



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119120483 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202411057957.X

C12N 15/864 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.15

C12N 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/47 (2006.01)

1800620.5 2018.01.15 GB

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201980016721.2 2019.01.15

(71) 申请人 曼寿医药有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 保罗·比舍普 西蒙·克拉克

理查德·昂温

(74) 专利代理机构 北京中博世达专利商标代理

有限公司 11274

专利代理师 张瑾

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书56页

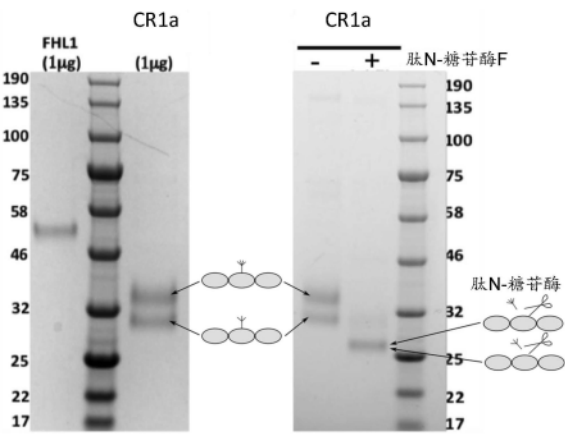
序列表 (电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

C3b结合多肽

(57) 摘要

本发明涉及了编码能够结合C3b的多肽的分离的核酸、载体以及药物组合物。该核酸包括与SEQ ID NO:35具有至少90%的序列同一性的核苷酸序列。



1. 一种分离的核酸,所述分离的核酸编码能够结合C3b的多肽,其中,所述核酸包括与SEQ ID NO:35具有至少90%的序列同一性的核苷酸序列。

2. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中,经编码的多肽包括氨基酸序列,所述氨基酸序列包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3、或者由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3组成。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中,所述核酸包括与SEQ ID NO:35具有至少95%的序列同一性的核苷酸序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的分离的核酸,其中,所述经编码的多肽具有450个以下氨基酸的总长度。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的分离的核酸,其中,所述核酸包括编码分泌途径序列的核苷酸序列。

6. 根据权利要求5所述的分离的核酸,其中,所述分泌途径序列的氨基酸序列包括SEQ ID NO:7、或者由SEQ ID NO:7组成。

7. 根据权利要求5或6所述的分离的核酸,其中,所述多肽或所述氨基酸序列包括SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49、或者由SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49组成。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的分离的核酸,其中,所述核酸包括SEQ ID NO:35的核苷酸67-648。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的分离的核酸,其中,所述核酸包括SEQ ID NO:35的核苷酸13-648。

10. 根据权利要求1至7中任一项所述的分离的核酸,其中,所述核酸包括SEQ ID NO:35的核苷酸7-648。

11. 一种载体,所述载体包括根据权利要求1至10中任一项所述的分离的核酸。

12. 根据权利要求11所述的载体,其中,所述载体为病毒载体。

13. 根据权利要求11或12所述的载体,其中,所述载体是慢病毒载体、逆转录病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒AAV载体、牛痘病毒载体和疱疹病毒载体。

14. 根据权利要求11-13中任一项所述的载体,其中,所述载体为AAV载体,所述AAV载体选自AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11,或者其杂种和/或突变体。

15. 根据权利要求11-14中任一项所述的载体,其中,所述载体为AAV2载体,或者其杂种和/或突变体。

16. 根据权利要求11-15中任一项所述的载体,其中,所述载体还包括启动子和/或多腺苷酸化序列。

17. 一种哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞包括或表达根据权利要求1至10中任一项所述的核酸、或者根据权利要求11至16中任一项所述的载体。

18. 根据权利要求17所述的哺乳动物细胞,其中,所述哺乳动物细胞是眼睛的细胞。

19. 根据权利要求17或18所述的哺乳动物细胞,其中,所述细胞是视网膜色素上皮RPE细胞、光感受器细胞、视网膜细胞、或者脉络膜或黄斑的细胞。

20. 一种药物组合物,所述药物组合物包括根据权利要求1至10中任一项所述的核酸、根据权利要求11至16中任一项所述的载体、和/或根据权利要求17至19中任一项所述的细胞。

C3b结合多肽

[0001] 本申请为申请日为2019年1月15日,申请号为“201980016721.2”(国际申请号为“PCT/EP2019/050949”),发明名称为“C3b结合多肽”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及分子生物学、免疫学和医学领域。更具体地,本发明涉及一种结合至C3b的多肽。

背景技术

[0003] 在发达国家中,年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)是失明的主要原因。AMD当前占有全球失明注册(global blind registration)的8.7%,并且据估计到2020年将有1.96亿人受到影响(Wong等.Lancet Glob Heal (2014) 2:e106-16)。AMD表现为眼后部视网膜的中央部位黄斑的进行性破坏(progressive destruction),导致中央视敏度(visual acuity)的丧失(loss)。该疾病的早期发现黄斑的形态变化,首先包括脉络膜毛细血管层(choriocapillaris)中血管的丧失(Whitmore等,Prog Retin Eye Res (2015) 45:1-29),脉络膜毛细血管层是存在于脉络膜中的网状(fenestrated)血管(向外部视网膜供应氧和营养的高度血管化的层)。

[0004] AMD主要是遗传疾病。补体系统、即我们免疫系统的一部分的基因突变与AMD增加的风险高度相关联。确实,已经变得清楚的是补体的过度活化是疾病发病机理的主要推动力,并且可以在脉络膜毛细血管层中看到补体过度活化的许多例子。例如,齐普费尔(Zipfel)等人在拉姆(Lambris)和阿达米(Adamis)(编辑)的炎症和视网膜疾病:补体生物学与病理学,实验医学和生物学进展703,施普林格科学+商业媒体有限责任公司(2010)的第二章中综述了补体在AMD中的作用,其全部内容通过引用合并于此。补体通过沉积到蛋白C3b的表面上来被活化,蛋白C3b是一种免疫系统蛋白C3的促炎性(pro-inflammatory)分解产物。C3b联合其他蛋白以形成用于活化和扩增补体响应的转化酶复合物,并启动补体级联(cascade)的扩增环(amplification loop),最终导致细胞/组织破坏以及局部炎症响应(AMD的全部特征)。

[0005] 通过薄的(2-4 μ m)、非细胞的、五层的细胞外基质布鲁赫膜(Bruch's membrane, BrM),将脉络膜毛细血管层从代谢活跃的视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)分开。该BrM主要有两个功能:RPE的基础(substratum)和血管壁。例如,在Curcio and Johnson, Structure, Function and Pathology of Bruch's Membrane, In: Ryan et al. (2013), Retina, Vol.1, Part 2: Basic Science and Translation to Therapy. 5th ed. London: Elsevier, pp466-481中综述了BrM的结构和功能,其全部内容通过引用合并于本文中。

[0006] 诸如BrM和毛细血管间隔(intercapillary septa)(填充脉络膜毛细血管层中毛细血管之间的空间的细胞外基质)的非细胞结构上的补体的C3b活化由蛋白“补体因子H”(FH)和“补体因子I”(FI)来调节。FI通过将C3b裂解为蛋白水解灭活形式

(proteolytically-inactive form)来预防补体活化,该蛋白水解灭活形式特指iC3b,其不能参与转化酶组装。然而,iC3b为调理素并因此是一种具有后续炎症响应的白细胞募集的介导体,而C3b的进一步分解产物、iC3dg和C3d是弱调理素。为了裂解C3b,FI需要辅因子的存在,辅因子的实施例包括血源性FH蛋白和膜结合的表面辅因子“补体因子1”(CR1;CD35)。CR1是在广泛的细胞中表达的膜受体,并涉及免疫复合物清除、吞噬作用和补体调节。除了充当C3b的FI介导裂解中的辅因子外,CR1还通过加速C3和C5转化酶来充当补体的调节剂。CR1的结构和功能例如在Khera and Das,Mol Immunol (2009) 46(5):761-772和Jacquet et al.,J Immunol (2013) 190(7):3721-3731中综述,其全部内容通过引用合并于此。

[0007] 早期AMD的标志性病变,称为玻璃膜疣,在邻近RPE层的BrM内发展(Bird et al, Surv Ophthalmol (1995) 39(5):367-374)。玻璃膜疣从脂质和细胞碎片的积聚形成,并包括一系列补体活化产物(Anderson et al.,Prog Retin Eye Res (2009) 29:95-112;Whitcup et al.,Int J Inflam (2013) 1-10)。BrM内玻璃膜疣的存在破坏营养物质从脉络膜穿过该细胞外基质向RPE细胞的流动,这导致细胞功能障碍并最终导致死亡。由于RPE细胞单层通过提供营养物质并去除废物来支持视网膜神经感觉层的视杆细胞和视锥细胞,因此它们的细胞死亡引起光感受器细胞(photoreceptor cell)的功能障碍并随后引起视敏度的丧失。

[0008] 这代表了AMD的晚期之一,称为“干性”AMD,并且也称为地图样萎缩,这代表了约90%的AMD病例。在晚期AMD病例的剩余占比中,玻璃膜疣的存在促使脉络膜新生血管形成(choroidal neovascularization,CNV),其中由RPE细胞增加的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的合成促使新的血管从脉络膜/脉络膜毛细血管层的生长,该生长破坏通过BRM进入视网膜中。这些新的血管渗漏并最终形成瘢痕组织;这称为“湿性”AMD。

[0009] 而仅代表10%病例的“湿性”AMD是晚期AMD的最致命形式,并具有与“干性”AMD不同的疾病特征。有益于湿性AMD的治疗,其中例如将抗VEGF试剂注射到眼睛的玻璃体中可以减缓或逆转这些血管的生长,尽管它无法预防起初这些血管的形成。地图样萎缩(“干性”AMD)仍然无法治疗。

发明内容

[0010] 本发明提供了一种结合至C3b的多肽,所述多肽可以用于治疗或预防补体相关疾病或病症。

[0011] 一方面,本发明提供一种能够结合C3b的多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度,所述多肽在治疗或预防补体相关疾病或病症的方法中使用。

[0012] 还提供了一种核酸,所述核酸编码能够结合C3b的多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度,所述多肽在治疗或预防补体相关疾病或病症的方法中使用。

[0013] 另一方面,本发明提供一种能够结合C3b的多肽在制造用于治疗或预防补体相关疾病或病症的药剂(medicament)中的用途,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度。

[0014] 还提供了一种核酸在制造用于治疗或预防补体相关疾病或病症的药剂中的用途,

所述核酸编码能够结合C3b的多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度。

[0015] 再一方面,提供了一种治疗或预防补体相关疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用能够结合C3b的多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度。

[0016] 再一方面,提供了一种治疗或预防受试者中补体相关疾病或病症的方法,所述方法包括修饰所述受试者的至少一种细胞以表达或包括能够结合C3b的多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度。

[0017] 在一些实施方案中,所述补体相关疾病或病症为眼部疾病或病症。

[0018] 在一些实施方案中,眼部疾病或病症的治疗或预防包括修饰受试者的至少一种眼部细胞以表达或包括所述多肽。在一些实施方案中,眼部疾病或病症的治疗或预防包括修饰受试者的至少一种眼部细胞以表达或包括编码所述多肽的核酸。在一些实施方案中,眼部疾病或病症的治疗或预防包括向受试者的至少一种眼部细胞施用载体,所述载体包括编码所述多肽的核酸。在一些实施方案中,所述至少一种眼部细胞为视网膜色素上皮(RPE)细胞。

[0019] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是其中病理上涉及C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的产物的疾病或病症。

[0020] 在一些实施方案中,所述疾病或病症为黄斑变性。在一些实施方案中,所述疾病或病症选自以下一种或多种:年龄相关性黄斑变性(AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、地图样萎缩(“干性”AMD)、“湿性”(新生血管)AMD、脉络膜新生血管形成(CNV)、青光眼、自身免疫性葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、以及早发性黄斑变性(EOMD)。

[0021] 在一些实施方案中,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少95%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:4的 X_1 为A或T, X_2 为P或L,和/或 X_3 为G或R。

[0022] 在一些实施方案中,所述多肽具有50-250个氨基酸的总长度。在一些实施方案中,所述多肽包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3,或者由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3组成。

[0023] 在一些实施方案中,所述多肽包括SEQ ID NO:13,或者由SEQ ID NO:13组成。

[0024] 在一些实施方案中,所述多肽能够充当补体因子I的辅因子(co-factor)。在一些实施方案中,所述多肽能够扩散穿过布鲁赫膜(BrM)。在一些实施方案中,所述多肽在通过补体因子I的辅因子结合的区域中结合至C3b。在一些实施方案中,所述多肽在通过补体受体1(Complement Receptor 1,CR1)结合的区域中结合至C3b。

[0025] 在一些实施方案中,所述多肽包括分泌途径序列(secretory pathway sequence)。在一些实施方案中,所述分泌途径序列包括SEQ ID NO:7,或者由SEQ ID NO:7组成。在一些实施方案中,所述多肽包括SEQ ID NO:47、49或51,或者由SEQ ID NO:47、49或51组成。在一些实施方案中,所述多肽包括用于去除所述分泌途径序列的裂解位点。

[0026] 一方面,本发明提供了一种多肽,所述多肽与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性,其中,所述多肽具有700个以下氨基酸的长度。

[0027] 在一些实施方案中,所述多肽具有50-700个氨基酸的长度。在一些实施方案中,所

述多肽与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性,其中, X_1 为A或T, X_2 为P或L,和/或 X_3 为G或R。

[0028] 还提供了一种能够结合至C3b的多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列,并且其中,所述多肽具有450个以下氨基酸的总长度。

[0029] 在一些实施方案中,所述多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少95%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, X_1 为A或T, X_2 为P或L,和/或 X_3 为G或R。

[0030] 在一些实施方案中,所述多肽具有50-250个氨基酸的总长度。

[0031] 在一些实施方案中,所述多肽包括根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或者由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,所述多肽包括根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:3组成。在一些实施方案中,所述多肽包括根据SEQ ID NO:13的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:13组成。

[0032] 在一些实施方案中,所述多肽能够结合至C3b。在一些实施方案中,所述多肽在通过补体因子I的辅因子结合的区域中结合至C3b。在一些实施方案中,所述多肽在通过补体受体1(CR1)结合的区域中结合至C3b。在一些实施方案中,所述多肽充当补体因子I的辅因子。

[0033] 在一些实施方案中,所述多肽能够扩散穿过布鲁赫膜(BrM)。在一些实施方案中,所述多肽是非糖基化的、或者是部分糖基化的。在一些实施方案中,所述多肽包括至少一个氨基酸取代,例如,在位置509、578、959和/或1028(根据通用蛋白质资源数据库(UniProt):P17927(SEQ ID NO:1)编号的)处的一个、两个、三个或四个取代。在一些实施方案中,至少一个氨基酸取代为N509Q、N578Q、N959Q和/或N1028Q(根据Uniprot:P17927(SEQ ID NO:1)编号的)中的一个或多个。在一些实施方案中,所述多肽包括SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和/或SEQ ID NO:15,或者由SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和/或SEQ ID NO:15组成。

[0034] 在一些实施方案中,所述多肽额外包括分泌途径序列。在一些实施方案中,所述分泌途径序列包括SEQ ID NO:7,或者由SEQ ID NO:7组成。在一些实施方案中,所述多肽额外包括用于去除所述分泌途径序列的裂解位点。在一些实施方案中,所述多肽包括SEQ ID NO:47、49或51,或者由SEQ ID NO:47、49或51组成。

[0035] 另一方面,本发明提供了一种核酸,所述核酸编码根据本发明的多肽。

[0036] 再一方面,本发明提供了一种载体,所述载体包括本发明的核酸。

[0037] 再一方面,本发明提供了一种细胞,所述细胞包括根据本发明的多肽、核酸或载体。

[0038] 再一方面,本发明提供了一种用于产生多肽的方法,所述方法包括将根据本发明的核酸或载体引入细胞中、以及在适于所述多肽的表达的条件下培养所述细胞。

[0039] 再一方面,本发明提供了一种细胞,所述细胞通过根据本发明的用于产生多肽的方法获得或可获得。

[0040] 再一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括根据本发明的多肽、核酸、载体或细胞。在一些实施方案中,所述药物组合物包括药学可接受媒介物(carrier)、佐剂、赋形剂或稀释剂。

[0041] 再一方面,本发明提供了在治疗或预防疾病或病症的方法中使用的根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物。

[0042] 再一方面,本发明提供了一种根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物在制造用于治疗或预防疾病或病症的药剂中的用途。

[0043] 再一方面,本发明提供了一种治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物。

[0044] 再一方面,本发明提供了一种治疗或预防受试者中的疾病或病症的方法,所述方法包括修饰受试者的至少一种细胞以表达或包括根据本发明的核酸、载体或多肽。

[0045] 在按照本发明的各种方面的一些实施方案中,所述疾病或病症是其中病理上涉及C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的产物的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症为黄斑变性。在一些实施方案中,所述疾病或病症为年龄相关性黄斑变性(AMD)。在一些实施方案中,用于治疗或预防疾病或病症的方法包括修饰受试者的至少一种视网膜色素上皮(RPE)细胞以表达或包括根据本发明的核酸、载体或多肽。

[0046] 再一方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括多个部分,所述多个部分包括预定量的根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物。

[0047] 描述

[0048] 迄今为止,针对AMD的基于补体的疗法集中在将补体调节抗体注射到眼睛中。这样的疗法带来了微乎其微的治疗益处甚至没有带来治疗益处,因为这些蛋白根本不能到达目标区域,即BrM及其下层脉管系统(underlying vasculature)、脉络膜毛细血管层,或达到有效浓度。

[0049] 补体因子I(FI)介导的补体调节、即C3b到iC3b的裂解(蛋白水解灭活的C3b),需要辅因子、诸如膜锚定的CR1。然而,本发明人发现为了成功的辅因子活性,不必提供全长的膜结合的CR1、甚至不必提供仅缺乏跨膜结构域的CR1的可溶形式。相反,发明人发现包括CR1 C3b结合结构域的短CR1片段足以实现有效的FI介导的C3b裂解。

[0050] 因此,本发明涉及衍生自FI辅因子CR1的可溶性截短多肽。该多肽包括能够结合至C3b的结构域,使得这些结构域可以充当用于调节补体活化的必要FI辅因子。该可溶性截短多肽的关键优势在于它们的穿过BrM的能力,因此它们能够到达与AMD相关联的所有区域,该与AMD相关联的所有区域即RPE/BrM界面、BrM和脉络膜,包括毛细血管间隔(脉络膜毛细血管层的血管之间的细胞外基质)。本发明还提供了衍生自CR1的非糖基化多肽,其可以辅助多肽穿过BrM。多肽易于表达和分泌,从而能够通过受影响位点局部的细胞原位表达,并将多肽靶向受补体过度活化影响的区域。多肽的原位表达可以使用基因疗法技术来实现。原位表达为需要的区域提供靶向疗法,而不会破坏身体其他区域的功能性补体调节。

[0051] 本发明能够补充退化的补体调节系统,而不会替换当前就位(in place)的内源性补体调节,或干扰其余的补体联级。

[0052] 多肽

[0053] 根据本发明的多肽可以包括一个或多个C3b结合区域,或者由一个或多个C3b结合区域组成。

[0054] 根据本发明的多肽与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性,其中,该多肽具有700个以下氨基酸的长度。在一些实施方案中,该多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有700个以下氨基酸的长度。

[0055] 根据本发明的多肽可以包括与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性的、700个以下氨基酸的氨基酸序列,或者由其组成。

[0056] 在一些实施方案中,该多肽包括650、600、550、500、450、400、350、300、250或200个以下氨基酸的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,该多肽包括具有1-200个氨基酸、1-250个氨基酸、1-300个氨基酸、1-350个氨基酸、1-400个氨基酸、1-450个氨基酸、1-500个氨基酸、1-550个氨基酸、1-600个氨基酸、1-650个氨基酸或1-700个氨基酸的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,该多肽具有50-700个氨基酸的长度。在一些实施方案中,该多肽具有100-650个氨基酸的长度。在一些实施方案中,该多肽具有100-550个氨基酸的长度。在一些实施方案中,该多肽具有150-450个氨基酸的长度。在一些实施方案中,该多肽具有400-700个氨基酸的长度。在一些实施方案中,该多肽具有700-1000、或大于1000个氨基酸的长度。

[0057] 本文中所使用的“长度”是指多肽的总长度;即“长度”是指整个多肽从端部到端部、即从N端到C端的度量(measurement)或范围。本文所使用的“长度”是通过多肽内氨基酸残基的数量测量的。

[0058] 在一些实施方案中,多肽是拆离的(detached)/离散的(discrete)/分开的(separate)/个体的(individual)的分子。在一些实施方案中,多肽是未连接、即未接合(join)、未融合(fuse)、或未附接至另一氨基酸序列的单一连续的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽未通过氨基酸接头或非氨基酸接头附接至另一多肽或氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽并不是较长氨基酸序列的截段(section)、部分或区域,即,多肽并非超过最大的、规定的多肽长度的氨基酸序列的一部分。在一些实施方案中,多肽不是融合蛋白的一部分、或并未形成融合蛋白的截段。在一些实施方案中,多肽可以包括本文提供的序列,以及一种或多种额外的氨基酸,只要不超过多肽的最大长度即可。本文描述的多肽的短的长度能够使得多肽穿过BrM并到达补体活化的位点。

[0059] 在一些实施方案中,多肽具有700、650、600、550、500、450、400、350、300、250或200个以下氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽具有450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80或70个以下氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽具有1-70个氨基酸、1-80个氨基酸、1-90个氨基酸、1-100个氨基酸、1-110个氨基酸、1-120个氨基酸、1-130个氨基酸、1-140个氨基酸、1-150个氨基酸、1-160个氨基酸、1-170个氨基酸、1-180个氨基酸、1-190个氨基酸、1-200个氨基酸、1-210个氨基酸、1-220个氨基酸、1-230个氨基酸、1-240个氨基酸、1-250个氨基酸、1-260个氨基酸、1-270个氨基酸、1-280个氨基酸、1-290个氨基酸、1-300个氨基酸、1-310个氨基酸、1-320个氨基酸、1-330个氨基酸、1-340个氨基酸、1-350个氨基酸、1-360个氨基酸、1-370个氨基酸、1-380个氨基酸、1-390个氨基酸、1-400个氨基酸、1-410个氨基酸、1-420个氨基酸、1-430个氨基酸、1-440个氨基酸或1-450个氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽具有50-450个氨基酸、50-400个氨基酸、50-350个氨基酸、50-300个氨基酸、50-250个氨基酸、50-200个氨基酸、100-250个氨基酸、100-200个氨基酸、150-250个氨基酸或150-200个氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽具有61、72、194、212、231、388、406或644个氨基酸之一的总长度。

[0060] 在一些实施方案中,本发明的多肽具有80kDa的最大分子量,无论多肽是共价/非

共价结合至更大的复合物、更大的复合物的一部分,还是并非更大的复合物的一部分。在一些实施方案中,本发明的多肽具有75kDa以下、70kDa以下、65kDa以下、60kDa以下、55kDa以下、50kDa以下、45kDa以下、40kDa以下、35kDa以下、30kDa以下、29kDa以下、28kDa以下、27kDa以下、26kDa以下、25kDa以下、24kDa以下、23kDa以下、22kDa以下、21kDa以下、20kDa以下、19kDa以下、18kDa以下、17kDa以下、16kDa以下、15kDa以下、14kDa以下、13kDa以下、12kDa以下、11kDa以下或10kDa以下的分子量。在一些实施方案中,多肽具有50kDa的最大分子量、即50kDa以下。在一些实施方案中,多肽具有26kDa的最大分子量、即26kDa以下。在一些实施方案中,多肽具有24kDa的最大分子量、即24kDa以下。在一些实施方案中,多肽具有22kDa的最大分子量、即22kDa以下。在一些实施方案中,多肽具有20kDa的最大分子量、即20kDa以下。

[0061] 在一些实施方案中,本发明的多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中, X_1 为A或T, X_2 为P或L,和/或 X_3 为G或R。在一些实施方案中, X_1 为A, X_2 为P,和/或 X_3 为G。在一些实施方案中, X_1 为A, X_2 为L,和/或 X_3 为R。在一些实施方案中, X_1 为A, X_2 为P,和/或 X_3 为R。在一些实施方案中, X_1 为A, X_2 为L,和/或 X_3 为G。在一些实施方案中, X_1 为T, X_2 为L,和/或 X_3 为R。在一些实施方案中, X_1 为T, X_2 为P,和/或 X_3 为G。在一些实施方案中, X_1 为T, X_2 为L,和/或 X_3 为G。在一些实施方案中, X_1 为T, X_2 为P,和/或 X_3 为R。

[0062] 在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有本文提供的长度。例如,在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有85%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,多肽具有450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170或160个以下氨基酸的总长度;在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有90%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190或180个以下氨基酸的总长度;在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有95%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190或180个以下氨基酸的总长度;在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有98%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210或200个以下氨基酸的总长度。

[0063] 在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有450个以下氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有50-450个氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有250个以下氨基酸的

总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少85%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有50-250个氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有450个以下氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有50-450个氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有250个以下氨基酸的总长度。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:4具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成,其中,该多肽具有50-250个氨基酸的总长度。

[0064] 人CR1 (UniProt:P17927 (词条版本 (entry version) 181 (2017年10月25日), 序列版本3 (2010年3月2日)); SEQ ID NO:1) 具有一个2039个氨基酸的序列 (包括N端、41个氨基酸的信号肽 (signal peptide)), 并包括30个补体控制蛋白 (complement control protein, CCP) 结构域 (也被称为sushi结构域或短共有重复序列 (short consensus repeat, SCR)), N端28个CCP组织成为四个长同源重复序列 (long homologous repeat, LHR) 结构域各自包括7个CCP: LHR-A、LHR-B、LHR-C和LHR-D。在LHR-B的CCP 8-10 (UniProt: P17927位置491-684; SEQ ID NO:2) 中和LHR-C的CCP 15-17 (UniProt: P17927位置941-1134; SEQ ID NO:3) 中存在CR1的C3b结合区域。CCP 8-10和15-17在序列上的差异在于三个氨基酸残基, 如共有序列 (consensus sequence) SEQ ID NO:4中所示。

[0065] 根据本发明的多肽可以包括对应于CCP 8-10 (SEQ ID NO:2) 和/或CCP 15-17 (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 或者由其组成。在一些实施方案中, 本发明的多肽包括与SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列, 或者由其组成。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0066] 根据本发明的多肽可以包括对应于CCP 8-10和15-17的氨基酸序列, 或者由其组成。多肽可以包括CCP 8-10和15-17的天然CR1序列 (SEQ ID NO:30), 或者由其组成。多肽可以包括接合至CCP 15-17的CCP 8-10, 或者由其组成。这可以是共有序列 (SEQ ID NO:13), 或在CCP 8-10和15-17之间通过接头来实现 (例如SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中, 本发明的多肽包括与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:30具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列, 或者由其组成。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0067] 根据本发明的多肽可以包括对应于序列“A” (SEQ ID NO:8)、序列“B” (SEQ ID NO:16) 和/或序列“C” (SEQ ID NO:17) 中的一个或多个的氨基酸序列, 或者由其组成。在一些实施方案中, 多肽由选自序列“A” (SEQ ID NO:8)、序列“B” (SEQ ID NO:16) 和序列“C” (SEQ ID NO:17) 的序列组成。在一些实施方案中, 本发明的多肽包括与序列“A” (SEQ ID NO:8)、序列“B” (SEQ ID NO:16) 和/或序列“C” (SEQ ID NO:17) 中的一个或多个具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列, 或者由其组成。

[0068] 在一些实施方案中, 在根据本发明的多肽包括以下或者由以下组成: 序列“B” (SEQ

ID NO:16),或与序列“B”(SEQ ID NO:16)具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列的情况下, X_1 为A或T。在一些实施方案中, X_1 为A。在一些实施方案中, X_1 为T。

[0069] 在一些实施方案中,在根据本发明的多肽包括以下或者由以下组成:序列“C”(SEQ ID NO:17),或与序列“C”(SEQ ID NO:17)具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列的情况下, X_2 为P或L,和/或 X_3 为G或R。在一些实施方案中, X_2 为P和/或 X_3 为G。在一些实施方案中, X_2 为P和/或 X_3 为R。在一些实施方案中, X_2 为L和/或 X_3 为G。在一些实施方案中, X_2 为L和/或 X_3 为R。

[0070] 在一些实施方案中,序列“B”对应于SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11。在一些实施方案中,序列“C”对应于SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12。

[0071] 本发明包括多肽,该多肽包括如本文描述的序列“A”、“B”和/或“C”、及其组合,从而包括至少以下结合(从N端至C端组织的):

[0072] • A+B

[0073] • B+C

[0074] • A+C

[0075] • C+A

[0076] • A+B+C

[0077] • B+C+A

[0078] • C+A+B

[0079] • A+B+C+A

[0080] • B+C+A+B

[0081] • C+A+B+C

[0082] • A+B+C+A+B

[0083] • B+C+A+B+C

[0084] • A+B+C+A+B+C

[0085] • A+B+C+A+B+C+Y(其中Y=A、B和/或C中的一个或多个)。

[0086] 在一些实施方案中,多肽包括与CCP结构域的任何组合或本文描述的序列“A”、“B”和/或“C”的任何组合具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。

[0087] 在一些实施方案中,CCP结构域的组合为存在于天然CR1中的组合。在一些实施方案中,CCP结构域的组合不是存在于天然CR1中的组合。

[0088] 在一些实施方案中,多肽包括具有序列“A”的多个拷贝(copy)、序列“B”的多个拷贝和/或序列“C”的多个拷贝的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,多肽包括序列“A”、“B”和/或“C”中的一个或多个的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个拷贝。在一些实施方案中,多肽包括:序列“A”的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个拷贝;序列“B”的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个拷贝;和/或序列“C”的1个、2

个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个拷贝。在一些实施方案中,多肽包括序列“A”、“B”和/或“C”中的一个或多个的9个、10个或更多个拷贝。

[0089] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽缺少与人CR1 (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列1-490、685-940和/或1135-2039中的一个或多个的实质序列同一性(substantial sequence identity)。如本文描述的缺少实质序列同一性的多肽可以与人CR1 (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列1-490、685-940和/或1135-2039中的一个或多个具有少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%、少于10%或少于5%的序列同一性。在一些实施方案中,根据本发明的多肽缺少与CR1长同源重复序列(LHR)结构域LHR-A和/或LHR-D具有实质序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,根据本发明的多肽缺少与CR1 CCP结构域1-7、11-14和/或18-30具有实质序列同一性的氨基酸序列。SEQ ID NO:1的氨基酸残基根据Uniprot P17927进行编号;词条版本181(2017年10月25日),序列版本3(2010年3月2日)。

[0090] 根据本发明的、和/或本文描述的多肽可以分离和/或大体上纯化。

[0091] 多肽的其他特征

[0092] 根据本发明的多肽可以包括修饰和/或额外的氨基酸序列。该修饰和/或额外的氨基酸序列可以包括在本文提供的多肽的长度限制中,使得不超过该多肽的长度限制。

[0093] 在一些实施方案中,额外的氨基酸序列包括不多于25、50、100、150或200个的氨基酸,或者由不多于25、50、100、150或200个的氨基酸组成,即额外的氨基酸序列包括1-25、1-50、1-100、1-150或1-200个的氨基酸,或者由1-25、1-50、1-100、1-150或1-200个的氨基酸组成。在一些实施方案中,额外的氨基酸序列包括多于200个的氨基酸。在一些实施方案中,额外的氨基酸序列在根据本发明的多肽的C端处包括不多于100个的氨基酸,和/或在根据本发明的多肽的N端处包括不多于100个的氨基酸。

[0094] 在一些实施方案中,额外的氨基酸序列导致比700个氨基酸更长的多肽。在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括700个以上的氨基酸,或者由其组成。例如,多肽可以包括700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000或多于1000个的氨基酸,或者由其组成。

[0095] 在一些实施方案中,本文描述的额外的氨基酸序列缺少与人CR1 (SEQ ID NO:1,根据Uniprot P17927编号;词条版本181(2017年10月25日),序列版本3(2010年3月2日))的氨基酸序列1-490、685-940和/或1135-2039中的一个或多个的实质序列同一性。在一些实施方案中,额外的氨基酸序列缺少与CR1 CCP结构域1-7、11-14和/或18-30的实质序列同一性。在一些实施方案中,额外的氨基酸序列与人CR1 (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列1-490、685-940和/或1135-2039中的一个或多个具有少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%、少于10%或少于5%的序列同一性。在一些实施方案中,额外的氨基酸序列缺少与CR1长同源重复序列(LHR)结构域LHR-A和/或LHR-D的实质序列同一性。

[0096] 在一些实施方案中,多肽可以缺少除了在C3b结合区域中与补体因子I(例如CR1)的辅因子的区域具有实质序列同一性的氨基酸序列。例如,多肽可以缺少除了在CR1 CCP结构域8-10和/或15-17(分别为SEQ ID NO:1的残基491-684和/或941-1134)中与CR1具有实质序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽可以缺少与CR1 CCP结构域1-7、11-

14和/或18-30具有实质序列同一性的氨基酸序列。如本文描述的缺少具有实质序列同一性的氨基酸序列的多肽可以与人CR1 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列1-490、685-940和/或1135-2039中的一个或多个具有少于80%、少于75%、少于70%、少于65%、少于60%、少于55%、少于50%、少于45%、少于40%、少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%、少于10%或少于5%的序列同一性。

[0097] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以包括分泌途径序列。如本文所使用的,分泌途径序列为指导多肽的分泌的氨基酸序列。一旦启动了多肽链跨粗糙内质网的出口,就可以从成熟蛋白裂解分泌途径序列。由哺乳动物细胞分泌的多肽通常具有融合至多肽的N端的信号肽,该信号肽从转译的多肽裂解以产生多肽的“成熟”形式。

[0098] 在一些实施方式中,分泌途径序列可以包括前导序列 (leader sequence) (也称为信号肽或或信号序列),或者由其组成。前导序列通常由形成单一 α 螺旋的5-30个疏水氨基酸的序列组成。分泌的蛋白和在细胞表面表达的蛋白通常包括前导序列。前导序列可能存在于新转译的多肽中 (例如在加工以去除前导序列之前)。许多蛋白的前导序列是已知的,并且记录在数据库中,诸如基因库 (GenBank)、UniProt、瑞士治疗蛋白质序列数据库 (Swiss-Prot)、TrEMBL、蛋白信息资源 (Protein Information Resource)、蛋白数据库 (Protein Data Bank)、Ensembl和InterPro,和/或可以使用诸如SignalP (Petersen等, 2011Nature Methods 8:785-786) 或Signal-BLAST (Frank和Sippl, 2008Bioinformatics 24:2172-2176) 的氨基酸序列分析工具来识别/预测。

[0099] 在一些实施方案中,分泌途径序列衍生自补体因子H (FH)。在一些实施方案中,分泌途径序列包括SEQ ID NO:7,或者由其组成。在一些实施方案中,本发明的多肽的分泌途径序列包括与SEQ ID NO:7具有至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。

[0100] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括对应于SEQ ID NO:47、49和/或51的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:47、49和/或51具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0101] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以额外包括用于从多肽去除分泌途径序列的裂解位点。在一些实施方案中,用于从多肽去除分泌途径序列的裂解位点是针对内切蛋白酶 (endoprotease) 的裂解位点。在一些实施方案中,裂解位点是针对由多肽在其中表达的细胞所表达的内切蛋白酶。在一些实施方案中,裂解位点是信号肽酶 (signal peptidase) 裂解位点。在一些实施方案中,裂解位点是蛋白酶裂解位点,例如针对由表达多肽的细胞所表达的内切蛋白酶的裂解位点。在一些实施方案中,裂解位点是针对由RPE细胞表达的内切蛋白酶的裂解位点。

[0102] 根据本发明的多肽可以包括氨基酸序列之间的一个或多个接头序列。接头序列可以设置在序列“A”、“B”和/或“C”中的任何两个或更多个之间。在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括氨基酸序列A+B+C-[接头]-A+B+C,或者由其组成。在一些实施方案中,多肽包括SEQ ID NO:14,或者由其组成。

[0103] 接头序列对于本领域技术人员是已知的,并例如在Chen等,Adv Drug Deliv Rev (2013) 65 (10) :1357-1369中进行了描述,其全部内容通过引用合并于此。在一些实施方案中,接头序列可以是柔性接头序列。柔性接头序列允许通过接头序列链接的氨基酸序列的相对移动。柔性接头对于技术人员是已知的,并且在Chen等,Adv Drug Deliv Rev (2013) 65 (10) :1357-1369中识别出一些柔性接头。柔性接头序列通常包括高比例的甘氨酸和/或丝氨酸残基。

[0104] 在一些实施方案中,接头序列包括至少一个甘氨酸残基和/或至少一个丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头序列由甘氨酸残基和丝氨酸残基组成。在一些实施方案中,接头序列具有1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30或1-35个氨基酸的长度。

[0105] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括非氨基酸接头。在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以包括两个以上的多肽,该两个以上的多肽通过共轭、例如通过亲核取代(例如,胺类和醇类与酰基卤化物、活性酯的反应)、亲电取代(例如,烯胺反应)以及碳-碳和碳-杂原子重键的加成(additions to carbon-carbon and carbon-heteroatom multiple bonds)(例如,迈克尔反应、狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)加成)链接。这些和其他有用的反应在例如March,Advanced Organic Chemistry,3rd Ed.,John Wiley&Sons, New York,1985;Hermanson,Bioconjugate Techniques,Academic Press,San Diego,1996;和Feeney et al.,Modification of Proteins;Advances in Chemistry Series, Vol.198,American Chemical Society,Washington,D.C.,1982中进行了讨论。

[0106] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括可裂解接头。

[0107] 可能需要根据本发明的多肽缺少CR1的某些特性。例如,可能需要多肽缺少将其他方式(otherwise)抑制通过布鲁赫膜(BrM)的扩散或将干扰天然辅因子家族蛋白活动的区域。

[0108] 根据本发明的多肽缺少CR1跨膜结构域(SEQ ID NO:32)。根据本发明的多肽可缺少CR1胞质尾区(cytoplasmic tail)(SEQ ID NO:33)。在优选的实施方案中,根据本发明的多肽为可溶性的。

[0109] 根据本发明的多肽可以缺少能够以其他方式被致病菌利用来破坏宿主免疫系统的区域。细菌已经在其表面上发展出了能够结合并从血液中募集可溶性补体因子H的分子。这使得细菌能够在补体调节剂中有效包覆其自身,并避开宿主的免疫响应。根据本发明的多肽可以缺少细菌结合位点,使得它们无法被入侵病原体使用以避开免疫响应。

[0110] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括一个或多个糖基化位点(site for glycosylation)。在一些实施方案中,根据本发明的多肽是糖基化的。

[0111] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽是非糖基化的。在一些实施方案中,根据本发明的多肽缺少一个或多个糖基化位点。在一些实施方案中,本发明的多肽缺少一个或多个N链接糖基化位点。在一些实施方案中,根据本发明的多肽缺少N链接聚糖(N-linked glycan)。在一些实施方案中,根据本发明的多肽由不能糖基化多肽或不能完全糖基化多肽的细胞表达和/或分泌。例如,细胞可缺少功能性糖基转移酶(glycosyl transferase enzyme)。在一些实施方案中,多肽为无糖基化的(aglycosyl)(即非糖基化的)。在一些实施方案中,多肽已经例如通过用糖苷酶(例如肽N-糖苷酶)的处理而被去糖基化。去糖基化优选为非变性的。在一些实施方案中,根据本发明的多肽为部分糖基化的、非糖基化的或去糖

基化的。

[0112] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽缺少符合SEQ ID NO:27的共有序列的序列。在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括符合已经突变以去除N糖基化位点的SEQ ID NO:27的共有序列的一个或多个序列。在一些实施方案中,根据SEQ ID NO:27的一个或多个共有序列中的天冬酰胺(Asn,N)残基由另一氨基酸残基取代,例如选自以下的残基:丙氨酸(Ala,A)、半胱氨酸(Cys,C)、天冬氨酸(Asp,D)、谷氨酸(Glu,E)、苯丙氨酸(Phe,F)、甘氨酸(Gly,G)、组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、赖氨酸(Lys,K)、亮氨酸(Leu,L)、甲硫氨酸(Met,M)、脯氨酸(Pro,P)、谷氨酰胺(Gln,Q)、精氨酸(Arg,R)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、缬氨酸(Val,V)、色氨酸(Trp,W)或酪氨酸(Tyr,Y)。在一些实施方案中,根据SEQ ID NO:27的一个或多个共有序列中的Asn(N)残基由Gln(Q)残基取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:27的残基X₂为不是Ser(S)或Thr(T)的氨基酸,或突变成不是Ser(S)或Thr(T)的氨基酸。

[0113] 在一些实施方案中,多肽包括位置509和/或位置578(根据Uniprot:P17927编号)处的一个或多个氨基酸取代,该多肽包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,该一个或多个氨基酸取代选自N509Q和/或N578Q。在一些实施方案中,多肽包括位置959和/或位置1028(根据Uniprot:P17927编号)处的一个或多个氨基酸取代,该多肽包括与SEQ ID NO:3具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,该一个或多个氨基酸取代选自N959Q和/或N1028Q。在一些实施方案中,多肽包括位置509、578、959和/或位置1028(根据Uniprot:P17927编号)处的一个或多个氨基酸取代,该多肽包括与SEQ ID NO:13具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,该一个或多个氨基酸取代选自N509Q、N578Q、N959Q和/或N1028Q。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0114] 在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:15和/或SEQ ID NO:31具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0115] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括分泌途径序列、以及符合已经突变以去除N糖基化位点的SEQ ID NO:27的共有序列的一个或多个序列。在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括对应于SEQ ID NO:48、50、52、53和/或54的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:48、50、52、53和/或54具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0116] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以包括氨基酸序列以促进多肽的表达、折叠、运输(trafficking)、加工、纯化或检测。例如,多肽可以包括编码蛋白标签(protein

tag)的序列,可选地在多肽的N或C末端处,在接头中,或在接头的N或C末端处,蛋白标签例如His(例如6XHis)、FLAG、Myc、GST、MBP、HA、E或生物素标签。在一些实施方案中,多肽包括可检测部分,例如荧光、冷光、可免疫检测、放射、化学、核酸或酶标记(label)。在一些实施方案中,可检测部分促进从受试者获取的样品中的多肽的检测,例如,在向受试者施用根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物之后。样品可以为从受试者获取的任何生物样品。在一些实施方案中,样品为液体活检,诸如眼内液(ocular fluid)(泪液、房水(aqueous humour)或玻璃体液)、血液、血浆等。在一些实施方案中,样品为细胞学样品或组织样品,诸如例如眼部细胞/组织的手术样品。

[0117] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以通过蛋白质印迹(Western blotting)、质谱分析法和/或例如通过特定肽酶的酶消化,来检测和/或与内源性CR1区分。在一些实施方案中,多肽可以包括点突变,以通过酶消化生成肽,该酶消化不同于来自内源性CR1的消化后肽(post-digestion peptide)。

[0118] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以额外包括用于去除蛋白标签的裂解位点。例如,可能需要在纯化后去除用于纯化多肽的标签。在一些实施方案中,裂解位点可以例如为烟草蚀纹病毒(Tobacco Etch Virus,TEV)蛋白酶裂解位点,例如如SEQ ID NO:34所示。

[0119] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽包括对应于SEQ ID NO:40、42、44和/或46的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:40、42、44和/或46具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列,或者由其组成。这样的多肽可以具有本文提供的任何长度。

[0120] 如本文所使用的,“多肽”包括分子,该分子包括多于一个的多肽链,该多肽链可以联合(例如共价地或非共价地)成复合物。也就是说,在本发明的含义内的“多肽”包含分子,该分子包括一个或多个多肽链。本发明的多肽可以在各种不同的实施方案中、以及在体外或体内表达/产生的不同阶段包括例如信号肽、蛋白标签、用于去除蛋白标签的裂解位点等。本发明的多肽可以包括本文描述的任何CR1 CCP序列,或CR1 CCP结构域8(SEQ ID NO:8)、9(SEQ ID NO:9)、10(SEQ ID NO:10)、15(SEQ ID NO:8)、16(SEQ ID NO:11)和/或17(SEQ ID NO:12)的任何组合,或本文描述的序列“A”、“B”和/或“C”的任何组合,可选地与本文描述的本发明的多肽的任意其他特征(例如信号肽、接头、检测序列、糖基化位点的缺失、取代的氨基酸残基、蛋白标签、用于去除蛋白标签的裂解位点、分泌途径序列、用于去除分泌途径序列的裂解位点)中的一个或多个相结合。

[0121] 序列同一性

[0122] 如本文所使用的,对应于参考氨基酸序列的氨基酸序列可以包括与参考序列至少60%的序列同一性,例如至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的序列同一性。

[0123] 为了确定两个以上氨基酸或核酸序列之间的百分比同一性的目的,成对和多条序列比对(alignment)可以以本领域技术人员已知的各种方式实现,例如,使用公开可获取的计算机软件,诸如ClustalOmega(Söding,J.2005,Bioinformatics 21,951-960)、T-coffee

(Notredame et al.2000,J.Mol.Biol.(2000) 302,205-217)、Kalign(Lassmann and Sonnhammer 2005,BMC Bioinformatics,6(298))、和MAFFT(Katoh and Standley 2013,Molecular Biology and Evolution,30(4)772-780)软件。当使用这类软件时,优选使用例如空位罚分(gap penalty)和延伸罚分(extension penalty)的默认参数。

[0124] 序列

[0125]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	人补体受体 1	MGASSPRSEPEVGPAPGLPFCCGSSLAVVLLALPVAW

[0126]

(Uniprot: P17927; 词条版本 181 (2017 年 10 月 25 日)、序列版本 3 (2010 年 3 月 2 日)); 残基 1-2039 包括信号序列 [CCP 结构域“8-10”和“15-17”由单下划线表示、个体的 CCP 结构域 8、9、10、15、16、17 由双下划线表示; CCP 8-10 和 15-17 之间的氨基酸差异由波浪下划线表示]	GQCNAPEWLPPFARPTNLTDEFEFPIGTYLNYECRPGYSGR PFSIICLKNSVWTGAKDRCKRRKSCRNPDPVNGMVHVIK IQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIISGDTVWDNETPI CDRIPCGLPPTITNGDFISTNRENFHYGSVVTYRCNPGSG GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIIPNKCTP PNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCQPGFVMKGPRRVKC QALNKWEPELPSCSRVCQPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQ EVFYSCPEGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDD FMGQLLNGRVLFVNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYC VLAMESLWNSSVPVCEQIFCPSPPVIPNGRHTGKPLEVF PFGKTVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNGVW SSPAPRCGILGHCAQPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSLK <u>YECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDP</u> <u>VNGMVHVITDIQVGSRINYSCTTGHR</u><u>LIGHSSAECILSGN</u> <u>AAHWSTKPPICQRI</u><u>PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSV</u> <u>VTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAP</u> <u>QCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCQPGF</u> <u>VMKGPRRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPPDVLHAERTQ</u> <u>RDKNFSPGQEVFYSCPEGYDLRGAASMRCTPQGDWSPA</u> <u>PTCEVKSCDDFMGQLLNGRVLFVNLQLGAKVDFVCDEGF</u> <u>QLKGSSASYCVLAGMESLWNSSVPVCEQIFCPSPPVIPNG</u> <u>RHTGKPLEVFPFGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRC</u> <u>TSDPQNGVWSSPAPRCGILGHCAQPDHFLFAKLKTQTN</u> <u>ASDFPIGTS</u><u>SLKYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCK</u> <u>RKSKCTPPDPVNGMVHVITDIQVGSRINYSCTTGHR</u><u>LIGH</u> <u>SSAECILSGNTAAHWSTKPPICQRI</u><u>PCGLPPTIANGDFIST</u> <u>NRENFHYGSVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDD</u> <u>QVGIWSGPAPQCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNE</u> <u>VVEFRCQPGFVMKGPRRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPP</u> <u>PEILHGEHTPSHQDNFSPGQEVFYSCPEGYDLRGAASLHC</u> <u>TPQGDWSPEAPRCAVKSCDDFLGQLPHGRVLFPLNLQLGA</u> <u>KVSFVCDEGFRLKGSSVSHCVLVGMRS</u><u>LWNSSVPVCEHIF</u> <u>CPNPPAILNGRHTGTPSGDIPYGKEISYTCDPHPDRGMTF</u> <u>NLIGESTIRCTSDPHGNGVWSSPAPRCELSVRAGHCKTPE</u> <u>QFPFASPTIPINDFEFPVGTSLNYECRPGYFGKMF</u><u>SISCL</u> <u>ENLVWSSVEDNCRKSCGPPPEPFNGMVHINTDTQFGSTV</u> <u>NYSCNEGFR</u><u>LIGSPSTTCLVSGNNVTWDK</u><u>KAPICEII</u><u>ISCE</u> <u>PPPTISNGDFYSNNRTSFHNGTVV</u><u>TYQCHTGP</u><u>DGEQLFEL</u> <u>VGERSIYCTSKDDQVGWSSPPPRCISTNKCTAPEVENAI</u> <u>RVPGNRSFFSLTEIIRFRCQPGFVMVGSHTVQCQTNGRWG</u> <u>PKLPHCSRVCQPPPEILHGEHTLSHQDNFSPGQEVFYSC</u> <u>PSYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRCTVKSCDDFLGQLPH</u> <u>GRVLLPLNLQLGAKVSFVCDEGFRLKGRSASHCVLAGMKA</u> <u>LWNSSVPVCEQIFCPNPPAILNGRHTGTPFGDIPYGKEIS</u> <u>YACDTHPDRGMTFNLIGESSIRCTSDPQNGVWSSPAPRC</u>
---	--

[0127]

		ELSVPAACPHPPKIQNGHYIGGHVSLYLPGMTISYICDPG YLLVGKGFIFCTDQGIWSQLDHYCKEVNCSFPLFMNGISK ELEMKKVYHYGDYVTLKCEDGYTLEGSPWSQCQADDRWDP PLAKCTSRTHDALIVGTLSGTIFFILLIIFLSWIILKHRK GNAHENPKVAIHLHSQGGSSVHPRTLQTNEENSRVLP
2	人补体受体 1 CCP 8-10 (UniProt: P17927 残基 491-684) 不具有前导序列	GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSKYECRPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITD IQVGSRIYSCSTTGHRLIGHSSAECILSGN AA HWSTKPP CQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCN PGSG GRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I
3	人补体受体 1 CCP 15-17 (UniProt : P17927 残基 941-1134) 不具有前导序列	GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSKYECRPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITD IQVGSRIYSCSTTGHRLIGHSSAECILSGN TA HWSTKPP CQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCN LGSR GRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I
4	人补体受体 1;CCP8-10、15-17 (UniProt: P17927 残基 491-684; 残基 941-1134) 的共有序列 不具有前导序列	GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSKYECRPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITD IQVGSRIYSCSTTGHRLIGHSSAECILSGN X₁ AHWSTKPP ICQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCN X₂ G SX₃ GRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I
5	人补体受体 1 CCP 8-10 (UniProt: P17927 残基 491-684) 非糖基化的; 不具有前导序列 [下划线标记突变的糖基化位点; 加粗的取代对应于 UniProt: P17927 的位置 509 和 578]	GHCQAPDHFLFAKLKTQT Q ASDFPIGTSKYECRPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITD IQVGSRI Q YSCSTTGHRLIGHSSAECILSGN AA HWSTKPP CQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCN PGSG GRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I
6	人补体受体 1 CCP 15-17 (UniProt : P17927 残基 941-1134) 非糖基化的; 不具有前导序列 [下划线标记突变的糖基化位点; 加粗的取代对应于 UniProt: P17927 的位置 959 和 1028]	GHCQAPDHFLFAKLKTQT Q ASDFPIGTSKYECRPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITD IQVGSRI Q YSCSTTGHRLIGHSSAECILSGN TA HWSTKPP CQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCN LGSR GRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I

[0128]

7	来自因子H的天然信号/前导序列	MRLAKIICLMLWAICVA
8	人补体受体 1 CCP8/CCP15 (UniProt: P17927 残基 491-550/941-1000) 序列“A”	<u>GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u> <u>SLKYECRPEYYGR</u> <u>PFSITCLDNLVWSSPKDVCKR</u>
9	人补体受体 1 CCP9 (UniProt: P17927 残基 552-612)	<u>KSCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS</u> <u>RINYSCTTGHR</u> <u>LIGH</u> <u>SAECILSGN</u> <u>AAHWSTKPPICQ</u>
10	人补体受体 1 CCP10 (UniProt: P17927 残基 613-684)	<u>RIPCGLPPTIANGDFISTNREN</u> <u>FHYGSVV</u> <u>TYRCN</u> <u>PGSG</u> <u>GR</u> <u>KVFELVG</u> <u>EPSIYCTSNDDQVGIW</u> <u>SGPAPQCI</u> <u>I</u>
11	人补体受体 1 CCP16 (UniProt: P17927 残基 1002-1062)	<u>KSCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS</u> <u>RINYSCTTGHR</u> <u>LIGH</u> <u>SAECILSGN</u> <u>TAHWSTKPPICQ</u>
12	人补体受体 1 CCP17 (UniProt: P17927 残基 1063-1134)	<u>RIPCGLPPTIANGDFISTNREN</u> <u>FHYGSVV</u> <u>TYRCN</u> <u>LGS</u> <u>RGR</u> <u>KVFELVG</u> <u>EPSIYCTSNDDQVGIW</u> <u>SGPAPQCI</u> <u>I</u>
13	人补体受体 1 CCP 8-10 和 15-17 (连续;不具有前导序列) [CCP8-10 和 15-17 之间的氨基酸差异由波浪下划线表示]	<u>GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u> <u>SLKYECRPEYYGR</u> <u>PFSITCLDNLVWSSPKDVCKR</u> <u>KSCKTPDPVNGMVHVITD</u> <u>IQVGS</u> <u>RINYSCTTGHR</u> <u>LIGH</u> <u>SSAECILSGN</u> <u>AAHWSTKPPICQ</u> <u>RIPCGLPPTIANGDFISTNREN</u> <u>FHYGSVV</u> <u>TYRCN</u> <u>PGSG</u> <u>GRKVFELVG</u> <u>EPSIYCTSNDDQVGIW</u> <u>SGPAPQCI</u> <u>I</u> <u>IGHCQAP</u> <u>DHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u> <u>SLKYECRPEYYGR</u> <u>PFSITC</u> <u>LDNLVWSSPKDVCKR</u> <u>KSCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS</u> <u>RINYSCTTGHR</u> <u>LIGH</u> <u>SSAECILSGN</u> <u>TAHWSTKPPICQ</u> <u>RIPCGLPPTIANGDFISTNREN</u> <u>FHYGSVV</u> <u>TYRCN</u> <u>LGS</u> <u>RGRKVFEL</u> <u>VG</u> <u>EPSIYCTSNDDQVGIW</u> <u>SGPAPQCI</u> <u>I</u>
14	人补体受体 1 CCP 8-10 (接头) 15-17	<u>GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u> <u>SLKYECRPEYYGR</u> <u>PFSITCLDNLVWSSPKDVCKR</u> <u>KSCKTPDPVNGMVHVITD</u> <u>IQVGS</u> <u>RINYSCTTGHR</u> <u>LIGH</u> <u>SSAECILSGN</u> <u>AAHWSTKPPICQ</u> <u>RIPCGLPPTIANGDFISTNREN</u> <u>FHYGSVV</u> <u>TYRCN</u> <u>PGSG</u> <u>GRKVFELVG</u> <u>EPSIYCTSNDDQVGIW</u> <u>SGPAPQCI</u> <u>I</u> - [接 头] - <u>GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u> <u>SLKYECRPEYYGR</u> <u>PFSITCLDNLVWSSPKDVCKR</u> <u>KSCKTPDPVNGMVHVITD</u> <u>IQVGS</u> <u>RINYSCTTGHR</u> <u>LIGH</u> <u>SSAECILSGN</u> <u>TAHWSTKPPICQ</u> <u>RIPCGLPPTIANGDFISTNREN</u> <u>FHYGSVV</u> <u>TYRCN</u> <u>LGS</u> <u>RGRKVFEL</u> <u>VG</u> <u>EPSIYCTSNDDQVGIW</u> <u>SGPAPQCI</u> <u>I</u>
15	人补体受体 1 CCP 8-10 和 15-17 (连续)	<u>GHCQAPDHFLFAKLKTQ</u> <u>TASDFPIGTS</u> <u>SLKYECRPEYYGR</u> <u>PFSITCLDNLVWSSPKDVCKR</u> <u>KSCKTPDPVNGMVHVITD</u>

[0129]

	非糖基化的； 不具有前导序列 [下划线标记突变的糖基化位点；加粗的取代对应于 UniProt: P17927 的位置 509、578、959 和 1028]	IQVGSRI<u>Q</u>YSCTTGHRLLIGHSSAECILSGNAAHWSTKPPI CQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENPHYGSVVITYRCNPGSG GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIIGHCQAP DHFLFAKLKTQTQASDFPIGTSLKYECRPEYYGRPFISITC LDNLVWSSPKDVCKRKCKTTPDPVNGMVHVITDIQVGSR <u>I</u><u>Q</u>YSCTTGHRLLIGHSSAECILSGNTAHWSTKPPICQRIPC GLPPTIANGDFISTNRENPHYGSVVITYRCNLGSRGRKVFE LVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI
16	人补体受体 1；针对 CCP 9、16 的共有序列（对应于 UniProt: P17927 残基 552-612 和 1002-1062） “序列 B”	KCKTTPDPVNGMVHVITDIQVGSRINYSCTTGHRLLIGH SAECILSGNX₁AHWSTKPPICQ
17	人补体受体 1；针对 CCP 10、17 的共有序列 （对应于 UniProt: P17927 残基 613-684 和 1063-1134） “序列 C”	RIPCGLPPTIANGDFISTNRENPHYGSVVITYRCNX₂GSX₃ GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI
18	人 C3（UniProt: P01024；词条版本 221（2017 年 12 月 20 日）； 序列版本 2（2006 年 12 月 12 日）） 包括信号肽	MGPTSGPSLLLLLLTHLPLALGSPMYSIITPNILRLESEE TMVLEAHDAQGDVPVTVTVHDFPGKKLVLSSEKTVLTPAT NHMGNVFTFTIPANREFKSEKGRNKFVTVQATFGTQVVEKV VLVSLQSGYLFITDKTIYTPGSTVLYRIFTVNHKLLPVG RTVMVNIENPEGIPVKQDSLSSQNQLGVLPLSWDIPELVN MGQWKIRAYYENSPPQVFSTEFVKEYVLPSEFVIVEPTE KFYYIYNEKGLEVTITARFLYGKKVEGTAFVIFGIQDGEQ RISLPESLKRIPIEDGSGEVLSRKVLLDGVQNPRAE DLV GKSLYVSATVILHSGSDMVQAERSGIPIVTSPYQIHFTKT PKYFKPGMPFDLMVFVTNPDGSPAYRVPVAVQGEDTVQSL TQGDGVAKLSINTHPSQKPLSITVVRTKKQELSEAEQATRT MQALPYSTVGNSNNYLHLSVLRTLRPGETLVNFNLLRMD RAHEAKIRYYTYLIMNKGRLKAGRQVREPGQDLVVLPLS ITTD FIPSFRLVAYYTLIGASGQREV VADSVWVDVKDSCV GSLVVKSGQSEDRQVPVPGQMTLKI EGDHGARVVLVAVDK GVFVLNKKNKLTQSKIWDVVEKADIGCTPGSGKDYAGVFS DAGLTFTSSSGQQT AQRAELQCPQPAARRRRSVQLTEKRM DKVGKYPKELRKCCEDGMRENPMRFSCQRRTRFISLGEAC KKVFLDCCNYITELRRQHARASHLGLARSNLDEDI IAEEN IVSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNGISTKLMNIFLKDSIT TWEILAVSMSDKKGICVADPFVETVMQDFFIDLRLPYSVV RNEQVEIRAVLYNYRQNQELKVRVELLHNP AFCSLATTKR RHQQT VTI PPKSSLSVPYVIVPLKTGLQEVEVKA AAVYHHF ISDGVKSLKVVPEGIRMNKTVAVRTLDPERLGREGVQKE

[0130]

		DIPPADLSDQVPDTESETRILLQGTFVAQMTEDAVDAERL KHLIVTPSGCGEQNMIGMTPTVIAVHYLDETEQWEKFGLE KRQGALELIKKGTYTQQLAFRQPSSAFAAFVKRAPSTWLTA YVVKVFS LAVNLI AID SQVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQE DAPVIHQEMIGGLRNNNEKDMALTAFLVLSLQEAKDICEE QVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYTVAIAGYALAQM RLKGPLLNKFLT TAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYALLAL LQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYYG GYGSTQATFMVFQALA QYQKDAPDHQELNLDVSLQLPSRSSKITHRIHWESASLLR SEETKENEGFTVTAEGKGQGTLSVVTMYHAKAKDQLTCNK FDLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEICTRYRGDQDATM SILDISMGTGFAPD TDDLKQLANGVDRIYSKYELDKAFSD RNTLIIYLDKVSHSEDDCLAFKVH QYFNVELIQPGAVKVY AYYNLEESCTRFYHPEKEDGKLNKLCRDELRCRAEENCFI QKSDDKVTLERLDKACEPGVDYVYKTRLVKVQLSNDFDE YIMAIEQTIKSGSDEVQVGQQT FISP I KCREALKLEKK HYLMWGLSSDFWGEKPNLSYII GKDTWVEHWPEEDEQCDE ENQKQCQDLGAFTESMVVFGCPN
19	人 C3 β 链 (UniProt: P01024; 词条版本 221 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2006 年 12 月 12 日); 残基 23- 667)	SPMYSIIITPNILRLESEETMVLEAHDAQGDVPVTVTVHDF PGKKLVLSSEKTVLTPATNHMGNTFTIPANREFKSEKGR NKFVTVQATFGTQVVEKVVLVSLQSGYLF IQTDKTIYTPG STVLYRIFTVNHKLLPVGRVTMVNIENPEGIPVKQDSLSS QNQLGVLPLSWDIPELVNMGQWKIRAYYENSPPQVFSTEF EVKEYVLPSFEVIVEPTEKFYIYNEKGLEVTITARFLYG KKVEGTAFVIFGIQDGEQRISLPESLKRIPIEDGSSEVVL SRKVLLDGVQNPRAE DLVGKSLYVSATVILHSGSDMVQAE RSGIPIVTSPIYQIHFTKTPKYFKPGMPFDLMVFVTNPDGS PAYRVPVAVQGEDTVQSLTQGDGVAKLSINTHPSQKPLSI TVRTRKKQELSEAEQATRTMQALPYSTVGNSNNYLHLSVLR TELRPGETLVNFNLLRMDRAHEAKIRYYTYLIMNKGRLK AGRQVREPGQDLVVLPLSITTD FIPSFRLVAYYTLIGASG QREVVADSVWVDVKDSCVGS LVVKSQSED RPVP GQOMT LKIEGDHGARVVLVAVDKGVFVLNKKNKLTQSKIWDVVEK ADIGCTPGSGKDYAGVFS DAGLTFTSSSGQQT AQRAELQC PQPAA
20	人 C3 α' 链 (UniProt: P01024; 词条版本 221 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2006 年 12 月 12 日); 残基 749-1663)	SNLDEDIIAEENIVSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNGIST KLMNIFLKDSITTWEILAVSMSDKKGICVADPFVTVMQD FFIDLRLPYSVVRNEQVEIRAVLYNYRQNQELKVRVELLH NPAFCSLATTKRRHQQT VTI PPKSSLSVPYVIVPLKTGLQ EVEVKAAYVHHFISDGVRSKLVVPEGIRMNKTAVVRTLD PERLGREGVQKEDI PPADLSDQVPDTESETRILLQGTFVA QMTEDAVDAERLKHLIVTPSGCGEQNMIGMTPTVIAVHYL DETEQWEKFGLEKRQGALELIKKGTYTQQLAFRQPSSAFAA FVKRAPSTWLTA YVVKVFS LAVNLI AID SQVLCGAVKWL ILEKQKPDGVFQEDAPVIHQEMIGGLRNNNEKDMALTAFLV

[0131]

		ISLQEAKDICEEQVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYT VAIAGYALAQMGRLKGPLLNKFLTTAKDKNRWEDPGKQLY NVEATSYALLALLQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYYGGS TQATFMVFQALAQYQKDAPDHQELNLDVSLQLPSRSSKIT HRIHWESASLLRSEETKENEGFTVTAEGKGQGTLSVVTMY HAKAKDQLTCNKF DLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEI CTRYRGDQDATMSILDISMMTGFAPDTDDLKQLANGVDRI ISKYELDKAFSDRNTLIIYLDKVS HSEDDCLAFKVHQYFN VELIQPGAVKVYAYYNLEESCTRFYHPEKEDGKLNKLCRD ELCRCAEENCFIQKSDDKVTLEERLDKACEPGVDYVYKTR LVKVQLSND FDEYIMAIEQTIKSGSDEVQVGQRTFISPI KCREALKLEEKHYLMWGLSSDFWGEKPNLSYIIIGKDTWV EHWPEEDECQDEENQKQCQDLGAFTESMVVFGCPN
21	人 C3a (UniProt : P01024 ; 词条版本 221 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2006 年 12 月 12 日); 残基 672-748)	SVQLTEKRMDKVGKYPKELRKCCEDGMRENPMRFSCQRR RFISLGEACKKVFLDCCNYITELRRQ HARASHLGLAR
22	人 C3 α' 链片段 1 (UniProt: P01024; 词条版本 221 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2006 年 12 月 12 日); 残基 749-1303)	SNLDEDI IAEENIVSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNGIST KLMNIFLKDSITTWEILAVSMSDKKICVADPFVETVMQD FFIDLRLPYSVVRNEQVEIRAVLYNYRQNELKVRVELLH NPAFCSLATTKRHRQQT VTI PPKSSLSVPYVIVPLKTGLQ EVEVKAAYVHHFISDGVRS LKVVPEGIRMNKTVAVRTLD PERLGREGVQKEDI PPADLS DQVPDTESETRILLQGT PVA QMTEDAVDAERLKLHIVTPSGCGEQNMIGMPTPTVIAVHYL DETEQWEKFGLEKRQGALELIKKGYTQQLAFRQPSSAFAA FVKRAPSTWLTAYVVKVFS LAVNLIAIDSQVLCGAVKWL LEKQKPDGVFQEDAPVIHQEMIGGLRNNNEKDMALTA FVL ISLQEAKDICEEQVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYT VAIAGYALAQMGRLKGPLLNKFLTTAKDKNRWEDPGKQLY NVEATSYALLALLQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYYGGS TQATFMVFQALAQYQKDAPDHQELNLDVSLQLPSR
23	人 C3 α' 链片段 2 (UniProt: P01024; 词条版本 221 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2006 年 12 月 12 日); 残基 1321-1663) 也被称为 C3c 片段 2	SEETKENEGFTVTAEGKGQGTLSVVTMYHAKAKDQLTCNK FDLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEICTRYRGDQDATM SILDISM MTGFAPDTDDLKQLANGVDRI SKYELDKAFSD RNTLIIYLDKVS HSEDDCLAFKVHQYFNVELIQPGAVKVY AYYNLEESCTRFYHPEKEDGKLNKLCRDELRCRAEENCFI QKSDDKVTLEERLDKACEPGVDYVYKTRLVKVQLSND FDE YIMAIEQTIKSGSDEVQVGQRTFISPIKCREALKLEEK HYLMWGLSSDFWGEKPNLSYIIIGKDTWVEHWPEEDECQDE ENQKQCQDLGAFTESMVVFGCPN
24	人 C3f (UniProt : P01024 ; 词条版本	SSKITHRIHWESASLLR

[0132]

	221 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2006 年 12 月 12 日); 残基 1304-1320)	
25	人补体因子 I (UniProt: P05156; 词条版本 192 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2011 年 1 月 11 日))	MKLLHVFLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTH LSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRR SFPTYCQQKSLECLHPGTFKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGN TDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQ QGADTQRRFKLSDL SINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTK RRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFQCVNGKYISQMK CDGINDCGDQSDLELCKACQKGKGFHCKSGVCIPSQYQCNG EVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKS LLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDA SGITCGGIYIGGCWILTAAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWI HPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGN KKDCELP RSIPACVPWSPYLFQPN DTCIVSGWGREKDNER VFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDA CKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYT KVANYFDWISYHVGRPFISQYNV
26	人补体因子 I 蛋白水解结构域 (UniProt: P05156; 词条版本 192 (2017 年 12 月 20 日); 序列版本 2 (2011 年 1 月 11 日); 残基 340-574)	IVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAA HCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHE NYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELP RSIPACVPWSPY LFQPN DTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFY GNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM DANNVTY VWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVG
27	用于 N 链接糖基化的 共有序列	NX_1X_2 其中 X_1 =除了 P 的任何氨基酸 X_2 =S 或 T
28	补体因子 H 同种型 FHL-1 (UniProt : P08603-2) 包括前导序列 (下划 线) SEQ ID NO.7	<u>MRL LAKI ICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQ</u> TYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKC QKRPCGHPGDT PFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQL LGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSS AMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSK EKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMG YEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPL RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRC TLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCYDEH FETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQ NYGRKFVQGSIDVACHPGYALPKAQT TVTCMENGWSPTP RCIRVSFTL
29	人补体因子 H	<u>MRL LAKI ICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQ</u>

[0133]

	(UniProt: P08603; 词条版本 214 (2017 年 10 月 25 日); 序列版本 4 (2007 年 9 月 11 日)) 包括前导序列 (下划线) SEQ ID NO.7	TYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKC QKRPCGHPGDTFPGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQL LGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSS AMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSK EKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMG YEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRC TLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYICDEH FETPSGSYWDHIHCTQDGWSPA VPCLRKCYFPYLENGYNQ NYGRKFVQGSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTP RCIRVKTCCKSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLG YVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTK NDFTWFKLNDTLDYECHDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSD LPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGVEVLKFSCKPG FTIVGPNSVQCYHFGLSPLPICKEQVQSCGPPPELLNGN VKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPFLMKGPNKIQCVDGWTT LPVCIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCS ESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCV AIDKLKKCKSSNLI I LEEHLKNKKEFDHNSNI RYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPE VNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLN YRDGEKVS VLCQ ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGT INSSRSSQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEENETTCYMGKW SSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEVVTYKCF EGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCI KTDCLSLPSFENAIP MGEKKDVYKAGEQVTYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGR PTCRDTSCVNPPTVQNAYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSP YEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPPIDNGDI TSFPLSVYAPASSVEYQCQONLYQLEGNKRITCRNGQWSEP PKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFV CKRGYRLSSRSHTLR TTCWDGKLEYPTCAKR
30	人补体受体 1 (UniProt: P17927 残基 491-1134, 从 CCP8 至 CCP17) [CCP 结构域“8-10”和“15-17”由单下划线表示、个体的 CCP 结构域 8、9、10、15、16、17 由双下划线表示; CCP 8-10 和 15-17 之间的氨基酸差异由加粗/波浪下划线表示]	<u>GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u>SLKYECRPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITD <u>IQVGS</u>RINYSCTTGHR LIGHSSAECILSGN~~AA~~HWSTKPP I <u>CQRI</u>PCGLPPTIANGDFISTNREN FHYGSVVTYRCN~~PGSG~~ <u>GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIW</u>SGPAPQCIIPNKCTP PNVENGILVSDNRS LFLSNEVVEFR CQPGFVMKGPRRVKC QALNKWEPELPSCSRVCQPPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQ EVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDD FMGQLLNGRVLFPVNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYC VLAMESLWNSSVPVCEQIFCPSPPVIPNGRHTGKPLEVF PFGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQGNVW SSPAPRCGIL<u>GHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS</u>SLK <u>YECRPEYYGR</u>PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDP <u>VNGMVHVITDIQVGS</u>RINYSCTTGHR LIGHSSAECILSGN <u>TAHWSTKPPICQRI</u>PCGLPPTIANGDFISTNREN FHYGSV

[0134]

		VTYRCN <u>LGS</u> <u>R</u> GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAP QCII
31	人补体受体 1 (UniProt: P17927 残基 491-1134, CCP8-CCP17) 非糖基化的 [CCP 结构域“8-10”和“15-17”由单下划线表示、个体的 CCP 结构域 8、9、10、15、16、17 由双下划线表示; CCP 8-10 和 15-17 之间的氨基酸差异由加粗/波浪下划线表示; 加粗/点下划线标记的取代对应于 UniProt: P17927 的位置 509、578、959 和 1028]]	GHCQAPDHFLFAKLKTQT <u>Q</u> ASDFPIGTSLKYECPPEYYGR PFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKCKTTPDPVNGMVHVITD IQVGSRI <u>Q</u> YSCTTGHRLLIGHSSAECILSGN <u>A</u> AHWSTKPPIC QRI ~~PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVV~~ TYRCN <u>PGSG</u> GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIIIPNKCTP PNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCQPGFVMKGPRRVKC QALNKWEPELPSCSRVCQPPDVLHAERTQRDKNFSPGQ EVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDD FMGQLLN ~~GRVLF~~ PVNLQLGAKVDFVCDEGFQKLGSSASYC VLAMESLWNSSVPVCEQIFCPSPVIPNGRHTGKPLEVF PFGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNGVW SSPAPRCGILGHCQAPDHFLFAKLKTQT <u>Q</u> ASDFPIGTSLK YECPPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKCKTTPDP VNGMVHVITDIQVGSRI <u>Q</u> YSCTTGHRLLIGHSSAECILSGN <u>T</u> AHWSTKPPICQRI ~~PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSV~~ VTYRCN <u>LGS</u> <u>R</u> GRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAP QCII
32	人补体受体 1 (UniProt: P17927; 词条版本 181 (2017 年 10 月 25 日)、序列 版本 3 (2010 年 3 月 2 日)) 跨膜结构域 (残基 1972-1996)	ALIVGTLSGTIFFILLIIFLSWIIL
33	人补体受体 1 (UniProt: P17927; 词条版本 181 (2017 年 10 月 25 日), 序列版本 3 (2010 年 3 月 2 日)) 胞质尾区 (残基 1997- 2039)	KHRKGNNAHENPKEVAIHLHSQGGSSVHPRTLQTNEENSR VLP
34	烟草蚀纹病毒 (TEV) 裂解位点	ENLYFQGS
35	人补体受体 1 CCP 8- 10 蛋白编码序列	AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCGGACATTGTCAGGC

[0135]

	包括前导序列 (双下划线) 包括 HindIII 限制酶裂解位点 (AAGCTT)、Kozak 共有序列 (GCCACC)、终止密码子(TAA)和 EcoRV 限制酶裂解位点 (GATATC)	CCCTGACCACTTCCTGTTCGCCAAGCTGAAAACCCAGACC AACGCCAGCGACTTCCCTATCGGCACCAGCCTGAAGTACG AGTGCAGACCCGAGTACTACGGCAGACCCTTCAGCATCAC CTGTCTGGACAACCTCGTGTGGTCTAGCCCCAAGGACGTG TGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGACCCCTCCTGATCCTGTGA ACGGCATGGTGCACGTGATCACCGACATCCAAGTGGGCAG CAGAATCAACTACAGCTGCACCACCGGCCACAGACTGATC GGACACTCTAGCGCCGAGTGTATCCTGAGCGGCAATGCCG CACACTGGTCCACCAAGCCTCCAATCTGCCAGAGAATCCC TTGCGGCCTGCCTCCTACAATCGCCAACGGCGATTTTCATC AGCACCAACAGAGAGAACTTCCACTACGGCTCCGTGGTCA CCTACAGATGCAATCCTGGCAGCGGCGGCAGAAAGGTGTT CGAACTTGTGGGCGAGCCCAGCATCTACTGCACCAGCAAC GATGACCAAGTCGGCATTTGGAGCGGCCCTGCTCCTCAGT GCATCATCTAAGATATC
36	人补体受体 1 CCP 8-10 蛋白编码序列 (下划线) 非糖基化的 包括前导序列 (双下划线) 包括 HindIII 限制酶裂解位点 (AAGCTT)、Kozak 共有序列 (GCCACC)、终止密码子(TAA)和 EcoRV 限制酶裂解位点 (GATATC)	AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCGGACATTGTCAGGC CCCTGACCACTTCCTGTTCGCCAAGCTGAAAACCCAGACA CAGGCCAGCGACTTCCCTATCGGCACCAGCCTGAAGTACG AGTGCAGACCCGAGTACTACGGCAGACCCTTCAGCATCAC CTGTCTGGACAACCTCGTGTGGTCTAGCCCCAAGGACGTG TGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGACCCCTCCTGATCCTGTGA ACGGCATGGTGCACGTGATCACCGACATCCAAGTGGGCAG CAGAATCCAGTACAGCTGCACCACAGGCCACAGACTGATC GGCCACTCTAGCGCCGAGTGTATCCTGTCTGGCAATGCCG CTCACTGGTCCACCAAGCCTCCAATCTGCCAGAGAATCCC TTGCGGCCTGCCTCCTACAATCGCCAACGGCGATTTTCATC AGCACCAACAGAGAGAACTTCCACTACGGCTCCGTGGTCA CCTACAGATGCAATCCTGGCAGCGGCGGCAGAAAGGTGTT CGAACTTGTGGGCGAGCCCAGCATCTACTGCACCAGCAAC GATGACCAAGTCGGCATTTGGAGCGGCCCTGCTCCTCAGT GCATCATCTAAGATATC
37	人补体受体 1 CCP 15-17 蛋白编码序列 (下划线) 包括前导序列 (双下划线) 包括 HindIII 限制酶裂解位点 (AAGCTT)、Kozak	AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCGGCCACTGTCAGGC CCCTGATCACTTCCTGTTCGCCAAGCTGAAAACCCAGACC AACGCCAGCGACTTCCCTATCGGCACCAGCCTGAAGTACG AGTGCAGACCCGAGTACTACGGCAGACCCTTCAGCATCAC CTGTCTGGACAACCTCGTGTGGTCTAGCCCCAAGGACGTG TGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGACCCCTCCTGATCCTGTGA ACGGCATGGTGCACGTGATCACCGACATCCAAGTGGGCAG CAGAATCAACTACAGCTGCACCACCGGCCACAGACTGATC

[0136]

	共有序列 (GCCACC)、终止密码子(TAA)和EcoRV限制酶裂解位点(GATATC)	GGACACTCTAGCGCCGAGTGTATCCTGAGCGGCAATGCCG CACACTGGTCCACCAAGCCTCCAATCTGCCAGAGAATCCC TTGCGGCCTGCCTCCTACAATCGCCAACGGCGATTTCATC AGCACCAACAGAGAGAACTTCCACTACGGCTCCGTGGTCA CCTACAGATGCAATCCTGGCAGCGGCGGCAGAAAGGTGTT CGAACTTGTGGGCGAGCCCAGCATCTACTGCACCAGCAAC GATGACCAAGTCGGCATTTGGAGCGGCCCTGCTCCTCAGT GCATCATCCCTAAGATATC
38	人补体受体 1 CCP 15-17 蛋白编码序列 (下划线) 非糖基化的 包括前导序列(双下 划线) 包括 HindIII 限制酶 裂解位点 (AAGCTT)、Kozak 共有序列 (GCCACC)、终止密 码子(TAA)和EcoRV 限制酶裂解位点 (GATATC)	AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCGGCCACTGTCAGGC CCCTGATCACTTCTGTTTCGCCAAGCTGAAAACCCAGACA CAGGCCAGCGACTTCCCTATCGGCACCAGCCTGAAGTACG AGTGCAGACCCGAGTACTACGGCAGACCCTTCAGCATCAC CTGTCTGGACAACCTCGTGTGGTCTAGCCCCAAGGACGTG TGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGACCCCTCCTGATCCTGTGA ACGGCATGGTGCACGTGATCACCGACATCCAAGTGGGCAG CAGAATCCAGTACAGCTGCACCACAGGCCACAGACTGATC GGCCACTCTAGCGCCGAGTGTATCCTGAGCGGAAACACAG CCCCTGGTCCACCAAGCCTCCAATCTGCCAGAGAATCCC TTGCGGCCTGCCTCCTACAATCGCCAACGGCGATTTCATC AGCACCAACAGAGAGAACTTCCACTACGGCTCCGTGGTCA CCTACAGATGCAACCTGGGCTCCAGAGGCCGGAAGGTGTT CGAACTTGTGGGCGAGCCTAGCATCTACTGCACCAGCAAC GACGACCAAGTCGGCATTTGGAGCGGACCTGCTCCTCAGT GCATCATCCCTAAGATATC
39	人补体受体 1 CCP 8- 10 蛋白编码序列(下 划线) 包括前导序列(双下 划线); His 标签(点划线); TEV 裂解位点(虚线) 包括 HindIII 限制酶 裂解位点 (AAGCTT)、Kozak 共有序列 (GCCACC)、终止密 码子(TAA)和EcoRV 限制酶裂解位点 (GATATC)	AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCACCACCATCACCA TCACGGCAGCAGCGAGAACCTGTACTTCCAAGGATCTTCT GGCGGCCACTGTCAGGCCCCTGATCACTTCTGTTTCGCCA AGCTGAAAACCCAGACCAACGCCAGCGACTTCCCTATCGG CACCAGCCTGAAGTACGAGTGCAGACCCGAGTACTACGGC AGACCCTTCAGCATCACCTGTCTGGACAACCTCGTGTGGT CTAGCCCCAAGGACGTGTGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGAC CCCTCCTGATCCTGTGAACGGCATGGTGCACGTGATCACC GACATCCAAGTGGGCAGCAGAATCAACTACAGCTGCACCA CCGGCCACAGACTGATCGGACACTCTAGCGCCGAGTGTAT CCTGAGCGGCAATGCCGCACACTGGTCCACCAAGCCTCCA ATCTGCCAGAGAATCCCTTGCGGCCTGCCTCCTACAATCG CCAACGGCGATTTTCATCAGCACCAACAGAGAGAACTTCCA CTACGGCTCCGTGGTACCTACAGATGCAATCCTGGCAGC GGCGGCAGAAAGGTGTTGCAACTTGTGGGCGAGCCCAGCA

[0137]

		<u>TCTACTGCACCAGCAACGATGACCAAGTCGGCATTGAG</u> <u>CGGCCCTGCTCCTCAGTGCATCATCTAAGATATC</u>
40	人补体受体 1 CCP 8-10 包括前导序列 (双下划线); His 标签 (点划线); TEV 裂解位点(虚线)	<u>MRL</u> LAKI <u>I</u> CLMLWAICVAHHHHHHGSS <u>ENLYFQ</u> SSGGHC QAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSLKYE <u>CRPEYYGR</u> PFS ITCLDNLVWSSPKDVCKRK <u>SCKTPDPV</u> NGMVHVITDIQV GSRINYSCTTGHR <u>LIGHSSAECILSGNA</u> AHWSTKPPICQR IPCGLPPTIANGDFISTNREN <u>FHYGSVV</u> TYRCNPGSGGRK VFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I
41	人补体受体 1 CCP 8-10 蛋白编码序列 (下划线) 非糖基化的 包括前导序列 (双下划线); His 标签 (点划线); TEV 裂解位点(虚线) 包括 HindIII 限制酶裂解位点 (AAGCTT)、Kozak 共有序列 (GCCACC)、终止密码子(TAA)和 EcoRV 限制酶裂解位点 (GATATC)	<u>AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC</u> <u>TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCACCACCATCACCA</u> <u>TCACGGCAGCAGCGAGA</u> ACCTGTACTTCCAAGGATCTTCT GGCGGCCACTGTCAGGCCCCTGATCACTTCCTGTTCGCCA AGCTGAAAACCCAGACACAGGCCAGCGACTTCCCTATCGG CACCAGCCTGAAGTACGAGTGCAGACCCGAGTACTACGGC AGACCCTTCAGCATCACCTGTCTGGACAACCTCGTGTGGT CTAGCCCCAAGGACGTGTGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGAC CCCTCCTGATCCTGTGAACGGCATGGTGCACGTGATCACC GACATCCAAGTGGGCAGCAGAATCCAGTACAGCTGCACCA CAGGCCACAGACTGATCGGCCACTCTAGCGCCGAGTGTAT CCTGTCTGGCAATGCCGCTCACTGGTCCACCAAGCCTCCA ATCTGCCAGAGAATCCCTTGCGGCCTGCCTCCTACAATCG CCAACGGCGATTTTCATCAGCACCAACAGAGAGAACTTCCA CTACGGCTCCGTGGTCACTACAGATGCAATCCTGGCAGC GGCGGCAGAAAGGTGTTGAACTTGTGGGCGAGCCCAGCA TCTACTGCACCAGCAACGATGACCAAGTCGGCATTGAG CGGCCCTGCTCCTCAGTGCATCATCTAAGATATC
42	人补体受体 1 CCP 8-10 非糖基化的 包括前导序列 (双下划线); His 标签 (点划线); TEV 裂解位点(虚线)	<u>MRL</u> LAKI <u>I</u> CLMLWAICVAHHHHHHGSS <u>ENLYFQ</u> SSGGHC QAPDHFLFAKLKTQQTQASDFPIGTSLKYE <u>CRPEYYGR</u> PFS ITCLDNLVWSSPKDVCKRK <u>SCKTPDPV</u> NGMVHVITDIQV GSRIQYSCTTGHR <u>LIGHSSAECILSGNA</u> AHWSTKPPICQR IPCGLPPTIANGDFISTNREN <u>FHYGSVV</u> TYRCNPGSGGRK VFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI I
43	人补体受体 1 CCP 15-17 蛋白编码序列 (下划线) 包括前导序列 (双下划线);	<u>AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC</u> <u>TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCACCACCATCACCA</u> <u>TCACGGCAGCAGCGAGA</u> ACCTGTACTTCCAAGGATCTTCT GGCGGCCACTGTCAGGCCCCTGATCACTTCCTGTTCGCCA AGCTGAAAACCCAGACCAACGCCAGCGACTTCCCTATCGG CACCAGCCTGAAGTACGAGTGCAGACCCGAGTACTACGGC

[0138]

	His 标签 (点划线); TEV 裂解位点(虚线) 包括 HindIII 限制酶 裂 解 位 点 (AAGCTT)、Kozak 共 有 序 列 (GCCACC)、终止密 码子(TAA)和 EcoRV 限 制 酶 裂 解 位 点 (GATATC)	AGACCCTTCAGCATCACCTGTCTGGACAACCTCGTGTGGT CTAGCCCCAAGGACGTGTGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGAC CCCTCCTGATCCTGTGAACGGCATGGTGCACGTGATCACC GACATCCAAGTGGGCAGCAGAATCAACTACAGCTGCACCA CCGGCCACAGACTGATCGGACACTCTAGCGCCGAGTGTAT CCTGAGCGGCAATGCCGCACACTGGTCCACCAAGCCTCCA ATCTGCCAGAGAATCCCTTGCGGCCTGCCTCCTACAATCG CCAACGGCGATTTTCATCAGCACCAACAGAGAGAACTTCCA CTACGGCTCCGTGGTCACCTACAGATGCAATCCTGGCAGC GGCGGCAGAAAGGTGTTTGAAGTTGTGGGCGAGCCAGCA TCTACTGCACCAGCAACGATGACCAAGTCGGCATTTGGAG CGGCCCTGCTCCTCAGTGCATCATCCCTAAGATATC
44	人补体受体 1 CCP 15-17 包括前导序列 (双下 划线); His 标签 (点划线); TEV 裂解位点(虚线)	MRL LAKI I CLMLWA I CV AHHHHHHGSS ENLY FQGS SGGHC QAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS LKYE CRPEYYGRPF S ITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKT PPDPVNGMVHVITDIQV GSRINYSCTTGHR LIGH SSAECILSGN TA HWSTKP PI CQR IPCGLPPTIANGDFISTNREN FHYG SVV TYRCN L GS RGRK VFELVGEPSIYCTSNDDQVG IWSG PAPQ CI I
45	人补体受体 1 CCP 15-17 蛋白编码序列 (下划线) 非糖基化的 包括前导序列 (双下 划线); His 标签 (点划线); TEV 裂解位点(虚线) 包括 HindIII 限制酶 裂 解 位 点 (AAGCTT)、Kozak 共 有 序 列 (GCCACC)、终止密 码子(TAA)和 EcoRV 限 制 酶 裂 解 位 点 (GATATC)	AAGCTTGCCACCATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCC TGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCACCACCATCACCA TCACGGCAGCAGCGAGAACCTGTACTTCCAAGGATCTTCT GGCGGCCACTGTCAAGCCCCCTGATCACTTCCTGTT CGCCA AGCTGAAAACCCAGACACAGGCCAGCGACTTCCCTATCGG CACCAGCCTGAAGTACGAGTGCAGACCCGAGTACTACGGC AGACCCTTCAGCATCACCTGTCTGGACAACCTCGTGTGGT CTAGCCCCAAGGACGTGTGCAAGAGAAAGAGCTGCAAGAC CCCTCCTGATCCTGTGAACGGCATGGTGCACGTGATCACC GACATCCAAGTGGGCAGCAGAATCCAGTACAGCTGCACCA CAGGCCACAGACTGATCGGCCACTCTAGCGCCGAGTGTAT CCTGAGCGGAAACACAGCCCACTGGTCCACCAAGCCTCCA ATCTGCCAGAGAATCCCTTGCGGCCTGCCTCCTACAATCG CCAACGGCGATTTTCATCAGCACCAACAGAGAGAACTTCCA CTACGGCTCCGTGGTCACCTACAGATGCAACCTGGGCTCC AGAGGCCGGAAGGTGTTTGAAGTTGTGGGCGAGCCTAGCA TCTACTGCACCAGCAACGACGACCAAGTCGGCATTTGGAG CGGACCTGCTCCTCAGTGCATCATCCCTAAGATATC
46	人补体受体 1 CCP 15-17 非糖基化的	MRL LAKI I CLMLWA I CV AHHHHHHGSS ENLY FQGS SGGHC QAPDHFLFAKLKTQ TQ ASDFPIGTS LKYE CRPEYYGRPF S ITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKT PPDPVNGMVHVITDIQV GSRIQYSCTTGHR LIGH SSAECILSGN AA HWSTKP PI CQR IPCGLPPTIANGDFISTNREN FHYG SVV TYRCN PGSGGRK

[0139]

	包括前导序列 (双下划线); His 标签 (点划线); TEV 裂解位点 (虚线)	VFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCII
47	CR1a 包括前导序列 (双下划线); CCP 8-10	<u>MRLLA</u> KIIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASD FPIGTS ~~L~~ KYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS ~~R~~ INYSCTTG ~~H~~ RLIGHSS AECILSGNAAHWSTKPPICQRI ~~P~~ CGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCII
48	nCR1a 包括前导序列 (双下划线); CCP 8-10; N509Q 和 N578Q (根据 UniProt:P17927 编号)	<u>MRLLA</u> KIIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTQASD FPIGTS ~~L~~ KYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS ~~R~~ IQYSCTTG ~~H~~ RLIGHSS AECILSGNAAHWSTKPPICQRI ~~P~~ CGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCII
49	CR1b 包括前导序列 (双下划线); CCP 15-17	<u>MRLLA</u> KIIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASD FPIGTS ~~L~~ KYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS ~~R~~ INYSCTTG ~~H~~ RLIGHSS AECILSGN ~~T~~ AHWSTKPPICQRI ~~P~~ CGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCII
50	nCR1b 包括前导序列 (双下划线); CCP 15-17; N959Q 和 N1028Q (根据 UniProt:P17927 编号)	<u>MRLLA</u> KIIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTQASD FPIGTS ~~L~~ KYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS ~~R~~ IQYSCTTG ~~H~~ RLIGHSS AECILSGN ~~T~~ AHWSTKPPICQRI ~~P~~ CGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCII
51	CR1a+CR1b 包括前导序列 (双下划线); CCP 8-10+15-17	<u>MRLLA</u> KIIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASD FPIGTS ~~L~~ KYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS ~~R~~ INYSCTTG ~~H~~ RLIGHSS AECILSGNAAHWSTKPPICQRI ~~P~~ CGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCIIGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS LKYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGS ~~R~~ INYSCTTG ~~H~~ RLIGHSS AECILSGN ~~T~~ AHWSTKPPICQRI ~~P~~ CGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCII
52	nCR1a+nCR1b	<u>MRLLA</u> KIIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTQASD FPIGTS ~~L~~ KYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRK

[0140]

	包括前导序列 (双下划线); CCP8-10+15-17; N509Q 和 N578Q、N959Q 和 N1028Q (根据 UniProt:P17927 编号)	SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCTTGHRLLIGHSS AECILSGNAAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCI IGH CQAPDHFLFAKLKTQTQASDFPIGTS LKYECRPEYYGRPF SITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPP DPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCTTGHRLLIGHSSAECILS GNTAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYG SVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGP APQCII
53	CR1a+nCR1b 包括前导序列 (双下划线); CCP8-10+15-17; N959Q 和 N1028Q (根据 UniProt : P17927 编号)	<u>MRL LAKI ICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASD</u> FPIGTS LKYECRPEYYGRPF SITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCTTGHRLLIGHSS AECILSGNAAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCI IGH CQAPDHFLFAKLKTQTQASDFPIGTS LKYECRPEYYGRPF SITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPP DPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCTTGHRLLIGHSSAECILS GNTAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYG SVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGP APQCII
54	nCR1a+CR1b 包括前导序列 (双下划线); CCP8-10+15-17; N509Q 和 N578Q (根据 UniProt : P17927 编号)	<u>MRL LAKI ICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTQASD</u> FPIGTS LKYECRPEYYGRPF SITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPDPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCTTGHRLLIGHSS AECILSGNAAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNR ENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQV GIWSGPAPQCI IGH CQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTS LKYECRPEYYGRPF SITCLDNLVWSSPKDVCKRK SCKTPP DPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCTTGHRLLIGHSSAECILS GNTAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYG SVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGP APQCII

[0141] 多肽的功能特性

[0142] 根据本发明的多肽可以通过参考一个或多个功能特性来表征。

[0143] 具体地,根据本发明的多肽可以具有以下特性中的一个或多个(如通过在针对所述特性的适当试验中的分析而确定的):

[0144] 结合至C3b;

[0145] 以与通过补体因子I的辅因子(或其片段)展示的与C3b的结合亲和力相类似的结合亲和力结合至C3b;

[0146] 以比通过补体因子I的辅因子(或其片段)展示的与C3b的结合亲和力更高的结合亲和力结合至C3b;

[0147] 以与通过补体受体1(或其片段)展示的与C3b的结合亲和力相类似的结合亲和力结合至C3b;

[0148] 在通过补体因子I的辅因子(或其片段)结合的C3b的区域中结合至C3b;

- [0149] 在通过补体受体1 (或其片段) 结合的C3b的区域中结合至C3b;
- [0150] 在通过补体受体1 CCP结构域8-10和/或15-17 (或其片段) 结合的C3b的区域中结合至C3b;
- [0151] 充当辅因子以实现 (enable) 补体因子I介导的C3b灭活;
- [0152] 充当辅因子以实现补体因子I介导的功能性C3bBb型C3转化酶的形成的下降/阻止;
- [0153] 充当辅因子以实现补体因子I介导的功能性C3bBb3b型C5转化酶的形成的下降/阻止;
- [0154] 充当辅因子以实现补体因子I介导的功能性C4b2a3b型C5转化酶的形成的下降/阻止;
- [0155] 充当辅因子以实现补体因子I介导的C3bBb型C3转化酶活性的下降;
- [0156] 充当辅因子以实现补体因子I介导的C3bBb3b型C5转化酶活性的下降;
- [0157] 充当辅因子以实现补体因子I介导的C4b2a3b型C5转化酶活性的下降;
- [0158] 充当辅因子以实现补体因子I介导的C3bBb型C3转化酶的量下降;
- [0159] 充当辅因子以实现补体因子I介导的C3bBb3b型C5转化酶的量下降;
- [0160] 充当辅因子以实现补体因子I介导的C4b2a3b型C5转化酶的量下降;
- [0161] 通过补体因子I减少C3b的量;
- [0162] 通过补体因子I增加iC3b的量;
- [0163] 通过补体因子I增加C3dg的量;
- [0164] 通过补体因子I增加C3d的量;
- [0165] 通过补体因子I增加C3f的量;
- [0166] 通过补体因子I减少C5b的量;
- [0167] 通过补体因子I减少C5a的量;
- [0168] 与通过补体因子I由FH和/或FHL-1产生的iC3b的量相比,通过补体因子I减少iC3b的量;
- [0169] 通过补体因子I增加C3dg与iC3b的比例;
- [0170] 能够抑制补体活化;
- [0171] 扩散通过布鲁赫膜 (BrM) ;
- [0172] 与补体因子I相比,展示出优异的扩散通过BrM的能力;
- [0173] 与补体因子I的辅因子 (或其片段) 相比,展示出优异的扩散通过BrM的能力;
- [0174] 与补体因子I的辅因子 (或其片段) 相比,展示出相似的扩散通过BrM的能力;
- [0175] 与补体因子H相比,展示出优异的扩散通过BrM的能力;
- [0176] 与补体因子H同种型FHL-1相比,展示出相似的扩散通过BrM的能力;
- [0177] 与补体因子H同种型FHL-1相比,展示出优异的扩散通过BrM的能力;
- [0178] 与可溶性补体受体1相比,展示出相似的扩散通过BrM的能力;
- [0179] 与可溶性补体受体1相比,展示出优异的扩散通过BrM的能力。
- [0180] 例如,如本文所描述的,可以分析给出的多肽是否具有前段中提及的功能特性。
- [0181] 根据本发明的多肽可能能够结合至C3b。在一些实施方案中,根据本发明的多肽可以包括C3b结合区域,或者由其组成。在一些实施方案中,根据本发明的多肽的C3b结合区域

包括CR1的C3b结合区域,或者由其组成,例如CCP结构域8-10和/或15-17。

[0182] 如本文所使用的,“C3b结合区域”指的是能够结合至C3b的区域。在一些实施方案中,该C3b结合区域能够特异性结合至C3b。结合至C3b可以由非共价相互作用来介导,诸如范德华力、静电相互作用、氢键合、以及C3b结合区域与C3b之间形成的疏水相互作用。在一些实施方案中,与结合至除了C3b以外的分子相比,C3b结合区域以更大的亲和力、和/或更大的持续时间结合至C3b。

[0183] 根据本发明的多肽或假定的C3b结合区域结合至C3b的能力可以使用本领域技术人员已知的技术进行分析,包括ELISA、表面等离子体共振 (SPR;例如参见Hearty et al., *Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442;或Rich et al., *Anal Biochem*.2008Feb 1;373 (1):112-20)、生物层干涉技术 (Bio-Layer Interferometry) (例如参见Lad et al., (2015) *J Biomol Screen* 20 (4):498-507;或Concepcion et al., *Comb Chem High Throughput Screen*.2009Sep;12 (8):791-800)、微尺度热泳 (MST) 分析 (例如参见Jerabek-Willemsen et al., *Assay Drug Dev Technol*.2011Aug;9 (4):342-353) 或者通过放射标记抗原结合试验 (RIA)。通过这样的分析可以确定并定量与给定靶标的结合。在一些实施方案中,该结合可以是在给定试验中检测到的响应。

[0184] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽在这类试验中展示出与C3b的结合,该结合大于在这类试验中检测到的、与C3b结合区域未结合到的阴性对照分子的结合信号水平的1倍,例如,>1.01、>1.02、>1.03、>1.04、>1.05、>1.06、>1.07、>1.08、>1.09、>1.1、>1.2、>1.3、>1.4、>1.5、>1.6、>1.7、>1.8、>1.9、>2、>3、>4、>5、>6、>7、>8、>9、>10、>15、>20、>25、>30、>35、>40、>45、>50、>60、>70、>80、>90或>100倍之一。

[0185] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够以与在给定试验中通过CR1或其他补体因子I的辅因子 (或其片段) 展示的与C3b的结合亲和力相似的结合亲和力结合至C3b。与参考结合亲和力相似的结合亲和力可以为可比较试验中由参考CR1或参考补体因子I的辅因子展示的结合水平的例如±40%,例如±35%、±30%、±25%、±20%、±15%、±10%或±5%之一。

[0186] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够以比在给定试验中通过补体因子I的辅因子 (或其片段) 展示的与C3b的结合亲和力更高的结合亲和力结合至C3b。在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够以在给定试验中通过补体因子I的辅因子 (或其片段) 展示的与C3b的结合亲和力的1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍或1000倍的结合亲和力结合至C3b。在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够以在给定试验中通过补体因子I的辅因子 (或其片段) 展示的与C3b的结合亲和力的10000倍、100000倍或1000000倍的结合亲和力结合至C3b。在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够以比在给定试验中通过补体因子I的辅因子 (或其片段) 展示的与C3b的结合亲和力大2、3、4、5、6、7、8、9或10个数量级的结合亲和力结合至C3b。在一些实施方案中,补体因子I的辅因子为补体因子H或截短的FH同种型FHL-1。补体因子I的辅因子可以为CR1。

[0187] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够在通过补体因子I的辅因子结合的C3b

的区域中结合至C3b(即结合至相同区域或重叠区域)。在一些实施方案中,多肽能够在通过CR1(或其片段)结合的区域中结合至C3b。在一些实施方案中,多肽能够在通过CR1 CCP结构域8-10和/或15-17结合的区域中结合至C3b。在一些实施方案中,多肽能够在通过补体因子I辅因子补体因子H、CD46、CD55、C4BP、SPICE、VCP或MOPICE(或其片段)中的一个或多个结合的区域中结合至C3b。

[0188] 可以通过本领域技术人员已知的各种方法确定根据本发明的多肽是否在通过给定的补体因子I的辅因子(或其片段)结合的C3b的区域中结合至C3b,该各种方法包括ELISA和表面等离子体共振(SPR)分析。用以确定C3b结合区域是否在通过给定的补体因子I的辅因子(或其片段)结合的区域中结合至C3b的合适试验的实施例为ELISA试验。

[0189] 例如,根据本发明的多肽是否在通过给定的补体因子I的辅因子(或其片段)结合的C3b的区域中结合至C3b,可以在存在根据本发明的多肽的情况下、或在辅因子/片段和C3b中的一者或两者与根据本发明的多肽的温育之后,通过分析辅因子/片段与C3b的相互作用来确定。在通过给定的辅因子/片段结合的C3b的区域中结合至C3b的C3b结合区域通过观察以下内容来识别:与不存在根据本发明的多肽的情况下的相互作用水平(或在存在适当的对照肽/多肽的情况下)相比,在存在根据本发明的多肽的情况下、或在辅因子/片段和C3b中的一者或两者与根据本发明的多肽的温育之后,辅因子/片段和C3b之间的相互作用水平的下降/减少。可以在体外,例如使用重组的相互作用配偶体(partner)来执行合适的分析。为了这类试验的目的,相互作用配偶体中的一者或两者、和/或根据本发明的多肽可以被标记,或者为了检测和/或测量相互作用水平的目的而与可检测实体结合使用。

[0190] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽充当补体因子I的辅因子。例如,多肽可以增强补体因子I对C3b的裂解,和/或呈现补体因子I对C3b在有利方向上的溶蛋白性裂解(proteolytic cleavage)。多肽优选不抑制补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解。在一些实施方案中,补体因子I为内源性的。在一些实施方案中,补体因子I为外源性的。

[0191] 如本文所使用的,“内源性”蛋白/肽是指由相关细胞类型、组织或受试者(在使用根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物的治疗前)编码/表达的蛋白/肽。“非内源性”或“外源性”蛋白/肽是指并非由相关细胞类型、组织或受试者(在使用根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物的治疗前)编码/表达的蛋白/肽。

[0192] 充当补体因子I的辅因子的根据本发明的多肽,可以例如通过分析以下内容来确定:与不存在根据本发明的多肽的情况下(或在存在适当的对照肽/多肽的情况下)补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解的水平或速率相比,在存在根据本发明的多肽的情况下(或在与根据本发明的多肽一起温育之后),在合适的试验中补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解的水平或速率。充当补体因子I的辅因子的C3b结合区域通过检测以下内容来识别:与不存在根据本发明的多肽的情况下(或在存在适当的对照肽/多肽的情况下)补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解的水平或速率相比,在存在根据本发明的多肽的情况下(或在与根据本发明的多肽一起温育之后)补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解水平或速率的增加。补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解的水平或速率可以例如通过检测补体因子I对C3b的裂解的一种或多种产物来确定,该一种或多种产物例如iC3b、C3dg、C3d或C3f。补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解的水平或速率可以例如通过检测在存在C3b的情况下的下降来确定。在一些实施方案中,与通过补体因子I由FH/FHL-1产生的iC3b的量相比,充当补体因子I的辅因子的根据本发明

的多肽,整体上产生更少量的iC3b。在一些实施方案中,与通过补体因子I由FH/FHL-1产生的C3dg与iC3b的比例相比,充当补体因子I的辅因子的根据本发明的多肽通过补体因子I增加了C3dg与iC3b的比例。例如,多肽可能不增加iC3b的整体量,但是相反可能通过补体因子I增加C3dg、C3f和/或C3d的量。

[0193] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽能够抑制或降低补体活化。多肽可以抑制或降低补体过度活化。可以通过本文描述的试验、例如补体成分的异常水平,或者通过本领域技术人员已知的测试/试验、例如在Shih and MuraliAm.J.Hematol.2015,90:1180-1186、Kirschfink and Mollnes,Clin Diagn Lab Immunol.2003,10(6):982-989、Nilsson and Ekdahl,Clinical and Developmental Immunology,2012,Article ID 962702中所描述的,来确定补体活化/过度活化的水平,上述文件的全部内容均通过引用合并于此。

[0194] 在一些实施方案中,如通过针对所述特性的适当试验中的分析所确定的,根据本发明的多肽具有扩散通过、即穿过布鲁赫膜(BrM)的能力。

[0195] 给定多肽的扩散通过BrM的能力可以例如在体外进行分析,例如,如Clark et al J.Immunol (2014) 193,4962-4970中所描述的。简单地,如McHarg et al.,J Vis Exp(2015) 1-7中所描述的,可以从供体的眼睛分离BrM,并且可以将黄斑区域安置在尤斯室(Ussing chamber)中。一经安置,直径5mm的黄斑区域则是两个相同区室(compartment)之间的唯一屏障。可以用PBS清洗BrM的两侧,并可以用PBS以1:1稀释人血清,并将人血清加入至BrM一侧上的尤斯区室(样品室)。可以将待分析的多肽在PBS中加入到样品室,并可以将PBS单独加入到BrM另一侧上的区室(扩散室),可以在室温下、在样品室和扩散室中温和搅拌的情况下将尤斯室温育24小时。随后,可以例如使用基于抗体的检测方法、诸如ELISA分析或蛋白质印迹,来分析来自各室的样品中多肽的存在。扩散室中的多肽的检测表明多肽能够扩散通过BrM。已知能够/不能够扩散通过BrM的合适的阳性和阴性对照蛋白可包括在这类实验中。

[0196] 在一些实施方案中,根据本发明的多肽展示出比补体因子I优异的扩散通过BrM的能力。在一些实施方案中,根据本发明的多肽展示出比补体因子H优异的扩散通过BrM的能力。由20个CCP结构域组成的FH为大分子,且并不穿过BrM。在一些实施方案中,与截短的补体因子H同种型FHL-1(UniProt:P08603-2;SEQ ID NO:28)相比,根据本发明的多肽展示出相似的扩散通过BrM的能力。在一些实施方案中,与补体因子H同种型FHL-1相比,根据本发明的多肽展示出优异的扩散通过BrM的能力。在一些实施方案中,与全长的可溶性CR1(30个CCP结构域;缺少SEQ ID NO:32和33的SEQ ID NO:1)相比,根据本发明的多肽展示出相似的扩散通过BrM的能力。在一些实施方案中,与全长的可溶性CR1相比,根据本发明的多肽展示出优异的扩散通过BrM的能力。能够扩散通过BrM的根据本发明的多肽在扩散通过BrM后,优选保持功能活性,即充当补体因子I的辅因子。

[0197] 可以通过如上所述地分析通过BrM的扩散来识别与给定参考多肽相比展示出优异的扩散通过BrM的能力的本发明的多肽。可以通过测量通过扩散室的扩散速率和/或检测在实验结束时存在于扩散室中的多肽的占比来检测通过BrM的扩散。可以通过如上所述地分析通过BrM的扩散来识别与给定参考多肽相比展示出相似的扩散通过BrM的能力的本发明的多肽。可以通过检测到通过扩散室的扩散速率在参考多肽的扩散速率的30%以内、例如在25%、20%、15%或10%之一以内,和/或通过检测到在实验结束时存在于扩散室中的本

发明的多肽的占比在存在于扩散室中的参考多肽的占比的30%以内、例如在25%、20%、15%或10%之一以内,来指示相似的扩散通过BrM的能力。

[0198] 由于多肽扩散通过BrM的能力,如果/一旦本发明的多肽与FI一起执行了它们的辅因子作用,则本发明的多肽也能够从C3b灭活位点扩散开。换句话说,本发明的多肽可能能够瞬时存在于补体活化的区域处。这是有利的,因为补体相关碎片的积聚是不合需要的,特别是在细胞碎片积聚可导致形成玻璃膜疣(drusen)的黄斑变性的情况下。

[0199] 本发明的多肽可能能够在细胞、例如如本文所述的细胞中表达。本发明的多肽可能能够由细胞、例如如本文所述的细胞分泌。在一些实施方案中,细胞为眼部细胞,例如如本文所述的RPE细胞。

[0200] 核酸、细胞、组合物和试剂盒(kit)

[0201] 本发明提供了一种编码根据本发明的多肽的核酸。在一些实施方案中,该核酸例如从其他核酸或天然形成的生物材料中纯化或分离。在一些实施方案中,该核酸包括DNA和/或RNA,或者由DNA和/或RNA组成。

[0202] 本文提供的是编码多肽的核酸序列,该多肽包括SEQ ID NO:2、3、5、6、13、14、15、30、31、40、42、44、46、47、48、49、50、51、52、53或54,或者由SEQ ID NO:2、3、5、6、13、14、15、30、31、40、42、44、46、47、48、49、50、51、52、53或54组成。可以在具有或不具有前导序列、例如分泌途径序列的情况下,产生编码的多肽。编码的多肽可以与前导序列一起产生,然后该前导序列随后从所述多肽去除。

[0203] 在一些实施方案中,根据本发明的核酸包括以下或者由以下组成:SEQ ID NO:35、36、37、38、39、41、43和/或45中的一个或多个、或者由于密码子简并而被转译成相同的相应多肽的其等效核酸序列。

[0204] 本发明还提供了一种包括编码根据本发明的多肽的核酸的载体。

[0205] 核苷酸序列可以包含在载体、例如表达载体(expression vector)中。如本文所使用的“载体”为用作将外源性核酸转运到细胞中的媒介物的核酸分子。载体可以为用于在细胞中表达核酸的载体。这样的载体可以包括启动子序列(promoter sequence),该启动子序列可操作地链接到编码待表达的序列的核苷酸序列。载体还可以包括终止密码子和表达增强子。载体可以包括调控元件,诸如多腺苷酸化位点(polyadenylation site)。本领域已知的任何合适的载体、启动子、增强子和终止密码子,可以用于从根据本发明的载体表达肽或多肽。可以对本文描述的核酸序列进行密码子优化,以在所需细胞或生物体中优化表达。

[0206] 术语“可操作地链接”可以包括这样的情况,其中选择的核酸序列和调控核酸序列(例如启动子和/或增强子)以使核酸序列的表达处于调控序列的影响或控制之下的方式共价链接(从而形成表达盒(cassette))。因此,如果调控序列能够影响核酸序列的转录,则调控序列可操作地链接至所选择的核酸序列。然后,可以将所得的转录物(transcript)转译成所需的肽/多肽。

[0207] 优选提供根据本发明的核酸和/或载体,用于引入细胞、例如人细胞中。合适的载体包括质粒、二元载体、DNA载体、mRNA载体、病毒载体(例如 γ 逆转录病毒载体(例如鼠白血病病毒(MLV)衍生的载体)、慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体、牛痘病毒载体和疱疹病毒载体如单纯性疱疹病毒载体(Herpes Simplex Virus))、基于转座子的载体和人工染色体(例如酵母人工染色体),例

如,如Maus et al.,Annu Rev Immunol (2014) 32:189-225或Morgan and Boyerinas, Biomedicines 2016 4,9中所描述的,二者的全部内容通过引用合并于此。在一些实施方案中,慢病毒载体可以是pELNS,或可以源自pELNS。在一些实施方案中,载体可以是编码CRISPR/Cas9的载体。在一些实施方案中,腺相关病毒(AAV)载体选自AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11,或其杂种(hybrid)和/或突变体。在一些实施方案中,AAV载体是AAV血清型2(AAV-2)载体,或其杂种和/或突变体。用于将遗传物质引入细胞中的病毒和非病毒递送系统在例如Nayerossadat et al.,Adv Biomed Res.2012;1:27、MacLaren et al.Ophthalmology.2016,123(10Suppl):S98-S106、Petit and Punzo,Discov Med.2016,22(121):221-229、Aguirre,Invest Ophthalmol Vis Sci.2017,58(12):5399-5411、Lundstrom,Diseases.2018,6(2):42中进行综述,这些文件的全部内容通过引用合并于此。在本发明的情况下,可以使用任何合适的核苷酸或载体递送方法。

[0208] 在一些实施方案中,根据本发明,核酸或包含在载体中的核酸的表达由启动子驱动,该启动子驱动在特定的视网膜细胞类型中的表达,该特定的视网膜细胞类型例如杆、视锥、RPE或神经节细胞,如在例如Beltran WA,et al.Gene Ther.2010;17:1162-74和Boye SE,et al.Hum Gene Ther.2012;23:1101-15中所描述的,这些文件的全部内容通过引用合并于此。

[0209] 在一些实施方案中,根据本发明,核酸或包含在载体中的核酸的表达由启动子驱动,该启动子驱动该核酸在视网膜色素上皮(RPE)细胞中的表达。在一些实施方案中,启动子是RPE65或VMD2启动子,或者其修饰形式。在一些实施方案中,启动子是鸡 β 肌动蛋白启动子(chicken β actin promoter)。

[0210] 在一些实施方案中,载体可以是真核载体,例如包括针对来自载体的蛋白在真核细胞中的表达所必需的元件的载体。在一些实施方案中,载体可以是哺乳动物载体,例如包括巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)或SV40启动子,以驱动蛋白表达。

[0211] 在一些实施方案中,载体包括诱导型启动子(inducible promoter),即基因表达仅在存在或不存在特定分子的情况下由启动子激活。合适的诱导型启动子将是技术人员所已知的。诱导型启动子的实施例在例如Le et al.Invest Ophthalmol Vis Sci.2008,49(3):1248-1253和McGee Sanftner et al.Mol Ther.2001.3(5):688-696中进行描述,上述文件的全部内容通过引用合并于此。

[0212] 在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的核酸序列,或由其组成,该多肽与SEQ ID NO:2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、30、31、40、42、44、46、47、48、49、50、51、52、53或54、或者如本文所述的序列A、B和/或C的任何结合具有至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0213] 本发明还提供了一种包括或表达根据本发明的多肽的细胞。还提供了包括或表达根据本发明的核酸或载体的细胞。包括或表达根据本发明的多肽、核酸或载体的细胞可以分泌根据本发明的多肽。也就是说,细胞对多肽、核酸或载体的表达可导致根据本发明的多肽从细胞的可溶性产生。

[0214] 细胞可以是真核细胞,例如哺乳动物细胞。哺乳动物可以是人或非人哺乳动物(例如,兔子、豚鼠、大鼠、小鼠或其他啮齿动物(包括啮齿目中的任何动物)、猫、狗、猪、绵羊、山

羊、牛(包括奶牛,例如乳牛(dairy cow)或牛目(oder Bos)中的任何动物)、马(包括马目(order Equidae)中的任何动物)、驴和非人灵长目动物)。在一些实施方案中,细胞可以来自人受试者或可以已经从人受试者获取。

[0215] 在一些实施方案中,细胞是眼睛的细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜神经感觉层(neurosensory retina)、视网膜色素上皮(RPE)、脉络膜或黄斑的细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜色素上皮细胞。在一些实施方案中,细胞是人视网膜色素上皮细胞(RPE)。在一些实施方案中,细胞是光感受器细胞。

[0216] 本发明还提供了一种用于产生包括根据本发明的核酸或载体的细胞的方法,该方法包括将根据本发明的核酸或载体引入到细胞中。在一些实施方案中,将根据本发明的分离的核酸或载体引入到细胞中包括转化、转染、电穿孔或转导(例如逆转录病毒转导)。可以根据本领域技术人员已知的用于产生包括核酸/载体的细胞的方法,来执行根据本发明的用于产生细胞的方法。

[0217] 本发明还提供了一种用于产生包括或表达根据本发明的多肽的细胞的方法,该方法包括将根据本发明的核酸或载体引入到细胞中。在一些实施方案中,该方法额外包括在适于细胞对核酸或载体的表达的条件下培养细胞。在一些实施方案中,该方法在体外或离体(ex vivo)执行。在一些实施方案中,该方法在体内执行。

[0218] 本发明还提供了一种通过根据本发明的方法获取或可获取的细胞。

[0219] 本发明还提供了一种组合物,该组合物包括根据本发明的多肽、核酸、载体或细胞。

[0220] 根据本发明的多肽、核酸、载体和细胞可以被配制用于临床使用的药物组合物,并且可以包括药学可接受媒介物、稀释剂、赋形剂或佐剂。

[0221] 按照本发明,还提供了用于产生药学有用的组合物的方法,这类产生方法可包括一个或多个选自以下的步骤:分离如本文所述的多肽、细胞、核酸或载体;和/或将如本文所述的多肽、细胞、核酸或载体与药学可接受媒介物、佐剂、赋形剂或稀释剂混合。

[0222] 还提供了一种多个部分的试剂盒(kit of parts)。在一些实施方案中,试剂盒可具有至少一个容器,该容器具有预定量的根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞和/或组合物。

[0223] 该试剂盒可以与施用说明一起向受试者提供多肽、核酸、载体、细胞或组合物,以便治疗特定的疾病/病症。多肽、核酸、载体、细胞或组合物可以被配制用于注射或输注。在一些实施方案中,多肽、核酸、载体、细胞或组合物可以被配制用于静脉内、眼内、视网膜下、脉络膜上腔(suprachoroidal)或结膜内注射、作为滴眼剂的施用(即眼科施用)或口服施用。

[0224] 在一些实施方案中,试剂盒可以包括用于产生根据本发明的细胞的材料。例如,试剂盒可以包括:用于修饰细胞以表达或包括根据本发明的多肽、核酸或载体的材料、或者用于将根据本发明的核酸或载体引入到细胞中的材料。

[0225] 在一些实施方案中,试剂盒可以进一步包括至少一个容器,该容器具有预定量的另一治疗剂(例如,用于治疗AMD的治疗剂)。在这样的实施方案中,试剂盒还可以包括第二药剂或药物组合物,使得两种药剂或药物组合物可以同时或分开施用,从而为特定的疾病或病症提供联合治疗。在一些实施方案中,第二药剂或药物组合物包括补体因子I。

[0226] 产生多肽

[0227] 本发明还提供了一种用于产生根据本发明的多肽的方法,该方法包括:将根据本发明的核酸或载体引入到细胞中;和在适于该多肽的表达的条件下培养该细胞。该多肽可以是融合蛋白。随后可以分离和/或大体纯化该多肽。

[0228] 根据本发明的多肽可以根据本领域技术人员已知的用于产生多肽的方法来制备。

[0229] 可以通过化学合成、例如液相或固相合成来制备多肽。例如,可以使用例如 Chandrudu et al., *Molecules* (2013), 18:4373-4388 中描述的方法来合成肽/多肽,其全部内容通过引用合并于此。

[0230] 可替代地,可以通过重组表达来产生多肽。适于重组产生多肽的分子生物学技术是本领域众所周知的,例如在 Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Edition), Cold Spring Harbor Press, 2012 和 *Nat Methods*. (2008); 5 (2): 135-146 中提出的那些,二者的全部内容通过引用合并于此。

[0231] 对于根据本发明的重组产生,可使用适于多肽的表达的任何细胞。该细胞可以是原核细胞或真核细胞。在一些实施方案中,细胞为原核细胞,诸如古生菌或细菌的细胞。在一些实施方案中,细菌可以是革兰氏阴性菌,诸如肠杆菌科的细菌,例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。在一些实施方案中,细胞是真核细胞,诸如酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,例如 CHO、HEK (例如 HEK293)、HeLa 或 COS 细胞。

[0232] 在一些情况下,细胞不是原核细胞,因为一些原核细胞不允许与真核细胞相同的折叠或转译后修饰。另外,在真核细胞中非常高的表达水平是可能的,并且使用适当的标签可以更容易地从真核细胞纯化蛋白。也可以使用增强蛋白到培养基中的分泌的特定质粒。

[0233] 在一些实施方案中,多肽可以通过无细胞蛋白合成 (cell-free-protein, CFPS) 来制备,例如相应使用 Zemella et al. *Chembiochem* (2015) 16 (17): 2420-2431 中描述的系统,其全部内容通过引用合并于此。

[0234] 产生可以涉及被修饰以表达目标 (of interest) 多肽的真核细胞的培养或发酵。培养或发酵可在提供有营养素、空气/氧气和/或生长因子的适当供应的生物反应器中执行。分泌的蛋白可通过从细胞分配培养基/发酵液、提取蛋白含量、以及分离个体蛋白质以分离分泌的多肽来收集。培养、发酵和分离技术是本领域技术人员众所周知的,并且例如在 Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第四版,其通过引用合并于上文) 中描述。

[0235] 生物反应器包括一个或多个可以在其中培养细胞的容器。生物反应器中的培养可以连续发生,反应物连续流入反应器,培养的细胞从反应器连续流出。可替代地,培养可以分批发生。生物反应器监测并控制环境条件,诸如 pH、氧气、进出容器的流速以及容器内的搅动 (agitation), 从而为被培养的细胞提供最佳条件。

[0236] 培养表达抗原结合分子/多肽的细胞后,可以分离目标多肽。可以使用本领域已知的从细胞分离蛋白的任何合适的方法。为了分离多肽,可能有必要将细胞与营养培养基分开。如果多肽从细胞分泌,则可以通过离心将细胞与包含分泌的目标多肽的培养基分离。如果目标多肽聚集在细胞内,则蛋白分离可以包括:用以将细胞与细胞培养基分开的离心;用裂解缓冲液对细胞沉淀的处理;以及例如通过超声处理、快速冻融 (rapid freeze-thaw) 或渗透裂解 (osmotic lysis) 的细胞破坏。

[0237] 然后可能需要从上清液或培养基分离目标多肽,该上清液或培养基可以包含其他蛋白和非蛋白成分。从上清液或培养基分离蛋白成分的通用方法是通过沉淀。不同溶解度的蛋白在不同浓度的沉淀剂、诸如硫酸铵下沉淀。例如,在低浓度的沉淀剂下,提取水溶性蛋白。因此,通过添加不同渐增浓度的沉淀剂,可以区分不同溶解度的蛋白。随后可以使用透析以从分离的蛋白去除硫酸铵。

[0238] 区分不同蛋白的其他方法是本领域已知的,例如离子交换色谱法和尺寸色谱法(size chromatography)。也可以使用适当的多肽上分子标签的结合配偶体(例如,His、FLAG、Myc、GST、MBP、HA、E或生物素标签)来亲和纯化(affinity-purify)多肽。这些可以用作沉淀的替代物,或者可以在沉淀之后执行。

[0239] 在一些情况下,可能进一步需要加工多肽,例如以去除氨基酸、分子标签、部分等的序列。

[0240] 在一些实施方案中,用适当的肽链内切酶(endopeptidase)处理以裂解并去除氨基酸序列。

[0241] 在一些实施方案中,用酶处理以去除目标部分。在一些实施方案中,例如通过用糖苷酶、诸如用肽:N-糖苷酶(PNGase)的处理,处理多肽以除去聚糖(即,将多肽去糖基化)。

[0242] 一旦从培养物中分离出目标多肽,就可能需要或必须浓缩多肽。浓缩蛋白的许多方法是本领域已知的,诸如超滤(ultrafiltration)或冻干(lyophilisation)。

[0243] 在一些实施方案中,多肽的产生在体内发生,例如,在将包括编码本发明的多肽的核酸或载体的细胞引入宿主之后,或在将编码本发明的多肽的核酸或载体引入宿主细胞中之后。在这样的实施方案中,将多肽转录、转译和转译后加工成成熟多肽。在一些实施方案中,多肽在宿主中所需位置处原位产生。在一些实施方案中,所需位置是眼睛,例如在视网膜、脉络膜、视网膜色素上皮(RPE)或黄斑的细胞中。在一些实施方案中,所需位置是在视网膜细胞处或在视网膜细胞中。在一些实施方案中,所需位置是在RPE细胞处或在RPE细胞中。

[0244] 治疗应用

[0245] 根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞和药物组合物中的任一项在治疗或预防方法中得到使用。

[0246] 本发明提供了在医疗(medical treatment)或预防法(prophylaxis)中使用的根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物。本发明还提供了根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物在制造用于治疗或预防疾病或病症的药剂中的用途。本发明还提供了一种治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗或预防有效量的根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物。

[0247] 特别地,根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞和药物组合物得到使用,以治疗或预防与补体调节异常、特别是过度活跃的补体响应相关联的疾病/病症。在一些实施方案中,过度活跃的补体响应与C3b的存在有关联。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病/病症为补体相关疾病。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病/病症与补体活化病理上相关联。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病/病症与补体过度活化病理上相关联。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病/病症由补体活化或过度活化驱动。在一些实施方案中,疾病/病症为补体活化或过度活化。

[0248] 多肽、核酸、载体、细胞和药物组合物得到使用,以治疗或预防将从以下一项或多

项中受益的疾病/病症：C3bBb型C3转化酶、C3bBb3b型C5转化酶或C4b2a3b型C5转化酶的水平或活性下降；C3b、C5b或C5a的水平下降；iC3b、C3f、C3dg或C3d的水平增加；或iC3b的水平或活性下降；以及C3f、C3dg或C3d的水平增加。

[0249] 例如，“治疗”可以是疾病/病症的发展或进展下降、疾病/病症的症状的减轻、或疾病/病症的病理学下降。疾病/病症的治疗或缓解可以有效地预防疾病/病症的进展，例如预防病症的恶化或减慢发展的速度。在一些实施方案中，治疗或缓解可导致疾病/病症的改善，例如疾病/病症的症状的下降或疾病/病症的严重性/活性的一些其他相关性的下降。疾病/病症的预防/预防法可以指预防病症的恶化或预防疾病/病症的发展，例如，预防早期疾病/病症发展为晚期、慢性期。

[0250] 在一些实施方案中，待治疗或预防的疾病或病症可以是与C3b或含C3b的复合物相关联的疾病/病症、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或者与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的产物。也就是说，在一些实施方案中，待治疗或预防的疾病或病症是其中病理上涉及C3b、含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或所述活性/响应的产物的疾病/病症。在一些实施方案中，该疾病/病症可以与以下相关联：与对照状态相比，C3b或含C3b的复合物的水平增加、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的水平增加或与C3b或含C3b的复合物相关联活性/响应的产物的水平增加。

[0251] 治疗可以旨在降低C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或与C3b或含C3b的复合物相关联活性/响应的产物的水平。在一些实施方案中，治疗旨在：降低C3bBb型C3转化酶、C3bBb3b型C5转化酶或C4b2a3b型C5转化酶的水平或活性；降低C3b、C5b或C5a的水平；增加iC3b、C3f、C3dg或C3d的水平，或者降低iC3b的水平并增加C3f、C3dg或C3d的水平。

[0252] 本发明的多肽、核酸、载体、细胞和组合物的施用可能会通过C3b的裂解而引起C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或与C3b或含C3b的复合物相关联活性/响应的产物的水平的降低。

[0253] 在一些实施方案中，治疗可以旨在降低受试者的例如特定位置、在特定器官、组织、结构或细胞类型中的C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或与C3b或含C3b的复合物相关联活性/响应的产物的水平。在一些实施方案中，治疗可以旨在降低眼睛中例如视网膜、脉络膜、RPE、黄斑和/或在BrM/RPE界面处的C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或与C3b或含C3b的复合物相关联活性/响应的产物的水平。

[0254] 在一些实施方案中，治疗可以包括修饰细胞或细胞群以包括/表达本发明的多肽、核酸或载体。在一些实施方案中，治疗可以包括体内修饰细胞/群，以原位产生本发明的多肽。在一些实施方案中，细胞/细胞群是眼部细胞。在一些实施方案中，细胞/细胞群是RPE细胞和/或RPE细胞群。在一些实施方案中，细胞/细胞群是光感受器细胞和/或光感受器细胞群。

[0255] 在一些实施方案中，本发明提供了在基因疗法中使用的本发明的核酸或载体。在一些实施方案中，治疗包括向受试者施用核酸和/或载体。在一些实施方案中，治疗包括使用本文描述的或本领域公知的技术将核酸和/或载体引入到受试者的细胞中，本领域公知的技术参见例如MacLaren et al. Ophthalmology. 2016, 123 (10 Suppl) :S98-S106、

Aguirre, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017, 58(12):5399-5411、Lundstrom, Diseases. 2018, 6(2):42, 其全部内容通过引用合并于此。在一些实施方案中, 细胞是一个或多个眼部细胞。在一些实施方案中, 细胞是一个或多个RPE细胞。在一些实施方案中, 细胞是一个或多个光感受器细胞。

[0256] 在一些实施方案中, 治疗可包括向受试者施用被修饰为包括/表达本发明的多肽、核酸或载体的细胞或细胞群。在一些实施方案中, 治疗可以包括离体(ex vivo)或体外修饰细胞/群。

[0257] 在一些实施方案中, 治疗旨在向受试者提供产生和/或将产生本发明的多肽的细胞或细胞群, 例如通过施用根据本发明的细胞、或通过产生根据本发明的细胞。

[0258] 在一些实施方案中, 本文中提到的细胞是眼睛的细胞、即眼部细胞。在一些实施方案中, 细胞是视网膜、脉络膜、视网膜色素上皮(RPE)或黄斑的细胞。在一些实施方案中, 细胞是视网膜细胞。在一些实施方案中, 细胞是RPE细胞。在一些实施方案中, 细胞是光感受器细胞。

[0259] 本发明提供了一种治疗或预防受试者中的疾病或病症的方法, 该方法包括修饰至少一个细胞以表达或包括根据本发明的多肽、核酸或载体。在一些实施方案中, 该至少一个细胞是眼部细胞。在一些实施方案中, 该至少一种细胞是RPE细胞。

[0260] 根据本发明修饰的至少一种细胞可以根据技术人员公知的方法进行修饰。修饰可以包括核酸转移, 以用于转移的核酸的永久或瞬时表达。任何合适的基因工程平台可以用于修饰根据本发明的细胞。合适的修饰细胞的方法包括使用基因工程平台, 诸如 γ 逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、DNA转染、基于转座子的基因递送和RNA转染, 例如如Maus et al., Annu Rev Immunol (2014) 32:189-225中描述的, 其通过引用合并于上文。

[0261] 待治疗的受试者可以是任何动物或人。受试者优选是哺乳动物, 更优选是人。受试者可以是非人哺乳动物, 但更优选是人。受试者可以是男性或女性。受试者可以是患者。受试者可能已经被诊断患有需要治疗的疾病或病症, 或者疑似患有这样的疾病或病症。

[0262] 待治疗的受试者可以展示出C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应、或者与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/反应的产物的水平升高, 例如, 如通过使用适当的试验分析受试者、或从受试者获取的样品(例如细胞、组织、血液样品)而确定的。

[0263] 受试者可具有增加水平的C3b或含C3b的复合物的阳性调节剂/效应器的表达或活性、或与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的表达或活性, 或者可具有增加水平的与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的产物的表达或活性。受试者可具有增加水平的由C3b或含C3b的复合物上调的活性。

[0264] 受试者可具有降低水平的C3b或含C3b的复合物的阴性调节剂的表达或活性、或与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/响应的表达或活性, 或者可具有降低水平的由C3b或含C3b的复合物下调的因子的表达或活性。受试者可具有降低水平的由C3b或含C3b的复合物下调的活性。

[0265] 增加/降低可与在不存在相关疾病/病症的情况下表达/活性的水平、例如在健康对照受试者或从健康对照受试者获取的样品中表达/活性的水平有关。

[0266] 在一些实施方案中,受试者可处于发展/感染疾病或病症的风险中。在一些实施方案中,受试者可具有增加发展/感染疾病或病症的风险的一种或多种发病因素。

[0267] 在一些实施方案中,受试者可具有针对年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的一种或多种风险因素。在一些实施方案中,受试者可具有一种或多种AMD相关联遗传变体。AMD相关联遗传变体在例如Clark et al., J Clin Med (2015) 4 (1):18-31中描述,其全部内容通过引用合并于此。在一些实施方案中,受试者可具有一种或多种以下AMD相关联遗传变体(或具有 $LD=r^2 \geq 0.8$ 、具有该变体的变体):CFH中的Y402H(即rs1061170^C)、rs1410996^C、CFH中的I62V、CFH中的R53C、CFH中的D90G、CFH中的R1210C、CFHR4中的rs6685931^T。

[0268] 在一些实施方案中,受试者可具有针对早发性黄斑变性 (EOMD) 的一种或多种风险因素。EOMD被认为是由CFH基因罕见变体的单基因遗传导致的(参见例如Boon CJ et al. Am J Hum Genet 2008;82(2):516-23、van de Ven JP, et al. Arch Ophthalmol 2012;130(8):1038-47、Yu Y et al. Hum Mol Genet 2014;23(19):5283-93、Duvvari MR, et al. Mol Vis 2015;21:285-92、Hughes AE, et al. Acta Ophthalmol 2016;94(3):e247-8、Wagner et al. Sci Rep 2016;6:31531)。在一些实施方案中,受试者可具有一种或多种EOMD相关联遗传变体。EOMD相关联遗传变体例如在Servais A et al. Kidney Int, 2012;82(4):454-64和Dragon-Durey MA, et al. J Am Soc Nephrol 2004;15(3):787-95中描述,其全部内容通过引用合并于此。在一些实施方案中,受试者可具有一种或多种以下EOMD相关联遗传变体:CFH c.1243del,p. (Ala415Profs*39)het;CFH c.350+1G>T het;CFH c.619+1G>Ahet;CFH c.380G>A,p. (Arg127His);CFH c.694C>T,p. (Arg232Ter);或者CFH c.1291T>A,p. (Cys431Ser)。

[0269] 在一些实施方案中,基于确定受试者具有针对AMD和/或EOMD的一种或多种风险因素、例如一种或多种AMD/EOMD相关联遗传变体,来选择受试者进行使用本发明的多肽、核酸、载体、细胞或组合物的治疗或预防性治疗。在一些实施方案中,已经确定受试者患有一种或多种这样的风险因素。在一些实施方案中,本发明的方法涉及确定受试者是否具有一种或多种这样的风险因素。

[0270] 在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症可以为眼部疾病/病症。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为补体相关眼部疾病。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为黄斑变性。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为年龄相关性黄斑变性 (AMD)。通常将AMD定义为导致50岁以上的受试者视力丧失。

[0271] 在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症选自:年龄相关性黄斑变性 (AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、地图样萎缩(“干性”(即非渗出性)AMD)、“湿性”(新生血管或渗出性)AMD、脉络膜新生血管形成(CNV)、青光眼、自身免疫性葡萄膜炎和糖尿病视网膜病变。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为AMD。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为地图样萎缩(“干性”AMD)。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为“湿性”AMD。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症是上述疾病/病症的组合,例如“干性”和“湿性”AMD。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症不是“湿性”AMD或脉络膜新生血管形成。在一些实施方案中,待治疗的受试者为50岁以上,即至少50岁。

[0272] 如本文所使用的,“早期AMD”是指一AMD的阶段,其特征不在于在邻近RPE层的布鲁赫

膜内存在中等大小的玻璃膜疣,通常具有达 $\sim 200\mu\text{m}$ 的宽度。患有早期AMD的受试者通常不会出现明显的视力丧失。如本文所使用的,“中期AMD”是指一AMD的阶段,其特征存在于视网膜中的大玻璃膜疣和/或色素改变。中期AMD可伴有一些视力丧失。如本文所使用的,“晚期AMD”是指一AMD的阶段,其特征存在于由于对黄斑的损害而存在玻璃膜疣和视力丧失。在AMD的所有阶段中,可能存在“网状假性玻璃膜疣(reticular pseudodrusen,RPD)”或“网状玻璃膜疣”,是指细胞外物质在视网膜神经感觉层和RPE之间的视网膜下腔(subretinal space)中的积聚。“晚期AMD”涵盖“干性”和“湿性”AMD。在“干性”AMD(也称为地图样萎缩)中,黄斑中将视觉信息传递到大脑的光敏细胞逐渐分解,且黄斑下方的支持组织逐渐分解。在“湿性”AMD(也称为脉络膜新生血管形成和渗出性AMD)中,异常血管在视网膜下面生长并进入视网膜中。这些血管会渗漏液体和血液,这可能会导致黄斑的肿胀及损害,以及随后的疤痕形成。这种损害可能是迅速且严重的。

[0273] 在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为早发性黄斑变性(EOMD)。如本文所使用的,“EOMD”是指表型严重(phenotypically severe)的黄斑变性亚型,其表现出比经典AMD早得多的发病年龄并且导致更多年的实质性视力丧失。EOMD子集在例如Boon CJ et al.*Am J Hum Genet* 2008;82(2):516-23和van de Ven JP,et al.*Arch Ophthalmol* 2012;130(8):1038-47中描述。在一些实施方案中,待治疗的受试者为49岁以下。在一些实施方案中,待治疗的受试者的年龄在15到49岁之间,即15岁到49岁之间。

[0274] 在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症为由补体过度活化驱动的疾病/病症。在一些实施方案中,待治疗或预防的疾病或病症可以选自:非典型溶血尿毒综合征(atypical Haemolytic Uremic Syndrome,aHUS)、II型膜增生性肾小球肾炎(Membranoproliferative Glomerulonephritis Type II,MPGN II)、败血症和阵发性睡眠性血红蛋白尿症(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria,PNH)。

[0275] 医疗方法也可涉及体内、离体以及过继(adoptive)的免疫疗法,包括使用同源和/或异源细胞或永生(immortalized)细胞系的免疫疗法。

[0276] 本文描述的多肽的施用优选以“治疗有效量”进行,这足以显示出对个体的益处。实际施用量、以及施用的速率和时间进程将取决于所治疗疾病的性质和严重程度。治疗的处方,例如剂量的决定等,在全科医生和其他医生的责任之内,且通常要考虑待治疗的病症、个体患者的病症、递送位点、施用方法以及执业医师已知的其他因素。上面提到的技术和方案的实施例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences,20th Edition,2000,pub.Lippincott,Williams&Wilkins中找到。

[0277] 根据本发明的多肽、核酸、载体和细胞可以被配制成用于临床使用的药物组合物或药剂,并且可以包括药学可接受媒介物、稀释剂、赋形剂或佐剂。该组合物可以配制成用于局部、肠胃外、全身、腔内、静脉内、动脉内、肌内、鞘内、眼内、结膜内、视网膜下、脉络膜上腔、皮下、皮内、鞘内、口服或经皮的施用途径,施用途径可以包括注射或输注,或作为滴眼剂的施用(即眼科施用)。合适的制剂可以包括无菌或等渗培养基中的多肽、核酸、载体或细胞。药剂和药物组合物可以被配制成包括凝胶在内的液体形式。液体制剂可以被配制成通过注射或输注(例如经由导管)施用于人或动物体的选定器官或区域。在一些实施方案中,本发明的多肽、核酸、载体、细胞和组合物被配制成用于例如通过玻璃体内注射的玻璃体内施用途径。在一些实施方案中,本发明的多肽、核酸、载体、细胞和组合物被配制成用于黄斑

下递送,即使治疗分子与靶细胞层直接接触。

[0278] 可以根据需要C3b灭活的位置选择特定的施用模式和/或位点。在一些实施方案中,本发明的多肽、核酸、载体或药物组合物被配制用于施用和/或被施用到眼睛中的光感受器细胞和视网膜色素上皮(RPE)之间的视网膜下腔中。在一些实施方案中,本发明的多肽、核酸、载体或药物组合物被配制用于施用和/或被施用到视网膜色素上皮(RPE)中。

[0279] 根据本发明,还提供了用于产生药学有用的组合物的方法,这种产生方法可包括一个或多个选自以下的步骤:分离本文所述的多肽、核酸、载体或细胞;和/或将本文所述的多肽、核酸、载体或细胞与药学可接受媒介物、佐剂、赋形剂或稀释剂混合。

[0280] 例如,本发明的另一方面涉及一种配制或产生用于医疗方法的药剂或药物组合物,该方法包括通过将本文所述的多肽、核酸、载体或细胞与药学可接受媒介物、佐剂、赋形剂或稀释剂混合来配制药物组合物或药剂。

[0281] 可以单独施用或与其他治疗(例如其他治疗性干预或预防性干预)组合施用,根据待治疗的病症或同时或依序施用。根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或组合物以及治疗剂可以同时或依序施用。

[0282] 同时施用是指将多肽、核酸、载体、细胞或组合物和治疗剂一起例如作为包含两种试剂的药物组合物(联合制剂)施用,或紧接着彼此且可选地通过相同的施用途径,例如向相同组织、动脉、静脉或其他血管施用。依序施用是指施用多肽、核酸、载体、细胞或组合物或治疗剂中的一种,然后在给定的时间间隔后分开施用另一试剂。尽管在一些实施方案中是这种情况,但是不需要通过相同的途径来施用两种试剂。该时间间隔可以是任意时间间隔。在一些实施方案中,多肽、核酸、载体、细胞或组合物和治疗剂分开、同时或依序地施用于眼睛。

[0283] 在一些实施方案中,另一治疗/治疗剂是治疗有效量的补体因子I。在一些实施方案中,将补体因子I与根据本发明的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物的施用同时或依序地施用给受试者。在一些实施方案中,治疗可以包括体外、离体或体内修饰细胞或细胞群以表达和/或分泌补体因子I。细胞或细胞群可以为与被修饰成包括/表达根据本发明的多肽、核酸或载体的细胞或细胞群相同的细胞或细胞群,例如,治疗可以包括体外、离体或体内修饰细胞或细胞群以表达和/或分泌根据本发明的多肽、核酸或载体,以及补体因子I。在一些实施方案中,将补体因子I施用给受试者,其中,受试者包括被修饰成包括/表达本发明的多肽、核酸或载体的细胞或细胞群。在一些实施方案中,将补体因子I施用给受试者,其中,受试者已经原位表达或正在原位表达本发明的多肽、核酸或载体。

[0284] 补体因子I或包括补体因子I的组合物,可以配制用于局部、肠胃外、全身、腔内、静脉内、玻璃体内、动脉内、肌内、鞘内、眼内、结膜内、视网膜下、脉络膜上腔、皮下、皮内、鞘内、口服或经皮的施用途径,施用途径可以包括注射或输注,或作为滴眼剂的施用(即眼科施用)。合适的制剂可包含无菌或等渗培养基。药剂和药物组合物可以被配制包括凝胶在内的液体形式。液体制剂可以被配制通过注射或输注(例如经由导管)施用于人或动物体的选定器官或区域。

[0285] 在一些实施方案中,另一治疗/治疗剂是治疗有效量的抗VEGF疗法(例如兰尼单抗(ranibizumab)(诺适得(Lucentis);基因泰克/诺华(Genentech/Novartis));贝伐单抗(bevacizumab)(标示外阿瓦斯丁(off label Avastin);基因泰克);阿柏西普

(aflibercept) (艾力亚 (Eylea)/VEGF Trap-Eye;再生元/拜耳 (Regeneron/Bayer));哌加他尼 (pegaptanib) (**Macugen[®]**);激光光凝术 (laser photocoagulation);或例如使用维速达尔 (Visudyne)[™] (维替泊芬 (verteporfin)) 的光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT)。

[0286] 可以提供多种剂量的多肽、核酸、载体、细胞或组合物。一种或多种剂量或每种剂量可以伴有另一治疗剂的同时或依序施用。

[0287] 多种剂量可以通过预定时间间隔分开,该预定时间间隔可以选择为以下之一:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天,或者1、2、3、4、5或6个月。举例来说,剂量可以每7、14、21或28天(加或减3、2或1天)给予一次。

[0288] 根据本发明的多肽、核酸、载体或组合物可以配制在缓释递送系统中,以便以预定速率释放多肽、核酸、载体或组合物。缓释递送系统可以在指定的时间段内保持恒定的药物/治疗浓度。在一些实施方案中,根据本发明的多肽、核酸、载体或组合物被配制成脂质体、凝胶、植入物、装置或药物-聚合物缀合物,例如水凝胶。

[0289] 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的遗传因素

[0290] 补体因子H(由CHF基因编码的)是另一补体因子I的辅因子。补体因子H的结构和功能在Wu et al., Nat Immunol (2009) 10 (7):728-733中进行综述,其全部内容通过引用合并于此。人补体因子H(UniProt:P08603;SEQ ID NO:29)具有1233个氨基酸序列(包括N端处18个氨基酸的信号肽),并且包括20个补体控制蛋白 (CCP) 结构域。补体因子H的前四个CCP结构域(即CCP1至CCP4)对于补体因子I辅因子将C3b裂解为iC3b的活性是必需的。CCP 19至20也已被显示与C3b和C3d接合 (Morgan et al., Nat Struct Mol Biol (2011) 18 (4):463-470),而CCP7和CCP19-20与葡糖氨基葡聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 和唾液酸结合,并参与自我 (self) 和非自我 (non-self) 之间的区分 (discrimination) (Schmidt et al., J Immunol (2008) 181 (4):2610-2619;Kajander et al., PNAS (2011) 108 (7):2897-2902)。

[0291] 与发展AMD的遗传风险相关联的主要SNP之一存在于CFH基因中,并导致补体因子H中的Y402H多态性(例如,参见Haines et al., Science (2005) 308:419-21),并且它是可替代的间接变体因子H样蛋白1(factor H-like protein1, FHL-1)。大约30%的欧洲白人遗传个体具有该多态性的至少一个副本,而作为杂合子会使AMD的风险增加~3倍 (Sofat et al., Int J Epidemiol (2012) 41:250-262)。体现在第七个补体控制蛋白 (CCP) 结构域中的Y402H多态性降低FH/FHL-1与BrM的结合,导致这些血源性补体调节剂的结合与该表面上被抑制的补体调节中的扰动 (Clark et al., J Biol Chem (2010) 285:30192-202)。

[0292] FH/FHL-1与BrM的结合是通过硫酸化糖 (sulphated sugar) 介导的,该硫酸化糖包括葡糖氨基葡聚糖 (GAG)、硫酸乙酰肝素 (heparan sulphate, HS) 和硫酸皮肤素 (dermatan sulphate, DS)。存在于BrM中的GAG序列家族似乎比以前认为的具有更大的组织特异性,因为它们能够通过其CCP7结构域而不是CCP19-20中存在的FH的次级锚定位点来募集 (recruit) FH/FHL-1 (Clark et al., J Immunol (2013) 190:2049-2057)。这可能是一种进化的转折,因为已发现BrM中补体的主要调节剂是截短的FHL-1蛋白 (Clark et al. J. Immunol (2014) 193, 4962-4970),该截短的FHL-1蛋白仅具有CCP7中的一个表面锚定位点,并缺乏CCP19-20。相反,Y402H多态性与肾脏疾病并不相关联,其中已知FH的CCP19-20结构域是主

要的GAG介导的锚定位点(Clark et al., J Immunol (2013) 190:2049-2057)。HS和DS的BrM表达水平的年龄相关变化、其自身也被认为是正常衰老过程的一部分,也与AMD相关联,并且可能在某种程度上解释了遗传驱动的AMD的年龄相关性质。

[0293] 不与BrM结合的FH的C端CCP19-20区域中的罕见突变(R1210C),具有与AMD非常高的关联水平,并且发现携带该突变的FH蛋白与白蛋白共价结合(Sánchez-Corral et al., Am J Hum Genet (2002) 71:1285-1295),阻止了FH蛋白离开循环系统并进入眼组织。一些研究表明,地图样萎缩之前的大融合性玻璃膜疣和RPE中的相关联的色素变化表明干性AMD首先由在脉络膜中具有继发作用的RPE功能障碍造成(Bhutto and Luty Mol Aspects Med (2012) 33:295-317)。相反,Whitmore等人报道了包括末端补体膜攻击复合物(MAC)的沉积在内的所有形式的晚期AMD之前脉络膜毛细血管层的变化,并认为脉络膜毛细血管层中的过度补体活化是RPE萎缩继发的主要事件(Whitmore et al., Prog Retin Eye Res (2015) 45:1-29)。这些数据表明,由补体基因的改变所赋予的遗传易感性是耐受的,直至BrM和下层脉络膜毛细血管层二者的改变涌现。这些变化是否是年龄相关的、由氧化应激驱动还是由RPE细胞功能障碍所致,尚待观察,但已知这些结构中自然发生的变化是年龄相关的。

[0294] C3和C3b

[0295] 补体成分3(C3)是免疫系统蛋白,其在先天免疫和补体系统中具有核心作用。C3的加工例如在Foley et al. J Thromb Haemostasis (2015) 13:610-618中描述,其全部内容通过引用合并于此。人C3(UniProt:P01024;SEQ ID NO:18)包括一个1663个氨基酸的序列(包括N端、22个氨基酸的信号肽)。氨基酸23至667编码C3 β 链(SEQ ID NO:19),且氨基酸749至1663编码C3 α' 链(SEQ ID NO:20)。C3 β 链和C3 α' 链通过链间二硫键(形成在C3 β 链的半胱氨酸559和C3 α' 链的半胱氨酸816之间)缔合以形成C3b。C3a是对应于C3的氨基酸位置672至748的一个77个氨基酸的片段(SEQ ID NO:21),其在通过经典补体途径和凝集素(lectin)途径活化后通过C3的溶蛋白性裂解生成。

[0296] C3b是一种有效的调理素,靶向病原体、抗体-抗原免疫复合物和凋亡细胞以用于通过吞噬细胞和NK细胞的吞噬作用。C3b也参与转化酶复合物的形成以激活和扩增补体响应。C3b与因子B缔合以形成C3bBb型C3转化酶(替代的补体途径),并可以与C4b和C2a缔合以形成C4b2a3b型C5转化酶(经典途径),或与C3bBb缔合以形成C3bBb3b型C5转化酶(替代的途径)。

[0297] 用以形成蛋白水解灭活的、且本身不能促进进一步补体扩增的iC3b的C3b的加工,涉及C3b α' 链在氨基酸位置1303和1320处的溶蛋白性裂解,以形成 α' 链片段1(对应于C3的氨基酸位置672-748;SEQ ID NO:22)、 α' 链片段2(对应于C3的氨基酸位置1321-1663;SEQ ID NO:23)。因此,iC3b包括C3 β 链、C3 α' 链片段1和C3 α' 链片段2(通过二硫键缔合)。 α 通链的裂解也放出C3f,其对应于C3的氨基酸位置1304-1320(SEQ ID NO:24)。

[0298] 如本文所使用的,“C3”是指来自任何物种的C3,并且包括来自任何物种的C3的同种型、片段、变体或同源物。在一些实施方案中,C3是哺乳动物C3(例如食蟹猴、人和/或啮齿动物(例如大鼠和/或鼠)C3)。C3的同种型、片段、变体或同源物可以可选地被表征为与来自给定物种的不成熟或成熟C3、例如人C3(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的序列同一性。

[0299] 如本文所使用的,“C3b”是指来自任何物种的C3b的同种型、片段、变体或同源物,并且包括来自任何物种的C3b的同种型、片段、变体或同源物。在一些实施方案中,C3b是哺乳动物C3b(例如食蟹猴、人和/或啮齿动物(例如大鼠和/或鼠)C3b)。

[0300] C3b的同种型、片段、变体或同源物可以可选地被表征为包括C3 α '链片段1、C3 α '链片段2和C3 β ,其与来自给定物种、例如人的个体多肽的氨基酸序列具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性。也就是说,C3b可包括:C3 α 3链片段1,其与SEQ ID NO:22具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性;C3 α '链片段2,其与SEQ ID NO:23具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性;以及C3 β 链,其与SEQ ID NO:19具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性。

[0301] C3b的同种型、片段、变体或同源物可以可选地是功能性同种型、片段、变体或同源物,例如具有参考C3b的功能特性/活性,如通过对功能特性/活性的合适试验的分析所确定的。例如,C3b的同种型、片段、变体或同源物的特征可以在于充当调理素、和/或形成功能性C3/C5转化酶的能力。

[0302] 补体因子I

[0303] C3b到iC3b的加工是通过补体因子I(在人中由基因CFI编码)执行的。人补体因子I(UniProt:P05156;SEQ ID NO:25)具有一583个氨基酸的序列(包括N端、18个氨基酸的信号肽)。前体多肽被弗林蛋白酶(furin)裂解而产生成熟的补体因子I,其包括通过链间二硫键链接的重链(氨基酸19至335)和轻链(氨基酸340至583)。轻链的氨基酸340至574编码补体因子I的蛋白水解结构域(SEQ ID NO:26),该补体因子I的蛋白水解结构域是包含负责裂解C3b以产生iC3b的催化三联体(catalytic triad)的丝氨酸蛋白酶(Ekdahl et al., J Immunol (1990) 144(11):4269-74)。

[0304] 如本文所使用的,“补体因子I(FI)”是指来自任何物种的补体因子I,并且包括来自任何物种的补体因子I的同种型、片段、变体或同源物。在一些实施方案中,补体因子I是哺乳动物补体因子I(例如食蟹猴、人和/或啮齿动物(例如大鼠和/或鼠)补体因子I)。

[0305] 补体因子I的同种型、片段、变体或同源物可以可选地被表征为与来自给定物种的未成熟或成熟补体因子I、例如人补体因子I(SEQ ID NO:25)的氨基酸序列具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性。补体因子I的同种型、片段、变体或同源物可以可选地是功能性同种型、片段、变体或同源物,例如具有参考补体因子I(例如全长的人补体因子I)的功能特性/活性,如通过对功能特性/活性的合适试验的分析所确定的。例如,补体因子I的同种型、片段、变体或同源物可以展示出丝氨酸蛋白酶活性和/或可以能够使C3b灭活。

[0306] 用以产生iC3b的补体因子I对C3b的溶蛋白性裂解由补体因子I的辅因子促进。补体因子I的辅因子通常结合至C3b和/或补体因子I,并增强通过补体因子I的C3b到iC3b的加工。

[0307] 补体受体1

[0308] 补体受体1(CR1)充当补体因子I的辅因子,其能够将C3b裂解为iC3b和下游产物。

[0309] iC3b不会扩增或活化补体系统,但仍可以充当调理素来靶向用于吞噬作用的病原体。因此,iC3b的产生导致局部免疫系统活化和炎症作用。这可能会对补体相关疾病的患者产生负面影响,并可能促使现有补体相关疾病/病症的发展或恶化。

[0310] 因子H(FH)和截短的FH同种型FHL-1充当FI的辅因子以产生iC3b,但它们不能促进iC3b的进一步降解,这会导致不期望的iC3b积聚。另外,iC3b的积聚可能会在受影响区域中(affected area)促进进一步的碎屑(debris),从而导致例如黄斑变性中玻璃膜疣的(进一步)发展。

[0311] 相反,参见例如图2、图3B、图7A,根据本发明的CR1和多肽可以与FI组合起作用,以促进iC3b进一步分解成有利的下游产物,诸如C3c、C3dg和C3b。这些分子不是调理素,因此避免了募集免疫系统成分。它们在受影响区域中的存在要好于iC3b积聚。

[0312] 如本文所使用的,“补体受体1(CR1)”是指来自任何物种的CR1,并且包括来自任何物种的CR1的同种型、片段、变体或同源物。在一些实施方案中,CR1是哺乳动物CR1(例如食蟹猴、人和/或啮齿动物(例如大鼠和/或鼠)CR1)。

[0313] ***

[0314] 现在将通过实施例并参考附图来说明本发明的方面和实施方案。对于本领域技术人员而言,其他方面和实施方案将是显而易见的。本文中提及的所有文献通过引用合并于此。

[0315] 本发明包括所述方面和优选特征的组合,除非这种组合是明显不允许的或明确避免的。

[0316] 本文中使用的章节标题仅用于组织目的,不应解释为限制所描述的主题。

[0317] 在前面的说明书、或接下来的权利要求书或附图中公开的、以其特定形式、或就执行所公开功能的手段或获得所公开结果的方法或过程而言表达的特征,视情况而定,可以分开地或以这些特征的任何组合被利用以以多种形式实现本发明。

[0318] 虽然已经连同上述示例性实施方案描述了本发明,但是当给出本发明时,许多等同的修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,上述本发明的示例性实施方案被认为是说明性的,而不是限制性的。可以在不背离本发明的精神和范围的情况下对所述实施方案进行各种改变。

[0319] 为避免任何疑问,提供本文提供的任何理论解释是为了提高读者的理解的目的。发明人不希望受任何这些理论解释的约束。

[0320] 在整个说明书中,包括随后的权利要求书,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”及诸如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”的变型,将被理解为意指包括所述整数或步骤、或整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤、或整数或步骤的组。

[0321] 必须注意,除非上下文另有明确说明,否则如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物。范围在本文中可以表达为从“约”一个特定值和/或到“约”另一个特定值。当表达该范围时,另一实施方案包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表达为近似值时,将理解的是,该特定值形成另一实施方案。

[0322] 在核酸序列被公开的情况下,其反向补体也被明确考虑。

[0323] 以下编号的段落(段(paras))描述了本发明的特定方面和实施方案:

[0324] 1、一种多肽,其与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性,其中,该多肽具有700个以下氨基酸的总长度。

[0325] 2、根据段1所述的多肽,其中,所述多肽具有50-700个氨基酸的长度。

[0326] 3、根据段1或2所述的多肽,其中, X_1 为A或T, X_2 为P或L,和/或 X_3 为G或R。

[0327] 4、根据段1-3中任一项所述的多肽,所述多肽包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13。

[0328] 5、根据段1-4中任一项所述的多肽,所述多肽由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13组成。

[0329] 6、根据段1-5中任一项所述的多肽,所述多肽能够结合至C3b。

[0330] 7、根据段1-6中任一项所述的多肽,其在通过补体因子I的辅因子结合的区域中结合至C3b。

[0331] 8、根据段1-7中任一项所述的多肽,其在通过补体受体1(CR1)结合的区域中结合至C3b。

[0332] 9、根据段1-8中任一项所述的多肽,其充当补体因子I的辅因子。

[0333] 10、根据段1-9中任一项所述的多肽,其能够扩散穿过布鲁赫膜(BrM)。

[0334] 11、根据段1-10中任一项所述的多肽,其为非糖基化的或部分糖基化的。

[0335] 12、根据段1-11中任一项所述的多肽,其中,所述氨基酸序列包括位置509、578、959和/或1028(根据Uniprot:P17927编号的)处的一个或多个氨基酸取代。

[0336] 13、根据段12所述的多肽,其中,所述一个或多个氨基酸取代选自N509Q、N578Q、N959Q和/或N1028Q(根据Uniprot:P17927编号的)。

[0337] 14、根据段1-13中任一项所述的多肽,其包括SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和/或SEQ ID NO:15,或者由SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和/或SEQ ID NO:15组成。

[0338] 15、根据段1-14中任一项所述的多肽,其额外包括分泌途径序列。

[0339] 16、根据段15所述的多肽,其中,所述分泌途径序列包括SEQ ID NO:7。

[0340] 17、根据段15或段16所述的多肽,其中,所述多肽额外包括用于去除所述分泌途径序列的裂解位点。

[0341] 18、一种核酸,其编码根据段1-17中任一项所述的多肽。

[0342] 19、一种载体,其包括根据段18所述的核酸。

[0343] 20、一种细胞,其包括根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、或根据段19所述的载体。

[0344] 21、一种用于产生多肽的方法,其包括:将根据段18所述的核酸、或根据段19所述的载体引入到细胞中;和在适于所述多肽的表达的条件下培养所述细胞。

[0345] 22、一种细胞,其通过根据段21所述的方法获得或可为获得的。

[0346] 23、一种药物组合物,其包括根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、根据段19所述的载体或根据段20或22所述的细胞,可选地包括药学可接受媒介物、佐剂、赋形剂、或稀释剂。

[0347] 24、根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、根据段19所述的载体、根据段20或22所述的细胞、或根据段23所述的药物组合物,其在治疗或预防疾病或病症

的方法中使用。

[0348] 25、一种根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、根据段19所述的载体、根据段20或22所述的细胞、或根据段23所述的药物组合物在制造用于治疗或预防疾病或病症的药剂中的用途。

[0349] 26、一种治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、根据段19所述的载体、根据段20或22所述的细胞、或根据段23所述的药物组合物。

[0350] 27、一种治疗或预防受试者的疾病或病症的方法,其包括修饰所述受试者的至少一个细胞以表达或包括根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、或根据段19所述的载体。

[0351] 28、根据段24所述的所使用的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物、或根据段25所述的用途、或根据段26或段27的方法,其中,所述疾病或病症为其中病理上涉及C3b或含C3b的复合物、与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/应答、或者与C3b或含C3b的复合物相关联的活性/应答的产物的疾病或病症。

[0352] 29、根据段24-28中任一项所述的所使用的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物、用途或方法,其中,所述疾病或病症为年龄相关性黄斑变性(AMD)。

[0353] 30、根据段24-29中任一项所述的所使用的多肽、核酸、载体、细胞或药物组合物、用途或方法,其中所述用于治疗或预防疾病或病症的方法包括修饰受试者的至少一个视网膜色素上皮(RPE)细胞以表达或包括根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸或根据段19所述的载体。

[0354] 31、一种试剂盒,其包括多个部分,所述多个部分包括预定量的根据段1-17中任一项所述的多肽、根据段18所述的核酸、根据段19所述的载体、根据段20或段22所述的细胞或者根据段23所述的药物组合物。

附图说明

[0355] 现将参照附图讨论说明本发明的原则的实施方案和实验。

[0356] 图1A和图1B.来自人HEK293细胞的CR1a和nCR1a蛋白表达。(图1A)CR1a表达为两种糖形式,在用肽N-糖苷酶进行去糖基化处理后,这两种糖形式被还原成一个较低的MW带。(图1B)nCR1a表达为与去糖基化的CR1a相同的MW的单一形式。

[0357] 图2.由人细胞表达和分泌的CR1a和nCR1a充当因子I介导的C3b分解的辅因子的能力。CR1a/nCR1a+FI+C3b反应产生了iC3b和C3dg(泳道(lane)7和11)。

[0358] 图3A至图3C.(图3A)24小时后,尤斯室的扩散室中存在CR1a,表现出扩散通过布鲁赫膜(BrM)的能力。(图3B和图3C)多肽扩散通过布鲁赫膜(BrM)后,(图3B)CR1a和(图3C)nCR1a充当因子I的辅因子以分解C3b的能力。

[0359] 图4.扩散实验中使用的尤斯室的示意图,其中(a)是富集的来自人供体眼睛的布鲁赫膜,其覆盖了5mm的孔径且代表液体从一个室到另一个室的唯一通道;(b)是采样接入点;且(c)是磁力搅拌棒。

[0360] 图5.通过生物膜层干涉法(BLI)测量的CR1a、FH和FHL-1对C3b的结合动力学。

[0361] 图6.使用抗CR1a抗体从AAV-CR1a转导的ARPE-19细胞的组织培养基中检测分泌的

CR1a (AAV-CR1a培养基)。重组CR1a蛋白用作阳性对照。单独的培养基和来自AAV-GFP转导的ARPE-19细胞的培养物的培养基用作阴性对照。

[0362] 图7A和图7B. 从人ARPE-19细胞分泌的CR1a充当因子I介导的C3b分解的辅因子的能力。(图7A)分泌的CR1a充当FI辅因子,以产生iC3b(产物e)和C3dg(产物f)。提供从人HEK293细胞分泌的CR1a作为对照。(图7B)与含非转导细胞的培养基相比,培养的AAV-CR1a转导的RPE细胞显示出增加的将C3b(产物a)分解为iC3b(产物b)的能力。

[0363] 图8.眼睛的黄斑区域的示意图,示出了光感受器、视网膜色素上皮、布鲁赫膜以及脉络膜中的脉络膜毛细血管层和毛细血管间隔。

[0364] 图9.Forest et al. (2015) Dis. Mod. Mech. 8, 421-427中的视网膜组织的代表性荧光显微图像(图1)。显示的是降解的RPE细胞和补体活化区域下方的玻璃膜疣沉积物。比例尺20 μ m。

[0365] 图10. 示出了有效补体治疗的局部表达关键阶段的眼部黄斑区域的示意图。

[0366] 图11. 包括编码根据本发明的多肽(例如CR1)的核酸、启动子元件、复制元件和选择元件的表达载体的实施例。

实施例

[0367] 在以下实施例中,发明人描述了包括补体受体1的C3b结合辅因子区域的重组CR1蛋白的设计。还描述了这些蛋白质由人细胞表达、扩散通过从人供体眼睛富集的布鲁赫膜、以及赋予调控活性即促进C3b到iC3b和进一步分解产物的FI介导分解的能力。

[0368] 实施例1

[0369] 编码SEQ ID NO:2和5所示的氨基酸序列的DNA插入物(insert)通过重组DNA技术制备,并克隆到载体中以生成用于CR1肽的重组表达的构建体(construct)。氨基酸序列及其特征如下所示:

[0370] CR1a (SEQ ID NO:47)

[0371] MRLAKIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSLKYECPREYYGRPFSITCLDNLV
WSSPKDVCKRKSKTPDPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCCTGHRLIGHSSAECILSGNAAHWSTKPPICQRIPCGL
PPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPISYCTSNDDQVGIWSGPAPQCII

[0372] 信号肽 (SEQ ID NO:7); CR1的CCP 8-10 (SEQ ID NO:2) (UniProt:P17927, 残基491-685)

[0373] nCR1a (SEQ ID NO:48)

[0374] MRLAKIICLMLWAICVAGHCQAPDHFLFAKLKTQTQASDFPIGTSLKYECPREYYGRPFSITCLDNLV
WSSPKDVCKRKSKTPDPVNGMVHVITDIQVGSRIQYSCCTGHRLIGHSSAECILSGNAAHWSTKPPICQRIPCGL
PPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPISYCTSNDDQVGIWSGPAPQCII

[0375] 信号肽 (SEQ ID NO:7); 包括取代N509Q和N578Q的CR1的CCP 8-10 (SEQ ID NO:5) (UniProt:P17927, 残基491-685)

[0376] 18个氨基酸信号肽被设计为在分泌时从多肽裂解。

[0377] 在一些实施方案中,使用了HIS标记的CR1a和nCR1a,例如分别如SEQ ID NO:40和21所示。

[0378] 来自人细胞的蛋白表达

[0379] HEK 293T细胞(7×10^6 细胞/板)在37在下、5%CO₂的温育箱中、在17mL的补充有10%胎牛血清(Foetal Bovine Serum) (FBS,西格玛(Sigma),目录号F9665)的高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM,西格玛,目录号D469)中、在15cm的培养板上生长过夜。一旦细胞达到60%融合度(confluence),就用86.4 μ g的7.5mM聚乙烯亚胺(PEI,波利塞斯(Polysciences),目录号24765-2)、150mM NaCl(费雪科技有限公司(Fisher Scientific UK Ltd),目录号10739592)瞬时转染细胞和14.4 μ g的质粒,该质粒表达链接至信号肽(SEQ ID NO:7)的CR1a(SEQ ID NO:2)或nCR1a(SEQ ID NO:5)。对于阴性对照,使用14.4 μ g的Tris-EDTA缓冲液代替质粒DNA。转染后五小时,用17.5ml的新鲜的高糖DMEM代替含有10%FBS的转染培养基,该新鲜的高糖DMEM补充有2%FBS(以下称为表达培养基)。在转染后24、48、72和140小时收集表达培养基。向收集并在4℃下储存的每100ml表达培养基中添加80 μ l的0.5M苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF,西格玛,目录号P7626)。24小时后收集的表达培养基用于下文描述的扩散和功能研究。

[0380] 来自人细胞的分泌蛋白的表征

[0381] 来自人细胞的蛋白表达如图1A和图1B所示。发现重组表达和纯化的CR1a蛋白以两种糖形式从细胞分泌。使用去除糖基化的酶、肽N-糖苷酶F进行的处理将两条带还原为表观分子量较低的一条带(1A)。蛋白的非糖基化形式(nCR1a)被表达。蛋白质印迹表明,nCR1a产生单一带,该单一带迁移到与酶促去糖基化蛋白相同的位置(图1B)。

[0382] C3b分解活性

[0383] 测试了从人HEK293细胞表达和分泌的CR1a和nCR1a的充当因子I介导的C3b分解的辅因子的能力。

[0384] 将1 μ g重组CR1a或nCR1a蛋白与2 μ g纯C3b蛋白和0.04 μ g纯补体因子I(FI;VWR国际,目录号341280)在37℃下混合15分钟。提供FHL-1作为FI的辅因子对照。还提供了CR1a/nCR1a、CR1a/nCR1a+FI、CR1a/nCR1a+C3b和单独的C3b作为对照。以添加4 $\times$ SDS-上样缓冲液(SDS-loading buffer)来终止反应,并加热至100℃5分钟。然后,样品在4-12%NuPAGE Bis-Tris凝胶上电泳(run),在200V下电泳60分钟。使用半干的转移设备在转移缓冲液(25mM Tris,192mM甘氨酸,10%(v/v)甲醇)中,将样品在80mA下转移到硝酸纤维素膜上1.5小时。在室温下添加PBS、0.2%(v/v)吐温-20(PBS-T)中的100 μ g/ml抗C3b抗体(Hycult生物技术(HycultBiotech),目录号HM2287)之前,将膜在PBS、10%(w/v)牛奶、0.2%(w/v)BSA中于4℃下封闭16小时。在室温下添加HRP缀合的山羊抗小鼠的1:2500稀释液1小时之前,将膜在PBS-T中洗涤2 $\times$ 30min、避光。在室温下添加超级信号西方皮科(SuperSignal West Pico)化学发光底物(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific),目录号34080)3min之前,将膜在PBS-T中洗涤2 $\times$ 30min。通过在室温下将Super RX-N X射线胶片(富士胶片(FujiFilm),目录号PPB5080)暴露于处理过的膜2min、并在自动X射线胶片显影机上显影,来检测反应带。

[0385] 结果在图2中示出。发现两种分泌的蛋白都能够充当因子I的辅因子,从而导致C3b首先分解为iC3b(a₁),并进一步分解为C3dg(a₁₋₁)。使用CR1a/nCR1a进行的C3b分解比使用FI+FHL-1(第二泳道)观察到的C3b的正常天然分解继续得更多,该正常天然分解仅产生iC3b(a₁)。

[0386] 尤斯室扩散实验和C3b分解活性

[0387] 如上述McHarg et al., J Vis Exp (2015) 1-7中所描述的, 将从供体眼睛分离出的富集的布鲁赫膜的黄斑区域安装在尤斯室(哈佛大学设备(Harvard Apparatus), 哈姆登(Hamden), CT)中。一旦安装, 直径5毫米的黄斑区域就是两个相同区室之间的唯一屏障, 即液体必须穿过布鲁赫膜(图4)。在室温下, 布鲁赫膜的两面用2ml PBS洗涤5分钟。在实验之前, 通过将2ml液体保留在一个室中而不泄漏到下一个腔中的能力来测试布鲁赫膜的结构完整性。将2ml的含有重组蛋白的表达培养基(CR1a和/或nCR1a, 见上文)添加到一个室(此后称为样品室)中, 并将2ml新鲜PBS添加到另一个室(此后称为扩散(diffusate)室/扩散(diffusion)室)。将尤斯室在室温下放置24小时, 并在每个区室中用磁力搅拌棒温和搅拌, 以避免生成扩散蛋白的梯度。

[0388] 将CR1a添加到样品室。24小时后, 分析各室(原始样品室和扩散室)中的样品是否存在CR1a。

[0389] 结果在图3A中示出。发现24小时后, CR1a存在于扩散室中。

[0390] 将CR1a和nCR1a分开地添加到样品室中, 并分析两个室中样品的C3b分解活性。24小时后, 从各室取出18.6 μ l样品, 并与1品, (1品,) 纯C3b蛋白和0.4 μ l纯补体因子I (0.04子室, VWR国际, 目录号341280) 在37 $^{\circ}$ C下混合15、30或60分钟之一。以添加4分钟之一。以上样缓冲液终止反应, 并加热至100 $^{\circ}$ C终止反应。然后, 样品在4-12% NuPAGE Bis-Tris凝胶上电泳, 在200V下电泳60分钟。

[0391] 结果在图3B和图3C中示出。C3b在扩散室中的分解表明, 糖基化的CR1a(图3B)和非糖基化的nCR1a(图3C)都能够从样品室穿过布鲁赫膜并保持功能活性。发现两个室中的CR1a和nCR1a成功地充当了FI的辅因子, 从而将C3b分解为蛋白水解灭活的C3b(iC3b)和进一步产物, 如通过代表C3b分解产物iC3b和C3dg的带的存在而得以证明。因此, 在因子I存在的情况下, CR1a和nCR1a能够扩散通过BrM、并保持赋予C3b分解的能力。

[0392] 实施例2

[0393] 比较根据本发明的多肽的表达水平以评估是否存在最佳制剂, 即、糖基化多肽是否比非糖基化多肽以更高的水平表达。预期多肽的糖基化状态将对表达水平具有最小的影响。

[0394] 发现CR1a由人细胞表达良好。发现nCR1a以比CR1a低的水平表达, 但是发现两种多肽都具有功能活性, 例如参见图2。

[0395] 实施例3

[0396] 使用表面等离子体共振 (SPR) 测试根据本发明的纯化的多肽对C3b的结合动力学, 由此将C3b固定在SPR芯片上, 并将该多肽用于液相。直接测量缔合常数和解离常数, 并推断相互作用的kD值。

[0397] 尽管未观察到CR1a (CCP 8-10) 或CR1b (CCP 15-17) 与C3b的结合差异, 但糖基化多肽比非糖基化多肽更强地结合至C3b。

[0398] 通过生物层干涉术 (BLI) 测量的结合动力学

[0399] 使用OctetRed96系统(福泰生物(ForteBio), 颇尔公司(Pall Corp), 美国)测量CR1a对C3b蛋白的亲和力。将生物素化的C3b蛋白在0.2% PBST中稀释至0.4 μ g/mL的最终浓度, 并加载到高精度链霉亲和素 (SAX) 生物传感器(福泰生物, 颇尔公司, 美国)上600s, 该生物传感器预先用相同的缓冲液水合20分钟。然后, 将C3b加载的传感器用0.2% PBST洗涤

150s(基线),并浸入含有从30.0 μ g/mL到2.6 μ g/mL不同浓度范围的CR1a的孔中600s(缔合),然后用0.2%PBST洗涤600s(解离)。记录缔合和解离概况,并用福泰生物数据分析v9(福泰生物,颇尔公司,美国)进行分析。平行使用阴性对照、即含0.2%PBST的孔,以减去与传感器的非特异性相互作用导致的结合。使用动力学模式在25 $^{\circ}$ C下进行实验,并将样品板预搅动3分钟。结合概况全局拟合为1:1(溶液中的一种分析物对表面上的一个结合位点)。使用来自四个最低可用分析物浓度的缔合相(从0s至600s)和解离相(从0s至100s)的数据、通过稳态分析来确定KD。还确定了天然可溶性C3b结合补体调节因子H(FH)和FHL-1与固定的(immobilised)C3b的结合亲和力。

[0400] 结果在图5中示出。发现CR1a对C3b的结合亲和力为21nM。为了比较,FH对C3b的结合亲和力为580nM,FHL-1对C3b的结合亲和力为1.2mM。因此,CR1a比任一种天然的可溶性补体调节剂明显更强地结合至C3b。CR1a对C3b的强结合亲和力意味着CR1a是比基于FH或FHL-1的试剂更有效的促进C3b分解的试剂。

[0401] 强结合亲和力还使CR1a能够促进iC3b降解为所需的进一步的下游产物,例如C3dg(见图2)。相反,FH和FHL-1不会导致C3b的降解超过iC3b。iC3b是一种促炎分子,其作用以将免疫细胞募集到补体活化位点,进而引起负面的炎症作用。因此,CR1a将iC3b进一步降解为C3dg是有利的,并且避免了由免疫系统造成的进一步损害。

[0402] 实施例4

[0403] 使用尤斯室实验(如上所述)比较根据本发明的多肽的扩散速率,以查看是否由于蛋白质的配制而产生任何差异。

[0404] 实验包括使用来自患有AMD的供体的布鲁赫膜来确定在这种情况下沉积在布鲁赫膜中的物质、包括玻璃膜疣和基底线性沉积物是否损害了多肽的穿过布鲁赫膜的能力。可以预料,即使存在AMD变化,最佳的多肽也将有效地穿过布鲁赫膜。

[0405] 实施例5

[0406] 将可选地编码优选信号肽和终止密码子的根据本发明的核酸插入到AAV载体中,该优选信号肽是与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性的多肽。所得的表达载体用于转染培养的RPE细胞。评价编码的多肽的表达和分泌。预期与SEQ ID NO:4具有至少80%的序列同一性的多肽由RPE细胞分泌,并且信号肽已从分泌的多肽裂解。

[0407] 腺相关病毒(Adeno-associated virus,AAV)转导将实施例1中描述的编码CR1a多肽的核酸转染到衍生自视网膜色素上皮的人APRE-19细胞(ATCC,USA)中。

[0408] 将AAV2血清型病毒颗粒与CR1a质粒一起预包装。将ARPE-19细胞以每孔300,000个细胞的密度接种在6孔细胞培养板(科宁(Corning))上的2ml DMEM/F12生长培养基(ATCC,美国)中,该生长培养基中补充有10%(v/v)胎牛血清(ATCC,美国)。然后,将细胞在5%CO₂的潮湿气氛中于37 $^{\circ}$ C温育24小时。温育后,将细胞用2ml无血清(serum free)DMEM/F12生长培养基洗涤两次。添加总体积为1ml的、在无血清DMEM/F12生长培养基中感染复数(MOI)为100,000的AAV2-CR1a。将含有AAV2-CR1a的培养基与细胞一起温育24小时(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂),随后第二天用2ml新鲜的无血清DMEM/F12生长培养基替换。用AAV-GFP转导的对照细胞平行生长。感染后14天评估转导效率。通过斑点印迹检测ARPE-19细胞对CR1a的分泌:将来自CR1a转导的RPE细胞的条件培养基与内部(in-house)多克隆抗CR1a抗体接触。

[0409] 结果在图6中示出。与用作阴性对照的使用AAV-GFP转导的RPE细胞的培养基(对照

(Ctrl) 培养基) 相比, 在两个测试样品 (AAV-CR1a培养基) 中均发现了与抗CR1a抗体的免疫反应性。包括纯化的重组CR1a蛋白作为阳性对照。

[0410] 评估了从人APRE-19和HEK293细胞分泌的重组CR1a多肽的将C3b分解为iC3b和C3dg的能力。

[0411] 结果在图7A中示出。发现从人APRE-19细胞分泌的功能性CR1a多肽充当因子I的辅因子, 导致C3b分解为iC3b (产物e) 和C3dg (产物f)。含有FHL-1+FI+C3b的反应为C3b和产物iC3b提供了MW控制。

[0412] 在利用AAV递送的CR1a转导的人RPE细胞 (ARPE-19) 的组织培养基中评估了C3b的分解。AAV-GFP转导的RPE细胞用作阴性对照。转导后14天, 用纯化的C3b和因子I补充转导细胞。通过蛋白质印迹检测组织培养基中的C3b和iC3b水平。

[0413] 结果在图7B中示出。RPE细胞产生自己的补体成分, 并发现RPE细胞具有低的C3b (产品a) 到iC3b (产品b; 泳道2) 的天然周转 (native turnover)。然而, 发现与天然周转率相比, 表达AAV递送的CR1a的RPE细胞具有增加的C3b到iC3b (产物b; 泳道3) 的分解能力。

[0414] 这表明CR1a成功地从眼细胞、例如视网膜色素上皮细胞分泌, 作为FI辅因子具有功能活性, 增强C3b分解为下游产物, 能够补体调节, 并且将对涉及补体过度活化的病症、例如C3b的过量提供治疗益处。

[0415] 实施例6

[0416] 本发明的多肽在治疗或预防补体相关失调的方法中得到使用。补体相关失调的一个实施例是眼睛中的黄斑变性, 例如AMD。

[0417] 图8提供了眼睛黄斑区域的示意图。视网膜色素上皮 (RPE) 是在视网膜神经感觉层和血管脉络膜之间的连续单层立方/柱状上皮细胞。该细胞具有物理、光学、代谢/生物化学和转运的功能, 并在正常视觉过程中起到至关重要的作用。通过薄的 (2-4 μ -)、非细胞的、五层的、细胞外基质的布鲁赫膜 (BrM) 将RPE与脉络膜分开。该BrM主要有两个功能: RPE的基础和血管壁。与BrM紧邻且在脉络膜内的是一层毛细血管, 称为脉络膜毛细血管层。补体活化集中在脉络膜毛细血管层的细胞外基质上, 称为毛细血管间隔。

[0418] AMD的标志性病变—玻璃膜疣是从脂质和细胞碎片的积聚形成的, 该脂质和细胞碎片包括许多补体活化产物。玻璃膜疣在邻近RPE层的BrM内发展, 并破坏营养物质从脉络膜到RPE的流动, 导致细胞功能障碍和死亡。RPE细胞的死亡也会导致光感受器细胞的功能障碍, 并随后导致视敏度的丧失。

[0419] 图9提供了玻璃膜疣沉积物的代表性荧光显微镜图像, 取自Forest et al. (2015) Dis.Mod.Mech.8, 421-427 (图1)。图9显示了来自一名患有AMD的82岁女性的视网膜组织。细胞膜标记物显示了覆盖玻璃膜疣的退化RPE细胞。末端补体复合物标记物C5b-9指示了玻璃膜疣内的、以及血管周围的补体活化区域。细胞核被染色。比例尺20 μ m。

[0420] 补体调节分子的全身性施用将需要高剂量, 并且给运行补体系统带来有害的脱靶效应 (off-target effect) 的实质风险。局部施用、例如从RPE细胞表达, 是更安全且更有效的递送方法。然而, 要使RPE表达的分子在治疗/预防脉络膜毛细血管层的毛细血管间隔、即补体过度活化位点中的补体相关失调中是有效的, 则该分子将必须穿过布鲁赫膜 (参见图10)。也就是说, 有效的补体抑制疗法必须满足图10中所有三个阶段的要求。

[0421] 如本文所示, CR1a为:

[0422] 1、从人RPE细胞分泌的(例如参见图6)；

[0423] 2、能够被动扩散穿过人BrM(例如参见图3)；和

[0424] 3、在存在补体因子I的情况下,能够介导C3b分解为iC3b、以及进一步的所需的分解产物(例如参见图2、3、7)。

[0425] 因此,CR1a能够由RPE细胞表达,能够到达需要C3b调节的补体活化区域,并且可以充当治疗眼部中的补体过度活化、例如AMD的有效治疗剂。

[0426] 实施例7

[0427] 激光诱导的脉络膜新生血管形成模型

[0428] 此模型对小鼠或大鼠的视网膜应用激光灼伤,以诱导脉络膜新生血管形成,例如,如Schnabolk et al, Mol Ther Methods Clin Dev.2018;9:1-11中描述的。脉络膜新生血管复合物的尺寸可以通过荧光素血管造影术或组织学测量。

[0429] 啮齿动物被给予视网膜下注射含有CR1a cDNA的AAV载体、例如AAV2,或空白AAV载体作为对照。接受含有CR1a cDNA的AAV载体的啮齿动物会从其视网膜色素上皮细胞分泌CR1a蛋白。当达到最大CR1a蛋白排泄量时,对啮齿动物视网膜应用激光灼伤,并在激光灼伤后的预定时间时测量脉络膜新生血管复合物的尺寸。发现与施用空白AAV载体的啮齿动物相比,CR1a多肽的补体抑制作用减小了脉络膜新生血管复合物的尺寸。

[0430] 碘酸钠诱导的视网膜变性

[0431] 给小鼠静脉内注射碘酸钠,其诱导视网膜色素上皮的变性,该视网膜色素上皮的变性部分取决于补体活化,例如,如Katschke et al., Sci Rep.2018;8(1):7348中描述的。作为重组蛋白通过玻璃体内注射,或通过使用含有CR1acDNA的AAV载体、例如AAV2的视网膜下递送,来递送CR1a。施用空白AAV载体作为对照。发现CR1a治疗的小鼠比未接受CR1a治疗的对照小鼠具有更少的视网膜变性。

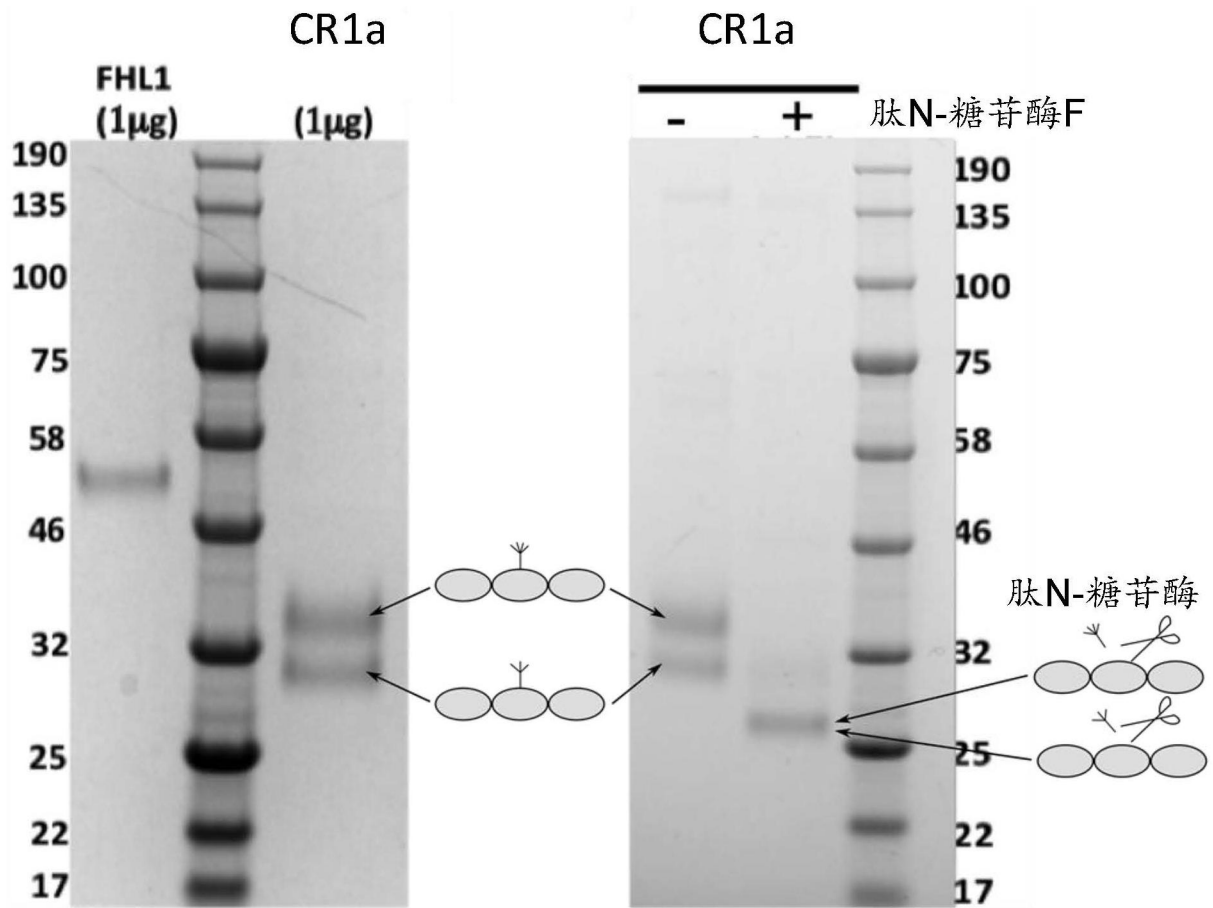


图1A

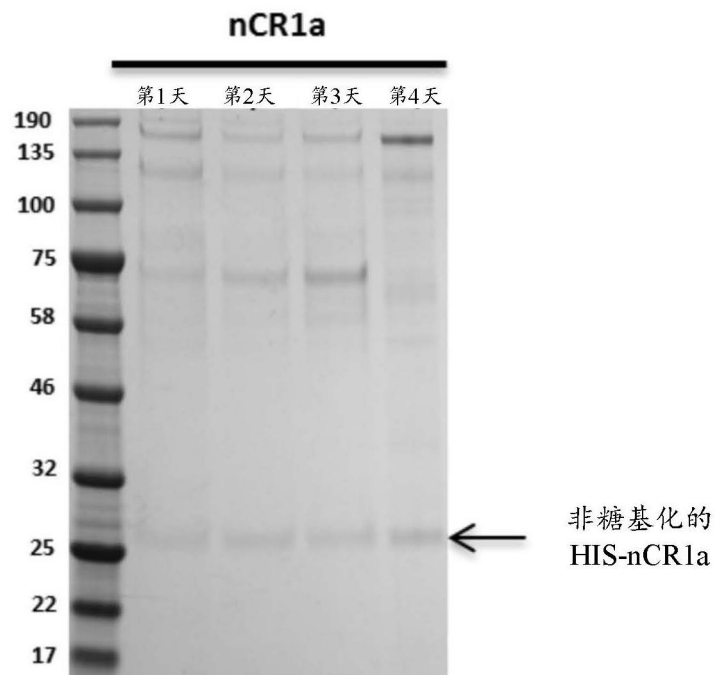
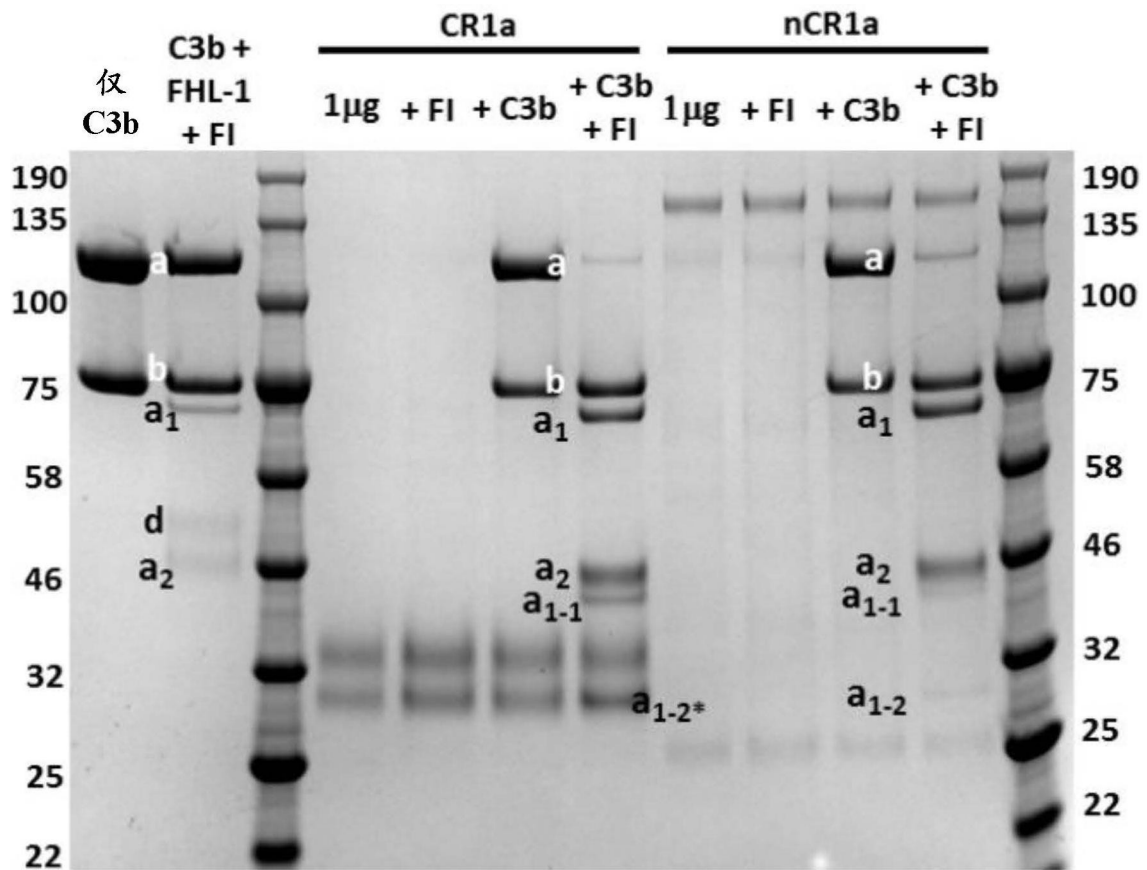


图1B



- a** – a-C3b α 链 114 kDa ($a = a_1 + a_2$)
b – a-C3b β 链 75 kDa
a₁ – iC3b 68 kDa ($a_1 = a_{1-1} + a_{1-2}$)
d – FHL-1
a₂ – iC3b 43kDa
a₁₋₁ – C3dg 41kDa
a₁₋₂ – 27kDa (保留部分68 kDa iC3b片段)
a₁₋₂* – 由HISCR1a带掩盖的27 kDa

图2

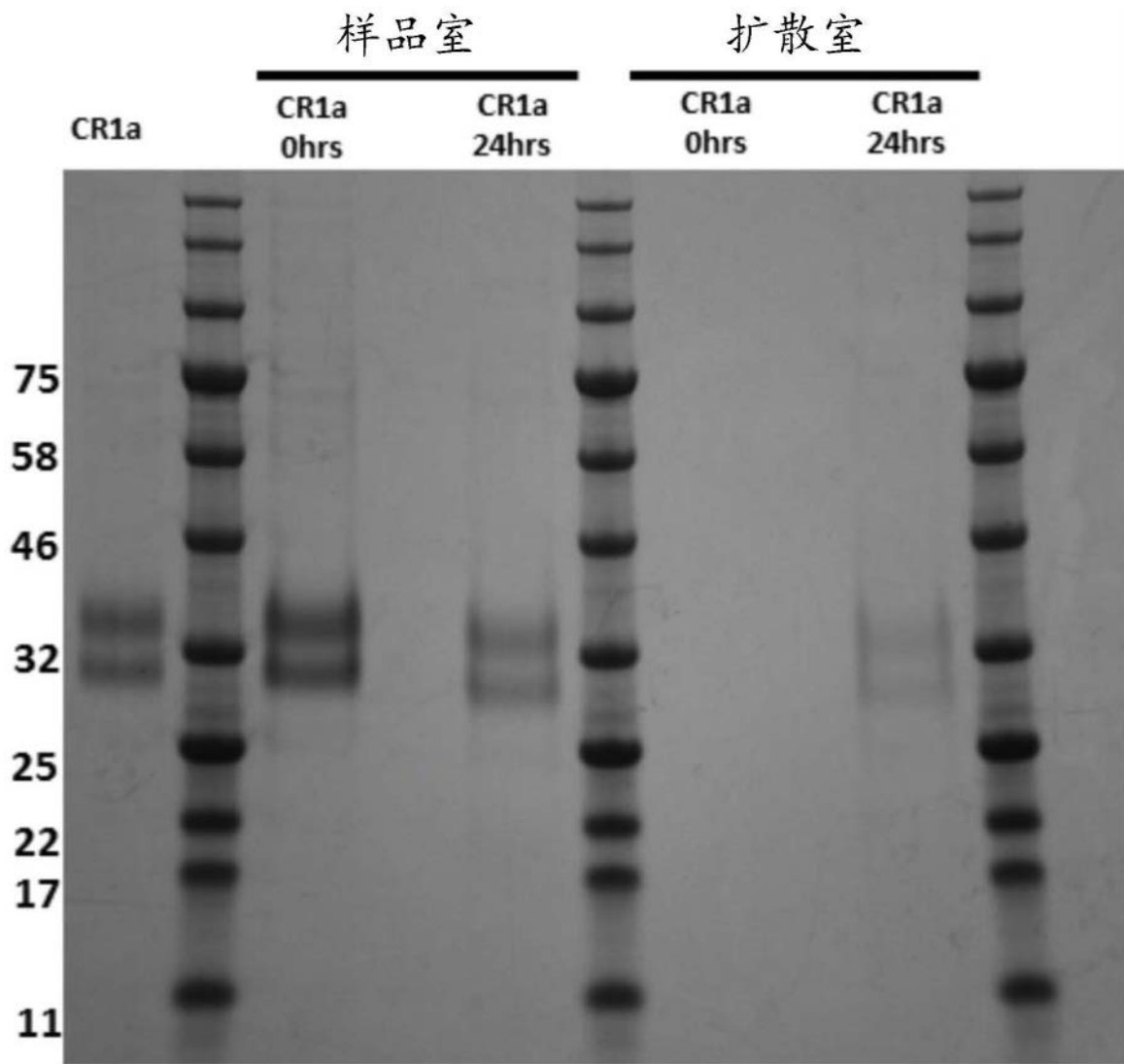


图3A

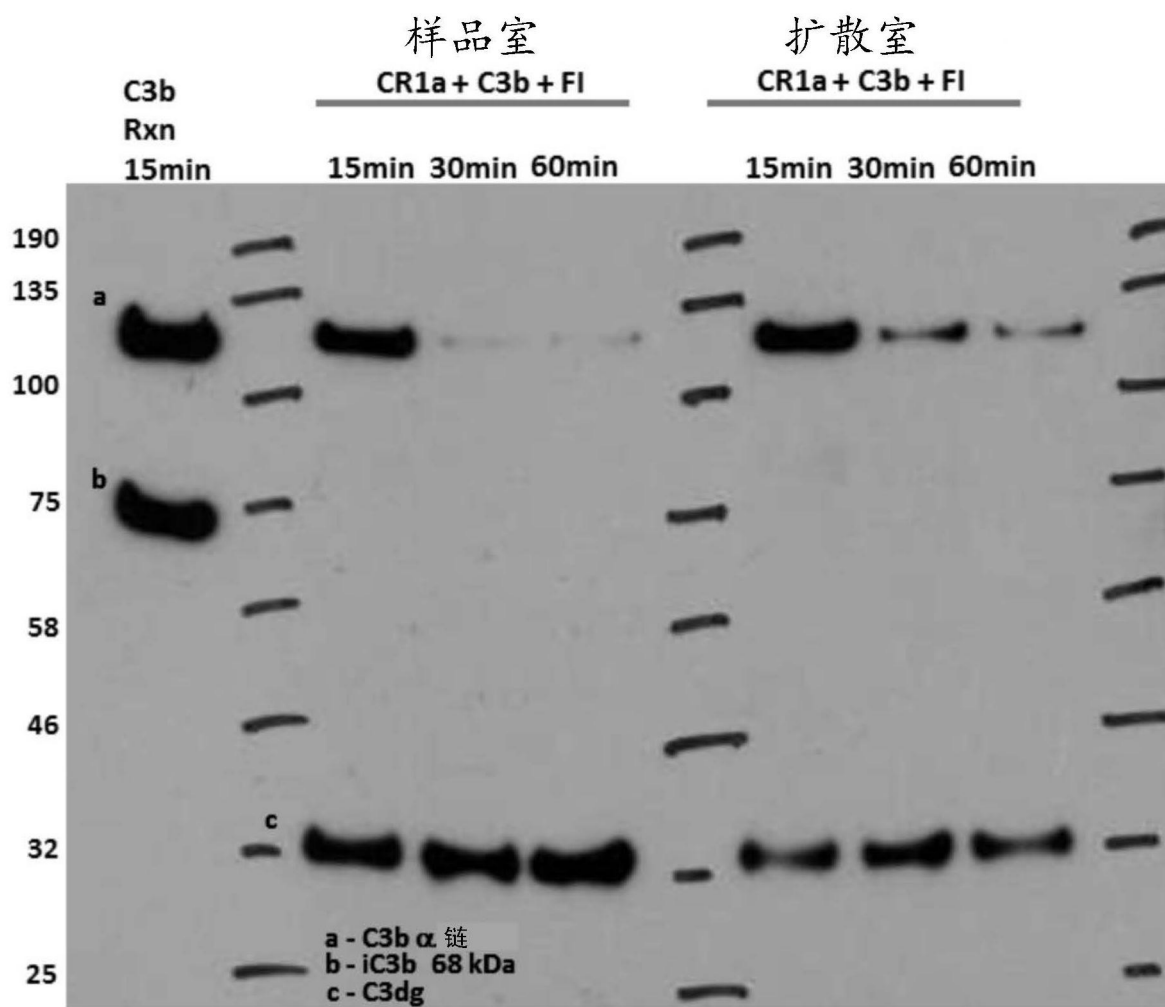


图3B

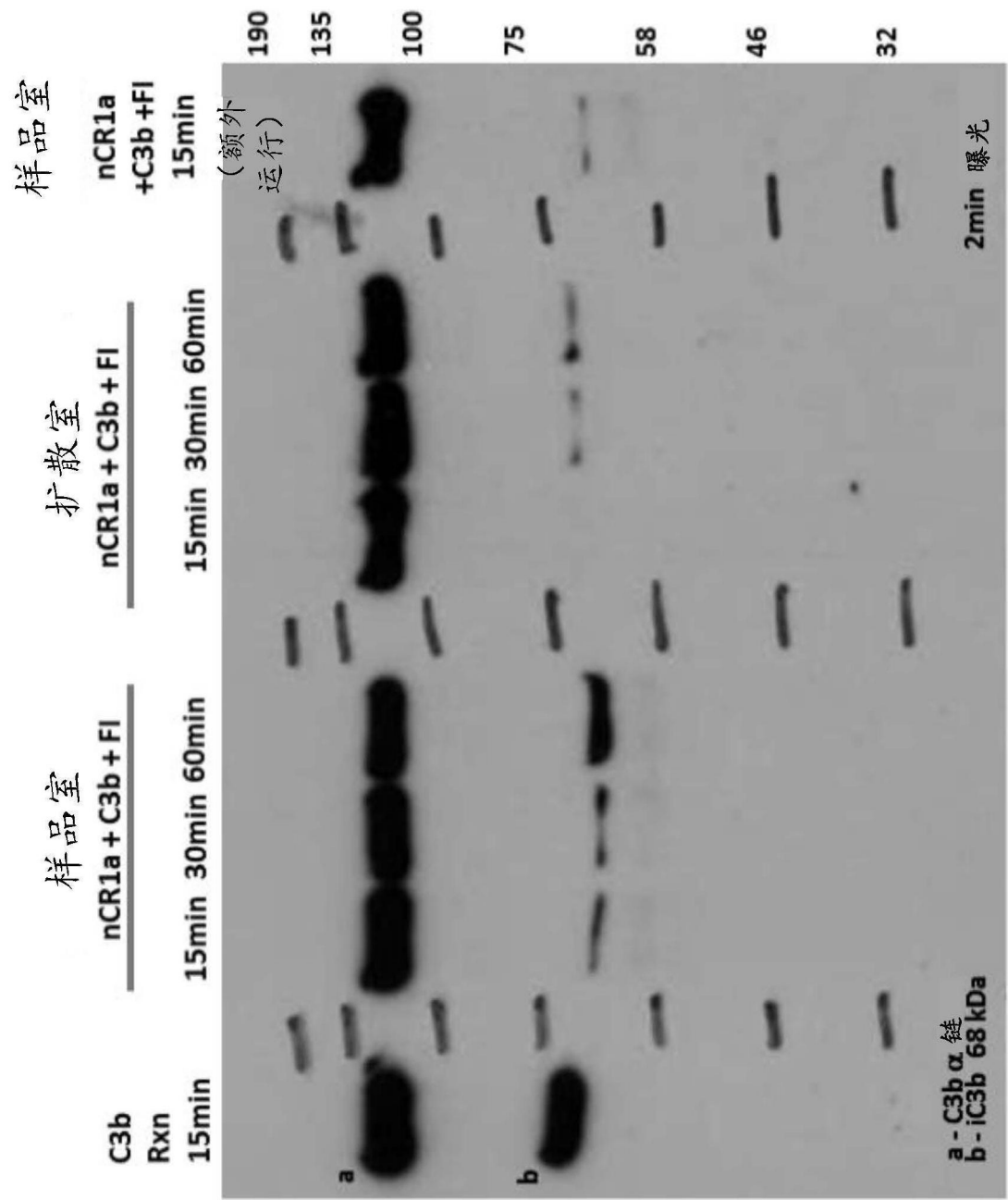


图3C

样品室

扩散室

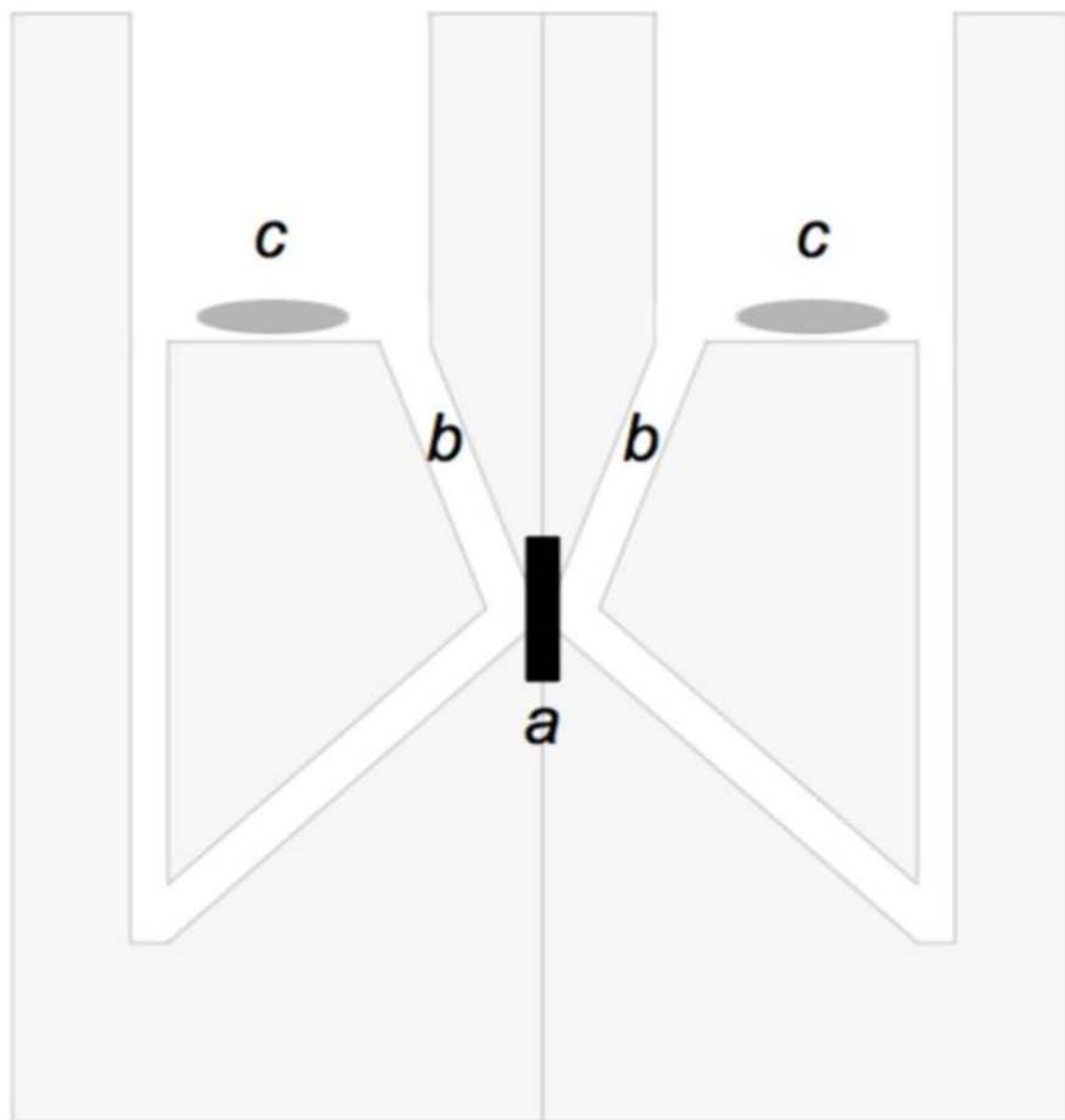


图4

	FH	FHL-1	CR1a
	~155kDa	~50kDa	
KD (M)	5.83E-07	1.17E-06	2.10E-08
KD 误差 (%)	3.0192	3.1325	0.4186
Rmax	0.1792	0.1495	0.1987
Rmax 误差 (%)	1.1926	0.6311	0.0483
全 R^2	0.9770	0.9550	0.8731

167 µgml
20180514

278 µgml
20180501

30 µgml
20180511

数据位置

图5

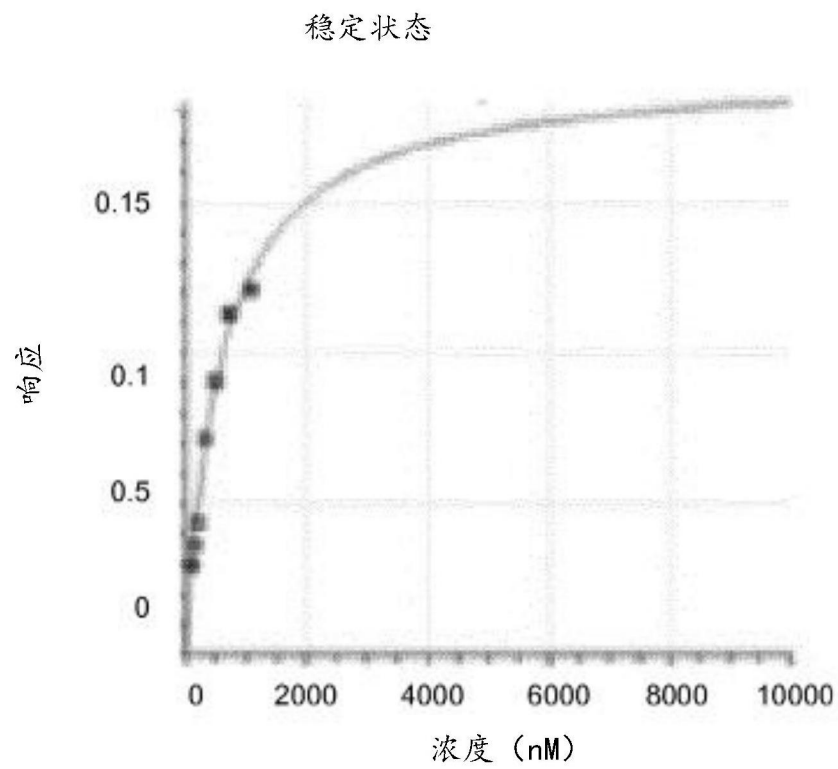
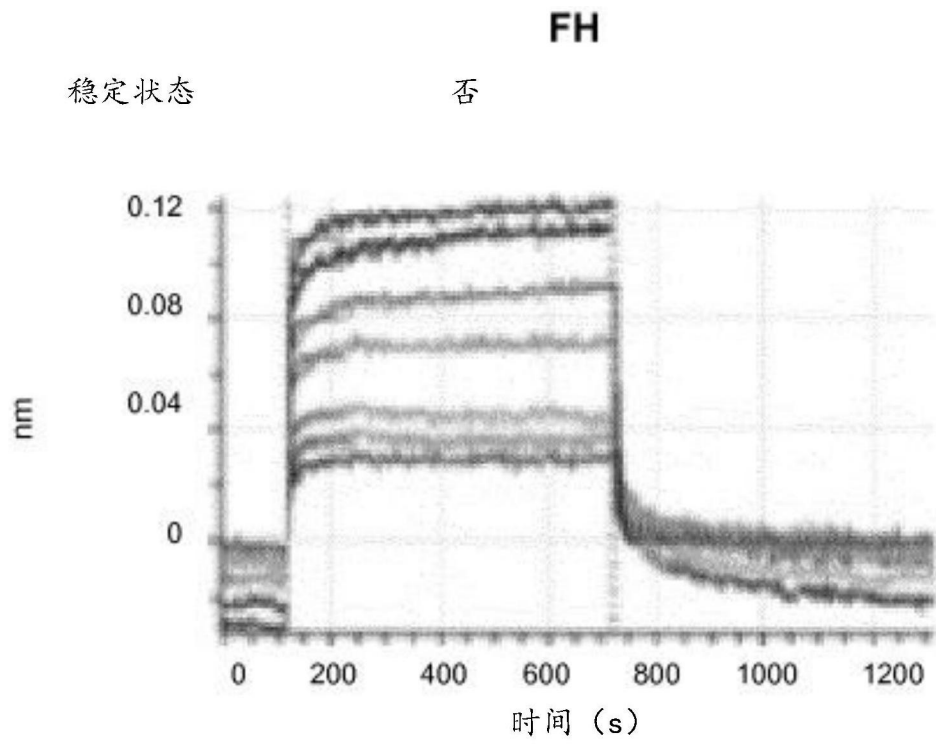


图5(续)

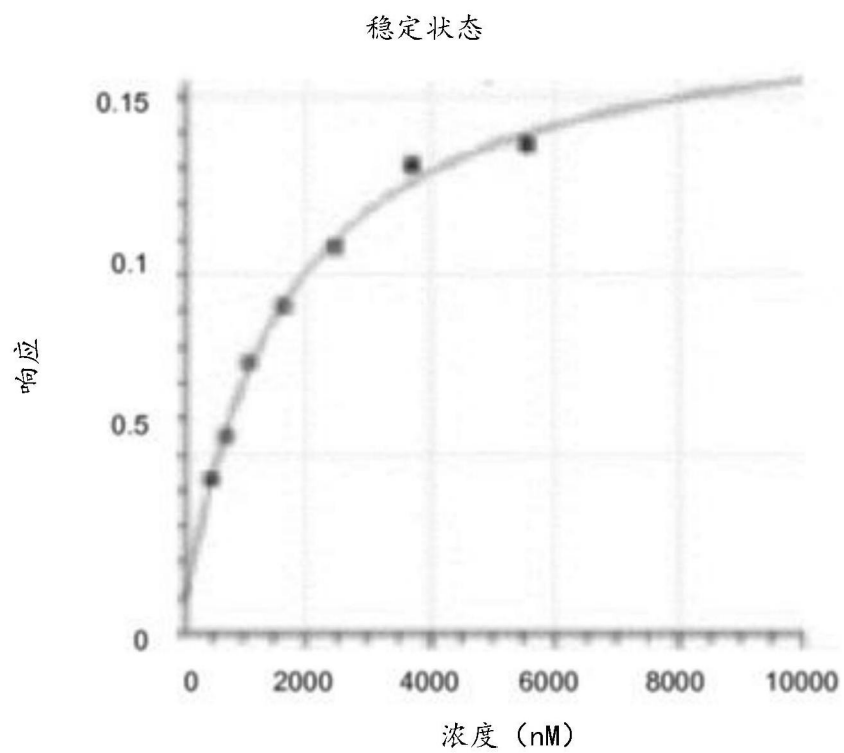
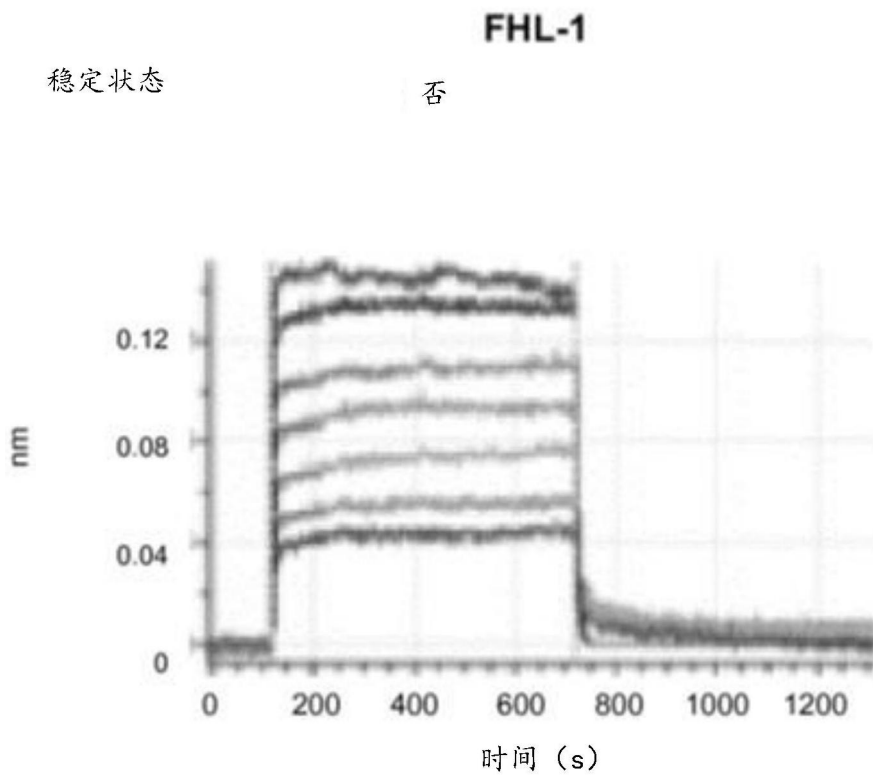


图5(续)

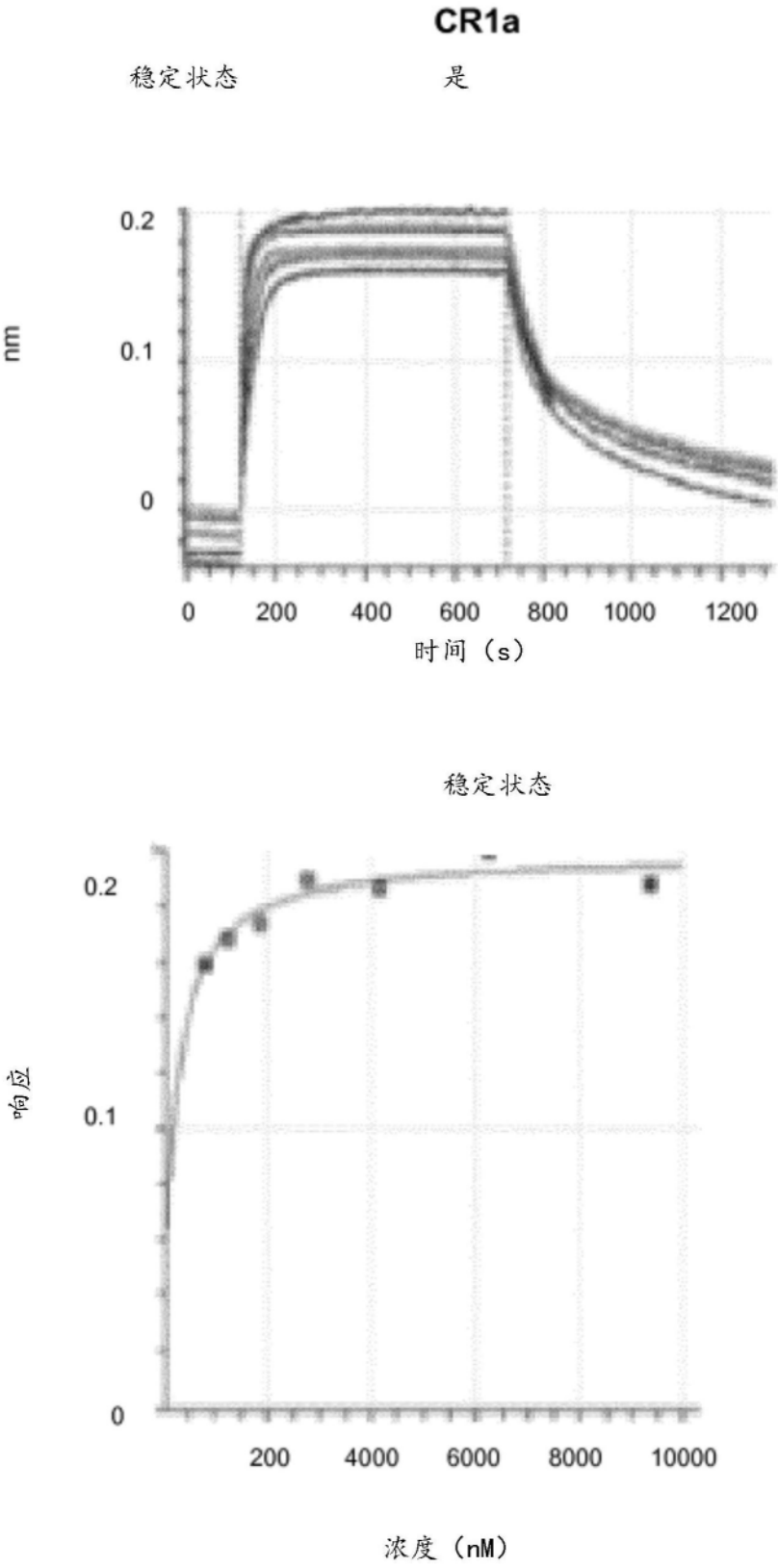


图5(续)

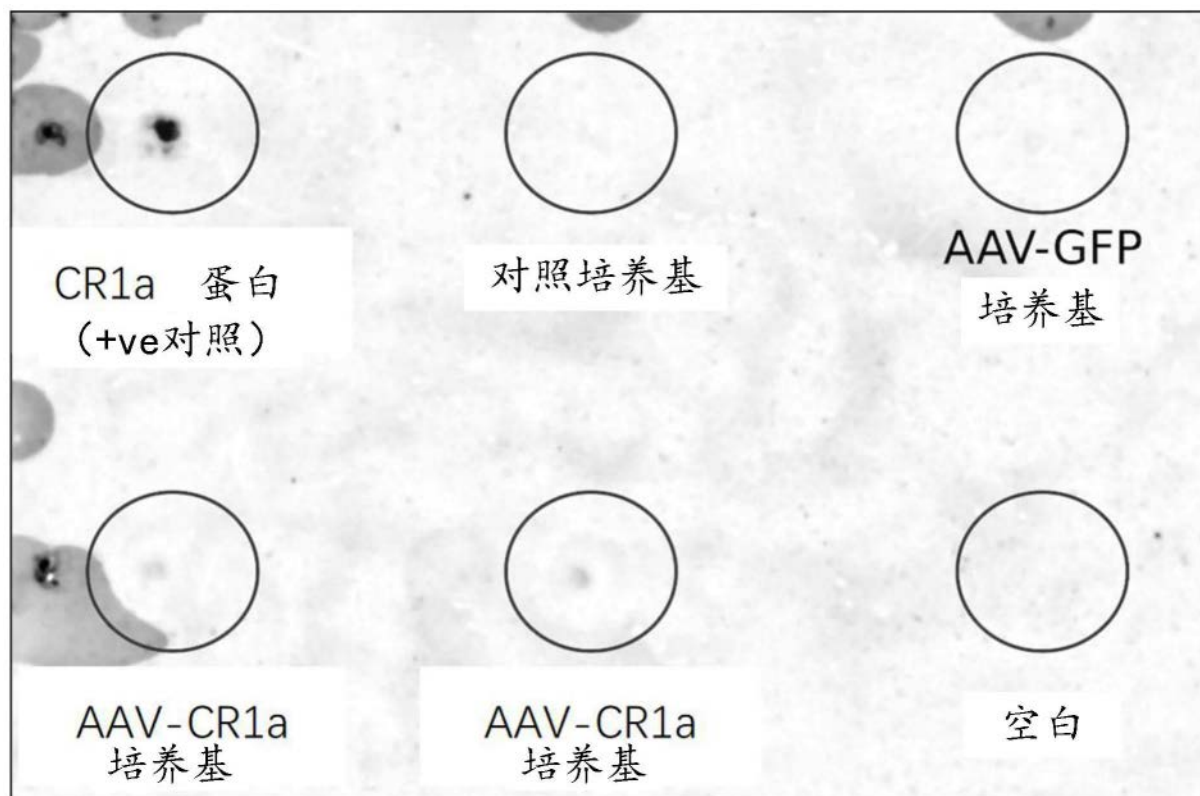
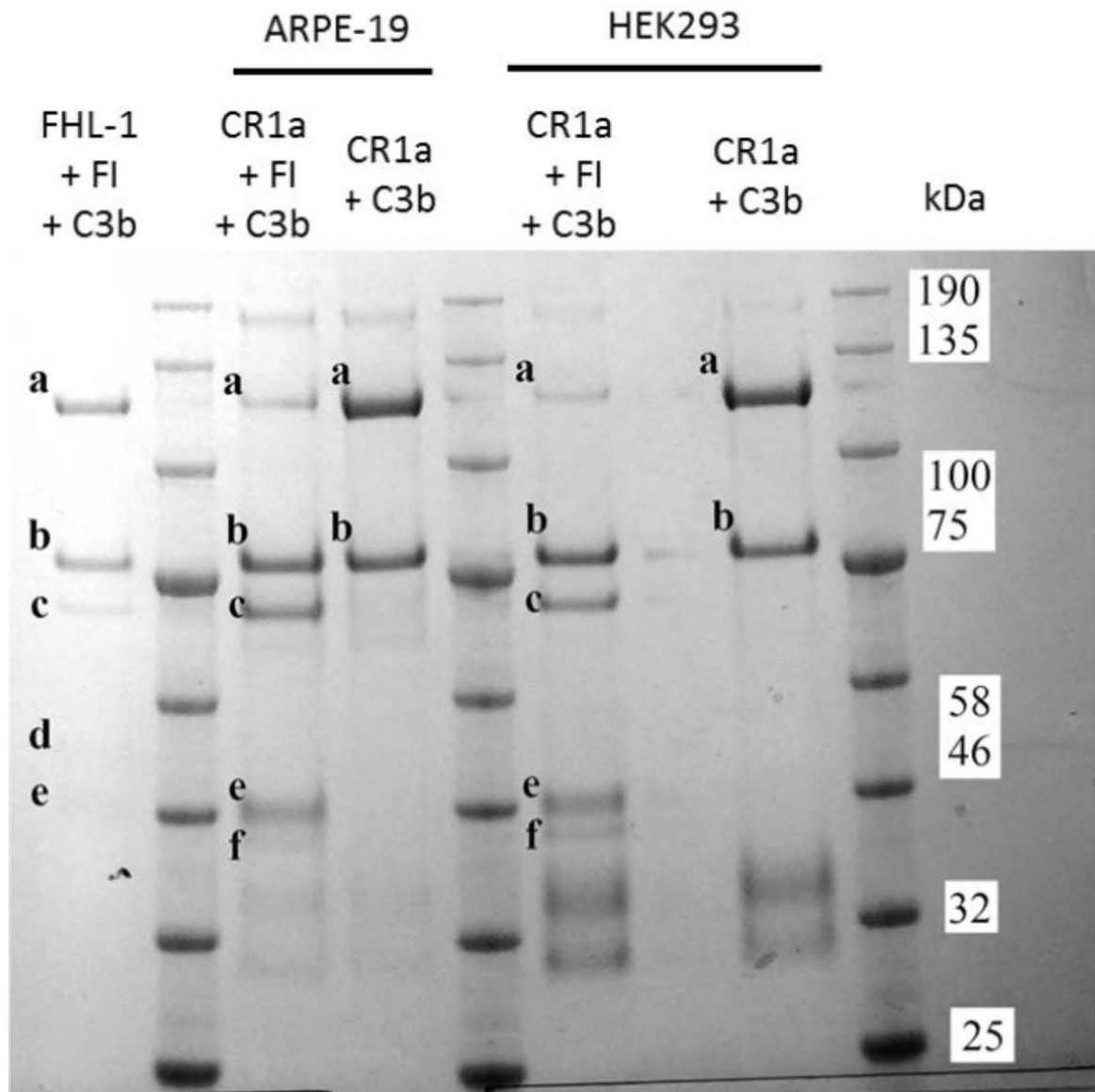


图6



a - C3b α 链

b - C3b β 链

c - iC3b 68 kDa

d - FHL-1

e - iC3b 43 kDa

f - C3dg 41 kDa (部分68 kDa iC3b)

图7A

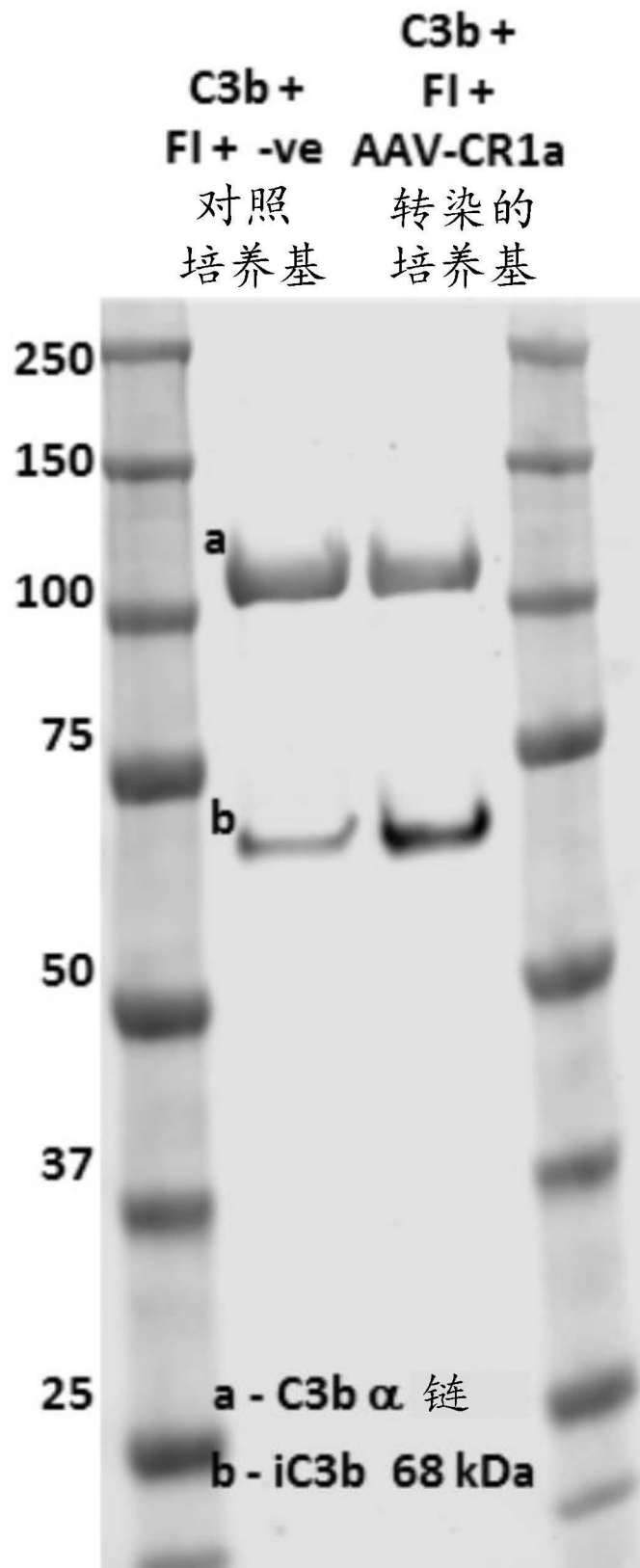


图7B

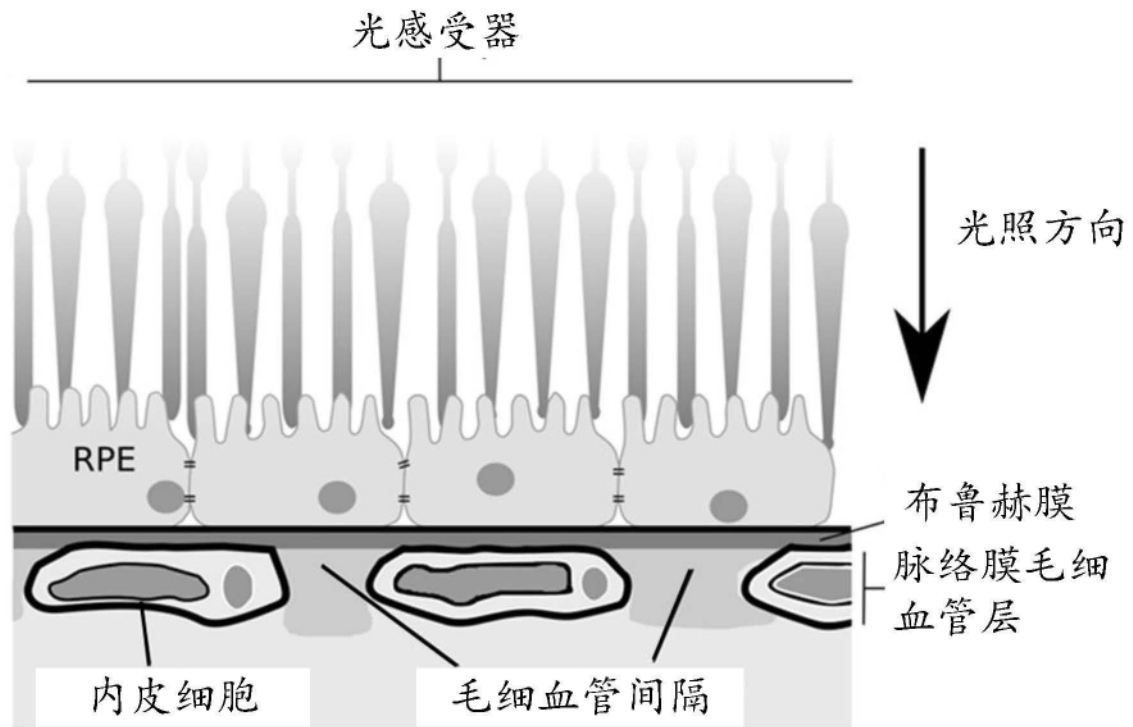


图8

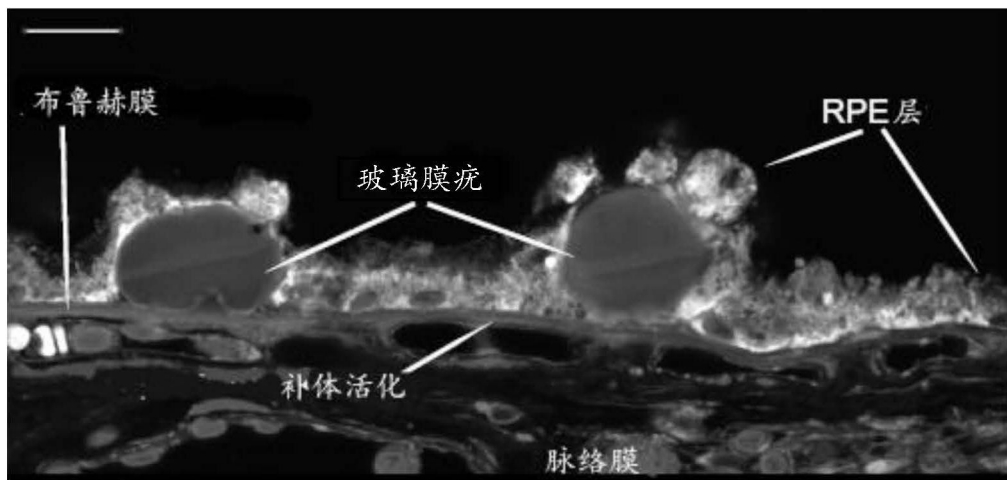


图9

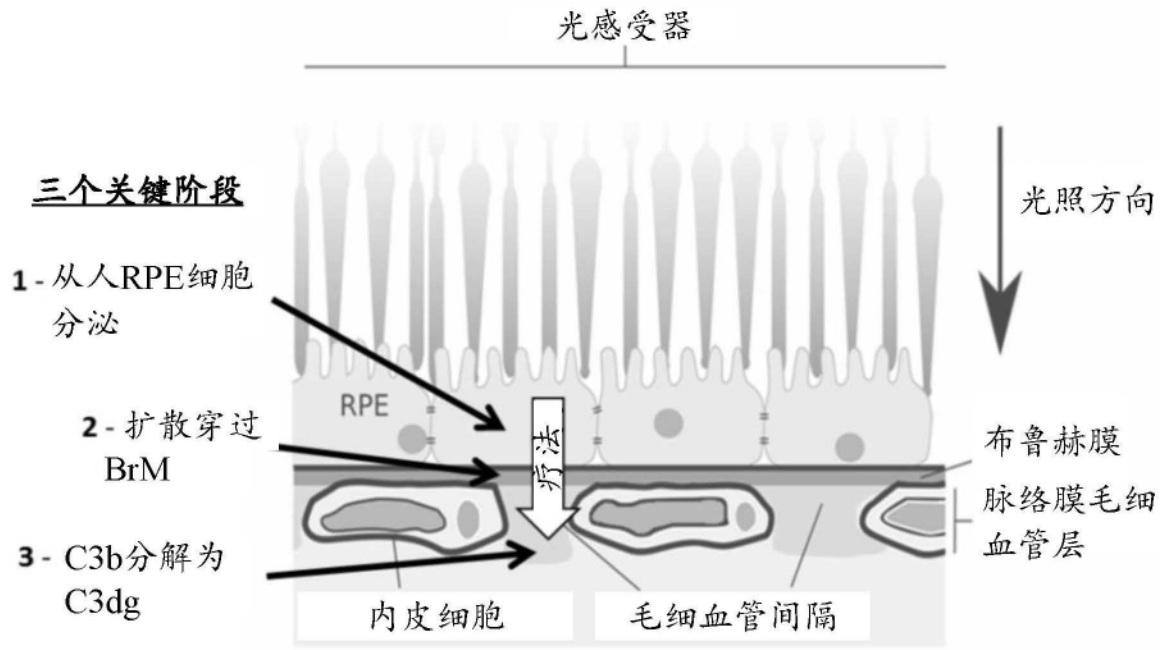


图10

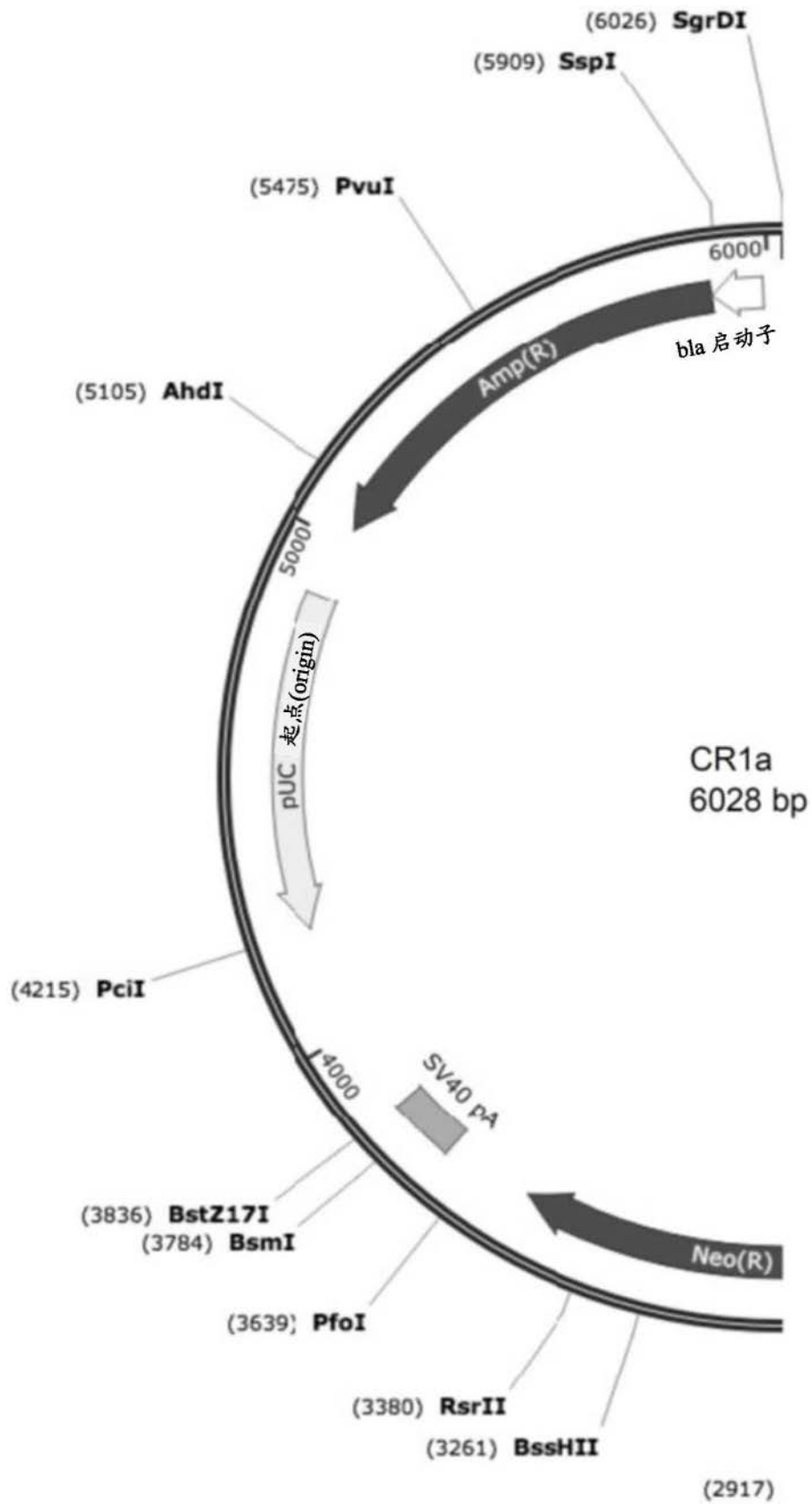


图11

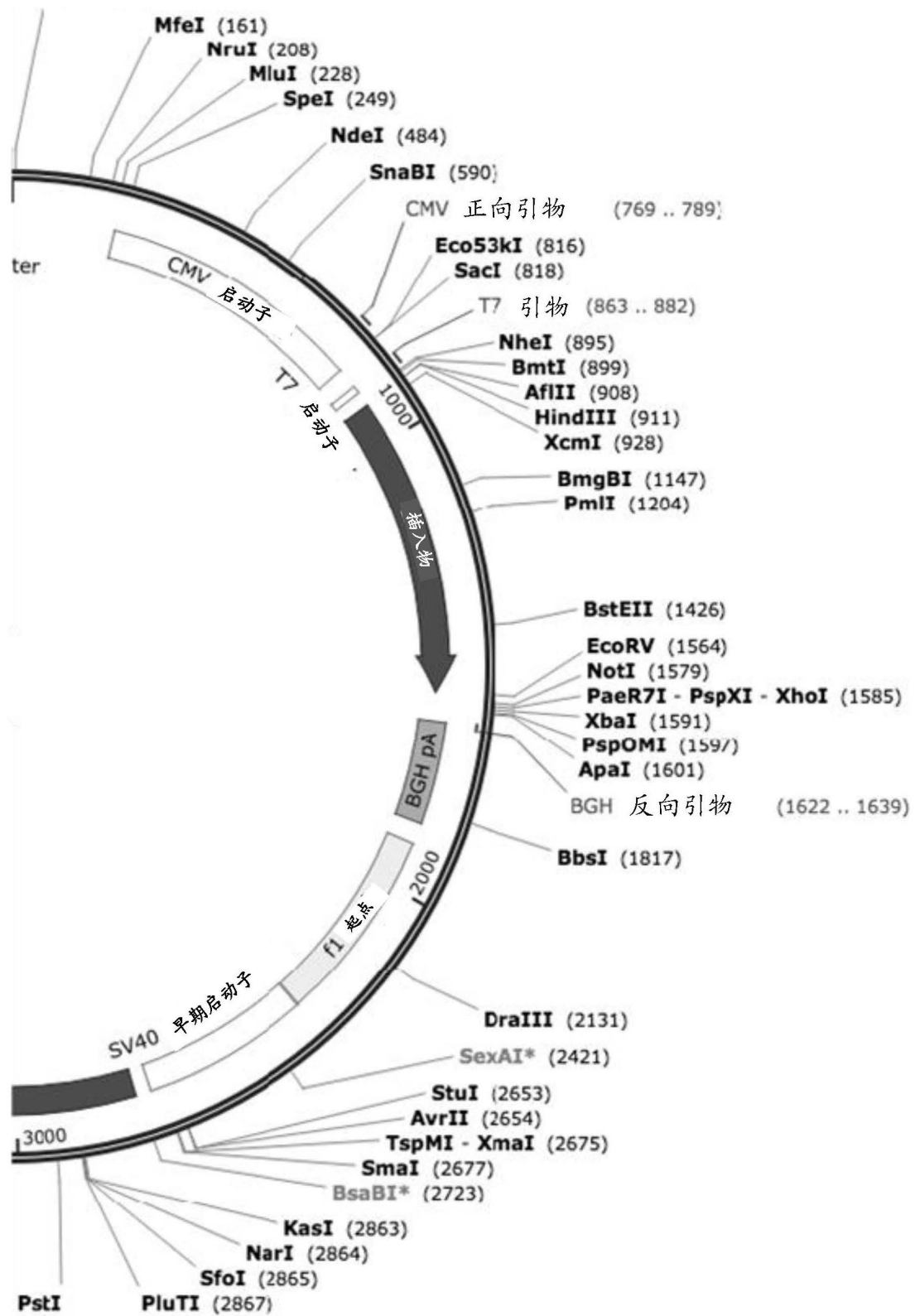


图11(续)