267Asn、Gly280Asp、Gly287Arg、Glu290Asp、Ala300Thr、Glu303Lys、Glu305*、Ile306Val、Ile306Ser、Asp310Glu、Arg317Trp、Arg317Gln、Cys327Arg、Gly328Arg、Arg339*、Arg339Gln、Ile340Thr、Gly342Glu、Arg345Gln、Gly349Arg、Val355Met、Ala356Pro、Ile357Met、Gly362Ala、Tyr369Ser、Trp374Cys、Arg389His、Trp399Arg、Pro402Ser、Asp403Asn、Arg406Cys、Arg406His、Tyr411*、Val412Met、Ile416Leu、His418Leu、Gly424Asp、Asp429Glu、Ala431Thr、Ile433Val、Ile433Thr、Lys441Arg、Arg448Cys、Ala452Ser、Trp456Leu、Tyr459Ser、Gln462His、Cys467Arg、Arg474*、Arg474Gln、Asp477His、Gly487Cys、Ile492Leu、Gly500Arg、Arg502Cys、Gly512Ser、Asp519Asn、Lys522Thr、Asp524Val、Met532Val、Asn536Lys、Trp541*、Gly542Ser、Val543Ala、Trp546*、Glu548Gln、Pro553Ser、Glu554Val、Ser570Thr、Ile578Thr和Gln580*。

[0113] 在一些实施方案中,眼部病症是由患有GA的受试者的一组突变中的一个或多个引起的,该组突变由以下组成:C2、CFB、CFH和C3突变。

[0114] C.组合疗法

[0115] 本文提供的治疗性CFI融合构建体中的任一者的施用可以是单一疗法,或者可与任何其他已知的药物或治疗组合。其他已知的药物或治疗可用于与补体系统的失调相关的病症,或者可与CFI缺乏症相关。

[0116] D.施用

[0117] 本文所述的CFI融合构建体作为基于多肽的疗法被递送至眼。

[0118] 如本文所设想的此类治疗包括将本公开的CFI融合构建体施用于眼。因此,本文提供了包含本公开的CFI融合构建体的药物组合物。

[0119] 本文所述的治疗性CFI融合构建体的眼部施用可以是眼眶内、眼周、眼内、玻璃体内或视网膜下。可以用任何合适的赋形剂、载剂或其他剂进行融合构建体的施用,以提供合适的或改善的耐受性、转移、递送等。在示例性实施方案中,本文所述的CFI融合构建体的施用是玻璃体内施用。

[0120] 在一些实施方案中,CFI融合构建体可以表达为非活性单链前体蛋白,并且通过弗林蛋白酶(一种丝氨酸蛋白酶)活化。弗林蛋白酶是内切蛋白酶,其在保守的RRKR序列(也被称为弗林蛋白酶识别序列)处切割CFI,产生通过二硫键连接的重链和轻链。弗林蛋白酶加工的成熟双链蛋白是CFI蛋白的活化形式。如本文一般设想的,本文所述的CFI融合构建体以活化的双链形式递送。然而,在一些情况下,非活性CFI融合构建体可以非活性单链形式递送。在一些实施方案中,所递送的形式包括单链非活性形式和双链活性形式两者。

[0121] E.给药

[0122] 在本文提供的实施方案中,将本文所述的CFI融合构建体以约0.1mg每只眼至约10mg每只眼的剂量和/或以约每4周至16周的频率施用于有需要的受试者的一只眼或双眼。

[0123] 预期本公开的最佳剂量范围和频率在CFI融合构建体的眼部注射后10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、

140、145或150天内维持高于患有眼部疾病(例如,AMD)的受试者中的水平的基线CFI水平。

[0124] 在一些实施方案中,在眼内施用融合CFI构建体后,患有眼部疾病的受试者的基线CFI水平保持高于未接受注射的患有相同眼部疾病的参考受试者的基线CFI水平。在一些实施方案中,此类CFI水平在CFI-HSA注射后保持至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145或150天。

[0125] 在一些实施方案中,将本文所述的CFI融合构建体以约0.1mg每只眼至约10mg每只眼的剂量和约每4周至16周的频率施用于有需要的受试者的眼。

[0126] 在一些实施方案中,将CFI融合构建体施用于一只眼。在一些实施方案中,将CFI融合构建体施用于双眼。在一些实施方案中,将CFI融合构建体同时施用于双眼。在一些实施方案中,将CFI融合构建体依次施用于双眼。

[0127] 本文所述的CFI融合构建体的示例性剂量为约0.1mg每只眼至约10mg每只眼。在一些实施方案中,本文所述的CFI融合构建体的剂量为约0.5mg每只眼至约10mg每只眼、约1mg每只眼至约10mg每只眼、约1.5mg每只眼至约10mg每只眼、约2mg每只眼至约10mg每只眼、约2.5mg每只眼至约10mg每只眼、约3mg每只眼至约10mg每只眼、约3.5mg每只眼至约10mg每只眼、约4mg每只眼至约10mg每只眼、约4.5mg每只眼至约10mg每只眼、约5mg每只眼至约10mg每只眼、约5.5mg每只眼至约10mg每只眼、约6mg每只眼至约10mg每只眼、约6.5mg每只眼至约10mg每只眼、约7mg每只眼至约10mg每只眼、约7.5mg每只眼至约10mg每只眼、约8mg每只眼至约10mg每只眼、约8.5mg每只眼至约10mg每只眼、约9mg每只眼至约10mg每只眼或约9.5mg每只眼至约10mg每只眼。

[0128] 在一些实施方案中,本文所述的CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼。

[0129] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用频率为约每4周至约每16周。在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是玻璃体内施用,并且为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0130] 在一些实施方案中,本文所述的治疗性CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每4周。

[0131] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每5周。

[0132] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约

0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每6周。

[0133] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每7周。

[0134] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每8周。

[0135] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每9周。

[0136] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每10周。

[0137] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每11周。

[0138] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每12周。

[0139] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每13周。

[0140] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每14周。

[0141] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每15周。

[0142] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼、约0.5mg每只眼、约1mg每只眼、约1.5mg每只眼、约2mg每只眼、约2.5mg每只眼、约3mg每只眼、约3.5mg每只眼、约4mg每只眼、约4.5mg每只眼、约5mg每只眼、约5.5mg每只眼、约6mg每只眼、约6.5mg每只眼、约7mg每只眼、约7.5mg每只眼、约8mg每只眼、约8.5mg每只眼、约9mg每只眼、约9.5mg每只眼或约10mg每只眼,频率为约每16周。

[0143] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.1mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0144] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约0.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0145] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约1.0mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0146] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约1.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0147] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约2mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0148] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约2.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0149] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约3mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0150] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约3.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0151] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约4mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0152] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约4.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0153] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0154] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约5.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0155] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约6mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0156] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约6.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0157] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约7mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0158] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约7.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0159] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约8mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0160] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约8.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0161] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约9mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0162] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约9.5mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0163] 在一些实施方案中,CFI融合构建体的施用是眼内(例如玻璃体内)施用,剂量为约10mg每只眼,频率为约每4周、约每5周、约每6周、约每7周、约每8周、约每9周、约每10周、约每11周、约每12周、约每13周、约每14周、约每15周或约每16周。

[0164] F.制剂

[0165] 含有本公开的CFI融合构建体的药物组合物可通过将所选择量的多肽与一种或多种生理学上可接受的载剂或赋形剂混合而以适合眼部施用的任何常规方式配制,以用于本文所提供的治疗。载剂或赋形剂的选择在施用职业技能范围内,并且可取决于多种参数。这些参数包括例如施用模式和所治疗病症。本文所提供的药物组合物可被配制用于单次剂量(直接)施用或用于稀释或其他修改。制剂中化合物的浓度可有效递送当施用时有效用于预定治疗的量。通常,组合物被配制用于单次剂量施用,但并非必需。

[0166] 在一些示例性实施方案中,可将融合构建体浓缩至至少150mg/mL。在一些实施方案中,可将融合构建体投配至50uL中至少7.5mg。在一些实施方案中,可将融合构建体投配至约25ul至约150ul、约30ul至约150ul、约35ul至约150ul、约40ul至约150ul、约45ul至约150ul、约50ul至约150ul、约55ul至约150ul、约60ul至约150ul、约65ul至约150ul、约70ul至约150ul、约75ul至约150ul、约80ul至约150ul、约85ul至约150ul、约90ul至约150ul、约95ul至约150ul、约100ul至约150ul、约105ul至约150ul、约110ul至约150ul、约115ul至约150ul、约120ul至约150ul、约125ul至约150ul、约130ul至约150ul、约135ul至约150ul、约140ul至约150ul、约145ul至约150ul或约25ul至约150ul中至少7.5mg。

[0167] 在一些示例性实施方案中,可将融合构建体投配至25uL中至少7.5mg、30uL中至少7.5mg、35uL中至少7.5mg、40uL中至少7.5mg、45uL中至少7.5mg、50uL中至少7.5mg、55uL中至少7.5mg、60uL中至少7.5mg、65uL中至少7.5mg、70uL中至少7.5mg、75uL中至少7.5mg、80uL中至少7.5mg、85uL中至少7.5mg、90uL中至少7.5mg、95uL中至少7.5mg、100uL中至少7.5mg、105uL中至少7.5mg、110uL中至少7.5mg、115uL中至少7.5mg、120uL中至少7.5mg、125uL中至少7.5mg、130uL中至少7.5mg、135uL中至少7.5mg、140uL中至少7.5mg、145uL中至少7.5mg或150uL中至少7.5mg。

[0168] 在一些示例性实施方案中,将融合构建体投配至25uL、30uL、35uL、40uL、45uL、50uL、55uL、60uL、65uL、70uL、75uL、80uL、85uL、90uL、95uL、100uL、105uL、110uL、115uL、120uL、125uL、130uL、135uL、140uL、145uL或150uL中约5mg至10mg。

[0169] G.药物组合物

[0170] 本公开还提供了药物组合物,该药物组合物包含本文所公开的CFI融合构建体中的任一者以及任选的适合眼部施用的药学上可接受的赋形剂或载剂。在一些实施方案中,药物组合物是无菌的。药物组合物可被配制成与其预期的施用途径相容。在一些实施方案中,本公开的药物组合物适于施用于人类受试者或其他非人灵长类动物。在示例性实施方案中,药物组合物被配制用于玻璃体内施用。

[0171] H.治疗性CFI融合构建体的试剂盒和制品

[0172] 本公开还提供了试剂盒或制品,该试剂盒或制品包含本文所公开的CFI融合构建体中的任一者或者本文所公开的任何药物组合物。在一些实施方案中,试剂盒还可包括用于执行本文所公开的任何给药和眼内施用方法的指导材料。在一些实施方案中,试剂盒还可包括用于容纳本文所公开的融合构建体和/或药物组合物的无菌容器或小瓶。在一些实施方案中,试剂盒还可包括用于施用本文所公开的融合构建体和/或药物组合物的无菌递送装置。在一些实施方案中,制品包含本公开的任何药物组合物。

[0173] 实施例

[0174] 实施例1:CFI-HSA表达、纯化、活化和体外唾液酸化

[0175] 概述

[0176] 对于实施例1,提及的CFI-HSA是指与野生型CFI的N末端融合的人血清白蛋白(SEQ ID NO:21)。

[0177] 野生型CFI-HSA蛋白在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达,用抗白蛋白亲和纯化法纯化,用弗林蛋白酶活化,并通过分级柱纯化。使活化的CFI-HSA蛋白经受体外唾液酸化以增加CFI-HSA的总唾液酸化。最后,使用抗白蛋白亲和纯化法来纯化唾液酸化的蛋白质,并通过尺寸排阻柱色谱法精制。

[0178] 表达

[0179] 合成CFI-HSA基因(SEQ ID NO:21)(ThermoFisher Scientific,Geneart,Regensburg,Germany),其中人血清白蛋白位于CFI蛋白的氨基末端。用SEQ ID NO:2的信号序列制备该蛋白质,该信号序列在表达期间被去除。氨基末端白蛋白标签通过接头(SEQ ID NO:6)与CFI基因连接。利用标准分子生物学技术将CFI-HSA的基因插入到表达载体(Lake Pharma,Hayward,CA)中。将所得的质粒DNA转化到大肠杆菌(E.coli)中。使转染的大肠杆菌在200mL LB培养基中生长以表达质粒DNA,并利用标准技术收获。在琼脂糖凝胶上运行质粒DNA以用于质量评估,并在进行转染前确认序列。

[0180] 将1.0升悬浮TunaCHO™细胞接种在摇瓶中,并使用无血清化学限定培养基扩增。在转染当天,将扩增的细胞接种到装有新鲜培养基的新烧瓶中。使用Lipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific)将质粒DNA瞬时转染到CHO细胞中。将细胞维持为分批补料培养物,直到生产运行结束。该蛋白质在37℃下以125RMP和8% CO_2浓度表达14天。将细胞离心并收集上清液以在14天表达结束时纯化所分泌的CFI-HSA。

[0181] 纯化

[0182] 使含有所表达的CFI-HSA蛋白的上清液通过CaptureSelect™人白蛋白亲和基质(ThermoFisher Scientific)的10mL重力流动柱。用10个柱体积的20mM磷酸钠缓冲液洗涤柱结合的蛋白质。结合的CFI-HSA蛋白以两个步骤洗脱:第一步,用3个柱体积的20mM Tris-HCl(pH 7.0)缓冲液和2M $MgCl_2$洗脱,第二步,用3个柱体积的20mM柠檬酸(pH 3.0)洗脱。将来自步骤1和2两者的洗脱液收集在5mL级分中。用10%中和缓冲液(1.5M tris-HCL,pH 7.4)中和步骤2洗脱液的各级分。通过还原和非还原SDS-PAGE电泳分析所有级分,并通过SimplyBlue™SafeStain(ThermoFisher Scientific)可视化条带。CFI-HSA在非还原凝胶上作为130kDa条带运行,在还原凝胶上作为102kDa和28kDa条带运行。将具有最大CFI-HSA浓度和纯度的级分合并进行进一步处理。

[0183] 弗林蛋白酶活化

[0184] 通过将4μg重组弗林蛋白酶/mg纯化的CFI-HSA在30℃下在Tris-NaCl(tris缓冲盐水)、2.5mM $CaCl_2$和0.5% CHAPS中温育18小时来进行CFI-HSA的切割以产生处于活化形式的蛋白质。CFI-HSA蛋白浓度维持在1.4mg/mL。这导致超过90%的蛋白质被活化。通过尺寸排阻色谱法将活化的蛋白质与失活的CFI-HSA和其他蛋白质分离。使用HiLoad 16/600Superdex200柱(GE Healthcare Life Sciences)和磷酸盐缓冲盐水(PBS,137mM NaCl,2.7mM KCl,10mM Na_2HPO_4,2mM KH_2PO_4,pH 7.4)作为流动相来进行尺寸排阻色谱法(SEC)。通过CE-SDS(LabChip GXII,Perkin Elmer)分析所收集的级分。将含有靶蛋白的级分合并,

并通过SE-UPLC分析。

[0185] 体外唾液酸化

[0186] 使活化的CFI-HSA蛋白经受体外唾液酸化。简言之,唾液酸化在两步酶促反应中进行。首先,利用1:200摩尔比的半乳糖基转移酶(GalT1)和CFI-HSA,在10mM UDP-半乳糖、5mM $MnCl_2$和100mM MES(pH 6.5)缓冲液中以200μL体积进行CFI-HSA的半乳糖苷化反应。如前所述,通过CaptureSelect™人白蛋白亲和色谱法从反应混合物中纯化半乳糖基化的CFI-HSA。接着,利用1:50摩尔比的α2,6-唾液酸转移酶和纯化的CFI-HSA,在80μM碱性磷酸酶、6.1mM CMP-NANA、10mM $ZnCl_2$和200mM MES缓冲液(pH 6.5)中在37℃下以250μL体积进行唾液酸化反应,保持1小时。通过CaptureSelect™人白蛋白亲和色谱法从反应混合物中纯化唾液酸化的CFI-HSA蛋白。通过利用Agilent/Prozyme分析服务"用于总唾液酸定量的GS-SAP方法(Agilent GS48)"和质谱分光光度(MS)分析(Lake Pharma分析服务)来测定CFI-HSA上唾液酸链的水平和特征,下文将进一步详细描述。

[0187] 简言之,通过将20μL每种样品与10μL释放试剂在96孔板中混合来进行总唾液酸定量。将该反应混合物在80℃下温育2小时。将样品冷却至室温并向每个样品中添加10μL标记试剂以在50℃下进一步温育3小时。将样品再次冷却至室温并添加160μL去离子(dI)水以使总体积达到200μL。将10μL样品进样到Agilent UHPLC Poroshell C18柱,在30℃下在4%甲醇、8%乙腈的水溶液(线A1)和100% ACN(线B1)中以0.4mL/分钟的流速运行。记录在373/448nm波长处的峰值。通过在同一柱上运行由试剂盒提供的1pmol-2000pmol NANA(N-乙酰基神经氨酸,Neu5Ac)来产生总峰面积对比皮摩尔(pmol)唾液酸的标准曲线。通过将样品的峰面积与标准曲线进行比较来定量每个样品的总唾液酸。所获得的唾液酸化汇总于下表1.1中。

[0188] 表1.1:唾液酸化测定结果

[0189]

蛋白质	唾液酸(Neu5Ac)pmol/ug蛋白质
重组CFI-HSA	35±0.7
体外唾液酸化的重组CFI-HSA	69±2.2
牛胎球蛋白对照	222±2.6

[0190] 通过标准胰蛋白酶Q-TOF质谱仪进行质谱分析。简言之,用DTT和碘乙酰胺处理、还原和烷基化所有样品,随后进行胰蛋白酶消化。使用蛋白BEH C18柱,通过与Xevo G2-XS-QTOF质谱仪偶联的Waters ACQUITY UPLC分析消化的样品。所进行的分析汇总于下表1.2中。

[0191] 表1.2:肽分析结果

[0192]

	聚糖	重组 CFI-HSA（%）	体外唾液酸化的重组 CFI-HSA（%）
肽分析	Man5	7.1	16.24
	G0	2.39	0
	G0F	0.88	0
	G1	6.07	0
	G1F	6.68	0.03
	G2	13.62	2.37
	G2F	24.81	1.78
	G2FSA	13.38	19.44
	G2FSA2	21.48	53.91

[0193] 精制

[0194] 使用HiLoad 16/600Superdex 200柱(GE Healthcare Life Sciences)和磷酸盐缓冲盐水作为流动相,使纯化的CFI-HSA蛋白经受尺寸排阻色谱法(SEC)。通过CE-SDS(LabChip GXII,Perkin Elmer)分析所收集的级分。将含有靶蛋白的级分合并,使浓度达到5mg/mL,并将样品快速冷冻,保存在-80℃下。

[0195] N末端白蛋白融合体提供可溶性并促进CFI-HSA的活化。

[0196] 在CFI-HSA与不含白蛋白或其他融合标签的野生型CFI(WT-CFI)之间进行活化的比较。基本上如上文针对CFI-HSA所述表达WT-CFI的基因构建体。通过还原SDS-PAGE,重组WT-CFI蛋白显示出中等纯度,然而,在还原和非还原条件下观察到大量高分子量物类(HMWS)和聚集体。对于添加有N末端HSA标签的CFI-HSA,使用TunaCHO™细胞进行瞬时表达,随后如上文所述进行纯化,在还原和非还原SDS-PAGE上未显示出HMWS或聚集体。用弗林蛋白酶活化纯化的重组CFI导致具有几乎完全多分散性的聚集体和HMWS进一步增加。此外,通过还原SDS-PAGE基本上未观察到活化的CFI。相反,弗林蛋白酶的添加在相同条件下几乎完全有效地活化CFI-HSA,并且CFI-HSA蛋白在非还原条件下保持为单体,没有聚集体和HMWS的证据。当与缺乏任何融合标签的CFI相比时,N末端HSA标签对于维持可溶性、单分散性和有效的弗林蛋白酶活化具有显著和意想不到的益处。

[0197] 实施例2:CFI-HSA在非人灵长类动物的玻璃体液中的半衰期

[0198] 对于实施例2,提及的CFI-HSA是指与野生型CFI的N末端融合的人血清白蛋白(SEQ ID NO:21)。

[0199] 玻璃体内注射后CFI-HSA的药代动力学和药效动力学

[0200] 对六只AGM进行玻璃体内给药后,进行野生型CFI-HSA的N末端白蛋白融合体的眼部药代动力学检查。将六只动物分成两组,以两个剂量水平处理:一组接受500μg CFI-HSA的单次玻璃体内注射(右眼,OD,N=3),另一组接受250μg CFI-HSA的单次玻璃体内注射(右眼,OD,N=3)。所有六只动物的左眼(OS)注射等体积的100μL无菌注射用PBS作为媒介物对照。在给药后第1、7、14、21和28天采集非终末玻璃体液样品(100μL)。使用定量电化学发光(ECL)抗原测定来确定玻璃体液CFI-HSA药物浓度,该测定被优化用于测量AGM玻璃体液中的CFI-HSA。该测定采用以2μg/mL包被在Meso Scale Discovery(MSD,Rockville,MA)测定板上的抗CFI抗体(克隆OX21,LS Bio,Seattle WA)来捕获CFI-HSA水平。用以0.5μg/mL与SULFO-TAG缀合的羊多克隆抗HSA抗体(Abcam,Cambridge,MA)对所捕获的CFI-HSA进行检测,该SULFO-TAG在施加电势时发光[电化学发光(ECL)]。在MESO®SECTOR S 600读取器

上测量ECL相对光单位(RLU),并且在范围为0.05μg/mL至40μg/mL因子I-HSA的标准曲线中内插玻璃体液中的未知CFI-HSA浓度。数据在表2.1中提供。

[0201] 表2.1玻璃体内给药后第1、7、14、21和28天的CFI-HSA水平

[0202]

剂量水平	动物数量	时间点	因子 I-HSA 的水平+/-SD（μg/ml）
5.01mg/ml	3	基线	BLQ
		第 1 天	66.4 +/- 18.9
		第 7 天	34.7 +/- 5.5
		第 14 天	9.0 +/- 6.4
		第 21 天	2.0 +/- 1.3
		第 28 天	0.9 +/- 0.6
2.50mg/ml	3	基线	BLQ
		第 1 天	46.9 +/- 11.1
		第 7 天	12.5 +/- 5.0
		第 14 天	2.8 +/- 3.0
		第 21 天	0.2 +/- 0.1
		第 28 天	0.6

[0203] *BLQ:低于测定的定量限的测量结果

[0204] 对于250μg和500μg的剂量水平,非房室分析得到分别为3.6天和4.1天的表观眼部终末半衰期。

[0205] 表2.2.CFI-HSA在非洲绿猴的玻璃体液中的估计PK参数

[0206]

参数	500μg	250μg
终末半衰期（天）	4.1	3.7
T_{max}（天）	1.0	1.0
C_{max}（μg/ml）	66.4	46.9

[0207]

参数	500μg	250μg
MRT（天）	6.0	4.4
AUC 0-inf（μg/ml×天）	543.2	271.5
AUC 0-t（μg/ml×天）	537.8	268.5

[0208] 对于250μg和500μg剂量,使用用于C3a ELISA的Quidel试剂盒通过ELISA确定玻璃体液中的补体成分3a(C3a)水平(图2)。CFI-HSA融合构建体在眼内注射后长达7天内以剂量依赖性方式降低眼部C3a水平。CFI-HSA对C3b降解的增加减少了C3b和Bb之间的复合物形成,这导致通过旁路途径的扩增环将C3切割成C3a和C3b的减少。

[0209] 对六只AGM进行玻璃体内给药后,进行野生型CFI-HSA的N末端白蛋白融合体的眼部药代动力学检查。将六只动物分成两组,以两个剂量水平处理:一组接受0.25mg CFI-HSA的单次玻璃体内注射(OU,N=4),1.0mg CFI-HSA(OU,N=4),并且对照组接受媒介物的单次玻璃体内注射(OU,N=4)。所有12只动物的眼睛(OU)注射等体积的100μL供试品或媒介物对照。动物在给药后第0、1、7或8、14或15、21和28天接受眼部检查(参见实施例4)。在第1、7、14和28天对动物实施安乐死以用于PK-PD分析和组织病理学。使用定量电化学发光(ECL)抗原测定来确定玻璃体液CFI-HSA药物浓度,该测定被优化用于如上所述测量AGM的玻璃体液中

的CFI-HSA。0.25mg和1.0mg剂量的评估的终末玻璃体半衰期测量结果分别为4天和4.4天(图3A)。

[0210] 对于1.0mg剂量,使用抗C3抗体通过化学发光蛋白质印迹并通过光密度量化来确定玻璃体液中的补体成分3b(C3b)和切割片段iC3b的水平(图2B)。CFI-HSA融合构建体在眼内注射后长达14天内降低眼部iC3b水平。CFI-HSA对C3b降解的增加表示为第1、7和14天的C3b/iC3b比率,其显示与媒介物对照相比,接受1.0mg CFI-HSA注射的眼中切割显著增加(图2B)。

[0211] 实施例3:用于人给药的CFI-HSA玻璃体内注射的药代动力学建模

[0212] 在非人灵长类动物中随着时间的推移测量玻璃体内注射CFI-HSA后的CFI-HSA半衰期。发现约4天的半衰期在AGM中跨越3个剂量水平保持剂量比例性,如图3A中所例示。此外,通过蛋白质印迹检测长达14天的CFI-HSA切割活性(图2B)。

[0213] 基于AGM数据,生成用于人给药的玻璃体PK模型,如图3B中所例示。不拘泥于理论或机制,预计玻璃体内注射1mg每只眼的CFI-HSA在注射后60天内维持高于AMD患者水平的基线CFI水平。预计玻璃体内注射10mg每只眼的CFI-HSA在注射后90天内维持高于AMD患者水平的基线CFI水平。

[0214] 实施例4:CFI-HSA玻璃体内注射在非人灵长类动物中的安全性概况。

[0215] 在非人灵长类动物中确定CFI-HSA玻璃体内注射CFI-HSA的安全性概况。注射后,在第0、1、7或8、14或15、21和28天或直到终止日通过裂隙灯测试评估AGM的临床评分。玻璃体内注射CFI-HSA后随着时间的推移使用裂隙灯测试产生临床评分,如图4A中所例示。还评估了CFI-HSA注射后AGM受试者的眼内压。随着时间的推移测量经注射的AGM受试者的眼内压,如图4B中所例示。发现各个经注射的AGM受试者的眼内压在基线变异内并且因此是稳定的。最后,在CFI-HSA注射后评估AGM受试者的视网膜厚度。随着时间的推移测量经注射的AGM受试者的视网膜厚度,如图4C中所例示。发现各个经注射的AGM受试者的视网膜厚度在基线变异内并且因此是稳定的。

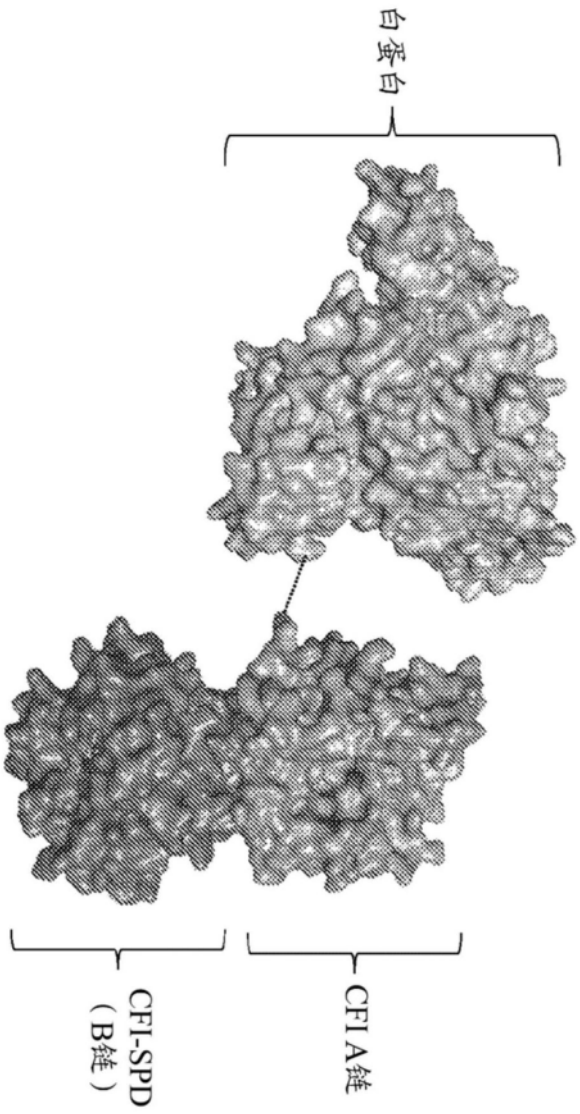


图1

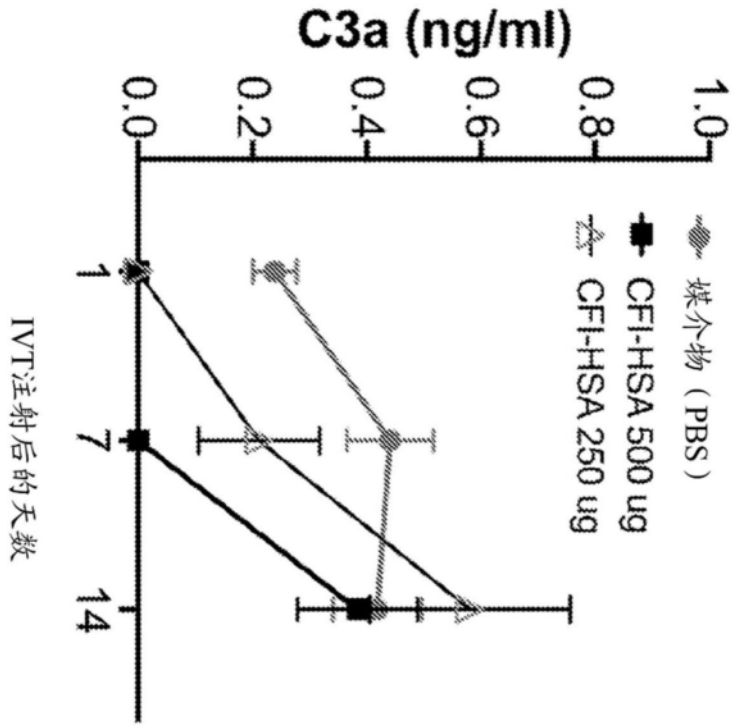

C3a (ng/ml)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1
7
14
IVT注射后的天数
媒介物（PBS）
CFI-HSA 500 ug
CFI-HSA 250 ug

图2A

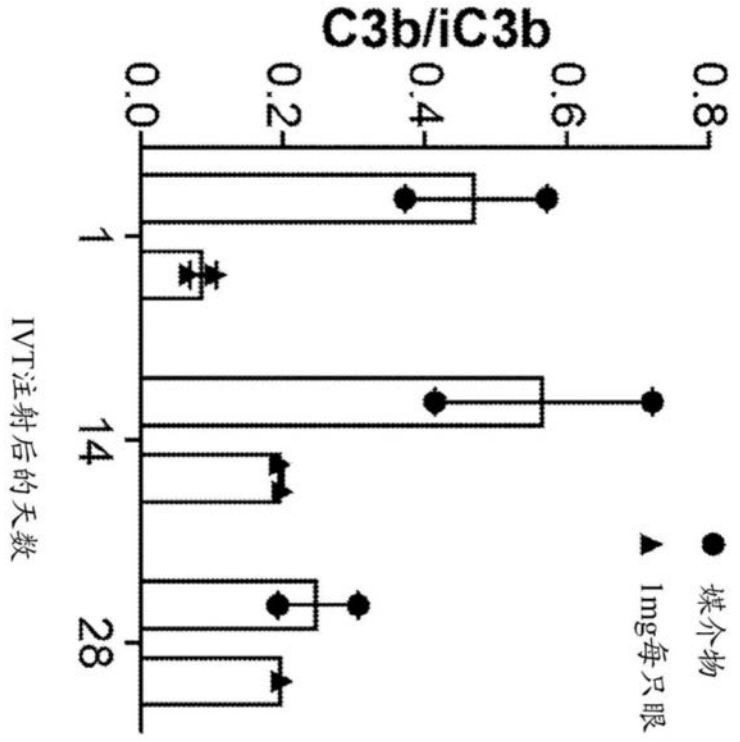

C3b/iC3b
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
14
28
IVT注射后的天数
媒介物
1mg每只眼

图2B

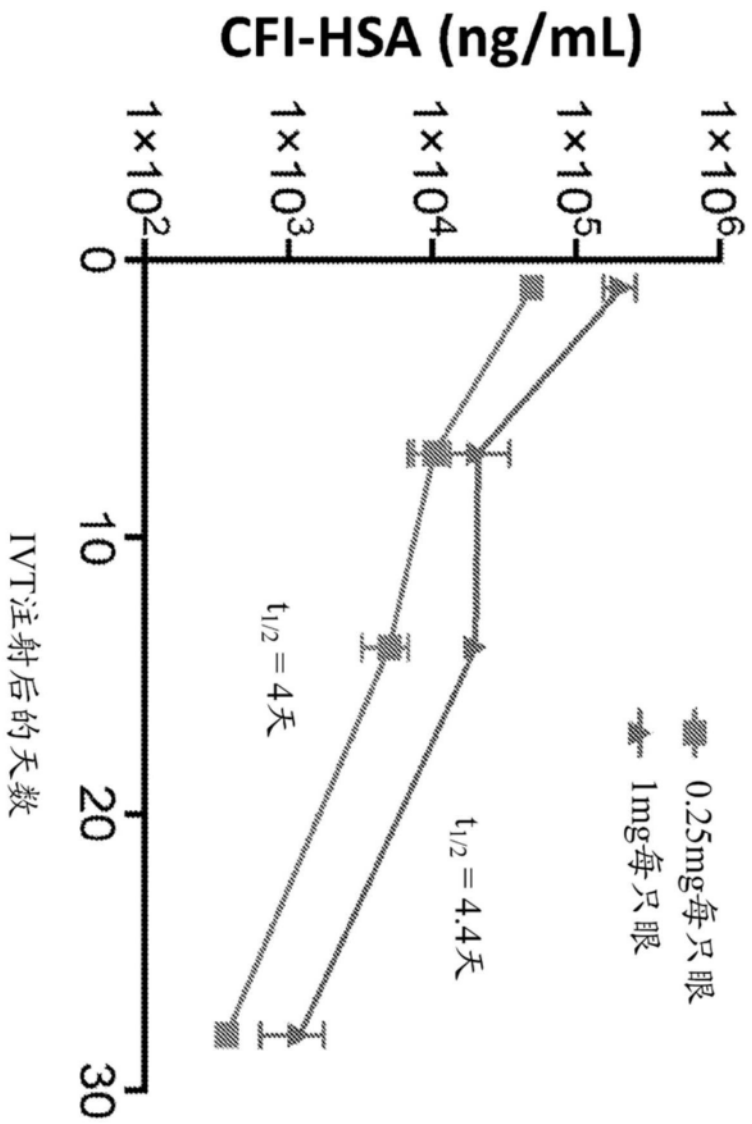

CFI-HSA (ng/mL)
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
0
10
20
30
IVT注射后的天数
t1/2 = 4天
t1/2 = 4.4天
0.25mg每只眼
1mg每只眼

图3A

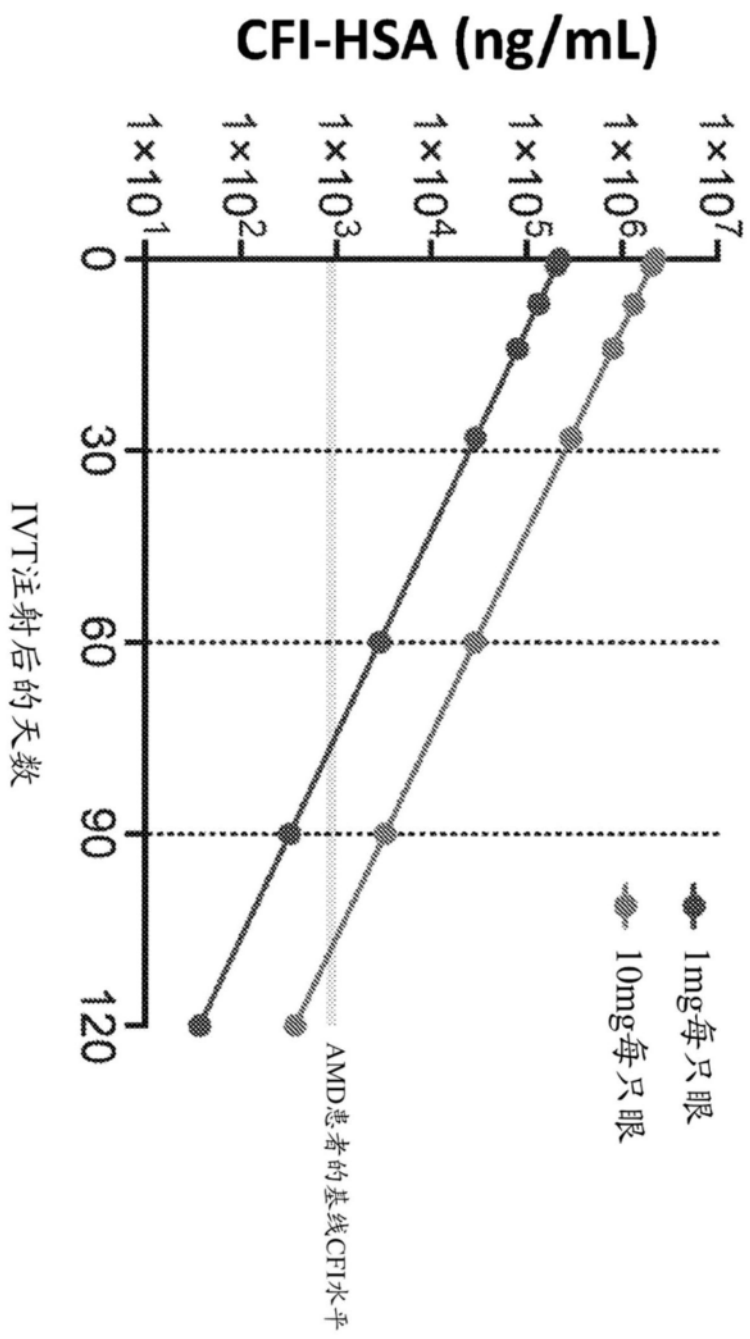

CFI-HSA (ng/mL)
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
0
30
60
90
120
IVT注射后的天数
1mg每只眼
10mg每只眼
AMD患者的基线CFI水平

图3B

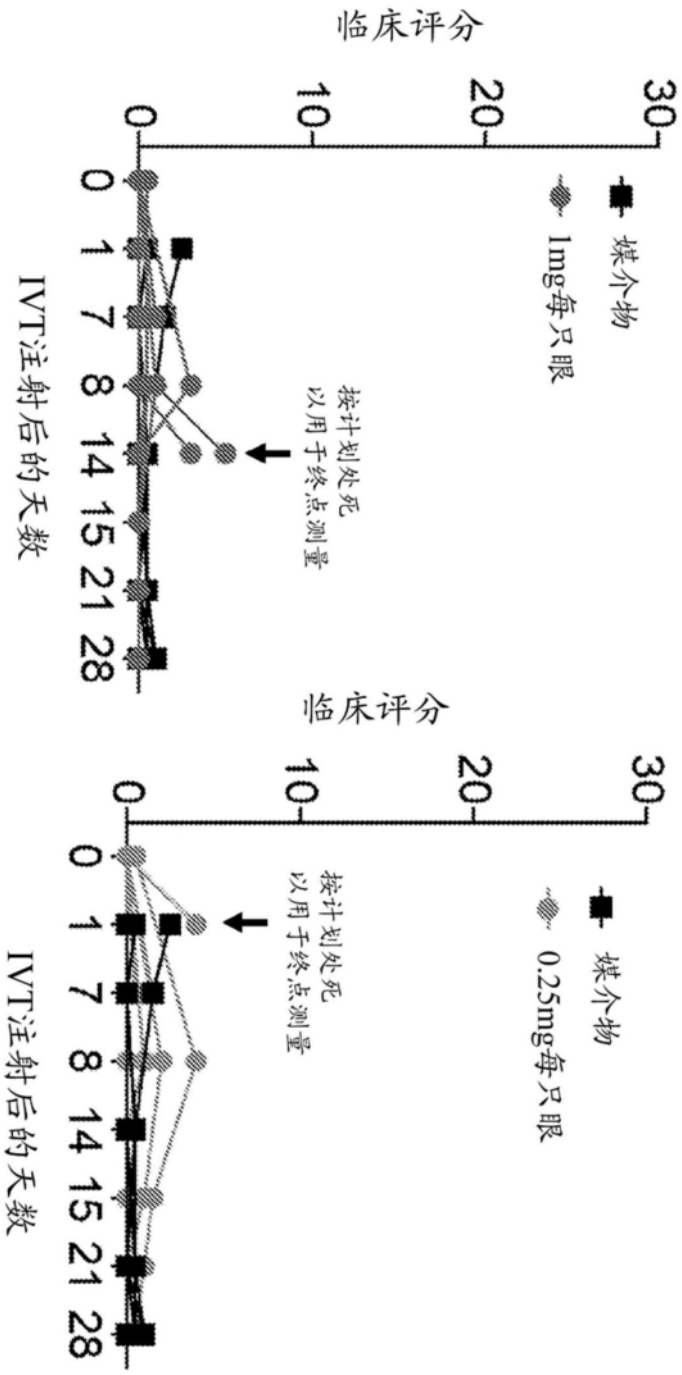

临床评分
0
10
20
30
媒介物
1mg每只眼
按计划处死
以用于终点测量
0 1 7 8 14 15 21 28
IVT注射后的天数
临床评分
0
10
20
30
媒介物
0.25mg每只眼
按计划处死
以用于终点测量
0 1 7 8 14 15 21 28
IVT注射后的天数

图4A

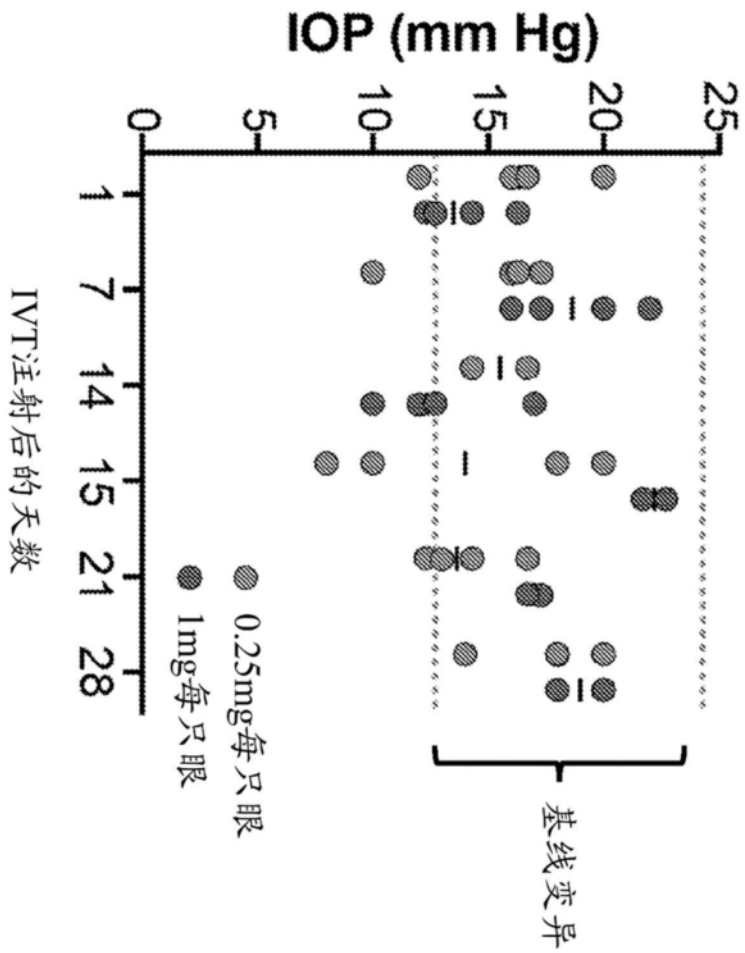

IOP (mm Hg)
0
5
10
15
20
25
1
7
14
15
21
28
IVT注射后的天数
0.25mg每只眼
1mg每只眼
基线变异

图4B

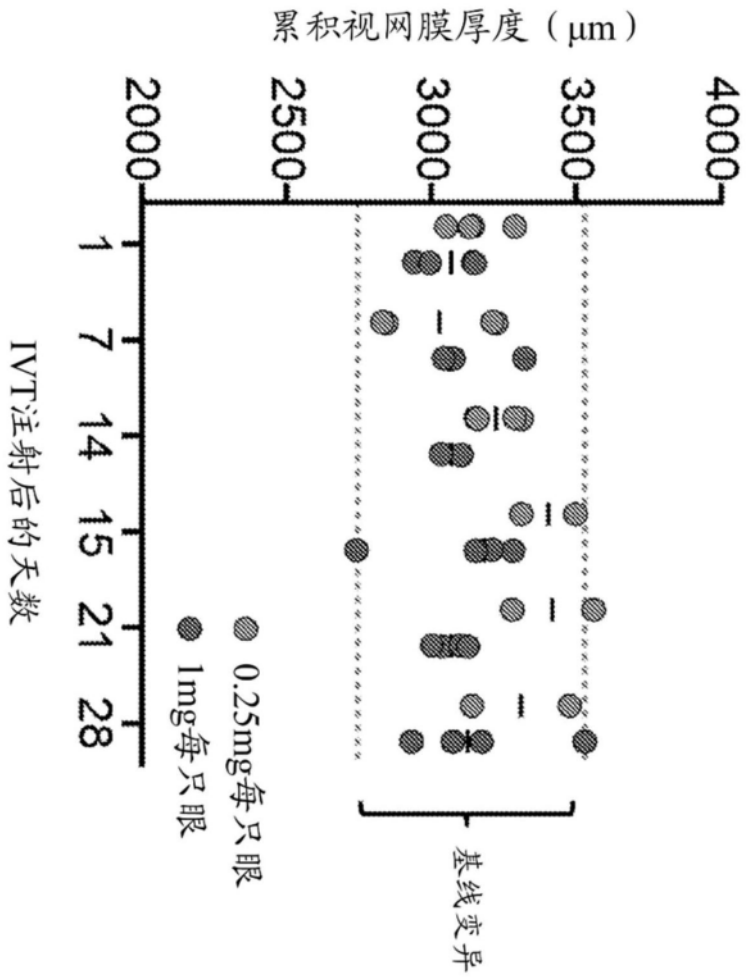

累积视网膜厚度（μm）
2000
2500
3000
3500
4000
1
7
14
15
21
28
IVT注射后的天数
0.25mg每只眼
1mg每只眼
基线变异

图4C