

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491253 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.06

(22) Дата подачи заявки
2022.12.21

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, СВЯЗАННЫЕ С ФАКТОРОМ I КОМПЛЕМЕНТА

(31) 63/293,040

(32) 2021.12.22

(33) US

(86) PCT/US2022/082177

(87) WO 2023/122689 2023.06.29

(88) 2023.08.10

(71) Заявитель:
ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

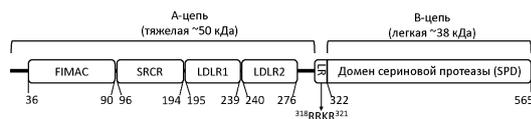
(72) Изобретатель:

Блауз Грант И. (US), Йенсен Ян
Кристиан, Ольденбург Эмиль, Шар
Кристин Рене, Ендрошек Агнешка
(DK), Макгуайр Джеймс Н., Ийер
Шьям Раждан, Пелот Кайл А. (US)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем документе предложены варианты фактора I комплемента (CFI) и слитные конструкции, содержащие CFI, которые демонстрируют по меньшей мере одну улучшенную характеристику относительно CFI дикого типа. Варианты CFI и слитные конструкции согласно описанию могут проявлять настраиваемую специфичность и активность. Варианты CFI и слитные конструкции, предложенные в настоящем документе, могут использоваться для лечения заболевания или состояния, связанного с дисрегуляцией системы комплемента или дефицитом CFI.



Область	Нумерация химотрипсина-A	Нумерация зрелых белков CFI
Петля активации	16-19	322-326
37-петля	36-39	342-344
60-петля	60-64	366-372
70-петля	69-80	377-389
99-петля	94-101	403-410
110-петля	109-112	418-426
150-петля автолиза	142-152	455-463
180-петля стабилизирующего оксаниона	184-193	494-509
220-петля входной рамки S1	216-223	529-536

A1

202491253

202491253

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, СВЯЗАННЫЕ С ФАКТОРОМ I КОМПЛЕМЕНТА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/293,040, поданной 22 декабря 2021 г., содержание которой во всей полноте включено в настоящий документ путем ссылки.

ССЫЛКА НА ЭЛЕКТРОННЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Содержание электронного перечня последовательностей (VTEX_706_01WO_SeqList_ST26.xml; размер: 53 828 байтов и дата создания: 20 декабря 2022 г.) полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Система комплемента включает в себя классические, лектиновые и альтернативные и пути и жестко управляется рядом регуляторов. Фактор I комплемента (CFI) является одним из таких регуляторов, который регулирует систему комплемента посредством расщепления белков C4b и C3b, тем самым инактивируя эти белки. Такое расщепление приводит к ингибированию классических и лектиновых путей (посредством расщепления C4b) и ингибированию альтернативного пути (посредством расщепления C3b), что в конечном итоге предотвращает сборку ферментов C3- и C5-конвертазы.

[0004] CFI кодируется как профермент, который затем активируется посредством протеолитического расщепления на гетеродимерный гликопротеин, причем гетеродимерный белок имеет тяжелую цепь и легкую цепь, которые соединены дисульфидной связью. Легкая цепь (также называемая В-цепью) содержит домен сериновой протеазы (SPD), ответственный за расщепление C3b и C4b, и содержит каталитическую триаду (His362, Asp411 и Ser507) в области, называемой активным сайтом. Тяжелая цепь (также называемая А-цепью) содержит четыре домена: домен мембраноатакующего комплекса FI (FIMAC), домен SRCR, богатый цистеином домен скэвенджер-рецептора (также называемый доменом CD5), домен рецептора 1 липопротеинов низкой плотности (LDLr1) и домен рецептора 2 липопротеинов низкой плотности (LDLr2). CFI процессирует в свою активную форму посттрансляционно посредством добавления шести Asn-связанных гликанов и протеолитической активации

фурином с вырезанием тем самым линкера RRKR (SEQ ID NO: 25) для получения двухцепочечного зрелого белка.

[0005] Что касается его способности расщеплять C3b или C4b, то CFI является протеолитически активным, когда он образует тройные комплексы со своими кофакторами: фактором H (FH) или рецептором комплемента 1 (CR1, также называемым CD35) и его физиологическими субстратами C3b и C4b. FH представляет собой пример растворимого члена группы белков, называемых регуляторами активации комплемента (RCA). Образование комплекса, получающегося из CFI и FH, и последующее расщепление C3b вместе оказывают регулирующее действие на альтернативный путь системы комплемента. Непрерывное регулирование уровней C3b с помощью CFI способствует поддержанию баланса между классическим и альтернативным путями. Например, было показано, что удаление CFI вызывает немедленную активацию, что приводит к чрезмерной активности альтернативного пути. CR1 представляет собой пример мономерного однопроходного мембранного гликопротеина типа I и тоже является членом группы белков RCA. Образование комплекса между CFI и CR1 и последующее расщепление C3b и C4b оказывают регулирующее действие на альтернативный или классический и лектиновый пути соответственно.

[0006] Дисрегуляция CFI, мутации и нарушение функциональности CFI, а также дефицит CFI играют роль в заболеваниях, связанных с системой комплемента. Существует потребность в способах модуляции или ингибирования конкретных точек регуляции в системе комплемента. В настоящем документе предложены композиции и способы, которые удовлетворяют эту потребность.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном аспекте в описании предложены варианты фактора I комплемента (CFI), содержащие по меньшей мере одну модификацию по отношению к CFI дикого типа, и слитные белки, содержащие такие варианты CFI. Примеры вариантов CFI и слитных белков представлены в таблицах 2 и 3. Варианты CFI согласно описанию способны модулировать систему комплемента и демонстрируют по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа. Также предложены способы получения и применения вариантов CFI и слитных белков согласно описанию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0008] На ФИГ. 1 схематически представлены домены фактора I комплемента (CFI) дикого типа, демонстрирующие тяжелую цепь и легкую цепь. Тяжелая цепь (А-цепь) содержит домены FIMAC, SRCR, LDLr1, LDLr2 и линкер. Легкая цепь (В-цепь) содержит домен сериновой протеазы. Области легкой цепи включают в себя петлю активации, 37-петлю, 60-петлю, 70-петлю, 99-петлю, 110-петлю, 150-петлю автолиза, оксианион-стабилизирующую 180-петлю и/или 220-петлю входной рамки S1.

[0009] На ФИГ. 2А–2D показаны примеры моделей слитных конструкторов согласно описанию между альбумином (например, сывороточным альбумином, например, человеческим сывороточным альбумином (HSA)) и CFI, содержащим вариант CFI, причем вариант CFI содержит инверсию цепи А-В.

[0010] На ФИГ. 3А показан пример модели слитного конструктора CFI-альбумина (например, сывороточного альбумина, например, человеческого сывороточного альбумина (HSA)), содержащей сывороточный альбумин, слитый с CFI.

[0011] На ФИГ. 3В показан пример модели слитного конструктора CFI-HSA, содержащей HSA, слитый с доменом сериновой протеазы CFI.

[0012] На ФИГ. 4А показана принципиальная схема фактора Н (FH), показывающая его 20 доменов.

[0013] На ФИГ. 4В показана принципиальная схема мини-фактора Н, показывающая домены 1–4, соединенные с доменами 19–20 FH.

[0014] На ФИГ. 5 показан пример модели слитного конструктора, содержащей части фактора Н и CFI, включая домены 1–8 FH, слитые с CFI.

[0015] На ФИГ. 6 показано схематическое представление трех примеров слитных конструкторов согласно описанию, каждый из которых содержит HSA, по меньшей мере один домен CFI и различные домены фактора Н, часть которых соединена необязательными / приведенными в качестве примера линкерами.

[0016] На ФИГ. 7 показано схематическое представление примера слитного конструктора CFI, в котором «сердцевинный» домен содержит любой один или более CFI согласно

описанию и может быть фланкирован одним или более доменами на одном или обоих N- и C-концах. Показанные домены могут быть необязательно соединены линкерами.

[0017] На ФИГ. 8А–8В представлены графики, показывающие измеренные концентрации слитного конструкта CFI-HSA дикого типа в сравнении с не содержащим плазму очищенным CFI после однократного подкожного введения обезьянам в дозе 1 мг/кг.

[0018] На ФИГ. 9А–9В показаны графики разложения С3b и разложения С4b соответственно с помощью CFI-HSA и полученного из плазмы CFI.

[0019] На ФИГ. 9С–9D показаны графики гемолитических анализов CFI-HSA и полученного из плазмы CFI. При этом AP представляет анализ с акцентом на альтернативный путь, а CP+AP представляет анализ с акцентом на альтернативный и классический пути.

[0020] На ФИГ. 10 показан график, демонстрирующий количество С3а, обнаруженное в образцах стекловидного тела после интравитреальной инъекции (IVT) CFI-HSA в дозе 250 мкг или 500 мкг в модели примата с африканской зеленой мартышкой.

[0021] На ФИГ. 11 показан график уровней фактора I, обнаруженных в плазме в указанные моменты времени после внутривенной инъекции CFI-HSA (фактора I-HSA) в дозе 3 мг/кг или CFI (фактора I) в дозе 1,3 мг/кг у мышей CD1.

[0022] На ФИГ. 12 показан график уровней фактора I, обнаруженных в плазме в указанные моменты времени после подкожной инъекции CFI-HSA (фактора I-HSA) в дозе 3 мг/кг или CFI (фактора I) в дозе 6,5 мг/кг у мышей CD1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0023] В описании предложены композиции и способы, используемые для модулирования сигнализации и амплификации системы комплемента. Благодаря обеспечению вариантов фактора I комплемента (CFI) и слитных конструктов, содержащих CFI, которые более или менее активны на одном или более физиологических субстратах CFI и/или более стабильны, чем полученный из плазмы CFI, наблюдается модуляция системы комплемента. Такая модуляция включает в себя расщепление С3b и/или расщепление С4b в повышенном количестве, что снижает активацию комплемента и

уменьшает амплификацию путей комплемента. Например, некоторые варианты CFI могут изменять уровни регуляторов в системе комплемента. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI и слитные конструкты, предложенные в настоящем документе, могут действовать на классические и лектиновые пути системы комплемента, на альтернативный путь системы комплемента или на оба пути. В описании также предложены способы получения и применения этих вариантов и конструктов, например при лечении заболевания или состояния, связанного с дисрегуляцией комплемента, например при лечении сверхактивного ответа комплемента.

I. Белки фактора I комплемента, используемые для модуляции системы комплемента

A. Варианты фактора I комплемента

[0024] В настоящем документе предложены варианты фактора I комплемента (CFI), такие как варианты, содержащие одну или более модификаций по отношению к CFI дикого типа, называемые в настоящем документе «вариантами CFI». В настоящем документе «модификация» CFI дикого типа включает в себя: делецию одного или более аминокислотных остатков, делецию одного или более доменов, замену одного или более аминокислотных остатков, вставку (т. е. добавление) одного или более аминокислотных остатков, вставку (т. е. добавление) одного или более доменов, инверсию одного или более доменов и замену одного или более доменов.

[0025] Варианты CFI согласно описанию непосредственно не действуют на C3, например варианты согласно описанию непосредственно не расщепляют C3, непосредственно не ингибируют C3, непосредственно не ингибируют активацию C3 и непосредственно не снижают активацию C3.

[0026] В настоящем документе термин «CFI дикого типа» относится к любому встречающемуся в природе полноразмерному CFI, который не является вызывающим заболевание CFI, с сигнальной последовательностью или без нее, и который может относиться к любому биологическому виду.

[0027] В некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа является полученным из плазмы. В некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа представляет собой человеческий CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления человеческого CFI

дикого типа, имеющий сигнальную последовательность, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (как показано в таблице 1 ниже). В некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа представляет собой человеческий CFI. В некоторых вариантах осуществления человеческого CFI дикого типа не содержит сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа без сигнальной последовательности содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 (как показано в таблице 1 ниже).

[0028] CFI дикого типа содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые также называются А-цепью и В-цепью соответственно. На ФИГ. 1 показана принципиальная схема CFI, демонстрирующая две цепи. Тяжелая цепь (А-цепь) имеет четыре домена: домен мембраноатакующего комплекса FI (FIMAC) (остатки 36–90 SEQ ID NO: 5), домен SRCR, в свою очередь состоящий из множества богатых цистеином доменов скэвенджер-рецептора (SRCR), домен липопротейна 1 низкой плотности (LDLr1) и домен липопротейна 2 низкой плотности (LDLr2). Легкая цепь (В-цепь) состоит из домена сериновой протеазы (SPD). Область контакта между этими цепями называется областью контакта цепей А:В.

[0029] Вариант CFI согласно описанию включает в себя одну или более делецию одного или более аминокислотных остатков CFI дикого типа, делецию одного или более доменов CFI дикого типа, замену одного или более аминокислотных остатков CFI дикого типа, вставку одного или более аминокислотных остатков в CFI дикого типа, инверсию одного или более доменов CFI дикого типа и вставку одного или более доменов в CFI дикого типа.

[0030] Варианты CFI согласно описанию могут быть получены посредством введения одной или более модификаций в базовую молекулу CFI, причем домены базовой молекулы CFI соответствуют доменам, встречающимся в CFI дикого типа, например, как показано на ФИГ. 1. Таким образом, базовая молекула CFI может представлять собой CFI дикого типа любого биологического вида или базовая молекула CFI может содержать только части CFI дикого типа, имеющего только некоторые домены CFI дикого типа любого биологического вида (например, уже варианта CFI). В некоторых вариантах осуществления базовая молекула CFI представляет собой мышинный CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления базовая молекула CFI представляет собой

человеческий CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления базовая молекула CFI представляет собой CFI дикого типа примата, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления базовая молекула CFI содержит только некоторые домены человеческого CFI дикого типа.

[0031] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, предложенные в настоящем документе, модулируют активность системы комплемента и имеют по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа. Такие улучшенные характеристики включают в себя, без ограничений, увеличение или уменьшение любого одного или более из биодоступности, периода полужизни, активности, эффективности, каталитической способности, аффинности к кофактору (например, аффинности к фактору H и/или CR1), специфичности к субстрату и аффинности к субстрату (например, аффинности к C3b и/или C4b). В некоторых вариантах осуществления улучшенная характеристика представляет собой увеличенный период полужизни. В некоторых вариантах осуществления улучшенная характеристика представляет собой увеличение активности, описанное более подробно в следующих ниже разделах. В других вариантах осуществления улучшенная характеристика представляет собой изменение субстратной специфичности к C3b и/или C4b, что обеспечивает возможность настройки варианта CFI.

[0032] В таблице 1 представлены примеры базовых молекул, которые могут применяться для получения вариантов CFI. Базовые молекулы, предложенные в настоящем документе, могут быть пригодны для модуляции системы комплемента без дополнительной модификации или могут быть пригодны для модуляции системы комплемента с дополнительной модификацией. Например, любая из базовых молекул, представленных в таблице 1, может быть дополнительно модифицирована для включения одной или более модификаций, таких как делеция одного или более аминокислотных остатков, делеция одного или более доменов CFI, замена одного или более аминокислотных остатков или добавление одного или более аминокислотных остатков или доменов CFI. Базовые молекулы из таблицы 1 могут быть дополнительной частью слитного конструкта, дополнительно описанного ниже.

Таблица 1. Базовые молекулы для получения вариантов CFI

Описание базовой молекулы CFI	Номенклатура базовой молекулы	Аминокислотная последовательность
Полученный из плазмы человеческий CFI дикого типа (wt-hCFI) (с подчеркнутой сигнальной последовательностью)	CFI-PD	<u>MKLLHVFLFLCFHLRFCKVTYTS</u> QEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVF CQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKN GTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECL HPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKH GNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICK SSWSMREANVACLDLGFQQGADT QRRFKLSDLSINSTECLHVHCRGLE TSLAECTFTKRRRTMGYQDFADV VVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYIS QMKACDGINDCGDQSDDELCKAC QKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEV DCITGEDEVGCAGFASVTQEETEIL TADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKN RMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQ VAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHP DLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQ NDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIP ACVPWSPYLFQPNDTCIVSGWGRE KDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFY GNRFYEKEMECAGTYDGSIDACK GDSGGPLVCMDANNVTYVWGVV SWGGENCGKPEFPGVYTKVANYFD WISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 1)
wt-hCFI, без сигнальной последовательности	hCFI	KVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHL SCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPY QCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQ KSLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKF SVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDK TMFICKSSWSMREANVACLDLGF QQGADTQRRFKLSDLSINSTECLH VHCRGLETSLAECTFTKRRRTMGY QDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC VNGKYISQMKACDGINDCGDQSD ELCKACQKGFHCKSGVCIPSQY QCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVT QEETEILTADMDAERRRIKSLLPKL SCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQL GDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGG CWILTAHCLRASKTHRYQIWTTV VDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENY NAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDC

Описание базовой молекулы CFI	Номенклатура базовой молекулы	Аминокислотная последовательность
		ELPRSIPACVPWSPYLFQPNDTCIV SGWGREKDNERVFSLQWGEVKLI SNCSKIFYGNRFYEKEMECAGTYD GSIDACKGDSGGPLVCMDANNVT YVWGVVSWGGENCGKPEFPGVYT KVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 5)
Δ(K1-P305), делеция А-цепи wt-hCFI	ΔА-цепь (CFI-SPD)	KLSCGVKNRMHIRRKIVGGKRA QLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYI GGCWILTAHCLRASKTHRYQIW TTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFH ENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNK KDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDT CIVSGWGREKDNERVFSLQWGEV KLISNCSKIFYGNRFYEKEMECAGT YDGSIDACKGDSGGPLVCMDANN VTYVWGVVSWGGENCGKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYN V (SEQ ID NO: 12)
Мышиный CFI дикого типа (https://www.uniprot.org/uniprot/Q61129)	Мышиный CFI (mCFI)	MKLAHLSLFLALHLSSSRSPSASD LPQEELVDQKCLLQKYTHRSCNK VFCQPWQRCIEGTCICKLPYQCPR AGTPVCAMNGRSYPTYCHQKSFE CLHPEIKFSHNGTCAAEGKFNVSLI YGRKTEGLVQVKLVDQDERMFI CKNSWSMAEANVACVDLGFPLGV RDIQGSFNISGNLHINDTECLHVHC RGVETSLAEC AFTKRRELSNGLA GVVCYKQDADFPTLSFQCVNGK HIPQEKACNGVNDCGDQSDDELCC KGCRCNASLCKSGVCIPDQYKCN GEVDCITGEDESRCEEDRQQNIPK GLARSAQGEAEIETEEMLTTPGM DNERKRIKSLLPKLSCGVKRNTHT RRKRVIGGKPANVGDYPWQVAIK DGQRITCGGIYIGGCWILTAHCV RPSRAHSYQVWTALLDWLKPNSQ LGIQTVKRVIVHEKYNGATFQNDI ALIEMKMHTGKKECELPNSVPAC VPWSPYLFQPNDRCIISGWGRGKD NQKVYSLRWGEVDLIGNCSQFYF DRYYEKEMQCAGTRDGSIDACKG DSGGPLVCEDINNVTYVWGIVSW GENCGKPEFPGVYTRVANYFDWIS

Описание базовой молекулы CFI	Номенклатура базовой молекулы	Аминокислотная последовательность
		YHVGRSLVSQHNV (SEQ ID NO: 23)
wt-hCFI + GSSGG (линкер) + wt-hCFI	Слитный белок hCFI-hCFI	KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHL SCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPY QCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQ KSLECLHPGKFLNNGTCTAEGKF SVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDK TMFICKSSWSMREANVACLDLGF QQGADTQRRFKLSDLSINSTECLH VHCRGLETSLAECTFTKRRTMGY QDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC VNGKYISQMKACDGINDCGDQSD ELCCKACQGKGFHCKSGVCIPSQY QCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVT QEETEILTADMDAERRRIKSLLPKL SCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQL GDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGG CWILTAAHCLRASKTHRYQIWTTV VDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENY NAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDC ELPRSIPACVPWSPYLFQPNDTCIV SGWGREKDNERVFSLQWGEVKLI SNCSEFYGNRFYEKEMECAGTYD GSIDACKGDSGGPLVCM DANNVT YVWGVVSWG ENCGKPEFPGVYT KVANYFDWISYHVGRPFISQYNVG SSGGKVTYTSQEDLVEKKCLAKK YTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVC KLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTY CQQKSLECLHPGKFLNNGTCTAE GKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVD QDKTMFICKSSWSMREANVACLD LGFQQGADTQRRFKLSDLSINSTE CLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTM GYQDFADVVCYTQKADSPMDDFF QCVNGKYISQMKACDGINDCGDQ SDELCCKACQGKGFHCKSGVCIPS QYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFA SVTQEETEILTADMDAERRRIKSL PKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRA QLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYI GGCWILTAAHCLRASKTHRYQIW TTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFH ENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNK KDC ELPRSIPACVPWSPYLFQPNDT

Описание базовой молекулы CFI	Номенклатура базовой молекулы	Аминокислотная последовательность
		CIVSGWGREKDNERVFSLQWGEV KLISNCSKFGNRFYEKEMECAGT YDGSIDACKGDSGGPLVCM DANN VTYVWGVVSWGENCGKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYN V (SEQ ID NO: 16)

[0033] В некоторых вариантах осуществления сама базовая молекула может представлять собой вариант CFI, например в некоторых вариантах осуществления вариант CFI, содержащий только домен сериновой протеазы (CFI-SPD), сам по себе является вариантом CFI. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI получены из любой базовой молекулы из таблицы 1 и содержат модификации петель, соответствующих петлям немодифицированного CFI. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI получены из любой базовой молекулы из таблицы 1 и содержат мутации по типу замены. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI получены из любой базовой молекулы из таблицы 1 и содержат делецию одного или более доменов CFI. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI получены из любой базовой молекулы из таблицы 1 и содержат инверсию А-цепи и В-цепи CFI.

[0034] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI, причем по меньшей мере один домен CFI соответствует домену CFI дикого типа любого биологического вида. Например, аминокислотная последовательность по меньшей мере одного домена CFI может содержать аминокислотную последовательность, полученную из человеческого CFI дикого типа, как указано в SEQ ID NO: 5. Варианты CFI, предложенные в настоящем документе, содержащие аминокислотную последовательность, полученную из SEQ ID NO: 5, могут содержать одну или более модификаций в отношении последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5. Например, одна или более модификаций могут включать в себя делецию одного или более аминокислотных остатков, мутации по типу замены одного или более аминокислотных остатков, добавление одного или более аминокислотных остатков, делецию одного или более

доменов CFI, замену одного или более доменов CFI или добавление одного или более доменов CFI.

[0035] В некоторых вариантах осуществления, приведенных в настоящем документе, предложены варианты CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI любого вида, причем по меньшей мере один домен CFI включает в себя любой один или более доменов CFI, выбранных из: домена сериновой протеазы (SPD), домена мембраноатакующего комплекса фактора I (FIMAC), богатого цистеином домена скэвенджер-рецептора (SRCR), домена рецептора 1 липопротеина низкой плотности (LDLr1) и домена рецептора 2 липопротеина низкой плотности (LDLr2). В некоторых вариантах осуществления любой один или более доменов CFI представляет собой домен человеческого CFI. В некоторых вариантах осуществления любой один или более домен CFI содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

[0036] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI включают в себя все домены CFI дикого типа, т. е. каждый из SPD, домена FIMAC, домена SRCR, домена LDLr1 и домена LDLr2, и содержат модификацию в любом одном или более из этих доменов по отношению к CFI дикого типа.

[0037] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI не содержат всех доменов, соответствующих доменам CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI содержат SPD. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI содержат только SPD, причем А-цепь CFI была удалена; они называются в настоящем документе «CFI-SPD». В некоторых вариантах осуществления CFI-SPD содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 (как показано в таблице 1), которая представляет собой SPD из человеческого CFI. В некоторых вариантах осуществления CFI-SPD не содержит дополнительных модификаций по сравнению с SPD из CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFI-SPD содержит одну или более модификаций по сравнению с SPD из CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFI-SPD содержит по меньшей мере одну модификацию относительно аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

[0038] Примеры вариантов CFI более подробно описаны ниже. Примеры вариантов CFI содержат одну или более замен аминокислотных остатков по отношению к CFI, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

Например, вариант CFI, который включает в себя замены в положениях S499 и I500, будет иметь замены в положениях S499 и I500 в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

Примеры вариантов CFI

[0039] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие по меньшей мере одну модификацию по отношению к CFI дикого типа или состоящие из нее, причем вариант CFI способен усиливать ингибирование системы комплемента, и при этом вариант CFI имеет по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа. В число примеров улучшенных характеристик входят, без ограничений, увеличение периода полужизни, повышение биодоступности или увеличение или уменьшение любой одной или более из активности, субстратной специфичности, потенции, аффинности к субстрату, аффинности к кофактору и каталитической способности. В примерах осуществления улучшенная характеристика представляет собой увеличенный период полужизни. В других примерах осуществления улучшенная характеристика представляет собой повышенную или измененную субстратную специфичность.

[0040] Без ограничений, настоящее описание предусматривает примеры вариантов CFI, описанные в таблице 3. Варианты из таблицы 3 включают в себя модифицированные CFI, а также слитные конструкции CFI, описанные в настоящем документе. Во избежание сомнений, если не указано иное, то номер остатка относится к SEQ ID NO: 5 (человеческий CFI дикого типа) или последовательности, соответствующей ей. Во избежание сомнений, в качестве примера, вариант, описанный как P433A, представляет собой вариант CFI, содержащий замену P433A, например вариант CFI, содержащий замену P433A в SEQ ID NO: 5 (или соответствующей ей последовательности); описанию также относится к варианту CFI, состоящему из замены P433A, например варианту CFI, в котором в SEQ ID NO: 5 имеется замена P433A.

[0041] Варианты CFI согласно описанию приведены отдельно в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию содержит любую одну или более модификаций из представленных в таблице 2 модификаций или состоит из них, причем положения соответствуют положениям в CFI, имеющем аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Номер конструкта ссылается на таблицу 3, представляющую конструкт, в котором присутствует указанный вариант.

[0042] Варианты CFI согласно настоящему описанию могут иметь по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или более модификаций, например замены, делеции, вставки и слияния. Модификация, например, замены, для данного варианта может быть представлена одним из многих способов, известных специалисту в данной области техники. Например, вариант hCFI, имеющий замены в D395A и E416A, может упоминаться как имеющий замены: «D395A и E416A», «D395A–E416A», «D395A + E416A», «D395A/E416A» или «D395A; E416A», и эти названия используются в настоящем документе взаимозаменяемо. В некоторых случаях вариант CFI, имеющий замены в D395A и E416A, может называться «hCFI; D395A; E416A» или «вариант CFI (D395A; E416A)». Как описано в настоящем документе, варианты с другими модификациями, такими как делеции, или комбинациями модификаций, таких как делеции, слияния и замены, могут соответствовать сходным стилям номенклатуры.

[0043] В таблице 3 приведены примеры вариантов CFI согласно описанию, каждый из которых представлен уникальным номером конструкта (сокращенно «№ констр.» в таблице 3). Эта и другие таблицы, описывающие варианты, могут включать в себя следующие символы и сокращения и связанные с ними значения: HSA — человеческий сывороточный альбумин; CFI — фактор I комплемента; Δ — делеция указанного аминокислотного диапазона; → или > — делеция указанной последовательности и замена указанными аминокислотами; Cr1 — слияние CR1; Fh — слияние FH; G(#) обозначает линкер глицинов, повторенный указанное количество раз; (GGSS)ⁿ обозначает линкер GGSS, повторенный n раз (SEQ ID NO: 26); (GGSS)ⁿGG обозначает линкер GGSS, повторенный n раз, за которым следует GG (SEQ ID NO: 27).

[0044] ФИГ. 7 соответствует макету таблицы 3 и изображает схематическое представление примера слитного конструкта CFI, в котором «сердцевинный» домен содержит любую одну или более аминокислотных модификаций согласно описанию и может быть фланкирован одним или более доменами на одном или обоих N- и C-концах. Показанные домены могут быть необязательно соединены линкерами.

Таблица 2. Варианты CFI

№ констр. в табли- це 3	Сердцевина
1	hCFI; F559W
2	hCFI; F559H
3	hCFI; L307F
4	hCFI; L307H
5	hCFI; L307W
6	hCFI; L307Y
7	hCFI; P433A
8	hCFI; P433G
9	hCFI; P433F
10	hCFI; Δ(Y496)
11	hCFI; Δ(D497)
12	hCFI; Δ(Y496; D497)
13	hCFI; S499G
14	hCFI; S499A
15	hCFI; S499K
16	hCFI; S499V
17	hCFI; Y496L
18	hCFI; S499G; I500K
19	hCFI; S499A; I500K
20	hCFI; T495F; Y496L; S499G; I500K
21	hCFI; K423R
22	hCFI; R62A
23	hCFI; R62E
24	hCFI; R62L
25	hCFI; R62H
26	hCFI; E401K
27	hCFI; E401R
28	hCFI; E401A
29	hCFI; E401F
30	hCFI; N402G
31	hCFI; N402K
32	hCFI; N402R
33	hCFI; H554F
34	hCFI; H554K
35	hCFI; R371E
36	hCFI; A342R
37	hCFI; K51R; N52A; A55P; T59M; R61G; F64Y
38	hCFI; N52A
39	hCFI; A55P

№ констр. в табли- це 3	Сердцевина
40	hCFI; T59E
41	hCFI; L73F
42	hCFI; L73D
43	hCFI; Δ(275- CAGFASVAQE-284) (SEQ ID NO: 31) > CEEDRQQNIPKGLARSA QGEAEIETE (SEQ ID NO: 32)
44	hCFI; Δ(275- CAGFASVAQE-284) (SEQ ID NO: 31) > CEEDRQQNIPKGLARSA QGEAEIETE (SEQ ID NO: 32) + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CR1(ccp15–17)
45	hCFI; R484A
46	hCFI; R484K
47	hCFI; R484E
48	hCFI; Δ(V565) > VG
49	hCFI; Δ(V565) > VY
50	hCFI; E416K
51	hCFI; E416R
52	hCFI; D395A
53	hCFI; D395G
54	hCFI; D395K
55	hCFI; D395R
56	hCFI; D395A; D425A
57	hCFI; D395A; E416A
58	hCFI; D395A; E416A; D425A
59	hCFI; N402D
60	hCFI; K368D
76	hCFI; H383K; D385N; K387S; R388Q; E392Q; Y393T; D395K; K419M; D420H; G421T; N422G; D425E
77	hCFI; H383K; R388Q; E392Q; Y393T; K419M
78	hCFI; K51D; T59E; R61D

№ констр. в табли- це 3	Сердцевина
79	hCFI; Q69H; L73F; G79E; T80I; L83S; N84H
80	hCFI; Δ(1-KVTYTS-6) (SEQ ID NO: 35) > RSPSASDLP (SEQ ID NO: 36)
81	hCFI; M186E; G187L; Y188S; Q189N; D190G; F191L; D193G

№ констр. в табли- це 3	Сердцевина
89	hCFI; T377G; E457G; N531G
90	hCFI; T377G; E457G; N531G
91	hCFI; T377A; E457G; N531G
92	hCFI; N422A
93	hCFI; T377A
95	hCFI

Настройка активности и специфичности

[0045] Активность и специфичность вариантов CFI, предложенных в настоящем документе, могут быть настроены (скорректированы) для конкретных применений и терапевтических показаний. Например, активность и специфичность могут быть настроены путем отбора деструкторов C3b, или деструкторов C4b, или деструкторов как C3b, так и C4b. В настоящем документе «протеазная активность» в отношении субстрата относится к способности варианта CFI согласно описанию расщеплять свои субстраты, C4b и C3b. Она может быть выражена несколькими способами, например в виде увеличения активности деструктора C4b, протеазной активности по отношению к C4b, активности деструктора C3b, протеазной активности по отношению к C3b, выхода продуктов расщепления и т. п.

[0046] В настоящем документе деструктор C3b представляет собой вариант CFI, способный расщеплять C3b; аналогичным образом, деструктор C4b представляет собой вариант CFI, который способен расщеплять C4b. Использование термина «деструктор C3b» не означает, что он не разрушает C4b. Вариант CFI может быть как деструктором C3b, так и деструктором C4b, и может, но не обязательно, проявлять большую специфичность к одному, чем к другому.

[0047] Варианты CFI, предложенные в настоящем документе, имеют модифицированные характеристики, которые включают в себя увеличение или уменьшение протеазной

активности в отношении субстрата, а также увеличение или уменьшение специфичности к субстрату.

[0048] В настоящем документе и как продемонстрировано в приведенных в настоящем документе примерах, «специфичность к субстрату», также называемая «субстратной специфичностью», относится к избирательности по отношению к одному субстрату по сравнению с другим, которую демонстрирует вариант CFI. Если субстратная специфичность варианта CFI составляет примерно 1, то специфичность как к C4b, так и к C3b одинакова относительно активности CFI дикого типа. Если специфичность варианта CFI в 2 раза выше к C4b, то считается, что он демонстрирует повышенную специфичность расщепления для C4b по сравнению с C3b. Повышение протеазной активности для одного субстрата в несколько раз по сравнению с другим субстратом является примером увеличения специфичности к этому субстрату.

[0049] В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации (например, замены) либо увеличивают активность, либо придают специфичность, либо и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления повышение активности деструктора C4b включает в себя увеличение расщепления C4b (и образование продукта расщепления, такого как C4c), а повышение специфичности по отношению к C4b включает в себя увеличение расщепления C4b и уменьшение расщепления C3b (и образование продукта расщепления, такого как iC3b). Как правило, сравнение проводят по отношению к CFI дикого типа или слитному конструкту, содержащему CFI дикого типа.

[0050] В некоторых вариантах осуществления комбинация двух или более модификаций (например, замен) может давать неожиданные повышения активности, которые являются синергетическими или аддитивными.

[0051] В некоторых вариантах осуществления комбинация одной или более модификаций может давать неожиданные повышения или снижения активности, которые являются синергетическими, когда C4b представляет собой субстрат, и аддитивными или менее чем аддитивными, когда C3b представляет собой субстрат.

[0052] В некоторых вариантах осуществления комбинация одной или более модификаций может давать неожиданные повышения или снижения активности, которые являются

синергетическими, когда C3b представляет собой субстрат, и аддитивными или менее чем аддитивными, когда C4b представляет собой субстрат.

[0053] В некоторых вариантах осуществления модифицированная характеристика может быть достигнута посредством выбора (например, настройки) одной или более модификаций, которые придают повышенную активность в качестве деструктора C3b и снижают активность в качестве деструктора C4b (повышение субстратной специфичности к C3b), или альтернативно придают повышенную активность в качестве деструктора C4b и снижают активность в качестве деструктора C3b (повышение субстратной специфичности к C4b), или альтернативно обеспечивают повышенную активность в качестве деструкторов как C3b, так и C4b (без изменения специфичности, но с увеличением активности в отношении обоих субстратов).

[0054] В некоторых вариантах осуществления модифицированная характеристика может быть достигнута посредством выбора одной или более модификаций, которые придают повышенную активность в качестве деструктора C3b и не изменяют активность в качестве деструктора C4b (повышение субстратной специфичности к C3b) или альтернативно придают повышенную активность в качестве деструктора C4b и не изменяют активность в качестве деструктора C3b (повышение субстратной специфичности к C4b).

[0055] В некоторых вариантах осуществления модифицированная характеристика может быть достигнута посредством выбора одной или более модификаций, которые придают пониженную активность в качестве деструктора C3b и не изменяют активность в качестве деструктора C4b (повышение субстратной специфичности к C4b) или альтернативно придают пониженную активность в качестве деструктора C4b и не изменяют активность в качестве деструктора C3b (повышение субстратной специфичности к C3b).

[0056] Модификации, обеспечивающие повышенную активность и специфичность, обычно концентрируются в структурных областях, критичных для функционирования CFI, но не ограничиваются ими. Примерами структурных областей, где модификации (например, замены), которые могут привести по меньшей мере к одной улучшенной характеристике, являются С-концевое удлинение, область контакта А:В, поверхность, представляющая область контакта с кофакторами и модификациями (например, замены)

на активном сайте SPD, включая поверхностные петли, которые обеспечивают область контакта с субстратами C3b и C4b и кофакторами CR1 и FH (см. ФИГ. 1).

[0057] Без привязки к какой-либо конкретной теории или механизму в настоящем документе предложены варианты CFI, имеющие одну или более комбинаций любых из аминокислотных модификаций, подробно описанных ниже, причем варианты CFI имеют по меньшей мере одну улучшенную характеристику. Варианты CFI с комбинированными модификациями (например, заменами) содержат две или более модификаций в одной или более областях CFI, выбранных, без ограничений, из структурных областей С-концевого удлинения, области контакта А:В, области контакта с кофакторами и активным сайтом, включая поверхностные петли, которые обеспечивают область контакта с кофакторами и субстратами C3b или C4b.

[0058] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, содержащие две или более замен, демонстрируют изменения активности, субстратной специфичности или и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя увеличение расщепления C4b и/или образование C4с, а специфичность включает в себя ограниченное увеличение или уменьшение расщепления C3b и/или образование iC3b по сравнению с CFI дикого типа (или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления комбинация двух или более замен обеспечивает неожиданное повышение активности, которая является синергетической, когда C4b представляет собой субстрат, и аддитивной или менее аддитивной, когда C3b представляет собой субстрат.

[0059] В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены либо повышают активность, либо придают специфичность, либо и то, и другое, и могут переключаться между селективностью по C3b и селективностью по C4b. В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя увеличение расщепления C4b и/или образование C4с, а селективность включает в себя уменьшение расщепления C3b и/или образование iC3b по сравнению с CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и/или образование iC3b, а специфичность включает в себя уменьшение расщепления C4b и/или образование C4с по сравнению с CFI дикого типа. В некоторых вариантах

осуществления природа аминокислотной замены определяет, проявляет ли вариант CFI характеристики специфичности к C3b или специфичности к C4b.

[0060] Примеры вариантов согласно описанию проверяют на различия в активности и на различия в специфичности. Примеры данных приведены в таблице 7.2.

[0061] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет повышенную активность, причем повышение активности включает в себя повышение активности в качестве деструктора C3b вариантом CFI согласно описанию (с сопутствующим увеличением продукта расщепления C3b). В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет повышение активности в качестве деструктора C3b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления это повышение активности в качестве деструктора C3b сопровождается также повышением активности в качестве деструктора C4b. В некоторых вариантах осуществления это повышение активности в качестве

деструктора C3b не сопровождается также повышением активности в качестве деструктора C4b и может даже наблюдаться снижение активности в качестве деструктора C4b.

[0062] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет повышенную активность, причем повышение активности включает в себя повышение активности в качестве деструктора C4b вариантом CFI согласно описанию (с сопутствующим увеличением продукта расщепления C4b). В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет повышение активности в качестве деструктора C4b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления это повышение активности в качестве деструктора C4b сопровождается также повышением активности в качестве деструктора C3b. В некоторых вариантах осуществления это повышение активности в качестве деструктора C4b не сопровождается также повышением активности в качестве

деструктора C3b и может даже наблюдаться снижение активности в качестве деструктора C3b.

[0063] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет повышенную активность, причем повышение активности включает в себя повышение активности в качестве деструктора как C3b, так и C4b. В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет повышенную активность в качестве деструктора как C3b, так и C4b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21. Повышение активности в качестве деструктора одного субстрата может быть одинаковым, но это не обязательно.

[0064] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет повышенную специфичность к субстрату, причем специфичность повышается к C3b (по сравнению с C4b). В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет повышенную специфичность к C3b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей

мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21.

[0065] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет повышенную специфичность к субстрату, причем специфичность повышается к C4b (по сравнению с C3b). В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет повышенную специфичность к C4b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по

меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21, который имеет примерно равную специфичность как к C3b, так и к C4b.

[0066] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет пониженную специфичность к субстрату, причем специфичность понижается к C3b (по сравнению с C4b). В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет пониженную специфичность к C3b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по

меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21, который имеет примерно равную специфичность как к С3b, так и к С4b.

[0067] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI проявляет пониженную специфичность к субстрату, причем специфичность понижается к С4b (по сравнению с С3b). В некоторых вариантах осуществления вариант CFI согласно описанию проявляет пониженную специфичность к С4b по меньшей мере или примерно в 1,5 раза, по меньшей мере или примерно в 2 раза, по меньшей мере или примерно в 3 раза, по меньшей мере или примерно в 4 раза, по меньшей мере или примерно в 5 раз, по меньшей мере или примерно в 6 раз, по меньшей мере или примерно в 7 раз, по меньшей мере или примерно в 8 раз, по меньшей мере или примерно в 9 раз, по меньшей мере или примерно в 10 раз, по меньшей мере или примерно в 15 раз, по меньшей мере или примерно в 20 раз, по меньшей мере или примерно в 25 раз, по меньшей мере или примерно в 30 раз, по меньшей мере или примерно в 40 раз, по меньшей мере или примерно в 50 раз, по меньшей мере или примерно в 75 раз, по меньшей мере или примерно в 100 раз, по меньшей мере или примерно в 150 раз, по меньшей мере или примерно в 200 раз, по меньшей мере или примерно в 250 раз, по меньшей мере или примерно в 300 раз, по меньшей мере или примерно в 350 раз, по меньшей мере или примерно в 400 раз, по меньшей мере или примерно в 450 раз, по меньшей мере или примерно в 500 раз, по меньшей мере или примерно в 550 раз, по меньшей мере или примерно в 600 раз, по меньшей мере или примерно в 650 раз, по меньшей мере или примерно в 700 раз, по меньшей мере или примерно в 750 раз, по меньшей мере или примерно в 800 раз, по меньшей мере или примерно в 850 раз, по меньшей мере или примерно в 900 раз, по меньшей мере или примерно в 950 раз или даже по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа или слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21, который имеет примерно равную специфичность как к С3b, так и к С4b.

[0068] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI имеет повышенную активность, причем повышенная активность включает в себя увеличенное расщепление

C4b и/или повышенную специфичность к C4b по сравнению с C3b. В некоторых вариантах осуществления вариант CFI, имеющий увеличение расщепления C4b, содержит одну или более замен в положениях аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта A:B в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта кофактора в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области С-концевого удлинения в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах С-концевого удлинения; области контакта C4b в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта C4b в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах активного сайта; области контакта C4b в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в петле автолиза; область контакта кофактора в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах активного сайта; область входной рамки S1 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области входной рамки S1 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Эти различия имеются по сравнению с CFI дикого типа (или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21), причем положения соответствуют положениям в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0069] В некоторых вариантах осуществления улучшенная характеристика представляет собой повышение активности, причем повышение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и/или C4b. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, предложенные в настоящем документе, представляют собой деструкторы C3b, называемые так из-за способности вариантов CFI увеличивать расщепление C3b. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, предложенные в настоящем документе, представляют собой деструкторы C4b, называемые так из-за способности вариантов CFI увеличивать расщепление C4b. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, предложенные в настоящем документе, представляют собой деструкторы C3b и C4b, называемые так из-за способности вариантов CFI увеличивать расщепление как C3b, так и C4b.

[0070] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI имеет повышенную активность, причем повышенная активность включает в себя увеличенное расщепление C3b и C4b. В некоторых вариантах осуществления вариант CFI, имеющий увеличение расщепления C3b и C4b, содержит одну или более замен в положениях аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта субстрата в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение в области контакта субстрата представляет собой E401. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах активного сайта; область контакта субстрата в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта кофактора в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области С-концевого удлинения в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в петле автолиза; область контакта кофактора в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах

осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах активного сайта; область входной рамки S1 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Эти различия имеются по сравнению с CFI дикого типа (или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21), причем положения соответствуют положениям в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0071] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI имеет повышенную активность, причем повышение активности включает в себя увеличение расщепления C3b вариантом CFI согласно описанию и не включает в себя или минимально включает в себя увеличение расщепления C4b. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах активного сайта; области контакта C3b в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта кофактора в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области С-концевого удлинения в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Эти различия имеются по сравнению с CFI дикого типа (или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21), причем положения соответствуют положениям в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0072] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI имеет повышенную активность, причем повышение активности включает в себя увеличение расщепления C4b вариантом CFI согласно описанию и не включает в себя или минимально включает в себя увеличение расщепления C3b. В некоторых вариантах осуществления вариант CFI, имеющий увеличение расщепления C4b и не включающий в себя или минимально включающий в себя увеличение расщепления C3b, содержит одну или более замен в положениях аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта A:B в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области контакта кофактора в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области входной рамки S1 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в пределах С-концевого удлинения; области контакта C4b в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления положение аминокислоты представляет собой положение в области С-концевого удлинения в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Эти различия имеются по сравнению с CFI дикого типа (или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа, например SEQ ID NO: 21), причем положения соответствуют положениям в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0073] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI согласно описанию, которые представляют собой специфические деструкторы C3b, пригодны для лечения заболеваний.

[0074] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI согласно описанию, которые представляют собой специфические деструкторы C4b, пригодны для лечения заболеваний.

[0075] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI согласно описанию, которые являются как деструкторами C4b, так и деструкторами C3b и демонстрируют улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа (например, повышенную активность в отношении как C4b, так и C3b), пригодны для лечения заболеваний.

[0076] Например, заболевания, которые можно лечить с использованием деструкторов C4b, включают в себя, без ограничений, неофтальмологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание. В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание, выбранное из группы, состоящей из следующего: болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), ассоциированный с антинейтрофильным

цитоплазматическим антителом (ANCA) васкулит, антифосфолипидный синдром, астма, атеросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), аутоиммунная гемолитическая анемия, буллезный пемфигоид (BP), С3-гломерулопатия, хроническая почечная недостаточность, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), холодовая агглютининовая болезнь (CAD), болезнь Крона, диабетическая нейропатия, генерализованная миастения гравис (gMG), гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Гийена — Барре (GBS), наследственный ангионевротический отек (HAE), гнойный гидраденит (HS), IgA-нефропатия (IgAN), волчаночный нефрит (LN), мембранозный гломерулонефрит (MN), микроскопический полиангиит (MPA), мотонейронная болезнь, мультифокальная моторная нейропатия (MMN), рассеянный склероз (MS), инсулинонезависимый диабет, остеоартрит, панкреатит, болезнь Паркинсона, ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH), посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, энтеропатия с белковой дистрофией, псориаз, гангренозная пиодермия, ревматоидный артрит, шизофрения (SZ), системная красная волчанка (СКВ), иммунная тромбоцитопения (ITP), аутоиммунная гемолитическая анемия с тепловыми антителами (wAIHA), иммунокомплексный мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (IC-MPGN) и язвенный колит, миастенический синдром Ламперта — Итона (LEMS), синдром CHAPLE (дефицит CD55), тромботическая микроангиография (ТМА) и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), болезнь Хантингтона и ишемические реперфузионные повреждения.

[0077] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, предложенные в настоящем документе, являются деструкторами как C3b, так и C4b и используются для лечения заболеваний.

[0078] В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя увеличение образования C3dg и/или C3c из iC3b. Примеры вариантов, которые демонстрируют такие улучшенные характеристики, представлены в таблице 3 и описаны в примерах.

[0079] В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя снижение уровней α -цепи C3b. Примеры вариантов, которые демонстрируют такие улучшенные характеристики, представлены в таблице 3 и описаны в примерах.

[0080] В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя гидролиз пептидного субстрата или протеолиз макромолекулярного белкового субстрата. В некоторых вариантах осуществления макромолекулярный белковый субстрат представляет собой C3b. В некоторых вариантах осуществления макромолекулярный белковый субстрат представляет собой C4b. В некоторых вариантах осуществления пептидный субстрат представляет собой хромогенный субстрат, например, такие пептидные субстраты используются в формате анализа. Примеры вариантов, которые демонстрируют такие улучшенные характеристики, представлены в таблице 3 и описаны в примерах.

[0081] В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя снижение уровней или функции мембраноатакующего комплекса (МАС). В некоторых вариантах осуществления снижение или даже ингибирование гемолиза коррелирует со снижением уровней МАС, и, соответственно, в некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя снижение (частичное или полное) наблюдаемого гемолиза.

[0082] В некоторых вариантах осуществления повышение активности включает в себя снижение амплификации системы комплемента для продукции C3b. Примеры вариантов, которые демонстрируют такие улучшенные характеристики, представлены в таблице 3 и описаны в примерах.

[0083] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI являются сиалированными. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI дополнительно сиалированы по сравнению с CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI сиалируют способами *in vitro* посттрансляционно.

[0084] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI представляют собой активированные варианты (т. е. в активной двухцепочечной форме). В некоторых вариантах осуществления варианты CFI активируют фурином (термин «фурин» включает в себя варианты фурина). В некоторых вариантах осуществления варианты CFI активируют фурином во время продукции в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления активация фурином во время продукции в клетке-хозяине достигается за счет сверхэкспрессии фурина, например посредством стабильной или временной

трансфекции. В некоторых вариантах осуществления вариант CFI активируют фурином после продукции и секреции клеткой-хозяином, т. е. посттрансляционно.

[0085] Ссылки на модификации, такие как замеры, в последующих разделах являются модификациями в отношении аминокислотной последовательности CFI человека в соответствии с SEQ ID NO: 5. Однако следует понимать, что модификации также могут быть внесены в соответствующие аминокислотные остатки любого вида, не являющегося человеком.

Варианты CFI области контакта цепей A:B

[0086] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие одну или более модификаций в области контакта тяжелой и легкой цепей, также называемой областью контакта цепей A:B, и варианты, которые вызывают нарушение области контакта цепей A:B.

[0087] Без привязки к какой-либо конкретной теории или механизму считается, что домен сериновой протеазы (SPD) CFI поддерживается в зимоген-подобном состоянии посредством многочисленных взаимодействий со своей собственной А-цепью. Хотя встречающийся в природе CFI может расщеплять пептидные или белковые субстраты с относительно низкой скоростью, скорость расщепления CFI увеличивается за счет разрушения области контакта цепей A:B.

Варианты C-концевой области

[0088] В комплексе, образованном между CFI и C3b, область C-концевого удлинения расположена в полости между цепями А и В связанной и слегка скрученной молекулы CFI. Это говорит о том, что C-концевое удлинение CFI может быть важной регуляторной областью для активации CFI при связывании с C3b.

Варианты сайта N-связанного гликозилирования

[0089] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI, причем по меньшей мере один домен CFI содержит одну или более модификаций в сайте N-связанного гликозилирования CFI.

[0090] В некоторых вариантах осуществления модификация в сайте N-связанного гликозилирования представляет собой удаление одного или более сайтов N-связанного гликозилирования CFI.

Варианты домена сериновой протеазы

[0091] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI или состоящие из него, причем по меньшей мере один домен CFI представляет собой домен сериновой протеазы (SPD) CFI, и при этом вариант CFI содержит одну или более модификаций в SPD.

[0092] В кристаллической структуре свободного CFI расщепление петли активации не приводило к вставке вновь образованного N-конца (He322), что является следующим этапом в классической активации сериновых протеаз. Вместо этого кристаллическая структура предполагает, что С-концевая область расщепленной петли активации остается в плотно изогнутой петлевой структуре на поверхности CFI в той же области, в которой осталась бы нерасщепленная петля активации. Это предотвращает вставку в карман активации и, таким образом, созревание активного сайта (называемое классической активацией сериновой протеазы посредством индуцированных конформационных перестроек). При протеолитической активации SPD фактора CFI новый N-конец петли активации обычно высвобождается и вставляется в карман активации таким образом, что расщепленная петля активации вызывает полную активацию CFI в растворе. Таким образом, мутации в С-концевой области петли активации не должны влиять на расщепление фурином, так как область находится за пределами 3'-положений относительно расщепляющейся связи.

[0093] Соответственно, в настоящем документе предложены варианты CFI домена SPD. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, содержащие одну или более модификаций в областях SPD фактора CFI (ФИГ. 1), могут содержать одну или более модификаций в любой одной или более из петли активации (остатки 322–326 последовательности с SEQ ID NO: 5), 37-петли (остатки 342–344 последовательности с SEQ ID NO: 5), 60-петли (остатки 366–372 последовательности с SEQ ID NO: 5), 70-петли (остатки 377–389 последовательности с SEQ ID NO: 5), 99-петли (остатки 403–410 последовательности с SEQ ID NO: 5), 110-петли (остатки 418–426 последовательности с

SEQ ID NO: 5), 150-петли автолиза (остатки 455–463 последовательности с SEQ ID NO: 5), оксианион-стабилизирующей 180-петли (остатки 494–509 последовательности с SEQ ID NO: 5) и/или 220-петли входной рамки S1 (остатки 529–536 последовательности с SEQ ID NO: 5). В частности, в настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие SPD фактора CFI, и при этом вариант CFI содержит любую одну или более из модификаций, приведенных в таблице 5. В таблице 5 приведены примеры вариантов CFI, содержащих одну или более из модификаций аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, причем одна или более модификаций находятся в SPD. Базовая молекула для вариантов CFI, приведенных в таблице 5, может представлять собой CFI дикого типа, CFI человека или CFI-SPD, причем SPD соответствует молекуле CFI дикого типа (также называемой Δ (K1-P305) или делецией А-цепи) или CFI, слитого с другим регулятором комплемента, таким как фактор H (FH-CFI) или CR1 (CR1-CFI), которые более подробно описано в настоящем документе со ссылкой на слитные конструкторы.

[0094] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI содержат замену петли автолиза. Петля автолиза сериновых протеаз является частью домена активации и влияет на субстратную специфичность. Трипсин имеет более длинную петлю автолиза, чем CFI, и несколько ключевых остатков уникальны для петель автолиза трипсина и CFI. Различия также могут возникать между петлями автолиза разных видов, например мышей и людей. Петля автолиза CFI мыши может иметь большое количество отличий по сравнению с петлей автолиза CFI человека. Примеры вариантов CFI могут включать в себя вариант CFI, в котором петля автолиза CFI человека заменена петлей трипсина человека или заменена петлей CFI мыши. Такие варианты петли автолиза могут помочь идентифицировать критические остатки, которые влияют на активность расщепления C3b и/или C4b. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены варианты CFI, причем вариант CFI представляет собой химеру, содержащую один или более доменов из CFI человека, и при этом CFI человека дополнительно содержит замену одного или более аминокислотных остатков аминокислотными остатками соответствующей области из CFI вида, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления CFI вида, отличного от человека, представляет собой CFI мыши. В настоящем документе также предложены варианты CFI, причем вариант CFI представляет собой химеру, и при этом модификация включает в себя

замену одного или более аминокислотных остатков CFI аминокислотными остатками из соответствующей области сериновой протеазы, отличной от CFI. В некоторых вариантах осуществления сериновая протеаза, отличная от CFI, представляет собой трипсин.

[0095] Пример варианта CFI петли автолиза включает в себя замену петель автолиза трипсина, представляющую собой замену петли автолиза CFI (REKDNERVFS, SEQ ID NO: 9) петель автолиза трипсина (NTASSGADYPDE, SEQ ID NO: 10), причем петля автолиза находится между положениями, соответствующими положению 456 и положению 465 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0096] Другой пример варианта CFI петли автолиза включает в себя замену петли автолиза CFI мыши, причем ⁴⁵⁶REKDNERVFS⁴⁶⁵ (SEQ ID NO: 9) заменено на RGKDNQKVYS (SEQ ID NO: 11), причем петля автолиза находится между положениями, соответствующими положению 456 и положению 465 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

Варианты активного сайта

[0097] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие одну или более модификаций в активном сайте CFI или состоящие из них. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкции CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI, причем по меньшей мере один домен CFI содержит модификацию аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, при этом модификация находится в активном сайте CFI. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI активного сайта могут улучшать каталитический потенциал CFI. В некоторых вариантах осуществления варианты активного сайта CFI могут улучшать каталитический потенциал CFI посредством улучшения активного сайта (каталитический механизм), не влияя на связывание или специфичность связывания С3b или С4b, в котором преобладают взаимодействия экзосайта и А-цепи.

Варианты CFI инверсии цепей А-В

[0098] В настоящем документе предложены варианты CFI, причем CFI содержит А-цепь и В-цепь и содержит инверсию А-цепи и В-цепи. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI без инверсии цепей (отдельные цепи необязательно содержат одну или более модификаций) содержат структурное расположение от N-конца к С-концу или от С-конца к N-концу в виде (А-цепь)–(необязательный линкер)–(В-цепь). В некоторых вариантах осуществления варианты CFI содержат инверсию А-цепи и В-цепи (отдельные цепи необязательно содержат одну или более модификаций), так что структурное расположение от N-конца к С-концу или от С-конца к N-концу представляет собой (В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь). Необязательные линкеры могут быть любой приемлемой длины, например, состоять из по меньшей мере одной аминокислоты. Линкер может представлять собой гибкий линкер и может представлять собой пептид длиной от примерно 1 до примерно 20 аминокислотных остатков, причем аминокислотные остатки могут включать в себя остатки глицина. Линкер может также необязательно содержать остатки серина. Примеры гибких линкеров могут включать в себя, без ограничений, глициновые полимеры, глицин-сериновые полимеры, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры или любые другие подходящие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Примерами линкеров являются $(GGSS)^n$ (SEQ ID NO: 28), $(GGSSGG)^n$ (SEQ ID NO: 29) и $(GGSS)^n GG$ (SEQ ID NO: 30), где n представляет собой любое число от примерно 1 до примерно 2. Примеры линкеров могут быть длиной 1–50, 5–50, 10–50, 15–50, 20–50, 25–50, 1–20, 2–20, 3–20, 4–20, 5–20, 6–20, 7–20, 8–20, 9–20, 10–20, 3–15, 3–10, 3–9, 3–8, 3–7, 3–6, 3–5, 4–15, 4–10, 4–9, 4–8, 4–7, 4–6, 4–5, 5–15, 5–10, 5–9, 5–8, 5–7, 5–6, 6–15, 6–10, 6–9, 6–8 или 6–7 аминокислот.

[0099] Без привязки к какой-либо конкретной теории или механизму, примеры вариантов CFI, содержащих инверсию А- и В-цепей, могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20. Цепи могут удерживаться вместе необязательными линкерами. Линкеры между А-цепью и В-цепью вариантов инверсии могут быть любой приемлемой длины из по меньшей мере одной аминокислоты. Линкер может быть гибким линкером и может представлять собой пептид длиной от примерно 1 до примерно 10, от 3–11 до примерно 20 или от 1 до примерно 40 аминокислотных остатков, причем аминокислотные остатки могут включать в себя остатки глицина. Линкер может также необязательно содержать остатки серина. Примеры

гибких линкеров могут включать в себя, без ограничений, глициновые полимеры, глицин-сериновые полимеры, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры или любые другие подходящие гибкие линкеры, известные в данной области техники.

Дополнительные варианты CFI, используемые для модуляции и/или оценки системы комплемента

[0100] В некоторых вариантах осуществления предложены варианты CFI, которые, хотя они и приемлемы для модуляции системы комплемента, также могут быть приемлемы для оценки активности системы комплемента, например, могут считаться инструментальными белками, также имеющими терапевтическую ценность.

[0101] Например, эти другие варианты CFI позволяют проводить различные испытания с использованием слитных конструкторов CFI. Примером такого варианта CFI может быть не поддающийся активации вариант для использования в качестве контроля. Другой пример такого варианта CFI может обеспечивать более легкую активацию слитного конструктора.

[0102] В некоторых вариантах осуществления такие дополнительные варианты CFI, предложенные в настоящем документе, содержат модификацию аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные варианты CFI, предложенные в настоящем документе, получены из мышинового CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные варианты CFI, предложенные в настоящем документе, получены из человеческого CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные варианты CFI, предложенные в настоящем документе, дополнительно получены из CFI-SPD.

[0103] Примеры вариантов CFI могут включать в себя не поддающийся активации вариант CFI, который может приносить определенную пользу, например в качестве ложной цели или контроля.

Комбинированные варианты CFI

[0104] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие по меньшей мере одну модификацию по отношению к CFI дикого типа или состоящие из ее. Модификации

происходят в одних и тех же или разных доменах CFI. В некоторых вариантах осуществления модификации включают в себя две или более замены. В некоторых вариантах осуществления модификации включают в себя замену и делецию. В некоторых вариантах осуществления модификации включают в себя замену и добавление. В некоторых вариантах осуществления модификации включают в себя делецию и добавление. В некоторых вариантах осуществления модификации включают в себя замену, делецию и добавление. В настоящем документе такие варианты в совокупности могут называться комбинированными вариантами CFI.

В. Слитные конструкции, содержащие фактор I комплемента

[0105] В настоящем документе предложены слитные конструкции, содержащие по меньшей мере первый компонент (часть CFI), включающий в себя по меньшей мере один домен фактора I комплемента, и по меньшей мере второй компонент, причем первый компонент, и второй, и последующие компоненты являются слитными (например, смежными или разделенными необязательным линкером). Эти слитные конструкции называются в настоящем документе «слитные конструкции CFI» или просто «слитные конструкции». В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит дополнительные компоненты, например третий компонент, четвертый компонент, пятый компонент и т. д. Пример конструкта на ФИГ. 7 показывает два N-концевых компонента, два C-концевых компонента и сердцевинный компонент, т. е. слитный конструкт с по меньшей мере пятью компонентами.

[0106] На ФИГ. 7 показано схематическое представление примера слитного конструкта CFI, в котором «сердцевинный» домен содержит любой один или более из вариантов CFI согласно описанию и может быть фланкирован одним или более доменами (одним или более компонентами) на одном или обоих N- и C-концах. Показанные домены могут быть необязательно соединены линкерами. Например, изображение на ФИГ. 7 представляет собой два N-концевых компонента и два C-концевых компонента, изображающих пятикомпонентный слитный конструкт. Варианты, приведенные в таблице 3, соответствуют этому формату. Примеры сердцевинных доменов CFI первого компонента приведены в таблице 2 и ниже в таблице 3.

Таблица 3. Примеры вариантов и конструктов CFI

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
1			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; F559W				
2			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; F559H				
3			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; L307F				
4			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; L307H				
5			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; L307W				
6			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; L307Y				
7			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; P433A				
8			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; P433G				
9			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; P433F				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
10			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(Y496)				
11			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(D497)				
12			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(Y496; D497)				
13			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; S499G				
14			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; S499A				
15			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; S499K				
16			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; S499V				
17			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Y496L				
18			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; S499G; I500K				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
19			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; S499A; I500K				
20			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; T495F; Y496L; S499G; I500K				
21			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; K423R				
22			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R62A				
23			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R62E				
24			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R62L				
25			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R62H				
26			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; E401K				
27			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; E401R				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
28			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; E401A				
29			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; E401F				
30			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; N402G				
31			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; N402K				
32			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; N402R				
33			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; H554F				
34			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; H554K				
35			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R371E				
36			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; A342R				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
37			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; K51R; N52A; A55P; T59M; R61G; F64Y				
38			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; N52A				
39			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; A55P				
40			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; T59E				
41			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; L73F				
42			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; L73D				
43			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ (275- CAGFAS VAQE- 284) (SEQ ID NO: 31) > CEEDRQ QNIPKGL ARSAQG EAEIETE (SEQ ID NO: 32)				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
44			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(275- CAGFAS VAQE- 284) (SEQ ID NO: 31) > CEEDRQ QNIPKGL ARSAQG EAEIETE (SEQ ID NO: 32) + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CR1(ccp1 5-17)	GGSS GG (SEQ ID NO : 6)	hCR1; CCP15; CCP16; CCP17		
45			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R484A				
46			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R484K				
47			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; R484E				
48			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(V565) > VG				
49			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(V565) > VY				
50			HSA	GGSS GG	hCFI; E416K				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
				(SEQ ID NO: 6)					
51			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; E416R				
52			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395A				
53			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395G				
54			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395K				
55			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395R				
56			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395A; D425A				
57			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395A; E416A				
58			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; D395A; E416A; D425A				
59			HSA	GGSS GG	hCFI; N402D				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
				(SEQ ID NO: 6)					
60			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; K368D				
63			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCR1; CCP15; CCP16; CCP17	GGSS GGSS GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 33)	hFH; CCP1 9; CCP2 0
64			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCR1; CCP8; CCP9; CCP10		
65			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCR1; CCP8; CCP9; CCP10; hFH; CCP4	GGSS GGSS GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 33)	hFH; CCP1 9; CCP2 0
66			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCR1; CCP8; CCP9; CCP10	GGSS GGSS GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 33)	hFH; CCP1 9; CCP2 0
67			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCR1; CCP1; CCP2; CCP3; CCP4		
68			HSA	GGSS GG (SEQ	hCFI	GGSS GG (SEQ	hCR1; CCP1;	GGSS GG (SEQ	hCR1; CCP1 5;

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
				ID NO: 6)		ID NO: 6)	CCP2; CCP3	ID NO: 6)	CCP1 6; CCP1 7
70			HSA	GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 34)	CFI крысы				
71			HSA	GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 34)	CFI гориллы				
72			HSA	GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 34)	CFI яванского макака				
73			HSA	GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 34)	CFI шимпанзе				
74			HSA	GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 34)	CFI коровы				
75			HSA	GGSS GGSS GG (SEQ ID	CFI аллигато- ра				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
				NO: 34)					
76			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; H383K; D385N; K387S; R388Q; E392Q; Y393T; D395K; K419M; D420H; G421T; N422G; D425E				
77			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; H383K; R388Q; E392Q; Y393T; K419M				
78			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; K51D; T59E; R61D				
79			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Q69H; L73F; G79E; T80I; L83S; N84H				
80			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; Δ(1- KVTYTS- 6) (SEQ ID NO: 35) > RSPSASD LP (SEQ ID NO: 36)				
81			HSA	GGSS GG (SEQ	hCFI; M186E; G187L;				

№ констр.	N2- конец	N2- линкер	N- конец	N- линкер	Сердце- вина	С- линкер	С- конец	С2- линкер	С2- конец
				ID NO: 6)	Y188S; Q189N; D190G; F191L; D193G				
89			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI;T377 G;E457G; N531G	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCR1;C CP15;C CP16;C CP17;h FH;CC P4	GGGG GGGG GGGG (SEQ ID NO: 37)	hFH; CCP1 9;CC P20
90	HHH HHH SG (SEQ ID NO: 38);h CR1; CCP1 5;CC P16;C CP17; hFH; CCP4 ;GGG GGG GGG GGG (SEQ ID NO: 37);h FH;C CP19; CCP2 0	GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GGSS GG (SEQ ID NO: 39)	HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI;T377 G;E457G; N531G				
91			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI;T377 A;E457G; N531G				
92			HSA	GGSS GG (SEQ	hCFI;N42 2A				

№ констр.	N2-конец	N2-линкер	N-конец	N-линкер	Сердцевина	C-линкер	C-конец	C2-линкер	C2-конец
				ID NO: 6)					
93			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI; T377 A				
94					hCFI-PD;				
95			HSA	GGSS GG (SEQ ID NO: 6)	hCFI;				
96					hCFI;				

[0107] В некоторых вариантах осуществления первый компонент содержит CFI дикого типа любого вида, либо полноразмерный, либо его домен («сердцевинный» домен). В некоторых вариантах осуществления первый компонент содержит вариант CFI согласно описанию, подробно описанный в предыдущем разделе, например в таблице 3, также приведенный в таблице 2. Следует отметить, что второй и последующие компоненты могут повышать активность или изменять специфичность части CFI (первого компонента) или его период полужизни. Второй и последующие компоненты также могут обеспечивать CFI (первому компоненту) возможность действовать в системе комплемента без присутствия экзогенного кофактора (например, кофактора, такого как фактор H (FH) или CR1). В настоящем документе экзогенный кофактор для CFI представляет собой кофактор, который не слит с CFI. Следует понимать, что слитный конструкт может действовать в системе комплемента без присутствия FH и/или CR1, но активность слитного конструкта также может дополнительно повышаться за счет присутствия FH и/или CR1 либо в составе слитного конструкта, либо предоставленного экзогенно.

[0108] В настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие первый компонент, включающий в себя любой из вариантов CFI, предложенных в настоящем документе. Следует понимать, что вариант CFI может представлять собой любой из вариантов CFI, приведенных в таблице 2 и таблице 3.

[0109] В некоторых вариантах осуществления второй и последующие компоненты слитного конструкта представляют собой белок. В некоторых вариантах осуществления второй и/или последующие компоненты не являются белком.

[0110] Компоненты слитных конструктов согласно описанию могут удерживаться вместе необязательными линкерами, как изображено на ФИГ. 7. Они могут иметь любую подходящую длину, по меньшей мере состоять из одной аминокислоты. Линкер может представлять собой гибкий линкер и может представлять собой пептид длиной от примерно 1 до примерно 20 аминокислотных остатков, причем аминокислотные остатки могут включать в себя остатки глицина. Линкер может также необязательно содержать остатки серина. Примеры гибких линкеров могут включать в себя, без ограничений, глициновые полимеры, глицин-сериновые полимеры, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры или любые другие подходящие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Примером линкера является GGSSGGⁿ (SEQ ID NO: 51), где n является любым числом от примерно 1 до примерно 20. В число других примеров линкеров входят (GGSS)ⁿ, что обозначает линкер GGSS, повторенный n раз (SEQ ID NO: 26); и (GGSS)ⁿGG, что обозначает линкер GGSS, повторенный n раз, с последующим GG (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления линкеры представляют собой протеазочувствительные расщепляемые линкеры. Примеры линкеров, соединяющих слитные конструкты, могут иметь 1–50, 5–50, 10–50, 15–50, 20–50, 25–50, 1–20, 2–20, 3–20, 4–20, 5–20, 6–20, 7–20, 8–20, 9–20, 10–20, 3–15, 3–10, 3–9, 3–8, 3–7, 3–6, 3–5, 4–15, 4–10, 4–9, 4–8, 4–7, 4–6, 4–5, 5–15, 5–10, 5–9, 5–8, 5–7, 5–6, 6–15, 6–10, 6–9, 6–8 или 6–7 аминокислот в длину.

Слитные конструкты CFI + удлинитель периода полужизни

[0111] В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI (первый компонент) и второй компонент, и при этом второй компонент представляет собой удлинитель периода полужизни. Поскольку встречающийся в природе CFI имеет относительно короткий период полужизни, в некоторых вариантах осуществления увеличение периода полужизни CFI может давать преимущества. В настоящем документе «CFI» используется для обозначения CFI дикого типа или его вариантов. Благодаря использованию второго компонента, который является

удлинителем периода полужизни, активность CFI может повышаться, или же может улучшаться другая характеристика CFI по сравнению с CFI дикого типа. Например, период полужизни CFI дикого типа или варианта CFI можно увеличить путем слияния CFI с удлинителем периода полужизни.

[0112] Примеры удлинителей периода полужизни включают в себя, без ограничений, альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин, PEG, небioresлагаемый полимер, биоразлагаемый полимер и Fc. В некоторых вариантах осуществления второй компонент представляет собой белок и является удлинителем периода полужизни, таким как альбумин или Fc. В некоторых вариантах осуществления второй компонент не является белком и представляет собой удлинитель периода полужизни, такой как PEG. В некоторых вариантах осуществления удлинитель периода полужизни содержит пептидные повторы.

[0113] В некоторых вариантах осуществления второй компонент представляет собой удлинитель периода полужизни и является альбумином. Следует обратить внимание на то, что в настоящем документе термин «альбумин» относится к любому альбумину, такому как любой сывороточный альбумин, или варианту альбумина, или производному альбумина. В качестве примера, вариант альбумина включает в себя любой альбумин, содержащий по меньшей мере одну модификацию, соответствующую аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7 (человеческий сывороточный альбумин (HSA) дикого типа) или по меньшей мере одну модификацию, соответствующую аминокислотной последовательности альбумина любого биологического вида, не являющегося человеком. В примерах осуществления альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA) и представлен в (SEQ ID NO: 7).

[0114] Примеры слитных конструкторов, содержащих CFI дикого типа и HSA, называются в настоящем документе «CFI-HSA» и более подробно описаны ниже.

[0115] В некоторых вариантах осуществления слитный конструктор согласно настоящему описанию содержит альбумин и вариант CFI согласно настоящему описанию. Примеры конструкторов приведены в таблице 3.

Структурные расположения слитных конструктов

[0116] Примеры структурных расположений показаны на ФИГ. 7.

[0117] В некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа или вариант CFI согласно описанию представляет собой первый компонент слитного конструкта, и при этом данная часть CFI содержит А-цепь и В-цепь. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит структурное расположение от N-конца до С-конца (А-цепь)–(необязательный линкер)–(В-цепь)–(необязательный линкер)–(второй компонент). В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит инверсию А- и В-цепей в своем компоненте CFI, так что структурное расположение от N-конца до С-конца представляет собой (В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь)–(необязательный линкер)–(второй компонент).

[0118] В некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа или вариант CFI согласно описанию представляет собой первый компонент слитного конструкта, и при этом данная часть CFI содержит А-цепь и В-цепь. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит структурное расположение от N-конца до С-конца в виде (второй компонент)–(необязательный линкер)–(А-цепь)–(необязательный линкер)–(В-цепь). В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит инверсию цепей А и В в своем компоненте CFI, так что структурное расположение от N-конца до С-конца представляет собой (второй компонент)–(необязательный линкер)–(В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь).

[0119] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие по меньшей мере первый компонент, причем первый компонент представляет собой любой из CFI дикого типа или вариантов CFI, предложенных в настоящем документе (CFI-часть), и второй компонент, причем первый компонент и второй компонент являются слитными, и при этом второй компонент слит с N-концом CFI-части. В некоторых вариантах осуществления второй компонент слит с С-концом CFI-части. В некоторых вариантах осуществления второй компонент слит с С-концом CFI-части, а третий компонент дополнительно слит с N-концом CFI-части. В некоторых вариантах осуществления второй компонент слит с N-концом CFI-части, а третий компонент дополнительно слит с С-концом CFI-части.

[0120] На ФИГ. 2А–2D показаны модели слитного конструкта, содержащего альбумин и вариант CFI, причем вариант CFI содержит инверсию цепей А-В. На ФИГ. 2А–2В показана первая версия, а на ФИГ. 2С–2D показана вторая версия моделей слитного конструкта, содержащего человеческий сывороточный альбумин (HSA) и цепи А и В CFI, причем цепи А и В содержат инверсию. Первая версия варианта CFI инверсии цепей А-В содержит междоменную дисульфидную связь. Вторая версия не содержит междоменную дисульфидную связь. Обе версии вариантов инверсии могут быть сконструированы по типу «голова к хвосту» следующим образом: (HSA)–(необязательный линкер)–(В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь).

[0121] Соответственно, в настоящем документе предложены варианты CFI, причем вариант CFI представляет собой первый компонент слитного конструкта, содержащего первый компонент и второй компонент, и вариант CFI слит со вторым компонентом, и при этом CFI содержит А-цепь и В-цепь, а структурное расположение от N-конца до С-конца или от С-конца до N-конца представляет собой (второй компонент)–(необязательный линкер)–(В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь).

[0122] В некоторых вариантах осуществления второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен фактора Н. Слитные конструкты, содержащие по меньшей мере один домен CFI и фактор Н, более подробно описаны ниже. В некоторых вариантах осуществления второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен CR1. Слитные конструкты, содержащие по меньшей мере один домен CFI и фактор Н, более подробно описаны ниже. В некоторых вариантах осуществления второй компонент содержит по меньшей мере один домен фактора Н и по меньшей мере один домен CR1. Слитные конструкты, содержащие по меньшей мере один домен CFI, по меньшей мере один домен фактора Н и по меньшей мере один домен CR1, более подробно описаны ниже.

Компоненты слитных конструктов

[0123] В настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие первый компонент и дополнительные компоненты. В некоторых вариантах осуществления первый компонент содержит CFI дикого типа или вариант CFI согласно описанию. В некоторых вариантах осуществления компонент содержит удлинитель периода полужизни. В

некоторых вариантах осуществления второй компонент содержит по меньшей мере один домен фактора H (FH), по меньшей мере один домен CR1 или смесь доменов FH и CR1. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт также содержит дополнительные компоненты. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий (или более) компоненты представляют собой любой один или более компонентов, приведенных в таблице 4. В таблице 4 приведены различные примеры компонентов и аминокислотные последовательности компонентов, которые могут использоваться для получения слитных конструктов CFI, предложенных в настоящем документе.

[0124] Если обратиться к таблице 4, то SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого CFI дикого типа, полученного из плазмы, называемого «CFI-PD» и имеющего лидерную последовательность. CFI дикого типа, используемый для слияния со вторым компонентом, может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, которая не включает в себя лидерную последовательность, присутствующую в SEQ ID NO: 1. Вместо нее можно использовать лидерную последовательность МОРС 63 области V-III каппа-цепи Ig мыши (SEQ ID NO: 2) для рекомбинантного получения любого из слитных конструктов CFI, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкты CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI, причем по меньшей мере один домен CFI содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

Таблица 4. Компоненты примеров слитных конструкторов CFI

Описание	Последовательность
Человеческий CFI дикого типа, полученный из плазмы (CFI-PD)	MKLLHVFLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYT HLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATN RRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKH GNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDL GFQQGADTQRRFKLSLDSINSTECLHVHCRGLETSLAECTF TKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYIS QMKACDGINDCGDQSDDELCKACQKGFHCKSGVCIPSQ YQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAER RRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQV AIKDASGITCGGIYGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTV VDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKK DGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREKD NERVFLQWGEVKLISNCSKIFYGNRFYEKEMECAGTYDG SIDACKGDSGGPLVCM DANNTYVWGVVSWGENCGKPE FPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 1)
Лидерная последовательность (мышинный лидер для CFI-HSA)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 2)
Лидерная последовательность человеческого CFI	MKLLHVFLFLCFHLRFC (SEQ ID NO: 3)
Человеческий фактор H (FH)	MRLLAKEICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQT YPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKC QKRPCGHPGDTDFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQ LLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSS AMEPDREYHFQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFW KEKPKCWEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMG YEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRC TLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYYCDE HFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPA VPCLRKCYFPYLENGY NQNYGRKFVQKSIDVACHPGYALPKAQT TVTCMENGW SPTPRCIRVKTCSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCK LGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNAR TKNDFTWFKLNDTLDYECHDGYESNTGSTTGSIVCGYNG WSDLPICYERECLEPKIDVHLVPDRKKDQYKVGVLKFC

Описание	Последовательность
	<p>KPGFTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSCGPPPELLN GNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPFLMKGPNKIQCVDGE WTTLPVCIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFN CSESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCVAIDKLLKCKSSNLI LEEHLKNKKEFDHNSNIRYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPE VNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNRYRDGEKVSVLCQ ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINS SRSSQESYAHGTKLSYTCGGFRRISEENETTCYMGKWSSPP QCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVTYKCFEGFG IDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKK DVYKAGEQVTYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTC RDTSCVNPPTVQNAIYVSRQMSKYPSGERVRYQCRSPYE MFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITS FPLSVYAPASSVEYQCQONLYQLEGNKRITCRNGQWSEPPK CLHPCVISREIMENYNIALRWTAQKQLYSRTGESVEFVCK RGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR (SEQ ID NO: 4)</p>
<p>Человеческий мини-фактор H (мини-FH)</p>	<p>MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQT YPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQ KRPCGHPGDTFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQL LGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENKIVSSA MEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSK EKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIYKENERFQYKCNMGYE YSERGDAVCTESGWRPLPSCEEAGGGGGGGGGGGGGK GPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQONLYQLEGNKRIT CRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAQKQLYS RTGESVEFVCKRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR ENLYFQGHHHHHH (SEQ ID NO: 8)</p>
<p>CFI дикого типа с SEQ ID NO 1 без сигнальной последова- тельности</p>	<p>KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEG TCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPG TKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKT MFICKSSWSMREANVACLDFGQGGADTQRRFKLSDLSIN STECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYT QKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDQSDCLC CKACQKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCA GFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHI RRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWI LTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRII FHENYNAGTYQNDIALIEMKKGDNKKDCELPRSIPACVPW SPYLFQPNDT CIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCS KFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM DA NNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYH VGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 5)</p>

Описание	Последовательность
Линкер	GGSSGG (SEQ ID NO: 6)
Человеческий сывороточный альбумин (HSA)	<p> DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPVLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLLKLYEYIARRHPYFYAPELFF AKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQ RLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCCEL FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKV GSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR VTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 7) </p>
HSA, соединенный с CFI (CFI-HSA)	<p> DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPVLPRLVR PEVDVMCTAFHDNEETFLLKLYEYIARRHPYFYAPELFF AKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQ RLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCCEL FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKV GSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR VTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSSGG KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEG TCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPG TKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDKT MFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFKLSDSLIN STECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRRTMGYQDFADVVCYT QKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDQSDCLC CKACQKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCA GFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMHI RRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWI LTAACHLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRII FHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPW SPYLFQPNDCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCS </p>

Описание	Последовательность
	KFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDA NNVTYVWGVVSWGKPEFPGVYTKVANYFDWISYH VGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 21, констр. № 95 из таблицы 3)

С. Слитные конструкторы фактора I комплемента и альбумина

Слитные конструкторы варианты CFI + альбумин

[0125] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкторы, содержащие первый компонент, который представляет собой вариант CFI согласно описанию (например, см. таблицу 2), и второй компонент, который представляет собой альбумин, например сывороточный альбумин, например человеческий сывороточный альбумин.

[0126] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкторы, содержащие по меньшей мере один домен CFI и второй компонент, причем второй компонент представляет собой HSA, и при этом по меньшей мере один домен CFI содержит любой один или более доменов CFI, выбранных из: SPD, домена FIMAC, домена SRCR, домена LDLr1 и домена LDLr2. В некоторых вариантах осуществления любой один или более доменов CFI содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или содержат аминокислотную последовательность, полученную из SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления любой один или более доменов CFI соответствуют доменам CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CFI содержит каждый из SPD, домена FIMAC, домена SRCR и доменов LDLr1 и LDLr2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CFI конструктора CFI-HSA содержит только SPD.

[0127] На ФИГ. 3А показан пример модели слитного конструктора, содержащего HSA, слитый с CFI, причем CFI представляет собой вариант CFI, содержащий каждый из SPD, домена FIMAC, домена SRCR и доменов LDLr1 и LDLr2. Таким образом, в этой модели обе из А-цепи и В-цепи включены в CFI. Домен FIMAC, домен SRCR и домены LDLr1 и

LDLr2 вместе представляют собой А-цепь, или тяжелую цепь, в то время как SPD представляет собой В-цепь, или легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки любого одного или более доменов слитного конструкта могут соответствовать аминокислотным остаткам CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки любого одного или более доменов слитного конструкта могут содержать одну или более модификаций по отношению к доменам CFI дикого типа.

[0128] На ФИГ. 3В показана модель примера слитного конструкта, содержащего HSA, слитый с частью CFI, причем CFI содержит только домен сериновой протеазы (SPD). Пример слитного конструкта, показанный на ФИГ. 3В, может называться «HSA-SPD» и включает в себя петлю активации в положениях аминокислотных остатков 322–326, петлю автолиза в положениях аминокислотных остатков 455–463 и входную рамку S1 в положениях аминокислотных остатков 529–536. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки любой одной или более из петли активации, петли автолиза и входной рамки S1 слитного конструкта могут соответствовать SPD дикого типа CFI. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки любой одной или более из петли активации, петли автолиза и входной рамки S1 слитного конструкта могут содержать одну или более модификаций по отношению к SPD дикого типа CFI.

D. Слитные конструкты фактора I комплемента и фактора Н

[0129] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие CFI дикого типа (или его вариант), слитый по меньшей мере с одним доменом фактора Н. Фактор Н (FN), как и CFI, представляет собой белок, участвующий в пути комплемента. FN представляет собой кофактор CFI, который образует комплекс с CFI и C3b для катализа расщепления C3b посредством CFI. Как отмечено выше, полноразмерный FN содержит 20 доменов. На ФИГ. 4А показана принципиальная схема FN, демонстрирующую его 20 доменов, каждый из которых представляет собой домен белка контроля комплемента (CCP) и каждый из которых соединен короткими линкерами в расположении «голова к хвосту». Домены CCP пронумерованы от 1 до 20, начиная с N-конца. CCP 1–4 образуют комплекс с C3b, а CCP 19–20 образуют комплекс с C3d. Без привязки к какой-либо конкретной теории или

механизму, считается, что FH важен для эффективного расщепления C3b посредством CFI. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления слитный конструкт, содержащий конкретные домены FH, слитые по меньшей мере с одним доменом CFI, может делать возможным расщепление C3b независимо от экзогенного FH. Экзогенный FH может быть определен как любой FH, который не слит с каким-либо доменом CFI, и может представлять собой FH дикого типа. В настоящем документе FH дикого типа относится к любому встречающемуся в природе FH, который не является FH, вызывающим заболевание. В некоторых вариантах осуществления FH представляет собой человеческий FH. В некоторых вариантах осуществления FH дикого типа содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

[0130] В некоторых вариантах осуществления дополнительный компонент слитных конструктов согласно описанию представляет собой по меньшей мере один домен фактора H или часть домена FH. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен FH содержит домены 1–20 ССР фактора H. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен FH соответствует домену FH дикого типа, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

[0131] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие по меньшей мере один домен CFI и дополнительный компонент, причем дополнительный компонент представляет собой по меньшей мере один домен фактора H, и при этом по меньшей мере один домен фактора H содержит домены 1–4 и 19–20 белка контроля комплемента (ССР) фактора H. Домены 1–4 и 19–20 ССР называются «мини-фактором H» (мини-FH). На ФИГ. 4В показана принципиальная схема мини-FH, демонстрирующая домены 1–4 ССР, соединенные соединителем Gly с доменами 19–20, которые содержат His-метку. В некоторых вариантах осуществления мини-FH представляет собой человеческий мини-FH. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность мини-FH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

[0132] Исходя из структуры комплекса, образуемого C3b-CFI и мини-FH, имеются несколько доменов, относящихся к функции FH. Следующие типы примеров слитных

конструктов FH-CFI были получены в виде базовых молекул для стимулирования независимой от FH активности расщепления CFI:

- (a) домены 1–8 FH, слитые с CFI (фактор H-CCP1–8+ CFI);
- (b) домены 1–4 FH, слитые с CFI (фактор H-CCP1–4+ CFI);
- (c) домены 19–20 FH, слитые с CFI (фактор H-CCP19–20+ CFI);
- (d) домены 5–8 FH, слитые с CFI (фактор H-CCP1–4+19–20+5–8+ CFI);
- (e) домены 1–4, 19–20 и/или 5–8 FH, слитые с CFI;
- (f) домены 1–4 и 19–20 FH, слитые с CFI (фактор H-CCP1–4+19–20+ CFI);
- (g) домены 1–4, 19–20 и 5–8 FH, слитые с CFI (фактор H-CCP1–4+19–20+5–8+ CFI);
- (h) домены 1–8 FH, слитые только с доменом CFI LDLr2 (фактор H-CCP1–8+LDLR2-CFI);
- (i) домены 1–4, 19–20 и 5–8 FH, слитые только с доменом CFI LDLr2 (фактор H-CCP1–4+19–20+5–8+LDLR2-CFI);
- (j) домены 1–4 FH, слитые с человеческим сывороточным альбумином (HSA) и доменом сериновой протеазы (SPD) CFI (CFI-HSA(SPD)-фактор H-CCP1–4);
- (k) домены 2–4 FH, слитые с человеческим сывороточным альбумином (HSA) и доменом сериновой протеазы (SPD) CFI (CFI-HSA(SPD)-фактор H-CCP2–4);
- (l) домены 2–3 FH, слитые с человеческим сывороточным альбумином (HSA) и доменом сериновой протеазы (SPD) CFI (CFI-HSA(SPD)-фактор H-CCP2–3).

[0133] Вышеуказанные слияния могут быть дополнительно слиты с альбумином, например HAS.

[0134] На ФИГ. 5 показана модель примера слитного конструкта, содержащего FH и CFI, которая содержит домены 1–8 CCP фактора FH, слитого с CFI, причем часть FH слитого

конструкта представляет собой усеченный мини-FH, а CFI представляет собой CFI дикого типа. CFI дикого типа содержит каждый из SPD, домена FIMAC, домена SRCR, домена LDLr1 и домена LDLr2. Пример слитного конструкта, показанный на ФИГ. 5, также упомянут в настоящем документе как «фактор H-CCP1–8+ CFI». Обе из А-цепи и В-цепи включены в CFI. Домен FIMAC, домен SRCR и домены LDLr1 и LDLr2 вместе представляют собой А-цепь, или тяжелую цепь, в то время как SPD представляет собой В-цепь, или легкую цепь. FH содержит домены 1–4 и линкер, содержащий домены 5–8. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки любого одного или более доменов FH и/или CFI слитного конструкта могут соответствовать аминокислотным остаткам FH дикого типа или CFI дикого типа соответственно. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки любого одного или более доменов FH и/или CFI слитного конструкта могут содержать одну или более модификаций по отношению к доменам FH дикого типа или CFI дикого типа соответственно.

[0135] В таблице 5А перечислены примеры слитных конструктов, содержащих фактор Н.

Таблица 5А. Базовые молекулы слитного конструкта, содержащего фактор Н

Изменение	Базовая молекула — сердцевинный домен	Название области/варианта
FH_CCP1–8 + GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 37) + ΔHSA	FH + hCFI wt	Слияние FH-CFI (слияние № 1)
FH_CCP1–4 + 19–20 + 5–8 + GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 37) + ΔHSA		Слияние FH-CFI (слияние № 2)
Δ(K1-P305) + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + FH_CCP1–4	CFI-SPD + FH	Слияние HSA-SPD (ΔА-цепь)-FH_CCP1–4
Δ(K1-P305) + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + FH_CCP2–4		Слияние HSA-SPD (ΔА-цепь)-FH_CCP2–4
Δ(K1-P305) + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + FH_CCP2–3		Слияние HSA-SPD (ΔА-цепь)-FH_CCP2–3
WT + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CCP_1–4		Слияние CFI-HSA-FH_CCP1–4

Изменение	Базовая молекула — сердцевинный домен	Название области/варианта
WT + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CCP_2–3		Слияние CFI-HSA-FH_CCP2–3
WT + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CCP_2–4		Слияние CFI-HSA-FH_CCP2–4
FH_CCP1–4 + G(43) (SEQ ID NO: 40) + hCFI wt	FH + hCFI wt	Слияние FH-CFI (слияние № 1) (100%Gly, 150Å)
FH_CCP1–4 + GGGGSS(7) (SEQ ID NO: 41) + hCFI wt		Слияние FH-CFI (слияние № 1) (66%Gly, 150Å)
FH_CCP1–4 + GGSS(11) (SEQ ID NO: 42) + hCFI wt		Слияние FH-CFI (слияние № 1) (50%Gly, 150Å)
FH_CCP1–4 + G(53) (SEQ ID NO: 43) + hCFI wt		Слияние FH-CFI (слияние № 1) (100%Gly, 185Å)
FH_CCP1–4 + GGGGSS(9) (SEQ ID NO: 44) + hCFI wt		Слияние FH-CFI (слияние № 1) (66%Gly, 185Å)
FH_CCP1–4 + GGSS(13) (SEQ ID NO: 45) + hCFI wt		Слияние FH-CFI (слияние № 1) (50%Gly, 185Å)
FH_CCP2–4 + FH_CCP5–8 + GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 37) + ΔHSA		Слияние FH-CFI (производные слияния №1)
FH_CCP1–3 + FH_CCP5–8 + GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 37) + ΔHSA		Слияние FH-CFI (производные слияния №1)
FH_CCP2–3 + FH_CCP5–8 + GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 37) + ΔHSA		Слияние FH-CFI (производные слияния №1)
WT + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CCP_1–4 + GGSS(6)+G (SEQ ID NO: 46) + компстатин		
WT + GGSSGG (SEQ ID NO: 6) + CCP_1–5 + GGSS(3)+GGG (SEQ ID NO: 47) + компстатин		CFI-HSA-FH-CCP_1–5 с компстатином
Мышиный мини-фактор H	мышинный FH	mFH
Человеческий мини-фактор H	человеческий FH	mFH

[0136] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI представляет собой первый компонент слитного конструкта, содержащего первый компонент и второй компонент, и вариант CFI слит со вторым компонентом, причем второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен фактора H, при этом домен FH содержит 1–4 CCP фактора FH.

[0137] В некоторых вариантах осуществления вариант CFI представляет собой первый компонент слитного конструкта, содержащего первый компонент и второй компонент, и вариант CFI слит со вторым компонентом, причем второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен фактора H, при этом домен FH содержит 1–4 CCP фактора FH.

[0138] Слитные конструкты CR1 описаны в разделе ниже. Следует отметить, что дополнительно могут быть образованы химерные конструкции FH и CR1 и действовать как один из компонентов слитных конструктов согласно описанию. Например, если исходить из конструкта № 90 таблицы 3, такой компонент может быть следующим:
 ННННННСG (SEQ ID NO: 38);hCR1;CCP15;CCP16;CCP17;hFH;CCP4;GGGGGGGGGGGGG
 (SEQ ID NO: 37);hFH;CCP19;CCP20.

Е. Слитные конструкты фактора I комплемента и рецептора комплемента типа 1

[0139] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие CFI дикого типа (или его вариант), слитые с по меньшей мере одним доменом рецептора комплемента типа 1 (CR1). CR1 также называют CD35. CR1, как и CFI, представляет собой белок, участвующий в пути комплемента. CR1 является кофактором CFI. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления слитный конструкт, содержащий конкретные домены CR1, слитые с по меньшей мере одним доменом CFI, может делать возможным расщепление C3b и/или C4b независимо от экзогенного кофактора. Экзогенный кофактор CR1 может быть определен как любой CR1 или его часть, которая не слита с каким-либо доменом CFI и может представлять собой CR1 дикого типа или может представлять собой домены 1–3 или 15–17 CCP рецептора

CR1. CR1 дикого типа в настоящем документе относится к любому CR1 естественного происхождения, который не является CR1, вызывающим заболевание. В некоторых вариантах осуществления CR1 представляет собой человеческий CR1.

[0140] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере второй компонент слитных конструкторов согласно описанию представляет собой по меньшей мере один домен CR1 или часть домена CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домены 8–10 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домены 15–17 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домены 1–3 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления слитные конструкторы согласно описанию, содержащие по меньшей мере один домен CR1, также включают в себя слияние с альбумином. В некоторых вариантах осуществления слитные конструкторы согласно описанию, содержащие по меньшей мере один домен CR1, также включают в себя слияние с альбумином и/или по меньшей мере один домен фактора Н. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домен 15 CR1 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домен 16 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домен 17 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домены 15–16 ССР рецептора CR1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен CR1 содержит домены 16–17 ССР рецептора CR1.

[0141] В таблице 5В перечислены примеры слитных конструкторов, содержащих CR1, и соответствующая последовательность примера слитного конструктора, содержащего CFI дикого типа и домены 15–17 ССР рецептора CR1.

Таблица 5В. Слитные конструкции, содержащие фактор 1 комплемента

Слитный конструктор	Слитный конец	Используемые фрагменты или базовые молекулы	Последовательность
HSA + Cfi + GGSSGG + CR1(ccp15-17)	C	GGSSGG + CR1(ccp15-17)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLIFAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADE SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRET YGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETF LKKYLYEIAARRHPYFYAPPELLFFAKRY KAAFTECCQAADKAACLLPKLDLDRD EGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFE QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPT LVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV TKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKLV ASQAALGLGGSSGGKVTYTSQEDLVE KKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIE GTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSF PTYCQQSLECLHPGKFLNNGTCTA EGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDQ DKTMFICKSSWSMREANVACLDFGFQ QGADTQRRFKLSDLSINSTECLHVHCR GLETSLAECTFTKRRRTMGYQDFADV CYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQM KACDGINDCGDQSDDELCKACQGGK FHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDE VGCAGFASVTQEETEILTADMDAERR RIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGG KRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYI GGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTV VDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNA GTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSI PACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREK

Слитный конструктор	Слитый конец	Используемые фрагменты или базовые молекулы	Последовательность
			DNERVFSLQWGEVKLISNCSKFGYGNR FYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGP LVCMDANNVTYVWGVVSWGECGK PEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFIS QYNVGGSSGGGHCQAPDHFLFAKLLK TQTNASDFPIGTSLKYECRPEYYGRPF SITCLDNLVWSSPKDVCKRKSCKTPPD PVNGMVHVITDIQVGSRINYSCTTGH LIGHSSAECILSGNAAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVV TYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSN DDQVGIWSGPAPQCII (SEQ ID NO: 22)
CR1(ccp15) + fH(ccp2) + fH(ccp3) + fH(ccp4)		fH и CR1	
fH(ccp1) + CR1(ccp16) + fH(ccp3) + fH(ccp4)			
fH(ccp1) + fH(ccp2) + CR1(ccp17) + fH(ccp4)			
CR1(ccp15) + CR1(ccp16) + fH(ccp3) + fH(ccp4)			
fH(ccp1) + CR1(ccp16) + CR1(ccp17) + fH(ccp4)			
CR1(ccp15) + fH(ccp2) + CR1(ccp17) + fH(ccp4)			

Слитный конструктор	Слитый конец	Используемые фрагменты или базовые молекулы	Последовательность
CR1(ccp15) + CR1(ccp16) + CR1(ccp17) + fH(ccp4)			
CR1(ccp15–17)			

Ф. Комбинированные слитные конструкторы

[0142] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкторы, содержащие по меньшей мере один домен фактора I комплемента (CFI), второй компонент, третий компонент, четвертый компонент и пятый компонент, как показано на ФИГ. 7 и в таблице 3. Эти примеры слитных конструкторов могут содержать комбинацию компонентов, слитых вместе, и каждая из них содержит по меньшей мере один сердцевинный домен CFI. Как отмечено выше, некоторые примеры слитных конструкторов, содержащие первый компонент, включающий в себя CFI, второй компонент и третий компонент, могут включать в себя слитный конструктор, содержащий альбумин, по меньшей мере один домен CFI и по меньшей мере один домен фактора H (FH).

[0143] На ФИГ. 5 показано схематическое представление трех примеров слитных конструкторов, содержащих HSA, по меньшей мере один домен CFI и различные домены фактора H. Каждый из показанных примеров слитных конструкторов может содержать часть CFI-HSA, включающую в себя лидерную последовательность, HSA, CFI дикого типа, как описано ранее в настоящем документе, и различные домены FH (называемые «ССР-частью» на ФИГ. 5). Как отмечено выше, часть CFI-HSA может быть сконструирована с помощью линкера GGSSGG (SEQ ID NO: 6), сливающего вместе HSA и SPD CFI. Пример слияния, упоминаемого в настоящем документе как слитный конструктор CFI-HSA-FH_CCP1–4, содержит CFI дикого типа и домены 1–4 ССР фактора FH. CFI-HSA-

FH_CCP1–4 также содержит линкер GGSSGG (SEQ ID NO: 6), который представляет собой комбинацию линкера GGSSGG (SEQ ID NO: 6) и состоящего только из Gly линкера, который соединяет вместе домен CCP4 и домен CCP19 в мини-факторе H. Другой показанный пример слитного конструкта содержит домены 2–4 CCP фактора FH и домены 2–3 CCP фактора FH. Длины линкеров, используемых в примерах слитных конструктов, показаны, при этом в скобках показаны консервативные минимальные длины. Следует понимать, что также могут использоваться любые другие приемлемые гибкие линкеры.

[0144] Другие примеры слитных конструктов, приведенные в настоящем документе, содержат CFI дикого типа или вариант CFI, по меньшей мере один домен FH и по меньшей мере один домен CRI. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI, по меньшей мере один домен FH и по меньшей мере один домен CRI. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит сывороточный альбумин человека, CFI дикого типа или вариант CFI, по меньшей мере один домен FH и по меньшей мере один домен CRI. Слитные конструкты, содержащие по меньшей мере один домен FH и по меньшей мере один домен CR1, могут содержать ориентацию, включающую в себя домен FH, слитый с доменом CR1, чередующиеся домены FH и CR1, один или более последовательных доменов FH, слитых с одним или более последовательными доменами CR1, один или более последовательных доменов CR1, слитых с одним или более доменами FH, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI, hCR1; CCP15; CCP16; CCP17 и hFH; CCP1; CCP2; CCP3; CCP4. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI и hCR1; CCP15; hFH; CCP2; CCP3; CCP4. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI и hFH; CCP1; hCR1; CCP16; hFH; CCP3; CCP4. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI и hCR1; CCP15; CCP16; hFH; CCP3; CCP4. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI и hCR1; CCP15; CCP16; CCP17; hFH; CCP4. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI и hCR1; CCP15; CCP16; CCP17; hFH; CCP4. Следует понимать, что любой из слитных конструктов может дополнительно содержать один или более линкеров, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI, по меньшей мере один домен FH, по меньшей мере один домен CRI и линкерную область. Понятно, что любой из слитных конструктов может дополнительно содержать человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит человеческий сывороточный альбумин, CFI дикого типа или вариант CFI, по меньшей мере один домен FH и по меньшей мере один домен CRI.

[0145] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкты, содержащие первый компонент, который содержит по меньшей мере один домен CFI, второй компонент и третий компонент, причем второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен FH, а третий компонент представляет собой любой удлинитель периода полужизни. В некоторых вариантах осуществления третий компонент представляет собой белок (например, сывороточный альбумин или Fc). В некоторых вариантах осуществления третий компонент не является белком (например, PEG).

II. Получение вариантов CFI и слитных конструктов CFI

[0146] В настоящем документе предложены способы и композиции для получения вариантов CFI и слитных конструктов CFI. Соответственно, в настоящем документе предложены нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие любые из вариантов или слитных конструктов CFI согласно описанию. Также предложены клетки, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих CFI или его вариант и слитные конструкты согласно описанию.

[0147] В настоящем документе предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты CFI и слитные конструкты, описанные в настоящем документе.

[0148] В настоящем документе предложены экспрессионные векторы, кодирующие варианты и слитные конструкты CFI, описанные в настоящем документе. Экспрессионные векторы могут включать в себя регуляторные элементы транскрипции, такие как энхансеры или промоторы, функционально связанные с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант CFI или слитный конструкт согласно описанию.

[0149] Могут быть разработаны клеточные линии для экспрессии продукции вариантов CFI и слитных конструктов, описанных в настоящем документе. Клеточные линии для продуцирования CFI, CFI могут быть получены с использованием любой клетки-хозяина, способной экспрессировать варианты CFI и слитные конструкты CFI, описанные в настоящем документе. Клетки-хозяева могут представлять собой клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки грибов, клетки растений и/или бактериальные клетки. Для экспрессии вариантов CFI и слитных конструктов линия клеток-хозяев может быть временно или стабильно трансфицирована или трансдуцирована экспрессионными векторами, кодирующими варианты CFI, CFI и слияния CFI. Векторы могут представлять собой, например, плазмиды или вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления линия клеток-хозяев представляет собой клеточную линию млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

[0150] Варианты и слитные конструкты CFI, описанные в настоящем документе, могут быть рекомбинантным способом экспрессированы в клеточных линиях млекопитающих, известных в данной области техники для получения биологических продуктов, например, в клетках яичника китайского хомячка (CHO). Клетки млекопитающих могут быть трансфицированы или трансдуцированы экспрессионным вектором, кодирующим варианты и слитные конструкты CFI, описанные в настоящем документе, с использованием любого способа, известного в данной области техники.

[0151] В настоящем документе предложены способы получения CFI или его варианта в активированном состоянии; способ включает получение CFI в клетке, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих CFI или его вариант, и экспрессионную кассету для фурина.

[0152] В настоящем документе предложены способы получения и очистки вариантов CFI и слитных конструктов, описанных в настоящем документе. Варианты и слитные конструкты CFI, описанные в настоящем документе, могут быть очищены из кондиционированной среды стандартными способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления варианты и слитные конструкты CFI могут быть очищены посредством хроматографии на аффинных матрицах. В некоторых

вариантах осуществления аффинная матрица представляет собой аффинную матрицу альбумина человека CaptureSelect™. В некоторых вариантах осуществления варианты и слитные конструкции CFI могут быть очищены посредством хроматографии на катионообменных и/или анионообменных матрицах и необязательно методом эксклюзионной хроматографии. Варианты и слитные конструкции CFI могут быть оптимально подвергнуты замене буфера для получения любого подходящего буфера, известного в данной области техники. Чистоту можно оценивать любым способом, известным в данной области техники, включая гель-электрофорез, ортогональные методы ВЭЖХ, окрашивание и спектрофотометрические методы.

III. Применения вариантов CFI и слитных конструкций CFI

[0153] Варианты и слитные конструкции CFI согласно описанию могут использоваться для модуляции системы комплемента.

[0154] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен модулировать классический и лектиновый пути комплемента.

[0155] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен модулировать альтернативный путь комплемента.

[0156] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен уменьшать амплификацию системы комплемента.

[0157] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать расщепление C3b.

[0158] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать расщепление C4b.

[0159] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать образование C4c.

[0160] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать образование iC3b.

[0161] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать образование C3dg из iC3b.

[0162] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать образование C3c из iC3b.

[0163] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен снижать уровень α -цепи C3b.

[0164] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать гидролиз пептидного субстрата.

[0165] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать протеолиз макромолекулярного белкового субстрата.

[0166] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен снижать уровень или функцию мембраноатакующего комплекса (MAC).

[0167] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен снижать наблюдаемый гемолиз.

[0168] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать расщепление C3b в отсутствие кофактора, например, независимым от кофактора образом.

[0169] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вариант CFI или слитный конструкт CFI согласно описанию способен увеличивать расщепление C4b в отсутствие кофактора, например, независимым от кофактора образом.

[0170] Варианты CFI и слитные конструкты согласно описанию могут использоваться для терапии субъекта. В настоящем документе субъект включает в себя любого субъекта-млекопитающего и включает в себя приматов, грызунов, домашних животных, животных из зоопарка и животных-компаньонов. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человеческого субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект-млекопитающее представляет собой субъекта-примата, не являющегося человеком.

A. Варианты CFI и слитные конструкты для модуляции системы комплемента

[0171] В настоящем документе предложен способ модуляции системы комплемента, включающий приведение образца *in vitro* или ткани *in vivo* в контакт с любым из вариантов или слитных конструктов CFI, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой плазму.

B. Лечение нефтальмологических заболеваний

[0172] В некоторых вариантах осуществления слитные конструкты CFI, предложенные в настоящем документе, используются для лечения нефтальмологического заболевания у субъекта. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ лечения офтальмологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из вариантов или слитных конструктов CFI, предложенных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе.

[0173] В некоторых вариантах осуществления нефталъмологическое заболевание характеризуется дефицитом CFI. В некоторых вариантах осуществления нефталъмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента.

[0174] В некоторых вариантах осуществления нефталъмологическое заболевание представляет собой системное острое показание. В некоторых вариантах осуществления нефталъмологическое заболевание представляет собой системное острое показание, выбранное из группы, состоящей из: острого гломерулонефрита, острого повреждения почек, острого респираторного дистресс-синдрома, бактериального менингита, кровоизлияния в мозг, ожогов, коронавирусной инфекции, инфекции вируса Эпштейна — Барр, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, ишемического реперфузионного повреждения, болезни Лайма, инфаркта миокарда, трансплантации органов, пародонтита, пневмонии, преэклампсии, шистосомоза, сепсиса, инсульта, тромбоэмболии и травматического повреждения головного мозга.

[0175] В некоторых вариантах осуществления нефталъмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание. В некоторых вариантах осуществления нефталъмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание, выбранное из группы, состоящей из следующего: болезнь Альцгеймера, ассоциированный с антинейтрофильным цитоплазматическим антителом (ANCA) васкулит, антифосфолипидный синдром, астма, атеросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), аутоиммунная гемолитическая анемия, буллезный пемфигоид (BP), С3-гломерулопатия, хроническая почечная недостаточность, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), холодовая агглютининовая болезнь (CAD), болезнь Крона, диабетическая нейропатия, генерализованная миастения гравис (gMG), гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Гийена — Барре (GBS), наследственный ангионевротический отек (HAE), гнойный гидраденит (HS), IgA-нефропатия (IgAN), волчаночный нефрит (LN), мембранозный гломерулонефрит (MN), микроскопический полиангиит (MPA), мотонейронная болезнь, мультифокальная моторная нейропатия (MMN), рассеянный склероз (MS), инсулинонезависимый диабет, остеоартрит, панкреатит, болезнь Паркинсона, ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH), посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, энтеропатия с

белковой дистрофией, псориаз, гангренозная пиодермия, ревматоидный артрит, шизофрения (SZ), системная красная волчанка (СКВ), иммунная тромбоцитопения (ITP) и язвенный колит, миастенический синдром Ламперта — Итона (LEMS), синдром CHAPLE (дефицит CD55), тромботическая микроангиография (ТМА) и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), болезнь Хантингтона и ишемические реперфузионные повреждения.

[0176] В некоторых вариантах осуществления варианты или слитные конструкции CFI, предложенные в настоящем документе, имеют улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа. В некоторых вариантах осуществления улучшенная характеристика представляет собой повышение активности, причем повышение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и/или C4b. Эффективность и специфичность вариантов CFI, предложенных в настоящем документе, могут быть настроены для конкретных терапевтических показаний. В некоторых вариантах осуществления варианты или слитные конструкции CFI, предложенные в настоящем документе, представляют собой деструкторы C3b. В некоторых вариантах осуществления деструкторы C3b используются для лечения заболеваний. В некоторых вариантах осуществления варианты CFI, предложенные в настоящем документе, представляют собой деструкторы C4b и используются для лечения заболеваний. Например, заболевания, которые можно лечить с использованием деструкторов C4b, включают в себя, без ограничений, неофтальмологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание. В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание, выбранное из группы, состоящей из следующего: болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), ассоциированный с антинейтрофильным цитоплазматическим антителом (ANCA) васкулит, антифосфолипидный синдром, астма, атеросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), аутоиммунная гемолитическая анемия, буллезный пемфигоид (BP), C3-гломерулопатия, хроническая почечная недостаточность, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), холодовая агглютининовая болезнь (CAD), болезнь Крона, диабетическая нейропатия, генерализованная миастения гравис (gMG), гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Гийена — Барре (GBS),

наследственный ангионевротический отек (НАЕ), гнойный гидраденит (HS), IgA-нефропатия, волчаночный нефрит (LN), мембранозный гломерулонефрит (MN), микроскопический полиангиит (МРА), мотонейронная болезнь, мультифокальная моторная нейропатия (ММН), рассеянный склероз (MS), инсулинонезависимый диабет, остеоартрит, панкреатит, болезнь Паркинсона, ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH), посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, энтеропатия с белковой дистрофией, псориаз, гангренозная пиодермия, ревматоидный артрит, шизофрения (SZ), системная красная волчанка (СКВ), иммунная тромбоцитопения (IC-ITP), аутоиммунная гемолитическая анемия с тепловыми антителами (wAIHA), иммунокомплексный мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (IC-MPGN) и язвенный колит, миастенический синдром Ламперта — Итона (LEMS), синдром CHAPLE (дефицит CD55), тромботическая микроангиография (ТМА) и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), болезнь Хантингтона и ишемические реперфузионные повреждения.

[0177] В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание является не онкологическим.

[0178] В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание является онкологическим. В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание является онкологическим и характеризуется солидными опухолями или опухолями жидких тканей. В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание характеризуется солидными опухолями и выбрано из группы, состоящей из: колоректальных опухолей, гормонорезистентного рака предстательной железы, меланомы, метастатического рака молочной железы, метастатического колоректального рака, метастатического рака пищевода, метастатического рака поджелудочной железы, метастатического рака желудка, назофарингеальной карциномы, немелкоклеточного рака легкого, опухолей поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы и опухолей желудка. В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание характеризуется опухолями жидких тканей и выбрано из группы, состоящей из: острого миелогенного лейкоза, В-клеточной лимфомы и болезни Ходжкина.

С. Варианты CFI и слитные конструкторы для лечения офтальмологических заболеваний

[0179] В некоторых вариантах осуществления варианты или слитные конструкторы CFI, предложенные в настоящем документе, используются для лечения офтальмологического заболевания у субъекта. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ лечения офтальмологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из вариантов или слитных конструкторов CFI, предложенных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе.

[0180] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание характеризуется дефицитом CFI. В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента.

[0181] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание характеризуется наличием дисфункционального гена CFI. В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента и низкими уровнями CFI.

[0182] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из: диабетического отека макулы (DME), диабетической ретинопатии, сухой возрастной дегенерации макулы (AMD), глаукомы, кератоконъюнктивита, нейромиелиита зрительного нерва со спектральным расстройством (NMOSD), открытоугольной глаукомы, полипоидной хориоидальной васкулопатии, болезни Штаргардта, увеита и витреоретинопатии.

[0183] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание является не онкологическим.

D. Варианты комбинированной терапии

[0184] Любой из терапевтических вариантов или слитных конструкторов CFI, предложенных в настоящем документе, можно вводить в качестве монотерапии или можно применять в комбинации с любыми другими известными лекарственными

средствами или вариантами лечения. Другие известные лекарственные средства или варианты лечения могут быть предназначены для заболеваний, связанных с дисрегуляцией системы комплемента, или могут быть связаны с дефицитом CFI. В некоторых вариантах осуществления заболевания могут быть офтальмологическими. В некоторых вариантах осуществления заболевания могут быть неофтальмологическими. В некоторых вариантах осуществления терапевтические варианты или слитные конструкторы CFI, предложенные в настоящем документе, вводят совместно с одним или более ингибиторами C5. В некоторых вариантах осуществления ингибитор C5 представляет собой экулизумаб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор C5 представляет собой цемдисирам.

Е. Введение

[0185] Варианты CFI и слитные конструкторы, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в виде терапевтических средств на основе полипептидов или терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот.

[0186] Такое лечение, как предусмотрено в настоящем документе, включает в себя как введение варианта CFI согласно описанию или слитного конструктора согласно описанию, так и введение одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих CFI согласно описанию или слитный конструктор согласно описанию. Соответственно, в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие варианты CFI согласно описанию, слитные конструкторы CFI согласно описанию, а также фармацевтические композиции, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих варианты CFI согласно описанию и кодирующих слитные конструкторы согласно описанию.

[0187] Соответственно, в настоящем документе предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты CFI и слитные конструкторы согласно описанию, и они доставляются нуждающемуся субъекту в составе генной терапии на основе нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вариант CFI или слитный конструктор согласно описанию, доставляется в составе генной терапии на основе вирусного вектора (например, терапия на основе лентивируса, терапия на основе аденовируса, терапия на основе аденоассоциированного вируса и т. п.). В некоторых

вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вариант CFI или слитный конструктор согласно описанию, доставляется в виде голый нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вариант CFI или слитный конструктор согласно описанию, доставляется внутри липосомы. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вариант CFI или слитный конструктор согласно описанию, доставляется в составе наночастицы. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вариант CFI или слитный конструктор согласно описанию, доставляется в составе вирусоподобной частицы.

[0188] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI и слитные конструкторы, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в виде терапевтических средств на основе полипептидов.

[0189] Введение *in vivo* терапевтических вариантов CFI или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе (терапевтические средства на основе белков или нуклеиновых кислот), можно осуществлять внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутрибрюшинно, внутриорбитально, интратекально, интравентрикулярно, интраназально, трансмукозально, путем имплантации или путем ингаляции. Введение терапевтических слитных конструкторов может быть выполнено с любыми подходящими эксципиентами, носителями или другими агентами для обеспечения подходящей или улучшенной переносимости, переноса, доставки и т. п.

[0190] В примерах осуществления введение терапевтических вариантов CFI или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, представляет собой подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления подкожное введение представляет собой введение ежедневно, через день, два раза в неделю или еженедельно.

[0191] В некоторых вариантах осуществления введение терапевтических вариантов CFI или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, представляет собой внутривенное введение.

[0192] В настоящем документе обычно предусматривается, что варианты CFI или слитные конструкторы, описанные в настоящем документе, доставляются в активированной

двухцепочечной форме. Однако в некоторых случаях могут быть доставлены неактивные варианты CFII или слитные конструкторы в неактивной одноцепочечной форме. В некоторых вариантах осуществления доставляемый состав содержит как одноцепочечные неактивные, так и двухцепочечные активные формы.

Ф. Дозировки

[0193] В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических вариантов CFII или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в дозе от примерно 0,05 мг/кг до примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет примерно 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтических вариантов CFII или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, представляет собой подкожное введение в дозе примерно 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 2,5 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 3,5 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 4,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 5,5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 6,5 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 7,5 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 8,5 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 9,5 мг/кг или примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтических вариантов CFII или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, представляет собой внутривенное введение в дозе примерно 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 2,5 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 3,5 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 4,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 5,5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 6,5 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 7,5 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 8,5 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 9,5 мг/кг или примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтических вариантов CFII или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, представляет собой ежедневное введение, введение через день, еженедельное введение или введение два раза в неделю.

[0194] В некоторых вариантах осуществления целевой уровень терапевтических слитных конструкторов в плазме может составлять примерно 0,05 мг/кг, 0,1 мкг/мл, примерно 0,5 мкг/мл, примерно 1 мкг/мл, примерно 1,5 мкг/мл, примерно 2 мкг/мл, примерно

2,5 мкг/мл, примерно 3 мкг/мл, примерно 3,5 мкг/мл, примерно 4 мкг/мл, примерно 4,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, примерно 5,5 мкг/мл, примерно 6 мкг/мл, примерно 6,5 мкг/мл, примерно 7 мкг/мл, примерно 7,5 мкг/мл, примерно 8 мкг/мл, примерно 8,5 мкг/мл, примерно 9 мкг/мл, примерно 9,5 мкг/мл, примерно 10 мкг/мл, примерно 10,5 мкг/мл, примерно 11 мкг/мл, примерно 11,5 мкг/мл, примерно 12 мкг/мл, примерно 12,5 мкг/мл, примерно 13 мкг/мл, примерно 13,5 мкг/мл, примерно 14 мкг/мл, примерно 14,5 мкг/мл, 15 мкг/мл, примерно 15,5 мкг/мл, примерно 16 мкг/мл, примерно 16,5 мкг/мл, примерно 17 мкг/мл, примерно 17,5 мкг/мл, примерно 18 мкг/мл, примерно 18,5 мкг/мл, примерно 19 мкг/мл, примерно 19,5 мкг/мл, примерно 20 мкг/мл, примерно 20,5 мкг/мл, примерно 21 мкг/мл, примерно 21,5 мкг/мл, примерно 22 мкг/мл, примерно 22,5 мкг/мл, примерно 23 мкг/мл, примерно 23,5 мкг/мл, примерно 24 мкг/мл, примерно 24,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, примерно 25,5 мкг/мл, примерно 26 мкг/мл, примерно 26,5 мкг/мл, примерно 27 мкг/мл, примерно 27,5 мкг/мл, примерно 28 мкг/мл, примерно 28,5 мкг/мл, примерно 29 мкг/мл, примерно 29,5 мкг/мл, примерно 30 мкг/мл. Целевой уровень может составлять примерно 10 мкг/мл, примерно 25 мкг/мл, примерно 50 мкг/мл, примерно 100 мкг/мл, примерно 150 мкг/мл, примерно 200 мкг/мл, примерно 250 мкг/мл или даже примерно 300 мкг/мл. Примеры слитных конструкторов, которые могут быть введены нуждающемуся в этом субъекту для достижения целевого уровня примерно 20 мкг/мл, могут включать в себя CFI-HSA, содержащий CFI, соответствующий CFI дикого типа.

Г. Составы

[0195] Фармацевтические композиции, содержащие вариант CFI или слитные конструкторы согласно описанию, могут быть приготовлены любым общепринятым способом путем смешивания выбранного количества полипептида с одним или более физиологически приемлемыми носителями или эксципиентами для применения в способах лечения, предложенных в настоящем документе. Выбор носителя или эксципиента находится в пределах компетенции специалиста по введению и может зависеть от ряда параметров. Они включают в себя, например, способ введения и подлежащее лечению заболевание. Фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, могут быть приготовлены для однократного введения дозы (прямого) или для разбавления или другой модификации. Концентрации соединений в составах эффективно обеспечивают при

введении доставку количества, которое эффективно для предполагаемого лечения. Как правило, композиции приготовлены для однократного введения, но это не обязательно.

Н. Фармацевтические композиции

[0196] В настоящем описании также предложены фармацевтические композиции, содержащие любой из вариантов CFI или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, и необязательно фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной. Фармацевтические композиции могут быть составлены для обеспечения совместимости с предполагаемыми путями введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно описанию подходят для введения субъекту-человеку или другому примату, не являющегося человеком. В примерах осуществления фармацевтическая композиция приготовлена для подкожного введения.

I. Наборы и изделия промышленного производства для терапевтических вариантов CFI и слитных конструкторов

[0197] В описании также предложен набор или изделие промышленного производства, содержащие любой из вариантов CFI или слитных конструкторов, описанных в настоящем документе, или любую фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать в себя материалы с инструкциями по осуществлению любого из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать в себя стерильные контейнеры или флаконы для хранения слитных конструкторов и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать в себя стерильные устройства доставки для введения слитных конструкторов и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изделие промышленного производства содержит любую фармацевтическую композицию согласно описанию.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспрессия, очистка, активация и *in vitro* сиалирование вариантов CFI и слитных белков

Общее описание

[0198] В примере 1 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом человеческого CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0199] Белок CFI дикого типа-HSA экспрессируют в клетках яичника китайского хомячка (CHO), очищают аффинной очисткой с антителами к альбумину, активируют фурином и очищают с помощью колонок для разделения по размеру. Активированный белок CFI-HSA подвергали сиалированию *in vitro* для увеличения общего сиалирования CFI-HSA. Наконец, сиалированный белок очищали с использованием аффинной очистки с антителами к альбумину и проводили заключительную обработку колоночной эксклюзионной хроматографией.

Экспрессия

[0200] Синтезировали ген CFI-HSA (SEQ ID NO: 21) (ThermoFisher Scientific, Geneart, г. Регенсбург, Германия) с человеческим сывороточным альбумином на аминоконце белка CFI. Получали белок с сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 2, которую удаляли во время экспрессии. Аминоконцевая альбуминовая метка была присоединена к гену CFI через линкер (SEQ ID NO: 6). Ген CFI-HSA встраивали в экспрессионный вектор (Lake Pharma, г. Хейворд, штат Калифорния, США) с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Полученную плазмидную ДНК трансформировали в *E. coli*. Трансфицированную *E. coli* выращивали в 200 мл среды LB для экспрессии плазмидной ДНК и собирали с использованием стандартных методик. Плазмидную ДНК анализировали в агарозном геле для оценки качества и подтверждения последовательности перед переходом к трансфекции.

[0201] 1,0 литра суспензии клеток TupaCHO™ высевали во встряхиваемый флакон и размножали с использованием бессывороточной среды с химически определенным составом. В день трансфекции размноженные клетки высевали в новый флакон со свежей

средой. Плазмидную ДНК временно трансфицировали в клетки CHO с использованием липофектамина 2000 (ThermoFisher Scientific). Клетки инкубировали в виде культуры с периодическим добавлением питательных веществ до конца производственного цикла. Белок экспрессировали в течение 14 дней при 37 °C при 125 об/мин, при концентрации CO₂ 8%. Клетки центрифугировали и надосадочную жидкость собирали для очистки секретированного CFI-HSA в конце 14-дневной экспрессии.

Очистка

[0202] Супернатант с экспрессированным белком CFI-HSA пропускали через колонку CaptureSelect™ объемом 10 мл с потоком под действием силы тяжести, заполненную аффинной матрицей к человеческому альбумину (ThermoFisher Scientific). Связанный с колонкой белок промывали 20 mM натрий-фосфатным буфером в количестве, равном 10 объемам колонки. Связанный белок CFI-HSA элюировали в две стадии: сначала 20 mM буфером трис-HCl, pH 7,0, с 2 M MgCl₂ (3 объема колонки), а затем 20 mM лимонной кислотой, pH 3,0 (3 объема колонки). Элюат с обеих стадий 1 и 2 собирали в виде фракций объемом 5 мл. Каждую фракцию элюирования на стадии 2 нейтрализовали 10% нейтрализующего буфера (1,5 M трис-HCl, pH 7,4). Все фракции анализировали посредством ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а полосы визуализировали с помощью SimplyBlue™ SafeStain (ThermoFisher Scientific). CFI-HSA выявляется как полоса 130 кДа в геле в невосстанавливающих условиях и как полосы 102 кДа и 28 кДа в геле в восстанавливающих условиях. Фракции с максимальной концентрацией и чистотой CFI-HSA объединяли для дальнейшей обработки.

Активация фурином

[0203] CFI-HSA экспрессируется в виде неактивного одноцепочечного белка-предшественника и активируется фурином, другой сериновой протеазой. Фурин представляет собой эндопротеазу, которая расщепляет CFI по его консервативной последовательности RRKR (также называемой последовательностью распознавания фурином), что приводит к образованию тяжелой и легкой цепей, соединенных дисульфидной связью. Обработанный фурином зрелый двухцепочечный белок является активированной формой белка CFI.

[0204] Расщепление CFI-HSA для получения белка в его активированной форме проводили путем инкубации 4 мкг рекомбинантного фурина на мг очищенного CFI-HSA в трис-NaCl (трис-буферном солевом растворе), 2,5 мМ CaCl₂ и 0,5% CHAPS при 30 °С в течение 18 часов. Концентрацию белка CFI-HSA поддерживали на уровне 1,4 мг/мл. Это приводит к более чем 90% активации белка. Активированный белок отделяли от инактивированного CFI-HSA и других белков посредством эксклюзионной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию (SEC) проводили с использованием колонки HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences) и фосфатного буферного солевого раствора (PBS, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, pH 7,4) в качестве подвижной фазы. Собранные фракции анализировали посредством капиллярного электрофореза с ДСН (КЭ-ДСН) (LabChip GXII, Perkin Elmer). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и анализировали посредством эксклюзионной СВЭЖХ.

Сиалирование in vitro

[0205] Активированный белок CFI-HSA подвергали сиалированию *in vitro*. Вкратце, сиалирование проводили в ходе двухстадийной ферментативной реакции. Сначала проводили реакцию галактозилирования CFI-HSA в объеме 200 мкл, используя молярное соотношение 1 : 200 фермента галактозилтрансферазы (GalT1) и CFI-HSA в буфере, содержащем 10 мМ УДФ-галактозы, 5 мМ MnCl₂ и 100 мМ MES, pH 6,5. Галактозилированный CFI-HSA очищали от реакционной смеси посредством аффинной хроматографии на колонке CaptureSelect™ для человеческого альбумина, как описано ранее. Затем проводили реакцию сиалирования в объеме 250 мкл с использованием молярного соотношения 1 : 50 фермента альфа-2,6-сиалилтрансферазы и очищенного CFI-HSA в буфере, содержащем 80 мкМ щелочной фосфатазы, 6,1 мМ CMP-NANA, 10 мМ ZnCl₂ и 200 мМ MES, pH 6,5, при 37 °С в течение 1 часа. Сиалированный белок CFI-HSA очищали из реакционной смеси посредством аффинной хроматографии на колонке CaptureSelect™ для человеческого альбумина. Величину и характеристики цепи сиаловой кислоты на CFI-HSA определяли с использованием аналитического сервиса Agilent/Prozyme методом GS-SAP для количественного определения общей сиаловой кислоты (Agilent GS48) и масс-спектрофотометрического (MS) анализа (аналитическая служба Lake Pharma), как более подробно описано ниже.

[0206] Вкратце, количественное определение общей сиаловой кислоты проводили путем смешивания 20 мкл каждого образца с 10 мкл высвобождающего реагента в 96-луночном планшете. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 часов при 80 °С. Образцы охлаждали до комнатной температуры и к каждому образцу добавляли 10 мкл реагента мечения для дальнейшей инкубации в течение 3 часов при 50 °С. Образцы снова охлаждали до комнатной температуры и добавляли 160 мкл деионизированной (dI) воды, доводя общий объем до 200 мкл. 10 мкл образца вносили в колонку Agilent UHPLC Poroshell C18 и пропускали со скоростью потока 0,4 мл/мин при 30 °С в 4% метаноле, 8% ацетонитриле (АЦН) в воде (линия А1) и 100% АЦН (линия В1). Пики регистрировали при длине волны 373/448 нм. Стандартную кривую зависимости общей площади пика от количества сиаловой кислоты в пикомолях (пмоль) получали путем пропускания 1–2000 пмоль NANA (N-ацетилнейраминовой кислоты, Neu5Ac), поставляемой в комплекте с колонкой. Общее содержание сиаловой кислоты в каждом образце количественно определяли путем сравнения площади пика образцов со стандартной кривой.

[0207] Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью стандартного масс-спектрометра для Q-TOF с трипсином. Вкратце, все образцы обрабатывали, восстанавливали и алкилировали с помощью DTT и йодоацетамида с последующим расщеплением трипсином. Расщепленные образцы анализировали с помощью аппарата для СВЭЖХ Waters ACQUITY UPLC, соединенного с масс-спектрометром Xevo G2-XS-QTOF, с использованием колонки с белком VEN C18.

Заключительная обработка

[0208] Очищенный белок CFI-HSA подвергали эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием колонки HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences) и фосфатного буферного солевого раствора в качестве подвижной фазы. Собранные фракции анализировали посредством капиллярного электрофореза с ДСН (КЭ-ДСН) (LabChip GXII, Perkin Elmer). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, концентрацию доводили до 5 мг/мл и образцы мгновенно замораживали для хранения при -80 °С.

Экспрессия и очистка вариантов CFI-HSA

[0209] ДНК для вариантов CFI-HSA получали либо путем синтеза, либо путем сайт-направленного мутагенеза с использованием стандартных методик. Белки экспрессировали в 250 мл суспензии в клетках TunaCHO™, как описано в настоящем документе применительно к белку CFI-HSA дикого типа, за исключением того, что экспрессию проводили в течение 7 дней вместо 14 дней. Через 7 дней клетки центрифугировали и кондиционированную среду пропускали через колонку CaptureSelect™ с потоком под действием силы тяжести, заполненную аффинной матрицей к человеческому альбумину (ThermoFisher Scientific). Связанный с колонкой белок промывали 20 мМ натрий-фосфатным буфером в количестве, равном 10 объемам колонки. Связанный белок CFI-HSA элюировали буфером 20 мМ трис-HCl, pH 7,0, с 2 М MgCl₂ (3 объема колонки) и собирали в виде фракций объемом 5 мл. CFI-HSA или его варианты подвергали замене буфера (либо путем диализа, либо с помощью центрифужного концентратора) на 30 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂, pH 7,4. Рекомбинантный человеческий фурин в молярном соотношении 1 : 25 (фурин : CFI-HSA) добавляли к CFI-HSA и реакционную смесь инкубировали при 30 °С в течение 16 часов. Два микрограмма активирующей смеси анализировали в 9% геле для ДСН-ПААГ для оценки эффективности активации. Как правило, достигалась активация более 80%.

N-концевое слияние с альбумином обеспечивает растворимость и облегчает активацию CFI-HSA

[0210] Активацию вариантов CFI и слитных белков, содержащих такие варианты согласно описанию, можно сравнивать с CFI дикого типа или друг с другом. Для этого генный конструкт WT-CFI экспрессировали по существу так, как описано выше применительно к CFI-HSA. Чистоту рекомбинантного белка можно оценить посредством ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в присутствии или в отсутствие фурина. Ранее в заявке РСТ № РСТ/US2021/037278 было показано, что существует значительное и неожиданное преимущество N-концевой метки HSA (в SEQ ID NO: 21) для поддержания растворимости, монодисперсности и эффективной активации фурином. То же самое можно оценивать для вариантов CFI и слитных белков согласно описанию.

Пример 2. Характеризация посредством анализа пептидолитической активности

[0211] В примере 2 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0212] Протеолитическая активность слитных белков CFI-HSA дикого типа и варианта CFI-HSA (в совокупности называемых в настоящем документе «белки CFI-HSA») может быть проверена путем последующего расщепления хромогенных субстратов с использованием хромофора. Для этого анализа выбран пептидный субстрат S-2288 (Chromogenix), поскольку он чувствителен к широкому спектру сериновых протеаз. Пептидолитическую активность белков CFI-HSA измеряют по скорости генерации p-нитроанилина (pNA) при расщеплении субстрата, оцениваемой спектрофотометрически при 405 нм.

[0213] Белки CFI-HSA разбавляют до начальной концентрации 400 нМ в 100 мкл HBS/BSA (30 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 0,2% BSA, pH 7,4) в 96-луночном планшете без покрытия (Nunc). Рабочий исходный раствор 4 мМ S-2288 готовят в HBS/BSA в отдельной пробирке. Микропланшет и разбавленный хромогенный субстрат предварительно нагревают до 37 °С в течение 5 минут. Анализ инициируют добавлением 100 мкл предварительно нагретого S-2288 в лунки микропланшета, содержащего белки CFI-HSA. Это дает конечную концентрацию 200 нМ белков CFI-HSA и 2 мМ субстрата S-2288 в объеме реакционной смеси 200 мкл. Скорость расщепления субстрата регистрируют каждые 30 секунд в течение 3 часов при 37 °С при 405 нм с использованием считывателя микропланшетов (спектрофотометр для микропланшетов Multiskan™ GO, Thermo Scientific). Гидролитическую активность CFI-HSA дикого типа в отношении пептидов берут за 100%, и рассчитывают процент активности пептидолиза для вариантов CFI-HSA.

Пример 3. Характеризация посредством анализа расщепления С3b

[0214] В примере 3 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0215] Анализ расщепления С3b представляет собой функциональный анализ, который может использоваться для определения способности CFI дикого типа, CFI-HSA дикого

типа и вариантов CFI и CFI-HSA (в совокупности называемых в настоящем документе «белки CFI-HSA») расщеплять свой естественный субстрат, C3b. Пример протокола представлен в настоящем документе. Белки CFI-HSA инкубируют с C3b и усеченным фактором H (мини-FH) при 37 °С для анализа расщепления C3b. Ранее было показано, что мини-FH является функционально активным и поддерживает CFI-опосредованное расщепление C3b (*J Immunol.* 2013 Jul 15;191(2):912–21). Затем отслеживают расщепление C3b на более мелкие фрагменты с течением времени посредством ДСН-ПААГ.

[0216] Сначала для каждого варианта CFI-HSA готовили главную реакционную смесь комнатной температуры, содержащую конечные концентрации 500 нМ мини-FH и 5 нМ белков CFI-HSA в буфере HBS (30 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, pH 7,4). Главные реакционные смеси доводят до 37 °С и оставляли уравниваться в течение 5 минут. Реакцию расщепления инициировали добавлением C3b в конечной концентрации 0,5 мкМ. Извлекали по 20 мкл образцов главных смесей для каждой измеряемой временной точки и гасили добавлением 5X восстанавливающего ДСН-буфера для образца. Образцы пропускали через 9% гель для ДСН-ПААГ и расщепление C3b визуализировали окрашиванием по Кумасси. Величину расщепления C3b количественно оценивают посредством денситометрии. Активность расщепления C3b CFI-HSA дикого типа берут за 100%, и рассчитывают процент активности расщепления C3b для вариантов CFI-HSA.

[0217] Чтобы сравнить скорость расщепления C3b каждым вариантом CFI-HSA с таковой для CFI-HSA дикого типа, можно параллельно изучать временной профиль расщепления C3b белками CFI-HSA. Если наблюдается исчезновение полосы C3(альфа)' с молекулярной массой 114 кДа (на ДСН-ПААГ), это является признаком расщепления C3b. Это связано с тем, что C3b включает в себя две цепи: (альфа)' и бета. Для количественной оценки может быть выполнена денситометрия соответствующей окрашенной полосы, с коррекцией на среднее фоновое окрашивание (интенсивность дорожки за пределами полосы).

[0218] Видимую скорость потери интенсивности полосы можно оценить путем аппроксимации данных об интенсивности полосы в зависимости от времени простой формулой экспоненциального спада, получая в результате константу (k) кажущейся скорости расщепления C3b. Относительную скорость расщепления C3b вариантами CFI-

HSA рассчитывали путем деления на соответствующую скорость для дикого типа: $k(\text{варианта}) / k(\text{контроля ДТ})$. Эту процедуру выполняют во множестве независимых экспериментов с ДСН-ПААГ и рассчитывают среднее значение $k(\text{варианта}) / k(\text{контроля ДТ})$ вместе с соответствующим стандартным отклонением.

[0219] Измеряли процентную долю альфа-цепи C3b, оставшейся после инкубации, в зависимости от времени, для оценки активности тестируемого варианта CFI по сравнению с CFI дикого типа. Поскольку даже незначительные отличия в расщеплении C3b могут вызывать заболевание, такое как атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), варианты, которые демонстрируют различия, могут быть пригодны для повышения активности системы комплемента в борьбе с заболеваниями, вызванными C3.

Пример 4. Количественный анализ активности расщепления C3b для CFI-HSA, проводимый посредством измерения образования C3dg посредством иммунофлуорометрического анализа с временным разрешением (TRIFMA)

[0220] В примере 4 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0221] Анализ C3dg можно использовать для определения расщепления C3b, вызванного фактором I комплемента (CFI), или его вариантами, или слитными белками. Образование C3dg может быть использовано в качестве количественного анализа активности расщепления C3b посредством CFI-HSA и в одном возможном анализе измеряется посредством иммунофлуорометрического анализа с временным разрешением (TRIFMA). Пример протокола представлен в настоящем документе.

[0222] Путь комплемента в сыворотке крови человека активируют с помощью термоагрегированного IgG. Влияние плазменных белков CFI или CFI-HSA, включая варианты CFI-HSA, на расщепление C3b измеряют путем захвата C3dg с использованием антитела к C3dg на микротитровальном планшете. Связанный C3dg обнаруживают с помощью комбинации биотинилированного антитела к C3dg и меченого европием стрептавидина и измеряют посредством флуорометрии с временным разрешением.

[0223] Планшеты для микротитрования MaxiSorb (Nunc) покрывали 100 мкл моноклонального крысиного антитела IgM против C3dg человека в концентрации 2 мкг/мл в буфере для покрытия 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6 посредством инкубации в течение ночи при комнатной температуре. Оставшиеся сайты связывания с белком блокировали путем инкубации с HSA в концентрации 1 мг/мл в TBS. Несвязанный HSA отмывали TBS-Tween.

[0224] Испытуемые образцы разбавляли в 1–6 разведениях человеческой сыворотки до требуемых концентраций в буфере для разведения в объеме 100 мкл (0,14 M NaCl, 10 mM трис, 14 mM азида натрия, с 0,05% (об./об.) Tween 20 (TBS/Tween), 1 мг/мл HSA и 0,1 мг/мл агрегированного при нагревании IgG. Четырехкратные шеститочечные разведения выполняли для каждого варианта CFI-HSA для охвата диапазона концентраций вариантов от 3132 нМ до 3 нМ. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 90 минут и гасили 10 mM EDTA. Для захвата полученного C3dg 100 мкл каждой реакционной смеси добавляли в покрытые антителами лунки для микротитрования, и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Для обнаружения связанного C3dg в лунки добавляли по 100 мкл биотинилированного кроличьего антитела к C3dg (ДАКО) в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывки комбинацией Eu³⁺-стрептавидин (Perkin Elmer) в лунки добавляли 25 мкМ EDTA и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (1/1000). После промывки в каждую лунку добавляли по 200 мкл усиливающего буфера (Ampliqon). Планшеты считывали с помощью считывателя DELFIA Victor5+ (Perkin Elmer) методом флуориметрии с временным разрешением.

Пример 5. Характеризация по анализу гемолиза

[0225] Анализ гемолиза может использоваться для измерения гемолитической функции соединения, использующего путь комплемента. Фактор I комплемента (CFI) опосредует расщепление C3b со своим кофактором фактором H (FH) в рамках альтернативного пути системы комплемента. Для проверки гемолитической функции в альтернативном пути C3-дефицитную человеческую сыворотку с добавкой человеческого C3 инкубировали с вариантами / слитными белками согласно описанию и кроличьим раствором Alsevers, и общий гемолиз измеряли спектрофотометрически. Результаты анализа гемолиза могут

быть получены с FH или без него, чтобы понять влияние кофактора FH на общий гемолиз. Пример протокола представлен в настоящем документе. Вкратце, 12 мл эритроцитов кролика (RBC) дважды промывали буфером GVB (желатиновый вероналовый буфер: Sigma, с 8 mM EGTA и 10 mM MgCl₂) и ресуспендировали в 12 мл ледяного буфера GVB. В C3-дефицитную человеческую сыворотку добавляли 1 мкМ человеческого C3, исходя из предыдущих наблюдений, что 1 мкМ C3 поддерживает максимальный гемолиз в этой системе. Готовили трехкратные восьмиточечные последовательные разведения вариантов / слитных белков в буфере GVB для получения концентраций в диапазоне от 260 мкг/мл до 0,11 мкг/мл в реакционной смеси. Сначала в 96-луночном планшете готовили по 50 мкл реакционной смеси для каждой концентрационной точки путем добавления 62,8% человеческой сыворотки и различных концентраций вариантов / слитных белков с 200 мкг/мл FH или без него. Реакцию гемолиза начинали с добавления 50 мкл эритроцитов кролика и инкубировали в планшете для микротитрования при 37 °C в течение 30 минут. Все анализы выполняли в трех повторностях, и все разведения выполняли в буфере GVB. Для контроля с максимальным гемолизом в эритроциты добавляли деионизированную воду, а для контроля без гемолиза добавляли 0,154 M NaCl. После инкубации планшет центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут и 90 мкл супернатанта переносили в другой 96-луночный планшет. Процент гемолиза количественно определяли путем измерения оптической плотности (OD) лизированных эритроцитов при 412 нм.

[0226] Поглощение при 412 нм преобразовали в процент гемолиза, взяв контроль с максимальным гемолизом за 100% и контроль с буфером за 0%.

[0227] На ФИГ. 9А–9В показаны кривые зависимости ответа от дозы, полученные в результате анализа гемолиза для CFI с кофакторным фактором H и без него соответственно. Кривые зависимости ответа от дозы получают посредством нелинейного регрессионного анализа и аппроксимации 4-параметрической сигмоидальной кривой в программном обеспечении Prism. Данные показали 50% активность альтернативного пути (AP₅₀) для CFI-HSA дикого типа с FH и для плазменного CFI с FH.

[0228] На ФИГ. 9С–9D показаны кривые зависимости ответа от дозы для процента ингибирования гемолиза, измеренного в классическом пути и альтернативном пути

соответственно с помощью плазменного CFI и CFI-HSA дикого типа. Эти фигуры показывают, что плазменный CFI и CFI-HSA дикого типа имеют эффективность, аналогичную человеческой сыворотке.

[0229] Эти данные показали, что при более высоких концентрациях как CFI-HSA, так и CFI-PD активны в анализе гемолиза. Ингибирующая активность CFI-HSA на альтернативном пути была аналогична активности CFI-PD в анализе гемолиза. Анализ гемолиза также показал, что ингибирующее действие CFI, как в случае CFI-HSA, так и CFI-PD, на альтернативный путь значительно увеличивалось с кофактором FH.

[0230] Можно измерить способность вариантов / слитных белков ингибировать классический путь гемолиза. Пример протокола представлен в настоящем документе. Эритроциты овец активируют антителами к SRBC (Amboceptor, Testline, Великобритания). SRBC суспендируют в желатиновом вероналовом буфере (GVB). В планшеты для анализа добавляют серию разведений вариантов CFI, а затем активированные SRBC и сыворотку, обедненную факторами В и I при концентрации ~1% (об./об.). Активированные SRBC инкубировали с испытуемыми образцами в течение 30 мин. Клетки осаждали и надосадочную жидкость переносили в отдельный планшет для считывания поглощения при 412 нМ. Процент лизиса рассчитывали следующим образом: $100 * (\text{поглощение в испытуемом образце}) / (\text{поглощение без CFI (0\% ингибирования)})$. По данным строили график и анализировали с использованием нелинейной регрессии по четырем параметрам (GraphPad Software, США). Значения IC₅₀ рассчитывали для данных из отдельных планшетов, а средние значения получали по значениям logIC₅₀ и преобразовывали в концентрацию (нМ), как указано в таблице 5.3.

[0231] Можно также измерить способность вариантов / слитных белков ингибировать альтернативный путь гемолиза. Пример протокола представлен в настоящем документе. Эритроциты овец активируют антителами к SRBC (Amboceptor, Testline, Великобритания). SRBC суспендировали в 8% (об./об.) нормальной человеческой сыворотке, обедненной факторами В и H, к которой добавляли экулизумаб для осаждения C3b. Активированные SRBC с нанесенным C3b инкубировали с полноразмерным фактором H (Complement Technologies, США) и исследуемыми препаратами. После 10-минутной инкубации добавляли факторы В и D (Complement Technologies, США) и

инкубировали еще в течение 10 минут. Наконец, добавляли сыворотку морской свинки (Sigma-Aldrich, Великобритания) и инкубировали в течение 20 мин. Клетки осаждали и надосадочную жидкость переносили в отдельный планшет для регистрации поглощения при 412 нМ. Процент лизиса рассчитывали следующим образом: $100 * (\text{поглощение в испытуемом образце}) / (\text{поглощение без CFI (0\% ингибирования)})$. По данным строили график и анализировали с использованием нелинейной регрессии по четырем параметрам (GraphPad Software, США). Значения IC50 рассчитывали для данных из отдельных планшетов, а средние значения получали для значений logIC50 и преобразовывали в концентрацию (нМ).

Пример 6. Фармакокинетическое моделирование для определения дозы у людей на основе данных, полученных на приматах, не являющихся человеком

[0232] Варианты / слитные белки можно протестировать на уровне концентрации в плазме после однократного подкожного введения в модельной системе, например с африканскими зелеными мартышками. Слитный конструкт содержал человеческий сывороточный альбумин (HSA) и CFI дикого типа (CFI-HSA). На ФИГ. 8А представлен график, показывающий измеренные концентрации слитного конструкта CFI-HSA по сравнению со свободным CFI после подкожного введения обезьянам в дозе 1 мг/кг. Слитный конструкт CFI-HSA демонстрировал возможность достижения целевого уровня около 20 мкг/мл. Измеримая концентрация слитного конструкта CFI-HSA сохранялась до 14 дней, а целевая концентрация примерно 20 мкг/мл измерялась в течение примерно 7 дней. Эти данные говорят в пользу еженедельного подкожного введения слитного конструкта CFI-HSA для терапевтического применения. Эти данные подтверждают, что еженедельное подкожное введение CFI-HSA может быть использовано в терапевтических целях у людей — сопоставимое моделирование может быть проведено для вариантов и слитных конструктов вариантов согласно описанию. На ФИГ. 8В показан график, представленный на ФИГ. 8А, с отдельными точками данных, изображенными вдоль кривых для дополнительной ясности.

Пример 7. Характеризация по анализам расщепления C3b и C4b

Реакции расщепления C3b

[0233] В примере 7 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0234] Один пример протокола для реакций расщепления с применением ДСН-ПААГ приведен ниже. Сначала для каждого варианта CFI-HSA готовили главную реакционную смесь комнатной температуры, содержащую конечные концентрации 500 нМ мини-FH и 500 нМ C3b в буфере HBS (30 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, pH 7,4). Главные реакционные смеси доводили до 37 °C и оставляли уравниваться в течение 5 минут. Реакцию расщепления инициировали добавлением белка CFI-HSA в конечной концентрации 5 нМ. Объем образца, соответствующий 0,6 мкг C3b, отбирали из главных смесей каждой измеряемой временной точки и гасили путем добавления 5X восстанавливающего ДСН-буфера для образцов. Образцы пропускали через 9 или 10% гель для ДСН-ПААГ и расщепление C3b визуализировали окрашиванием по Кумасси. Величину расщепления C3b количественно оценивали посредством денситометрии. Активность расщепления C3b CFI-HSA дикого типа брали за 100%, и рассчитывали процент активности расщепления C3b для вариантов CFI-HSA.

[0235] Другой пример протокола для реакций расщепления осуществлялся описанным ниже способом с измерением посредством твердофазного ИФА (ELISA). Реакции расщепления C3b проводили с использованием 1 нМ CFI (вариант или дикий тип), 500 нМ кофактора мини-FH и 500 нМ растворимого человеческого C3b, с инкубированием в течение 10 минут при 37 °C в солевом буферном растворе с HEPES (HBS). Реакцию гасили добавлением 1 М NaCl в HBS. Реакционные смеси дополнительно разбавляли до конечной концентрации 5 нМ C3b в буфере (HBS, 0,5 М NaCl, 0,05% Tween 20), после чего проводили ELISA на iC3b. Активность расщепления C3b определяли по количеству iC3b, образовавшегося в реакции расщепления. Количество образовавшегося iC3b анализировали с использованием набора для ELISA MicroVue iC3b A006 (Quidel). Анализ ELISA включает в себя микропланшет, покрытый специфическим к iC3b моноклональным антителом для захвата образовавшегося во время реакций iC3b, а также конъюгированного с HRP антитела против iC3b для детекции связанного iC3b и хромогенного субстрата. Регистрируемая оптическая плотность представляет собой относительную меру продукта iC3b, образовавшегося в реакциях расщепления. Кратность разность в активности расщепления C3b вариантами CFI относительно эталонной

молекулы, CFI-HSA дикого типа, рассчитывали посредством деления скорректированного по фону поглощения для вариантов CFI-HSA на скорректированное по фону поглощение для CFI-HSA дикого типа. В таблице 7.3 обобщенно представлены эти результаты, с представлением кратности различия медианного значения для каждого варианта CFI относительно медианного значения для эталонной молекулы. Кратности различий также рассчитывали по гелям для ДСН-ПААГ. Образцы для временного профиля расщепления C3b анализировали на 9 или 10% геле для ДСН-ПААГ и расщепление C3b визуализировали окрашиванием по Кумасси. Величину расщепления C3b количественно определяли посредством денситометрии, строили график по данным, и кажущуюся константу скорости (k) потери интенсивности полосы определяли аппроксимацией посредством кривой экспоненциального снижения. Кратность разность в активности расщепления C3b вариантами CFI относительно эталонной молекулы, CFI-HSA дикого типа, рассчитывали посредством деления значения k для вариантов CFI-HSA на значение k для дикого типа CFI-HSA.

[0236] Расщепление C3b вариантами CFI дополнительно характеризовали посредством определения EC50 для расщепления C3b. Вкратце, реакции расщепления C3b проводили с использованием 25 нМ мини-FH, 75 нМ растворимого человеческого C3b и серии разведений вариантов CFI. Реакционные смеси при каждой из концентраций вариантов CFI инкубировали в течение 5 мин при 37 °C в HBS. Реакцию гасили добавлением 1 М NaCl в HBS. Реакционные смеси дополнительно разбавляли до конечной концентрации 5 нМ C3b в буфере (HBS, 0,5 М NaCl, 0,05% Tween 20), после чего проводили ELISA на iC3b. Количество iC3b, образовавшегося в реакции, определяли с использованием набора MicroVue iC3b A006 для ELISA (Quidel). Анализ ELISA включает в себя микропланшет, покрытый специфическим к iC3b моноклональным антителом для захвата образовавшегося во время реакций iC3b, а также конъюгированного с HRP антитела против iC3b для детекции связанного iC3b и хромогенного субстрата. Регистрируемая оптическая плотность представляет собой относительную меру продукта iC3b, образовавшегося в реакциях расщепления. Значения EC50 рассчитывали с использованием аппроксимации кривой четырехпараметрической нелинейной регрессии без ограничений в GraphPad Prism. В таблице 7.4 ниже обобщенно представлены результаты анализов титрования iC3b методом ELISA. Значения EC50 выше 500 нМ

считали равными 500 нМ. Реакции расщепления также проводили в отсутствие мини-FH, где это отмечено, и анализ проводили таким же образом, как и для реакций, включающих мини-FH.

Реакции расщепления C4b

[0237] CFI регулирует классический путь комплемента посредством протеолитической инактивации белка C4b. CR1, рецептор C3b/C4b, и C4-связывающий белок (C4BP) действуют как кофакторы катализируемой CFI реакции расщепления C4b. Анализ расщепления C4b представляет собой функциональный анализ для определения способности CFI и его вариантов к активности расщепления C4b в присутствии кофакторов CR1 или C4BP. Для захвата C4b использовали белок-фактор комплемента C2, который специфически связывается с C4b, но не с расщепленным CFI продуктом iC4b. Катализируемое CFI расщепление C4b измеряли посредством измерения снижения концентрации C4b, связанного с белком C2, иммобилизованным на планшете для ELISA. Захваченный белок C4b обнаруживали с помощью поликлонального кроличьего антитела к C4c (DAKO, № A0065) методом ELISA. При расчете процента активности расщепления C4b вариантами CFI активность расщепления C4b с помощью CFI-HSA брали за 100%.

[0238] Для каждого варианта CFI-HSA готовили главную реакционную смесь комнатной температуры, содержащую конечные концентрации 250 нМ кофактора (CR1 домены 1–3) и 250 нМ C4b человека в буфере HBS (30 мМ HEPES, 140 мМ NaCl pH 7,4). Главные реакционные смеси доводили до 37 °C и оставляли уравниваться в течение 5 минут. Реакцию расщепления инициировали добавлением белка CFI-HSA в конечной концентрации 250 нМ. Объем образца, соответствующий 0,6 мкг C3b, отбирали из главных смесей каждой измеряемой временной точки и гасили путем добавления 5X восстанавливающего ДСН-буфера для образцов с последующей инкубацией при 95 °C в течение 5 минут. Образцы пропускали через 9 или 10% гель для ДСН-ПААГ и расщепление C4b визуализировали окрашиванием по Кумасси. Величину расщепления C4b количественно оценивали посредством денситометрии. Активность расщепления C4b CFI-HSA дикого типа брали за 100%, и рассчитывали процент активности расщепления C4b для вариантов CFI-HSA.

[0239] Другой пример анализа активности расщепления C4b осуществляли описанным ниже образом для определения активности расщепления C4b вариантами CFI относительно эталонной молекулы, CFI-HSA дикого типа. Реакцию расщепления проводили с 250 нМ вариантов CFI в присутствии 250 нМ кофактора (домены 1–3 CR1) и 250 нМ человеческого C4b, которые инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Реакционную смесь разбавляли в 20 раз, после чего добавляли в заблокированный планшет для ELISA, покрытый мышинным моноклональным антителом к C4с. Поглощение, зарегистрированное на планшете для ELISA, представляет собой относительную меру продукта C4с, образовавшегося в реакциях расщепления, и, следовательно, меру активности расщепления C4b. Кратность разность в активности расщепления C4b вариантами CFI относительно эталонной молекулы, CFI-HSA дикого типа, рассчитывали посредством деления скорректированного по фону поглощения для вариантов CFI-HSA на скорректированное по фону поглощение для CFI-HSA дикого типа. В таблице 7.3 ниже обобщенно приведены кратности различий анализа активности расщепления C4b вариантами CFI относительно эталонной молекулы CFI-HSA, измеренные посредством скрининга методом ELISA на C4с с CR1.

[0240] Измеряли EC_{50} расщепления C4b вариантами CFI. Анализ проводили с использованием 250 нМ кофактора (CR1 домены 1–3), 250 нМ человеческого C4b и серии разведений вариантов CFI. Реакционные смеси инкубировали в течение 30 минут при 37°С, а затем реакционную смесь разбавляли в 20 раз перед началом ELISA. Количество образовавшегося C4с измеряли посредством ELISA с использованием мышинового моноклонального антитела, специфичного к C4с. Поглощение, зарегистрированное на планшете для ELISA, представляет собой относительную меру продукта C4с, образовавшегося в реакциях расщепления, и, следовательно, меру активности расщепления C4b. Значения EC_{50} рассчитывали с использованием аппроксимации кривой четырехпараметрической нелинейной регрессии без ограничений в GraphPad Prism. Значения EC_{50} выше 1000 нМ считали равными 1000 нМ. Реакции расщепления также проводили в отсутствие CR1, где отмечено, и их анализировали таким же образом, как и реакции, включающие CR1. В таблице 7.4 обобщенно представлены результаты титрования C4с с кофактором CR1 методом ELISA.

Активность в отсутствие кофактора

[0241] Реакции расщепления C4b проводили так, как описано выше, в отсутствие кофактора для панели вариантов CFI (таблица 7.1). Результаты показывают, что варианты CFI с С-концевым слитным белком, который включает в себя домен CR1 человека, сохраняют способность расщеплять C4b в отсутствие кофактора в реакционной смеси. Напротив, варианты CFI, не имеющие С-концевого слияния с CR1, не сохраняли способность расщеплять C4b. Эти результаты свидетельствуют о том, что варианты CFI с С-концевым слиянием с CR1 могут быть независимыми от кофактора CR1.

Таблица 7.1. Расщепление C4b вариантом CFI в отсутствие кофактора

Констр. №	C4c без кофактора EC ₅₀ (нМ)	C4c с кофактором EC ₅₀ (нМ)
66	88,63	69,1

[0242] Реакции расщепления C3b проводили так, как описано выше, в отсутствие кофактора для панели вариантов CFI (таблица 7.2). Результаты показывают, что варианты CFI с С-концевым слитным белком, который включает в себя домен CR1 человека, сохраняют способность расщеплять C3b в отсутствие кофактора в реакционной смеси.

Таблица 7.2. Расщепление C3b вариантом CFI в отсутствие кофактора

Констр. №	iC3b без кофактора EC ₅₀ (нМ)	iC3b с кофактором EC ₅₀ (нМ)
66	2,92	3,2

Одноточечный скрининг вариантов CFI на расщепление C4b и C3b

[0243] Рассчитывали кратность различия в активности расщепления C3b вариантами CFI относительно эталонной молекулы, CFI-HSA дикого типа. Скорректированное по фону поглощение для вариантов CFI-HSA делили на скорректированное по фону поглощение для CFI-HSA дикого типа. Результаты представлены в таблице 7.3.

Таблица 7.3. Скрининг вариантов на расщепление C4b и C3b

Констр. №	iC3b кратн. отн. эталона	C4c кратн. отн. эталона	Констр. №	iC3b кратн. отн. эталона	C4c кратн. отн. эталона
1	1,39	1,08	3	1,01	3,48
2	1,73	0,58	4	0,89	3,55

Констр. №	iC3b кратн. отн. эталона	C4c кратн. отн. эталона
5	0,79	3,89
6	0,63	2,98
7	0,8	0,81
8	0,14	0,39
9	0,07	0,05
10	0,03	0,02
11	-0,01	-0,02
12	0,18	0,9
13	0,34	0,72
14	1,36	0,45
15	0,67	1,98
16	0,18	1,24
17	0,44	1,54
18	0,16	0,08
19	0,02	-0,05
20	0	0,05
21	0,55	1,44
22	0,23	1,07
23	0,04	0,1
24	0,19	0,59
25	0,29	0,74
26	2,37	1,92
27	2,12	2,93
28	1,87	0,86
29	1,64	0,5
30	1,44	0,73
31	1,53	1,14
32	1,47	0,98
33	1	0,55
34	2,11	2,62
35	0,04	2,02
36	1,73	2,08
37	1,12	3,59
38	0,72	2,93
39	1,1	2,83
40	0,68	2,17
41	0,9	2,36
42	0,08	2,33
43	0,89	1,54
44	0,03	3,47
45	0,7	1,3
46	1,21	0,76

Констр. №	iC3b кратн. отн. эталона	C4c кратн. отн. эталона
47	0,35	0,93
48	0	0,67
49	0,15	1,47
50	1,89	1,23
51	1,87	1,17
52	1,55	0,78
53	1,52	0,8
54	2,06	1,61
55	1,85	1,38
56	1,77	0,65
57	0,76	0,06
58	0,77	0,06
59	0,74	1,66
60	0,03	1,39
63	0,14	4,15
64	0,06	4,11
65	0,1	4,1
66	0,15	3,55
67	-0,01	3,2
68	0,06	3,75
70	0,94	4,12
71	0,07	0,09
72	3,17	0,34
73	0,08	-0,03
74	1,67	2,19
75	-0,03	0,12
76	2,11	4,46
77	1,21	3,81
78	0	-0,24
79	1,63	3,36
80	0,91	3,07
81	0,95	3,31
89	0,05	3,21
90	0,47	2
91	1,7	4,59
92	0,72	1,52
93	1,09	2,36
94		
95	1	1
96		

[0244] Определяли специфичность расщепления С4b относительно расщепления С3b и расщепления С3b относительно расщепления С4b. Специфичность рассчитывали посредством нормализации значений EC50 к CFI-HSA. Для расщепления С4b максимальное значение было установлено равным 1000 нМ, и все более высокие значения принимали равными 1000 нМ. Для расщепления С3b максимальное значение было установлено равным 500 нМ, и все более высокие значения принимали равными 500 нМ. Результаты представлены в таблице 7.4.

Таблица 7.4. Значения EC₅₀ для вариантов в анализах расщепления С4b и С3b

Констр. №	iC3b EC ₅₀ (нМ)	C4c EC ₅₀ (нМ)
1		183,29
2	28,64	243,81
3	18,92	102,86
4	21,43	186,45
5	24,75	183,19
6	34,66	104,28
7	15,76	908,5
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14	40,89	
15	35,14	488,76
16	85,61	
17		
18		
19		
20		
21	30,52	240,39
22	101,84	1450
23	155,92	1207
24		
25		
26	6,39	99,62
27	6,26	47,02
28	11,82	90,43
29	10,63	210,39

Констр. №	iC3b EC ₅₀ (нМ)	C4c EC ₅₀ (нМ)
30		
31		
32		
33	16,36	707
34	8,7	93,16
35	347,26	744,91
36	13,05	205,41
37	20,33	
38	39,83	218,94
39	31,43	203
40	43,15	214,66
41	31,37	223,89
42	168,11	379,44
43		
44		
45	61,06	
46		
47	154,42	
48	1000	811,69
49	89,23	
50	12,8	
51	12,48	
52	22,54	
53	20,74	
54	7,38	
55	12,38	
56	9,67	
57	17,47	
58	8,15	

Констр. №	iC3b EC ₅₀ (нМ)	C4c EC ₅₀ (нМ)
59	24,9	
60	155,78	366,86
63		
64		
65		
66	3,17	69,11
67		
68		
70	17,48	16,65
71	32,7	679
72	3,12	
73	54,61	1606
74	5,79	47,13
75		
76		

Констр. №	iC3b EC ₅₀ (нМ)	C4c EC ₅₀ (нМ)
77		
78		
79		
80		
81		
89		
90	2,37	20,78
91	6,69	13,82
92	46,29	
93		
94	50,1	412,1
95	28,6	292,4
96	62,4	339,6

Пример 8. Настраиваемость и отбор вариантов CFI для C3b, C4b или как для C3b, так и для C4b

[0245] В примере 8 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0246] Для анализов, в которых определяли значения EC₅₀, специфичность расщепления C4b по сравнению с расщеплением C3b и расщепления C3b по сравнению с расщеплением C4b рассчитывали посредством нормализации к CFI-HSA, как показано в таблице 7.4. Специфичность приведена в таблице 8.1. Специфичность для C4b рассчитывали следующим образом: (C4b EC₅₀ для CFI-HSA/C4b EC₅₀ для варианта) / (C3b EC₅₀ для CFI-HSA/C3b EC₅₀ для варианта). Специфичность для C3b рассчитывали следующим образом: (C3b EC₅₀ для CFI-HSA/C3b EC₅₀ для варианта) / (C4b EC₅₀ для CFI-HSA/C4b EC₅₀ для варианта). Результаты представлены в таблице 8.1.

Таблица 8.1. Специфичность расщепления C3b и C4b

Констр. №	Специ-фич-ность к C3b	Специ-фич-ность к C4b
1		

Констр. №	Специ-фич-ность к C3b	Специ-фич-ность к C4b
2	1,31	0,77

Констр. №	Специ-фич-ность к СЗв	Специ-фич-ность к С4в
3	0,53	1,88
4	0,85	1,18
5	0,72	1,38
6	0,29	3,4
7	5,63	0,18
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15	1,36	0,74
16		
17		
18		
19		
20		
21	0,77	1,3
22	1,39	0,72
23	0,76	1,32
24		
25		
26	1,52	0,66
27	0,73	1,36
28	0,75	1,34
29	1,93	0,52
30		
31		
32		
33	4,22	0,24
34	1,05	0,96
35	0,21	4,77
36	1,54	0,65
37		
38	0,54	1,86
39	0,63	1,58
40	0,49	2,06
41	0,7	1,43
42	0,22	4,53
43		
44		
45		
46		

Констр. №	Специ-фич-ность к СЗв	Специ-фич-ность к С4в
47		
48	0,05	18,28
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60	0,23	4,35
63		
64		
65		
66	2,13	0,47
67		
68		
70	0,09	10,74
71	2,03	0,49
72		
73	2,87	0,35
74	0,8	1,26
75		
76		
77		
78		
79		
80		
81		
89		
90	1,35	0,74
91	0,32	3,15
92		
93		
94	1,29	0,77
95	1	1
96	0,86	1,17

Пример 10. Интравитреальные инъекции

[0247] В примере 10 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

Фармакокинетика CFI-HSA после интравитреальной инъекции

[0248] Исследовали офтальмологическую фармакокинетику слитого на N-конце с альбумином белка CFI-HSA дикого типа после интравитреального введения шести африканским зеленым мартышкам (AGM). Шесть животных были разделены на две группы, получавшие 2 дозы: одна группа получила одну интравитреальную инъекцию 500 мкг CFI-HSA (правый глаз, OD, N = 3), а другая группа получила одну интравитреальную инъекцию 250 мкг CFI-HSA (правый глаз, OD, N = 3). В левый глаз (OS) всех шести животных вводили эквивалентный объем 100 мкл стерильного PBS для инъекций в качестве контроля — несущей среды. Нетерминальные образцы жидкой части стекловидного тела (100 мкл) брали на 1, 7, 14, 21 и 28-й день после введения дозы. Концентрации препарата CFI-HSA в жидкой части стекловидного тела определяли с использованием количественного электрохемилюминесцентного (ECL) анализа антигена, оптимизированного для измерения CFI-HSA в стекловидном теле AGM. В анализе использовали нанесение покрытия из антитела к CFI (клон OX21, LS Bio, г. Сиэтл, штат Вашингтон, США) в концентрации 2 мкг/мл на планшет для анализа Meso Scale Discovery (MSD, г. Роквилл, штат Массачусетс, США) для определения уровня CFI-HSA. Детектирование захваченного CFI-HSA проводили с помощью козьего поликлонального антитела к HSA (Abscam, г. Кембридж, штат Массачусетс, США) в концентрации 0,5 мкг/мл, конъюгированного с испускающей свет меткой SULFO-TAG [электрохемилюминесценция (ECL)] при приложении электрического потенциала. Относительные световые единицы ECL (RLU) измеряли на считывателе MESO® SECTOR S 600, а неизвестные концентрации CFI-HSA в стекловидном теле интерполировали по стандартной кривой в диапазоне от 0,05 мкг/мл до 40 мкг/мл фактора I-HSA.

[0249] Некомпаратментный анализ показал кажущийся конечный период полужизни в глазу 3,6 и 4,1 дня для уровней доз 250 и 500 мкг соответственно.

[0250] Уровни компонента комплемента 3а (С3а) в стекловидном теле определяли посредством ELISA с использованием набора Quidel для ELISA на С3а (ФИГ. 10). Слитный белок CFI-HSA после внутриглазной инъекции снижал уровни С3а в глазу дозозависимым образом в течении периода до 7 дней. Увеличение расщепления С3b посредством CFI-HSA уменьшает образование комплекса между С3b и Вb, что приводит к уменьшению расщепления С3 на С3а и С3b через усилительный контур альтернативного пути. Другие варианты и слитные конструкторы могут быть протестированы в этой же модели на предмет их активности.

Пример 11. Фармакокинетика CFI-HSA и плазменного CFI в плазме крови мышей

[0251] В примере 11 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0252] Изучали фармакокинетику слитого N-концом с альбумином CFI дикого типа (CFI-HSA) после внутривенного и подкожного введения мышам CD-1. Используя схему с выборочным сбором образцов, включающую в себя до двух образцов на мышь и отбор у трех мышей в каждый момент времени, мышей CD-1 разделяли на четыре группы и давали одну дозу либо очищенного из плазмы CFI дикого типа, либо рекомбинантного CFI-HSA дикого типа.

[0253] Для сравнения периода полужизни в плазме и биодоступности плазменного CFI и CFI-HSA животным вводили плазменный CFI или CFI-HSA как внутривенно, так и подкожно. Плазменный CFI вводили в дозе 1,3 мг/кг внутривенно (группа 1) и 6,5 мг/кг подкожно (группа 2). CFI-HSA вводили в дозе 3 мг/кг внутривенно (группа 3) и подкожно (группа 4). Еще 3 животных получали однократную дозу эквивалентного объема PBS, вводимую подкожно в качестве — несущей среды (группа 5; не показано). Кровь (~30–50 мкл) собирали в EDTA в различные моменты времени от 5 минут до 144 часов после введения дозы и отделяли плазму центрифугированием.

[0254] Концентрации CFI-HSA и плазменного CFI определяли посредством количественного электрохемилюминесцентного (ECL) анализа антигена CFI-HSA и плазменного CFI в плазме мышей CD-1 с EDTA. Для анализа на CFI наносили покрытие из мышинового моноклонального антитела к фактору I (MAB12907, Abnova, г. Тайбэй,

Тайвань) 2 мкг/мл на аналитический планшет Meso Scale Discovery (MSD, г. Роквилл, штат Массачусетс, США) для захвата плазменного CFI. Детекцию захваченного CFI проводили с помощью мышиного моноклонального антитела против CFI (клон 3R/8, САВТ-47940МН, Creative diagnostic, г. Ширли, штат Нью-Йорк, США) в концентрации 0,5 мкг/мл, конъюгированного с излучающей свет меткой SULFO-TAG [электрохемилюминесценция (ECL)] при приложении электрического потенциала. Для анализа на CFI-HSA наносили покрытие мышиного моноклонального антитела к CFI (клон 3R/8, САВТ-47940МН) 1 мкг/мл на аналитический планшет Meso Scale Discovery (MSD, г. Роквилл, штат Массачусетс, США) для захвата CFI-HSA. Детектирование захваченного CFI-HSA проводили с помощью кроличьего поликлонального антитела к HSA (ab24207, Abscam, г. Кембридж, штат Массачусетс, США) в концентрации 2 мкг/мл, конъюгированного с испускающей свет меткой SULFO-TAG [электрохемилюминесценция (ECL)] при приложении электрического потенциала. Относительные световые единицы ECL (RLU) измеряли на считывателе MESO® SECTOR S 600, а неизвестные концентрации плазменного CFI и CFI-HSA интерполировали по стандартным кривым.

[0255] Период полужизни в кровотоке после внутривенной инфузии CFI-HSA больше (~22 часа), чем у неслитного варианта плазменного белка CFI (~13 часов), и это указывает на то, что слияние HSA с белком CFI увеличивает период полужизни по сравнению с неслитым CFI. Важно отметить, что биодоступность CFI (53,6%) аналогична CFI-HSA (46,7%), и это указывает на то, что слияние HSA с белком CFI не оказывало неблагоприятного влияния на биодоступность CFI после подкожного введения. Слияние HSA с белком CFI увеличивает период полужизни примерно в 2 раза по сравнению с неслитным вариантом белка CFI после внутривенного (ФИГ. 11) или подкожного введения (ФИГ. 12). Аналогичный уровень воздействия достигается при 2-кратном снижении дозы слитного белка CFI-HSA по сравнению с CFI после подкожной инъекции (ФИГ. 12).

[0256] Циркуляция других вариантов и слитных белков может быть протестирована аналогичным образом.

Пример 12. Биологическая активность CFI-HSA после внутривенного введения на моделях активации комплемента у грызунов

[0257] Модель повреждения периферического нерва у крыс была разработана для изучения участия комплемента в валлеровском перерождении, обусловленным механическим повреждением миелинизированного седалищного нерва. Самцов крыс линии CD Sprague Dawley (Charles River Laboratories) массой от 300 до 350 г при включении в исследование анестезировали смесью 2–2,5% изофлурана USP (Abbot Laboratories, г. Монреаль, Канада) в кислороде и помещали на нагревательную подушку для поддержания температуры тела. На обеих ногах проводили стерильную операцию по обнажению седалищного нерва. На одной ноге создавали травму седалищного нерва (SNI), пережимая седалищный нерв три раза в течение 10 секунд с помощью щипцов Dumont № 7. Нога на противоположной стороне не подвергалась травмированию щипцами и служила внутренним контролем для каждого субъекта.

[0258] Сразу после индукции SNI животные могут получать внутривенную инъекцию варианта или слитного белка согласно описанию. Для купирования боли также вводят подкожную инъекцию бупренорфина с медленным высвобождением (0,01 мг/кг). Через 4 или 24 часа после SNI 5 животных из каждой экспериментальной группы умерщвляли обескровливанием.

[0259] При умерщвлении фрагмент нерва размером 1 см (0,5 см проксимальнее и дистальнее места повреждения) отбирали из травмированной ноги (ипсилатеральной) и из ложнопериоперированной ноги, замораживали и хранили при -80 °C до обработки для масс-спектрометрическим анализом (Phenoswitch Bioscience, Канада). Образцы плазмы с K2-EDTA собирали до SNI (исходный уровень), а также через 1, 4 и 24 часа (где применимо) после SNI для оценки фрагментов компонентов комплемента посредством масс-спектрометрии (MS). Уровни цитокинов и хемокинов (крысиный 27-плексный иммуноанализ на наборе BioPlex 200 Cytokine Array, Assay Kit Millipore MILLIPLEX, проводила компания Eve Technologies, г. Калгари, Канада) оценивали в плазме с K2-EDTA, собранной на исходном уровне (только носитель), и через 4 и 24 часа (если применимо) после SNI. При умерщвлении собирали цельную кровь и сыворотку для клинической оценки патологии [общий анализ крови (СВС) и биохимический анализ сыворотки; Biovet Inc., Канада].

Масс-спектрометрический анализ образцов in vivo

[0260] Образцы денатурировали и осаждали с промывкой и заменой буфера, после чего присоединяли метку к N-концу посредством восстановительного аминного диметилирования. Затем образцы расщепляли трипсином (или смесью трипсина и химотрипсина) и анализировали методом ЖХ-МС/МС в режиме SWATH. Данные SWATH интегрировали на библиотеке ионов, полученной для каждого биологического вида и типа образца. Интегрировали 10 лучших пептидов на белок, содержащихся в библиотеке ионов, и проводили пептидоцентрический анализ для специфического количественного определения меченных на N-конце пептидов C3, C5, C4 и CFB.

[0261] Продукты расщепления, образующиеся в результате каталитической активности в отношении C3b, контролировали в нервной ткани (мембраносвязанные фрагменты) (ФИГ. 21А) и в кровотоке (растворимые фрагменты в плазме) (ФИГ. 21В) посредством масс-спектрометрии. Активность расщепления CFI-HSA (Y408L; N531G) дает 2 основных фрагмента расщепления, обнаруженных посредством масс-спектрометрии: C3dg и C3f. Расщепление поверхностно-связанного C3b с помощью CFI приводит к образованию поверхностно-связанного фрагмента C3dg и растворимого фрагмента C3f. Оба фрагмента растворимы при образовании из растворимого C3b. Следовательно, обнаружение C3dg в плазме может быть связано с расщеплением растворимого C3b, а обнаружение C3dg в ткани может быть результатом расщепления мембраносвязанного C3b. Меченный на N-конце C3dg (E[2Me]DVPAADLSDQVPDTSETR) (SEQ ID NO: 24) представляет собой продукт расщепления iC3b посредством CFI. Активность вариантов CFI определяется как процентная доля пептидов C3dg с N-концевой меткой (называемых «активированным C3dg»), умноженная на общую величину сигнала C3dg (EDVPAADLSDQVPDTSETR) (SEQ ID NO: 48).

Пример 13. Активность in vivo в модели с травмой периферического нерва у крыс

[0262] Можно определить эффективность панели вариантов CFI в отношении активации комплемента в модели повреждения седалищного нерва (SNI) у крыс. Сразу после индукции SNI животные получали внутривенную (в/в) инъекцию варианта, или слитного белка, или контроля (1X PBS) в объеме дозы 5 мл/кг. Через 24 часа после SNI всех животных умерщвляли обескровливанием. Уровни цитокинов и хемокинов (крысиный 27-

плексный иммуноанализ на наборе BioPlex 200 Cytokine Array, Assay Kit Millipore MILLIPLEX, проводила компания Eve Technologies, г. Калгари, Канада) оценивали в плазме с K2-EDTA, собранной через 4 и 24 часа после SNI. При умерщвлении сыворотку собирали для биохимического анализа [Biovet Inc., Канада].

[0263] Активность вариантов и слитных белков отслеживали путем обнаружения продуктов расщепления CFI (C3dg и C3f) посредством масс-спектрометрии. Меченный на N-конце C3f (S[2Me]EETK[2Me]QNEGF) (SEQ ID NO: 48) представляет собой продукт расщепления C3b посредством CFI, а меченный на N-конце C3dg (E[2Me]DVPAADLSDQVPDTSSETR) (SEQ ID NO: 24) представляет собой продукт расщепления iC3b посредством CFI. Общее количество активированных C3f определяют как процентную долю пептидов C3f с N-концевой меткой (S[2Me]EETK[2Me]QNEGF) (SEQ ID NO: 48), умноженную на общую величину пептидного сигнала C3f (SEETKQNEGF) (SEQ ID NO: 49).

Пример 14. Активность вариантов CFI *in vivo* в модели перевязки и пункции слепой кишки

[0264] Можно оценить влияние варианта CFI и слитного белка на ограничение активации комплемента в модели сепсиса, вызванного перевязкой и пункцией слепой кишки (CLP) у крыс.

[0265] Модель неасептического сепсиса у крыс можно использовать для изучения вовлечения комплемента после операции по перевязке и пункции слепой кишки (CLP). Эта операция обеспечивает три аспекта активации комплемента и воспаления (механическое повреждение, бактериальное воздействие и ишемическое повреждение), что делает ее особенно актуальной в качестве инструмента скрининга для других показаний. Самцов крыс линии CD Sprague Dawley (Charles River Laboratories) массой от 300 до 350 г при включении в исследование анестезируют смесью 2–2,5% изофлурана USP (Abbot Laboratories, г. Монреаль, Канада) в кислороде и помещали на нагревательную подушку для поддержания температуры тела. Сепсис индуцировали хирургической процедурой CLP. Выполняли срединный разрез в брюшной стенке, выводили наружу слепую кишку и перевязывали нейлоновой нитью (4-0) проксимальнее илеоцекального клапана, затем выполняли перфорацию с помощью иглы 16 калибра, пропуская через

дистальную часть слепой кишки, в результате чего небольшое количество содержимого слепой кишки попадало в брюшную полость. Затем брюшную стенку и кожу ушивали.

[0266] Сразу после процедуры CLP животные получали внутривенную инъекцию выбранных вариантов или слитных белков или контрольного препарата (1X PBS) в объеме дозы 5 мл/кг. Через 16 часов после операции CLP всех животных умерщвляли обескровливанием. Образцы плазмы с K2-EDTA собирали за день до включения в исследование (исходный уровень), через 3 и 16 часов после CLP для оценки фрагментов компонентов комплемента посредством масс-спектрометрии (MS) и уровней цитокинов/хемокинов (27-плексный иммуноанализ на крысах, проводимый с помощью набора BioPlex 200 Cytokine Array, Assay Kit Millipore MILLIPLEX компанией Eve Technologies, г. Калгари, Канада). Собирали цельную кровь и сыворотку для клинической оценки патологии [общий анализ крови (CBC) и биохимического анализа сыворотки; Biovet Inc., Канада] на исходном уровне и через 16 часов.

Пример 15. Активность вариантов CFI *in vivo* при остром респираторном дистресс-синдроме

[0267] Можно провести оценку терапевтических эффектов вариантов CFI и слитных белков на мышинной модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), индуцированного LPS.

[0268] Цель: Целью данного исследования является оценка эффективности вариантов и слитных белков для ограничения опосредованного комплементом острого воспаления легких на мышинной модели ОРДС, индуцированного однократным введением липополисахарида (ЛПС).

[0269] Мышиная модель асептического ОРДС может быть использована для изучения вовлечения комплемента после интратрахеальной инстилляцией (IT) LPS. Самцов мышей C57BL/6 (Charles River Laboratories) массой от 20 до 25 г при включении в исследование анестезировали изофлураном, и интратрахеально инстиллировали 50 мкг LPS (1 мг/мл LPS, выделенного из *E. coli* 0111:B4 в 0,9% солевом растворе, Sigma).

[0270] Через три часа после процедуры CLP животные получали внутривенную инъекцию 5 вариантов, или слитных белков, или контрольного препарата (1X PBS) в

объеме дозирования 5 мг/кг. Для оценки потенциального влияния повторяющегося ежедневного введения препарата через 27 часов после IT-LPS животные могли получать вторую дозу 5 мг/кг. Ложнооперированной группе проводили интратрахеальную инстилляцию 50 мкл 0,9% физиологического раствора (n = 5) без какой-либо в/в обработки.

[0271] Образцы плазмы в K₂-EDTA, легочной ткани и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) собирали при умерщвлении для оценки фрагментов компонентов комплемента посредством масс-спектрометрии (MS). BALF собирали посредством трех перфузий правого легкого по 300 мкл холодного PBS 1X, содержащего ингибитор протеазы 1X (SigmaFAST®). Уровни цитокинов и хемокинов (31-плексный иммуноанализ для мышей на наборе BioPlex 200 Cytokine Array, Assay Kit Millipore MILLIPLEX, проведенный компанией Eve Technologies, г. Калгари, Канада) оценивали в плазме с K₂-EDTA, в BALF и в легочной ткани (гомогенизированной в PBS 1X + 0,1% Triton X-100 с коктейлем ингибиторов протеаз), собранных при умерщвлении. При умерщвлении собирали цельную кровь и сыворотку для клинической оценки патологии [общий анализ крови (CBC) и биохимический анализ сыворотки; Biovet Inc., Канада]. В образцах BALF проводили определение разности числа клеток для оценки рекрутинга лейкоцитов в легкое.

[0272] LPS является известным агентом, индуцирующим альтернативный путь комплемента. Активность варианта CFI или слитного белка по циркулирующим продуктам расщепления C3b можно оценить посредством масс-спектрометрии. Процентную долю активированного C3f определяли как процентную долю пептида C3f с N-концевой меткой (S[2Me]EETK[2Me]QNEGF) (SEQ ID NO: 48), умноженную на общую величину пептидного сигнала C3f (SEETKQNEGF) (SEQ ID NO: 49).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант фактора I комплемента (CFI), содержащий по меньшей мере одну модификацию по отношению к CFI дикого типа, причем вариант CFI способен модулировать систему комплемента, при этом вариант CFI имеет по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа, и при этом вариант выбран из тех, которые представлены в таблице 2 или таблице 3.
2. Вариант CFI по п. 1, причем улучшенная характеристика выбрана из увеличения периода полужизни либо биодоступности или увеличения либо уменьшения любого одного или более из активности, специфичности к субстрату, эффективности, аффинности к субстрату, аффинности к кофактору и каталитической способности
3. Вариант CFI по п. 2, причем улучшенная характеристика представляет собой увеличение активности.
4. Вариант CFI по п. 3, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и/или C4b по сравнению с CFI дикого типа.
5. Вариант CFI по п. 4, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и не включает в себя увеличение расщепления C4b.
6. Вариант CFI по любому из пп. 4–5, причем увеличение расщепления C3b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40 раз, по меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа.
7. Вариант CFI по п. 4, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C4b по сравнению с CFI дикого типа и не включает в себя увеличение расщепления C3b.

- 8.** Вариант CFI по любому из пп. 4 и 7, причем увеличение расщепления C4b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40 раз, по меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа.
- 9.** Вариант CFI по п. 4, причем увеличение каждого из расщепления C3b и C4b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40 раз, по меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа.
- 10.** Вариант CFI по любому из пп. 3–6 и 9, причем увеличение активности включает в себя увеличение образования iC3b.
- 11.** Вариант CFI по любому из пп. 3–6 и 9–10, причем увеличение активности включает в себя увеличение образования C3dg и/или C3c из iC3b.
- 12.** Вариант CFI по любому из пп. 3–6 и 10–11, причем увеличение активности включает в себя снижение уровней α -цепи C3b.
- 13.** Вариант CFI по любому из пп. 3–12, причем увеличение активности включает в себя увеличение протеолиза пептидного субстрата.
- 14.** Вариант CFI по любому из пп. 3–13, причем увеличение активности включает в себя снижение уровней или функции мембраноатакующего комплекса (MAC).

15. Вариант CFI по любому из пп. 3–14, причем увеличение активности приводит к снижению усиления в системе комплемента.
16. Вариант CFI по п. 2, причем улучшенная характеристика представляет собой снижение активности для C3b и/или C4b.
17. Вариант CFI по п. 2, причем улучшенная характеристика представляет собой увеличение специфичности к субстрату.
18. Вариант CFI по п. 17, причем увеличение специфичности включает в себя увеличение специфичности к C3b или C4b по сравнению с CFI дикого типа.
19. Вариант CFI по п. 17, причем увеличение специфичности включает в себя увеличение специфичности к C3b и/или C4b по сравнению с CFI дикого типа.
20. Вариант CFI по п. 17, причем увеличение специфичности включает в себя увеличение специфичности к C3b по сравнению с CFI дикого типа.
21. Вариант CFI по п. 17, причем увеличение специфичности включает в себя увеличение специфичности к C4b по сравнению с CFI дикого типа.
22. Вариант CFI по п. 18, причем увеличение специфичности к C3b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40 раз, по меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа.
23. Вариант CFI по п. 18, причем увеличение специфичности к C4b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40 раз, по

меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа.

24. Вариант CFI по любому из пп. 1–23, причем модификация относительно CFI дикого типа включает в себя любое одно или более из: делеции одного или более аминокислотных остатков, делеции одного или более доменов CFI, замены одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более доменов CFI и перестановки одного или более доменов CFI.

25. Вариант CFI по любому из пп. 1–24, причем вариант CFI содержит любой один или более доменов CFI, выбранных из: домена сериновой протеазы (SPD), домена мембраноатакующего комплекса фактора I (FIMAC), домена SRCR, домена рецептора липопротеина низкой плотности 1 (LDLr1) и домена рецептора липопротеина низкой плотности 2 (LDLr2).

26. Вариант CFI по любому из пп. 1–25, причем вариант CFI содержит по меньшей мере одну модификацию, соответствующую человеческому CFI дикого типа.

27. Вариант CFI по любому из пп. 1–25, причем вариант CFI содержит по меньшей мере одну модификацию, соответствующую нечеловеческому CFI дикого типа.

28. Вариант CFI по любому из пп. 1–25, причем вариант CFI содержит по меньшей мере одну модификацию, соответствующую CFI дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5.

29. Вариант CFI по любому из пп. 1–28, причем вариант CFI представляет собой химеру, содержащую один или более доменов из человеческого CFI, и при этом человеческий CFI дополнительно содержит замену одного или более аминокислотных остатков на аминокислотные остатки соответствующей области из CFI вида, не являющегося человеком.

30. Вариант CFI по п. 29, причем вид, не являющийся человеком, представляет собой мышь.

31. Вариант CFI по любому из пп. 1–30, причем вариант CFI представляет собой химеру, и при этом модификация включает в себя замену одного или более

аминокислотных остатков CFI аминокислотными остатками из соответствующей области сериновой протеазы, не являющейся CFI.

32. Вариант CFI по п. 31, причем сериновая протеаза, не являющаяся CFI, представляет собой трипсин.
33. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, причем вариант CFI содержит А-цепь и В-цепь, при этом вариант CFI содержит одну или более модификаций в области контакта между А-цепью и В-цепью.
34. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, содержащий одну или более модификаций в С-концевой области варианта CFI.
35. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, содержащий одну или более модификаций в одном или более N-связанных сайтах гликозилирования CFI.
36. Вариант CFI по п. 35, причем одна или более модификаций представляют собой удаление N-связанного сайта гликозилирования.
37. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, содержащий одну или более модификаций в домене SPD в CFI, необязательно содержащий одну или более модификаций в любом одном или более из петли автолиза, петли 99, входа в карман S1 или петли активации SPD, или любом одном или более доменах, представленных на ФИГ. 1.
38. Вариант CFI по п. 37, содержащий замену петли автолиза CFI (REKDNERVFS, SEQ ID NO: 9) петель автолиза трипсина (NTASSGADYPDE, SEQ ID NO: 10), причем петля автолиза находится между положениями, соответствующими положению 456 и положению 465 в CFI, имеющем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.
39. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, содержащий одну или более модификаций в активном сайте CFI.
40. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, содержащий А-цепь и В-цепь, причем вариант CFI имеет структурное расположение в направлении от N-конца к С-концу в виде (А-цепь)–(необязательный линкер)–(В-цепь).

41. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, содержащий А-цепь и В-цепь, причем вариант CFI имеет структурное расположение в направлении от N-конца к С-концу в виде (В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь).
42. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, причем вариант CFI легче активируется по сравнению с CFI дикого типа.
43. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, причем вариант CFI содержит каждый один из SPD, домена FIMAC, домена SRCR, домена LDLr1 и домена LDLr2 и любых других доменов, представленных на ФИГ. 1.
44. Вариант CFI по любому из пп. 1–32, причем вариант CFI содержит не все из SPD, домена FIMAC, домена SRCR, домена LDLr1 и домена LDLr2.
45. Вариант CFI по п. 44, причем вариант CFI содержит SPD.
46. Вариант CFI по п. 45, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.
47. Вариант CFI по любому из пп. 1–46, причем вариант CFI является сialiрированным.
48. Вариант CFI по любому из пп. 1–47, причем вариант CFI является активным.
49. Вариант CFI по п. 48, причем вариант CFI активируется фурином или его вариантом.
50. Вариант CFI по п. 49, причем вариант CFI активируется фурином или его вариантом *in vitro*.
51. Вариант CFI по п. 49, причем вариант CFI активируется фурином или его вариантом во время продуцирования в клетке-хозяине.
52. Вариант CFI по п. 51, причем активация фурином или его вариантом во время продуцирования в клетке-хозяине осуществляется посредством сверхэкспрессии фурина или его варианта.
53. Вариант CFI по п. 49, причем вариант CFI активируется фурином или его вариантом после продуцирования и секреции клеткой-хозяином, необязательно в среде.

- 54.** Вариант CFI по любому из пп. 1–53, причем вариант CFI представляет собой первый компонент слитного конструкта, содержащего первый компонент и по меньшей мере второй компонент, и вариант CFI слит со вторым компонентом.
- 55.** Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент представляет собой белок.
- 56.** Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент не является белком.
- 57.** Вариант CFI по любому из пп. 54–56, причем второй компонент представляет собой удлинитель периода полужизни.
- 58.** Вариант CFI по п. 57, причем удлинитель периода полужизни содержит пептидные повторы.
- 59.** Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент представляет собой удлинитель периода полужизни, выбранный из альбумина, PEG, небioresлагаемого полимера,ioresлагаемого полимера и Fc.
- 60.** Вариант CFI по п. 59, причем удлинитель периода полужизни представляет собой модифицированный альбумин или производное альбумина.
- 61.** Вариант CFI по п. 59, причем удлинитель периода полужизни представляет собой альбумин дикого типа.
- 62.** Вариант CFI по п. 59, причем удлинитель периода полужизни представляет собой человеческий сывороточный альбумин или его вариант.
- 63.** Вариант CFI по любому из пп. 54–62, причем вариант CFI содержит А-цепь и В-цепь, и при этом слитный конструкт имеет структурное расположение в направлении от N-конца к С-концу или от С-конца к N-концу в виде (второй компонент)–(необязательный линкер)–(А-цепь)–(необязательный линкер)–(В-цепь).
- 64.** Вариант CFI по любому из пп. 54–62, причем вариант CFI содержит А-цепь и В-цепь, и при этом слитный конструкт имеет структурное расположение в направлении от N-конца к С-концу или от С-конца к N-концу в виде (второй компонент)–(необязательный линкер)–(В-цепь)–(необязательный линкер)–(А-цепь).
- 65.** Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен или часть домена фактора H.

66. Вариант CFI по п. 65, причем по меньшей мере один домен фактора H содержит любой один или более из доменов 1–20 белка контроля комплемента (CCP) фактора H.
67. Вариант CFI по любому из пп. 65–66, причем аминокислотная последовательность по меньшей мере одного домена фактора H представляет собой или получена из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.
68. Вариант CFI по любому из пп. 65–67, причем по меньшей мере один домен фактора H содержит каждый из доменов 1–20 CCP фактора H.
69. Вариант CFI по любому из пп. 65–67, причем по меньшей мере один домен фактора H содержит CCP1, CCP2, CCP3 и CCP4.
70. Вариант CFI по любому из пп. 65–67, причем по меньшей мере один домен фактора H содержит CCP2, CCP3 и CCP4.
71. Вариант CFI по любому из пп. 65–67, причем по меньшей мере один домен фактора H содержит CCP2 и CCP3.
72. Вариант CFI по любому из пп. 65–66, причем аминокислотная последовательность по меньшей мере одного домена фактора H представляет собой или получена из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.
73. Вариант CFI по п. 72, причем по меньшей мере один домен фактора H содержит домены 1–4 CCP и 19–20 фактора H.
74. Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен или часть домена рецептора комплемента 1 (CR1).
75. Вариант CFI по п. 74, причем по меньшей мере один домен CR1 представляет собой любой один или более из доменов 15–17 CCP из CR1.
76. Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент содержит по меньшей мере один домен или часть домена рецептора комплемента I (CRI) и по меньшей мере один домен или часть домена фактора H.
77. Вариант CFI по п. 54, причем второй компонент представляет собой по меньшей мере один домен или часть домена CR1 и FH.

- 78.** Вариант CFI по любому из пп. 54–77, причем слитный конструкт дополнительно содержит третий компонент.
- 79.** Вариант CFI по п. 78, причем третий компонент представляет собой белок.
- 80.** Вариант CFI по п. 78, причем третий компонент не является белком.
- 81.** Вариант CFI по любому из пп. 54–75, дополнительно содержащий третий компонент, причем третий компонент представляет собой удлинитель периода полужизни, необязательно выбранный из альбумина, PEG, небiorазлагаемого полимера, бiorазлагаемого полимера и Fc.
- 82.** Вариант CFI по п. 81, причем удлинитель периода полужизни представляет собой повторяющуюся пептидную последовательность.
- 83.** Слитный конструкт, содержащий по меньшей мере первый, второй и третий компоненты, причем первый компонент содержит CFI дикого типа или его вариант (вариант CFI), при этом второй компонент содержит FH или CR1 и третий компонент содержит FH или CR1.
- 84.** Слитный конструкт по п. 83, причем первый компонент содержит CFI дикого типа, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.
- 85.** Слитный конструкт по п. 83 или 84, причем конструкт содержит альбумин.
- 86.** Слитный конструкт по п. 85, причем альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин.
- 87.** Слитный конструкт по п. 86, причем человеческий сывороточный альбумин содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.
- 88.** Слитный конструкт по п. 83, причем первый компонент содержит вариант CFI.
- 89.** Слитный конструкт по п. 88, причем вариант CFI представляет собой любой вариант CFI по пп. 1–49.
- 90.** Слитный конструкт по любому из пп. 83–89, причем слитный конструкт имеет по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению со свободным CFI дикого типа (не являющимся частью слитного конструкта).

- 91.** Слитный конструкт по любому из пп. 83–90, причем улучшенная характеристика выбрана из увеличения периода полужизни или биодоступности или увеличения или уменьшения любого одного или более из активности, специфичности к субстрату, эффективности, аффинности к субстрату, аффинности к кофактору и каталитической способности
- 92.** Слитный конструкт по п. 91, причем улучшенная характеристика представляет собой увеличение активности.
- 93.** Слитный конструкт по п. 92, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и/или C4b.
- 94.** Слитный конструкт по п. 93, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и не включает в себя увеличение расщепления C4b.
- 95.** Слитный конструкт по любому из пп. 93–94, причем увеличение расщепления C3b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40 раз, по меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа, не являющимся частью слитного конструкта, или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа.
- 96.** Слитный конструкт по п. 93, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C4b по сравнению с CFI дикого типа и не включает в себя увеличение расщепления C3b.
- 97.** Слитный конструкт по любому из пп. 93 и 96, причем увеличение расщепления C4b происходит по меньшей мере или приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере или приблизительно в 2 раза, по меньшей мере или приблизительно в 3 раза, по меньшей мере или приблизительно в 4 раза, по меньшей мере или приблизительно в 5 раз, по меньшей мере или приблизительно в 10 раз, по меньшей мере или приблизительно в 20 раз, по меньшей мере или приблизительно в 30 раз, по меньшей мере или приблизительно в 40

раз, по меньшей мере или приблизительно в 50 раз, по меньшей мере или приблизительно в 100 раз, по меньшей мере или приблизительно в 150 раз, по меньшей мере или приблизительно в 500 раз или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз по сравнению с CFI дикого типа, не являющимся частью слитного конструкта, или по сравнению со слитным конструктом, содержащим CFI дикого типа.

98. Слитный конструкт по любому из пп. 92–95 и 97, причем увеличение активности включает в себя увеличение образования iC3b.

99. Слитный конструкт по любому из пп. 92–95 и 97–98, причем увеличение активности включает в себя увеличение образования C3dg из iC3b.

100. Слитный конструкт по любому из пп. 92–95 и 97–99, причем увеличение активности включает в себя снижение уровней α -цепи C3b.

101. Слитный конструкт по любому из пп. 92–100, причем увеличение активности включает в себя увеличение гидролиза пептидного субстрата или протеолиза макромолекулярного белкового субстрата.

102. Слитный конструкт по п. 91, причем улучшенная характеристика представляет собой уменьшение активности.

103. Слитный конструкт по любому из пп. 83–102, причем слитный конструкт имеет по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению со свободным CFI дикого типа без присутствия фактора Н и/или без присутствия CR1.

104. Слитный конструкт по любому из пп. 83–102, причем слитный конструкт имеет по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению со свободным CFI дикого типа, и при этом по меньшей мере одна улучшенная характеристика дополнительно улучшается за счет присутствия экзогенного фактора Н и/или экзогенного CR1.

105. Слитный конструкт, включающий в себя любой из слитных конструктов из таблицы 3.

106. Фармацевтическая композиция, содержащая любой из вариантов CFI по пп. 1–82 или любой из слитных конструктов по пп. 83–105 и необязательно фармацевтически приемлемый эксципиент.

- 107.** Способ модуляции системы комплемента, включающий приведение образца в контакт *in vitro* или приведение ткани в контакт *in vivo* с любым из вариантов CFI по пп. 1–82 или любым из слитных конструкторов по пп. 83–104.
- 108.** Способ по п. 107, который представляет собой способ *in vitro*.
- 109.** Способ по п. 107, который представляет собой способ *in vivo*.
- 110.** Способ по любому из пп. 107–109, который приводит к увеличению расщепления C3b, C4b, образования iC3b, образования C3dg и/или C4c.
- 111.** Способ по любому из пп. 107–109, который приводит к уменьшению гемолиза.
- 112.** Способ по любому из пп. 107–109, который приводит к снижению уровня MAC.
- 113.** Способ по любому из пп. 107–109, который приводит к снижению усиления в системе комплемента.
- 114.** Способ по любому из пп. 107–109, который приводит к увеличению гидролиза пептидного субстрата или увеличению протеолиза макромолекулярного белкового субстрата.
- 115.** Способ лечения нефталмологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из вариантов CFI по пп. 1–82, или любого из слитных конструкторов по пп. 83–105, или фармацевтической композиции по п. 106.
- 116.** Способ по п. 115, причем нефталмологическое заболевание характеризуется дефицитом CFI.
- 117.** Способ по любому из пп. 115–116, причем нефталмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента.
- 118.** Способ по любому из пп. 115–117, причем нефталмологическое заболевание представляет собой системное острое показание.
- 119.** Способ по п. 118, причем нефталмологическое заболевание представляет собой системное острое показание, выбранное из группы, состоящей из: острого гломерулонефрита, острого повреждения почек, острого респираторного дистресс-синдрома, бактериального менингита, кровоизлияния в мозг, ожогов, коронавирусной

инфекции, инфекции вирусом Эпштейна — Барр, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, ишемического реперфузионного повреждения, болезни Лайма, инфаркта миокарда, трансплантации органов, пародонтита, пневмонии, преэклампсии, шистосомоза, сепсиса, инсульта, тромбоэмболии, ишемического-реперфузионного поражения и травматического повреждения головного мозга.

120. Способ по любому из пп. 115–117, причем нефтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание.

121. Способ по п. 120, причем нефтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание, выбранное из группы, состоящей из следующего: болезнь Альцгеймера, ассоциированный с антинейтрофильным цитоплазматическим антителом (ANCA) васкулит, антифосфолипидный синдром, астма, атеросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), аутоиммунная гемолитическая анемия, буллезный пемфигоид (BP), С3-гломерулопатия, хроническая почечная недостаточность, хроническая обструктивная болезнь легких, болезнь Крона, диабетическая нейропатия, генерализованная миастения гравис (gMG), гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Гийена — Барре (GBS), наследственный ангионевротический отек (HAE), гнойный гидраденит (HS), IgA-нефропатия, волчаночный нефрит (LN), мембранозный гломерулонефрит (MN), микроскопический полиангиит (MPA), мотонейронная болезнь, мультифокальная моторная нейропатия (MMN), рассеянный склероз (MS), инсулинонезависимый диабет, остеоартрит, панкреатит, болезнь Паркинсона, ночная пароксизмальная гемоглобинурия, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, энтеропатия с белковой дистрофией, псориаз, гангренозная пиодермия, ревматоидный артрит, шизофрения (SZ), системная красная волчанка (СКВ), иммунная тромбоцитопения (ITP), язвенный колит, боковой амиотрофический склероз (БАС), аутоиммунная гемолитическая анемия с тепловыми антителами (wAIHA), холоддовая агглютининовая болезнь (CAD) и иммунокомплексный мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (IC-MPGN), миастенический синдром Ламперта — Итона (LEMS), синдром CHAPLE (дефицит CD55), тромботическая микроангиография (ТМА), болезнь Хантингтона и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIPD).

122. Способ по любому из пп. 115–117, причем нефтальмологическое заболевание является неонкологическим.

- 123.** Способ по любому из пп. 115–117, причем нефтальмологическое заболевание является онкологическим.
- 124.** Способ по п. 122, причем нефтальмологическое заболевание характеризуется солидными опухолями или жидкими опухолями.
- 125.** Способ по п. 124, причем нефтальмологическое заболевание характеризуется солидными опухолями и выбрано из группы, состоящей из: колоректальных опухолей, гормонорезистентного рака предстательной железы, меланомы, метастатического рака молочной железы, метастатического колоректального рака, метастатического рака пищевода, метастатического рака поджелудочной железы, метастатического рака желудка, назофарингеальной карциномы, немелкоклеточного рака легкого, опухолей поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы и опухолей желудка.
- 126.** Способ по п. 124, причем нефтальмологическое заболевание характеризуется жидкими опухолями и выбрано из группы, состоящей из: острого миелогенного лейкоза, В-клеточной лимфомы и болезни Ходжкина.
- 127.** Способ по любому из пп. 107–126, в котором вариант CFI, слитный конструктор или фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно или внутривенно.
- 128.** Способ по п. 127, в котором введение представляет собой подкожное введение.
- 129.** Способ по п. 128, в котором подкожное введение осуществляют ежедневно, или еженедельно, или один раз в две недели.
- 130.** Способ лечения офтальмологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из вариантов CFI по пп. 1–82, или любого из слитных конструкторов по пп. 83–105, или фармацевтической композиции по п. 106.
- 131.** Способ по п. 130, причем офтальмологическое заболевание характеризуется дефицитом CFI.
- 132.** Способ по любому из пп. 130–131, причем офтальмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента.
- 133.** Способ по любому из пп. 130–132, причем офтальмологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из: диабетического отека макулы (DME), диабетической

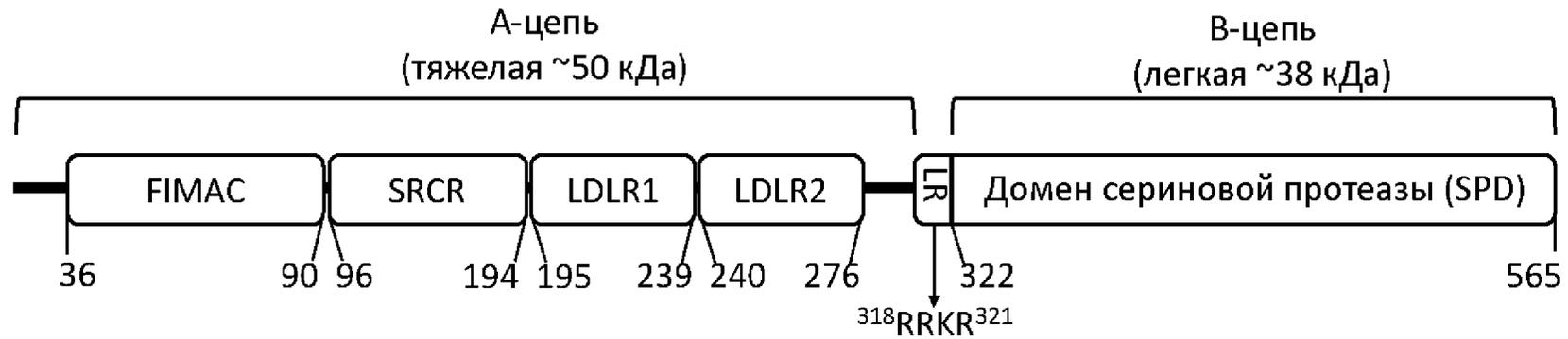
ретинопатии, сухой возрастной дегенерации макулы (AMD), глаукомы, кератоконъюнктивита, нейромиеелита зрительного нерва со спектральным расстройством (NMOSD), открытоугольной глаукомы, полипообразной хориоидальной васкулопатии, болезни Штаргардта, увеита и витреоретинопатии.

134. Способ по любому из пп. 130–133, причем офтальмологическое заболевание является неонкологическим.

135. Клетка, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих CFI дикого типа или его вариант, и содержащая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих фурин.

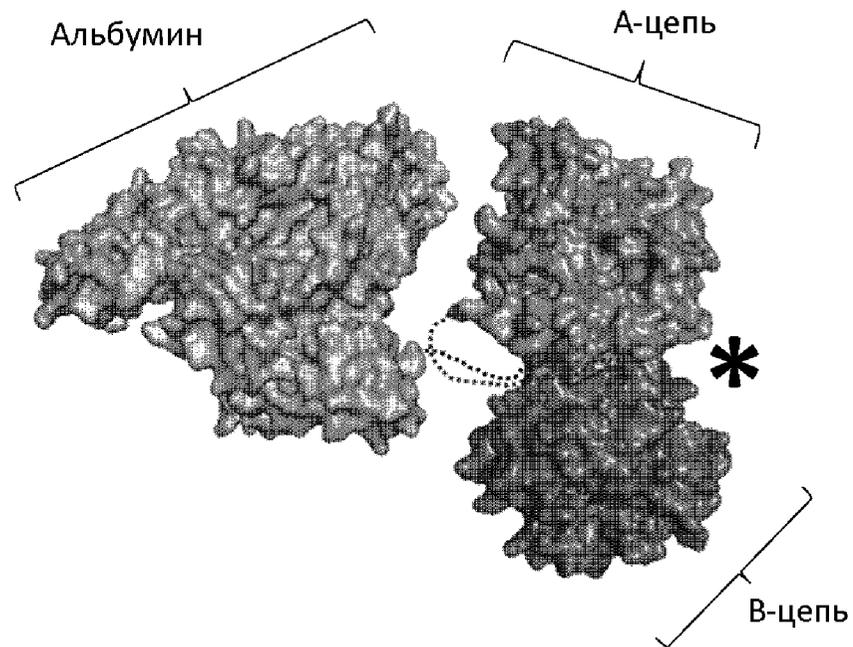
136. Способ получения CFI дикого типа или его варианта в активированном состоянии, включающий получение CFI или его варианта рекомбинантным способом в клетке, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих CFI или его вариант, и содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих фурин.

ФИГ. 1

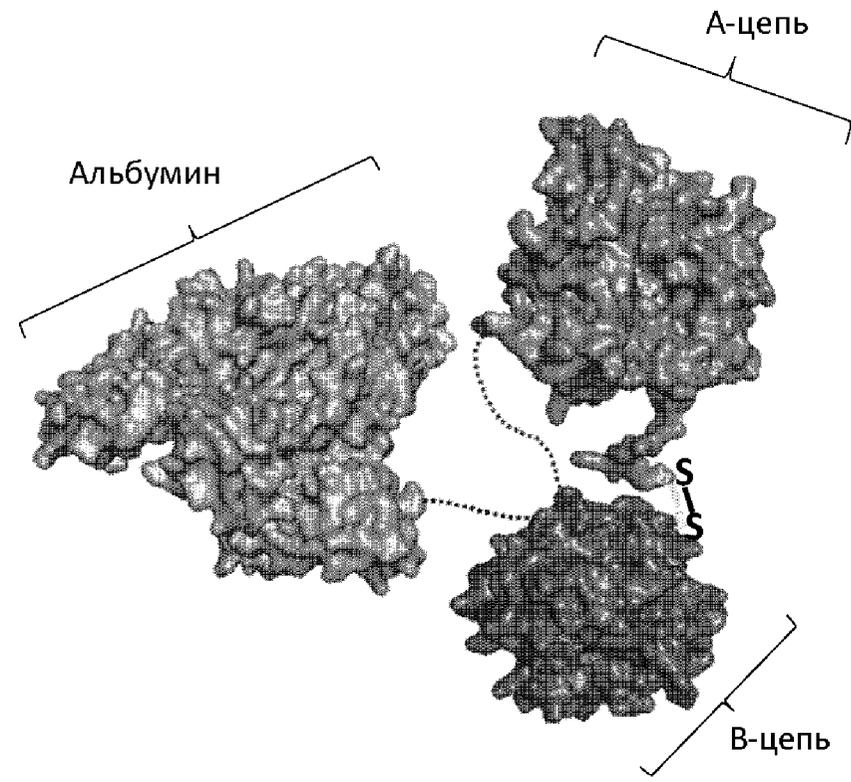


Область	Нумерация химотрипсина-А	Нумерация зрелых белков CFI
Петля активации	16–19	322–326
37-петля	36–39	342–344
60-петля	60–64	366–372
70-петля	69–80	377–389
99-петля	94–101	403–410
110-петля	109–112	418–426
150-петля автолиза	142–152	455–463
180-петля стабилизирующего оксианиона	184–193	494–509
220-петля входной рамки S1	216–223	529–536

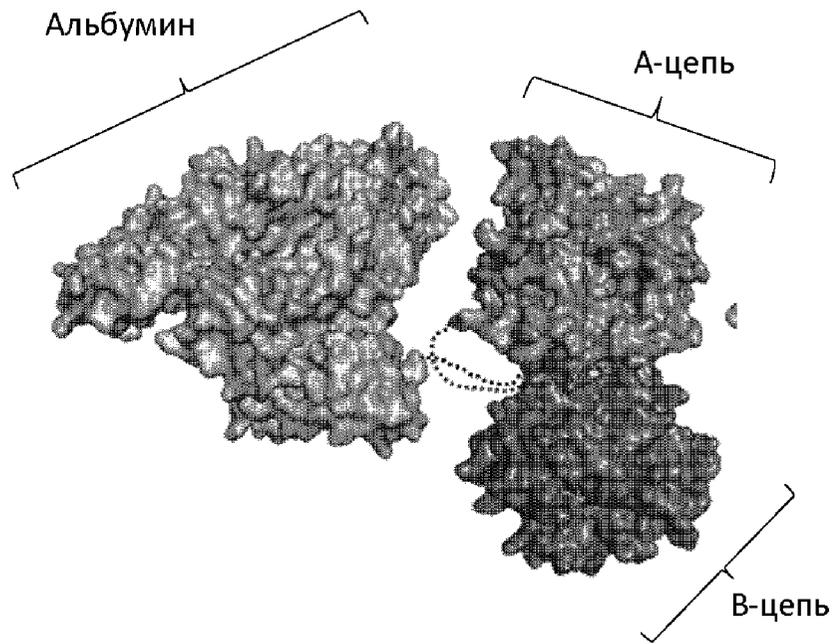
ФИГ. 2А



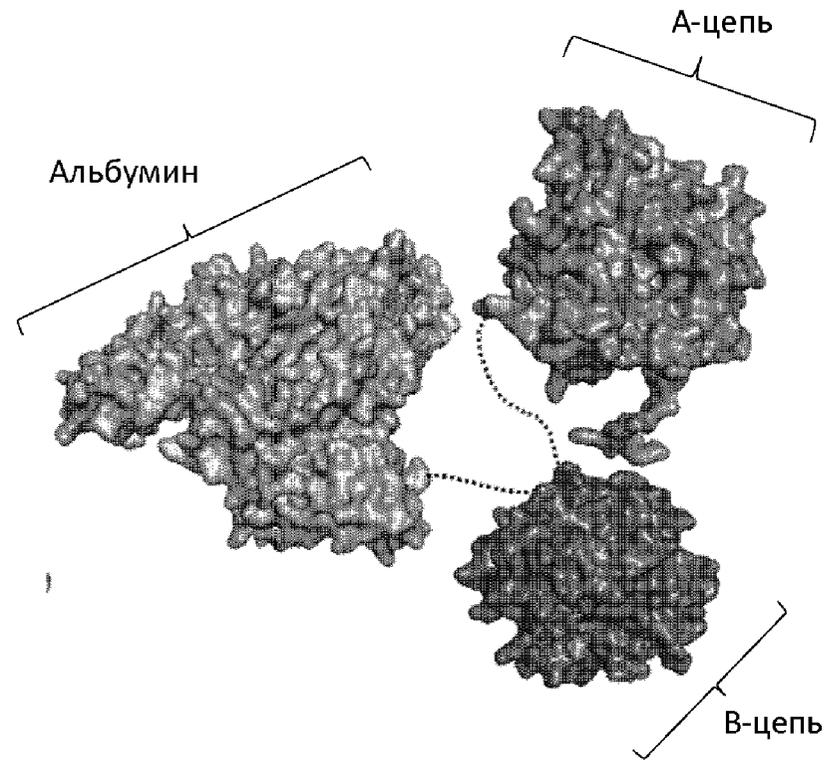
ФИГ. 2В



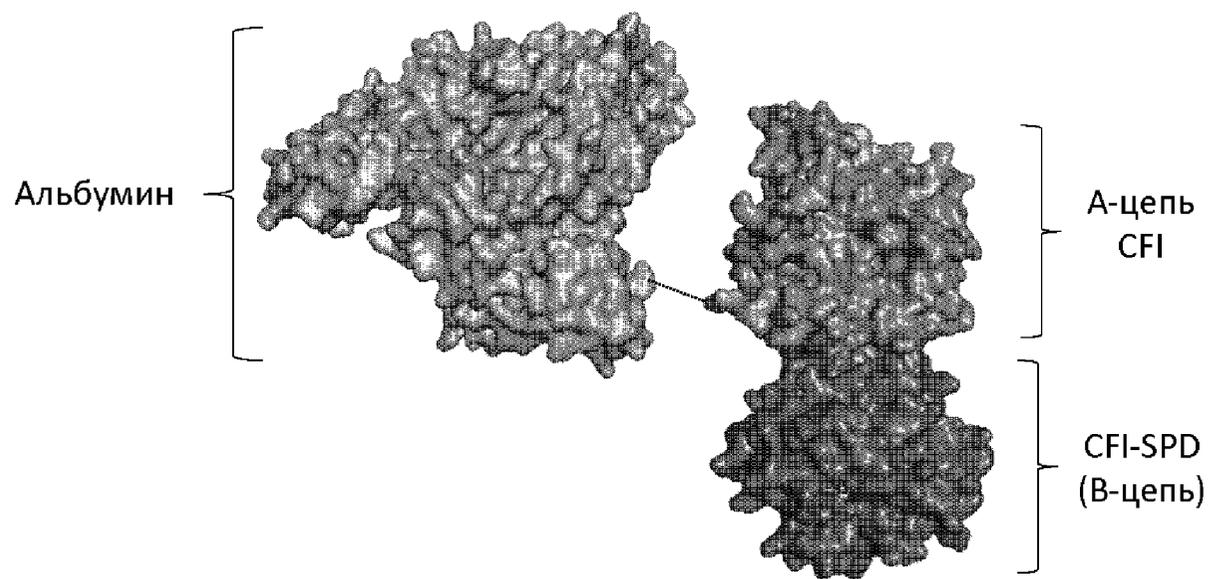
ФИГ. 2С



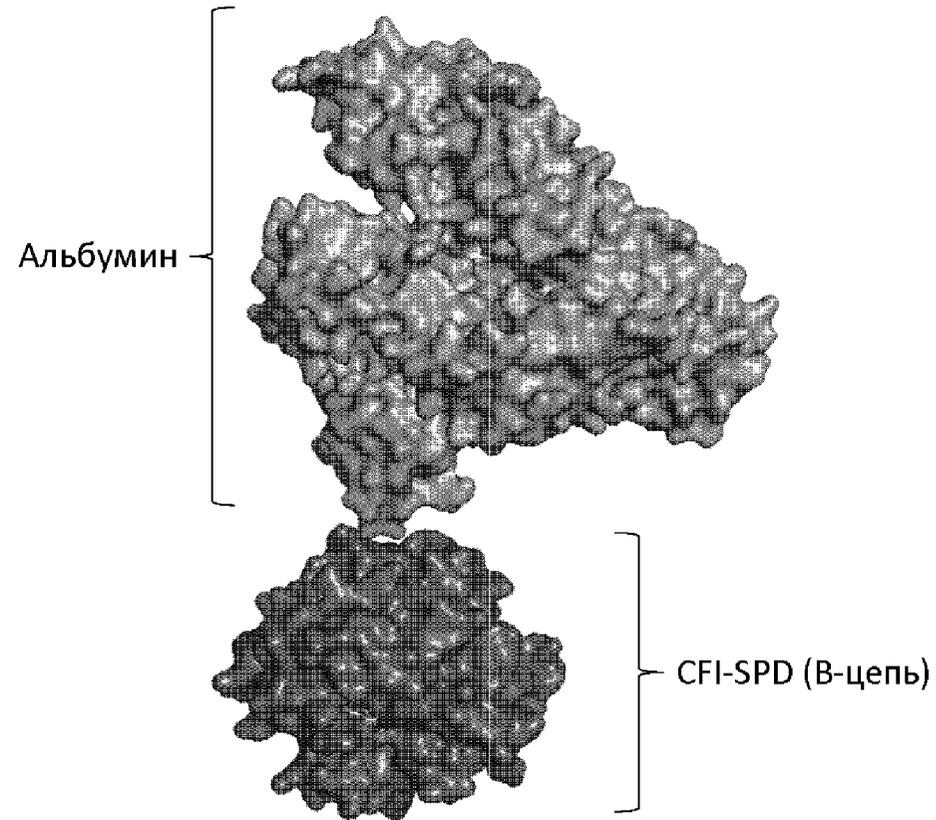
ФИГ. 2D



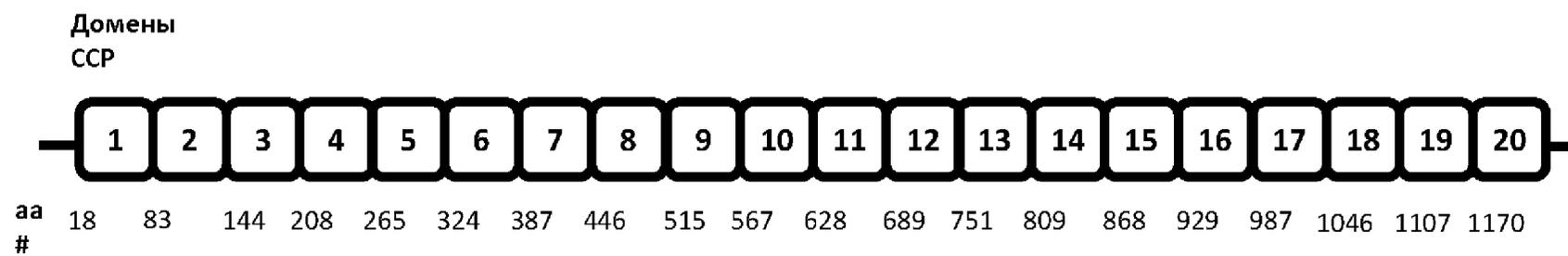
ФИГ. 3А



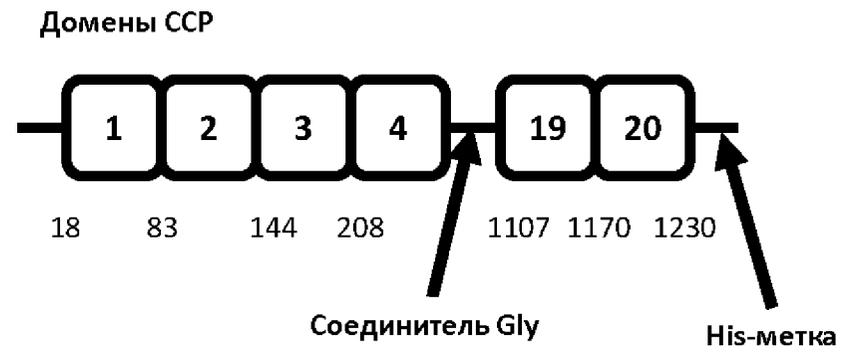
ФИГ. 3В



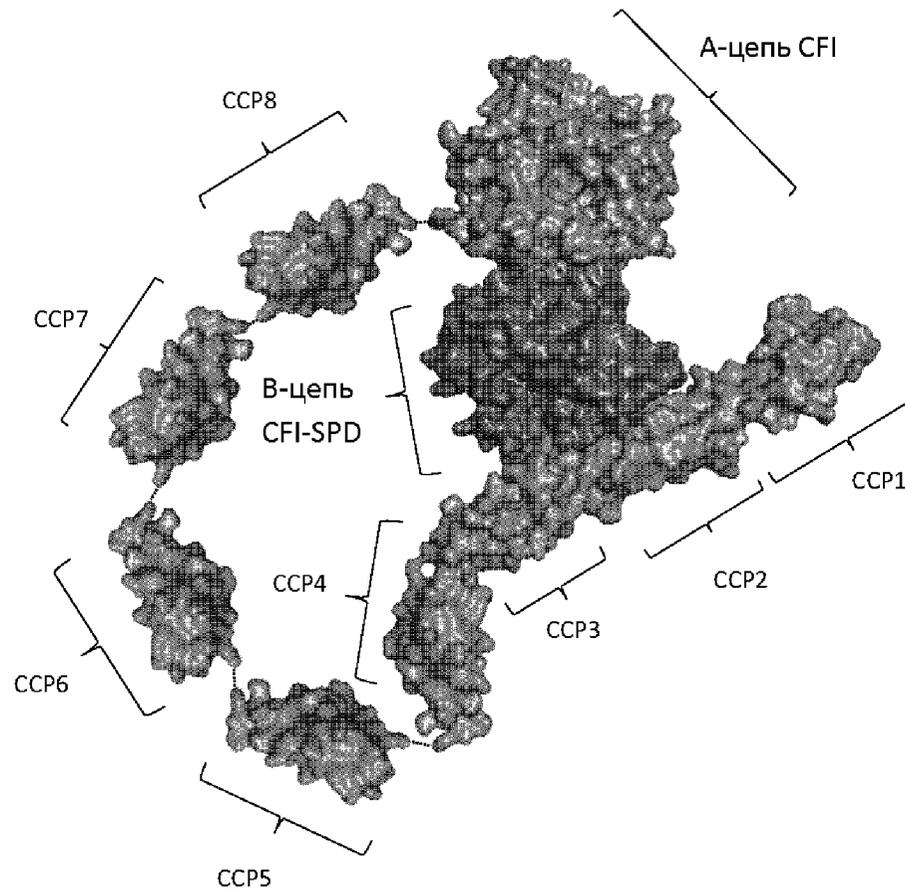
ФИГ. 4А



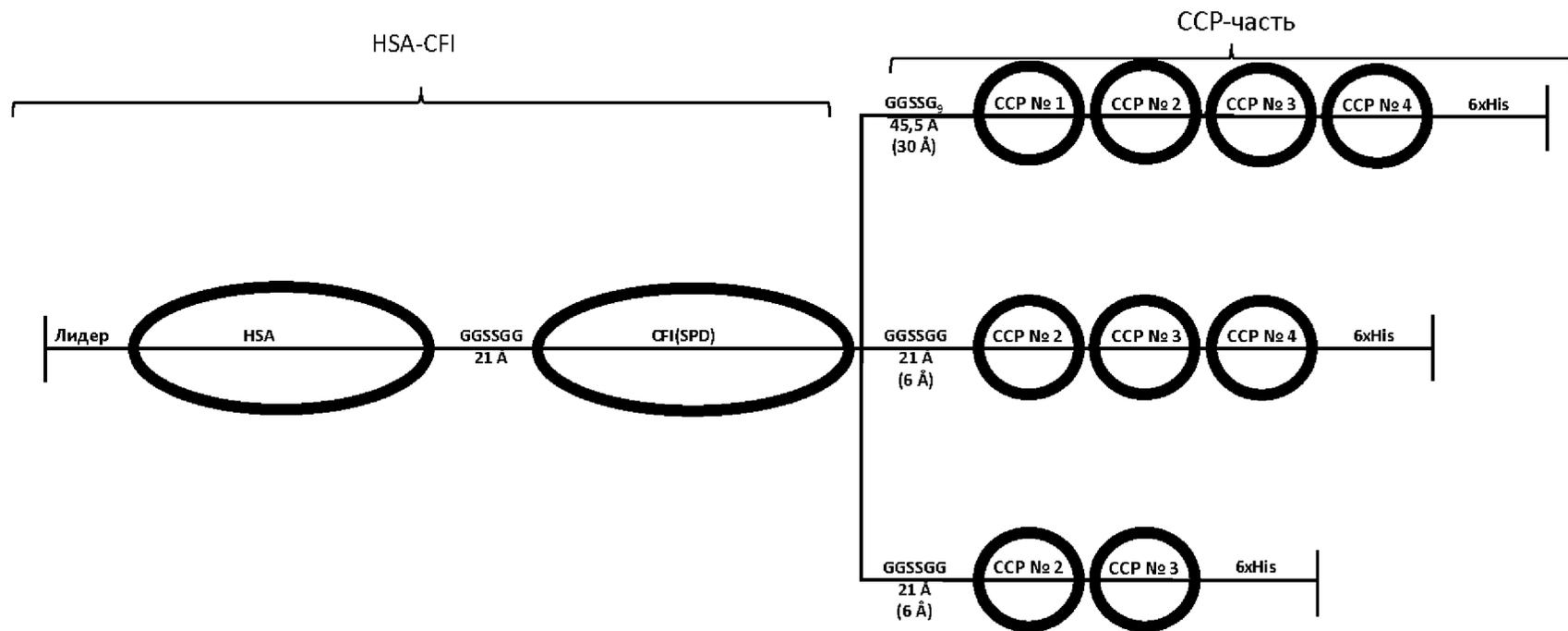
ФИГ. 4В



ФИГ. 5



ФИГ. 6

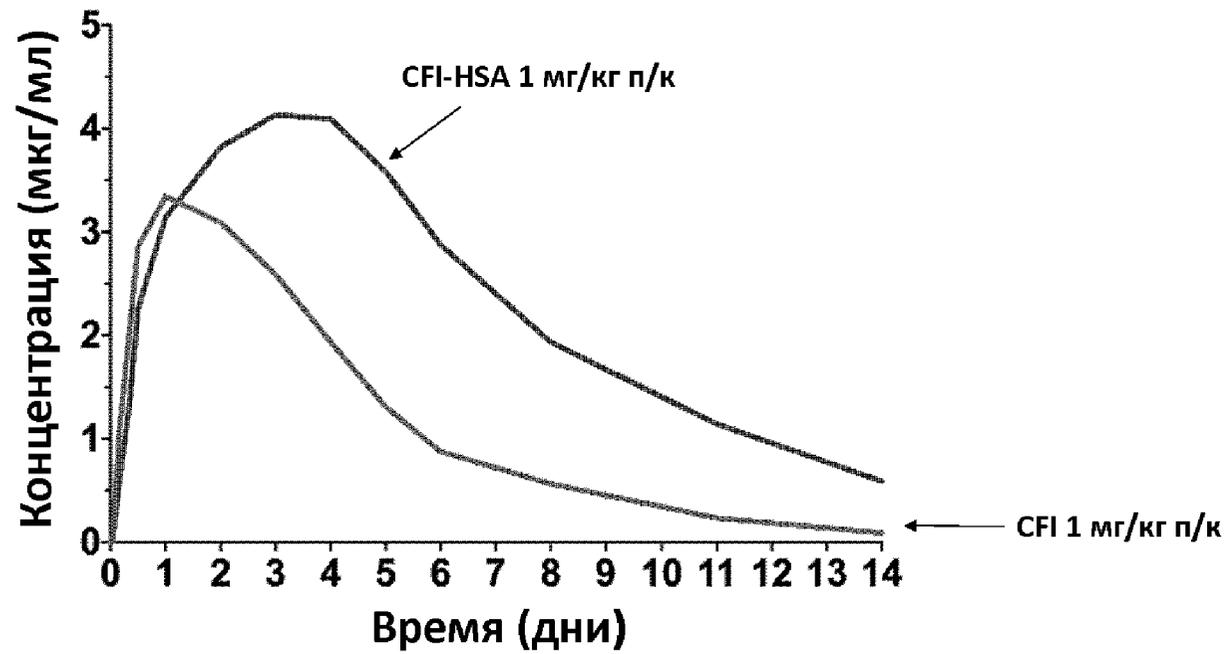


ФИГ. 7



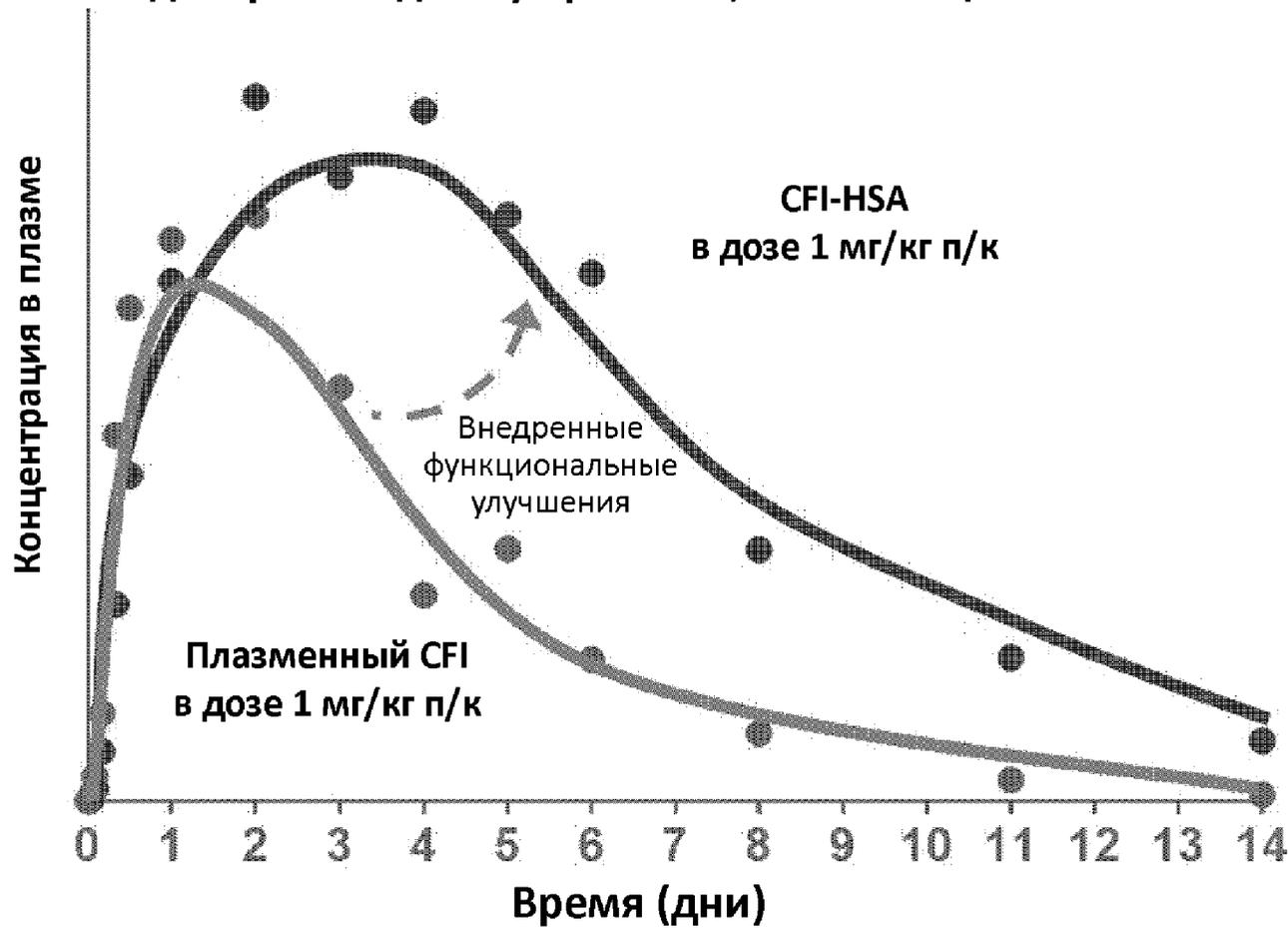
ФИГ. 8А

ФК однократной дозы у африканских зеленых мартышек

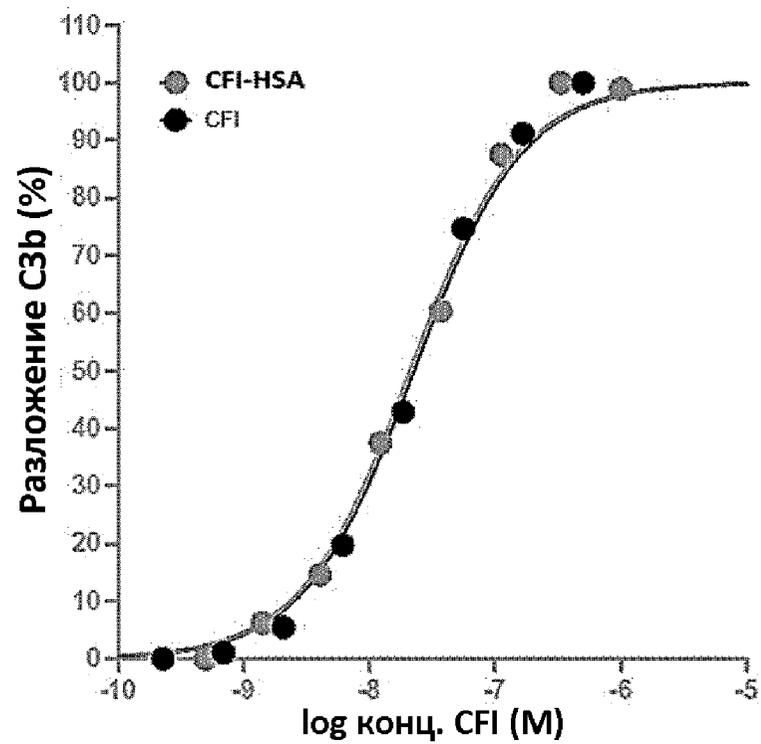


ФИГ. 8В

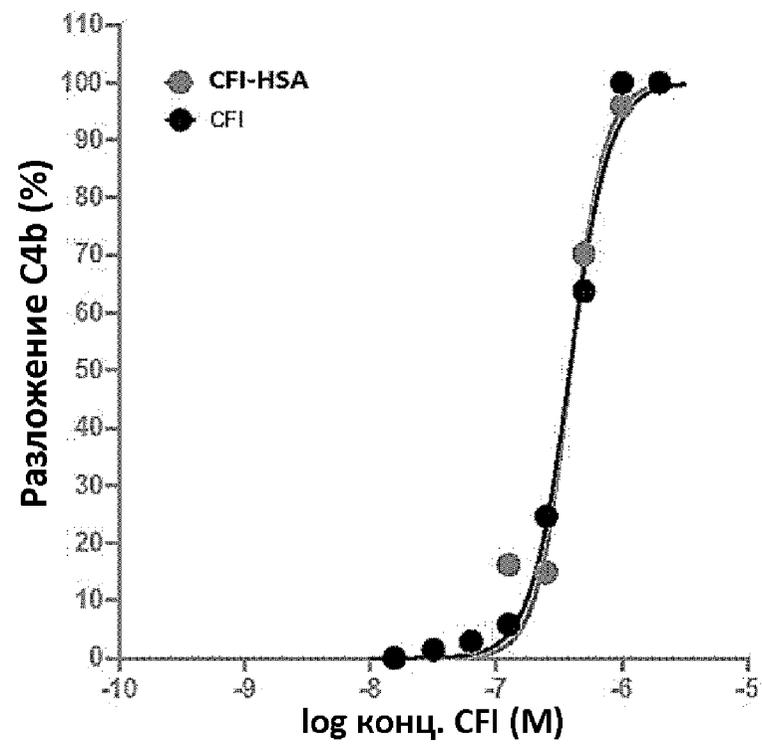
ФК системной однократной дозы у приматов, не являющихся человеком



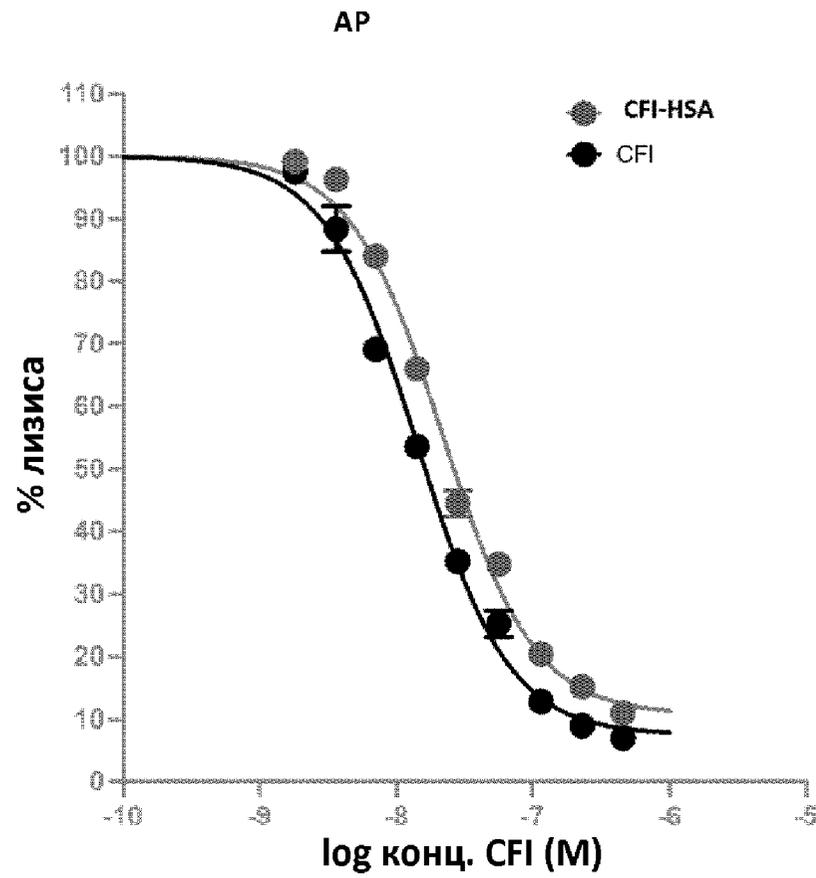
ФИГ. 9А



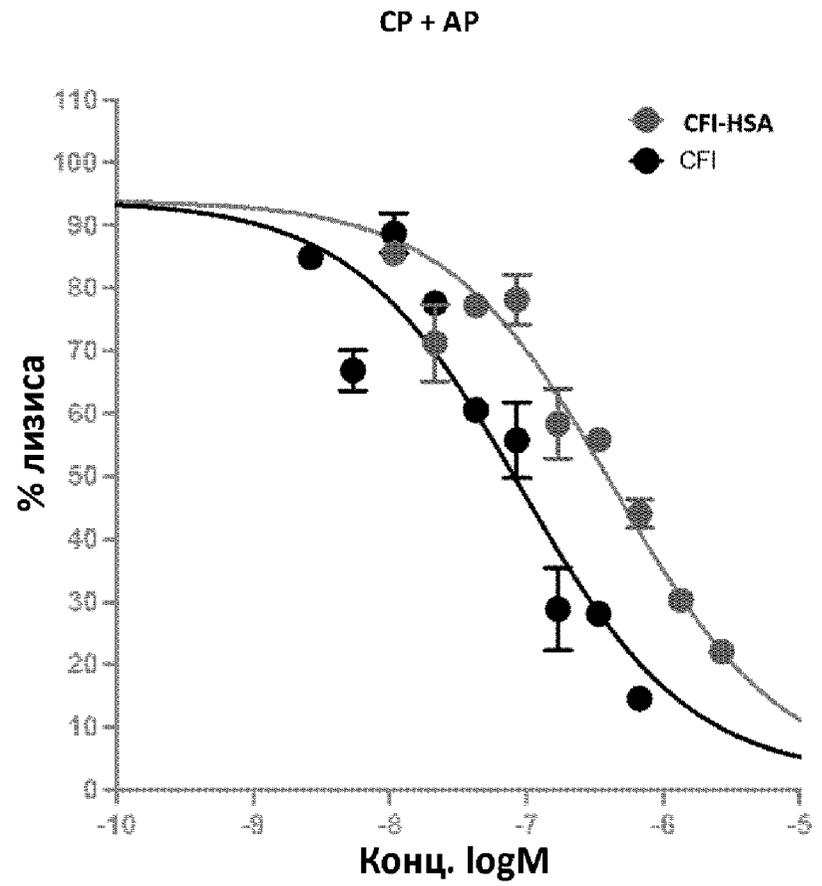
ФИГ. 9В



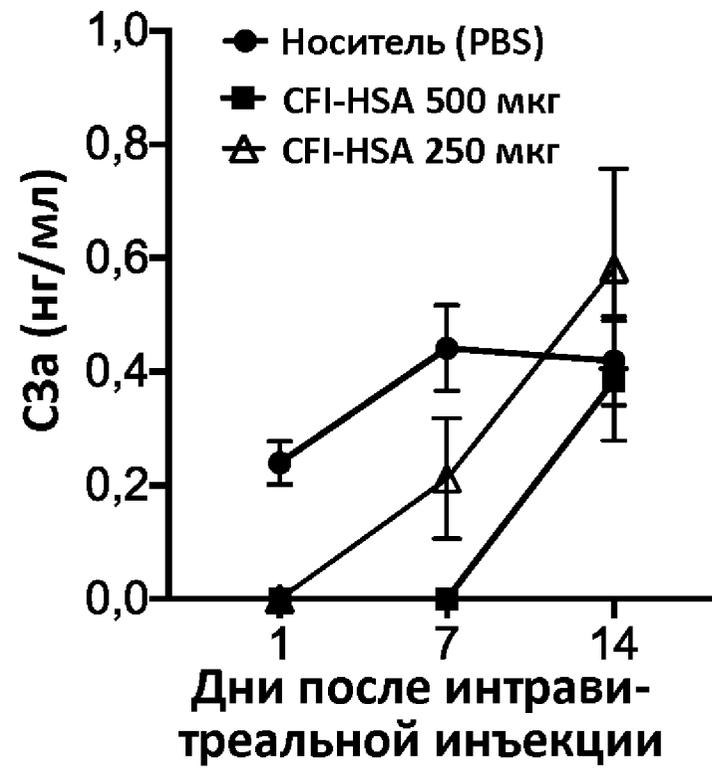
ФИГ. 9С



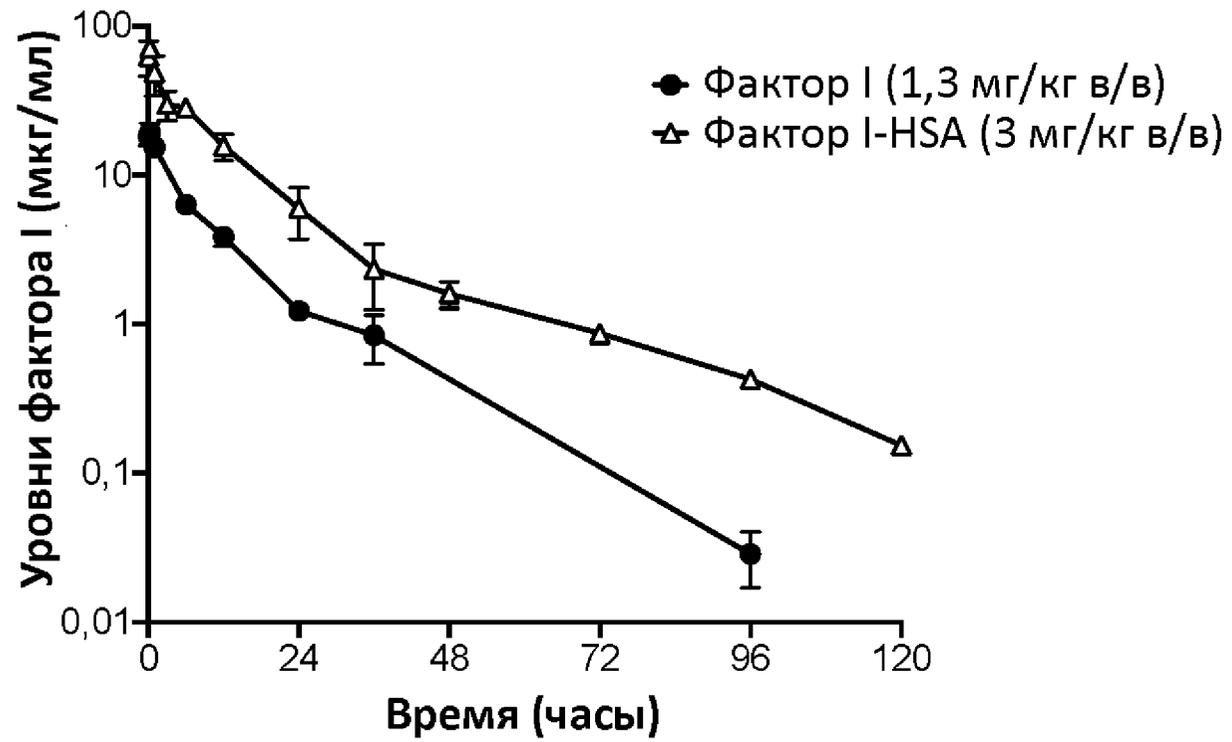
ФИГ. 9D



ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12

