



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118450906 A

(43) 申请公布日 2024.08.06

(21) 申请号 202280084962.2

(22) 申请日 2022.12.21

(30) 优先权数据

63/293,013 2021.12.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/082179 2022.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/122691 EN 2023.06.29

(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 单兵 B·D·康诺利 S·巴兰

A·查特吉

(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 47/02 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

补体因子I制剂

(57) 摘要

本文提供了包含野生型补体因子I (CFI) 及其变体的药学上可接受的制剂;在一些实施方案中,该野生型CFI及其变体是融合构建体例如包含人血清白蛋白的融合构建体的一部分。这些制剂在以液体或冻干状态储存期间稳定CFI对抗急性应力。还提供了制备这些制剂的方法以及使用这些制剂治疗疾病的方法。

1. 一种包含野生型补体因子I (CFI) 或其变体 (CFI变体) 的制剂, 其中所述制剂包含缓冲剂、表面活性剂和张力调节剂。
2. 根据权利要求1所述的制剂, 其中所述制剂包含增量剂、冷冻保护剂和冻干保护剂中的一者或多者。
3. 根据权利要求1至2中任一项所述的制剂, 其中所述CFI或其变体以约10mg/ml至约300mg/ml存在。
4. 根据权利要求1至2中任一项所述的制剂, 其中所述CFI或其变体以约150mg/ml存在。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的制剂, 其中所述缓冲剂包括乙酸盐、组氨酸或琥珀酸盐。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的制剂, 其中所述缓冲剂是乙酸钠、组氨酸盐酸盐或琥珀酸钠。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的制剂, 其中所述缓冲剂以约1mM至约50mM存在。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的制剂, 其中所述表面活性剂是聚山梨酸酯80、聚山梨酸酯20、聚山梨酸酯80/20或泊洛沙姆F68。
9. 根据权利要求8所述的制剂, 其中所述表面活性剂以约0.001% v/v至约0.1% v/v存在。
10. 根据权利要求9所述的制剂, 其中所述表面活性剂以约0.01% v/v至约0.03% v/v存在。
11. 根据权利要求10所述的制剂, 其中所述表面活性剂以约0.02% v/v存在。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的制剂, 其中所述张力调节剂是山梨醇、海藻糖、氯化钠或精氨酸盐酸盐。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的制剂, 其中所述增量剂是海藻糖或甘氨酸。
14. 根据权利要求12所述的制剂, 其中所述山梨醇以约1% v/v至约10% v/v存在。
15. 根据权利要求14所述的制剂, 其中所述山梨醇以约5% v/v存在。
16. 根据权利要求12所述的制剂, 其中所述海藻糖以约1% v/v至约15% v/v存在。
17. 根据权利要求16所述的制剂, 其中所述海藻糖以约10% v/v存在。
18. 根据权利要求12所述的制剂, 其中所述氯化钠以约1mM至约500mM存在。
19. 根据权利要求18所述的制剂, 其中所述氯化钠以约150mM存在。
20. 根据权利要求12所述的制剂, 其中所述精氨酸盐酸盐以约10mM至约200mM存在。
21. 根据权利要求20所述的制剂, 其中所述精氨酸盐酸盐以约70mM存在。
22. 根据权利要求20所述的制剂, 其中所述精氨酸盐酸盐以约135mM存在。
23. 根据权利要求13所述的制剂, 其中所述甘氨酸以约1% v/v至约5% v/v存在。
24. 根据权利要求23所述的制剂, 其中所述甘氨酸以约2% 存在。
25. 根据权利要求13所述的制剂, 其中所述甘氨酸以约1mM至约100mM存在。
26. 根据权利要求25所述的制剂, 其中所述甘氨酸以60mM存在。
27. 根据权利要求2至26中任一项所述的制剂, 其中所述冷冻保护剂或冻干保护剂选自葡萄糖、蔗糖、甘氨酸、山梨醇、海藻糖、蔗糖或甘露醇。
28. 根据权利要求27所述的制剂, 其中所述葡萄糖以约1% v/v至约10% v/v存在。
29. 根据权利要求28所述的制剂, 其中所述葡萄糖以约4% v/v存在。

30. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述蔗糖以约1%v/v至约10%v/v存在。
31. 根据权利要求28所述的制剂,其中所述蔗糖以约4%v/v存在。
32. 根据权利要求28所述的制剂,其中所述蔗糖以约5%v/v存在。
33. 根据权利要求28所述的制剂,其中所述蔗糖以约8%v/v存在。
34. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述甘氨酸以约50mM至约150mM存在。
35. 根据权利要求34所述的制剂,其中所述甘氨酸以约120mM存在。
36. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述海藻糖以约1%v/v至约10%v/v存在。
37. 根据权利要求36所述的制剂,其中所述海藻糖以约4%v/v存在。
38. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述甘露醇以约1mM至约100mM存在。
39. 根据权利要求38所述的制剂,其中所述甘露醇以约60mM存在。
40. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述山梨醇以约1%v/v至约5%v/v存在。
41. 根据权利要求40所述的制剂,其中所述山梨醇以约2.5%v/v存在。
42. 根据权利要求1至41中任一项所述的制剂,其中所述制剂选自表2.2或表3.3中所示的制剂。
43. 根据权利要求1至42中任一项所述的制剂,其中所述制剂是固体形式。
44. 根据权利要求1至42中任一项所述的制剂,其中所述制剂是冻干形式。
45. 根据权利要求1至42中任一项所述的制剂,其中所述制剂是液体形式。
46. 根据权利要求1至45中任一项所述的制剂,其中所述制剂在-80°C+/-2°C、-20°C+/-2°C、0°C+/-2°C、4°C+/-2°C、25°C+/-2°C、37°C+/-2°C、45°C+/-2°C或60°C+/-2°C中的任何一者或多者下是稳定的。
47. 根据权利要求1至46中任一项所述的制剂,其中所述制剂稳定达至少1周、至少1个月或至少1年。
48. 根据权利要求1至47中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含野生型CFI。
49. 根据权利要求1至47中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含CFI变体,所述CFI变体包含相对于野生型CFI的至少一个修饰,其中所述CFI变体能够调节补体系统,并且其中所述CFI变体与所述野生型CFI相比具有至少一种改善的特征。
50. 根据权利要求49所述的制剂,其中所述改善的特征选自半衰期或生物利用度增加,或活性、底物特异性、效力、底物亲和力、辅因子亲和力和催化能力中的任何一者或多者增加或降低。
51. 根据权利要求50所述的制剂,其中所述改善的特征是活性增加。
52. 根据权利要求51所述的制剂,其中与野生型CFI相比,所述活性增加包括C3b和/或C4b的裂解增加。
53. 根据权利要求49所述的制剂,其中所述CFI变体包含与野生型CFI相对应的至少一个修饰,所述野生型CFI具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。
54. 根据权利要求49所述的制剂,其中所述CFI变体选自表2中所示的那些变体。
55. 根据权利要求1至54中任一项所述的制剂,其中所述野生型CFI或CFI变体是融合构建体的第一组分,所述融合构建体包含第一组分和至少第二组分,并且所述野生型CFI或CFI变体融合至所述第二组分。
56. 根据权利要求55所述的制剂,其中所述融合构建体的所述第二组分是蛋白质。

57. 根据权利要求55至56中任一项所述的制剂,其中所述融合构建体的所述第二组分是半衰期延长物。

58. 根据权利要求57所述的制剂,其中所述半衰期延长物是修饰的白蛋白或白蛋白衍生物。

59. 根据权利要求57所述的制剂,其中所述半衰期延长物是野生型白蛋白。

60. 根据权利要求57所述的制剂,其中所述半衰期延长物是人血清白蛋白或其变体。

61. 根据权利要求60所述的制剂,其中所述融合构建体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

62. 一种包含融合构建体的制剂,所述融合构建体包含野生型CFI或其变体(CFI变体),其中所述野生型CFI或CFI变体融合至人血清白蛋白,并且所述制剂选自表2.2或表3.3中所示的那些制剂。

63. 根据权利要求62所述的制剂,其中所述融合构建体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

64. 一种用于治疗对其有需要的受试者的病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至63所述的制剂中的任一制剂。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述病症是眼部病症。

66. 根据权利要求64所述的方法,其中所述病症是非眼部病症。

67. 根据权利要求64至66中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

68. 根据权利要求64至67中任一项所述的方法,其中施用途径是皮下施用。

69. 根据权利要求64至67中任一项所述的方法,其中所述施用途径是静脉内施用。

补体因子I制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年12月22日提交的美国临时专利申请第63/293,013号的优先权,其内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 电子序列表的参考

[0004] 电子序列表(VTEX_707_01WO_SeqList_ST26.xml;大小:31,757字节;和创建日期:2022年12月17日)的内容全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0005] 补体因子I (CFI) 是补体系统的可溶性蛋白,其通过裂解细胞结合的或流体相C3b和C4b来调节补体活化。它是一种可溶性糖蛋白,在人体血液中循环并用于维持补体系统的经典途径、凝集素途径和旁路途径之间的平衡。CFI失调、CFI突变和功能障碍以及CFI缺乏与涉及补体系统的疾病有关。需要可用于调节补体系统的药学上可接受的CFI制剂。本文提供了满足该需要的制剂。

发明内容

[0006] 本公开提供了包含野生型补体因子I (CFI) 或CFI变体及它们的融合蛋白的制剂。所提供的制剂稳定活性成分对抗急性应力,并允许以液体和冻干状态储存。还提供了制备这些制剂的方法以及使用这些制剂治疗疾病的方法。

具体实施方式

[0007] 本公开提供了包含野生型CFI或CFI变体及它们的融合蛋白的制剂。所提供的制剂稳定活性成分对抗急性应力,并允许以液体和冻干状态储存。还提供了制备这些制剂的方法以及使用这些制剂治疗疾病的方法。

[0008] I. 药学上可接受的制剂

[0009] 在允许药学上可接受的储存条件的浓度范围内,本文所述的药学上可接受的制剂为本公开的野生型CFI或CFI变体及它们的融合构建体(在本文中可互换地称为“活性成分”或“活性药物成分”)提供稳定特性。稳定特性可以是例如防止降解、维持浓度、防止聚集和/或维持生物活性。

[0010] 本公开的制剂包括野生型CFI、CFI变体、包含野生型CFI的融合构建体(例如CFI-HSA)或包含CFI变体的融合构建体(例如表2的任何CFI变体-HSA融合物)、缓冲剂、张力调节剂、表面活性剂,以及进一步任选的增量剂、冷冻保护剂、冻干保护剂和/或稳定剂。

[0011] 制剂可设计成支持活性成分以固体(干燥)形式(例如冻干饼状物或冻存)储存。在一些实施方案中,制剂是冻干物。在一些实施方案中,制剂是液体制剂。

[0012] 制剂可设计成在一定浓度范围内支持活性成分以液体溶液形式储存(同时保持例如稳定性、活性)。可调整制剂的浓度以用于不同类型的施用(例如,皮下或静脉内施用)。例如,活性成分可以约10mg/mL至约300mg/mL,例如以约10mg/mL、约15mg/mL、20mg/mL、约

25mg/mL、30mg/mL、约35mg/mL、40mg/mL、约45mg/mL、约50mg/mL、约55mg/mL、约60mg/mL、约65mg/mL、约70mg/mL、约75mg/mL、约80mg/mL、约85mg/mL、约90mg/mL、约95mg/mL、约100mg/mL、约105mg/mL、约110mg/mL、约115mg/mL、约120mg/mL、约125mg/mL、约130mg/mL、约135mg/mL、约140mg/mL、约145mg/mL、约150mg/mL、约155mg/mL、约160mg/mL、约165mg/mL、约175mg/mL、约180mg/mL、约185mg/mL、约190mg/mL、约195mg/mL、约200mg/mL、约205mg/mL、约210mg/mL、约215mg/mL、约220mg/mL、约225mg/mL、约230mg/mL、约235mg/mL、约245mg/mL、约250mg/mL、约255mg/mL、约260mg/mL、约260mg/mL、约265mg/mL、约270mg/mL、约275mg/mL、约280mg/mL、约285mg/mL、约290mg/mL、约295mg/mL或约300mg/mL的液体溶液形式储存在制剂中。在一些实施方案中,制剂包含浓度为约50mg/mL的活性成分。在一些实施方案中,制剂包含浓度为约100mg/mL的活性成分。在一些实施方案中,制剂包含浓度大于150mg/mL的活性成分。在一些实施方案中,制剂包含浓度为约170mg/mL的活性成分。在一些实施方案中,制剂包含浓度为约190mg/mL的活性成分。

[0013] 本公开的制剂允许活性成分在以下温度中的任何一个或多个温度下维持稳定性(例如活性): $-80^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 、 $0^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 、 $45^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 或 $60^{\circ}\text{C}+/-2^{\circ}\text{C}$ 。

[0014] 本公开的制剂允许活性成分维持稳定性(例如活性)达至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少1年、至少2年或更久。

[0015] 本文所述制剂的pH是向本文所述的CFI变体和融合构建体提供稳定特性的任何pH。在一些实施方案中,制剂包含约5至约7.5的pH。pH可以是例如约pH 5.0、约pH 5.1、约pH 5.2、约pH 5.3、约pH 5.4、约pH 5.5、约pH 5.6、约pH 5.7、约pH 5.8、约pH 5.9、约pH 6.0、约pH 6.1、约pH 6.2、约pH 6.2、约pH 6.3、约pH 6.4、约pH 6.5、约pH 6.6、约pH 6.7、约pH 6.8、约pH 6.9、约pH 7、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3、约pH 7.4或约pH 7.5。

[0016] 制剂包含药学上可接受的缓冲剂。缓冲剂可用于将制剂的pH维持在期望范围内。任何合适的缓冲液可用于本公开的制剂中。药学上可接受的缓冲液的示例包括组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、谷氨酸盐、甘氨酸、碳酸氢盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐和羟甲基氨基甲烷(tris)缓冲液。在一些实施方案中,缓冲剂以约1mM至约50mM存在。在一些实施方案中,缓冲剂以约20nM存在。在一些实施方案中,缓冲液包括组氨酸,例如组氨酸盐酸盐。在一些实施方案中,缓冲液包括乙酸盐,例如乙酸钠。在一些实施方案中,缓冲液包括琥珀酸盐,例如琥珀酸钠。

[0017] 制剂包含表面活性剂,有时称为润湿剂和/或增溶剂。非限制地,表面活性剂赋形剂可用于调节生物制剂分子的溶解度和生物利用度,增加生物制剂分子在剂型中的稳定性,并维持优选的多晶型形式。表面活性剂的示例包括聚山梨酸酯20(PS20、Tween 20)、聚山梨酸酯80(PS80、Tween80)、PS80/20、泊洛沙姆(Pluronic F68和F127)、Triton X-100、Brij 30和Brij 35。在一些实施方案中,本公开的制剂包含表面活性剂。在一些实施方案中,表面活性剂是聚山梨酸酯20或聚山梨酸酯80。在一些实施方案中,制剂包含聚山梨酸酯20。在一些实施例中,聚山梨酸酯20以约0.01%至约0.05%存在。在一些实施方案中,聚山梨酸酯为约0.02%。在一些实施方案中,制剂包含聚山梨酸酯80。在一些实施例中,聚山梨酸酯80以约0.01%至约0.05%存在。在一些实施方案中,聚山梨酸酯80为约0.02%。

[0018] 制剂包含张力调节剂,有时也可称为张力剂、张度调节剂或张度剂。张力调节剂用于调整制剂的重量克分子渗透浓度,使得当施用于受试者时制剂的渗透压不引起任何有害作用,诸如不期望的细胞溶解。与本公开的活性成分相容的任何药学上可接受的张力调节剂可适用于本文所述的制剂。药学上可接受的张力调节剂可包括例如甘露醇、山梨醇、乳糖、右旋糖、海藻糖、氯化钠、氯化钾、丙三醇、甘油或精氨酸盐酸盐。在一些实施方案中,制剂包含张力调节剂。在一些实施方案中,张力调节剂是精氨酸盐酸盐。在一些实施方案中,制剂包含精氨酸盐酸盐。在一些实施方案中,精氨酸盐酸盐为约10mM至约200mM。在一些实施方案中,精氨酸盐酸盐为约70mM。在一些实施方案中,精氨酸盐酸盐为约135mM。在一些实施方案中,山梨醇是张力调节剂,并且山梨醇以约1%v/v至约10%v/v,例如以约5%v/v存在。在一些实施方案中,张力调节剂是海藻糖,并且海藻糖以约1%v/v至约15%v/v,例如以约10%v/v存在。在一些实施方案中,张力调节剂是氯化钠,并且以约1mM至约500mM,例如以约150mM存在。在一些实施方案中,张力调节剂对于非离子缓冲剂是山梨醇或海藻糖,而对于离子缓冲剂是氯化钠。

[0019] 制剂可包含增量剂,例如海藻糖或甘氨酸。在一些实施方案中,增量剂是甘氨酸,并且以约1%v/v至约5%v/v,例如以约2%v/v存在于制剂中。在一些实施方案中,增量剂是甘氨酸,并且以约1mM至约100mM,例如以约60mM存在于制剂中。

[0020] 制剂可包含冷冻保护剂和/或冻干保护剂。冷冻保护剂和冻干保护剂被包含在制剂中,以在冷冻和解冻循环期间为生物制剂分子提供保护以免变性。它们还可有助于在冻干(即,冷冻干燥)和重构期间保持生物制剂完整性,例如维持生物活性。在一些情况下,冷冻保护剂和冻干保护剂可互换使用。可以使用能够为包含本公开的CFI变体和融合构建体的制剂提供稳定特性的任何药学上可接受的冷冻保护剂和/或冻干保护剂。冷冻保护剂和冻干保护剂的非限制性示例包括多元醇、二糖、多糖、葡萄糖、甘氨酸、甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖和葡聚糖40。在一些实施方案中,制剂包含冷冻保护剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂是蔗糖、甘氨酸、山梨醇、海藻糖和甘露醇中的至少一者。在一些实施方案中,冷冻保护剂是蔗糖。在一些实施方案中,蔗糖以约2%至约10%存在。在一些实施例中,蔗糖以约4%至约5%存在。在一些实施方案中,蔗糖为约8.5%。在一些实施方案中,冷冻保护剂是甘氨酸。在一些实施方案中,甘氨酸为约50mM至约150mM,例如约120mM。在一些实施方案中,甘氨酸为约120mM。在一些实施方案中,冷冻保护剂是山梨醇。在一些实施方案中,葡萄糖以约1%v/v至约10%v/v,例如以约4%v/v存在于制剂中。在一些实施方案中,山梨醇以约1%至约5%存在。在一些实施方案中,山梨醇为约2.5%v/v。在一些实施方案中,海藻糖以约1%v/v至约10%v/v,例如以约4%v/v存在。在一些实施方案中,山梨醇为约2.5%。在一些实施方案中,冷冻保护剂是甘露醇。在一些实施方案中,甘露醇为约1mM至约100mM。在一些实施方案中,甘露醇为约60mM。

[0021] 制剂可包含稳定化剂,有时称为稳定剂。稳定化剂是向包含本文所述的CFI变体和融合构建体的制剂提供稳定特性的任何赋形剂。例如,稳定化剂可以是氯化钙(CaCl_2)、组胺、甲硫氨酸、抗坏血酸、谷胱甘肽、维生素E、聚(乙烯亚胺)、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂防腐剂或任何其他药学上可接受的稳定化剂。在一些实施方案中,制剂包含稳定剂。在一些实施方案中,稳定剂是氯化钙。在一些实施方案中,制剂包含氯化钙。在一些实施方案中,氯化钙为约20mM至约50mM。在一些实施方案中,氯化钙为约35mM。

- [0022] 示例性制剂提供于表2.2和表3.3中。
- [0023] 在一些实施方案中,制剂包含20mM乙酸钠、5%山梨醇、0.02% PS80,并且pH为约5。
- [0024] 在一些实施方案中,制剂包含20mM乙酸钠、5%山梨醇、0.02% PS80,并且pH为约5.5。
- [0025] 在一些实施方案中,制剂包含20mM乙酸钠、150mM氯化钠、0.02%PS80,并且pH为约5.5。
- [0026] 在一些实施方案中,制剂包含20mM乙酸钠、70mM精氨酸盐酸盐、2%蔗糖、60mM甘氨酸、0.02% PS80,并且pH为约5.5。
- [0027] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸盐酸盐、70mM精氨酸盐酸盐、2%蔗糖、60mM甘氨酸、0.02% PS80,并且pH为约6。
- [0028] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸盐酸盐、150mM氯化钠、0.02%PS80,并且pH为约6。
- [0029] 在一些实施方案中,制剂包含20mM琥珀酸钠、10%海藻糖、0.02%PS80,并且pH为约5。
- [0030] 在一些实施方案中,制剂包含20mM琥珀酸钠、5%海藻糖、2%甘氨酸、0.02%PS80,并且pH为约5。
- [0031] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸盐酸盐、10%海藻糖、0.02% PS80,并且pH为约6。
- [0032] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸盐酸盐、5%海藻糖、2%甘氨酸、0.02%PS80,并且pH为约6。
- [0033] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸盐酸盐、10%海藻糖、0.02% PS80,并且pH为约7。
- [0034] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸盐酸盐、5%海藻糖、2%甘氨酸、0.02%PS80,并且pH为约7。
- [0035] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、135mM精氨酸盐酸盐、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。
- [0036] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、70mM精氨酸盐酸盐、4%蔗糖、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。
- [0037] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。
- [0038] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、70mM精氨酸盐酸盐、120mM甘氨酸、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。
- [0039] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、70mM精氨酸盐酸盐、2.5%山梨醇、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。
- [0040] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、70mM精氨酸盐酸盐、4%海藻糖、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。
- [0041] 在一些实施方案中,制剂包含20mM组氨酸、5%蔗糖、35mM氯化钙、0.02%聚山梨酸酯20,并且具有约5.8的pH。

[0042] II. 用于制剂的补体因子I变体和融合构建体

[0043] A. 补体因子I变体

[0044] 本文提供了包含变体的制剂,这些变体包含相对于野生型CFI的一个或多个修饰,并且在本文中被称为“CFI变体”。如本文所用,对野生型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、以及一个或多个结构域的取代。

[0045] 本公开的CFI变体不直接作用于C3,例如,本公开的变体不直接裂解C3,不直接抑制C3,不直接抑制C3的活化,并且不直接降低C3的活化。

[0046] 如本文所用,“野生型CFI”是指任何天然存在的全长CFI,其不是致病CFI,具有或不具有信号序列,并且其可以是任何物种。

[0047] 在一些实施方案中,野生型CFI是血浆来源的。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中所示的氨基酸序列(如下表1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,不具有信号序列的野生型CFI包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列(如下表1中所示)。

[0048] 野生型CFI包含重链和轻链,它们也分别被称为A链和B链。重链(A链)具有四个结构域:FI膜攻击复合体(FIMAC)结构域(SEQ ID NO:5的残基36至90)、SRCR结构域, SRCR结构域进一步由多个清道夫受体富含半胱氨酸(SRCR)结构域、低密度脂蛋白1结构域(LDLr1)和低密度脂蛋白2结构域(LDLr2)构成。轻链(B链)由丝氨酸蛋白酶结构域(SPD)组成。这些链之间的界面称为A:B链界面。

[0049] 本公开的CFI变体包括野生型CFI的一个或多个氨基酸残基的缺失、野生型CFI的一个或多个CFI结构域的缺失、野生型CFI的一个或多个氨基酸残基的取代、一个或多个氨基酸残基向野生型CFI的插入、野生型CFI的一个或多个CFI结构域的倒位、以及一个或多个结构域向野生型CFI的插入中的一者或多者。

[0050] 本公开的CFI变体可以通过向CFI基础分子引入一个或多个修饰来产生,其中该CFI基础分子的结构域与野生型CFI中存在那些结构域相对应。因此,CFI基础分子可以是任何物种的野生型CFI,或者CFI基础分子可以仅包含野生型CFI的部分,仅具有任何物种的野生型CFI的结构域中的一些结构域(例如已经是CFI变体)。在一些实施方案中,CFI基础分子是野生型小鼠CFI。在一些实施方案中,CFI基础分子是野生型人CFI。在一些实施方案中,CFI基础分子是野生型非人灵长类动物CFI。在一些实施方案中,CFI基础分子仅包含野生型人CFI的结构域中的一些结构域。

[0051] 在一些实施方案中,本文提供的CFI变体调节补体系统的活性,并且与野生型CFI相比具有至少一种改善的特征。此类改善的特征包括但不限于生物利用度、半衰期、活性、效力、催化能力、辅因子亲和力(例如对因子H和/或CR1的亲和力)、底物特异性和底物亲和力(例如对C3b和/或C4b的亲合性)中的任何一者或多者增加或减少。在一些实施方案中,改善的特征是半衰期增加。在一些实施方案中,改善的特征是活性增加,这在下文后续小节中进一步详细讨论。在其他实施方案中,改善的特征是C3b和/或C4b的底物特异性改变,从而允许CFI变体的可调节性。

[0052] 表1中提供了可用于生成CFI变体的示例性基础分子。本文提供的基础分子可用于调节补体系统而无需进一步修饰,或可用于调节补体系统而无需进一步修饰。例如,表1中提供的基础分子中的任一基础分子可以被进一步修饰以包含一个或多个修饰,例如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、或一个或多个氨基酸残基或CFI结构域的添加。表1的基础分子可以是下文进一步描述的融合构建体的另一部分。

[0053] 表1:用于生成CFI变体的基础分子

CFI 基础分子的描述	基础分子的命名	氨基酸序列
血浆来源的野生型人 CFI (wt hCFI) (信号序列加下划线)	CFI-PD	MKLLHVFLFLFCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAK KYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNG TAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGKFLNNGTCT AEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKS SWSMREANVAACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLSINST ECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVC YTQKADSPMDFFQCVNGKYISQMKACDGINDCGD QSDELCKACQGGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCI TGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSL LPKLSGCVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVA IKDASGITCGGIYIGGCWILTAACHLRASKTHRYQIW TTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDI ALIEMKKDGNKKDCELPRESIPACVPWSPYLFQPNDT CIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVVKLISNCSKIFYGNR FYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM DANNV TYVWGVVSWG ENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISY HVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 1)
wt hCFI, 无信号序列	hCFI	KVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQR CIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQK SLECLHPGKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGI VEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREANVAACLDLGFQQ GADTQRRFKLSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTF

[0054]

[0055]

CFI 基础分子的描述	基础分子的命名	氨基酸序列
		TKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNG KYISQMKACDGINDCGDQSDELCKACQGKGFHCK SGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEE TEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMHIRRKRI VGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWIL TAAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYV DRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPWSPYLFQPNDDTCIVSGWGREKDNERVFSL QWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSID ACKGDSGGPLVCMANNVTYVWGVVSWGENCEGK PEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 5)
Δ (K1-P305), wt hCFI 的 A 链 缺失	ΔA 链 (CFI-SPD)	KLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIK DASGITCGGIYIGGCWILTAAHCLRASKTHRYQIWTT VVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIAL IEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDDTCIV SGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFY EKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMANNVTY VWGVVSWGENCEGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHV GRPFISQYNV (SEQ ID NO: 12)
野生型小鼠 CFI (https://www.uniprot.org/uniprot/Q61129)	小鼠 CFI (mCFI)	MKLAHLSLFLALHLSSSRSPSASDLPEELVDQKCL LQKYTHRSCNKVFCQPWQRCIEGTCICKLPYQCPRA GTPVCAMNGRSYPTYCHQKSFECLHPEIKFSHNGTC AAEGKFNVS LIYGRKTEGLVQVKLVQDERMFICK NSWSMAEANVACVDLGFPLGVRDIQGSFNISGNLHI NDTECLHVHCRGVETSLAECAFTKRRTLSNGLAGV VCYKQDADFPTSLSFQCVNGKHIPQEKACNGVND GDQSDELCKGCRGNASLCKSGVCIPDQYKCN GEVDCITGEDESRCEDRQQNIPKGLARSAQGEA IETEE TEMLTPGMDNERKRIKSLLPKLSCGV KRNTHTRRKR VIGGKPANVGDYPWQVAIKD GQRITCGGIYIGGCWIL TAAHCVRPSRAH SYQVWTALLDWLKPNSQLGIQT VKRVIVHE KYNGATFQNDIALIEMKMHTGKKECELP NSVPACVPWSPYLFQPNDDRCIISGWGRGKDN QKVYS LRWGEVDLIGNCSQFYDPDRY YEKEMQCAGTRDGSIDACKGDSGGPLV CEDINNVTYVWGVVSWGENCEGKPEFPGVY TRVANYFDWISYHVGRSLVVSQHN V (SEQ ID NO: 23)
wt hCFI+GSSGG (接头)+wt hCFI	hCFI-hCFI 融合物	KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQR CIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQK SLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGI VEVKLVQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQ GADTQRRFKLSLSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTF TKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNG KYISQMKACDGINDCGDQSDELCKACQGKGFHCK SGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEE TEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMHIRRKRI VGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWIL TAAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYV

CFI 基础分子的描述	基础分子的命名	氨基酸序列
[0056]		DRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPWSPYLFQPNDDTCIVSGWGREGDNERVFSL QWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSID ACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWG ENCGK PEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV GSSGG KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQR CIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQK SLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGI VEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACL DLGFQQ GADTQRRFKLS DLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTF TKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNG KYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCK SGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEE TEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRI VGGKRAQLGDL PWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWIL TAAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYV DRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPWSPYLFQPNDDTCIVSGWGREGDNERVFSL QWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSID ACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWG ENCGK PEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 16)

[0057] 在一些实施方案中,基础分子本身可以是CFI变体,例如,在一些实施方案中,仅包含丝氨酸蛋白酶结构域的CFI变体(CFI-SPD)本身是CFI变体。在一些实施方案中,CFI变体来源于表1的任何基础分子,并且包含对与未修饰的CFI的环相对应的环的修饰。在一些实施方案中,CFI变体来源于表1的任何基础分子,并且包含取代突变。在一些实施方案中,CFI变体来源于表1的任何基础分子,并且包含CFI的一个或多个结构域的缺失。在一些实施方案中,CFI变体来源于表1的任何基础分子,并且包含CFI的A链和B链的倒位。

[0058] 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变体,其中该至少一个CFI结构域与任何物种的野生型CFI的结构域相对应。例如,该至少一个CFI结构域的氨基酸序列可以包括如SEQ ID NO:5中所示的来源于野生型人CFI的氨基酸序列。本文提供的包含来源于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CFI变体可以包含相对于SEQ ID NO:5中所示的序列的一个或多个修饰。例如,一个或多个修饰可以包括一个或多个氨基酸残基的缺失、一个或多个氨基酸残基的取代突变、一个或多个氨基酸残基的添加、CFI的一个或多个结构域的缺失、CFI的一个或多个结构域的取代、或CFI的一个或多个结构域的添加。

[0059] 在一些实施方案中,本文提供了包含任何物种的至少一个CFI结构域的CFI变体,其中该至少一个CFI结构域包含选自以下的任何一个或多个CFI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、清道夫受体富含半胱氨酸结构域(SRCR)、低密度脂蛋白受体1(LDLr1)和低密度脂蛋白受体2(LDLr2)结构域。在一些实施方案中,任何一个或多个CFI结构域是人CFI的结构域。在一些实施方案中,任何一个或多个CFI结构域包含来源于SEQ ID NO:5中所示的序列的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,CFI变体包含野生型CFI的所有结构域,即SPD、FIMAC结构域、SRCR结构域、LDLr1结构域和LDLr2结构域的每一个结构域,并且包含这些结构域的任何一

个或多个结构域的相对于野生型CFI的修饰。

[0061] 在一些实施方案中,CFI变体不包含与野生型CFI的结构域相对应的所有结构域。在一些实施方案中,CFI变体包含SPD。在一些实施方案中,CFI变体仅包含SPD,其中CFI的A链已经被缺失,在本文中称为“CFI-SPD”。在一些实施方案中,CFI-SPD包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列(如表1所示),其是人CFI的SPD。在一些实施方案中,CFI-SPD不包含相对于野生型CFI SPD的进一步修饰。在一些实施方案中,CFI-SPD包含相对于野生型CFI SPD的一个或多个修饰。在一些实施方案中,CFI-SPD包含相对于SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的至少一个修饰。

[0062] 在下文进一步详细描述CFI的示例性变体。示例性CFI变体包含相对于具有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CFI的一个或多个氨基酸残基取代。例如,在位置S499和I500处包含取代的CFI变体将在SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列中的位置S499和I500处具有取代。

[0063] 活性和特异性的调节

[0064] 本文提供的CFI变体的活性和特异性可以针对特定应用和治疗适应症进行调节(调整)。例如,活性和特异性可通过选择C3b降解剂或C4b降解剂或C3b和C4b两者的降解剂来调节。如本文所指,对底物的蛋白酶活性是指本公开的CFI变体裂解其底物C4b和C3b的能力。这可以多种方式表达,例如表达为C4b降解活性、针对C4b的蛋白酶活性、C3b降解活性、针对C3b的蛋白酶活性、裂解产物的产率等的增加。

[0065] 如本文所用,C3b降解剂是能够裂解C3b的CFI变体;同样,C4b降解剂是能够降解C4b的CFI变体。使用C3b降解剂并不意味着它不降解C4b。CFI变体可以是C3b降解剂和C4b降解剂两者,并且可能(但不一定)显示对一者的特异性超过另一者。

[0066] 本文提供的CFI变体具有修饰的特征,包括对底物的蛋白酶活性的增加或降低以及底物特异性的增加或降低。

[0067] 在一些实施方案中,作为特异性C3b降解剂的本公开的CFI变体可用于治疗疾病。

[0068] 在一些实施方案中,作为特异性C4b降解剂的本公开的CFI变体可用于治疗疾病。

[0069] 在一些实施方案中,作为C4b和C3b降解剂两者并且显示与野生型CFI相比改善的特征(例如,对C4b和C3b两者的活性增加)的本公开的CFI变体可用于治疗疾病。

[0070] 示例性CFI变体

[0071] 本文提供了CFI变体,这些CFI变体包含相对于野生型CFI的至少一个修饰或由其组成。

[0072] 非限制地,本公开考虑了表2中所述的示例性CFI变体。表2的变体包括本文所述的经修饰的CFI。为避免疑义,除非另外指明,否则当指明残基编号时,其是指SEQ ID NO:5(野生型人CFI)或与其相对应的序列。为避免疑义,举例来说,描述为P433A的变体是包含P433A取代的CFI变体,例如在SEQ ID NO:5(或与其相对应的序列)中包含P433A取代的CFI变体;本公开还提供了由P433A取代组成的CFI变体,例如其中SEQ ID NO:5具有P433A取代的CFI变体。

[0073] 本公开的CFI变体可以具有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或更多个修饰,例如取代、缺失、插入和融合。给定变体的修饰(例如取代)可以本领域技术人员公认的多种方式之一表示。例如,在D395A和E416A处具有取代的

hCFI变体可以被称为具有以下取代：“D395A和E416A”、“D395A-E416A”、“D395A+E416A”、“D395A/E416A”或“D395A;E416A”，这些取代在本文中可互换使用。在一些情况下，在D395A和E416A处具有取代的CFI变体可以被称为“hCFI;D395A;E416A”或CFI变体(D395A;E416A)”。如本文所述，具有其他修饰(诸如缺失)或修饰的组合(诸如缺失、融合和取代)的变体可符合类似命名风格。

[0074] 表2提供了本公开的示例性CFI变体。公开变体的该表和其他表可包括以下符号和缩写以及相关含义：HSA=人血清白蛋白；CFI=补体因子I； Δ =所示氨基酸范围缺失； \rightarrow 或 \succ =所示序列缺失并用所示氨基酸替换

[0075] 表2示例性CFI变体和CFI变体组合

[0076]

变体描述	变体描述	变体描述
K14A	N531A	Y408R
Y20A	P535A	Y408H
Y20F	Y408F	Y408I
D26A	Y408F; N531G	P535K
F29A	Y408L; N531G; E457G;	K534Q
R35A	E461Q; R462K; F464Y	E530D; N531G; G533A;
E38A	E530D	K534Q; P535K; E536N
M220A; K221Q	E457G	R321A
S507A	E461Q	N402E
S250A	R462K	N422K
S250L	F464Y	A502S; K504Q; F537K
Δ (K1-P305)	I317D; R318D; R319D;	A502S
D425A	K320D; R321K	K504Q
D425K	Δ (K1-P305); N531G	K504E
D425R	Δ (K1-P305); Y408L;	K504R
514-MDANNVT-520 (SEQ ID NO: 24) \rightarrow NG	N531G	K504A
Δ C-term (Δ 558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))	Δ (K1-P305); N531G;	K504G
R557A	P535A	K504L
K326A; R327A	P535G	K504P
Y408L; N531G	Y408L; N531G; E457G	K504H
L307G	Y408L; N531G; E457G;	A361G
N531G; P535A	E461Q	T495F; Y496L; D497E;
Y408L	Δ (K1-P305); Y408L;	S499G; I500K
456-REKDNERVFS-465 (SEQ ID NO: 26)	N531G; E457G; E461Q;	T495F; Y496L; D497E;
\rightarrow NTASSGADYPDE (SEQ ID NO: 27)	R462K; F464Y	S499G; I500K; G533A;
E457G; E461Q; R462K;	Y408L; N531G; P535A	K534Q; P535K; E536N;
F464Y	Δ (K1-P305); I317D;	F537K
E38A; D425R	R318D; R319D; K320D;	F537K
Y20F; D425R	R321K	F537R
S250A; D425R	K14A; D425R	Q467K
N531G	Y408G	Q467R
	Y408P	Q467K; F537K
	Y408D	E530G
	Y408A	E530G; N531G
	Y408N	E530F
	Y408T	
	Y408K	

[0077]

变体描述
E530Y
E530D; F537K
R557K
P558L
E457G; E461Q
R462A
R462D
E457G; E461G
N531G; E457G; E461Q
W381K
N404G
D506A
D506V
D506E
D506G
I322V
I322V; V323I
R327P
I322V; V323I; R327P
V323A
A328C; W468C
A328C; W468C; K326Y; R327N
Y408L; N531G; E461Q
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
Y20F; E38A; S250A; D425A
Y20F; E38A; S250A; D425A; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
V311-V565
K1-G310
V311-V565-G(13) (SEQ ID NO: 29) -K1-G310
C309S
C435S
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

变体描述
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; R462K
N531G; E457G; E461Q; F464Y
E416A
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; S507A
H370A
P384A
P384G
420-DGNK-424 (SEQ ID NO: 30) →GG
E536A
N85Q
N159Q
N476Q
N518Q
N52Q; N85Q; N159Q
N446Q; N476Q; N518Q
E457A
E457D
E457F
E457H
E457I
E457K
E457L
E457M
E457N
E457P
E457Q
E457R
E457S
E457T
E457W
E457Y
E457V
Y408E
K14A; Y20F; D26A; R35A; E38A
K14A; Y20F; D26A; R35A; E38A; L304G; P305G; K306G; L307G; S308G
Y408M
Y408Q

变体描述
Y408S
Y408W
D341A
Y408V
E461A
E461D
E461F
E461G
E461H
E461I
E461L
E461M
E461N
E461P
E461S
E461T
E461W
E461Y
E461V
R456A
I317D-R318D-R319D- K320D-R321K; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
K312A
R314A
K312A; R314A
P558S
F559L
I560V
Y563H
P558S; F559L; I560V; Y563H
P558G
L304G; P305G; K306G; L307G; S308G
N531D
N531E
N531F
N531H
N531I
N531K
N531L
N531M
I322T
N531P

[0078]

变体描述
N531Q
N531R
N531S
N531T
N531V
N531W
N531Y
Y403F
A405S
G406R
Q409D
A405S; G406R; Y408L; Q409D
A405S; G406A; Y408L; Q409D
Q409Y
Q409H
G406A
G406A; Y408L
T377G
W381A
W381A; P384A
W381A; ΔP384
G469L
R456N
K458A
G469L; R456N; E457T; K458A
G469L; R456N; K458A
G469L; R456N; K458A; E461G
G469L; R456N; K458A; E461G; F537K
K504D
K504F
K504I
K504M
K504N
K504S
K504T
K504V
K504W
K504Y
G406D
G406E
G406F
G406H

变体描述
G406I
G406K
G406L
G406M
G406N
G406P
G406Q
G406S
G406T
G406V
G406W
G406Y
G406D; Y408L
G406D; N531G
G406D; P535A
G406D; Y408L; N531G
G406D; Y408L; P535A
G406D; N531G; P535A
G406D; Y408L; N531G; P535A
K340G
I345G
K340G; I345G
Y372G
P384A
P384G
W381G
V390G
W381G; V390G
W381G; P384A; V390G
W381G; P384G; V390G
N404G
Q409G
K418G
D425G
K418G; D425G
S465G
G344R
G344K
G344Y
T346R
T346K
T346H
K504E
K504D

变体描述
E530R
E530K
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
N531G; P535A; S507A
F208Y
F246Y
F480Y
F537Y
F208Y; F246Y; F480Y; F537Y
H362T; V463S; R456I; D459W; S343R
H362T; V463S; R456I; D459W; S343K
H362T; V463S; R456F; D459W; S343R
H362T; V463S; R456I; S343R
H362T; R456I; D459W; S343R
H362T; R456I; S343R
H362T; R456I; S343K
K14A; D425R; Y408L- N531G
Y408L; E457G; S507A; N531G
E457G; N531G
E457G; Y408L
Y408L; N531G; E457G; R462K
Y408L; N531G; E457G; F464Y

[0079]

变体描述
Y408L; N531G; E461Q; R462K
Y408L; N531G; E461Q; F464Y
Y408L; N531G; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; F464Y
Y408L; E457G; R462K; F464Y
Y408L; E461Q; R462K; F464Y
N531G; E457G; E461Q; R462K
N531G; E457G; R462K; F464Y
N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G; R462K
Y408L; N531G; F464Y
Y408L; E457G; E461Q
Y408L; E457G; R462K
Y408L; E457G; F464Y
Y408L; E461Q; R462K
Y408L; E461Q; F464Y
Y408L; R462K; F464Y
N531G; E457G; R462K
N531G; E457G; F464Y
N531G; E461Q; R462K
N531G; E461Q; F464Y
N531G; R462K; F464Y
E457G; E461Q; R462K
E457G; E461Q; F464Y
E457G; R462K; F464Y
E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G
Y408L; E461Q
Y408L; R462K
Y408L; F464Y
N531G; E461Q
N531G; R462K
N531G; F464Y
E457G; R462K
E457G; F464Y
E461Q; R462K
E461Q; F464Y
R462K; F464Y
Y408L; N422K
E457G; N422K

变体描述
N531G; N422K
P535G; N422K
Y408L; P535G; N422K
E457G; P535G; N422K
N531G; P535G; N422K
Y408L; E457G; N422K
Y408L; N531G; N422K
E457G; N531G; N422K
Y408L; E457G; N531G; N422K
Y408L; E457G; P535G; N422K
E457G; N531G; P535G; N422K
Y408L; E457G; N531G; P535G; N422K
Y408L; E416A
E457G; E416A
N531G; E416A
P535G; E416A
Y408L; D425R; E416A
E457G; D425R; E416A
N531G; D425R; E416A
Y408L; E457G; E416A
Y408L; N531G; E416A
E457G; N531G; E416A
Y408L; E457G; N531G; E416A
Y408L; E457G; D425R; E416A
Y408L; N531G; D425R; E416A
E457G; N531G; D425R; E416A
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; E416A
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y; E416A
Y408L; N531G; D425R; E416A
E457G; E530Y
N531G; E530Y
P535G; E530Y
Y408L; D425R; E530Y
E457G; D425R; E530Y
N531G; D425R; E530Y
Y408L; E457G; E530Y
Y408L; N531G; E530Y
E457G; N531G; E530Y

变体描述
Y408L; E457G; N531G; E530Y
Y408L; E457G; D425R; E530Y
Y408L; N531G; D425R; E530Y
E457G; N531G; D425R; E530Y
Y408L; E457G; N531G; D425R; E530Y
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y
R365A
R365V
R365I
R365L
R365M
R365F
R365Y
R365W
R365G
R365P
R365S
R365T
R365N
R365Q
R365H
R365K
R365D
R365E
A366G
K368G
K368E
K424A
K424V
K424I
K424L
K424M
K424F
K424Y
K424W
K424G
K424P
K424S
K424T

[0080]

变体描述
K424N
K424Q
K424R
K424H
K424D
K424E
K423G
K423A
K423E
K423D
D549A
D549V
D549L
D549M
D549F
D549Y
D549W
D549T
D549N
D549Q
D549G
D549P
D549R
D549H
D549K
Y553A
Y553V
Y553I
Y553L
Y553S
Y553N
Y553Q
Y553R
Y553H
Y553K
Y553E
R557V
R557I
R557L
R557M
R557F
R557Y
R557W
R557S
R557T

变体描述
R557N
R557Q
R557G
R557P
R557H
R557D
R557E
T377G; N531G
T377G; E457G
T377G; E461Q
T377G; E457G; E461Q
T377G; E457G; E461Q; N531G
Y408L; N531G; R557A
N531G; P535A; R557A
E457G; E461Q; R557A
N531G; E457G; E461Q; R557A
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; R557A
N531G; P535A; R557K
E457G; E461Q; R557K
N531G; E457G; E461Q; R557K
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; R557K
Y408L; N531G; Δ C-term (Δ 558-PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
N531G; P535A; Δ C-term (Δ 558-PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
N531G; E457G; E461Q; Δ C-term (Δ 558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; Δ C-term (Δ 558-PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
Δ C-term (Δ 557- RPFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 28))
Q69G
L73G
L76G
H362G
H370G
F399G

变体描述
E401G
A405G
R456G
D459G
R484G
D501G
A502G
V526G
S527G
W528G
F537G
P538G
V540G
Y553G
A342G
R371G
R327G
S343G
Q373G
W375G
I382G
H383G
L386G
K387G
R388G
I389G
I391G
E392G
Y393G
K419G
D420G
N422G
N460G
R462G
V463G
Y408F; E457G; E461Q; N531G
Y408F; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
Y408F; E457G; E461Q; R462K; N531G
Y408F; E457G; E461Q; F464Y; N531G
E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G; R557K
E457G; E461Q; F464Y; N531G; R557K

[0081]

变体描述
E530F; P558S
E530Y; P558S
E457G; E461Q; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530F; N531G; P558S
Y408L; E457G; E461Q; R462K; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; F464Y; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y; N531G; P558S
Y408L; E457G; E461Q; R462K; E530Y; N531G; P558S
Y408F; E457G; E461Q; R462K; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; F464Y; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; K504H; N531G
E457G; E461Q; R462K; F464Y; K504H; N531G
Y408L; E457G; E461Q; R462K; K504H; N531G
E457G; E461Q; F464Y; K504H; N531G
E416A; E457G; E461Q; N531G
Y408L; E416A; E457G; E461Q; R462K; N531G
Y408F; E416A; E457G; E461Q; R462K; N531G
E416A; E457G; E461Q; F464Y; N531G
T377G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
T377G; Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G
T377G; E457G; E461Q; F464Y; N531G
T377G; E416A; K504H
E416A; K504H
T377G; K504H
N422K; E457G; E461Q; N531G
N422K; E457G; E461Q;

变体描述
Q467K; N531G
E416A; N422K; E457G; E461Q; Q467K; N531G
K504R; E530F; D425K; P558S
K504R; E530F; D425R; P558S
K504R; E530F; D425R; P558G
K504R; E530F; D425K; P558G
K504R; E530F; D425K; P558S; E457G; E461Q; N531G
K504R; E457G; E461Q; N531G
E530F; E457G; E461Q; N531G
D425R; E457G; E461Q; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G
P558S; E457G; E461Q; N531G
P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; E530F; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; E457G; E461Q; N531G
K504R; P558S; E457G; E461Q; N531G
E530F; P558S; E457G; E461Q; N531G
D425R; P558S; E457G; E461Q; N531G
D425R; E530F; E457G; E461Q; N531G
D425K; E530F; E457G; E461Q; N531G
D425R; E530F; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; E530F; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; E530F; E457G; E461Q; N531G
R557A; N531M
R557K; N531M
R557A; N531M; Y403F; K504Y
R557A; N531D; Y403F; K504Y

变体描述
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531G; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531D; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461L
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461T
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461V
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461Q
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461L
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461T
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461V
N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
N422K; E461Q
T377G; N422K
N531G; E457G; T377G
N531G; E461Q; N422K
N531G; E461Q; T377G
N531G; N422K; T377G
E457G; E461Q; N422K
E457G; N422K; T377G
E461Q; N422K; T377G
N531G; E457G; N422K; T377G
N531G; E461Q; N422K; T377G
E457G; E461Q; N422K; T377G
T377G; N422K; E457G; E461Q; N531G
D425K; Y408M
D425K; E530F
D425K; F537K
D425K; K504R
D425K; P558S
Y408M; E530F
Y408M; K504R
Y408M; P558S
E530F; F537K
E530F; K504R
E530F; P558S

[0082]

变体描述
F537K; K504R
F537K; P558S
K504R; P558S
D425K; Y408M; F537K
D425K; Y408M; K504R
D425K; Y408M; E530F; F537K
D425K; Y408M; E530F; P558S
D425K; E530F; F537K; K504R
Y408M; E530F; F537K; K504R
Y408M; F537K; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; F537K; K504R
D425K; Y408M; E530F; F537K; P558S
D425K; Y408M; E530F; K504R; P558S
D425K; Y408M; F537K; K504R; P558S
D425K; E530F; F537K; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; F537K; K504R; P558S
D425K; E457G; E461Q; K504R; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G; P558S
T377G; Y408M; N422K; E457G; E461Q; E530F; N531G
T377G; N422K; D425K; E457G; E461Q; E530F; N531G
E457G; E461Q; N531G; S507A
E457G; S507A
E461Q; S507A
N422K; S507A
T377G; S507A
D425K; S507A
Y408M; S507A
P558S; S507A
E530F; S507A
F537K; S507A
K504R; S507A
Y408F; S507A

变体描述
R557A; S507A
E416A; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
N52Q; N159Q
N476Q; N518Q
Y408F; N531M
Y408F; K504Y
G406A; Y403F
D425K
Y403F; D425K; E457G; N531G
G406A; D425K; E457G; E461Q; N531G
Y403F; G406A; D425K; E457G; E461Q; N531G
Y403F; D425K; E457G; E461Q; K504Y; N531G
Y403F; G406A; D425K; E457G; E461Q; K504Y; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G; R557A
R557A
Δ (V565)
F559Y
Δ (S308)
F559W
F559H
L307F
L307H
L307W
L307Y
P433A
P433G
P433F
Δ (Y496)
Δ (D497)
Δ (Y496; D497)
S499G
S499A
S499K
S499V
Y496L
S499G; I500K
S499A; I500K
T495F; Y496L; S499G;

变体描述
I500K
K423R
R62A
R62E
R62L
R62H
E401K
E401R
E401A
E401F
N402G
N402K
N402R
H554F
H554K
R371E
A342R
K51R; N52A; A55P; T59M; R61G; F64Y
N52A
A55P
T59E
L73F
L73D
Δ (275-CAGFASVAQE-284 (SEQ ID NO: 31)) >CEEDRQQNIPKGL ARSAQGEAEIETE (SEQ ID NO: 32)
R484A
R484K
R484E
Δ (V565) >VG
Δ (V565) >VY
E416K
E416R
D395A
D395G
D395K
D395R
D395A; D425A
D395A; E416A
D395A; E416A; D425A
N402D
K368D
K1103A

变体描述	变体描述	变体描述
E1106A	Q69H; L73F; G79E;	D988N
I1134G	T80I; L83S; N84H	L990S
I208G	Δ (1-KVITYTS-6 (SEQ ID NO: 33)) >RSPSASDLP (SEQ ID NO: 34)	V1108N
H383K; D385N; K387S;	M186E; G187L; Y188S;	E1110S
R388Q; E392Q; Y393T;	Q189N; D190G; F191L;	Q1131N
D395K; K419M; D420H;	D193G	I1133S
G421T; N422G; D425E	H948N	N422A
H383K; R388Q; E392Q;	L950S	T377A
Y393T; K419M		
K51D; T59E; R61D		

[0083] B. 包含补体因子I的融合构建体

[0085] 本文提供了用于融合构建体的制剂,这些融合构建体包含第一组分(CFI部分)和至少第二组分,该第一组分包含补体因子I的至少一个结构域,其中该第一组分和第二组分以及后续组分被融合(例如连续的或通过任选的接头隔开)。这些融合构建体在本文中称为“CFI融合构建体”或简称为“融合构建体”。在一些实施方案中,融合构建体包含附加组分,例如第三组分、第四组分等。

[0086] 在一些实施方案中,融合构建体的第二组分和后续组分是蛋白质。在一些实施方案中,第二组分和/或后续组分不是蛋白质。

[0087] 本公开的融合构建体的组分可以通过任选的接头保持在一起。它们可以是至少一个氨基酸的任何合适长度。接头可以是柔性接头,并且可以是长度为约1个至约20个氨基酸残基的肽,其中这些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,其中n是约1至约20的任何数(SEQ ID NO:35)。示例性的接头是(GGSS)ⁿGG(SEQ ID NO:36),其中n是约1至约20的任何数。示例性接头是(GGSSGG)ⁿ,其中n是约1至约20的任何数(SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,接头是蛋白酶敏感的可切割接头。连接融合构建体的示例性接头的长度可以是1-50个、5-50个、10-50个、15-50个、20-50个、25-50个、1-20个、2-20个、3-20个、4-20个、5-20个、6-20个、7-20个、8-20个、9-20个、10-20个、3-15个、3-10个、3-9个、3-8个、3-7个、3-6个、3-5个、4-15个、4-10个、4-9个、4-8个、4-7个、4-6个、4-5个、5-15个、5-10个、5-9个、5-8个、5-7个、5-6个、6-15个、6-10个、6-9个、6-8个或6-7个氨基酸。

[0088] CFI+半衰期延长物融合构建体

[0089] 在一些实施方案中,融合构建体包含野生型CFI或CFI变体(第一组分)和至少第二组分,并且其中该第二组分是半衰期延长物。因为天然存在的CFI具有相对短的半衰期,所以在一些实施方案中增加CFI或其变体的半衰期可能是有利的。通过使用作为半衰期延长物的第二组分,与野生型CFI相比,活性可以增加,或者它可以改善另一个特征。例如,野生型CFI或CFI变体可以通过将CFI与半衰期延长物融合来延长它们的半衰期。

[0090] 示例性半衰期延长物包括但不限于白蛋白,诸如人血清白蛋白、PEG、不可生物降解的聚合物、可生物降解的聚合物和Fc。在一些实施方案中,第二组分是蛋白质,并且是半衰期延长物,诸如白蛋白或Fc。在一些实施方案中,第二组分不是蛋白质,并且半衰期延长物,诸如PEG。在一些实施方案中,半衰期延长物包含肽重复序列。

[0091] 在一些实施方案中,第二组分是半衰期延长物,并且是白蛋白。注意,如本文所用,

白蛋白是指任何白蛋白,诸如任何血清白蛋白、或白蛋白变体、或白蛋白衍生物。例如,白蛋白变体包括包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列相对应(野生型人血清白蛋白(HSA))的至少一个修饰或与任何非人物种的白蛋白的氨基酸序列相对应的至少一个修饰的任何白蛋白。在示例性实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白(HSA)并且提供于SEQ ID NO:7中。

[0092] 包含野生型CFI和HSA的示例性融合构建体在本文中被称为“CFI-HSA”并且在下文进一步详细描述。本公开的示例性融合构建体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,本公开的融合构建体包含白蛋白和本公开的CFI变体。示例性CFI变体提供于下表2中。

[0094] 融合构建体的结构排列

[0095] 在一些实施方案中,本文提供了包含至少第一组分和第二组分的融合构建体,其中该第一组分是本文提供的野生型CFI或CFI变体中的任一者(CFI部分),其中该第一组分和第二组分融合,并且其中该第二组分融合至该CFI部分的N末端。在一些实施方案中,第二组分融合至CFI部分的C末端。在一些实施方案中,第二组分融合至CFI部分的C末端,并且第三组分进一步融合至CFI部分的N末端。在一些实施方案中,第二组分融合至CFI部分的N末端,并且第三组分进一步融合至CFI部分的C末端。

[0096] 转至表3,SEQ ID NO:1是野生型血浆来源的人CFI(称为“CFI-PD”)的氨基酸序列,并且具有前导序列。用于与第二组分融合的野生型CFI可以包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,其不包括SEQ ID NO:1中存在的前导序列。小鼠Ig kappa链V-III区MOPC 63前导序列(SEQ ID NO:2)可替代地用于本文提供的CFI融合构建体中的任一CFI融合构建体的重组生产。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,其中该至少一个CFI结构域包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

[0097] 本公开的示例性融合构建体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0098] 表3:示例性CFI融合构建体的组分

[0099]

描述	序列
野生型血浆来源的人 CFI (CFI-PD)	MKLLHVLLFLCFHLRFCVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 1)
前导序列 (用于 CFI-HSA 的小鼠前导序列)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 2)
人 CFI 前导序列	MKLLHVLLFLCFHLRFC (SEQ ID NO: 3)
无信号序列的 SEQ ID NO: 1 的野生型 CFI	KVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRI

描述	序列
	VIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPN DTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEME CAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKV ANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 5)
接头	GGSSGG (SEQ ID NO: 6)
人血清白蛋白 (HSA)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHV KLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN LIKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR VTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGL (SEQ ID NO: 7)
[0100] 与 CFI 连接的 HSA (CFI-HSA)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHV KLV NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN LIKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR VTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGLGGSSGGKVITYTSQEDL VEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNG TAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPG TKFLNNGTCTAEGKFSVS LKHGNTDSEGIVEVKLV DQDKTMFICKSSWSMREANVACL DLG FQQGADTQRRFKLS DLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRR TMGYQDFADVVCYTQKADSPMD DFFQCVNGKYISQMKACDGI NDCGDQSDELCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVD CITG EDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLS CGVKN RMHIRRK RIVGGKRAQLGDL PWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWI LTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHEN YNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPN DTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKE MECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWGE NCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 21)

[0101] III. 含CFI的制剂的用途

[0102] 本公开的制剂可用于受试者的治疗。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] A.非眼部病症的治疗

[0104] 在一些实施方案中,本文提供的制剂可用于治疗受试者的非眼部病症。在一些实施方案中,本文提供了一种治疗对其有需要的受试者的眼部病症的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本文提供的制剂中的任一制剂。

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

[0106] 在一些实施方案中,非眼部病症是系统性急性适应症。在一些实施方案中,非眼部病症是选自以下的系统性急性适应症:急性肾小球肾炎、急性肾损伤、急性呼吸窘迫综合征、细菌性脑膜炎、脑出血、烧伤、冠状病毒感染症、Epstein-Barr病毒感染、造血干细胞移植、缺血再灌注损伤、莱姆病、心肌梗死、器官移植、牙周炎、肺炎、先兆子痫、血吸虫病、败血症、卒中、血栓栓塞和外伤性脑损伤。

[0107] 在一些实施方案中,非眼部病症是系统性慢性适应症。在一些实施方案中,非眼部病症是选自以下的系统性慢性适应症:阿尔茨海默病、抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 相关性血管炎、抗磷脂综合征、哮喘、动脉粥样硬化、非典型溶血性尿毒综合征 (aHUS)、自身免疫性溶血性贫血、大疱性类天疱疮 (BP)、C3肾小球病、慢性肾衰竭、慢性阻塞性肺病 (COPD)、冷凝集素病 (CAD)、克罗恩病、糖尿病性神经病变、全身型重症肌无力 (gMG)、肉芽肿性多血管炎 (GPA)、格林-巴利综合征 (GBS)、遗传性血管性水肿 (HAE)、化脓性汗腺炎 (HS)、IgA肾病 (IgAN)、狼疮性肾炎 (LN)、膜性肾小球肾炎 (MN)、显微镜下多血管炎 (MPA)、运动神经元疾病、多灶性运动神经病 (MMN)、多发性硬化 (MS)、非胰岛素依赖型糖尿病、骨关节炎、胰腺炎、帕金森病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、移植后淋巴增生性疾病、蛋白丢失性肠病、牛皮癣、坏疽性脓皮病、类风湿关节炎、精神分裂症 (SZ)、系统性红斑狼疮 (SLE)、免疫性血小板减少症 (ITP) 和溃疡性结肠炎、Lambert-Eaton肌无力综合征 (LEMS)、CHAPLE综合征 (CD55缺陷)、血栓性微血管病 (TMA) 和慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病 (CIDP)、亨廷顿病和缺血再灌注损伤。

[0108] 在一些实施方案中,可通过使用本文提供的包含作为C4b降解剂的CFI变体或融合构建体的制剂治疗的疾病包括但不限于非眼部病症。在一些实施方案中,非眼部病症是系统性慢性适应症。在一些实施方案中,非眼部病症是选自以下的系统性慢性适应症:阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 相关性血管炎、抗磷脂综合征、哮喘、动脉粥样硬化、非典型溶血性尿毒综合征 (aHUS)、自身免疫性溶血性贫血、大疱性类天疱疮 (BP)、C3肾小球病、慢性肾衰竭、慢性阻塞性肺病 (COPD)、冷凝集素病 (CAD)、克罗恩病、糖尿病性神经病变、全身型重症肌无力 (gMG)、肉芽肿性多血管炎 (GPA)、格林-巴利综合征 (GBS)、遗传性血管性水肿 (HAE)、化脓性汗腺炎 (HS)、IgA肾病、狼疮性肾炎 (LN)、膜性肾小球肾炎 (MN)、显微镜下多血管炎 (MPA)、运动神经元疾病、多灶性运动神经病 (MMN)、多发性硬化 (MS)、非胰岛素依赖型糖尿病、骨关节炎、胰腺炎、帕金森病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、移植后淋巴增生性疾病、蛋白丢失性肠病、牛皮癣、坏疽性脓皮病、类风湿关节炎、精神分裂症 (SZ)、系统性红斑狼疮 (SLE)、免疫性血小板减少症 (ITP)、温抗体型自身免疫性溶血性贫血 (wAIHA)、免疫复合物膜性增生性肾小球肾炎 (IC-MPGN) 和溃疡性结肠炎、Lambert-Eaton肌无力综合征 (LEMS)、CHAPLE综合征 (CD55缺陷)、血栓性微血管

病 (TMA) 和慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病 (CIDP)、亨廷顿病和缺血再灌注损伤。

[0109] 在一些实施方案中,非眼部病症是非肿瘤性的。

[0110] 在一些实施方案中,非眼部病症是肿瘤性的。在一些实施方案中,非眼部病症是肿瘤性的,并且特征在于实体肿瘤或液体肿瘤。在一些实施方案中,非眼部病症的特征在于实体肿瘤,并且选自:结肠直肠肿瘤、激素难治性前列腺癌、黑色素瘤、转移性乳腺癌、转移性结肠直肠癌、转移性食管癌、转移性胰腺癌、转移性胃癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、胰腺肿瘤、鳞状细胞癌和胃肿瘤。在一些实施方案中,非眼部病症的特征在于液体肿瘤,并且选自:急性骨髓性白血病、B细胞淋巴瘤和霍奇金病。

[0111] B.眼部病症的治疗

[0112] 在一些实施方案中,本文提供的制剂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对其有需要的受试者的眼部病症的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本文提供的制剂中的任一制剂。

[0113] 在一些实施方案中,眼部病症的特征在于CFI缺乏。在一些实施方案中,眼部病症的特征在于补系统失调。

[0114] 在一些实施方案中,眼部病症的特征在于存在功能障碍的CFI基因。在一些实施方案中,眼部病症的特征在于补系统失调和低CFI水平。

[0115] 在一些实施方案中,眼部病症选自:糖尿病性黄斑水肿 (DME)、糖尿病性视网膜病、干性年龄相关性黄斑变性 (AMD)、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、斯塔格特病、葡萄膜炎和玻璃体视网膜病变。

[0116] 在一些实施方案中,其中眼部病症是非肿瘤性的。

[0117] C.施用

[0118] 本文所述的制剂的体内施用可以通过静脉内或皮下进行。

[0119] 在示例性实施方案中,本文所述的制剂的施用是皮下施用。在一些实施方案中,皮下施用是每天、每隔一天、每周两次或每周一次施用。

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的制剂的施用是静脉内施用。

[0121] 如本文一般考虑的,本文所述的CFI变体或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变体或融合构建体可以无活性单链形式递送。在一些实施方案中,所递送的CFI变体包括单链非活性形式和双链活性形式两者。

[0122] D.剂量

[0123] 在一些实施方案中,本文所述的制剂中的任一制剂可以约0.05mg/kg至约10mg/kg的剂量施用于对其有需要的受试者。在一些实施方案中,剂量为约1mg/kg。在一些实施方案中,本文所述的制剂中治疗性CFI、变体或融合构建体的施用是皮下施用,剂量为约0.05mg/kg、约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约3.5mg/kg、约4mg/kg、约4.5mg/kg、约5mg/kg、约5.5mg/kg、约6mg/kg、约6.5mg/kg、约7mg/kg、约7.5mg/kg、约8mg/kg、约8.5mg/kg、约9mg/kg、约9.5mg/kg或约10mg/kg。在一些实施方案中,本文所述的制剂中治疗性CFI、变体或融合构建体的施用是静脉内施用,剂量为约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约2.5mg/kg、约3mg/kg、约3.5mg/kg、约4mg/kg、约4.5mg/kg、约5mg/kg、约5.5mg/kg、约6mg/kg、约6.5mg/kg、约7mg/kg、约7.5mg/kg、约8mg/kg、约8.5mg/kg、约9mg/kg、约9.5mg/kg或约10mg/kg。在一些实施方案中,

本文所述的治疗性CFI变体或融合构建体的施用是每天施用、每隔一天施用、每周一次施用或每周两次施用。

[0124] 在一些实施方案中,本文提供的制剂中的治疗性CFI、变体或融合构建体在血浆中的目标水平可以是约0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约8.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约9.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约10.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约11.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约13.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约14.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约15.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约16.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约17.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约18.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约19.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约20.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约21.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约23.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约24.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约25.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约26.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约27.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约28.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约29.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。目标水平可以是约10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或甚至约300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0125] 实施例

[0126] 实施例1:CFI、CFI变体和融合蛋白的制备

[0127] 概述

[0128] 下文提供的方法适用于野生型CFI、CFI变体以及包含野生型CFI和CFI变体的融合构建体的表达、纯化、活化和体外唾液酸化。

[0129] 对于实施例1,对CFI-HSA的提及是指融合至人野生型CFI (SEQ ID NO:21)的N末端的人血清白蛋白。

[0130] 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,并通过尺寸化柱纯化。对活化的CFI-HSA蛋白质进行体外唾液酸化以增加CFI-HSA的唾液酸化总量。最后,使用抗白蛋白亲和纯化来纯化唾液酸化的蛋白质,并通过尺寸排阻柱色谱法进行精制。

[0131] 表达

[0132] 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基因插入到表达载体 (Lake Pharma, Hayward, CA) 中。将所得质粒DNA转化到大肠杆菌中。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。质粒DNA在琼脂糖凝胶上电泳以进行质量评估,并在进行转染前确认序列。

[0133] 将1.0升混悬TunaCHO™细胞接种在摇瓶中,并使用无血清化学限定培养基扩增。转染的当天,将扩增的细胞接种到含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。该蛋白在37°C、125RMP和8%CO₂浓度条件下表达14天。在表达14天结束时,将细胞离心并收集上清液,以纯化分泌的CFI-HSA。

[0134] 纯化

[0135] 使含有表达的CFI-HSA蛋白质的上清液通过CaptureSelect™人白蛋白亲和基质的10ml重力流柱(ThermoFisher Scientific)。用10倍柱体积的20mM磷酸钠缓冲液洗涤柱结合的蛋白质。结合的CFI-HSA蛋白分两步洗脱:第一步,用3倍柱体积的20mM Tris-HCl, pH 7.0缓冲液和2M MgCl₂洗脱,第二步,用3倍柱体积的20mM柠檬酸, pH 3.0洗脱。来自步骤1和2的洗脱液以5ml级分收集。将步骤2洗脱液各级分用10%中和缓冲液(1.5M tris-HCL, pH 7.4)中和。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)显现条带。CFI-HSA在非还原性凝胶上以130kDa条带电泳,在还原性凝胶上以102kDa和28kDa条带电泳。将具有最大CFI-HSA浓度和纯度的级分合并,以进行进一步加工。

[0136] 弗林蛋白酶活化

[0137] CFI-HSA被表达为无活性的单链前体蛋白,并且通过弗林蛋白酶(另一种丝氨酸蛋白酶)活化。弗林蛋白酶是在其保守的RRKR序列(也称为弗林蛋白酶识别序列)处裂解CFI的内切蛋白酶,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。

[0138] 通过将每mg纯化的CFI-HSA与4μg重组弗林蛋白酶在Tris-NaCl(tris缓冲盐溶液)、2.5mM CaCl₂和0.5%CHAPS中在30℃下温育18小时来进行CFI-HSA的裂解,以产生其活化形式的蛋白。CFI-HSA蛋白浓度维持在1.4mg/ml。这导致超过90%的蛋白活化。通过尺寸排阻色谱法将活化的蛋白与未活化的CFI-HSA和其他蛋白分离。使用HiLoad 16/600Superdex200柱(GE Healthcare Life Sciences)和磷酸盐缓冲盐溶液(PBS、137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄, pH 7.4)作为流动相进行尺寸排阻色谱法(SEC)。通过CE-SDS(LabChip GXII, Perkin Elmer)分析收集的级分。将含有靶蛋白的级分合并并通过SE-UPLC分析。

[0139] 体外唾液酸化

[0140] 将活化的CFI-HSA蛋白质进行体外唾液酸化。简而言之,唾液酸化在两步酶促反应中进行。首先,在10mM UDP-半乳糖、5mM MnCl₂和100mM MES, pH 6.5缓冲液中,利用1:200摩尔比的半乳糖基转移酶(GalT1)和CFI-HSA,以200μl的体积进行CFI-HSA的半乳糖基化反应。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,在80μM碱性磷酸酶、6.1mM CMP-NANA、10mM ZnCl₂和200mM MES, pH 6.5缓冲液中,利用1:50摩尔比的α-2,6-唾液酸转移酶和纯化的CFI-HSA,在37℃下以250μl的体积进行唾液酸化反应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)和质谱分光光度曲线(MS)分析(Lake Pharma分析服务)来测定CFI-HSA上唾液酸链的程度和特征,在下文进一步详细描述。

[0141] 简而言之,通过将20μl每个样品与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加入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加入160μl去离子(dI)水,以使总体积达到200μl。将10μl样品注入Agilent UHPLC Poroshell C18柱中,以在30℃下在4%甲醇、8%乙腈的水溶液(线A1)和100% ACN(线B1)中以0.4ml/分钟的流速层析。在373/448nm波长处记录峰。通过在同一柱上层析由试剂盒提供的1-2000pmol NANA(N-乙酰

神经氨酸, Neu5Ac), 生成总峰面积相对于皮摩尔 (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。

[0142] 通过标准胰蛋白酶Q-TOF质谱仪进行质谱分析。简而言之, 将所有样品通过DTT和碘乙酰胺处理、还原和烷基化, 然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。

[0143] 精制

[0144] 使用HiLoad 16/600Superdex 200柱(GE Healthcare Life Sciences)和磷酸盐缓冲盐溶液作为流动相对纯化的CFI-HSA蛋白质进行尺寸排阻色谱法 (SEC)。通过CE-SDS (LabChip GXII, Perkin Elmer) 分析收集的级分。将含有靶蛋白的级分合并, 使浓度达到5mg/ml, 并将样品快速冷冻以在-80°C下储存。

[0145] CFI-HSA变体的表达和纯化

[0146] CFI-HSA变体的DNA是利用标准技术通过合成或通过定点诱变生成的。如本文关于野生型CFI-HSA蛋白所述, 在250ml TunaCHO™细胞混悬液中表达蛋白, 不同之处在于表达进行7天而不是14天。7天后, 将细胞离心, 并使条件培养基通过CaptureSelect™人白蛋白亲和基质的重力流柱(ThermoFisher Scientific)。用10倍柱体积的20mM磷酸钠缓冲液洗涤柱结合的蛋白质。用3倍柱体积的20mM Tris-HCl, pH 7.0缓冲液和2M MgCl₂以5ml级分洗脱结合的CFI-HSA蛋白。将CFI-HSA或其变体缓冲液交换(通过透析或自旋浓缩器)到30mM HEPES、150mM NaCl、2.5mM CaCl₂, pH 7.4中。将重组人弗林蛋白酶以1:25的摩尔比(弗林蛋白酶:CFI-HSA)加入到CFI-HSA中, 并将反应混合物在30°C下温育16小时。将2微克活化混合物在9% SDS-PAGE凝胶上电泳以评估活化效率。一般来讲, 实现超过80%的活化。

[0147] 实施例2: 制剂开发研究I

[0148] 对于实施例2, 对CFI-HSA的提及是指融合至野生型CFI (SEQ ID NO:21) 的N末端的人血清白蛋白。以约150mg/mL的浓度配制CFI-HSA。

[0149] 该研究被设计为在一系列液体和冻干制剂中探究CFI-HSA的物理和化学性质, 以评估提供稳定性的最佳选择的条件。例如, 为了能够皮下施用, 含有CFI的组合物的高浓度和稳定性将是期望的。

[0150] 在该研究中检验的活性药物成分 (API) 是CFI-HAS (SEQ ID NO:21)。用于该研究材料包括以下:

[0151] (1) 药物: CFI-HSA, 153.4mg/mL, F1制剂

[0152] (2) 用于配制和分析CFI-HSA的化学品和材料如下, 如表2.1所示:

[0153] 表2.1: 材料

[0154]

化学品	供应商	目录#	CAS#	级别
乙酸	EMD	AX0073-9	64-19-7	
山梨醇	EMD	111597	50-70-4	EP、BP、NF、JP
NaCl	EMD	106404	7647-14-5	EP
琥珀酸	Sigma Aldrich	1623411	110-15-6	USP
精氨酸·HCl	Sigma Aldrich	A4599	1119-34-2	EP、JP、USP
蔗糖	Pfanstiehl	S-124-2-MC	57-50-1	NF、EP、JP、ChP
海藻糖	Pfanstiehl	T-104-4	6138-23-4	NF、EP、JP、ChP

甘氨酸	JT Baker	0581-05	56-40-6	USP
聚山梨酸酯80	Croda	Super Refined™	9005-65-6	USP、JP、EP

[0155] 在该稳定性研究中,在最佳pH范围内在含有各种张力调节剂/增量剂的十二(12)种制剂中监测CFI-HSA的稳定性。表2.2提供了被测的十二种制剂的制剂基质。

[0156] (1) pH 5-7

[0157] (2) 缓冲液(在本文中也可互换地称为缓冲剂)

[0158] (3) 张力调节剂(对于非离子缓冲剂是山梨醇或海藻糖,而对于离子缓冲剂是氯化钠)

[0159] (4) 增量剂(海藻糖或甘氨酸)

[0160] (5) 表面活性剂

[0161] 表2.2:制剂基质

制剂编号 (Form No.)	制剂类型	缓冲液 (20mM)	pH	张力调节剂/增量剂	API (mg/mL)	表面活性剂
[0162] 1	液体	乙酸钠	5	5%山梨醇	150	0.02% PS 80
2	液体	乙酸钠	5.5	5%山梨醇	150	0.02% PS 80
3	液体	乙酸钠	5.5	150mM NaCl	150	0.02% PS 80
4	液体	乙酸钠	5.5	70mM 精氨酸·HCl、 2%蔗糖、60mM 甘氨酸	150	0.02% PS 80

制剂编号 (Form No.)	制剂类型	缓冲液 (20mM)	pH	张力调节剂/增量剂	API (mg/mL)	表面活性剂
				酸		
[0163] 5	液体	组氨酸·HCl	6	70mM 精氨酸·HCl、 2%蔗糖、60mM 甘氨酸	150	0.02% PS 80
6	液体	组氨酸·HCl	6	150mM NaCl	150	0.02% PS 80
7	Lyo	琥珀酸钠	5	10%海藻糖	150	0.02% PS 80
8	Lyo	琥珀酸钠	5	5%海藻糖 2.0%甘氨酸	150	0.02% PS 80
9	Lyo	组氨酸·HCl	6	10%海藻糖	150	0.02% PS 80
10	Lyo	组氨酸·HCl	6	5%海藻糖、2%甘氨酸	150	0.02% PS 80
11	Lyo	组氨酸·HCl	7	10%海藻糖	150	0.02% PS 80
12	Lyo	组氨酸·HCl	7	5%海藻糖、2%甘氨酸	150	0.02% PS 80

[0164] *Form. = 制剂; API = 活性药物成分, CFI-HSA; Lyo = 冻干

[0165] 冻干制剂制备

[0166] 对于每种制剂,将CFI-HSA DS溶液装载到透析盒(Slide-A-Lyzer®透析盒, 10, 000MWC0)中。将制剂透析到它们各自的制剂缓冲液中。

[0167] 将制剂在无菌BSC中通过0.2µm PES膜进行无菌过滤,并填充至0.2mL到2cc无菌玻

璃瓶中。然后将小瓶用1yo排气塞部分塞住,并使用表2中列出的参数进行冻干。冻干后,用氮气回填腔室并将小瓶塞住。然后取出小瓶,并加塞、压紧并标记。在冻干前留出附加的小瓶并冷冻,以便与时间零点同时进行冻干前分析。

[0168] 液体制剂制备

[0169] 对于每种制剂,将CFI-HSA DS溶液装载到透析盒 (Slide-A-Lyzer[®] 透析盒,10,000MWC0) 中。将制剂透析到它们各自的制剂缓冲液中。将制剂在无菌BSC中通过0.2 μ m PES膜进行无菌过滤,并填充至0.2mL到2cc无菌玻璃瓶中。然后将小瓶加塞、压紧并标记。

[0170] 分析方法

[0171] 采用以下分析方法。

[0172] (1) 目视检查:在白色光源(13W荧光灯)下以黑色或白色为背景进行目视检查。在每个时间点获取所有制剂的数码照片。

[0173] (2) 浓度测定:使用 $1.041\text{mg/mL}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 的E.C.,经由SoloVPE通过A280分析CFI-HSA的浓度。

[0174] (3) SE-HPLC:用以下参数进行尺寸排阻HPLC色谱法。

- HPLC: Agilent 1260 系统
- 柱: Agilent AdvanceBio SEC 300Å,
4.6×300mm, 2.7 μ m, LC 柱 P/N:
PL1580-5301
- 流动相: 150mM 磷酸钠, pH 6.9 ± 0.1
- 稀释剂: DI 水
- 样品浓度: 0.5mg/mL
- [0175] • 流速: 0.35mL/min
- 运行时间: 15 分钟
- 自动取样机温度: 5°C
- 柱温度: 30°C
- 吸光度检测: 280nm、215nm
- 进样量: 20 μ L
- 进样载荷: 15 分钟

[0176] (4) FlowCAM:FlowCAM颗粒成像系统结合了光学、电子学和流体学,用于颗粒的自动分析。光学系统用于捕获流体中颗粒通过流动池时的实时图像。成像软件提供评估粒度和形态的能力。对所有样品进行分析,并在分析前在75托下脱气30分钟。

[0177] (5) 亚环境DSC:使用具有Intercooler II的Pyris Diamond DSC,将约10个 μ L的每个样品在-60°C下冷冻。将样品以10°C/min的升温速率升温直至解冻,并记录升温过程中的热流。

[0178] (6) 傅立叶变换红外光谱 (FTIR):FTIR是用于获得气体、液体或固体的吸收的红外光谱的技术。IBI使用FTIR-660Plus光谱仪,其收集样品材料对红外辐射的吸收与波数[cm^{-1}]的关系。该数据产生关于多肽的二级结构的信息。

[0179] 表面活性剂筛选

[0180] 用水将CFI-HSA药物物质稀释至15mg/mL。然后将溶液通过0.2 μ m注射器过滤器无菌过滤,并以1.0mL的填充体积填充到3cc小瓶中。然后四个小瓶中分别直接掺入1% PS20、1% PS80或10% F-68的储备溶液,以达到0.015% PS20、0.015% PS80或0.15% F-68的最终浓度。四个填充的小瓶用作无表面活性剂的对照。每个条件总共制备四个小瓶。将每个条件的小瓶放置在震荡器上,并在环境温度下以1000rpm搅拌四小时。每个条件一(1)小瓶,在室温下同时温育四小时。

[0181] 表2.3:表面活性剂筛选基质

	表面活性剂	CFI-HSA (mg/mL)
[0182]	无(无表面活性剂)	15.3
	0.015% PS20	
	0.015% PS80	
	0.15% F-68	

[0183] 在搅拌四小时(轨道式震荡器,1000RPM,室温)以及室温下静态条件四小时之后,研究含有和不含表面活性剂的CFI-HSA的稳定性。

[0184] 在搅拌和静态条件之后,无论表面活性剂如何,所有样品均呈澄清、无色,并且无可见颗粒。

[0185] 在搅拌或静态温育四小时后,含有或不含PS80、PS20和F68的所有样品观察到具有相似的色谱曲线。所有样品也显示出相似的纯度和总峰面积(表2.4)。

[0186] 表2.4:表面活性剂筛选SE-HPLC结果

样品	静态样品		搅拌样品 1		搅拌样品 2	
	总面积百分比 (%)		总面积百分比 (%)		总面积百分比 (%)	
	HMW 1	主峰	HMW 1	主峰	HMW 1	主峰
[0187] 无表面活性剂	0.2	99.8	0.6	99.4	0.5	99.5
聚山梨酸酯 80	0.2	99.8	0.5	99.5	0.5	99.5
聚山梨酸酯 20	0.2	99.8	0.6	99.4	0.4	99.6
泊洛沙姆 F68	0.2	99.8	0.3	99.7	0.2	99.8

[0188] FlowCam分析示于表2.5中。不含表面活性剂的样品显示出颗粒计数的显著增加。然而,无论表面活性剂如何,所有含表面活性剂的样品均显现出相对较低的颗粒浓度。

[0189] 表2.5:表面活性剂筛选FlowCam结果

颗粒/mL	表面活性剂															
	无表面活性剂			PS80 (0.02%)			PS20 (0.01%)			Pluronic F68 (0.1%)						
	静态	搅拌		静态	搅拌		静态	搅拌		静态	搅拌		静态	搅拌		
[0191]		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
>2 μ m	498	5111	6896	1516	648	409	1904	818	259	1504	3442	1335	80	2143	988	2232
>5 μ m	90	1365	2173	608	279	109	509	120	110	578	978	309	30	668	265	578
>10 μ m	50	259	239	150	10	35	70	20	20	90	190	70	10	90	49	60
>25 μ m	0	10	0	0	0	7	0	0	0	10	50	0	0	20	25	0

[0192] 基于这些结果,确定0.02%聚山梨酸酯80是下一轮制剂优化研究的一个最佳选择。

[0193] 制剂优化

[0194] 加速稳定性研究的目的是评估含有150mg/mL的CFI-HSA的液体和冻干制剂的稳定性。以0.2mL填充体积填充所有制剂,并冻干F7-F12。将冻干前的样品在-70°C下冷冻持续冻干循环的持续时间,并在时间0时解冻以进行分析。

[0195] 该研究包括在冷藏(5°C)、应力(25°C)和加速(40°C)储存温度下温育所有候选制剂。该研究的温度储存部分在四周时间内进行。表2.6总结了用于制剂稳定性评价的储存条件。

[0196] 表2.6:稳定性研究应力条件的总结

	应力	条件	时间点
[0197]	温度(液体)	5°C; 25°C; 40°C	0、1、2、4周
	温度(冻干)	5°C; 25°C; 40°C	
	搅拌	涡旋	1000RPM, 4小时

[0198] 在时间0时,按照表2.6将小瓶置于适当的温度下。在每个时间点取出小瓶并分析。

[0199] 在时间0时,所有冻干前制剂均呈澄清、无色,并且无可见颗粒。冻干制剂显现为良好的饼状物。所有液体和重构冻干制剂均呈澄清、微黄色,并且无可见颗粒。在整个研究中,直到四周时间点,无论储存温度如何,在冻干饼状物中均没有观察到显著变化。相似地,大多数液体和重构冻干制剂在所有温度下均呈澄清和黄色,无可见颗粒。

[0200] 在时间0时,所有制剂显现出接近目标的浓度,范围为130mg/mL至160mg/mL。在整个研究中,直到四周时间点,大多数制剂在5°C、25°C和40°C显现出在实验变化范围内的浓度。表2.7示出了稳定性浓度结果。

[0201] 表2.7:稳定性浓度结果

制剂 编号		浓度(mg/mL)									
		T=0	T=1周		T=2周			T=4周			
			25°C	40°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C	
[0202]	液体	1	150.49	150.25	148.81	144.89	145.86	147.50	148.1	143.0	142.8
		2	144.67	157.14	156.21	153.71	151.85	154.11	155.5	155.4	158.8
		3	143.57	149.07	145.49	117.26	116.40	109.87	117.7	118.0	110.3
		4	141.64	147.39	139.79	136.98	136.45	130.40	138.3	139.5	133.0
		5	147.23	151.12	147.23	130.47	133.93	125.85	130.3	132.3	118.1
		6	128.91	135.09	127.99	118.92	120.16	107.19	119.3	119.4	94.7
	冻干	7	156.46	180.31	175.71	170.60	174.47	174.83	168.9	174.2	185.4
		8	158.47	160.32	150.62	142.27	151.29	152.59	153.6	153.1	151.9
		9	178.19	170.42	174.25	171.15	155.01	171.56	151.3	174.2	169.4
		10	143.10	141.45	146.56	147.61	146.88	147.56	145.5	146.9	149.4
		11	147.09	154.29	139.70	146.20	143.73	143.09	146.8	143.6	151.6
		12	128.43	127.70	126.12	128.12	127.46	127.72	127.6	127.9	128.5
		13	137.87	不适用	136.39	不适用	不适用	199.96	不适用	148.8	143.9

[0203] CFI-HSA的FTIR光谱看起来与报告的白蛋白的光谱相似,在1650-1660 cm^{-1} 处具有强螺旋信号。当在候选制剂中冻干CFI-HSA时,未观察到FTIR光谱发生重大变化。

[0204] 在时间0时,所有制剂(包括重构冻干制剂)显现出具有较小的HMW(高分子量)和LMW(低分子量)峰的相当的色谱曲线。(SE-HPLC结果)

[0205] 在25-40°C下储存1周后,所有液体制剂均显现出HMWS以及LMW的增加。LMW的增加在较低的pH下快得多。然而,所有冻干制剂均保持稳定得多,特别是没有LMW增加的迹象。

(SE-HPLC结果)

[0206] 在5℃、25℃和40℃下储存2周后,所有液体制剂均显现出HMWS以及LMW的增加。LMW的增加在较低的pH下快得多。然而,所有冻干制剂均保持稳定得多,特别是没有LMW增加的迹象。(SE-HPLC结果)

[0207] 一般降解过程在5℃、25℃和40℃下在4周时间点保持一致:所有液体制剂均显现出HMWS以及LMW的增加。LMW的增加在较低的pH下快得多。然而,所有冻干制剂均保持更稳定,特别是没有LMW增加的迹象。(SE-HPLC结果)

[0208] 比较每种测试制剂在40℃下储存4周后的降解速率。在该研究中,在所有被测制剂中,含有海藻糖和甘氨酸两者作为增量剂的冻干制剂在6-7的pH范围表现最好。

[0209] 发现

[0210] 在本实施例中检测了150mg/mL的CFI-HSA在各种制剂条件下的稳定性。所研究的条件包括含有各种缓冲液(20mM乙酸钠、琥珀酸钠或组氨酸·HCl)、张力调节剂(氯化钠、山梨醇或海藻糖)、增量剂(海藻糖或甘氨酸)并且pH值范围为5.0至7.0的液体和冻干制剂。在冷藏(5℃)、环境(25℃)和加速(40℃)温度下在静态储存条件下检验制剂达四(4)周。在研究过程中,通过目视检查、浓度、SE-HPLC和FlowCAM进行分析。另外,冻干制剂还通过DSC和FTIR进行分析。

[0211] 最初,使用常用的表面活性剂稳定剂进行小的表面活性剂筛选。该研究评价了表面活性剂在使CFI-HSA对暴露于搅拌诱导的剪切应力后的降解稳定中的益处。向15mg/mL的CFI-HSA药物物质中掺入表面活性剂0.015% PS20、0.015% PS80和0.15% F68。通过SE-HPLC对搅拌应力后含有表面活性剂的小瓶进行比较,结果表明,无论搅拌与否,所有样品均显示相当的曲线。然而,MFI分析表明,与含有表面活性剂的样品相比,无表面活性剂的样品显现出大量增加的亚可见颗粒浓度。这证明了CFI-HSA对剪切应力敏感,并且在进一步的研究中可通过添加表面活性剂实现改善的稳定性。选择药物物质中的当前表面活性剂0.02% PS80用于加速稳定性研究。

[0212] 在制备12种候选制剂后,在时间0时,所有样品均呈澄清,并且无可见颗粒。

[0213] 在整个研究中,无论储存温度如何,在冻干饼状物中均没有观察到视觉外观的显著变化。相似地,大多数液体和重构冻干制剂在所有温度下均呈澄清,具有明显的黄色。四周后,大多数制剂在所有储存条件下均接近目标浓度。

[0214] FTIR结果发现冻干前样品和冻干样品之间的光谱曲线无显著差异。

[0215] FlowCAM分析显示,所有样品中去除的亚可见颗粒浓度相对较低,表明沉淀或颗粒不是正确配制CFI-HSA的关键因素。

[0216] 加速研究是在极端压力条件下进行的,可能不具有预测性。尽管如此,在所有温度下四周后通过SE-HPLC分析发现,液体制剂,特别是低pH制剂如F1、F2、F3和F4中的LMW显著升高。即使在pH 6时,F5和F6在5℃下储存四周的LMW也增加了约1%。包含有效抑制CFI-HSA自溶的添加剂可能是有用的。当CFI-HSA被冻干时停止自溶。当冻干制剂在40℃下储存四周时,没有观察到LMW的显著增加。在测试中,含有甘氨酸(一种离子增量剂)作为增量剂的制剂F8、F10和F12与含有非离子海藻糖的制剂相比显示出改善的抗聚集稳定性。另外,随着pH从5增加到7,聚集更慢。

[0217] 关键降解产物和稳定性指示测定通过SE-HPLC鉴定为HMW和LMW的增加。基于本研

究中产生的所有结果,150mg/mL的CFI-HSA的一种主要制剂可以是20mM组氨酸、5.0%海藻糖、2.0%甘氨酸和0.02%聚山梨酸酯80在pH 6.0-7.0下的冻干条件。

[0218] 实施例3:制剂开发研究II

[0219] 本文所述活性成分的其他制剂是在独立研究中开发的。为了能够皮下施用,期望实现含有CFI的组合物的高浓度和稳定性。

[0220] 对于实施例3,对CFI-HSA的提及是指融合至野生型CFI (SEQ ID NO:21)的N末端的人血清白蛋白。以30mg/mL-189mg/mL的浓度配制CFI-HSA。

[0221] 生物物理学表征和pH稳定性曲线

[0222] 将5mg/mL的CFI-HSA的储备溶液透析到含有135mM氯化钠的pH 5、pH 5.5、pH 6、pH 6.5、pH 7或pH 7.5的柠檬酸磷酸缓冲液中。在目视外观以评估任何潜在的沉淀后,将样品进行0.2微米过滤,在相应的缓冲液中调整至2mg/mL并无菌转移至微型管中。将该组样品在-70℃、25℃或40℃下储存。7天后,通过外观(乳光和颗粒)、蛋白浓度(OD280)、SEC、DSF、DLS、icIEF、CE-SDS和S2288显色活性测定分析各组。

[0223] 在25℃或40℃下储存7天后,发现所有样品在两个温度和所有被测pH水平下都是视觉上澄清的,无视觉上可检测的颗粒。所有样品的蛋白浓度均稳定(表3.1)。

[0224] 表3.1:在25℃和40℃下储存一周后的CFI-HSA浓度

样品代码	pH	温度	刚透析后浓度 (mg/mL) 由 5mg/mL 调整至 2mg/mL	透析后一周的浓度 (mg/mL)	
[0225]	样品 A	5.0	25℃	2.0	1.95
	样品 A	5.0	40℃	2.0	1.94
	样品 B	5.5	25℃	2.0	2.0
	样品 B	5.5	40℃	2.0	2.02

样品代码	pH	温度	刚透析后浓度 (mg/mL) 由 5mg/mL 调整至 2mg/mL	透析后一周的浓度 (mg/mL)	
[0226]	样品 C	6.0	25℃	2.0	1.99
	样品 C	6.0	40℃	2.0	2.02
	样品 D	6.5	25℃	2.0	1.98
	样品 D	6.5	40℃	2.0	1.99
	样品 E	7.0	25℃	2.0	1.97
	样品 E	7.0	40℃	2.0	1.99
	样品 F	7.5	25℃	2.0	2.02
	样品 F	7.5	40℃	2.0	2.04

[0227] SEC-HPLC用于评估在储存条件下的聚集。在25℃储存时,主峰纯度显示随着pH从7.5降低至5.0而稳定增加。相反,在pH 5.0和40℃储存条件下,主峰纯度急剧下降并且较低分子量物质具有尖峰,表明已经发生潜在的蛋白质降解。概括地说,在这些条件下,5.5和6.0之间的pH似乎是CFI-HSA稳定性的最佳范围。

[0228] 通过动态光散射(DLS)测量颗粒整体集合的流体动力学尺寸以进一步评估在储存条件下的聚集。结果表明,光强加权的平均值(Zave)和多分散度在pH 5下均急剧增加,但在pH 6-7.5之间是相当的。同时,主要物质(>99.8%)的尺寸随着pH的增加而略微增加。总之,通过DLS测量的多分散度和粒度数据表明最佳储存pH为约6,确证了SEC-HPLC结果。

[0229] 使用预制剂进行CE-SDS以评估纯度变化。结果显示,通过还原和非还原CE-SDS,在

pH 5和7.5时纯度略有降低,在pH 5.5-6.5之间纯度相当。相似地,通过差示扫描荧光计(DSF)表明最佳pH水平介于5.5和7.0之间,而通过成像毛细管等电聚焦(icIEF)发现pH 5是最不稳定的。

[0230] 高浓度液体制剂

[0231] 评估了高浓度制剂的可行性。将纯化的CFI-HSA透析至20mM组氨酸、150mM ArgHCl, pH 5.8,并在自旋过滤单元中浓缩至189mg/mL。使用高浓度的精氨酸以增加溶解度并防止由浓缩的CFI-HSA引起的粘度过高。为了评估蛋白浓度和精氨酸浓度对粘度的影响,还将189mg/mL的浓缩样品用20mM His (pH 5.8) 稀释至169mg/mL,以达到135mM ArgHCl。表3.2中所示的数据表明,即使在189mg/mL CFI-HSA下,粘度也仅为10.6厘泊(CP),表明使用被测制剂的粘度过高的风险极低。

[0232] 表3.2:高浓度CFI-HSA的粘度

CFI-HSA	缓冲液	粘度
189mg/mL	20mM His, 150mM Arg • HCl, pH 5.8	10.6CP
169mg/mL	20mM His, 135mM Arg • HCl, pH 5.8	8.1CP

[0234] 将浓缩的样品进行0.2微米过滤并使用SEC测试聚集体。在稀释至5mg/mL并在5°C自动取样机中储存的150mM精氨酸中的188.7mg/mL样品中未观察到聚集物水平的变化(1.5%)。稀释至5mg/mL并在5°C自动进样器中储存1周的169.7mg/mL样品仅显示1.72%聚集体。在5°C下储存1周后再稀释至5mg/mL的169.7mg/mL样品显示2.5% HMW物质。

[0235] 使用S2288显色测定评估浓缩至169.7mg/mL的CFI-HSA样品的生物活性。如图20所示,169.7mg/mL样品的活性与对照(Ct1)样品的活性相当。曲线斜率的微小差异可能是由于粘性溶液显著稀释后测定中的最终浓度不精确,或由于在5°C下储存约1个月后生物活性有一些损失。

[0236] 总之,这些结果表明含有精氨酸盐酸盐和组氨酸缓冲液的液体制剂可以稳定高浓度(例如大于150mg/mL)的CFI-HSA。

[0237] 制剂筛选

[0238] 筛选一组制剂(F1至F7),以确定离子强度、缓冲液类型、冷冻保护剂和氯化钙(CaCl₂)对CFI-HSA稳定性的影响。将包含药学上可接受的赋形剂的制剂加入到先前测试的组氨酸和精氨酸缓冲液中,这些赋形剂包括一系列浓度的张力调节剂(在本文中也可互换地称为张度调节剂)、冷冻保护剂、冻干保护剂、稳定剂和表面活性剂。表3.3示出了该实施例中的被测制剂F1-F7,不与实施例2的F1-F12混淆。

[0239] 表3.3:CFI-HSA的被测制剂

制剂	pH	组氨酸缓冲液 (mM)	张度调节剂精氨酸盐酸盐 (mM)	冷冻保护剂/冻干保护剂	稳定剂	表面活性剂 (PS20)	摩尔渗透压浓度
F1	5.8	20	135	-	-	0.02%	279
F2	5.8	20	70	4%葡萄糖	-	0.02%	279
F3	5.8	20	-	8.5%蔗糖	-	0.02%	285
F4	5.8	20	70	120mM 甘氨酸	-	0.02%	282
F5	5.8	20	70	2.5%山梨醇	-	0.02%	299
F6	5.8	20	70	4%海藻糖	-	0.02%	279
F7	5.8	20	-	5%蔗糖	35mM CaCl ₂	0.02%	279

[0241] 将储备CFI-HSA样品浓缩至约40mg/mL,然后针对表3.3中列出的7种制剂进行透析。将浓缩的样品进行0.2微米过滤,并无菌填充到玻璃小瓶中并加盖。每种组合物各一小瓶进行3次冷冻和解冻循环,并通过外观、OD280和SEC进行评估。对于短期热稳定性研究,每种组合物各四个小瓶包括在5周稳定性研究中,分别在-70°C、5°C、25°C和40°C下进行。通过OD280、SEC和CE-SDS分析5周稳定性样品。此外,为了评估脱酰胺和氧化,对所选样品进行肽图MS/MS和生物活性分析。

[0242] 5周后,目视检查显示除F3样品在40°C下储存时有沉淀迹象外,所有制剂均为胶体稳定的。OD280处的蛋白浓度测量显示在所有测试温度下,CFI-HSA经过1周三次冻融循环、或5周储存后,其浓度保持不变。

[0243] 通过SEC和CD-SDS对纯度的评估显示,对于所有7种制剂,-70°C样品的纯度未改变,5°C样品具有约97%的纯度,25°C样品具有约96%的纯度,并且所有40°C样品的主要物质的纯度在90%-92%之间。所有7种制剂经过5周储存后在40°C下纯度的显著降低和在25°C下纯度的轻微降低表明室温下的液体高浓度制剂是不可行的。

[0244] 进行生物活性测定以验证CFI-HSA在被测制剂和储存条件下储存后保持活性(表3.4)。这些制剂总体上是相对相当的。制剂F1在40°C下比其他六种制剂稍微更稳定。制剂F3在25°C和40°C下是最不稳定的,其显示出与-70°C对照相比低20%-30%的活性,以及比F2、F4或F1样品更大的活性损失。

[0245] 表3.4:CFI-HSA在被测储存条件后的生物活性

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
5°C	113%	94%	92%	99%	107%	112%	107%
25°C	116%	83%	72%	89%	85%	90%	-
40°C	62%	35%	26%	32%	35%	38%	-

[0247] 对CFI-HSA制剂进行肽作图MS/MS,以确定在被测储存条件后脱酰胺和氧化的水平。测试在5°C下储存5周后的制剂F1、F2、F4、F5和F6样品。冷冻的F4(F/T)用作对照。结果表明,所有位点上的脱酰胺化和氧化水平在不同制剂中是相当的。

[0248] 为临床评价和药物制造开发的其他测试和制剂包括表3.5中的制剂。将CFI-HSA缓冲液交换为表3.5中的3种新制剂,并浓缩至100mg/mL或150mg/mL,同时观察是否有沉淀、严重乳光或高粘度。为了使制剂更适于冻干产品,将60mM甘氨酸或60mM甘露醇分别加入到F2

和F3中以保护冻干饼状物的结构。然后将样品无菌过滤并填充,并测试粘度、SEC和活性。

[0249] 表3.5:用于临床制造和测试的制剂

	蛋白浓度 (mg/mL)	pH	缓冲液	张度调节剂/冷冻保护剂/冻干保护剂			PS-80
[0250]	F1	5.8	20mM 组氨酸	135mM Arg·HCL			0.02%
	F2			70mM Arg·HCL	2%蔗糖	60mM 甘氨酸	0.02%
	F3			70mM Arg·HCL	2%蔗糖	60mM 甘露醇	0.02%
	F1			135mM Arg·HCL			0.02%
	F2			70mM Arg·HCL	2%蔗糖	60mM 甘氨酸	0.02%
	F3			70mM Arg·HCL	2%蔗糖	60mM 甘露醇	0.02%