

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491254** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.09.19

(22) Дата подачи заявки
2022.12.21

(51) Int. Cl. *A61K 47/02* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) **СОСТАВЫ С ФАКТОРОМ I КОМПЛЕМЕНТА**

(31) **63/293,013**

(32) **2021.12.22**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/082179**

(87) **WO 2023/122691 2023.06.29**

(71) Заявитель:

**ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**

(72) Изобретатель:

**Шань Бин, Коннолли Брайан Дэвид,
Балан Сибу, Чатгерджи Анджу (US)**

(74) Представитель:

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

(57) В настоящем документе предложены фармацевтически приемлемые составы, содержащие фактор I комплемента (CFI) дикого типа и его варианты; в некоторых вариантах осуществления CFI дикого типа и его варианты являются частью слитного конструкта, например слитного конструкта, содержащего человеческий сывороточный альбумин. Составы стабилизируют CFI против острых стрессовых воздействий во время хранения в жидком или лиофилизированном состоянии. Также предложены способы получения составов и способы применения составов для лечения заболеваний.

A1

202491254

202491254

A1

СОСТАВЫ С ФАКТОРОМ I КОМПЛЕМЕНТА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/293,013, 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_707_01WO_SeqList_ST26.xml; размер: 31 757 байтов и дата создания: 17 декабря 2022 г.) полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Фактор I комплемента (CFI) представляет собой растворимый белок системы комплемента, который регулирует активацию комплемента путем расщепления связанных с клеткой или находящихся в жидкой фазе C3b и C4b. Это растворимый гликопротеин, который циркулирует в крови человека, и его функции заключаются в поддержании баланса между классическим, лектиновым и альтернативным путями системы комплемента. Дисрегуляция CFI, мутации и нарушение функциональности CFI, а также дефицит CFI играют роль в заболеваниях, связанных с системой комплемента. Необходимы фармацевтически приемлемые составы с CFI, пригодные для регулирования системы комплемента. Представленные в настоящем документе составы удовлетворяют эту потребность.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В настоящем описании предложены составы, содержащие фактор I комплемента (CFI) дикого типа или варианты CFI, а также их слитные белки. Предложенные составы стабилизируют активный ингредиент от острых стрессовых воздействий и обеспечивают хранение как в жидком, так и в лиофилизированном состоянии. Также предложены способы получения составов и способы применения составов для лечения заболеваний.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем описании предложены составы, содержащие CFI дикого типа или варианты CFI их слитные белки. Предложенные составы стабилизируют активный ингредиент от острых стрессовых воздействий и обеспечивают хранение как в жидком, так и в лиофилизированном состоянии. Также предложены способы получения составов и способы применения составов для лечения заболеваний.

I. Фармацевтически приемлемые составы

[0006] Фармацевтически приемлемые составы, описанные в настоящем документе, обеспечивают стабилизирующие свойства для CFI дикого типа или вариантов CFI и их слитных конструкторов согласно настоящему описанию (взаимозаменяемо называемых в настоящем документе «активный ингредиент» или «активный фармацевтический ингредиент») в диапазоне концентраций, которые обеспечивают фармацевтически приемлемые условия хранения. Стабилизирующими свойствами могут быть, например, предотвращение разложения, поддержание концентрации, предотвращение агрегации и/или сохранение биологической активности.

[0007] Составы согласно настоящему описанию включают в себя CFI дикого типа, варианты CFI, слитные конструкторы, содержащие CFI дикого типа (например, CFI-HSA), или слитные конструкторы, содержащие варианты CFI (например, слияние любого варианта CFI из таблицы 2 с HSA), буферные агенты, модификаторы тоничности, поверхностно-активные вещества и дополнительно необязательно наполнители, криопротекторы, лиопротекторы и/или стабилизаторы.

[0008] Состав может быть предназначен для обеспечения хранения активного ингредиента в твердой (сухой) форме (например, лиофилизированный осадок или криоконсерват). В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой лиофилизат. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой жидкий состав.

[0009] Составы могут быть предназначены для обеспечения хранения (при сохранении, например, стабильности, активности) активного ингредиента в растворе в виде жидкости в диапазоне концентраций. Концентрация в составе может быть скорректирована для применения при различных типах введения (например, подкожном или внутривенном). Например, активный ингредиент может храниться в составе в виде жидкого раствора при

концентрации от примерно 10 мг/мл до примерно 300 мг/мл, например, при концентрации примерно 10 мг/мл, примерно 15 мг/мл, 20 мг/мл, примерно 25 мг/мл, 30 мг/мл, примерно 35 мг/мл, 40 мг/мл, примерно 45 мг/мл, примерно 50 мг/мл, примерно 55 мг/мл, примерно 60 мг/мл, примерно 65 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 75 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 85 мг/мл, примерно 90 мг/мл, примерно 95 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 105 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 120 мг/мл, примерно 125 мг/мл, примерно 130 мг/мл, примерно 135 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 145 мг/мл, примерно 150 мг/мл, примерно 155 мг/мл, примерно 160 мг/мл, примерно 165 мг/мл, примерно 175 мг/мл, примерно 180 мг/мл, примерно 185 мг/мл, примерно 190 мг/мл, примерно 195 мг/мл, примерно 200 мг/мл, примерно 205 мг/мл, примерно 210 мг/мл, примерно 215 мг/мл, примерно 220 мг/мл, примерно 225 мг/мл, примерно 230 мг/мл, примерно 235 мг/мл, примерно 245 мг/мл, примерно 250 мг/мл, примерно 255 мг/мл, примерно 260 мг/мл, примерно 260 мг/мл, примерно 265 мг/мл, примерно 270 мг/мл, примерно 275 мг/мл, примерно 280 мг/мл, примерно 285 мг/мл, примерно 290 мг/мл, примерно 295 мг/мл или примерно 300 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления состав содержит активный ингредиент в концентрации примерно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления состав содержит активный ингредиент в концентрации примерно 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления состав содержит активный ингредиент в концентрации более 150 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления состав содержит активный ингредиент в концентрации примерно 170 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления состав содержит активный ингредиент в концентрации примерно 190 мг/мл.

[0010] Составы согласно настоящему описанию позволяют активному ингредиенту сохранять стабильность (например, активность) при любой одной или более из следующих температур: $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ или при $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[0011] Составы согласно настоящему описанию позволяют активному ингредиенту сохранять стабильность (например, активность) в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по

меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере одного года, по меньшей мере 2 лет или более.

[0012] рН состава, описанного в настоящем документе, представляет собой любой рН, который придает стабилизирующие свойства вариантам СFI и слитным конструктам, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления состав имеет рН от примерно 5 до примерно 7,5. рН может составлять, например, примерно рН 5,0, примерно рН 5,1, примерно рН 5,2, примерно рН 5,3, примерно рН 5,4, примерно рН 5,5, примерно рН 5,6, примерно рН 5,7, примерно рН 5,8, примерно рН 5,9, примерно рН 6,0, примерно рН 6,1, примерно рН 6,2, примерно рН 6,2, примерно рН 6,3, примерно рН 6,4, примерно рН 6,5, примерно рН 6,6, примерно рН 6,7, примерно рН 6,8, примерно рН 6,9, примерно рН 7, примерно рН 7,1, примерно рН 7,2, примерно рН 7,3, примерно рН 7,4 или примерно рН 7,5.

[0013] Составы включают в себя фармацевтически приемлемый буферный агент. Буферные агенты могут быть использованы для поддержания рН состава в желаемом диапазоне. В составах согласно настоящему описанию может быть использован любой подходящий буфер. Примеры фармацевтически приемлемых буферов включают в себя буферы на основе гистидина, ацетата, цитрата, сукцината, тартрата, глутамата, глицина, бикарбоната, сульфата, нитрата, фосфата и гидроксиметиламинометана (трис). В некоторых вариантах осуществления буферный агент присутствует в количестве от примерно 1 мМ до примерно 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферный агент присутствует в количестве примерно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит гистидин, например гистидина гидрохлорид. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат, например ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит сукцинат, например сукцинат натрия.

[0014] Составы включают в себя поверхностно-активное вещество, иногда называемое смачивающим и/или солюбилизующим агентом. Без ограничения, эксципиент-поверхностно-активное вещество может быть использован для модулирования растворимости и биодоступности биологических молекул, повышения стабильности молекул биологических препаратов в лекарственных формах и поддержания предпочтительных полиморфных форм. Примеры поверхностно-активных веществ включают в себя полисорбат 20 (PS20, Tween 20), полисорбат 80 (PS80, Tween 80),

PS80/20, полуксамер (Pluronic F68 и F127), Triton X-100, Brij 30 и Brij 35. В некоторых вариантах осуществления состав согласно настоящему описанию содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления состав содержит полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 20 присутствует в концентрации от примерно 0,01% до примерно 0,05%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат составляет примерно 0,02%. В некоторых вариантах осуществления состав содержит полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 присутствует в концентрации от примерно 0,01% до примерно 0,05%. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 составляет примерно 0,02%.

[0015] Составы включают в себя модификатор тоничности, который иногда также может именоваться регулятором тоничности, тонификатором или тонифицирующим агентом. Модификаторы тоничности применяют для регулирования осмоляльности состава таким образом, чтобы осмотическое давление состава при введении субъекту не вызывало каких-либо вредных последствий, таких как нежелательный лизис клеток. Любые фармацевтически приемлемые модификаторы тоничности, совместимые с активными ингредиентами согласно настоящему описанию, могут быть пригодны для применения в составах, описанных в настоящем документе. Фармацевтически приемлемые модификаторы тоничности могут включать в себя, например, маннит, сорбит, лактозу, декстрозу, трегалозу, хлорид натрия, хлорид калия, глицерол, глицерин или аргинина гидрохлорид. В некоторых вариантах осуществления состав содержит модификаторы тоничности. В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой аргинина гидрохлорид. В некоторых вариантах осуществления состав содержит аргинина гидрохлорид. В некоторых вариантах осуществления концентрация аргинина гидрохлорида составляет от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ. В некоторых вариантах осуществления аргинина гидрохлорид имеет концентрацию примерно 70 мМ. В некоторых вариантах осуществления аргинина гидрохлорид имеет концентрацию примерно 135 мМ. В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой сорбит, и сорбит присутствует в количестве от примерно 1% до примерно 10% об./об., например в количестве примерно 5% об./об. В некоторых вариантах осуществления модификатор

тоничности представляет собой трегалозу, и трегалоза присутствует в количестве от примерно 1% до примерно 15% об./об., например в количестве примерно 10% об./об. В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой хлорид натрия и присутствует в количестве от примерно 1 мМ до примерно 500 мМ, например в количестве примерно 150 мМ. В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой сорбит или трегалозу для неионных буферных агентов и хлорид натрия для ионных буферных агентов.

[0016] Состав может включать в себя наполнитель, например трегалозу или глицин. В некоторых вариантах осуществления наполнитель представляет собой глицин и присутствует в составе в количестве от примерно 1% до примерно 5% об./об., например в количестве примерно 2%. В некоторых вариантах осуществления наполнитель представляет собой глицин и присутствует в составе в количестве от примерно 1 мМ до примерно 100 нМ, например в количестве примерно 60 мМ.

[0017] Состав может включать в себя криопротектор и/или лиопротектор. Криопротекторы и лиопротекторы включены в составы для обеспечения защиты биологических молекул от денатурации во время циклов замораживания и оттаивания. Они также могут способствовать сохранению биологической целостности, например поддержанию биологической активности, во время лиофилизации (т. е. сублимационной сушки) и восстановления. В некоторых случаях криопротекторы и лиопротекторы могут носить такие названия взаимозаменяемо. Может быть использован любой фармацевтически приемлемый криопротектор и/или лиопротектор, способный обеспечивать стабилизирующие свойства составов, включающих в себя варианты CFI и слитные конструкты согласно настоящему описанию. Не имеющие ограничительного характера примеры криопротекторов и лиопротекторов включают в себя полиолы, дисахариды, полисахариды, глюкозу, глицин, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40. В некоторых вариантах осуществления состав содержит криопротектор. В некоторых вариантах осуществления криопротектор представляет собой по меньшей мере одно из сахарозы, глицина, сорбита, трегалозы и маннита. В некоторых вариантах осуществления криопротектор представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления сахароза присутствует в концентрации от примерно 2% до примерно 10%. В некоторых вариантах осуществления сахароза присутствует в концентрации от примерно 4% до примерно 5%. В некоторых вариантах осуществления сахароза

составляет примерно 8,5%. В некоторых вариантах осуществления криопротектор представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления глицин присутствует в концентрации от примерно 50 мМ до примерно 150 мМ, например примерно 120 мМ. В некоторых вариантах осуществления глицин присутствует в концентрации примерно 120 мМ. В некоторых вариантах осуществления криопротектор представляет собой сорбит. В некоторых вариантах осуществления глюкоза присутствует в составе в количестве от примерно 1% до примерно 10% об./об., например в количестве примерно 4% об./об. В некоторых вариантах осуществления сорбит присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 5%. В некоторых вариантах осуществления сорбит присутствует в концентрации примерно 2,5% об./об. В некоторых вариантах осуществления трегалоза присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 10% об./об., например примерно 4% об./об. В некоторых вариантах осуществления сорбит составляет примерно 2,5%. В некоторых вариантах осуществления криопротектор представляет собой маннит. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита составляет от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в концентрации примерно 60 мМ.

[0018] Состав может включать в себя стабилизирующий агент, иногда называемый стабилизатором. Стабилизирующий агент представляет собой любой эксципиент, который обеспечивает стабилизирующие свойства составов, включающих в себя варианты CFI и слитные конструкты, описанные в настоящем документе. Например, стабилизирующий агент может представлять собой хлорид кальция (CaCl_2), гистамин, метионин, аскорбиновую кислоту, глутатион, витамин Е, поли(этиленмин), хелатирующие агенты, antimicrobные консерванты, антиоксидантные консерванты или любой другой фармацевтически приемлемый стабилизирующий агент. В некоторых вариантах осуществления состав содержит стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления состав содержит хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления концентрация хлорида кальция составляет от примерно 20 мМ до примерно 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления хлорид кальция имеет концентрацию примерно 35 мМ.

[0019] Примеры составов представлены в таблице 2.2 и таблице 3.3.

- [0020] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ ацетата натрия, 5% сорбита, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 5.
- [0021] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ ацетата натрия, 5% сорбита, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 5,5.
- [0022] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ ацетата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 5,5.
- [0023] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ ацетата натрия, 70 мМ аргинина гидрохлорида, 2% сахарозы, 60 мМ глицина, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 5,5.
- [0024] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина гидрохлорида, 70 мМ аргинина гидрохлорида, 2% сахарозы, 60 мМ глицина, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 6.
- [0025] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина гидрохлорида, 150 мМ хлорида натрия, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 6.
- [0026] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ сукцината натрия, 10% трегалозы, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 5.
- [0027] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ сукцината натрия, 5% трегалозы, 2% глицина, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 5.
- [0028] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина гидрохлорида, 10% трегалозы, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 6.
- [0029] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина гидрохлорида, 5% трегалозы, 2% глицина, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 6.
- [0030] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина гидрохлорида, 10% трегалозы, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 7.
- [0031] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина гидрохлорида, 5% трегалозы, 2% глицина, 0,02% PS80 и имеет рН примерно 7.

[0032] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 135 мМ аргинина гидрохлорида, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

[0033] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 70 мМ аргинина гидрохлорида, 4% сахарозы, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

[0034] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 8,5% сахарозы, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

[0035] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 70 мМ аргинина гидрохлорида, 120 мМ глицина, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

[0036] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 70 мМ аргинина гидрохлорида, 2,5% сорбита, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

[0037] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 70 мМ аргинина гидрохлорида, 4% трегалозы, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

[0038] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 20 мМ гистидина, 5% сахарозы, 35 мМ хлорида кальция, 0,02% полисорбата 20 и имеет рН примерно 5,8.

II. Варианты фактора I комплемента и слитные конструкторы для состава

A. Варианты фактора I комплемента

[0039] В настоящем документе предложены составы, которые содержат варианты, включающие в себя 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.

[0040] Варианты CFI согласно описанию непосредственно не действуют на C3, например варианты согласно описанию непосредственно не расщепляют C3,

непосредственно не ингибируют СЗ, непосредственно не ингибируют активацию СЗ и непосредственно не снижают активацию СЗ.

[0041] 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.

[0042] 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).

[0043] CFI дикого типа содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые также называются А-цепью и В-цепью соответственно. Тяжелая цепь (А-цепь) имеет четыре домена: домен мембраноатакующего комплекса FI (FIMAC) (остатки 36-90 в SEQ ID NO: 5), домен SRCR, который дополнительно состоит из множества богатых цистеином доменов скавенджер-рецептора (SRCR), домен липопротеина низкой плотности 1 (LDLr1) и домен липопротеина низкой плотности 2 (LDLr2). Легкая цепь (В-цепь) состоит из домена сериновой протеазы (SPD). Область контакта между этими цепями называется областью контакта цепей А:В.

[0044] Вариант CFI согласно настоящему 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.

[0045] Варианты CFI согласно описанию могут быть получены путем введения одной или более модификаций в базовую молекулу CFI, где домены базовой молекулы CFI соответствуют доменам, встречающимся в CFI дикого типа. 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.

[0046] 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.

[0047] 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>MKLLHVFLFLCFHLRFCKVTYTSQEDLVE</u> <u>KKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCV</u> <u>CKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKS</u> <u>LECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGN</u> <u>TDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREA</u> <u>NVACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLSINSTE</u> <u>CLHVHCRGLETSLAECTFTKRRRTMGYQDFA</u> <u>DVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMK</u> <u>ACDGINDCGDQSDELCKACQGKGFHCKS</u> <u>GVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFAS</u> <u>VTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGV</u> <u>KNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIK</u> <u>DASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHR</u> <u>YQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHEN</u> <u>YNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSI</u> <u>PACVPWSPYLFQPNDT CIVSGWGREKDNER</u> <u>VFSLQWGEVKLISNCSKFGNRFYEKEMEC</u> <u>AGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTY</u> <u>VWGVVSWGENCCKPEFPGVYTKVANYFD</u> <u>WISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 1)</u>
wt-hCFI, без сигнальной последовательности	hCFI	<u>KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFC</u> <u>QPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATN</u> <u>RRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTAE</u> <u>GKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMF</u> <u>ICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRF</u> <u>KLSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTK</u> <u>RRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC</u> <u>VNGKYISQMKACDGINDCGDQSDELCKA</u> <u>CQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGE</u> <u>DEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRI</u> <u>KSLLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQL</u> <u>GDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAH</u> <u>HCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIE</u> <u>YVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGN</u> <u>KKDCELPRSI PACVPWSPYLFQPNDT CIVSG</u> <u>WGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFG</u>

Описание базовой молекулы CFI	Номенклатура базовой молекулы	Аминокислотная последовательность
		NRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLV CMDANNVTYVWGVVSWGENCCKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 5)
Δ(K1-P305), делеция А-цепи wt-hCFI	ΔА-цепь (CFI-SPD)	KLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDL WQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAACHLR ASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVD RIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKD CELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGR EKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFGYGNRFY EKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM ANNVTYVWGVVSWGENCCKPEFPGVYTK VANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 12)
Мышиный CFI дикого типа (https://www.uniprot.org/uniprot/Q61129)	Мышиный CFI (mCFI)	MKLAHLSLFLALHLSSSRSPSASDLPQEEL VDQKCLLQKYTHRSCNKVFCQPWQRCIEGT CICKLPYQCPRAGTPVCAMNGRSYPTYCHQ KSFECLEHPEIKFSHNGTCAAEGKFNVS LIYGRTKTEGLVQVKLVQDERMFICKNS WSMAEANVACVDLGFPLGVRDIQGSFN ISGNLHINDTECLHVHCRGVETSLAEC AFTKRRTLSNGLAGVVCYKQDADFPT SLSFQCVNGKHIPQEKACNGVND CGDQSDDELCCCKGCRGNASLC KSGVCIPDQYKCNGEVDCITGEDES RCEEDRQQNIPKGLARSAQGEAEI ETEEMLTGM DNERKRIKSLLPKL SCGVKRNTHTRRKR VIGGKPA NVGDYPWQVAIKDGQRITCGGIYIG GCWILTAACHCVRPSRAHSYQVWT ALLDWLKPNSQLGIQTVKRVIVHE KYNGATFQNDIALIEMKMHTGKKE CELPNSVPACVPWSPYLFQPNDR CIISGWGRGKDNQKVYSLRWGEV DLIGNCSQFYPPDRYYEKEMQCA GTRDGSIDACKGDSGGPLVCE DINNVTYVWGVVSWGENCCKPE FPGVYTRVANYFDWISYHVGRSL VLSQHN NV (SEQ ID NO: 23)
wt-hCFI + GSSGG (линкер) + wt-hCFI	Слитный белок hCFI-hCFI	KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFC QPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATN RRSFPTYCQQKSLECLHPGKFLNNGTCTAE GKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDKTMF ICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRF KLSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTK RRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC VNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCCA CQKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGE DEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRI KSLLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQL

Описание базовой молекулы CFI	Номенклатура базовой молекулы	Аминокислотная последовательность
		GDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA HCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIE YVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGN KKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSG WGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYG NRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLV CMDANNVTYVWGVVSWGENCEGKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNVSSGG KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFC QPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATN RRSFPTYCQQKSLECLHPGKFLNNGTCTAE GKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMF ICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRF KLSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTK RRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC VNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKA CQKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGE DEVCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRI KSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQL GDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA HCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIE YVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGN KKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSG WGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYG NRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLV CMDANNVTYVWGVVSWGENCEGKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 16)

[0048] 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.

[0049] 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.

[0050] 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 доменов CFI содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

[0051] 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.

[0052] 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, соответствующую аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

[0053] 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.

Настройка активности и специфичности

[0054] 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.

[0055] 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.

[0056] 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.

[0057] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI согласно описанию, которые представляют собой специфические деструкторы C3b, пригодны для лечения заболеваний.

[0058] В некоторых вариантах осуществления варианты CFI согласно описанию, которые представляют собой специфические деструкторы C4b, пригодны для лечения заболеваний.

[0059] 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.

Примеры вариантов CFI

[0060] В настоящем документе предложены варианты CFI, содержащие или состоящие по меньшей мере из одной модификации по отношению к CFI дикого типа.

[0061] Без ограничений, настоящее описание предусматривает иллюстративные варианты CFI, описанные в таблице 2. Варианты из таблицы 2 включают в себя модифицированные 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.

[0062] 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 называться имеющим 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.

[0063] В таблице 2 представлены примеры вариантов CFI по настоящему описанию. 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

Таблица 2. Примеры вариантов CFI и комбинации вариантов CFI

Описание варианта
K14A
Y20A
Y20F
D26A
F29A
R35A
E38A
M220A;K221Q
S507A
S250A
S250L
Δ(K1-P305)
D425A
D425K
D425R

Описание варианта
514-MDANNVT-520 (SEQ ID NO: 24) → NG
ΔC-конц. (Δ558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
R557A
K326A;R327A
Y408L;N531G
L307G
N531G; P535A
Y408L
456-REKDNERVFS- 465 (SEQ ID NO: 26) → NTASSGADYPDE (SEQ ID NO: 27)

Описание варианта
E457G; E461Q;R462K; F464Y
E38A; D425R
Y20F; D425R
S250A; D425R
N531G
N531A
P535A
Y408F
Y408F; N531G
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
E530D
E457G
E461Q

Описание варианта
R462K
F464Y
I317D;R318D;R319D;K320D;R321K
Δ (K1-P305); N531G
Δ (K1-P305); Y408L; N531G
Δ (K1-P305); N531G; P535A
P535G
Y408L; N531G; E457G
Y408L; N531G; E457G; E461Q
Δ (K1-P305); Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G; P535A
Δ (K1-P305); I317D;R318D;R319D;K320D;R321K
K14A; D425R
Y408G
Y408P
Y408D
Y408A
Y408N
Y408T
Y408K
Y408R
Y408H
Y408I
P535K
K534Q
E530D;N531G;G533A;K534Q;P535K;E536N
R321A
N402E
N422K
A502S; K504Q; F537K
A502S
K504Q
K504E
K504R

Описание варианта
K504A
K504G
K504L
K504P
K504H
A361G
T495F; Y496L; D497E; S499G; I500K
T495F; Y496L; D497E; S499G; I500K; G533A; K534Q; P535K; E536N; F537K
F537K
F537R
Q467K
Q467R
Q467K; F537K
E530G
E530G; N531G
E530F
E530Y
E530D; F537K
R557K
P558L
E457G; E461Q
R462A
R462D
E457G; E461G
N531G; E457G; E461Q
W381K
N404G
D506A
D506V
D506E
D506G
I322V
I322V; V323I
R327P
I322V; V323I; R327P
V323A
A328C; W468C

Описание варианта
A328C; W468C; K326Y; R327N
Y408L; N531G; E461Q
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
Y20F; E38A; S250A; D425A
Y20F; E38A; S250A; D425A; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
V311-V565
K1-G310
V311-V565 — G(13) (SEQ ID NO: 29) — K1-G310
C309S
C435S
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K
Y408L; N531G; E457G; E461Q; F464Y
Y408L; N531G; E457G; R462K; F464Y
Y408L; N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; R462K; F464Y
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; R462K
N531G; E457G; E461Q; F464Y
E416A
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; S507A
H370A
P384A
P384G
420-DGNK-424 (SEQ ID NO: 30) → GG
E536A

Описание варианта
N85Q
N159Q
N476Q
N518Q
N52Q; N85Q; N159Q
N446Q; N476Q; N518Q
E457A
E457D
E457F
E457H
E457I
E457K
E457L
E457M
E457N
E457P
E457Q
E457R
E457S
E457T
E457W
E457Y
E457V
Y408E
K14A; Y20F; D26A; R35A; E38A
K14A; Y20F; D26A; R35A; E38A; L304G; P305G; K306G; L307G; S308G
Y408M
Y408Q
Y408S
Y408W
D341A
Y408V
E461A
E461D
E461F
E461G
E461H
E461I

Описание варианта
E461L
E461M
E461N
E461P
E461S
E461T
E461W
E461Y
E461V
R456A
I317D-R318D-R319D- K320D-R321K; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
K312A
R314A
K312A; R314A
P558S
F559L
I560V
Y563H
P558S; F559L; I560V; Y563H
P558G
L304G; P305G; K306G; L307G; S308G
N531D
N531E
N531F
N531H
N531I
N531K
N531L
N531M
I322T
N531P
N531Q
N531R
N531S
N531T
N531V
N531W

Описание варианта
N531Y
Y403F
A405S
G406R
Q409D
A405S; G406R; Y408L; Q409D
A405S; G406A; Y408L; Q409D
Q409Y
Q409H
G406A
G406A; Y408L
T377G
W381A
W381A; P384A
W381A; ΔP384
G469L
R456N
K458A
G469L; R456N; E457T; K458A
G469L; R456N; K458A
G469L; R456N; K458A; E461G
G469L; R456N; K458A; E461G; F537K
K504D
K504F
K504I
K504M
K504N
K504S
K504T
K504V
K504W
K504Y
G406D
G406E
G406F
G406H
G406I

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

Описание варианта
K504E
K504D
E530R
E530K
T346R; K504E; E530R
T346K; K504D; E530K
G344R; Y408L; N531G
G344K; Y408L; N531G
T346R; Y408L; N531G
T346K; Y408L; N531G
K504D; Y408L; N531G
K504E; Y408L; N531G
Y408L; E530R; N531G
Y408L; E530K; N531G
T346R; Y408L; K504E; E530R; N531G
T346K; Y408L; K504D; E530K; N531G
Y408L; S507A; N531G
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; S507A
E457G; S507A
N531G; P535A; S507A
F208Y
F246Y
F480Y
F537Y
F208Y; F246Y; F480Y; F537Y
H362T; V463S; R456I; D459W; S343R
H362T; V463S; R456I; D459W; S343K
H362T; V463S; R456F; D459W; S343R
H362T; V463S; R456I; S343R
H362T; R456I; D459W; S343R
H362T; R456I; S343R
H362T; R456I; S343K

Описание варианта
K14A; D425R; Y408L- N531G
Y408L; E457G; S507A; N531G
E457G; N531G
E457G; Y408L
Y408L; N531G; E457G; R462K
Y408L; N531G; E457G; F464Y
Y408L; N531G; E461Q; R462K
Y408L; N531G; E461Q; F464Y
Y408L; N531G; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; F464Y
Y408L; E457G; R462K; F464Y
Y408L; E461Q; R462K; F464Y
N531G; E457G; E461Q; R462K
N531G; E457G; R462K; F464Y
N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G; R462K
Y408L; N531G; F464Y
Y408L; E457G; E461Q
Y408L; E457G; R462K
Y408L; E457G; F464Y
Y408L; E461Q; R462K
Y408L; E461Q; F464Y
Y408L; R462K; F464Y
N531G; E457G; R462K
N531G; E457G; F464Y
N531G; E461Q; R462K
N531G; E461Q; F464Y
N531G; R462K; F464Y
E457G; E461Q; R462K
E457G; E461Q; F464Y
E457G; R462K; F464Y

Описание варианта
E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G
Y408L; E461Q
Y408L; R462K
Y408L; F464Y
N531G; E461Q
N531G; R462K
N531G; F464Y
E457G; R462K
E457G; F464Y
E461Q; R462K
E461Q; F464Y
R462K; F464Y
Y408L; N422K
E457G; N422K
N531G; N422K
P535G; N422K
Y408L; P535G; N422K
E457G; P535G; N422K
N531G; P535G; N422K
Y408L; E457G; N422K
Y408L; N531G; N422K
E457G; N531G; N422K
Y408L; E457G; N531G; N422K
Y408L; E457G; P535G; N422K
E457G; N531G; P535G; N422K
Y408L; E457G; N531G; P535G; N422K
Y408L; E416A
E457G; E416A
N531G; E416A
P535G; E416A
Y408L; D425R; E416A
E457G; D425R; E416A
N531G; D425R; E416A
Y408L; E457G; E416A
Y408L; N531G; E416A
E457G; N531G; E416A

Описание варианта
Y408L; E457G; N531G; E416A
Y408L; E457G; D425R; E416A
Y408L; N531G; D425R; E416A
E457G; N531G; D425R; E416A
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; E416A
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y; E416A
Y408L; E530Y
E457G; E530Y
N531G; E530Y
P535G; E530Y
Y408L; D425R; E530Y
E457G; D425R; E530Y
N531G; D425R; E530Y
Y408L; E457G; E530Y
Y408L; N531G; E530Y
E457G; N531G; E530Y
Y408L; E457G; N531G; E530Y
Y408L; E457G; D425R; E530Y
Y408L; N531G; D425R; E530Y
E457G; N531G; D425R; E530Y
Y408L; E457G; N531G; D425R; E530Y
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y
R365A
R365V
R365I
R365L
R365M
R365F

Описание варианта
R365Y
R365W
R365G
R365P
R365S
R365T
R365N
R365Q
R365H
R365K
R365D
R365E
A366G
K368G
K368E
K424A
K424V
K424I
K424L
K424M
K424F
K424Y
K424W
K424G
K424P
K424S
K424T
K424N
K424Q
K424R
K424H
K424D
K424E
K423G
K423A
K423E
K423D
D549A
D549V
D549L
D549M

Описание варианта
D549F
D549Y
D549W
D549T
D549N
D549Q
D549G
D549P
D549R
D549H
D549K
Y553A
Y553V
Y553I
Y553L
Y553S
Y553N
Y553Q
Y553R
Y553H
Y553K
Y553E
R557V
R557I
R557L
R557M
R557F
R557Y
R557W
R557S
R557T
R557N
R557Q
R557G
R557P
R557H
R557D
R557E
T377G; N531G
T377G; E457G
T377G; E461Q

Описание варианта
T377G; E457G; E461Q
T377G; E457G; E461Q; N531G
Y408L; N531G; R557A
N531G; P535A; R557A
E457G; E461Q; R557A
N531G; E457G; E461Q; R557A
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; R557A
N531G; P535A; R557K
E457G; E461Q; R557K
N531G; E457G; E461Q; R557K
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; R557K
Y408L; N531G; ΔC- конц. (Δ558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
N531G; P535A; ΔC- конц. (Δ558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
N531G; E457G; E461Q; ΔC-конц. (Δ558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; ΔC- конц. (Δ558- PFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 25))
ΔC-конц. (Δ557- RPFISQYNV-565 (SEQ ID NO: 28))
Q69G
L73G
L76G
H362G
H370G
F399G
E401G
A405G

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

Описание варианта
E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G; R557K
E457G; E461Q; F464Y; N531G; R557K
E530F; P558S
E530Y; P558S
E457G; E461Q; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530F; N531G; P558S
Y408L; E457G; E461Q; R462K; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; F464Y; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y; N531G; P558S
Y408L; E457G; E461Q; R462K; E530Y; N531G; P558S
Y408F; E457G; E461Q; R462K; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; F464Y; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; K504H; N531G
E457G; E461Q; R462K; F464Y; K504H; N531G
Y408L; E457G; E461Q; R462K; K504H; N531G
E457G; E461Q; F464Y; K504H; N531G
E416A; E457G; E461Q; N531G
Y408L; E416A; E457G; E461Q; R462K; N531G
Y408F; E416A; E457G; E461Q; R462K; N531G
E416A; E457G; E461Q; F464Y; N531G

Описание варианта
T377G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
T377G; Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G
T377G; E457G; E461Q; F464Y; N531G
T377G; E416A; K504H
E416A; K504H
T377G; K504H
N422K; E457G; E461Q; N531G
N422K; E457G; E461Q; Q467K; N531G
E416A; N422K; E457G; E461Q; Q467K; N531G
K504R; E530F; D425K; P558S
K504R; E530F; D425R; P558S
K504R; E530F; D425R; P558G
K504R; E530F; D425K; P558G
K504R; E530F; D425K; P558S; E457G; E461Q; N531G
K504R; E457G; E461Q; N531G
E530F; E457G; E461Q; N531G
D425R; E457G; E461Q; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G
P558S; E457G; E461Q; N531G
P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; E530F; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; E457G; E461Q; N531G
K504R; P558S; E457G; E461Q; N531G

Описание варианта
E530F; P558S; E457G; E461Q; N531G
D425R; P558S; E457G; E461Q; N531G
D425R; E530F; E457G; E461Q; N531G
D425K; E530F; E457G; E461Q; N531G
D425R; E530F; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; E530F; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; E530F; E457G; E461Q; N531G
R557A; N531M
R557K; N531M
R557A; N531M; Y403F; K504Y
R557A; N531D; Y403F; K504Y
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531G; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531D; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461L
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461T
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461V
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461Q
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461L

Описание варианта
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461T
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461V
N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
N422K; E461Q
T377G; N422K
N531G; E457G; T377G
N531G; E461Q; N422K
N531G; E461Q; T377G
N531G; N422K; T377G
E457G; E461Q; N422K
E457G; N422K; T377G
E461Q; N422K; T377G
N531G; E457G; N422K; T377G
N531G; E461Q; N422K; T377G
E457G; E461Q; N422K; T377G
T377G; N422K; E457G; E461Q; N531G
D425K; Y408M
D425K; E530F
D425K; F537K
D425K; K504R
D425K; P558S
Y408M; E530F
Y408M; K504R
Y408M; P558S
E530F; F537K
E530F; K504R
E530F; P558S
F537K; K504R
F537K; P558S
K504R; P558S
D425K; Y408M; F537K
D425K; Y408M; K504R
D425K; Y408M; E530F; F537K

Описание варианта
D425K; Y408M; E530F; P558S
D425K; E530F; F537K; K504R
Y408M; E530F; F537K; K504R
Y408M; F537K; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; F537K; K504R
D425K; Y408M; E530F; F537K; P558S
D425K; Y408M; E530F; K504R; P558S
D425K; Y408M; F537K; K504R; P558S
D425K; E530F; F537K; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; F537K; K504R; P558S
D425K; E457G; E461Q; K504R; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G; P558S
T377G; Y408M; N422K; E457G; E461Q; E530F; N531G
T377G; N422K; D425K; E457G; E461Q; E530F; N531G
E457G; E461Q; N531G; S507A
N531G; S507A
E457G; S507A
E461Q; S507A
N422K; S507A
T377G; S507A
D425K; S507A
Y408M; S507A
P558S; S507A
E530F; S507A
F537K; S507A
K504R; S507A
Y408F; S507A

Описание варианта
R557A; S507A
E416A; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
N52Q; N159Q
N476Q; N518Q
Y408F; N531M
Y408F; K504Y
G406A; Y403F
D425K
Y403F; D425K; E457G; N531G
G406A; D425K; E457G; E461Q; N531G
Y403F; G406A; D425K; E457G; E461Q; N531G
Y403F; D425K; E457G; E461Q; K504Y; N531G
Y403F; G406A; D425K; E457G; E461Q; K504Y; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G; R557A
R557A
$\Delta(V565)$
F559Y
$\Delta(S308)$
F559W
F559H
L307F
L307H
L307W
L307Y
P433A
P433G
P433F
$\Delta(Y496)$
$\Delta(D497)$
$\Delta(Y496; D497)$
S499G
S499A
S499K

Описание варианта
S499V
Y496L
S499G; I500K
S499A; I500K
T495F; Y496L; S499G; I500K
K423R
R62A
R62E
R62L
R62H
E401K
E401R
E401A
E401F
N402G
N402K
N402R
H554F
H554K
R371E
A342R
K51R; N52A; A55P; T59M; R61G; F64Y
N52A
A55P

Описание варианта
T59E
L73F
L73D
$\Delta(275\text{-CAGFASVAQE-284 (SEQ ID NO: 31)) >$ CEEDRQQNIPKGLAR SAQGAEIETE (SEQ ID NO: 32)
R484A
R484K
R484E
$\Delta(V565) > VG$
$\Delta(V565) > VY$
E416K
E416R
D395A
D395G
D395K
D395R
D395A; D425A
D395A; E416A
D395A; E416A; D425A
N402D
K368D
K1103A
E1106A
I1134G

Описание варианта
I208G
H383K; D385N; K387S; R388Q; E392Q; Y393T; D395K; K419M; D420H; G421T; N422G; D425E
H383K; R388Q; E392Q; Y393T; K419M
K51D; T59E; R61D
Q69H; L73F; G79E; T80I; L83S; N84H
$\Delta(1\text{-KVTYTS-6 (SEQ ID NO: 33)) >$ RSPSASDLP (SEQ ID NO: 34)
M186E; G187L; Y188S; Q189N; D190G; F191L; D193G
H948N
L950S
D988N
L990S
V1108N
E1110S
Q1131N
I1133S
N422A
T377A

В. Слитные конструкторы, содержащие фактор I комплемента

[0064] В настоящем документе предложены составы слитных конструкторов, содержащих первый компонент (CFI-часть), 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 конструкторы называются в настоящем документе «слитные конструкторы CFI» или просто «слитные конструкторы». В некоторых вариантах осуществления слитный конструктор содержит дополнительные компоненты, например третий компонент, четвертый компонент и т. д.

[0065] 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.

[0066] Компоненты слитных конструктов согласно настоящему описанию могут удерживаться вместе необязательными линкерами. 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. Пример линкера представляет собой $(GGSS)^n$, где n является любым числом от примерно 1 до примерно 20 (SEQ ID NO: 35). Пример линкера представляет собой $(GGSS)^nGG$ (SEQ ID NO: 36), где n является любым числом от примерно 1 до примерно 20. Пример линкера представляет собой $(GGSSGG)^n$, где n является любым числом от примерно 1 до примерно 20 (SEQ ID NO: 37). 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

[0067] В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт содержит CFI дикого типа или вариант CFI (первый компонент) и по меньшей мере 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 или его варианта может давать преимущества. При использовании второго компонента, который является удлинителем периода полужизни, активность может увеличиваться, или может

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

[0068] 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.

[0069] 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.

[0070] Примеры слитных конструкций, содержащих CFI дикого типа и HSA, называются в настоящем документе «CFI-HSA» и более подробно описаны ниже. Пример слитного конструкта согласно описанию содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

[0071] В некоторых вариантах осуществления слитный конструкт согласно настоящему описанию содержит альбумин и вариант CFI согласно настоящему описанию. Примеры вариантов CFI приведены в таблице 2.

Структурные схемы слитных конструкторов

[0072] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкторы, 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 C-концом CFI-части. В некоторых вариантах осуществления второй компонент слит с C-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 C-концом CFI-части.

[0073] Если обратиться к таблице 3, 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 MOPC 63 области V-III каппа-цепи Ig мыши (SEQ ID NO: 2) для рекомбинантного получения любого из слитных конструкторов CFI, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены слитные конструкторы CFI, содержащие по меньшей мере один домен CFI, причем по меньшей мере один домен CFI содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0074] Пример слитного конструктора согласно описанию содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Таблица 3. Компоненты примеров слитных конструкторов CFI

Описание	Последовательность
Человеческий CFI дикого типа,	MKLLHVFLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDK VFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKS LECLHPGTKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDK

Описание	Последовательность
полученный из плазмы (CFI-PD)	<p>TMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFKLSDLINSTECL HVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDF FQCVNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCKSGV CIPSQYQCNGEVCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERR RIKSLLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASG ITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVI EYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVP WSPYLFQPNDTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFGY NRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGV VSWGENC GKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 1)</p>
Лидерная последовательность (мышиний лидер для CFI-HSA)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 2)
Лидерная последовательность человеческого CFI	MKLLHVFLFLCFHLRFC (SEQ ID NO: 3)
CFI дикого типа с SEQ ID NO 1 без сигнальной последовательности	<p>KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKL PYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTA EGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDKTMFICKSSWSMREANVA CLDLGFQQGADTQRRFKLSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFT KRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKACD GINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVCITGE DEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMH IRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAH CLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTY QNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDTCIVSGW GREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFGYGNRFYEKEMECAGTYDGS IDACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWGENC GKPEFPGVYTK VANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 5)</p>
Линкер	GGSSGG (SEQ ID NO: 6)
Человеческий сывороточный альбумин (HSA)	<p>DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL KKYL YEIARRHPYFY APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPK</p>

Описание	Последовательность
	AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNAL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 7)
HSA, соединенный с CFI (CFI-HSA)	DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFL KKYL YEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNAL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSS GGKVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVC KLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQOKSLECLHPGTFKLNNGTC TAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREAN VACLDLGFQQGADTQRRFKLSDL SINSTECLHVHCRGLETS LAECT FTKRRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQCVNGKYISQMKAC DGINDCGDQSDDELCKACQGGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVD CIT GEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNR MHIRRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAG TYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPR SIPACVPWSPYLFQPN DTCIVS GWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFGYGNRFYEKEMECAGTY DGSIDACKGDSGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWG ENCGKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV (SEQ ID NO: 21)

III. Применение составов, содержащих CFI

[0075] Составы согласно настоящему описанию можно применять в качестве терапевтических средств у 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.

А. Лечение нефтальмологических заболеваний

[0076] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, пригодны 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 составов, представленных в настоящем документе.

[0077] В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание характеризуется дефицитом CFI. В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента.

[0078] В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание представляет собой системное острое показание. В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое 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, тромбоза и травматического повреждения головного мозга.

[0079] В некоторых вариантах осуществления нефтальмологическое заболевание представляет собой системное хроническое показание. В некоторых вариантах осуществления 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 (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 (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 ишемически-реперфузионные повреждения.

[0080] В некоторых вариантах осуществления заболевания, которые можно лечить с применением составов, предложенных в настоящем документе, содержащих варианты CFI или слитные конструкты, которые являются деструкторами 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, 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 (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 ишемически-реперфузионные повреждения.

[0081] В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание является не онкологическим.

[0082] В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание является онкологическим. В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое заболевание является онкологическим и характеризуется солидными опухолями или опухолями жидких тканей. В некоторых вариантах осуществления неофтальмологическое 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 неофтальмологическое заболевание характеризуется опухолями жидких тканей и выбрано из группы, состоящей из: острого миелогенного лейкоза, В-клеточной лимфомы и болезни Ходжкина.

В. Лечение офтальмологических заболеваний

[0083] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, пригодны 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 составов, предложенных в настоящем документе.

[0084] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание характеризуется дефицитом CFI. В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание характеризуется дисрегуляцией системы комплемента.

[0085] 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.

[0086] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из: диабетического отека макулы (DME), диабетической ретинопатии, сухой возрастной дегенерации макулы (AMD), глаукомы, кератоконъюнктивита, нейромиелита зрительного нерва со спектральным расстройством (NMOSD), открытоугольной глаукомы, полипозной хориоидальной васкулопатии, болезни Штаргардта, увеита и витреоретинопатии.

[0087] В некоторых вариантах осуществления офтальмологическое заболевание является не онкологическим.

С. Введение

[0088] Введение *in vivo* составов, описанных в настоящем документе, можно осуществлять внутривенно или подкожно.

[0089] В иллюстративных вариантах осуществления введение составов, 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.

[0090] В некоторых вариантах осуществления введение составов, описанных в настоящем документе, представляет собой внутривенное введение.

[0091] 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 CFI или слитные конструкторы в неактивной одноцепочечной форме. В некоторых вариантах осуществления доставляемый состав содержит как одноцепочечные неактивные, так и двухцепочечные активные формы.

D. Дозы

[0092] В некоторых вариантах осуществления любой из составов, 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 терапевтического CFI, вариантов или слитных конструкторов в составах, описанных в настоящем документе, представляет собой подкожное введение в дозе примерно 0,05 мг/кг, примерно 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 терапевтического CFI, вариантов или слитных конструкторов в составах, описанных в настоящем документе, представляет собой внутривенное введение в дозе примерно 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 CFI или слитных конструкторов,

описанных в настоящем документе, представляет собой ежедневное введение, введение через день, еженедельное введение или введение два раза в неделю.

[0093] В некоторых вариантах осуществления целевой уровень терапевтического CFI, вариантов или слитных конструкторов в составах, предложенных в настоящем документе, в плазме может составлять примерно 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

Пример 1. Получение CFI, вариантов CFI и слитных белков

Общее описание

[0094] Способы, представленные ниже, применимы для экспрессии, очистки, активации и *in vitro* сиалирования CFI дикого типа, вариантов CFI и слитных конструкторов, содержащих CFI дикого типа и варианты CFI.

[0095] В примере 1 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом человеческого CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21).

[0096] 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 сиапированию *in vitro* для увеличения общего сиапирования CFI-HSA. Наконец, сиапированный белок очищали с использованием аффинной очистки с антителами к альбумину и проводили заключительную обработку колоночной эксклюзионной хроматографией.

Экспрессия

[0097] 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.

[0098] 1,0 литра суспензии клеток TunaCHO™ 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

[0099] 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 мМ натрий-фосфатным буфером в количестве, равном 10 объемам колонки. Связанный белок CFI-HSA элюировали в две стадии: сначала 20 мМ буфером трис-НСl, рН 7,0, с 2 М MgCl₂ (3 объема колонки), а затем 20 мМ лимонной кислотой, рН 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 М трис-НСl, рН 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

[0100] 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.

[0101] 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 °C 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 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM 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

[0102] 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 mM УДФ-галактозы, 5 mM MnCl₂ и 100 mM 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 mM CMP-NANA, 10 mM ZnCl₂ и 200 mM MES, pH 6,5, при 37 °C 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.

[0103] 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 °C. Образцы охлаждали до комнатной температуры и к каждому образцу добавляли 10 мкл реагента меченя для дальнейшей инкубации в течение 3 часов при 50 °C. 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.

[0104] 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

[0105] 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

[0106] 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%.

Пример 2. Стадия I разработки состава

[0107] В примере 2 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21). CFI-HSA готовили в концентрации примерно 150 мг/мл.

[0108] Было спланировано исследование для изучения физических и химических свойств CFI-HSA в диапазоне жидких и лиофилизированных составов для оценки условий, обеспечивающих оптимальные характеристики стабильности. Например, для обеспечения возможности подкожного введения желательна высокая концентрация и стабильность композиции, содержащей CFI.

[0109] Активный фармацевтический ингредиент (АФИ), изученный в этом исследовании, представлял собой CFI-HAS (SEQ ID NO: 21). Материал, использованный для этого исследования, включал в себя следующее:

- (1) лекарственное вещество: CFI-HSA, 153,4 мг/мл, состав F1;
- (2) химические вещества и материалы, используемые для приготовления состава и анализа CFI-HSA, были следующими (см. таблицу 2.1).

Таблица 2.1. Материалы

Химические вещества	Поставщик	№ по каталогу	CAS №	Степень очистки
Уксусная кислота	EMD	AX0073-9	64-19-7	
Сорбит	EMD	111597	50-70-4	Евр. фарм., Брит. фарм., Фарм. США-Нац. форм., Яп. фарм.
NaCl	EMD	106404	7647-14-5	Евр. фарм.
Янтарная кислота	Sigma Aldrich	1623411	110-15-6	Фарм. США
Аргинин.HCl	Sigma Aldrich	A4599	1119-34-2	Евр. фарм., Яп. фарм., Фарм. США
Сахароза	Pfanstiehl	S-124-2-MC	57-50-1	Фарм. США — Нац. фарм., Евр. фарм., Яп. фарм., Кит. Фарм.
Трегалоза	Pfanstiehl	T-104-4	6138-23-4	Фарм. США — Нац. фарм., Евр. фарм., Яп. фарм., Кит. Фарм.
Глицин	JT Baker	0581-05	56-40-6	Фарм. США
Полисорбат 80	Croda	Super Refined™	9005-65-6	Фарм. США, Яп. Фарм., Евр. фарм.

[0110] В этом исследовании стабильности стабильность CFI-HSA контролировали в 12 (двенадцати) составах, содержащих различные модификаторы тоничности/наполнители в оптимальном диапазоне pH. В таблице 2.2 приведена матрица составов для двенадцати испытанных образцов.

(1) pH 5–7.

(2) Буферы (также взаимозаменяемо называемые в настоящем документе буферными агентами).

(3) Модификаторы тоничности (сорбит или трегалоза для неионных буферных агентов и хлорид натрия для ионных буферных агентов).

(4) Наполнители (трегалоза или глицин).

(5) Поверхностно-активные вещества.

Таблица 2.2. Матрица составов

Состав №	Тип сост.	Буфер (20 мМ)	pH	Модификатор тоничности/ наполнитель	АФИ (мг/мл)	Поверхностно-активное вещество
1	Жидкость	Ацетат натрия	5	5% сорбит	150	0,02% PS80
2	Жидкость	Ацетат натрия	5,5	5% сорбит	150	0,02% PS80
3	Жидкость	Ацетат натрия	5,5	150 мМ NaCl	150	0,02% PS80
4	Жидкость	Ацетат натрия	5,5	70 мМ аргинин.HCl, 2% сахароза, 60 мМ глицин	150	0,02% PS80
5	Жидкость	Гистидин HCl	6	70 мМ аргинин.HCl, 2% сахароза, 60 мМ глицин	150	0,02% PS80
6	Жидкость	Гистидин HCl	6	150 мМ NaCl	150	0,02% PS80
7	Лио	Сукцинат натрия	5	10% трегалоза	150	0,02% PS80
8	Лио	Сукцинат натрия	5	5% трегалоза 2,0% глицин	150	0,02% PS80
9	Лио	Гистидин HCl	6	10% трегалоза	150	0,02% PS80
10	Лио	Гистидин HCl	6	5% трегалоза, 2% глицин	150	0,02% PS80
11	Лио	Гистидин HCl	7	10% трегалоза	150	0,02% PS80
12	Лио	Гистидин HCl	7	5% трегалоза, 2% глицин	150	0,02% PS80

* Сост. — состав; АФИ — активный фармацевтический ингредиент, CFI-HSA;

лио — лиофилизированный

Приготовление лиофилизированных составов

[0111] Для каждого состава раствор CFI-HSA DS загружали в кассету для диализа (кассета для диализа Slide-A-Lyzer®, номинальное отсечение по молекулярной массе: 10 000). Составы диализовали в соответствующих составу буферах.

[0112] Составы стерильно фильтровали через мембрану из PES с размером пор 0,2 мкм в асептическом боксе биологической безопасности (BSC) и разливали в объеме 0,2 мл в стерилизованные стеклянные флаконы вместимостью 2 см³. Затем флаконы частично укупоривали имеющими отверстия пробками для лиофилизации и лиофилизировали с использованием параметров, указанных в таблице 2. После лиофилизации камеру заполняли азотом и флаконы укупоривали. Затем флаконы извлекали и укупоривали, обжимали и маркировали. Дополнительные флаконы откладывали и замораживали перед лиофилизацией для анализа образца до лиофилизации параллельно с нулевым моментом времени.

Приготовление жидких составов

[0113] Для каждого состава раствор CFI-HSA DS загружали в кассету для диализа (кассета для диализа Slide-A-Lyzer®, номинальное отсечение по молекулярной массе: 10 000). Составы диализовали в соответствующих составу буферах. Составы стерильно фильтровали через мембрану из PES с размером пор 0,2 мкм в асептическом боксе биологической безопасности (BSC) и разливали в объеме 0,2 мл в стерилизованные стеклянные флаконы вместимостью 2 см³. Затем флаконы укупоривали, обжимали и маркировали.

Аналитические методы

[0114] Применяли следующие аналитические методы.

[0115] (1) Визуальная проверка: визуальную проверку проводили под белым источником света (флуоресцентная трубка 13 Вт) на черном или белом фоне. Получали цифровые фотографии всех составов в каждой временной точке.

[0116] (2) Измерение концентрации: концентрацию CFI-HSA анализировали по A280 посредством SoloVPE, используя коэффициент экстинкции (Е.С.) $1,041 \text{ мг/мл}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

[0117] (3) Эксклюзионная ВЭЖХ: эксклюзионную ВЭЖХ проводили со следующими параметрами.

- ВЭЖХ: система Agilent 1260
- Колонка: Agilent AdvanceBio SEC 300Å, $4,6 \times 300$ мм, 2,7 мкм, ЖХ-колонка кат. №: PL1580-5301
- Подвижная фаза: 150 мМ раствор фосфата натрия, рН $6,9 \pm 0,1$
- Разбавитель: деионизированная (ДИ) вода
- Концентрация образца: 0,5 мг/мл
- Скорость потока: 0,35 мл/мин
- Время прогона: 15 мин
- Темп. автосэмплера: 5 °С
- Темп. колонки: 30 °С
- Детекция оптической плотности: 280 нм, 215 нм
- Объем введенной пробы: 20 мкл
- Инжекционное нанесение: 15 минут

[0118] (4) FlowCAM: система визуализации частиц FlowCAM сочетает в себе оптические, электронные и жидкостные элементы для автоматизированного анализа частиц. Оптическая система используется для захвата изображений частиц в текучей среде в реальном времени, когда они проходят через проточную кювету. Программное обеспечение для визуализации обеспечивает возможность оценки размера и морфологии частиц. Все образцы анализировали и дегазировали в течение 30 минут при 75 торр перед анализом.

[0119] (5) Низкотемпературная ДСК: используя ДСК-систему Pyris Diamond с охладителем Intercooler II, приблизительно 10 мкл каждого образца замораживали при -60 °С. При скорости изменения 10 °С/мин образец нагревали до оттаивания и регистрировали тепловой поток во время процесса нагревания.

[0120] (6) Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR): FTIR представляет собой метод, используемый для получения инфракрасного спектра поглощения газа, жидкости или твердого вещества. В ИВІ используют спектрометр FTIR-660 Plus, который регистрирует зависимость поглощения инфракрасного излучения

материалом образца от волнового числа [см⁻¹]. Эти данные дают информацию о вторичной структуре полипептидов.

Скрининг поверхностно-активных веществ

[0121] Лекарственное вещество CFI-HSA разбавляли водой до 15 мг/мл. Затем раствор стерильно фильтровали через шприцевый фильтр с размером пор 0,2 мкм и разливали во флаконы вместимостью 3 см³ в объеме заполнения 1,0 мл. Затем в каждый из четырех флаконов непосредственно добавляли маточные растворы либо 1% PS20, 1% PS80, либо 10% F-68 до достижения конечных концентраций 0,015% PS20, 0,015% PS80 или 0,15% F-68. Четыре заполненных флакона использовали в качестве контроля без поверхностно-активного вещества. Всего было приготовлено по четыре флакона на каждую экспериментальную группу. Флаконы экспериментальных групп помещали на шейкер и перемешивали при 1000 об/мин в течение четырех часов при температуре окружающей среды. Одновременно инкубировали по 1 (одному) флакону на экспериментальную группу при температуре окружающей среды в течение четырех часов.

Таблица 2.3. Матрица скрининга поверхностно-активных веществ

Поверхностно-активное вещество	CFI-HSA (мг/мл)
Нет (без поверхностно-активного вещества)	15,3
0,015% PS20	
0,015% PS80	
0,15% F-68	

[0122] Стабильность CFI-HSA с поверхностно-активными веществами и без них изучали после перемешивания в течение четырех часов (1000 об/мин на орбитальном шейкере, комнатная температура); и в статических условиях, четыре часа (при комнатной температуре).

[0123] После воздействия перемешивания и статических условий все образцы выглядели прозрачными, бесцветными и не содержали видимых частиц, независимо от присутствия поверхностно-активного вещества.

[0124] После четырех часов перемешивания или статической инкубации наблюдали сходные хроматографические профили для всех образцов с PS80, PS20 и F68 или без них. Все образцы также продемонстрировали сходную чистоту и общую площадь пика (таблица 2.4).

Таблица 2.4. Результаты скрининга поверхностно-активных веществ методом эксклюзионной ВЭЖХ

Образец	Статические образцы		Перемешиваемый образец 1		Перемешиваемый образец 2	
	Процент общей площади (%)		Процент общей площади (%)		Процент общей площади (%)	
	ВММ 1	Основной пик	ВММ 1	Основной пик	ВММ 1	Основной пик
Без поверхностно-активного вещества	0,2	99,8	0,6	99,4	0,5	99,5
Полисорбат 80	0,2	99,8	0,5	99,5	0,5	99,5
Полисорбат 20	0,2	99,8	0,6	99,4	0,4	99,6
Полоксамер F68	0,2	99,8	0,3	99,7	0,2	99,8

[0125] Данные анализа FlowCam приведены в таблице 2.5. Образцы без поверхностно-активного вещества демонстрируют значимое увеличение количества частиц. Однако все образцы, содержащие поверхностно-активное вещество, демонстрировали относительно более низкие концентрации частиц, независимо от типа поверхностно-активного вещества.

Таблица 2.5. Результаты скрининга поверхностно-активных веществ методом FlowCam

Частиц/ мл	Поверхностно-активные вещества															
	Без поверхностно-активного вещества				PS80 (0,02%)			PS20 (0,01%)			Pluronic F68 (0,1%)					
	Ста- тич.	Перемешивание			Ста- тич.	Перемешивание			Ста- тич.	Перемешивание			Ста- тич.	Перемешивание		
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
> 2 мкм	498	5111	6896	1516	648	409	1904	818	259	1504	3442	1335	80	2143	988	2232
> 5 мкм	90	1365	2173	608	279	109	509	120	110	578	978	309	30	668	265	578
> 10 мкм	50	259	239	150	10	35	70	20	20	90	190	70	10	90	49	60
> 25 мкм	0	10	0	0	0	7	0	0	0	10	50	0	0	20	25	0

[0126] На основании этих результатов было определено, что 0,02% полисорбат 80 является одним из оптимальных вариантов для следующего раунда исследования по оптимизации состава.

Оптимизация состава

[0127] Целью ускоренного испытания на стабильность была оценка стабильности как жидких, так и лиофилизированных составов, содержащих CFI-HSA в концентрации 150 мг/мл. Все составы разливали в объеме заполнения 0,2 мл и составы F7–F12 лиофилизировали. Пред-лиофилизированные образцы замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ на время цикла лиофилизации и размораживали в нулевой момент времени для анализа.

[0128] Это исследование включало в себя инкубацию всех составов-кандидатов в условиях хранения при охлаждении ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$), стрессовых условиях ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и температуре ускоренного старения ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Часть исследования, связанная с хранением при указанной температуре, проводили в течение четырехнедельного периода. В таблицу 2.6 сведены условия хранения, которые использовались для оценки стабильности составов.

Таблица 2.6. Краткое описание стрессовых условий при исследовании стабильности

Стресс	Условия	Временная (-ые) точка (-и)
Температура (жидкий)	5°C; 25°C; 40°C	0, 1, 2, 4 недели
Температура (лиофилизированный)	5°C; 25°C; 40°C	
Перемешивание	Vortex	4 часа при 1000 об/мин

[0129] В нулевой момент времени флаконы помещали в соответствующие температурные условия в соответствии с таблицей 2.6. Флаконы извлекали в каждой временной точке и анализировали.

[0130] В нулевой момент времени все пред-лиофилизированные составы выглядели прозрачными, бесцветными и не содержали видимых частиц. Лиофилизированные составы продемонстрировали хорошие осадки. Все жидкие и восстановленные лиофилизированные составы имели прозрачный вид со слегка желтоватым оттенком и не содержали видимых частиц. На протяжении всего исследования вплоть до четырехнедельной временной точки не наблюдалось значимых изменений в лиофилизированных осадках, независимо от температуры хранения. Аналогичным образом большинство жидких и восстановленных лиофилизированных составов выглядели прозрачными с желтым оттенком и не содержали видимых частиц при всех температурах.

[0131] В нулевой момент времени все составы демонстрировали концентрации вблизи целевого значения в диапазоне от 130 мг/мл до 160 мг/мл. На протяжении всего исследования вплоть до четырехнедельной временной точки большинство составов при 5 °C, 25 °C и 40 °C демонстрировали концентрации в пределах вариабельности эксперимента. В таблице 2.7 приведены результаты исследования стабильности концентрации.

Таблица 2.7. Результаты исследования стабильности концентрации

Состав №		Концентрация (мг/мл)								
		Т = 0	Т = 1 неделя		Т = 2 недели			Т = 4 недели		
			25 °С	40 °С	5 °С	25 °С	40 °С	5 °С	25 °С	40 °С
1	ЖИДКОСТЬ	150,49	150,25	148,81	144,89	145,86	147,50	148,1	143,0	142,8
2		144,67	157,14	156,21	153,71	151,85	154,11	155,5	155,4	158,8
3		143,57	149,07	145,49	117,26	116,40	109,87	117,7	118,0	110,3
4		141,64	147,39	139,79	136,98	136,45	130,40	138,3	139,5	133,0
5		147,23	151,12	147,23	130,47	133,93	125,85	130,3	132,3	118,1
6		128,91	135,09	127,99	118,92	120,16	107,19	119,3	119,4	94,7
7	ЛИОФИЛИЗАТ	156,46	180,31	175,71	170,60	174,47	174,83	168,9	174,2	185,4
8		158,47	160,32	150,62	142,27	151,29	152,59	153,6	153,1	151,9
9		178,19	170,42	174,25	171,15	155,01	171,56	151,3	174,2	169,4
10		143,10	141,45	146,56	147,61	146,88	147,56	145,5	146,9	149,4
11		147,09	154,29	139,70	146,20	143,73	143,09	146,8	143,6	151,6
12		128,43	127,70	126,12	128,12	127,46	127,72	127,6	127,9	128,5
13		137,87	н/д	136,39	н/д	н/д	199,96	н/д	148,8	143,9

[0132] FTIR-спектр CFI-HSA оказался похожим на отмеченный для альбумина, с сильным α -спиральным сигналом при 1650–1660 см^{-1} . Когда CFI-HSA в препаратах-кандидатах был лиофилизирован, никаких существенных изменений в FTIR-спектре не наблюдалось.

[0133] В нулевой момент времени все составы, включая восстановленные лиофилизированные составы, демонстрировали сопоставимые хроматографические профили с незначительными пиками ВММ (высокой молекулярной массы) и НММ (низкой молекулярной массы) (данные эксклюзионной ВЭЖХ).

[0134] После 1 недели хранения при 25–40 °С все жидкие составы демонстрировали увеличение ВММ, а также НММ. Увеличение НММ происходило намного быстрее при более низких рН. Однако все лиофилизированные составы оставались гораздо более стабильными, в частности, без признаков увеличения НММ (данные эксклюзионной ВЭЖХ).

[0135] После 2-недельного хранения при 5, 25 и 40 °С все жидкие составы демонстрировали увеличение ВММ, а также НММ. Увеличение НММ происходило намного быстрее при более низких рН. Однако все лиофилизированные составы оставались гораздо более стабильными, в частности, без признаков увеличения НММ (данные эксклюзионной ВЭЖХ).

[0136] Общий процесс разложения оставался единообразным в 4-недельной конечной точке при 5, 25 и 40 °С: все жидкие составы демонстрировали увеличение ВММ, а также НММ. Увеличение НММ происходило намного быстрее при более низких рН. Однако все лиофилизированные составы оставались более стабильными, в частности, без признаков увеличения НММ (данные эксклюзионной ВЭЖХ).

[0137] Сравнивали скорости разложения в каждом испытанном составе в течение 4 недель хранения при 40 °С. Среди всех испытанных составов в этом исследовании лиофилизированные составы, содержащие как трегалозу, так и глицин в качестве наполнителей, показали наилучшие результаты в диапазоне рН 6–7.

Выводы

[0138] В этом примере исследовали стабильность CFI-HSA при 150 мг/мл в условиях различных составов. Исследуемые условия включали в себя жидкие и лиофилизированные составы, содержащие различные буферы (20 мМ ацетат натрия, сукцинат натрия или гистидин.HCl), модификаторы тоничности (хлорид натрия, сорбит или трегалоза), наполнители (трегалоза или глицин) и имевшие значения рН в диапазоне от 5,0 до 7,0. Составы исследовали в статических условиях хранения при охлаждении (5 °С), при температуре окружающей среды (25 °С) и при температуре ускоренного старения (40 °С) в течение периода до 4 (четырёх) недель. В ходе исследования анализ проводили путем визуальной проверки, определения концентрации, использования методов эксклюзионной ВЭЖХ и FlowCAM. Кроме того, лиофилизированные составы также анализировали методами ДСК и FTIR.

[0139] Первоначально был проведен небольшой скрининг поверхностно-активных веществ с использованием обычно применяемых стабилизаторов-поверхностно-активных веществ. В исследовании оценивали благоприятное влияние поверхностно-активных

веществ на стабилизацию CFI-HSA с точки зрения разложения после воздействия встряхивания, вызывающего сдвиговые стрессовые воздействия. В лекарственное вещество CFI-HSA в концентрации 15 мг/мл добавляли поверхностно-активные вещества 0,015% PS20, 0,015% PS80 и 0,15% F68. Сравнение после встряхивания флаконов, содержащих поверхностно-активное вещество, посредством эксклюзионной ВЭЖХ показало сопоставимые профили для всех образцов независимо от встряхивания. Однако анализ MFI показал, что образцы, не содержащие поверхностно-активного вещества, демонстрируют существенно повышенные концентрации невидимых частиц по сравнению с образцами, содержащими поверхностно-активное вещество. Это доказало, что CFI-HSA был чувствителен к сдвиговому стрессовому воздействию, и в дальнейших исследованиях можно добиться улучшенной стабильности при добавлении поверхностно-активного вещества. Применяемое в настоящее время в лекарственном веществе поверхностно-активное вещество, 0,02% PS80, было выбрано для ускоренного испытания на стабильность.

[0140] После приготовления 12 составов-кандидатов все образцы в нулевой момент времени оказались прозрачными и не содержащими видимых частиц.

[0141] На протяжении всего исследования не наблюдалось значимых изменений внешнего вида лиофилизированных осадков, независимо от температуры хранения. Аналогично, большинство жидких и восстановленных лиофилизированных составов выглядели прозрачными с характерным желтым оттенком при всех температурах. Через четыре недели большинство составов имели концентрацию, близкую к целевой, при любых условиях хранения.

[0142] Результаты FTIR не обнаружили значимых различий в спектральных профилях между пред-лиофилизированными и лиофилизированными образцами.

[0143] Анализ FlowCAM показал относительно низкие вычитаемые концентрации невидимых частиц для всех образцов, что позволяет предположить, что осаждение или частицы не являются критическим фактором для правильного состава с CFI-HSA.

[0144] Ускоренное испытание проводилось в условиях экстремального давления и может не быть прогностическим. Тем не менее, анализ посредством эксклюзионной

ВЭЖХ после четырех недель при всех температурах показал значимо более высокое содержание НММ в жидких составах, особенно в составах с низким рН, таких как F1, F2, F3 и F4. Даже в F5 и F6 при рН 6 увидели увеличение НММ примерно на 1% во время хранения в течение четырех недель при 5 °С. Может быть полезно включать добавки, эффективно ингибирующие автолиз CFI-HSA. Автолиз прекращается при лиофилизации CFI-HSA. Не отмечено значимого увеличения НММ при хранении лиофилизированных составов в течение четырех недель при 40 °С. Среди протестированных составов F8, F10 и F12, содержащих глицин в качестве наполнителя, ионный наполнитель по сравнению с неионной трегалозой продемонстрировал улучшенную стабильность с точки зрения агрегации. Кроме того, агрегация была медленнее при увеличении рН с 5 до 7.

[0145] Ключевые продукты разложения при анализе стабильности идентифицировали по увеличению ВММ и НММ посредством эксклюзионной ВЭЖХ. Основываясь на всех результатах, полученных в этом исследовании, одним ведущим составом для CFI-HSA в концентрации 150 мг/мл может быть лиофилизированное состояние с 20 мМ гистидина, 5,0% трегалозы, 2,0% глицина и 0,02% полисорбата 80 при рН 6,0–7,0.

Пример 3. Стадия II разработки состава

[0146] Дополнительные составы для активных ингредиентов, описанных в настоящем документе, были разработаны в независимом исследовании. Для обеспечения подкожного введения желательно достичь высокой концентрации и стабильности композиции, содержащей CFI.

[0147] В примере 3 упоминание CFI-HSA относится к человеческому сывороточному альбумину, слитому с N-концом CFI дикого типа (SEQ ID NO: 21). CFI-HSA вводили в состав в концентрации 30–189 мг/мл.

Биофизическая характеристика и профиль стабильности при разных рН

[0148] Маточный раствор CFI-HSA в концентрации 5 мг/мл диализовали относительно цитратно-фосфатного буфера, содержащего 135 мМ хлорида натрия, при рН 5, 5,5, 6, 6,5, 7 или 7,5. После визуальной проверки внешнего вида для оценки любого возможного осаждения образцы профильтровывали через фильтр с размером пор 0,2 мкм, довели до 2 мг/мл соответствующим буфером и асептически переносили в микропробирки. Наборы

образцов хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Через 7 дней наборы анализировали по внешнему виду (опалесценция и частицы), концентрации белка (OD_{280}), методами SEC, DSF, DLS, icIEF, КЭ-ДСН и анализом хромогенной активности S2288.

[0149] После 7 дней хранения при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ все образцы были визуально прозрачными, без визуально обнаруживаемых частиц при обеих температурах и при всех протестированных уровнях pH. Концентрация белка была стабильной во всех образцах (таблица 3.1).

Таблица 3.1. Концентрация CFI-HSA после хранения в течение одной недели при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Код образца	pH	Температура	Концентрация (мг/мл) сразу после диализа, с коррекцией от 5 до 2 мг/мл	Концентрация (мг/мл) после диализа через одну неделю
Образец А	5,0	25 °C	2,0	1,95
Образец А	5,0	40 °C	2,0	1,94
Образец В	5,5	25 °C	2,0	2,0
Образец В	5,5	40 °C	2,0	2,02
Образец С	6,0	25 °C	2,0	1,99
Образец С	6,0	40 °C	2,0	2,02
Образец D	6,5	25 °C	2,0	1,98
Образец D	6,5	40 °C	2,0	1,99
Образец Е	7,0	25 °C	2,0	1,97
Образец Е	7,0	40 °C	2,0	1,99
Образец F	7,5	25 °C	2,0	2,02
Образец F	7,5	40 °C	2,0	2,04

[0150] Для оценки агрегации в условиях хранения использовали эксклюзионную ВЭЖХ. При хранении при 25 °С чистота основного пика демонстрировала устойчивое увеличение по мере снижения рН с 7,5 до 5,0. Напротив, при условиях хранения рН 5,0 и 40 °С чистота основного пика резко снижалась, и появлялся пик более низкомолекулярных соединений, что указывает на потенциальное разложение белка. Таким образом, в этих условиях рН от 5,5 до 6,0, по-видимому, был оптимальным диапазоном для стабильности CFI-HSA.

[0151] Гидродинамический размер совокупного набора частиц измеряли посредством динамического светорассеяния (DLS) с целью дальнейшей оценки агрегации в условиях хранения. Результаты показали, что как средневзвешенное значение интенсивности (Z_{ave}), так и полидисперсность резко увеличивались при рН 5, но были сопоставимыми в диапазоне рН 6–7,5. Между тем размер основных соединений (> 99,8%) незначительно увеличивался с увеличением рН. Взятые вместе, данные по полидисперсности и размеру частиц, измеренные посредством DLS, показали, что оптимальный рН при хранении составляет примерно 6, что подтверждает результаты эксклюзионной ВЭЖХ.

[0152] Капиллярный электрофорез с додецисульфатом натрия (КЭ-ДСН) проводили для оценки изменений чистоты с использованием предварительно приготовленных составов. Результаты показали небольшое снижение чистоты при рН 5 и 7,5 и сопоставимую чистоту в диапазоне рН 5,5–6,5 при КЭ-ДСН как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях. Аналогичным образом данные дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) предполагают оптимальные уровни рН от 5,5 до 7,0, тогда как при капиллярном изоэлектрическом фокусировании с визуализацией (icIEF) стабильность была наименьшей при рН 5.

Высококонцентрированные жидкие составы

[0153] Оценивали применимость состава с высокой концентрацией. Очищенный CFI-HSA диализовали относительно 20 мМ гистидина, 150 мМ ArgHCl, рН 5,8 и концентрировали до 189 мг/мл в центробежном фильтрующем устройстве. Высокая концентрация аргинина использовалась для повышения растворимости и предотвращения чрезмерной вязкости, вызванной концентрированным CFI-HSA. Для оценки влияния концентрации белка и концентрации аргинина на вязкость концентрированный образец

189 мг/мл также разбавляли 20 мМ His, pH 5,8, до 169 мг/мл для достижения 135 мМ ArgHCl. Данные, представленные в таблице 3.2, показали, что вязкость составляла всего 10,6 сантипуаз (сП) даже при 189 мг/мл CFI-HSA, что указывает на минимальный риск чрезмерной вязкости при применении испытуемого состава.

Таблица 3.2. Вязкость высококонцентрированного CFI-HSA

CFI-HSA	Буфер	Вязкость
189 мг/мл	20 мМ His, 150 мМ Arg.HCl, pH 5,8	10,6 сП
169 мг/мл	20 мМ His, 135 мМ Arg.HCl, pH 5,8	8,1 сП

[0154] Концентрированные образцы фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и тестировали на присутствие агрегатов с использованием SEC. В образце 188,7 мг/мл в 150 мМ растворе аргинина, разведенном до 5 мг/мл и хранящемся в автосэмплере при 5 °С, изменений уровня агрегатов (1,5%) не наблюдалось. Образец 169,7 мг/мл, который был разведен до 5 мг/мл и хранился в автосэмплере при 5 °С в течение 1 недели, продемонстрировал только 1,72% агрегатов. Образец 169,7 мг/мл через 1 неделю при 5 °С, который затем разбавляли до 5 мг/мл, продемонстрировал 2,5% ВММ-соединений.

[0155] Биологическую активность образца CFI-HSA, сконцентрированного до 169,7 мг/мл, оценивали посредством хромогенного анализа S2288. Как показано на ФИГ. 20, активность образца 169,7 мг/мл сопоставима с активностью контрольного (Ctl) образца. Незначительное различие в наклоне кривых может быть связано либо с неточностью конечной концентрации при анализе после значительных разведений вязкого раствора, либо с некоторой потерей биологической активности после примерно 1 месяца хранения при 5 °С.

[0156] В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что жидкий состав, содержащий буфер из аргинина гидрохлорида и гистидина, может стабилизировать CFI-HSA в высокой концентрации (например, более 150 мг/мл).

Скрининг составов

[0157] Панель составов (F1–F7) подвергали скринингу для определения влияния ионной силы, типа буфера, криопротектора и хлорида кальция (CaCl₂) на стабильность CFI-HSA.

Составы включали в себя фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая диапазон концентраций модификаторов тоничности (также взаимозаменяемо называются в настоящем документе тонификаторами), криопротекторов, лиопротекторов, стабилизатор и поверхностно-активное вещество, добавляемые к ранее протестированному гистидин-аргининовому буферу. В таблице 3.3 показаны составы, испытанные в данном примере, F1–F7 (не путать с F1–F12 из примера 2).

Таблица 3.3. Испытанные составы с CFI-HSA

Приготовление лекарственной формы	pH	Гистидиновый буфер (мМ)	Тонификатор аргинина гидрохлорид (мМ)	Криопротектор/лиопротектор	Стабилизатор	Поверхностно-активное вещество (PS20)	Осмолярность
F1	5,8	20	135	-	-	0,02%	279
F2	5,8	20	70	4% глюкоза	-	0,02%	279
F3	5,8	20	-	8,5% сахароза	-	0,02%	285
F4	5,8	20	70	120 мМ глицин	-	0,02%	282
F5	5,8	20	70	2,5% сорбит	-	0,02%	299
F6	5,8	20	70	4% трегалоза	-	0,02%	279
F7	5,8	20	-	5% сахароза	35 мМ CaCl ₂	0,02%	279

[0158] Исходный образец CFI-HSA концентрировали до примерно 40 мг/мл, затем диализовали относительно 7 составов, перечисленных в таблице 3.3. Концентрированные образцы фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм, асептически разливали в стеклянные флаконы и укупоривали крышками. Один флакон каждой композиции подвергали 3 циклам замораживания и размораживания и оценивали по внешнему виду, OD₂₈₀ и посредством SEC. Для краткосрочного исследования термостабильности четыре флакона каждой композиции включали в 5-недельное исследование стабильности, по одному при -70 °C, 5 °C, 25 °C и 40 °C. Образцы для 5-недельного исследования стабильности анализировали посредством OD₂₈₀, SEC и КЭ-ДСН. Кроме того, для оценки дезамидирования и окисления для выбранных образцов составляли пептидную карту посредством MS/MS и проводили анализ биологической активности.

[0159] Через 5 недель визуальная проверка показала, что все составы были коллоидно стабильными, за исключением образца F3 при хранении при 40 °С, который имел признаки осаждения. Измерения концентрации белка при OD₂₈₀ показали, что концентрации CFI-HSA оставались неизменными после либо трех циклов замораживания/оттаивания в течение 1 недели, либо 5-недельного хранения при всех протестированных температурах.

[0160] Оценка чистоты методами SEC и КЭ-ДСН показала, что у всех 7 составов при -70 °С чистота образцов осталась неизменной, образцы при 5 °С имели чистоту примерно 97%, образцы при 25 °С имели чистоту примерно 96%, а все образцы при 40 °С имели чистоту основного соединения в диапазоне 90–92%. Значимое снижение чистоты при 40 °С и небольшое снижение чистоты при 25 °С в течение 5 недель хранения во всех 7 составах указывают на то, что жидкий высококонцентрированный состав при комнатной температуре является нерациональным.

[0161] Проводили анализ биологической активности для подтверждения того, что CFI-HSA сохранял активность после хранения в испытанных составах и условиях хранения (таблица 3.4). Составы в целом были относительно сопоставимыми. Состав F1 является немного более стабильным, чем другие шесть составов, при 40 °С. Состав F3 является наименее стабильным как при 25 °С, так и при 40 °С, демонстрируя на 20–30% более низкую активность по сравнению с контролем, хранившимся при -70 °С, и большую потерю активности, чем образцы F2, F4 или F1.

Таблица 3.4. Биологическая активность CFI-HSA после протестированных условий хранения

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

[0162] Пептидное картирование методом MS/MS проводили для составов с CFI-HSA для определения уровня дезамидирования и окисления после протестированных условий хранения. Тестировали составы F1, F2, F4, F5 и F6 после хранения в течение 5 недель при 5 °С. Замороженный состав F4 (замораживание/оттаивание) использовали в качестве

контроля. Результаты показали, что уровни дезамидирования и окисления по всем сайтам были сопоставимы у разных составов.

[0163] Дополнительные испытания и составы, разработанные для клинической оценки и производства лекарственных средств, включают в себя составы, представленные в таблице 3.5. CFI-HSA подвергали замене буфера для получения 3 новых составов в таблице 3.5 и концентрировали до 100 мг/мл или 150 мг/мл, выявляя любые признаки осаждения, сильную опалесценцию или высокую вязкость. Чтобы сделать составы более подходящими для лиофилизированного продукта, добавляли 60 мМ глицина или 60 мМ маннита к F2 и F3 для защиты структуры лиофилизированного осадка соответственно. Затем образцы стерильно фильтровали, разливали и тестировали вязкость, SEC и активность.

Таблица 3.5. Составы для клинического производства и испытаний

	Конц. белка (мг/мл)	pH	Буфер	Тонификатор/крио-/лиопротектор			PS-80
F1	100	5,8	20 мМ гистидин	135 мМ Arg HCl			0,02%
F2				70 мМ Arg HCl	2% сахароза	60 мМ глицин	0,02%
F3				70 мМ Arg HCl	2% сахароза	60 мМ маннит	0,02%
F1	150			135 мМ Arg HCl			0,02%
F2				70 мМ Arg HCl	2% сахароза	60 мМ глицин	0,02%
F3				70 мМ Arg HCl	2% сахароза	60 мМ маннит	0,02%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав, содержащий фактор I комплемента (CFI) дикого типа или его вариант (вариант CFI), причем состав содержит буферный агент, поверхностно-активное вещество и модификатор тоничности.
2. Состав по п. 1, причем состав содержит один или более из наполнителя, криопротектора и лиопротектора.
3. Состав по любому из п. 1–2, в котором концентрация CFI или его варианта составляет от примерно 10 мг/мл до примерно 300 мг/мл.
4. Состав по любому из п. 1–2, в котором концентрация CFI или его варианта составляет примерно 150 мг/мл.
5. Состав по любому из пп. 1–4, в котором буферный агент содержит ацетат, гистидин или сукцинат.
6. Состав по любому из пп. 1–5, в котором буферный агент представляет собой ацетат натрия, гистидина гидрохлорид или сукцинат натрия.
7. Состав по любому из пп. 1–6, в котором буферный агент присутствует в концентрации от примерно 1 мМ до примерно 50 мМ.
8. Состав по любому из пп. 1–7, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, полисорбат 20, полисорбат 80/20 или полоксамер F68.
9. Состав по п. 8, в котором поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от примерно 0,001% до примерно 0,1% об./об.
10. Состав по п. 9, в котором поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от примерно 0,01% до примерно 0,03% об./об.
11. Состав по п. 10, в котором поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации примерно 0,02% об./об.
12. Состав по любому из пп. 1–11, в котором модификатор тоничности представляет собой сорбит, трегалозу, хлорид натрия или аргинина гидрохлорид.

13. Состав по любому из пп. 1–12, в котором наполнитель представляет собой трегалозу или глицин.
14. Состав по п. 12, в котором сорбит присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 10% об./об.
15. Состав по п. 14, в котором сорбит присутствует в концентрации примерно 5% об./об.
16. Состав по п. 12, в котором трегалоза присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 15% об./об.
17. Состав по п. 16, в котором трегалоза присутствует в концентрации примерно 10% об./об.
18. Состав по п. 12, в котором хлорид натрия присутствует в концентрации от примерно 1 мМ до примерно 500 мМ.
19. Состав по п. 18, в котором хлорид натрия присутствует в концентрации примерно 150 мМ.
20. Состав по п. 12, в котором аргинина гидрохлорид присутствует в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ.
21. Состав по п. 20, в котором аргинина гидрохлорид присутствует в концентрации примерно 70 мМ.
22. Состав по п. 20, в котором аргинина гидрохлорид присутствует в концентрации примерно 135 мМ.
23. Состав по п. 13, в котором глицин присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 5% об./об.
24. Состав по п. 23, в котором глицин присутствует в концентрации примерно 2%.
25. Состав по п. 13, в котором глицин присутствует в концентрации от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ.
26. Состав по п. 25, в котором глицин присутствует в концентрации 60 мМ.

27. Состав по любому из пп. 2–26, в котором крипротектор или лиопротектор выбран из глюкозы, сахарозы, глицина, сорбита, трегалозы, сахарозы или маннита.
28. Состав по п. 27, в котором глюкоза присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 10% об./об.
29. Состав по п. 28, в котором глюкоза присутствует в концентрации примерно 4% об./об.
30. Состав по п. 27, в котором сахароза присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 10% об./об.
31. Состав по п. 28, в котором сахароза присутствует в концентрации примерно 4% об./об.
32. Состав по п. 28, в котором сахароза присутствует в концентрации примерно 5% об./об.
33. Состав по п. 28, в котором сахароза присутствует в концентрации примерно 8% об./об.
34. Состав по п. 27, в котором глицин присутствует в концентрации от примерно 50 мМ до примерно 150 мМ.
35. Состав по п. 34, в котором глицин присутствует в концентрации примерно 120 мМ.
36. Состав по п. 27, в котором трегалоза присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 10% об./об.
37. Состав по п. 36, в котором трегалоза присутствует в концентрации примерно 4% об./об.
38. Состав по п. 27, в котором маннит присутствует в концентрации от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ.
39. Состав по п. 38, в котором маннит присутствует в концентрации примерно 60 мМ.
40. Состав по п. 27, в котором сорбит присутствует в концентрации от примерно 1% до примерно 5% об./об.

41. Состав по п. 40, в котором сорбит присутствует в концентрации примерно 2,5% об./об.
42. Состав по любому из пп. 1–41, причем состав выбран из составов, представленных в таблице 2.2 или таблице 3.3.
43. Состав по любому из пп. 1–42, причем состав находится в твердой форме.
44. Состав по любому из пп. 1–42, причем состав находится в лиофилизированной форме.
45. Состав по любому из пп. 1–42, причем состав находится в жидкой форме.
46. Состав по любому из пп. 1–45, причем состав стабилен при любой одной или более из: $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ или при $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
47. Состав по любому из пп. 1–46, причем состав является стабильным в течение по меньшей мере 1 недели, в течение по меньшей мере одного месяца или по меньшей мере одного года.
48. Состав по любому из пп. 1–47, причем состав содержит CFI дикого типа.
49. Состав по любому из пп. 1–47, причем состав содержит вариант CFI, включающий по меньшей мере одну модификацию по отношению к CFI дикого типа, при этом вариант CFI способен модулировать систему комплемента, и при этом вариант CFI имеет по меньшей мере одну улучшенную характеристику по сравнению с CFI дикого типа.
50. Состав по п. 49, 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.
51. Состав по п. 50, причем улучшенная характеристика представляет собой увеличение активности.
52. Состав по п. 51, причем увеличение активности включает в себя увеличение расщепления C3b и/или C4b по сравнению с CFI дикого типа.

- 53.** Состав по п. 49, в котором вариант CFI содержит по меньшей мере одну модификацию относительно CFI дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5.
- 54.** Состав по п. 49, в котором вариант CFI выбран из вариантов, представленных в таблице 2.
- 55.** Состав по любому из пп. 1–54, причем CFI дикого типа или вариант CFI представляет собой первый компонент слитного конструкта, содержащего первый компонент и по меньшей мере второй компонент, и CFI дикого типа или вариант CFI слит со вторым компонентом.
- 56.** Состав по п. 55, причем второй компонент слитного конструкта представляет собой белок.
- 57.** Состав по любому из п. 55–56, причем второй компонент слитного конструкта представляет собой удлинитель периода полужизни.
- 58.** Состав по п. 57, причем удлинитель периода полужизни представляет собой модифицированный альбумин или производное альбумина.
- 59.** Состав по п. 57, причем удлинитель периода полужизни представляет собой альбумин дикого типа.
- 60.** Состав по п. 57, причем удлинитель периода полужизни представляет собой человеческий сывороточный альбумин или его вариант.
- 61.** Состав по п. 60, причем слитный конструкт содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.
- 62.** Состав, содержащий слитный конструкт, содержащий CFI дикого типа или его вариант (вариант CFI), причем CFI дикого типа или вариант CFI слит с человеческим сывороточным альбумином, и состав выбран из представленных в таблице 2.2 или таблице 3.3.
- 63.** Состав по п. 62, причем слитный конструкт содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

- 64.** Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из составов по пп. 1–63.
- 65.** Способ по п. 64, причем заболевание представляет собой офтальмологическое заболевание.
- 66.** Способ по п. 64, причем заболевание представляет собой неофтальмологическое заболевание.
- 67.** Способ по любому из пп. 64–66, причем субъект представляет собой человека.
- 68.** Способ по любому из пп. 64–67, причем путь введения является подкожным.
- 69.** Способ по любому из пп. 64–67, причем путь введения является внутривенным.