

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391345 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.29

(51) Int. Cl. A61P 25/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.01

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ SAP-Fc И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/108,799; 63/153,777

(32) 2020.11.02; 2021.02.25

(33) US

(86) PCT/US2021/072168

(87) WO 2022/094630 2022.05.05

(71) Заявитель:

АТТРАЛУС, ИНК.; ЮНИВЕРСИТИ
ОФ ТЕННЕССИ РИСЕРЧ
ФАУНДЕЙШН (US)

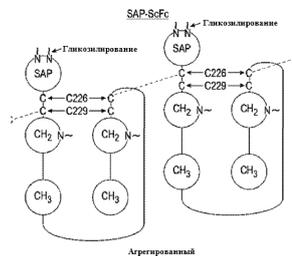
(72) Изобретатель:

Понз Хауме, Уолл Джонатан С. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к слитым белкам SAP-Fc и способам лечения связанных с амилоидом заболеваний.



A1

202391345

202391345

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577943EA/071

СЛИТЫЕ БЕЛКИ SAP-Fc И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/108,799, поданной 2 ноября 2020 г., и предварительной заявке США № 63/153,777, поданной 25 февраля 2021 г., содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

Содержание поданного в текстовом файле ASCII полностью включено в данный документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 165992000200SEQLIST.TXT, дата записи: 28 октября 2021 г., размер: 91 399 байт)

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к слитым белкам SAP-Fc и способам лечения связанных с амилоидом нарушений путем введения указанных слитых белков SAP-Fc.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Амилоидоз представляет собой широкую группу заболеваний, принадлежащих к группе заболеваний конформационных белков, которые включают другие заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, трансмиссивные губчатые энцефалопатии, болезнь Гентингтона или сахарный диабет II типа.

Амилоидоз представляет собой редкое заболевание, характеризующееся наличием в тканях отложений нерастворимых белков с аномальной фибриллярной конформацией. Чаще всего причиной являются фрагменты белков-предшественников сыворотки. Эти внеклеточные отложения, называемые «амилоидным веществом», могут поражать многие органы. Основными органами, поражаемыми отложениями амилоида, являются почки, сердце, пищеварительный тракт, печень, кожа, периферический нерв и глаза. Органы, пораженные этим заболеванием, обычно имеют значительный объем. В конечном итоге, амилоидоз может поражать все органы, а также центральную нервную систему, поэтому существует множество очень разнообразных симптомов.

Были опробованы различные подходы к лечению амилоидоза. Например, химиотерапевтическое лечение путем введения глюкокортикоидов (дексаметазон) и антимитотических агентов. Эффективность новых противовоспалительных препаратов (анти-TNF, анти-IL1) в настоящее время оценивается клинически. Но на данный момент этот амилоидоз остается неизлечимым и смертельным, поскольку не существует специфического лечения, способного быстрее устранить отложения. Также были опробованы DMSO и колхицин, а также антрациклин I-Dox.

Антитела анти-SAP являются еще одним терапевтическим средством, разрабатываемым для лечения амилоидоза. EOD001 представляет собой моноклональное

антитело, которое специфически нацелено на амилоидный амилоид AL или AA. В публикации WO 2015063728 описаны слитые белки «SAP-Fc-антитело» для лечения амилоидоза.

Соответственно, существует потребность в эффективных методах лечения амилоидоза и связанных с амилоидом заболеваний.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящего документе предлагается слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент амилоида P (SAP) сыворотки человека, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, а второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом один из двух Fc-доменов содержит мутацию по типу выступа, а другой Fc-домен содержит мутацию по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит мутацию по типу выступа, а второй полипептид содержит мутацию по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:10, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит мутацию по типу выступа, а второй полипептид содержит мутацию по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент P амилоида сыворотки человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент P амилоида сыворотки крови человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 20. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную замену в положении C226 или C229 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотные замены C226S или C229S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную замену в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат мутацию, которая уменьшает связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления

слитый белок образует пентамер.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к C-концу, SAP-шарнир1-Fc1-L1-шарнир2-Fc2, где SAP представляет собой белок-компонент амилоида P (SAP) сыворотки человека, шарнир1 представляет собой последовательность первого шарнира, Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, L1 представляет собой линкер, шарнир2 представляет собой последовательность второго шарнира и Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент P амилоида сыворотки крови человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент P амилоида сыворотки крови человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 20. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную замену в положении C226 или C229 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотные замены C226S или C229S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную замену в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены содержат мутацию, которая уменьшает связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления слитый белок образует пентамер.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок, описанный в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, описанный в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ продуцирования слитого белка, описанного в данном документе, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, в условиях, обеспечивающих экспрессию слитого белка. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку 293. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-хозяин не гликозилирует белок-компонент

SAP.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение слитого белка, описанного в данном документе, индивидууму, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления амилоидное заболевание включает системный амилоидоз.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к C-концу, шарнир1-Fc1-L1-шарнир2-Fc2, где шарнир1 представляет собой последовательность первого шарнира, Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, L1 представляет собой линкер, шарнир2 представляет собой последовательность второго шарнира, а Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена, при этом первый и второй Fc-домены содержат аминокислотные замены C226S или C229S в соответствии с нумерацией EU, и/или при этом первый и второй Fc-домены содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 демонстрирует конструкцию SAP-scFc.

Фиг. 2А демонстрирует дегликозилированный мутант SAP. Фиг. 2В демонстрирует выступ и впадину Fc-области. Фиг. 2С демонстрирует Fc с мутациями FcRN.

Фиг. 3А демонстрирует SAP-scFc конструкцию TNT 146. Фиг. 3В демонстрирует SAP-scFc конструкцию TNT 151. Фиг. 3С демонстрирует SAP-scFc конструкцию TNT 155. Фиг. 3D демонстрирует SAP-scFc конструкцию TNT 156.

Фиг. 4А демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT 148. Фиг. 4В демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT 152. Фиг. 4С демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT 157. Фиг. 4D демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT158.

Фиг. 5А демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT147. Фиг. 5В демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT 159. Фиг. 5С демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT 160. Фиг. 5D демонстрирует SAP-Fc конструкцию TNT 161.

Фиг. 6А и Фиг. 6В демонстрируют анализ SDS-PAGE восстановленного и невосстановленного SAP-Fc после этапов очистки. Полоса, обозначенная цифрой «1», демонстрирует уменьшенный образец продукта очистки; а полоса, обозначенная цифрой «2», демонстрирует невосстановленный образец продукта очистки; полоса, обозначенная буквой «М», демонстрирует белковый маркер (ALL BLUE PRECISION PLUS, BIO-RAD®, № по каталогу 161-0373). Стрелки указывают на мономер (обозначен как «①»), димер (обозначен как «②»), и другие олигомеры. Фиг. 6А демонстрирует анализ SDS-PAGE восстановленного и невосстановленного SAP-Fc после этапа аффинной очистки с белком А. Фиг. 6В демонстрирует анализ SDS-PAGE восстановленного и невосстановленного SAP-Fc после этапа очистки методом эксклюзионной хроматографии (SEC) 1700 мл.

Фиг. 7 А демонстрирует основной пик элюирования хроматограммы SEC. Фракции образца отмечены на оси х. Фиг. 7В демонстрирует анализ SDS-PAGE в

невосстанавливающих условиях фракций образца на этом этапе очистки SEC. Фиг. 7C демонстрирует анализ методом микрофлюидного электрофореза в восстанавливающих условиях фракции «2B1». Фиг. 7D демонстрирует анализ методом микрофлюидного электрофореза в восстанавливающих условиях фракции «2B1». Фиг. 7E демонстрирует анализ фракции «2A9» с помощью эксклюзионной хроматографии с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS). Фиг. 7F демонстрирует SEC-HPLC анализ фракции «2A9». Фиг. 7G демонстрирует масс-анализ дегликозилированной фракции «2A9».

Фиг. 8A демонстрирует ELISA анализ связывания hIgG (контроль), c11-1F4, TNT146(293) и TNT147(293) с синтетическими фибриллами rV λ 6Wil. Фиг. 8B демонстрирует ELISA анализ связывания hIgG (контроль), TNT146(CHO), TNT148(CHO), TNT151(293) и TNT152(293) с синтетическими фибриллами rV λ 6Wil.

Фиг. 9A и Фиг. 9B демонстрируют ELISA анализ связывания hIgG (контроль), TNT146(293) и TNT147(293) с SHI AL λ и Per125 wtATTR.

Фиг. 10A демонстрирует ELISA анализ связывания IgG1 с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ и экстрактом печени TAL ALk. Фиг. 10B демонстрирует ELISA анализ связывания TNT146(293) с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ и экстрактом печени TAL ALk. Фиг. 10C демонстрирует ELISA анализ связывания TNT148(CHO) с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ и экстрактом печени TAL ALk. Фиг. 10D демонстрирует ELISA анализ связывания TNT151(293) с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ и экстрактом печени TAL ALk. Фиг. 10E демонстрирует ELISA анализ связывания TNT152(293) с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ и экстрактом печени TAL ALk.

Фиг. 11A демонстрирует отложение амилоида, окрашенное конго красным (левый столбец) и автордиографию ¹²⁵I-меченного TNT146(293) у мышей AA, которым вводили 10 мкг SAP-Fc 146 (правый столбец). Фиг. 11B демонстрирует отложение амилоида, окрашенное конго красным (левый столбец) и автордиографию ¹²⁵I-меченного TNT147(293) у мышей AA, которым вводили 10 мкг SAP-Fc 147 (правый столбец). Фиг. 11C демонстрирует отложение амилоида, окрашенное конго красным (первый и третий столбцы), и иммуноокрашивание с применением антител против Fc человека у мышей AA, которым вводили 500 мкг SAP-Fc 147 (второй и четвертый столбцы).

Фиг. 12A и Фиг. 12B демонстрируют сравнение биораспределения SAP-Fc у мышей AA по сравнению с мышами дикого типа (WT). Фиг. 12A демонстрирует сравнение биораспределения SAP-Fc 146 у мышей AA по сравнению с мышами дикого типа (WT). Фиг. 12B демонстрирует сравнение биораспределения SAP-Fc 147 у мышей AA по сравнению с мышами дикого типа (WT).

Фиг. 13 демонстрирует SEC-хроматограммы TNT146(293), TNT147(293), TNT146(CHO), TNT148(HEK), TNT148(CHO), TNT151(293), TNT151(CHO), TNT152(293)

и TNT152(CHO). Стрелки внизу указывают время элюирования для стандартов молекулярной массы 150 кДа, 200 кДа, 443 кДа и 669 кДа.

Фиг. 14А демонстрирует биораспределение TNT151(293) у мышей АА. Фиг. 14В демонстрирует биораспределение TNT152(293) у мышей АА. Фиг. 14С демонстрирует биораспределение TNT148(293) у мышей АА.

Фиг. 15 демонстрирует фагоцитоз фибрилл rVλ6Wil клетками THP1 без обработки (контроль THP1), обработанными hIgG1 (контроль hIgG1), mlgp5 (слияние мышинового антитела и пептида), SAP-Fc TNT146(CHO), TNT147(239) (помечены как TNT147), TNT148(CHO), TNT151(CHO) и TNT152(CHO).

Фиг. 16А и Фиг. 16В демонстрируют гели SDS PAGE очищенных конструкций SAP-Fc. Фиг. 16А: полоса 1 соответствует TNT146 в невозстанавливающих условиях, полоса 2 соответствует TNT151 в невозстанавливающих условиях, полоса 3 соответствует TNT155 в невозстанавливающих условиях, полоса 4 соответствует TNT 146 в восстанавливающих условиях, полоса 5 соответствует TNT151 в восстанавливающих условиях, полоса 6 соответствует TNT 155 в восстанавливающих условиях. Фиг. 16В: полоса а соответствует TNT147 в невозстанавливающих условиях, полоса 2b соответствует TNT148 в невозстанавливающих условиях, полоса с соответствует TNT160 в невозстанавливающих условиях, полоса d соответствует TNT147 в восстанавливающих условиях, полоса е соответствует TNT148 в восстанавливающих условиях, полоса f соответствует TNT160 в восстанавливающих условиях.

Фиг. 17А и Фиг. 17В демонстрируют количественное определение эмиссии pHrodo красной флуоресценции при оптической визуализации мышей с подкожным амилоидом ALλ человека. Фиг. 17А демонстрирует изменение флуоресценции pHrodo Red (среднее ± SD) у мышей с амилоидом TNT146 и у контрольных мышей. Фиг. 17В представляет собой график, демонстрирующий увеличение эмиссии pHrodo Red в день 1 в амилоиде, обработанном TNT146.

Фиг. 18А и Фиг. 18В демонстрируют оптические изображения мышей с подкожным амилоидом ALλ человека, меченым pHrodo Red, на день 14 после инъекции. Стрелки указывают локализацию меченого амилоида. Фиг. 18А демонстрирует результаты для контрольных мышей. Фиг. 18В демонстрирует результаты для мышей, получавших слитый белок SAP-Fc.

Фиг. 19 демонстрирует количественный анализ фагоцитоза амилоидных фибрилл rVλWil AL в присутствии комплемента морской свинки (обозначено как «С»).

Фиг. 20А-Фиг. 20D демонстрируют сравнение связывания слияния SAP-Fc с амилоидными экстрактами и синтетическими фибриллами после предварительной инкубации с человеческим SAP в концентрации 30 мкг/мл.

Фиг. 21 демонстрирует связывание слитого белка SAP-Fc с амилоидными экстрактами в присутствии человеческого SAP в концентрации 30 мкг/мл.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предлагаются слитые белки SAP-Fc, которые способны

связываться с амилоидами с высокой аффинностью и индуцировать фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc имеют одну или большее количество модификаций, которые способствуют димеризации в Fc-области. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc обладают повышенной стабильностью по сравнению со слияниями SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc образуют стабильные нековалентные пентамеры. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc образуют стабильные нековалентные декамеры. В некоторых вариантах осуществления предлагаемые слитые белки SAP-Fc обладают пониженной агрегацией.

Слитые белки SAP-Fc

Таблица 1: Последовательности компонентов слияний SAP-Fc.		
Описание	Последовательность	SEQ ID NO
IgG1 Fc (впадина)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	6
IgG1 Fc (впадина; FcRn КО)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAAYTQKSLSLSPGK	9
IgG1 Fc (выступ)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
IgG1 Fc (выступ; FcRn КО)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK	15

	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK	
SAP	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVIKPLVWV	17
ШарнирМ IgG1 Fc	EPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	18
GS линкер	GGGGSGGGGSGGGGS	19
SAP (degly N32S, N110S)	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQSFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVIKPLVWV	20
ШарнирМ IgG1 Fc (FcRn KO)	EPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK	21
Таблица 2: Последовательности слитого белка SAP-Fc.		
Описание	Последовательность	SEQ ID NO
TNT146	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC	1

<p>SAP-ШарнирМ IgG1 Fc-GS линкер- ШарнирМ IgG1 Fc</p>	<p>FRAYSDLSRAYSLFSYNTQGRDNELLYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYV IIKPLVWVEPKSSDKT HTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEPK SSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p><u>TNT151</u> SAP (degly N32S, N110S)- ШарнирМ IgG1 Fc-GS линкер- ШарнирМ IgG1 Fc</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLI TPLEKPLQSFTLC FRAYSDLSRAYSLFSYNTQGRDNELLYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYV IIKPLVWVEPKSSDKT HTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEPK SSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</p>	<p>2</p>

	VSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
<u>TNT155</u> (TNT146- FcRn KO) SAP-ШарнирМ IgG1 Fc (FcRn KO)-GS линкер- ШарнирМ IgG1 Fc (FcRn KO)	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC FRAYSDLSRAYSLFSYNTQGRDNELLYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALNVEIRGYVVIKPLVWVEPKSSDKT HTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNAITQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEP KSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMA SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAITQKSLSLSPGK	3
<u>TNT156</u> (TNT151- FcRn KO) SAP (degly N32S, N110S)- ШарнирМ IgG1 Fc (FcRn KO)- GS линкер- ШарнирМ IgG1 Fc (FcRn KO)	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQSFTLC FRAYSDLSRAYSLFSYNTQGRDNELLYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALNVEIRGYVVIKPLVWVEPKSSDKT HTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP	4

	<p>VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNAYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEP KSSDKTHTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMA SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</p>	
<p><u>TNT148</u> <u>Полипептид 1:</u> SAP-IgG1 Fc (выступ)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIITPLEKPLQNFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	5
<p><u>TNT148</u> <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (впадина)</p>	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	6
<p><u>TNT152</u> <u>Полипептид 1:</u> SAP (degly N32S, N110S)- IgG1 Fc (выступ)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIITPLEKPLQSFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKT</p>	7

	HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
<u>TNT152</u> <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (впадина)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	6
<u>TNT157</u> (TNT148- FcRn KO) <u>Полипептид 1:</u> SAP-IgG1 Fc (выступ; FcRn KO)	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK	8
<u>TNT157</u> (TNT148- FcRn KO) <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (впадина; FcRn KO)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK	9

<p><u>TNT158</u> (TNT152 - FcRn KO) <u>Полипептид 1:</u> SAP (degly N32S, N110S)- IgG1 Fc (выступ; FcRn KO)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQSFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALNVEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNAYTQKSLSLSPGK</p>	10
<p><u>TNT158</u> (TNT152 - FcRn KO) <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (впадина; FcRn KO)</p>	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK</p>	9
<p><u>TNT147</u> <u>Полипептид 1:</u> SAP-IgG1 Fc (впадина)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALNVEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>	11
<p><u>TNT147</u></p>	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL</p>	12

<p><u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (выступ)</p>	<p>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p><u>TNT159</u> (TNT147 degly) <u>Полипептид 1:</u> SAP (degly N32S и N110S)-IgG1 Fc (впадина)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQSFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFD RSQS FVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>	13
<p><u>TNT159</u> (TNT147 degly) <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (выступ)</p>	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	12
<p><u>TNT160</u> (TNT147- FcRn KO) <u>Полипептид 1:</u> SAP-IgG1 Fc (впадина; FcRn KO)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFD RSQS FVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVIKPLVWVEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN</p>	14

	KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNAYTQKSLSLSPGK	
TNT160 (TNT147- FcRn KO) <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (выступ; FcRn KO)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK	15
TNT161 (TNT147 degly- FcRn KO) <u>Полипептид 1:</u> SAP (degly N32S и N110S)-IgG1 Fc (впадина; FcRn KO)	HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTIPLEKPLQSFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WISGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALNVEIRGYVVIKPLVWVEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNAYTQKSLSLSPGK	16
TNT161 (TNT147 degly- FcRn KO) <u>Полипептид 2:</u> Обрубленный (Stumpy) IgG1 Fc (выступ; FcRn KO)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK	15
SAP-scFc	H TDLSGKVFVFPRESVTDHVN LITPLEKPLQ NFTLCFRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNEL	22

	<p>LVYKERVGEY SLYIGRHKVT SKVIEKFPAP VHICVSWESSSGIAEFWING TPLVKKGLRQ GYFVEAQPKI VLGQEQDSYG GKFDERSQSFV GEIGDLYMWDSVLPPENILS AYQGTPLPAN ILDWQALNYE IRGYVVIKPLVWVEPKSSDK THTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGGGS GGGGSGGGGS EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK</p>	
<p><u>TNT170</u> (<u>TNT146 Fc1</u> <u>FCRN KO</u>) SAP-(IgG1-Fc- ШарнирМ) FcRn мутант -GS линкер-(IgG1- Fc-ШарнирМ)</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC FRAYS DLSRA YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYG GKFDERSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALNYEIRGYVVIKPLVWVEPKSSDKT HTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNA Y TQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSEP</p>	<p>23</p>

	<p>KSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p><u>TNT171</u> (<u>TNT146 Fc2</u> <u>FCRN KO</u>) SAP-(IgG1-Fc- ШарнирM) -GS линкер-(IgG1- Fc-ШарнирM) FcRn мутант</p>	<p>HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLC FRAYS DLSRAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGE YSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGIAEF WINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYG GKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGT PLPANILDWQALN YEIRGYVVIKPLVWVEPKSSDKT HTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEPK SSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNA Y TQKSLSLSPGK</p>	24
<p><u>TNT146A</u> TNT146 с лидерными последовательно стями</p>	<p><u>MPLLLLPLLWAGALA</u>HTDLSGKVFVFPRESVTDH VNLITPLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRAYSLFSYNTQ GRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFP PVHICVSWESSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFV EAQP KIVLGQE QDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYM WDSVLPPENILSAYQGTPLPANILDWQALN YEIRG YVVIKPLVWVEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</p>	25

	<p>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVL KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTSPPSPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK**</p>	
--	--	--

Таблица 3: Описание конструкции слитого белка SAP-Fc.

Конструкция	Описание	SEQ ID	Фигура
TNT146	Одноцепочечный слитый белок SAP-Fc с шарнирными мутациями цистеина. SAP-шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc - линкер - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc	1	Фиг. 3А
TNT151	Одноцепочечный слитый белок SAP-Fc с шарнирными мутациями цистеина и дегилкозилированным SAP. SAP (N32S/N110S) - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc - линкер - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc	2	Фиг. 3В
TNT155	Одноцепочечный слитый белок SAP-Fc с шарнирными мутациями цистеина и сниженным связыванием FcRn. SAP-шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc (I253A/H310A/H435A) - линкер - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc (I253A/H310A/H435A)	3	Фиг. 3С
TNT156	Одноцепочечный слитый белок SAP-Fc с шарнирными мутациями цистеина, сниженным связыванием FcRn и дегилкозилированным SAP. SAP (N32S/N110S) - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc	4	Фиг. 3D

	(I253A/H310A/H435A) - линкер - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc (I253A/H310A/H435A)		
TNT148	Полипептид 1: SAP-IgG1 Fc (выступ) Полипептид 2: IgG1Fc (впадина) Полипептид 1: SAP-IgG1 Fc (T366W) Полипептид 2: IgG1 Fc (T366S/L368A/Y407V)	5, 6	Фиг. 4А
TNT152	Полипептид 1: Дегликозилированный SAP-IgG1Fc (выступ) Полипептид 2: IgG1Fc (впадина) Полипептид 1: SAP (N32S/N110S)-IgG1 Fc (T366W) Полипептид 2: IgG1 Fc (T366S/L368A/Y407V)	7, 6	Фиг. 4В
TNT157	Полипептид 1: SAP-IgG1 Fc (выступ, сниженное связывание FcRn) Полипептид 2: IgG1Fc (впадина, сниженное связывание FcRn) Полипептид 1: SAP - IgG1 Fc (I253A/H310A/T366W/H435A) Полипептид 2: IgG1 Fc (I253A/H310A/T366S/L368A/Y407V/ H435A)	8, 9	Фиг. 4С
TNT158	Полипептид 1: Дегликозилированный SAP-IgG1Fc (выступ, сниженное связывание FcRn) Полипептид 2: IgG1Fc (впадина, сниженное связывание FcRn) Полипептид 1: SAP (N32S/N110S)-IgG1 Fc (I253A/H310A/T366W/H435A) Полипептид 2: IgG1 Fc (I253A/H310A/T366S/L368A/Y407V/ H435A)	10, 9	Фиг. 4D
TNT147	Полипептид 1: SAP- IgG1Fc (впадина) Полипептид 2: IgG1 Fc (выступ) Полипептид 1: SAP - IgG1 Fc (T366S/L368A/Y407V) Полипептид 2: IgG1 Fc (T366W)	11, 12	Фиг. 5А
TNT159	Полипептид 1: SAP (дегликозилированный) - IgG1Fc (впадина) Полипептид 2: IgG1 Fc (выступ) Полипептид 1: SAP (N32S/N110S) - IgG1 Fc	13, 12	Фиг. 5В

	(T55S/L368A/Y407V) Полипептид 2: IgG1 Fc (T366W)		
TNT160	Полипептид 1: SAP- IgG1Fc (впадина, сниженное связывание FcRn) Полипептид 2: IgG1 Fc (выступ, сниженное связывание FcRn) Полипептид 1:SAP - IgG1 Fc (I253A/H310A/T366S/L368A/Y407V/H435A) Полипептид 2: IgG1 Fc (I253A/H310A/T366W/H435A)	14, 15	Фиг. 5C
TNT161	Полипептид 1: SAP (дегликозилированный) - IgG1Fc (впадина, сниженное связывание FcRn) Полипептид 2: IgG1 Fc (выступ, сниженное связывание FcRn) Полипептид 1:SAP (N32S/N110S)- IgG1 Fc (I253A/H310A/T366S/L368A/Y407V/H435A) Полипептид 2: IgG1 Fc (I253A/H310A/T366W/H435A)	16, 15	Фиг. 5D
TNT170	Одноцепочечный слитый белок SAP-Fc с шарнирными мутациями цистеина и сниженным связыванием FcRn в первом Fc. SAP-шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc (I253A/H310A/H435A) - линкер - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc	23	
TNT171	Одноцепочечный слитый белок SAP-Fc с шарнирными мутациями цистеина и сниженным связыванием FcRn во втором Fc. SAP-шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc - линкер - шарнир (C226S/C229S) - IgG1 Fc (I253A/H310A/H435A)	24	

В настоящем изобретении предлагаются слитые белки SAP-Fc, содержащие, от N-конца к С-концу, белок-компонент SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, линкерный пептид, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира.

В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет

собой последовательность шарнира антитела. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет собой последовательность шарнира антитела человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет собой последовательность шарнира антитела IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет собой последовательность шарнира антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет собой последовательность шарнира антитела IgG1 человека с одной или большим количеством аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет собой последовательность шарнира антитела IgG1 человека, при этом один или большее количество остатков цистеина являются замещенными. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнира представляет собой последовательность шарнира антитела IgG1 человека, при этом один или большее количество остатков цистеина замещены серином.

В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP представляет собой человеческий белок SAP. В некоторых вариантах осуществления человеческий белок SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления человеческий белок SAP содержит одну или большее количество модификаций, которые уменьшают гликозилирование белка SAP. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, уменьшающих гликозилирование белка SAP, выбирают из аминокислотных замен N32S и N110S, нумерация которых начинается с N-конца белка SAP. В некоторых вариантах осуществления человеческий белок SAP содержит аминокислотные замены N32S и N110S, нумерация которых начинается с N-конца белка SAP. В некоторых вариантах осуществления человеческий белок SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит Fc-домен IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит одну или большее количество модификаций, которые удаляют остатки цистеина в шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая удаляет остаток цистеина в шарнирной области, повышает стабильность гетеродимерного слитого белка SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления модификация предотвращает ковалентную мультимеризацию более высокого порядка.

Цистеиновые остатки, например, в шарнирной области Fc-домена, могут вызывать агрегацию белка за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей между остатками цистеина в разных Fc-областях. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат Fc-домен, содержащий одну или большее количество модификаций, которые удаляют остатки цистеина в шарнирной области, тем самым предотвращая или уменьшая

агрегацию слитых белков SAP-Fc, вызванную межмолекулярным спариванием остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, которые удаляют остатки цистеина в шарнирной области, находятся в положении C226 или C229 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления замену выбирают из аминокислотных замен C226S и C229S, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит аминокислотные замены C226S и C229S, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления и первый, и второй Fc-домены содержат замену в шарнирной области в положении C226 или положении C229. В некоторых вариантах осуществления замену выбирают из остатка серина в аминокислотном положении 11 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 18 и остатка серина в аминокислотном положении 14 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит остаток серина в аминокислотном положении 11 и остаток серина в аминокислотном положении 14 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит остаток серина в положении аминокислоты 11 и остаток серина в аминокислотном положении 14 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, находятся в положении I253, H310 или H435 в соответствии с нумерацией по системе EU. В некоторых вариантах осуществления указанная модификация включает одну или большее количество аминокислотных замен I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит аминокислотные замены I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, находятся в аминокислотном положении 38, 95 или 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления указанная модификация содержит остаток аланина в одном или большем количестве аминокислотных положений 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит остаток аланина в аминокислотных положениях 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-доменов содержит замены в аминокислотных положениях 38, 95 или 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 15 или 21. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-доменов содержит замены в положении I253, H310 или H435, нумерация которых основана на системе нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяет C-конец первой Fc-области с N-концом второй Fc-области. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяет C-конец первой Fc-области с шарнирной областью второй Fc-области. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит линкерную последовательность глицин-серин. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит последовательность $(G_4S)_n$. В некоторых вариантах осуществления n равно 1-10. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит одну или большее количество модификаций для удаления цистеина в шарнирной области и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые удаляют остатки цистеина в шарнирной области, выбирают из аминокислотных замен C226S и C229S, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые удаляют остатки цистеина в шарнирной области, выбирают из остатка серина в аминокислотном положении 11 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 18 и остатка серина в аминокислотном положении 14 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, содержит одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn, выбирают из аминокислотных замен I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит аминокислотные замены I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, представляют собой остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит остаток аланина в аминокислотных положениях 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий последовательность шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc представляет собой одноцепочечный полипептид. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит одноцепочечный Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит, от N-конца к C-концу, белок-компонент SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, линкерный пептид, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит, от N-конца к C-концу, белок-компонент SAP, содержащий одну или большее количество модификаций, которые уменьшают гликозилирование белка-компонента SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, линкерный пептид, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, а второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит, от N-конца к C-концу, белок-компонент SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, линкерный пептид, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит, от N-конца к С-концу, белок-компонент SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, линкерный пептид и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит, от N-конца к С-концу, белок-компонент SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, линкерный пептид, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит, от N-конца к С-концу, белок-компонент SAP, содержащий одну или большее количество модификаций, которые уменьшают гликозилирование белка-компонента SAP, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира, и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, линкерный пептид, и второй Fc-домен, содержащий последовательность второго шарнира, и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP, содержащий одну или большее количество модификаций, уменьшающих гликозилирование белка-компонента SAP, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, первый Fc-домен, содержащий последовательность первого шарнира и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй Fc-домен,

содержащий последовательность второго шарнира и одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Также в настоящем изобретении предлагаются слитые белки SAP-Fc, содержащий первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP человека, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом один из двух Fc-доменов содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа, а другой Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины.

В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP человека содержит одну или большее количество модификаций, уменьшающих гликозилирование белка-компонента SAP. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, уменьшающих гликозилирование белка-компонента SAP, выбирают из аминокислотных замен N32S и N110S, нумерация которых начинается с N-конца белка-компонента SAP. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP человека содержит аминокислотные замены N32S и N110S, нумерация которых начинается с N-конца белка-компонента SAP. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc имеют одну или большее количество модификаций, способствующих гетеродимеризации Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления один из двух Fc-доменов содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа, а другой Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины, при этом мутации по типу выступа и впадины способствуют ассоциации первого и второго Fc-домена, например, в димере. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу выступа, содержит аминокислотную замену T366W, а Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу впадины, содержит аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу выступа, содержит аминокислотные замены T366W и Y349C, а Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу впадины, содержит аминокислотные замены S354C, T366S, L368A и Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу выступа, содержит аминокислотные замены T366W и Y349C, а Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу впадины, содержит аминокислотные замены E356C, T366S,

L368A и Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу выступа, содержит аминокислотные замены R409D и K370E, а Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу впадины, содержит аминокислотные замены D399K и E357K, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу выступа, содержит аминокислотные замены T366W, R409D и K370E, а Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу впадины, содержит аминокислотные замены T366S, L368A, Y407V, D399K и E357K, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один из двух Fc-доменов содержит аминокислотные замены Y349C и T366W, а другой Fc-домен содержит аминокислотные замены S354C, T366S, L368A, Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один из двух Fc-доменов содержит аминокислотную замену T366W, а другой Fc-домен содержит аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один из двух Fc-доменов содержит аминокислотные замены Y349C, T366W, R409D и K370E, а другой Fc-домен содержит аминокислотные замены S354C, T366S, L368A, Y407V, D399K и E357K, нумерация которых основана на системе нумерации EU. Дополнительные или альтернативные технологии «выступов во впадины», известные в данной области техники, могут быть использованы в слитых белках SAP-Fc по настоящему изобретению, например, как описано в публикации EP1870459A1. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу выступа, содержит остаток триптофана в аминокислотном положении 151 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 12, а Fc-домен, содержащий одну или большее количество мутаций по типу впадины, содержит остаток серина в аминокислотном положении 151, остаток аланина в аминокислотном положении 153 и остаток валина в аминокислотном положении 192, при этом нумерация соответствует SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-fc содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок амилоида P (SAP) сыворотки человека, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом один из двух Fc-доменов содержит мутацию по типу выступа, а другой Fc-домен содержит мутацию по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит мутацию по типу выступа. В некоторых вариантах осуществления мутация по типу выступа представляет собой аминокислотную замену T366W, нумерация которой основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления мутация по типу выступа представляет собой остаток триптофана в аминокислотном положении 151 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах

осуществления первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека дополнительно содержит одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn, выбирают из аминокислотных замен I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит аминокислотные замены I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, представляют собой остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления, когда первый Fc-домен содержит мутацию по типу выступа, второй Fc-домен человека содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество мутаций по типу впадины содержат аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество мутаций по типу впадины содержат остаток серина в аминокислотном положении 151, остаток аланина в аминокислотном положении 153 и остаток валина в аминокислотном положении 192, при этом нумерация соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека дополнительно содержит одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn, выбирают из аминокислотных замен I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит аминокислотные замены I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, представляют собой остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество мутаций по типу впадины содержат аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество мутаций по типу впадины содержат остаток серина в аминокислотном положении 151, остаток аланина в аминокислотном положении 153 и остаток валина в аминокислотном положении 192, при этом нумерация соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека дополнительно содержит одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn, выбирают из аминокислотных замен I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит аминокислотные замены I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, представляют собой остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления, когда первый Fc-домен содержит мутацию по типу впадины, второй Fc-домен человека содержит мутацию по типу выступа. В некоторых вариантах осуществления мутация по типу выступа представляет собой аминокислотную замену T366W, нумерация которой основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления мутация по типу выступа представляет собой остаток триптофана в аминокислотном положении 151 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека дополнительно содержит одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество модификаций, которые уменьшают связывание FcRn, выбирают из аминокислотных замен I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит аминокислотные замены I253A, H310A и H435A, нумерация которых основана на системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, представляют собой остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из

38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит остаток аланина в аминокислотном положении, выбранном из 38, 95 и 220 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, первый Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, а второй Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, содержащий одну или большее количество модификаций, снижающих гликозилирование белка-компонента SAP, при этом белок-компонент SAP связан с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, первый Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, а второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, содержащего одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, содержащий одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, но не содержит белок-

компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, а второй Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, включающий одну или большее количество модификаций, которые уменьшают гликозилирование белка-компонента SAP, при этом белок-компонент SAP связан с N-концом первого Fc-домена человека, содержащего одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, содержащий одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP человека содержит одну большее количество модификаций, которые удаляют сайт гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, а второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, первый Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй Fc-домен содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, содержащий одну или большее количество модификаций, снижающих гликозилирование белка-компонента SAP, при этом белок-компонент SAP связан с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, первый Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, содержащего одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, содержащий одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, первый Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc содержит первый полипептид первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент SAP, включающий одну или большее количество модификаций, которые уменьшают гликозилирование белка-компонента SAP, при этом белок-компонент SAP связан с N-концом первого Fc-домена человека, содержащего одну

или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, содержащий одну или большее количество модификаций, снижающих связывание FcRn, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом первый Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу впадины, а второй Fc-домен содержит одну или большее количество мутаций по типу выступа. В некоторых вариантах осуществления белок-компонент SAP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, первый Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc связывается с одним или большим количеством амилоидогенных пептидов в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенный белок варибельного домена $\lambda 6$ (V $\lambda 6$ Wil) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, A β (1-40) амилоидоподобную фибриллу или амилоидогенный белок-предшественник A β , или сывороточный амилоидный белок A (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин (A β_2 M), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гельзолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин (A α Syn), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF), IAAP, ALk4, A1 λ 1 или другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные слитым белком SAP-Fc, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc способствует фагоцитозу амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc способствует фагоцитозу, опосредованному макрофагами.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, описанные в данном документе, являются агликозилированными и связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления агликозилированный слитый

белок SAP-Fc связывается с одним или большим количеством амилоидогенных пептидов в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные агликозилированным слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенный белок переменного домена $\lambda 6$ ($V\lambda 6W11$) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, $A\beta(1-40)$ амилоидоподобную фибриллу или амилоидогенный белок-предшественник $A\beta$, или сывороточный амилоидный белок А (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные агликозилированным слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин ($A\beta_2M$), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гелозин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин ($A\alpha$ Syn), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF), IAAP, ALk4, Al1 или другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные агликозилированным слитым белком SAP-Fc, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания. В некоторых вариантах осуществления агликозилированный слитый белок SAP-Fc способствует фагоцитозу амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления агликозилированный слитый белок SAP-Fc способствует фагоцитозу, опосредованному макрофагами.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, описанные в данном документе, являются гликозилированными и связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления гликозилированный слитый белок SAP-Fc связывается с одним или большим количеством амилоидогенных пептидов в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные гликозилированным слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенный белок переменного домена $\lambda 6$ ($V\lambda 6W11$) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, $A\beta(1-40)$ амилоидоподобную фибриллу или амилоидогенный белок-предшественник $A\beta$, или сывороточный амилоидный белок А (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные гликозилированным слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин ($A\beta_2M$), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гелозин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин ($A\alpha$ Syn), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF), IAAP, ALk4, Al1 или

другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные гликозилированным слитым белком SAP-Fc, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания. В некоторых вариантах осуществления гликозилированный слитый белок SAP-Fc способствует фагоцитозу амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления гликозилированный слитый белок SAP-Fc способствует фагоцитозу, опосредованному макрофагами.

Известно, что профили гликозилирования различаются между белками, продуцируемыми нечеловеческими клетками (такими как клетки CHO) и человеческими клетками (такими как клетки HEK293). В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, описанные в данном документе, продуцируются в клетках человека, таких как клетки HEK293, и связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc, продуцируемый в клетках человека, таких как клетки HEK293, связывается с одним или большим количеством амилоидогенных пептидов в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, продуцируемым в клетках человека, таких как клетки HEK293, включают амилоидогенный белок варибельного домена $\lambda 6$ ($V\lambda 6Wil$) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, $A\beta(1-40)$ амилоидоподобную фибриллу или амилоидогенный белок-предшественник $A\beta$, или сывороточный амилоидный белок A (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, продуцируемым в клетках человека, таких как клетки HEK293, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин ($A\beta_2M$), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гелозин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена a (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин ($A\alpha Syn$), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF), IAAP, ALk4, ALl1 или другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные слитым белком SAP-Fc, продуцируемым в клетках человека, таких как клетки HEK293, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc, продуцируемый в клетках человека, таких как клетки HEK293, способствует фагоцитозу амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc, продуцируемый в клетках человека, таких как клетки HEK293, способствует фагоцитозу, опосредованному макрофагами. В

некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, описанные в данном документе, продуцируются в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, и связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc, продуцируемый в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, связывается с одним или большим количеством амилоидогенных пептидов в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, продуцируемым в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, включают амилоидогенный белок варибельного домена $\lambda 6$ (V $\lambda 6$ Wil) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, A β (1-40) амилоидоподобную фибриллу или амилоидогенный белок-предшественник A β , или сывороточный амилоидный белок A (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, продуцируемым в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин (A β_2 M), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гельзолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена a (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин (A α Syn), Tau (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF), IAAP, ALk4, Al λ 1 или другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные слитым белком SAP-Fc, продуцируемым в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc, продуцируемый в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, способствует фагоцитозу амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc, продуцируемый в нечеловеческих клетках, таких как клетки CHO, способствует фагоцитозу, опосредованному макрофагами.

В некоторых вариантах осуществления на связывание описанных в данном документе слитых белков SAP-Fc с амилоидными отложениями или фибриллами не влияет состояние гликозилирования слитых белков SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка SAP-Fc с одним или большим количеством амилоидогенных пептидов в амилоидах не зависит от состояния гликозилирования слитого белка SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, содержат амилоидогенный белок варибельного домена $\lambda 6$ (V $\lambda 6$ Wil) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, A β (1-40) амилоидоподобную фибриллу или амилоидогенный белок-предшественник A β , или сывороточный амилоидный белок A (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком SAP-Fc, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи

иммуноглобулина (АН), β_2 -микроглобулин ($A\beta_2M$), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гельзолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин (A α Syn), Tau (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF), IAAP, ALk4, Al1 или другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные слитым белком SAP-Fc, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания. В некоторых вариантах осуществления активность слитого белка SAP-Fc, описанного в данном документе, в стимулировании фагоцитоза амилоидных отложений не зависит от состояния гликозилирования слитого белка SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления активность слитого белка SAP-Fc, описанного в данном документе, в стимулировании опосредованного макрофагами фагоцитоза не влияет состояние гликозилирования слитого белка SAP-Fc.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат два полипептида Fc и один полипептид SAP. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc образуют стабильные нековалентные гетеродимеры. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc не содержат еще одного цистеина, расположенного в шарнирной области Fc. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc обладают пониженной агрегацией.

В некоторых вариантах осуществления димерные слитые белки SAP-Fc, предлагаемые в настоящем изобретении, образуют стабильные нековалентные пентамеры. В некоторых вариантах осуществления пентамеры стабильны в течение 1, 2, 3, 4, 5, 24 часов или более. В некоторых вариантах осуществления пентамеры стабильны на колонке для эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления пентамер имеет молекулярную массу около 375 кДа.

В некоторых вариантах осуществления димерные слитые белки SAP-Fc, предлагаемые в настоящем изобретении, образуют стабильные нековалентные декамеры. В некоторых вариантах осуществления декамеры стабильны в течение 1, 2, 3, 4, 5, 24 часов или более. В некоторых вариантах осуществления декамеры стабильны на колонке для эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления декамер имеет молекулярную массу примерно для SAP-Fc декамера около 750 кДа.

В настоящем изобретении также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие слитый белок SAP-Fc и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может по существу

не содержать каких-либо консервантов и других носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов. В альтернативном варианте фармацевтическая композиция может необязательно включать один или большее количество консервантов, например, антибактериальные агенты, фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, описанные в других разделах данного документа, при условии, что они не оказывают неблагоприятного воздействия на физико-химическую стабильность слияния SAP-Fc. Примеры приемлемых носителей, вспомогательных веществ и стабилизаторов включают, помимо прочего, дополнительные буферные агенты, соразтворители, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин, хелатирующие агенты, такие как EDTA, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и биоразлагаемые полимеры, такие как полиэфиры. Подробное обсуждение состава и выбора фармацевтически приемлемых носителей, стабилизаторов и изомолитов можно найти в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences (18-е изд.; Mack Publishing Company, Eaton, PA, 1990), включенной в данный документ посредством ссылки.

Композиции, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Данное условие легко достижимо с помощью осуществления фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению составлена таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым способом введения. Примеры путей введения включают парентеральное, *например*, внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (*например*, ингаляционное), трансдермальное (*т.е.* местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы и суспензии, применяемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может находиться в ампулах, одноразовых шприцах или многодозовых флаконах, изготовленных из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекции, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях

композиция должна быть стерильной и текучей в той степени, чтобы ее было легко набрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, которые содержат, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно готовить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, в результате которых получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

Способы лечения

В настоящем изобретении также предлагаются способы лечения связанного с амилоидом нарушения, включающие введение индивидууму описанного в данном документе слитого белка SAP-Fc.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc связывается с амилоидными отложениями. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения могут способствовать патологии заболевания. В других вариантах осуществления амилоидные отложения могут свидетельствовать об амилоидозе или амилоид-ассоциированным заболевании у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc связывается с амилоидами у индивидуума с амилоидозом. В некоторых вариантах осуществления амилоидоз локализован в определенной ткани или системе органов, таких как печень, сердце или центральная нервная система.

В других вариантах осуществления амилоидоз представляет собой системный амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления амилоидоз представляет собой семейный амилоидоз. В других вариантах осуществления амилоидоз представляет собой спорадический амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления амилоидоз или амилоид-ассоциированное заболевание представляет собой AA-амилоидоз, AL-амилоидоз, AN-амилоидоз, A β -амилоидоз, ATTR-амилоидоз, ALect2-амилоидоз и IAPP-амилоидоз диабета II типа, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в мозг с амилоидозом голландского типа, церебральную бета-амилоидную ангиопатию, губчатую энцефалопатию, опухоли щитовидной железы, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Льюиса, таупатию, болезнь Гентингтона, старческий системный амилоидоз, семейный амилоидоз, старческое системное старение, старческое поражение гипофиза, ятрогенный синдром, губчатые энцефалопатии, реактивное хроническое воспаление, опухоли щитовидной железы, миелому или другие формы злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc связывается с амилоидами, связанными с физиологическим старением. В других вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc используют для диагностики, лечения или прогнозирования амилоидоза или связанного с амилоидом заболевания у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект, подлежащий лечению, представляет собой животное, такое как млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим являются собаки, кошки, лошади, крупный рогатый скот, молочные коровы, свиньи, овцы, ягнята, козы, приматы, мыши, крысы или человек. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

Клетки-хозяева, векторы, способы получения

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектором экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор предназначен для прокариотической экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор предназначен для еукариотической экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии млекопитающего. В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор, который управляет транскрипцией слитого белка SAP-Fc. В некоторых вариантах осуществления промотор является конститутивным или индуцибельным промотором.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc получают путем культивирования клетки-хозяина, трансформированной нуклеиновой кислотой, предпочтительно вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидную конструкцию (например, вариант Fc, линкер и партнер по слиянию) в подходящих условиях для индуцирования или индукции экспрессии полипептидной

конструкции. В некоторых вариантах осуществления условия, подходящие для экспрессии, варьируются в зависимости от вектора экспрессии и выбранной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления применяется широкий спектр подходящих клеток-хозяев, включая, помимо прочего, клетки млекопитающих, бактерии, клетки насекомых и дрожжи. Например, множество клеточных линий, которые находят применение в настоящем изобретении, описаны в каталоге клеточных линий ATCC[®], доступном в Американской коллекции типовых культур. В некоторых вариантах осуществления слитые белки SAP-Fc по настоящему изобретению экспрессируются в клетке, которая оптимизирована для того, чтобы не гликозилировать белки, которые экспрессируются такой клеткой, либо с помощью генной инженерии клеточной линии, либо путем модификации условий культивирования клеток, таких как добавление кифунензина, либо с применением природного негликозилирующего хозяина, такого как прокариот (*E. coli* и т.д.), и в некоторых случаях нет необходимости в модификации последовательности гликозилирования в Fc.

В некоторых вариантах осуществления клетки млекопитающих применяют в качестве клеток-хозяев для получения полипептидов согласно настоящему изобретению. Примеры типов клеток млекопитающих включают, помимо прочего, клетки эмбриональной почки человека (HEK) (например, HEK293, HEK 293F), яичника китайского хомяка (CHO), HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NS0, Sp2/0, VERY, ВНК, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0 (клеточная линия мышины миеломы, эндогенно не продуцирующая какие-либо цепи иммуноглобулина), клетки CRL7030 и HsS78Bst. В некоторых вариантах осуществления клетки *E. coli* применяют в качестве клеток-хозяев для получения полипептидов согласно настоящему изобретению. Примеры штаммов *E. coli* включают, помимо прочего, *E. coli* 294 (ATCC[®] 31,446), *E. coli* λ 1776 (ATCC[®] 31,537), *E. coli* BL21 (DE3) (ATCC[®] BAA-1025) и *E. coli* RV308 (ATCC[®] 31,608).

Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белковых продуктов (например, гликозилирование). В некоторых вариантах осуществления выбирают подходящие клеточные линии или системы-хозяева, чтобы обеспечить правильную модификацию и процессинг экспрессируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления выбирают клетку-хозяина, которая не продуцирует α 2,3-связанные фрагменты SAP сиаловой кислоты. В некоторых вариантах осуществления выбирают клетку-хозяина, которая продуцирует α 2,6-связанные фрагменты SAP сиаловой кислоты на уровне, аналогичном человеческому SAP дикого типа.

После введения векторов в клетки-хозяева для продукции белка, клетки-хозяева культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная конструкция, например

полипептидная конструкция, содержащая слитый белок SAP-Fc, экспрессируется в системах экспрессии млекопитающих, включая системы, в которых конструкции экспрессии вводят в клетки млекопитающих с помощью вируса, такого как ретровирус или аденовирус. В некоторых вариантах осуществления применяют клетки человека, мыши, крысы, хомяка или примата. Подходящие клетки также включают известные исследовательские клетки, включая, помимо прочего, Т-клетки Jurkat, клетки NIH3T3, CHO, COS и 293. В альтернативном варианте, в некоторых вариантах осуществления белки экспрессируются в бактериальных клетках. Бактериальные системы экспрессии хорошо известны в данной области техники и включают *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* и *Streptococcus lividans*. В некоторых случаях полипептидные конструкции, содержащие варианты Fc, продуцируют в клетках насекомых, таких как, помимо прочего, клетки Sf9 и Sf21, или в клетках дрожжей, таких как, помимо прочего, организмы из родов *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Hansenula* и *Yarrowia*. В некоторых случаях полипептидные конструкции, содержащие варианты Fc, экспрессируют *in vitro* с применением бесклеточных систем трансляции. Системы трансляции *in vitro*, полученные как из прокариотических (например, *E. coli*), так и из эукариотических (например, зародышей пшеницы, ретикулоцитов кролика) клеток, доступны и, в некоторых вариантах осуществления, выбираются на основе уровней экспрессии и функциональных свойств представляющего интерес белка. Например, как понятно специалистам в данной области техники, трансляция *in vitro* требуется для некоторых технологий дисплея, например, рибосомного дисплея. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления варианты слитых белков SAP-Fc получают методами химического синтеза, такими как, помимо прочего, жидкофазный синтез пептидов и твердофазный синтез пептидов. В случае транскрипции *in vitro* с применением негликозилирующей системы, такой как бактериальные экстракты, Fc не будет гликозилирован даже в присутствии природного сайта гликозилирования, и, следовательно, инактивация Fc будет эквивалентной.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная конструкция включает неприродные аминокислоты, аналоги аминокислот, миметики аминокислот или любые их комбинации, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Аминокислоты, кодируемые естественным путем, обычно представляют собой 20 распространенных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин), а также пирролизин и селеноцистеин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и встречающиеся в природе аминокислоты, например, атом углерода, связанный с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, такие как гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метилсульфоний метионин. В некоторых вариантах осуществления такие аналоги имеют модифицированные группы R (такие как норлейцин) или

модифицированные пептидные остовы, но обычно сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота.

Продуцирование, восстановление и очистка белка

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, применяемые для получения полипептидов согласно настоящему изобретению, выращивают в среде, подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред для клеток-хозяев млекопитающих включают минимальную основную среду (MEM), модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM), экспрессионную среду Expi293™, DMEM с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и RPMI-1640. Примеры подходящих сред для бактериальных клеток-хозяев включают бульон Лурия (LB) плюс необходимые добавки, такие как селективный агент, например, ампициллин. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах, таких как от около 20°C до около 39 °C, например, от около 25°C до около 37 °C, предпочтительно 37 °C, и при уровнях CO₂, таких как от около 5% до 10%. В некоторых вариантах осуществления pH среды составляет от около pH 6,8 до pH 7,4, например, pH 7,0, в основном в зависимости от организма-хозяина. Если в векторе экспрессии применяется индуцируемый промотор, экспрессию белка можно индуцировать в условиях, подходящих для активации промотора.

В некоторых вариантах осуществления восстановление белка включает разрушение клетки-хозяина, например, путем осмотического шока, обработки ультразвуком или лизиса. После разрушения клеток клеточный дебрис удаляют центрифугированием или фильтрованием. Затем белки можно дополнительно очистить. В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению очищают различными способами очистки белка, например, хроматографией (например, ионообменной хроматографией, аффинной хроматографией и эксклюзионной колоночной хроматографией), центрифугированием, определением дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методикой очистки белков. Например, в некоторых вариантах осуществления белок выделяют и очищают путем надлежащего выбора и сочетания аффинных колонок, таких как колонка с белком А (например, хроматография с белком А POROS), с колонками для хроматографии (например, катионообменная хроматография POROS HS-50), фильтрация, процедуры ультрафильтрации, обессоливания и диализа. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгируют с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. Примером маркерной аминокислотной последовательности является гексагистидиновый пептид (His₆-метка), который может связываться с аффинной колонкой, заполненной функционализированной никелем агарозой, с микромолярной аффинностью. В качестве альтернативы можно использовать гемагглютининовую метку «НА», которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению, например, полипептидная конструкция, содержащая слитый белок SAP-Fc,

продуцируются клетками субъекта (например, человека), например, в контексте генной терапии путем введения вектора, такого как вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, поксвирусный вектор (например, вектор вируса коровьей оспы, такой как Modified Vaccinia Ankara (MVA)), вектор аденоассоциированного вируса и альфавирусный вектор), содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид по настоящему изобретению. Вектор, попадая внутрь клетки субъекта (например, путем трансформации, трансфекции, электропорации, преципитации фосфатом кальция, прямой микроинъекции, инфицирования и т. д.), может быть использован для экспрессии полипептида, описанного в данном документе. В некоторых случаях полипептид секретируется из клетки. В некоторых вариантах осуществления, если желаемым результатом является лечение заболевания или нарушения, никаких дополнительных действий не требуется. В некоторых вариантах осуществления, если требуется сбор белка, у субъекта берут кровь и очищают белок из крови различными способами.

Наборы

В настоящем изобретении также предлагаются наборы, содержащие слитый белок SAP-Fc, и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления указанный набор содержит инструкции в соответствии с любым из описанных в данном документе способов. В некоторых вариантах осуществления набор содержит инструкции по лечению амилоидного нарушения. В некоторых вариантах осуществления набор содержит инструкции по лечению системного амилоидного нарушения. В некоторых вариантах осуществления набор содержит инструкции по лечению заболевания, которое представляет собой АА-амилоидоз, AL-амилоидоз, АН-амилоидоз, Аβ-амилоидоз, АТТН-амилоидоз, ALect2-амилоидоз и IAPP-амилоидоз диабета II типа, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в мозг с амилоидозом голландского типа, церебральную бета-амилоидную ангиопатию, губчатую энцефалопатию, опухоли щитовидной железы, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Льюиса, таупатию, болезнь Гентингтона, старческий системный амилоидоз, семейный амилоидоз, старческое системное старение, старческое поражение гипофиза, ятрогенный синдром, губчатые энцефалопатии, реактивное хроническое воспаление, опухоли щитовидной железы, миелому или другие формы раковых заболеваний

Набор также может содержать слитый белок SAP-Fc в контейнере, таком как флакон, пакет, помпа или шприц. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SAP-Fc находится в фармацевтической композиции.

Варианты осуществления

1. Слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент амилоида Р (SAP) сыворотки человека, связанный с N-концом первого Fc-домена человека, при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека, но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом один из двух Fc-доменов

содержит мутацию по типу выступа, а другой Fc-домен содержит мутацию по типу впадины.

2. Слитый белок по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что первый полипептид содержит мутацию по типу выступа, а второй полипептид содержит мутацию по типу впадины.

3. Слитый белок по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:10, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:9.

4. Слитый белок по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит последовательности первого полипептида и второго полипептида TNT148, TNT152, TNT157, TNT158, TNT147, TNT159, TNT160 или TNT161 в соответствии с Таблицей 2.

5. Слитый белок по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что Fc-домен первого полипептида содержит мутацию по типу впадины, а Fc-домен второго полипептида содержит мутацию по типу выступа.

6. Слитый белок по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16; а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 15.

7. Слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к C-концу, SAP-шарнир1-Fc1-L1-шарнир2-Fc2, где SAP представляет собой белок-компонент амилоида P (SAP) сыворотки человека, шарнир1 представляет собой последовательность первого шарнира, Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, L1 представляет собой линкер, шарнир2 представляет собой последовательность второго шарнира и Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена.

8. Слитый белок по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

9. Слитый белок по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит полипептидную последовательность TNT146, TNT151, TNT155, TNT156, TNT170 или TNT171.

10. Слитый белок по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7, отличающийся тем, что белок-компонент P амилоида сыворотки человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO:17.

11. Слитый белок по варианту осуществления 10, отличающийся тем, что белок-компонент P амилоида сыворотки крови человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 20.

12. Слитый белок по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7,

отличающийся тем, что первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную замену в положении C226 или C229 в соответствии с нумерацией EU.

13. Слитый белок по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что первый и второй Fc-домены содержат аминокислотные замены C226S или C229S в соответствии с нумерацией EU.

14. Слитый белок по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7, отличающийся тем, что первый и второй Fc-домены содержат аминокислотную замену в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

15. Слитый белок по варианту осуществления 14, отличающийся тем, что первый и второй Fc-домены содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

16. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 12-15, отличающийся тем, что первый или второй Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

17. Слитый белок по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7, отличающийся тем, что первый и/или второй Fc-домены содержат мутацию, которая снижает связывание FcRn.

18. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1-17, отличающийся тем, что указанный слитый белок образует пентамер.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из вариантов осуществления 1-18.

20. Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок по любому из вариантов осуществления 1-18.

21. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 20.

22. Способ продуцирования слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-18, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, в условиях, обеспечивающих экспрессию слитого белка.

23. Способ по варианту осуществления 22, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку 293.

24. Способ по варианту осуществления 22 или варианту осуществления 23, отличающийся тем, что клетка-хозяин не гликозилирует белок-компонент SAP.

25. Способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-18 индивидууму, нуждающемуся в этом.

26. Способ по варианту осуществления 25, отличающийся тем, что амилоидное заболевание включает системный амилоидоз.

27. Слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к C-концу, шарнир1-Fc1-L1-шарнир2-Fc2, где шарнир1 представляет собой последовательность первого шарнира, Fc1 представляет собой последовательность

первого Fc-домена, L1 представляет собой линкер, шарнир2 представляет собой последовательность второго шарнира, а Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена, при этом первый и второй Fc-домены содержат аминокислотные замены C226S или C229S в соответствии с нумерацией EU, и/или при этом первый и второй Fc-домены содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

28. Слитый белок по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что указанный слитый белок дополнительно содержит белок-компонент амилоида P (SAP) сыворотки человека на N-конце указанного слитого белка.

1A. Слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к C-концу, SAP-Fc1-L1-Fc2, где Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, содержащую шарнир-CH₂-CH₃, L1 представляет собой линкер, и Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена, содержащую шарнир-CH₂-CH₃, где SAP представляет собой белок-компонент амилоида P сыворотки (SAP) крови человека, при этом Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положении C226 и/или C229 в соответствии с нумерацией EU.

2A. Слитый белок по варианту осуществления 1A, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положениях C226 и C229 в соответствии с нумерацией EU.

3A. Слитый белок по варианту осуществления 1A или 2A, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

4A. Слитый белок по варианту осуществления 3A, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 без C-концевого лизина, SEQ ID NO: 2 без C-концевого лизина, SEQ ID NO: 3 без C-концевого лизина, SEQ ID NO: 4 без C-концевого лизина, SEQ ID NO: 23 без C-концевого лизина или SEQ ID NO: 24 без C-концевого лизина.

5A. Слитый белок по варианту осуществления 1A или 2A, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит полипептидную последовательность TNT146, TNT151, TNT155, TNT156, TNT170 или TNT171.

6A. Слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент амилоида P сыворотки (SAP) человека, связанный с N-концом первого Fc-домена человека (Fc1), при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека (Fc2), но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом один из двух Fc-доменов содержит мутацию по типу выступа, а другой Fc-домен содержит мутацию по типу впадины.

7A. Слитый белок по варианту осуществления 6A, отличающийся тем, что первый полипептид содержит мутацию по типу выступа, а второй полипептид содержит мутацию

по типу впадины.

8А. Слитый белок по варианту осуществления 7А, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 10; а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:9.

9А. Слитый белок по варианту осуществления 8А, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6.

10А. Слитый белок по варианту осуществления 8А, отличающийся тем, что

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, с С-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, с С-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, с С-концевым лизином или без него; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, с С-концевым лизином или без него.

11А. Слитый белок по варианту осуществления 6А, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит последовательности первого полипептида и второго полипептида TNT148, TNT152, TNT157, TNT158, TNT147, TNT159, TNT160 или TNT161 в соответствии с Таблицей 2.

12А. Слитый белок по варианту осуществления 6А, отличающийся тем, что Fc-

домен первого полипептида содержит мутацию по типу впадины, а Fc-домен второго полипептида содержит мутацию по типу выступа.

13A. Слитый белок по варианту осуществления 6A, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16; а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 15.

14A. Слитый белок по варианту осуществления 13A, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15.

15A. Слитый белок по варианту осуществления 13A, отличающийся тем, что

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, с C-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12, с C-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, с C-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12, с C-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, с C-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, с C-концевым лизином или без него; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, с C-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, с C-концевым лизином или без него.

16A. Слитый белок по варианту осуществления 1A или варианту осуществления 6A, отличающийся тем, что SAP человека представляет собой SAP дикого типа, необязательно содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17.

17А. Слитый белок по варианту осуществления 1А или варианту осуществления 6А, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO: 17.

18А. Слитый белок по варианту осуществления 17А, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20.

19А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 6А или 16А-18А, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положениях C226 и/или C229 в соответствии с нумерацией EU.

20А. Слитый белок по варианту осуществления 19А, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положениях C226 и C229 в соответствии с нумерацией EU.

21А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А, 2А, 6А или 16А-20А, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотные замены C226S и/или C229S в соответствии с нумерацией EU.

22А. Слитый белок по варианту осуществления 21А, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотные замены C226S и C229S в соответствии с нумерацией EU.

23А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А, 2А, 6А или 15А-17А, отличающийся тем, что Fc1 и/или Fc2 содержат аминокислотную замену в аминокислотном положении 11 и/или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

24А. Слитый белок по варианту осуществления 23А, отличающийся тем, что Fc1 и/или Fc2 содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 и/или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

25А. Слитый белок по варианту осуществления 23А или 24А, отличающийся тем, что Fc1 и/или Fc2 содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

26А. Слитый белок по вариантах осуществления 1А, 2А, 6А или 16А-18А, отличающийся тем, что первый и/или второй Fc-домены содержат мутацию, которая снижает связывание FcRn.

27А. Слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к С-концу, Fc1-L1-Fc2, где Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, содержащую шарнир-CH2-CH3, L1 представляет собой линкер, а Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена, содержащую шарнир-CH2-CH3, при этом Fc1 и Fc2 содержат аминокислотные замены C226S и/или C229S в соответствии с нумерацией EU, и/или при этом Fc1 и Fc2 содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 и/или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

28А. Слитый белок по варианту осуществления 27А, отличающийся тем, что указанный слитый белок дополнительно содержит белок-компонент амилоида Р (SAP) сыворотки человека на N-конце слитого белка.

29А. Слитый белок по варианту осуществления 28А, отличающийся тем, что SAP человека представляет собой SAP дикого типа, необязательно содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17.

30А. Слитый белок по варианту осуществления 28А, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO:17.

31А. Слитый белок по варианту осуществления 30А, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20.

32А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-31А, отличающийся тем, что указанный слитый белок образует пентамер или декамер.

33А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-32А, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит Fc-область человека.

34А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-33А, отличающийся тем, что указанный слитый белок содержит Fc-область IgG1 человека.

35А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-34А, отличающийся тем, что указанный слитый белок характеризуется пониженной агрегацией по сравнению со слитым белком, в котором отсутствует одна или большее количество аминокислотных замен.

36А. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-35А и фармацевтически приемлемый носитель.

37А. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 36А, отличающаяся тем, что по меньшей мере 50% слитого белка находится в форме пентамера и/или декамера.

38А. Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-35А.

39А. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 38А.

40А. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 38 или вектор по варианту осуществления 39А.

41А. Клетка-хозяин по варианту осуществления 40А, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку 293.

42А. Способ продуцирования слитого белка по любому из вариантов осуществления 1А-35А, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, в условиях, обеспечивающих экспрессию слитого белка.

43А. Способ по варианту осуществления 42А, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку 293.

44А. Способ по варианту осуществления 42 или варианту осуществления 43, отличающийся тем, что клетка-хозяин не гликозилирует белок-компонент SAP.

45А. Способ лечения амилоидного заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму слитого белка по любому из вариантов осуществления

1A-35A.

46A. Способ лечения амилоидного заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму слитого белка, полученного способом по любому из вариантов осуществления 42A-44A.

47A. Способ по варианту осуществления 45A или варианту осуществления 46A, отличающийся тем, что амилоидное заболевание выбирают из группы, состоящей из AA-амилоидоза, AL-амилоидоза, AN-амилоидоза, A β -амилоидоза, ATTR-амилоидоза, ALect2-амилоидоза, IAPP-амилоидоза диабета II типа и болезни Альцгеймера.

48A. Слитый белок SAP-Fc, полученный способом по любому из вариантов осуществления 42A-45A.

49A. Способ по любому из вариантов осуществления 45A-47A, отличающийся тем, что индивидуумом является человек.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Продуцирование конструкции SAP-scFc

SAP-scFc очищали посредством этапа аффинной очистки с белом А (MABSELECT SURE™ LX, CYTIVA®) и этапа очистки с помощью 1700 мл эксклюзионной хроматографии (SEC). Однако эти этапы очистки не позволяли отделить мономер и димер от других олигомеров (Фиг. 6A и Фиг. 6B). Чтобы лучше отделить мономер и димер от других олигомеров, продукты очистки 1700 мл SEC дополнительно очищали на этапе очистки 496 мл SEC (Фиг. 7A). Анализ SDS-PAGE демонстрирует, что фракции, полученные на этом этапе, все еще содержат смесь мономера, димера и других олигомеров (Фиг. 7B). Фракцию «2B1» из 496 мл SEC отбирали для анализа с помощью микрожидкостного электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (LABCHIP® GXII, PERKINELMER®). Микрожидкостный электрофорез фракции «2B1» невосстанавливающих условиях продемонстрировал множество пиков олигомеров, в то время как микрожидкостный электрофорез в восстанавливающих условиях продемонстрировал основной пик мономера (Фиг. 7C-7D). Фракция «2A9» из 496 мл SEC была выбрана для анализа с помощью эксклюзионной хроматографии с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS). Результат SEC-MALS продемонстрировал, что белок SAP-scFc существует в виде комплекса с большой молекулярной массой (Фиг. 7E). Эти анализы указывают на то, что этап очистки 496 мл SEC не улучшил отделение мономера и димера от других олигомеров. Анализ SEC-HPLC фракции «2A9» после этапа очистки 496 мл SEC продемонстрировал один пик (Фиг. 7F), в то время как масс-анализ денатурированного дегликозилированного вещества продемонстрировал сигналы мономеров, димеров и тримеров (Фиг. 7G). Таким образом, предполагается, что SAP-scFc может существовать как комплекс мономера, димера и тримера, объединенных посредством нековалентных взаимодействий.

Продукт очистки 1700 мл SEC также подвергали дополнительной мелкомасштабной очистке с помощью высокоэффективной хроматографии с сильным катионообменом SP SEPHAROSE (HITRAP™ SP HP, CYTIVA®), хроматографии с

сильным катионообменом POROSTTM XS (THERMO FISHER SCIENTIFIC®), хроматографии гидрофобного взаимодействия с быстрым потоком PHENYL SEPHAROSE 6 (HITRAPTM PHENYL FF, CYTIVA®), хроматографии гидрофобного взаимодействия с быстрым потоком BUTYL-S SEPHAROSE 6 (HITRAPTM BUTYL-S FF, CYTIVA®), хроматографии гидрофобного взаимодействия BIOPROCESS CAPTO PHENYL IMPRES (HITRAPTM CAPTO PHENYL IMPRES, CYTIVA®) и катионообменной хроматографии с аффинностью к керамическому гидроксипатиту кальция СHTTM (BIO-RAD®). Однако ни один из мелкомасштабных методов очистки не улучшил отделение мономера и димера от других олигомеров.

Пример 2. Модифицированные слитые белки SAP-Fc

Как описано в Примере 1, структура SAP-Fc вызывала трудности в процессе очистки. Для улучшения профиля экспрессии и очистки исследовали модификации структуры SAP-Fc.

Модификация SAP-Fc для удаления остатков цистеина в шарнирной области

TNT146(293) и TNT146(CHO) получали путем точечных мутаций остатка цистеина в положении 226 на серин и остатка цистеина в положении 229 на серин (C226S/C229S, схема нумерации EU), таким образом удаляя остатки цистеина в шарнирной области SAP-Fc (Таблица 1).

Модификация SAP-Fc с помощью способа «выступ-впадина» для генерации Fc-области

TNT147 (293), TNT148 (293) и TNT148 (CHO) получали путем модификации SAP-Fc с помощью способа «выступ-впадина» для генерации Fc-области (Таблица 1). Мутант по типу выступа получали в результате точечной мутации треонина в положении 336 на триптофан (T366W, схема нумерации EU). Мутант по типу впадины получали путем точечной мутации треонина в положении 366 на серин, лейцина в положении 368 в аланин и тирозина в положении 407 на валин (T366S/L368A/Y407V, схема нумерации EU).

Модификация SAP-Fc для удаления сайта гликозилирования в SAP

TNT151(293) и TNT151(CHO) получали путем модификации SAP-Fc для удаления сайта гликозилирования в SAP (Таблица 1). Агликозилированный SAP получали точечной мутацией аспарагина в положении 32 на серин и аспарагина в положении 110 на серин (N32S/N110S, нумерация начинается с первой аминокислоты SAP).

Модификация SAP-Fc с помощью способа «выступ-впадина» для генерации Fc-области и удаления сайта гликозилирования в SAP

TNT152 (293) и TNT152 (CHO) получали путем модификации SAP-Fc для удаления сайта гликозилирования в SAP и с помощью способа «выступ-впадина» для генерации Fc-области (Таблица 1). Агликозилированный SAP и Fc-область по типу «выступ-впадина» получали, как описано выше.

Пример 3. Производство SAP-Fc и его модифицированных белков.

Производство конструкций SAP-Fc

Уровень продукции рекомбинантного белка SAP-Fc оценивали с помощью ELISA.

Сначала планшеты MaxiSorp™ (NUNC) покрывали первичным антителом против IgG человека (1 мкг/мл, Beckman Coulter) в течение ночи при 4 °С. После 3 промывок PBS/0,05% твин-20, 50 мкл образцов, разведенных в полной среде, инкубировали в течение 2 часов при 37 °С. Одновременно инкубировали стандартный диапазон IgG человека, разведенный в полной среде. После 3 промывок добавляли антитело против IgG (Beckman Coulter), связанное со щелочной фосфатазой (1 мкг/мл), и инкубировали в течение 1 часа 30 минут при 37 °С. После последней серии промывок добавляли 100 мкл субстрата щелочной фосфатазы и через несколько минут реакцию останавливали с помощью 3М NaOH. Планшет считывали спектрометрически при 405 нм.

Полученный слитый белок SAP-Fc затем очищали с помощью аффинной хроматографии на системе ÄKTA_{FPLC} (GE Healthcare) с применением аффинных колонок с белком А (Pierce) благодаря сильной аффинности белка А к сегментам Fc и присутствию фрагментов Fc-области в химерных белках по настоящему изобретению. УФ-детектор, расположенный ниже от колонки, позволяет контролировать процесс; при снижении поглощения неудерживаемой фазы до порогового значения белок элюировали 0,1 М глицином при pH 2,6. Различные фракции собирали в соответствии с пиками хроматограммы. Полученные элюаты затем нейтрализовали с применением Tris при pH 8,8.

Очищенный белок концентрировали с помощью фильтров Amicon® Ultra4 30k (Millipore), позволяющих отсеивать молекулы размером менее 30 кДа. Растворы помещали на фильтры и центрифугировали при 4000 g в течение времени, необходимого для получения нужного объема и нужной концентрации.

Очищенные белки (или культуральные супернатанты) выявляли вестерн-блоттингом с применением денатурирующего геля. Белки смешивали с объемом загрузочного буфера, содержащего β-меркаптоэтанол (BioRad), и кипятили в течение 5 мин. Затем их подвергали электрофорезу на полиакриламидном геле (SDS-PAGE), состоящем из стэкинг-фазы 7,5% и разделительной фазы 10%. Затем белки переносили на мембрану PVDF и насыщали 5%-ным молоком. Затем их инкубировали в течение 1 часа при температуре окружающей среды в присутствии мышинового антитела против SAP (Abeam) или против IgG, связанного с HRP (BECKMAN COULTER®) (1 мкг/мл). Антитело против SAP выявляли с помощью вторичного антитела козы против мышинового IgG, связанного с HRP (SANTA CRUZ®) (0,2 мкг/мл). Реакцию хемиллюминесценции запускали добавлением субстрата ECL (PIERCE®) и проявляли на радиоавтографической пленке (KODAK®).

Очищенные белки (или культуральные супернатанты) также обнаруживали с помощью вестерн-блоттинга с применением полунативного геля. Белки смешивали с объемом загрузочного буфера без β-меркаптоэтанола и затем подвергали миграции на SDS-12% PAGE геле. В остальном протокол был такой же, как и для денатурирующего геля.

На Фиг. 16А и Фиг. 16В продемонстрированы SDS PAGE гели очищенных слитых

белков. Для этих экспериментов TNT146, TNT147, TNT148, TNT155 и TNT160 очищали посредством двухэтапной очистки. TNT151 очищали с помощью единственного этапа очистки с белком А.

Пример 4. Связывание модифицированного SAP-Fc с фибриллами

Связывание SAP-Fc и SAP-scFc с фибриллами и экстрактами изучали с помощью анализа ELISA.

Используя метод анализа с иммуносорбентом, связанным с европием (EuLISA), для гуманизированного IgG, суспензию фибрилл rV λ 6Wil (обработанных ультразвуком) при 0,83 мкМ готовили в фосфатно-солевом буфере (PBS). Фибриллы наносили на лунки 96-луночного микропланшета, добавляя в каждую лунку по 50 мкл. Планшет сушили при 37 °С в течение ночи. Лунки микропланшета блокировали добавлением Superblock в трис-буферном солевом растворе (TBS) с 2 мМ хлорида кальция (Ca) (ThermoFisher) (SBT), используя 200 мкл/лунку, и оставляли при 37°С на 1 час. Добавляли первичный (тестовый) слитый белок SAP-Fc, гуманизированный иммуноглобулин, hIgG1 или c11-1F4. Планшет инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После этапа промывки (планшеты промывали 3 раза, используя TBS/Ca+0,05% твин-20), добавляли вторичное антитело - биотинилированное козье антитело против IgG человека в разведении 1:3000 (Sigma) в SBT в концентрации 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После еще одного этапа промывки добавляли 100 мкл/лунку разведения европия/стрептавидина 1:1000 (Perkin Elmer) в SBT. Планшет инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После заключительного этапа промывки, добавляли усиливающий раствор европия 100 мкл/лунку (Perkin Elmer). Флуоресцентное излучение с временным разрешением считывали с помощью устройства для считывания микропланшетов (Wallac).

Результат на Фиг. 8А демонстрирует, что первоначально поставляемые TNT146(293) и TNT147(293) связывают синтетические фибриллы rV λ 6Wil с более высокой аффинностью (EC50), чем контрольный hIgG1 и c11-1F4 в анализе ELISA. Фиг. 8В демонстрирует, что TNT146(CHO), TNT148(CHO), TNT151(293) одинаково хорошо связываются с фибриллами rV λ 6Wil, за исключением TNT152(293). Результаты на Фиг. 9А-9В демонстрируют, что версии SAP-Fc с мутацией по типу «выступа-впадина» и сус-мутацией сохраняют реактивность амилоида *in vitro*.

Результаты на Фиг. 10А-10Е и в Таблице 4 указывают, что все конструкции демонстрируют значения EC50 в диапазоне 1-10 нМ, за исключением TNT152(293) и TNT148(CHO). Наиболее высокое связывание с экстрактом wtATTR наблюдалось с реагентами SAP-scFc TNT146(293), TNT146(CHO), TNT151(293) (Таблица 4). Агликозилирование SAP в контексте SAP-scFc сохраняет амилоидную реактивность *in vitro* с аналогичным значением EC50, за исключением TNT152(293), который имеет более высокое значение EC50 для амилоидных экстрактов, чем слияния hIgG1-пептид (Фиг. 8В и Таблица 4).

Таблица 4. Связывание SAP-Fc и SAP-scFc с фибриллами и экстрактами в анализе

ELISA

	Субстрат						
		rVλ6Wil фибриллы	rVλ6Wil фибриллы	Per125 wtATTR экстракт	Ken hATTR экстракт	SHI ALλ экстракт печени	TAL ALκ экстракт печени
TNT146 (293)	LogEC50		8,375	8,717	8,471	8,575	8,574
	EC50		1,84E-09	1,92E-09	3,38E-09	2,66E-09	2,67E-09
	Макс		89,9	81,15	64,55	78,52	76,03
TNT146 (CHO)	LogEC50	8,794	8,841	8,772	8,508	8,63	8,574
	EC50	1,61E-09	1,44E-09	1,69E-09	3,10E-09	2,34E-09	2,67E-09
	Макс	81,28	79,02	71,18	51,72	57,21	66,69
TNT148(CH O)	LogEC50	8,596	8,717	8,094	7,966	8,014	7,98
	EC50	2,54E-09	1,92E-09	8,05E-09	1,08E-09	9,68E-09	1,05E-09
	Макс	81,81	83,07	87,02	54,48	73,11	78,85
TNT151(293)	LogEC50	8,708	8,71	8,553	8,242	8,348	8,243
	EC50	1,96E-09	1,95E-09	2,80E-09	5,73E-09	4,49E-09	5,71E-09
	Макс	81,71	89,31	77,42	60,51	72,71	75,21
TNT152(293)	LogEC50	7,843	7,839	7,221	7,119	7,195	6,956
	EC50	1,44E-09	1,45E-09	6,01E-09	7,60E-09	6,38E-09	1,11E-09
	Макс	71,35	89,33	88,86	56,48	69,75	75,39

Связывание слияний SAP-Fc с фибриллами и экстрактами также тестировали в анализе «pulldown». Синтетические амилоидные фибриллы из rVλ6Wil получали следующим образом: объем 1 мл, содержащий 1 мг/мл мономера в фосфатно-солевом буфере (PBS), 0,01% мас./об. NaN₃, pH 7,5, фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм, добавляли в коническую полипропиленовую пробирку объемом 15 мл (BD BioSciences, Бедфорд, штат Массачусетс) и встряхивали под углом 45 ° при 225 об/мин в течение 3-5 дней при 37°C до тех пор, пока реакционная смесь не становилась мутной.

Экстракты очищенной амилоидной ткани человека готовили с использованием тканей, полученных при аутопсии, от пациентов с амилоидозом легких цепей (AL) или транстретин-ассоциированным (ATTR) амилоидозом с помощью метода водной флотации, как описано в публикации Pras et al., J Exp Med (1969) 130(4):777-795 без изменений. Очищенный амилоидный материал, выделенный при промывании водой, и богатый амилоидом осадок собирали и хранили в лиофилизированном виде при комнатной температуре до использования.

Для анализа «pulldown» двадцать пять микролитров экстракта AL с концентрацией 1 мг/мл или синтетических фибрилл вариабельного домена rV λ 6Wil (REF) центрифугировали в 0,5 мл микроцентрифужной пробирке при 21000 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS с 0,05% твин-20 (PBST). К суспензии добавляли ¹²⁵I-p5+14 (~100000 отсчетов в минуту (CPM); ~5 нг пептида) или ¹²⁵I-меченые слитые белки SAP-Fc. Смесь вращали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем образцы дважды центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин. Супернатанты и осадки разделяли после каждого этапа и измеряли радиоактивность в каждом из них с помощью гамма-счетчика Cobra II (Perkin Elmer) с получением данных в течение 1 мин. Процент ¹²⁵I-p5+14 или ¹²⁵I-меченых слитых белков SAP-Fc, связанных с осадком, определяли следующим образом:

$$\text{Осадок CPM} / (\text{осадок CPM} + \text{супернатант CPM}) \times 100$$

В анализе «pulldown», ¹²⁵I-меченные TNT146 и TNT 147 продемонстрировали слабое связывание с субстратами со значениями EC50 в наномолярном диапазоне (Таблица 5), что указывает на то, что окислительное радиоактивное йодирование может отрицательно влиять на продукт, приводя к потере активности; амилоидный экстракт, представленный в виде растворимого материала, может иметь разные сайты связывания; и более высокие концентрации реагента могут вызывать связывание в формате ELISA.

Таблица 5. Связывание TNT146 и TNT147 с фибриллами и экстрактами в анализе «pulldown»

	TNT146	TNT147	Ктрл IgG
Синтетические фибриллы rV λ 6Wil	67,00**	61,97**	
фибриллы A β (1-40)			
фибрилл hIAPP			
гранулы V κ 4(Len(1-22))			
HIG AL κ 1			
TAL AL κ	1,76	1,10	0,10
SHI AL λ	1,90	1,51	0,17
TYL AL λ			
CAB AL κ 4			
SNO hATTR			

KEN hATTR	1,50	0,71	0,15
wtATTR - PER125	2,64	1,66	0,13
wtATTR - PER253			
Гомол. печень мышей AA			
Гомол. печень мышей дикого типа			

Пример 5. Биораспределение SAP-Fc у мышей

Мышиная модель AA-амилоидоза

Мыши с AA-амилоидозом представляют собой линию мышей, которые экспрессируют белок IL6 человека (huIL6) из стабильно встроенного трансгена. Штамм B6(C)-Tg(H2-Ld-IL-6)Kish (H2/huIL-6) был получен в Национальном институте здравоохранения путем интрогрессивного обратного скрещивания исходных трансгенных мышей H2-Ld-IL-6 Tg C57BL/6 на фоне Balb/c в течение более чем 20 поколений (Kovalchuk et al., PNAS (2002) 99:1509-1514). Эти мыши конститутивно экспрессируют трансген huIL6 под контролем мышинового промотора класса 1 (H2-Ld) главного комплекса гистосовместимости. Трансген сегрегирует с аутосомной формой менделевского наследования (Suematsu et al., PNAS (1992) 89:232-235). Из-за роли IL6 в поддержании воспалительного ответа и пролиферации лимфоцитов во время иммунного ответа ранние поколения этих трансгенных животных имели высокие уровни sAA и обширный лимфоцитоз с развитием поликлональной пролиферации плазматических клеток у 56% мышей в возрасте 18 месяцев (Kovalchuk et al., PNAS(2002) 99:1509-1514). Уровни человеческого IL6 в сыворотке в ранних поколениях этой трансгенной линии составляли от 0,5 до 1 нг/мл; однако у мышей Balb/c с обратным скрещиванием, выведенных в нашей лаборатории в течение примерно 2 лет, уровень циркулирующего huIL6 в возрасте 8 недель был примерно в 300 раз выше (от 0,3 до 1 мкг/мл) (Solomon et al., Am J Pathol (1999) 154:1267-12724). В ответ на провоспалительный цитокин huIL6, у мышей возникает хроническое воспалительное состояние, которое приводит к повышению концентрации циркулирующих липопротеинов высокой плотности, конъюгированных с sAA. Спонтанное начало AA-амилоидоза у этих мышей обычно происходило в возрасте 5 мес., проявляясь вначале в виде перифолликулярных отложений в селезенке, обнаруживаемых только гистологически с помощью биопсии (Solomon et al., Am J Pathol (1999) 154:1267-12724). В течение следующих 3-4 месяцев амилоид обнаруживали в перипортальной сосудистой сети и синусоидах печени, языка, сердца и ворсинок кишечника, а также в почечном интерстиции, клубочках и сосочках. Кроме того, часто наблюдалась «слепковая» нефропатия (cast nephropathy) или лимфоидная гиперплазия (или того и другого) в экстрамедуллярном кроветворении и спленомегалии из-за амилоидоза в результате повышенных концентраций IL6.

Природа амилоида у мышей H2/huIL-6 документирована иммуногистохимически с применением AA-специфических моноклональных антител (Solomon et al., Am J Pathol (1999) 154:1267-12724). Кроме того, масс-спектрометрия в сочетании с жидкостной

хроматографией показала, что выделенные из ткани фибриллы АА состоят из укороченной формы sAA, содержащей первые 77 N-концевых аминокислот (остатки с 1 по 77) (Solomon et al., *Am J Pathol* (1999) 154:1267-12724). При иммуногистохимическом исследовании и масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией выделенного из этих мышей амилоида не было обнаружено никаких признаков аполипопротеинов AI и AII или легкой цепи иммуноглобулина.

Биораспределение SAP-Fc изучали на мышах дикого типа (WT) и на мышинной модели АА-амилоидоза.

Биораспределение SAP-Fc изучали на мышах дикого типа (WT) и мышах с АА-амилоидозом с помощью тканевой микроавторадиографии. Мышиную модель АА-амилоидозу создавали путем внутривенного введения 10 мг выделенного фактора, усиливающего амилоид (AEF, Axelrad et al., *Lab Invest* (1982)47: 139-146.) в 100 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS). у трансгенных мышей H2-Ld-huIL-6 Tg Balb/c, которые конститутивно экспрессируют трансген человеческого интерлейкина-6. Мыши, использованные в этих исследованиях, находились в возрасте 4-6 недель после индукции. Мышиная модель АА характеризуется интерстициальным отложением амилоида в сердце, обширными синусоидальными отложениями амилоида в печени, начальными и массивными перифолликулярными отложениями амилоида в селезенке и более поздними отложениями амилоида в поджелудочной железе, почках, надпочечниках и кишечнике.

Мышам АА или WT вводили 10 мкг ¹²⁵I-меченного TNT146(293) и TNT147(293), затем подвергали эвтаназию через 48 часов после инъекции. У мышей WT и АА после эвтаназии собирали образцы селезенки, поджелудочной железы, левой и правой почки, печени, сердца, мышц, желудка, верхнего и нижнего отделов кишечника и легочной ткани. Каждый образец помещали в тарированный пластиковый флакон, взвешивали и измеряли радиоактивность ¹²⁵I с помощью автоматического гамма-счетчика Wizard 3 (1480 Wallac Gamma Counter, PERKIN ELMER®). Данные биораспределения выражали в процентах от введенной дозы на грамм ткани (% ID/г). Кроме того, образцы каждой ткани фиксировали в 10% забуференном формалине на 24 ч и заливали в парафин для проведения гистологического исследования и авторадиографии. Для авторадиографии, срезы толщиной от 4 до 6 мкм вырезали из фиксированных формалином и залитых парафином блоков на предметные стекла Plus (FISHER SCIENTIFIC®), погружали в эмульсию NTB2 (EASTMAN KODAK®), хранили в темноте и проявляли после 96-часовой экспозиции. Каждый срез контрастно окрашивали гематоксилином. В альтернативном варианте, мышам АА или WT вводили 500 мкг немеченого TNT147(293), а затем подвергали эвтаназию через 48 часов после инъекции. Образцы каждой ткани фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 ч и заливали в парафин. Срезы толщиной от 4 до 6 мкм вырезали из блоков, фиксированных формалином и залитых парафином, на предметные стекла Plus (FISHER SCIENTIFIC®), затем срезы окрашивали с применением антител против Fc человека. Отложения амилоида в тканях

идентифицировали под микроскопом в последовательных срезах ткани, просматриваемых при кросс-поляризованном освещении после окрашивания щелочным конго красным. Все срезы тканей исследовали с помощью световой микроскопии (DM500, LEICA®) с кросс-поляризационными фильтрами (для обнаружения двойного лучепреломления конго красного). Цифровые микроскопические изображения получали с помощью охлаждаемой камеры прибора с зарядовой связью (SPOT, DIAGNOSTIC INSTRUMENTS®).

Результаты на Фиг. 11А-11С демонстрируют, что TNT146(293) и TNT147(293) специфически связывают амилоид АА у мышей с системным заболеванием, как при радиоактивном мечении ¹²⁵I, так и без такового мечения. Специфическое связывание как TNT146(293), так и TNT147(293) с отложениями амилоида было подтверждено в скудных отложениях АК в сердце с помощью автордиографии.

Результаты на Фиг. 12А-12В демонстрируют, что ¹²⁵I-меченные TNT146(293) и TNT147(293) накапливаются в печени и селезенке у мышей АА и не накапливаются в тканях, не содержащих амилоид, у мышей дикого типа.

Пример 6. Анализ мультимеризации конструкций SAP-Fc

Высокая avidность связывания SAP с амилоидом обеспечивается соответствующей мультимеризацией белка в форме пентамера или декамера. С другой стороны, большая и/или несоответствующе агрегированная конструкция SAP-Fc может быстро выводиться из кровотока, что отрицательно влияет на ее фармакокинетику и функцию. Таким образом, анализ агрегации высокого порядка конструкций SAP-Fc важен для понимания их функций *in vivo*.

Мультимеризацию и агрегацию конструкций SAP-Fc анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). В этом анализе использовали матрицу, подходящую для белков с молекулярной массой 10-1300 кДа. В качестве стандартов молекулярной массы использовали коммерческие препараты белка. Расчетная молекулярная масса мономера SAP-Fc составляет около 75 кДа, расчетная молекулярная масса пентамера SAP-Fc составляет около 375 кДа, а расчетная молекулярная масса декамера SAP-Fc составляет около 750 кДа.

Результаты на Фиг. 13 демонстрируют, что все конструкции SAP-Fc имели различные структуры мутимеризации, в то время как TNT146(293) и TNT147(293) были наиболее однородными. Продукция в клетках CHO по сравнению с клетками HEK-293 сильно влияла на мутимеризационные структуры конструкций TNT151 и TNT152 (Фиг. 13).

Также сравнивали поглощение и биораспределение этих конструкций у мышей. Как TNT146(293), так и TNT147(293) продемонстрировали около 10% распределения в селезенке (Фиг. 12А-12В). Другие конструкции продемонстрировали меньшее распределение в селезенке: TNT151(293) продемонстрировал около 2,5% распределения в селезенке, что в 4 раза меньше, чем TNT146(293) и TNT147(293) (Фиг. 14А); TNT152(293) продемонстрировал около 2% распределения в селезенке, что в 5 раз меньше, чем TNT146(293) и TNT147(293) (Фиг. 14В); TNT148(293) продемонстрировал около 3%

распределения в селезенке, что в 3,3 раза меньше, чем TNT146(293) и TNT147(293) (Фиг. 14С). В совокупности с хроматограммами SEC анализа мутимеризации, эти результаты демонстрируют, что пик димера между 450-669 кДа коррелирует с оптимальным поглощением SAP-Fc у мышей AA (Фиг. 12А-12В, 14А-14С и 13).

Пример 7. Фагоцитоз фибрилл rVλ6Wil клетками ТНР1

Фагоцитоз изучали с помощью системы фибрилл rVλ6Wil, меченных pHrodo Red.

Для анализа поглощения Wil фибрилл в твердой фазе 24-луночные планшеты для тканевых культур покрывали крысиным коллагеном типа I (75 мкг/мл в 20 мМ уксусной кислоте, 0,4 мл), оставляли на 2 часа при комнатной температуре, промывали 0,5 мл PBS, покрывали фибриллами rVλ6, меченными pHrodo Red, в количестве 20 мкг/лунку (30% меченой фракции) и оставляли на ночь в 0,5 мл PBS при 4 °С. Лунки промывали 0,5 мл PBS и добавляли 0,5 мл RPMI 1640, не содержащего сыворотки и не содержащего фенолового красного. Добавляли опсоины антител или белки SAP-Fc с последующим немедленным добавлением клеток RAW 264.7 или неиндуцированных клеток ТНР-1 в бессывороточной среде RPMI 1640, не содержащей фенолового красного ($1,2 \times 10^6$ в 0,5 мл) в течение 4-часовой инкубации при 37 °С. Для измерения поглощения клетки из каждой лунки переносили в тройные лунки 96-луночного микропланшета из черного пластика с прозрачным дном (Corning) для измерения флуоресценции в считывателе микропланшетов BioTek SynergyHT-1 при возбуждении 530/25 нм и эмиссии 645/40 нм в режиме хорошего сканирования. Фоновые показания из лунок, инкубированных только в 1 мл среды, вычитали, чтобы получить относительные единицы флуоресценции.

Результат на Фиг. 15 демонстрирует, что SAP-Fc TNT146(CHO), TNT147(239), TNT148(CHO) и TNT151(CHO) служат превосходными опсонизирующими агентами, в то время как TNT152(CHO) оказался наименее эффективным реагентом, что согласуется с его более слабым связыванием с rVλ6Wil фибриллами.

Пример 8. Фаза 0 исследования биораспределения

AUR03 представляет собой SAP-Fc, меченный радиоактивным изотопом ^{124}I с использованием метода йодирования, применяемого в этом исследовании. Целями фазы 0 исследования являются: 1) определить биораспределение, включая нецелевое связывание и целевое воздействие у пациентов с системным амилоидозом; 2) определить, воздействует ли AUR03 на органы-мишени, нагруженные амилоидом, такие как сердце и почки; 3) определить, связывается ли AUR03 с органами, нагруженными амилоидом, как у пациентов с ATTR, так и у пациентов с AL; 4) дифференцировать AUR03 от других препаратов по типу амилоида или органам для планирования разработки.

30 пациентов были набраны в две когорты. 15 пациентов с ATTR с признаками поражения сердца включены в когорту 1a; 15 пациентов с AL с поражением органов брюшной полости и грудной клетки включены в когорту 1b. Пациенты в обеих когортах получали одну дозу 100 мкг AUR03, а затем подвергались визуализации через 2 дня и 5 дней после инъекции в 1-2 клинических центрах.

Кровь до и после инъекции собирали для исследований CBC, ClinChem, NT-

proBNP и LDH. Образцы крови собирали для определения фармакокинетики, а радиоактивность в образцах крови измеряли в течение 72 часов.

ПРИМЕР 9: Фагоцитоз *in vivo*

Партию 12 мг амилоида AL λ (SHI) человека, содержащую 10% материала, меченного pHrodo red, предварительно инкубировали с 600 мкг TNT146 в трис-буферном солевом растворе с 2 mM CaCl₂ в течение 30 мин при перемешивании при комнатной температуре (RT). Увеличение эмиссии флуоресценции флуорофора pHrodo red связано с закислением амилоида во время фагоцитоза макрофагами и, возможно, нейтрофилами. Иммуноскомпрометированные мыши NU/NU («голые») (n=5) получали 2 мг человеческого AL λ (SHI) в виде подкожной инъекции в левый бок. Контрольная группа мышей NU/NU (n=5) получила аналогичную дозу 2 мг человеческого AL λ (SHI) подкожно без предварительной обработки TNT146. Флуоресценцию, испускаемую флуорофором pHrodo red, серийно контролировали с помощью оптической визуализации у мышей под анестезией 2% изофлураном. Изображения собирали в дни 1, 3, 8, 10, 12 и 14 после инъекции амилоида. На день 15 мышей подвергали эвтаназии.

Количественное определение pHrodo red с помощью оптической визуализации выявило начальное увеличение эмиссии у мышей, получавших TNT146, которое сохранялось на протяжении всего исследования (Фиг. 17А). В день 1 (24 ч после инъекции амилоида) эмиссия флуоресценции амилоида, обработанного TNT146, была значительно выше, чем у контрольных животных (Фиг. 17В). На день 14, амилоид, обработанный TNT146, демонстрировал заметно более высокую эмиссию флуоресценции, чем у контрольных животных (Фиг. 18). Эти данные указывают на то, что связывание TNT146 с амилоидом усиливает фагоцитоз человеческого амилоида при подкожном введении мышам.

Пример 10. Фагоцитоз амилоидных фибрилл, усиленный компонентом

Этап 1: Дифференцировка клеток THP-1 в макрофаги M0

Подсчитайте и поместите 10⁶ клеток/лунку в центральные лунки 24-луночного планшета для культуры тканей (Costar 3526) в полной среде DMEM/F12 (Hyclone, SH 30023.01), дополненной 10% FBS (Hyclone, SH 30071.03), 1% Pen-Strep (Gibco, 15140-122) и 1% гентамицина (Gibco, 15710-064).

Добавьте 50 нг/мл PMA (Sigma, P8139) и дайте клеткам дифференцироваться в течение 24 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂.

Через 24 часа осторожно удалите среду, содержащую PMA, ручной аспирацией.

Пополните лунки 1 мл полной среды DMEM-F12 и дайте клеткам отдохнуть в течение минимум 48 ч.

Этап 2: Приготовление образцов

Промойте лунки один раз 1 мл DPBS (Hyclone, SH 30028.02).

Добавьте 500 мкл бессывороточной среды RPMI-1640 без фенолового красного (Hyclone, SH30605.01) в каждую лунку и инкубируйте планшет при 37°C до начала анализа.

Приготовьте реакцию, добавив 500 мкл RPMI-1640 в микропробирки, затем добавьте TNT146 или контрольный Fc в количестве 3 мкг. Хорошо перемешайте.

В микроцентрифужные пробирки добавьте фибриллы rV λ 6Wil (20 мкг), меченные pHrodo red (pHrodo™ Red SE, ThermoFisher, P36600).

Затем добавьте 20 мкг компонента морской свинки в половину лунок. Хорошо перемешайте и инкубируйте в течение 5 мин при комнатной температуре.

Перенесите содержимое каждой микроцентрифужной пробирки в соответствующие лунки 24-луночного планшета (общий объем каждой лунки теперь будет составлять 1 мл).

Аккуратно перемешайте вручную, перемещая планшет перпендикулярными движениями (а не вихревыми).

Инкубируйте планшет для тканевых культур при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 1 ч для облегчения фагоцитоза.

Этап 3: Получение изображений и количественная оценка

После инкубации в течение 1 часа флуоресценцию, связанную с pHrodo red, регистрировали с помощью флуоресцентной микроскопии (Keyence BZ X800 V 1.3.1).

Для каждой лунки выполняли четыре изображения, чтобы задокументировать все области лунки.

Количество флуоресценции в каждом изображении количественно определяется с помощью сегментации изображения и (Image Pro Premier V 9.0).

Данные анализировали путем вычисления среднего значения и стандартного отклонения четырех наблюдений. Статистический анализ проводили с использованием непарного двустороннего t-критерия с $\alpha=0,05$ (когда данные нормально распределены) с помощью программного обеспечения Prism (v. 9.0, GraphPad).

Активированные клетки ТНР-1 человека эффективно поглощают (фагоцитируют) синтетические амилоидоподобные фибриллы rV λ 6Wil AL при опсонизации путем добавления TNT146. В присутствии 20 мкг высокоактивного компонента морской свинки наблюдается значительное увеличение интенсивности флуоресценции pHrodo red, что свидетельствует об усилении фагоцитоза фибрилл в присутствии TNT146 и компонента (Фиг. 19).

Пример 11. Связывание слитого белка SAP-Fc с фибриллами амилоида в присутствии huSAP

Амилоидные экстракты человека (AL κ TAL и AL λ SHI), ATTRwt и синтетические AL амилоидоподобные фибриллы (rV λ 6Wil) предварительно обрабатывали путем инкубации в 96-луночном микропланшете в растворе белок-компонент Р амилоида сыворотки крови человека (SAP) в ТБС с 2 мМ CaCl₂ в течение 30 мин при 37°C. Использовали маточные растворы rV λ 6Wil и амилоидные экстракты с концентрацией 0,83 мкМ и 0,06 мг/мл соответственно. Образцы, не инкубированные в человеческом SAP, служили контролем. После инкубации образцы промывали TNT146 (молекулярная масса=410 кДа), добавляли в лунки микропланшета в серийном разведении от 100 нМ в

TBS/CaCl₂. После этапа промывки, связанный TNT146 обнаруживали путем добавления биотинилированного реагента против Fc человека. Связанный TNT146 определяли количественно путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления конъюгата «стрептавидин-европий» и раствора проявителя.

На график наносили среднее значение и стандартное отклонение продублированных лунок, и данные соответствовали сигмоидальному алгоритму с переменным наклоном (Prism v9.1, Graphpad).

Предварительное связывание SAP человека с амилоидными экстрактами AL или ATTR или амилоидоподобными фибриллами не оказывало отрицательного влияния на способность TNT146 связывать субстраты. (Фиг. 20A-20D)

Пример 12. Связывание слитого белка SAP-Fc с фибриллами амилоида в присутствии huSAP

Синтетические амилоидоподобные фибриллы A β (1-40) наносили на лунки 96-луночного микропланшета в PBS. Лунки блокировали с последующей промывкой и добавляли TNT146 (молекулярная масса=410 кД) в лунки микропланшета в серийном разведении в TBS/CaCl₂. Связанный TNT146 обнаруживали путем добавления биотинилированного реагента против Fc человека. Связанный TNT146 определяли количественно путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления конъюгата «стрептавидин-европий» и раствора проявителя. Fc человека применяли в качестве контрольного реагента.

На график наносили среднее значение и стандартное отклонение продублированных лунок, и данные соответствовали сигмоидальному алгоритму с переменным наклоном (Prism v9.1, Graphpad).

Связывание TNT146 с амилоидоподобными фибриллами A β (1-40) приводило к насыщаемому связыванию с расчетным значением EC₅₀ (концентрация при 50% полумаксимальном связывании) 0,4 нМ (Фиг. 21). Связывание Fc было слабым, и значение EC₅₀ нельзя было точно определить, но оно было оценено как ~0,2 мМ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к С-концу, SAP-Fc1-L1-Fc2, где Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, содержащую шарнир-CH2-CH3, L1 представляет собой линкер, и Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена, содержащую шарнир-CH2-CH3, где SAP представляет собой белок-компонент амилоида Р сыворотки (SAP) человека, при этом Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положении C226 и/или C229 в соответствии с нумерацией EU.

2. Слитый белок по п. 1, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положениях C226 и C229 в соответствии с нумерацией EU, необязательно C226S и C229S.

3. Слитый белок по п. 1 или 2, отличающийся тем, что содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

4. Слитый белок по п. 3, отличающийся тем, что содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 без С-концевого лизина, SEQ ID NO: 2 без С-концевого лизина, SEQ ID NO: 3 без С-концевого лизина, SEQ ID NO: 4 без С-концевого лизина, SEQ ID NO: 23 без С-концевого лизина или SEQ ID NO: 24 без С-концевого лизина.

5. Слитый белок по п. 1 или 2, отличающийся тем, что содержит полипептидную последовательность TNT146, TNT151, TNT155, TNT156, TNT170 или TNT171.

6. Слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, при этом первый полипептид содержит белок-компонент амилоида Р сыворотки (SAP) человека, связанный с N-концом первого Fc-домена человека (Fc1), при этом второй полипептид содержит второй Fc-домен человека (Fc2), но не содержит белок-компонент SAP человека, при этом первый и второй Fc-домены образуют димер, и при этом один из двух Fc-доменов содержит мутацию по типу выступа, а другой Fc-домен содержит мутацию по типу впадины.

7. Слитый белок по п. 6, отличающийся тем, что первый полипептид содержит мутацию по типу выступа, а второй полипептид содержит мутацию по типу впадины.

8. Слитый белок по п. 7, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 10; а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:9.

9. Слитый белок по п. 8, отличающийся тем, что:

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность,

указанную в SEQ ID NO:6;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9.

10. Слитый белок по п. 8, отличающийся тем, что:

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, с С-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, с С-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, с С-концевым лизином или без него; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, с С-концевым лизином или без него.

11. Слитый белок по п. 6, отличающийся тем, что содержит последовательности первого полипептида и второго полипептида TNT148, TNT152, TNT157, TNT158, TNT147, TNT159, TNT160 или TNT161 в соответствии с Таблицей 2.

12. Слитый белок по п. 6, отличающийся тем, что Fc-домен первого полипептида содержит мутацию по типу впадины, а Fc-домен второго полипептида содержит мутацию по типу выступа.

13. Слитый белок по п. 6, отличающийся тем, что первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16; а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 15.

14. Слитый белок по п. 13, отличающийся тем, что:

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность,

указанную в SEQ ID NO:12;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15.

15. Слитый белок по п. 13, отличающийся тем, что:

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12, с С-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12, с С-концевым лизином или без него;

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, с С-концевым лизином или без него; или

первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, с С-концевым лизином или без него, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, с С-концевым лизином или без него.

16. Слитый белок по п. 1 или п. 6, отличающийся тем, что SAP человека представляет собой SAP дикого типа, необязательно содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17.

17. Слитый белок по п. 1 или п. 6, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO:17.

18. Слитый белок по п. 17, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20.

19. Слитый белок по любому из пп. 6 или 16-18, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положениях C226 и/или C229 в соответствии с нумерацией EU.

20. Слитый белок по п. 19, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотную замену в положениях C226 и C229 в соответствии с нумерацией EU.

21. Слитый белок по любому из пп. 1, 2, 6 или 16-20, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат аминокислотные замены C226S и/или C229S в соответствии с нумерацией EU.

22. Слитый белок по п. 21, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 содержат

аминокислотные замены C226S и C229S в соответствии с нумерацией EU.

23. Слитый белок по любому из пп. 1, 2, 6 или 15-17, отличающийся тем, что Fc1 и/или Fc2 содержат аминокислотную замену в аминокислотном положении 11 и/или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

24. Слитый белок по п. 23, отличающийся тем, что Fc1 и/или Fc2 содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 и/или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

25. Слитый белок по п. 23 или 24, отличающийся тем, что Fc1 и/или Fc2 содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

26. Слитый белок по п. 1, 2, 6 или 16-18, отличающийся тем, что первый и/или второй Fc-домены содержат мутацию, которая снижает связывание FcRn.

27. Слитый белок, содержащий структуру, представленную следующей формулой, от N-конца к C-концу, Fc1-L1-Fc2, где Fc1 представляет собой последовательность первого Fc-домена, содержащую шарнир-CH2-CH3, L1 представляет собой линкер, а Fc2 представляет собой последовательность второго Fc-домена, содержащую шарнир-CH2-CH3, при этом Fc1 и Fc2 содержат аминокислотные замены C226S и/или C229S в соответствии с нумерацией EU, и/или при этом Fc1 и Fc2 содержат остаток серина в аминокислотном положении 11 и/или 14, пронумерованном в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

28. Слитый белок по п. 27, отличающийся тем, что дополнительно содержит белок-компонент амилоида Р сыворотки (SAP) человека на N-конце слитого белка.

29. Слитый белок по п. 28, отличающийся тем, что SAP человека представляет собой SAP дикого типа, необязательно содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17.

30. Слитый белок по п. 28, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную замену в положении N32 или N110 в соответствии с SEQ ID NO:17.

31. Слитый белок по п. 30, отличающийся тем, что SAP человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20.

32. Слитый белок по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что образует пентамер или декамер.

33. Слитый белок по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 представляют собой Fc-домены человека.

34. Слитый белок по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что Fc1 и Fc2 представляют собой Fc-домены IgG1 человека.

35. Слитый белок по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что характеризуется пониженной агрегацией по сравнению со слитым белком, в котором отсутствует одна или большее количество аминокислотных замен.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп. 1-35 и фармацевтически приемлемый носитель.

37. Фармацевтическая композиция по п. 36, отличающаяся тем, что по меньшей

мере 50% слитого белка находится в форме пентамера и/или декамера.

38. Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок по любому из пп. 1-35.

39. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 38.

40. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 38 или вектор по п. 39.

41. Клетка-хозяин по п. 40, отличающаяся тем, что представляет собой клетку СНО или клетку 293.

42. Способ продуцирования слитого белка по любому из пп. 1-35, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, в условиях, обеспечивающих экспрессию слитого белка.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку СНО или клетку 293.

44. Способ по п. 42 или п. 43, отличающийся тем, что клетка-хозяин не гликозилирует белок-компонент SAP.

45. Способ лечения амилоидного заболевания у индивидуума, включающий введение индивидууму слитого белка по любому из пп. 1-35.

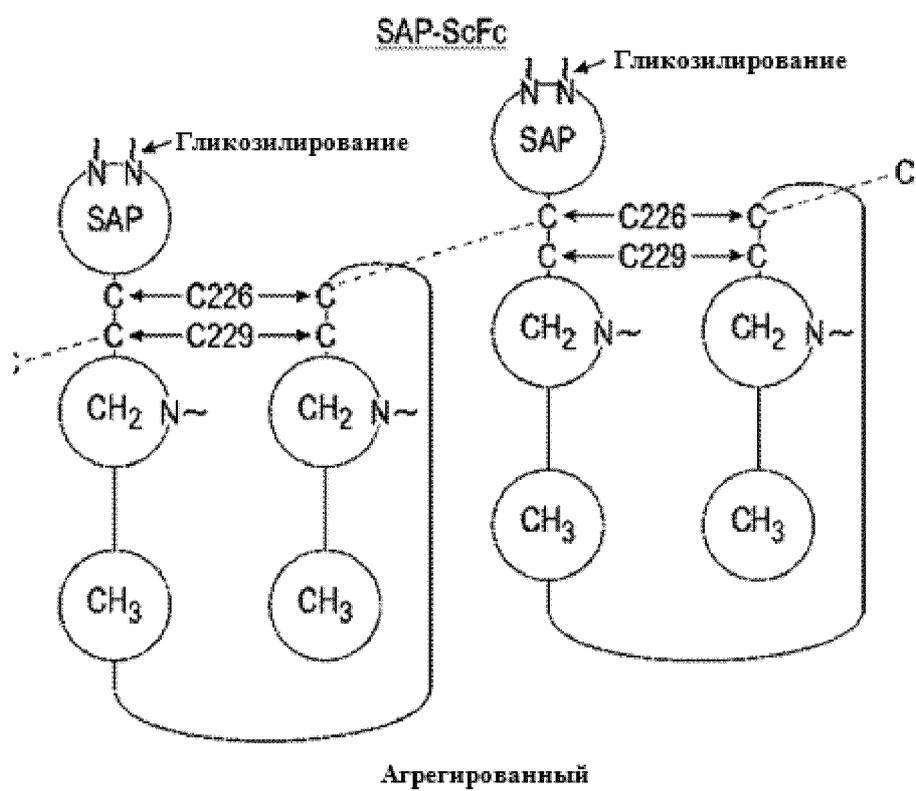
46. Способ лечения амилоидного заболевания у индивидуума, включающий введение индивидууму слитого белка, полученного способом по любому из пп. 42-44.

47. Способ по п. 45 или п. 46, отличающийся тем, что амилоидное заболевание выбирают из группы, состоящей из АА-амилоидоза, АL-амилоидоза, АН-амилоидоза, Аβ-амилоидоза, АТТR-амилоидоза, ALect2-амилоидоза, IAPP-амилоидоза диабета II типа и болезни Альцгеймера.

48. Слитый белок SAP-Fc, полученный способом по любому из пп. 42-45.

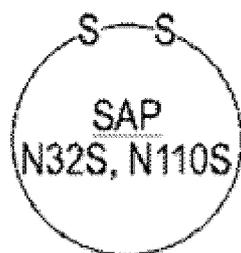
49. Способ по любому из пп. 45-47, отличающийся тем, что индивидуум представляет собой человека.

По доверенности



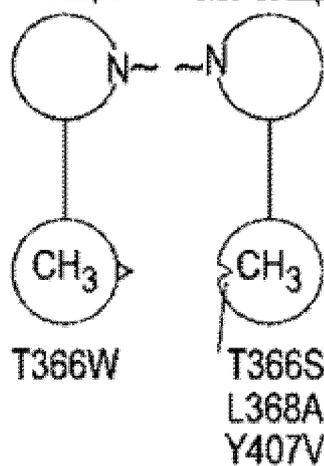
ФИГ. 1

«Дегликозилированный мутант SAP»



Фиг. 2А

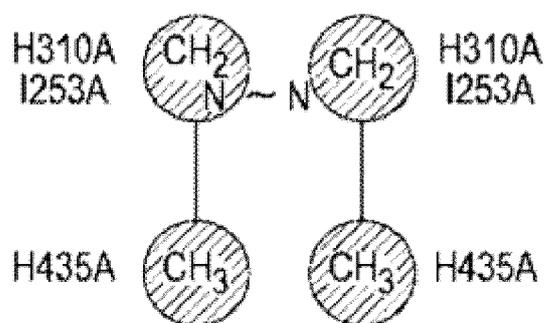
«ВЫСТУП» МУТАЦИЯ «ВПАДИНА» МУТАЦИЯ



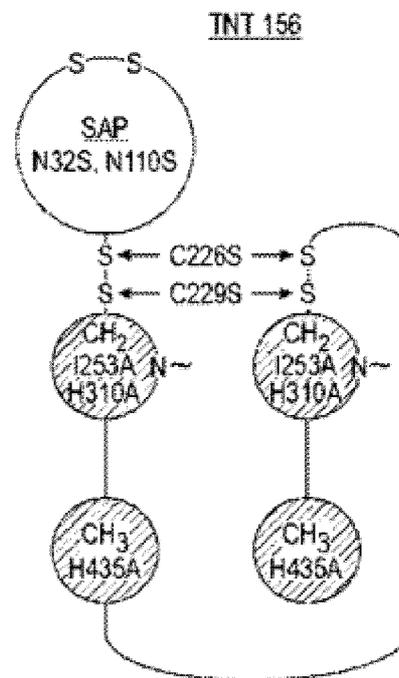
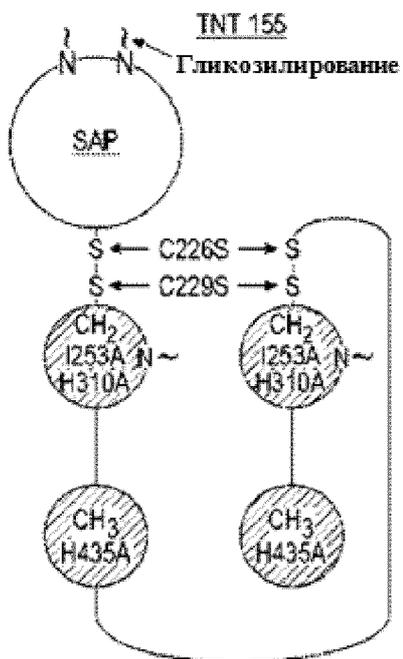
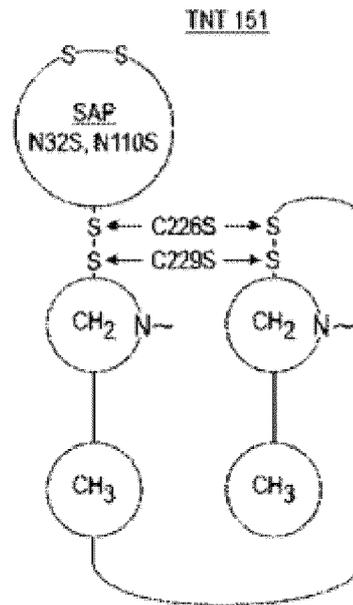
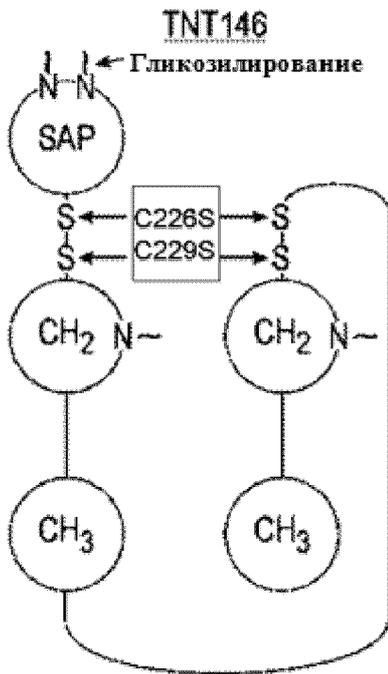
ВЫСТУП/ВПАДИНА/FC

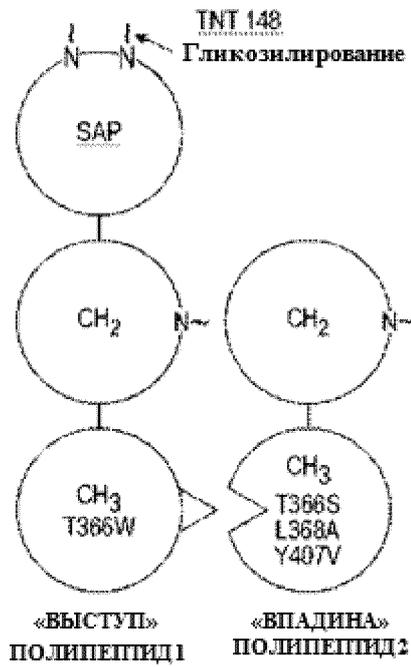
Фиг. 2В

FcRN Мутанты

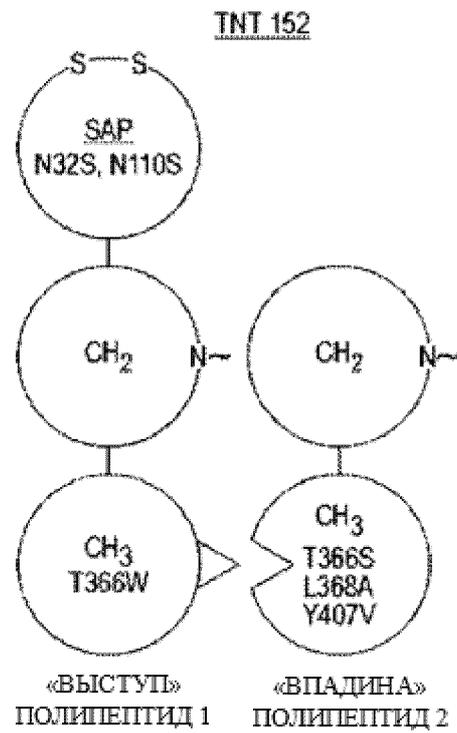


Фиг. 2С

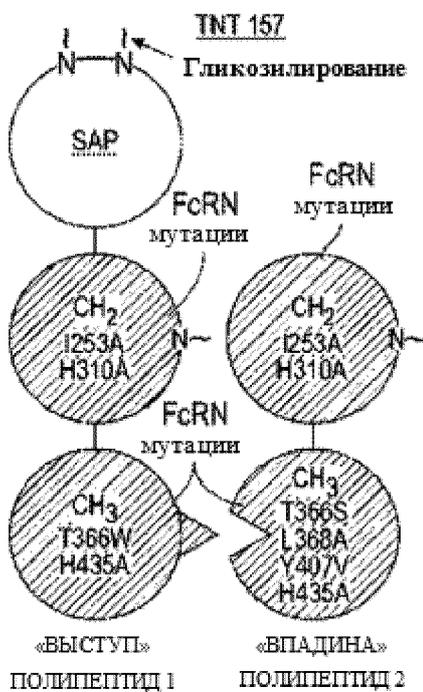




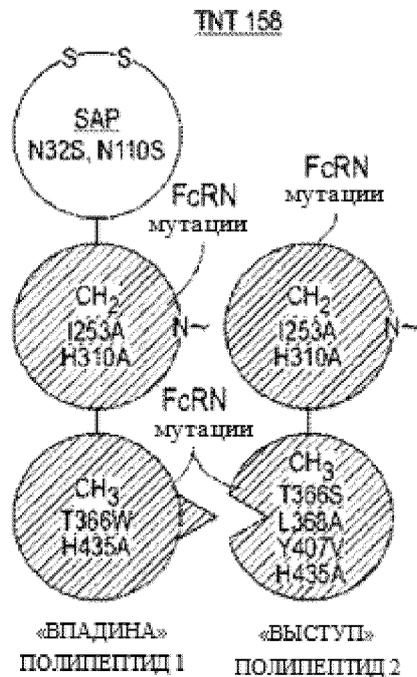
Фиг. 4А



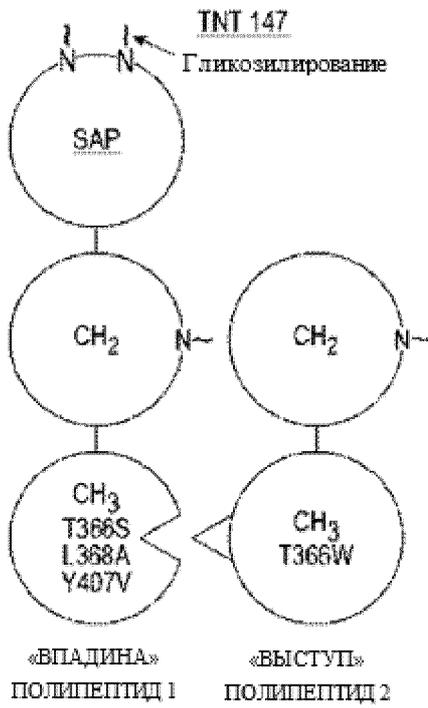
Фиг. 4В



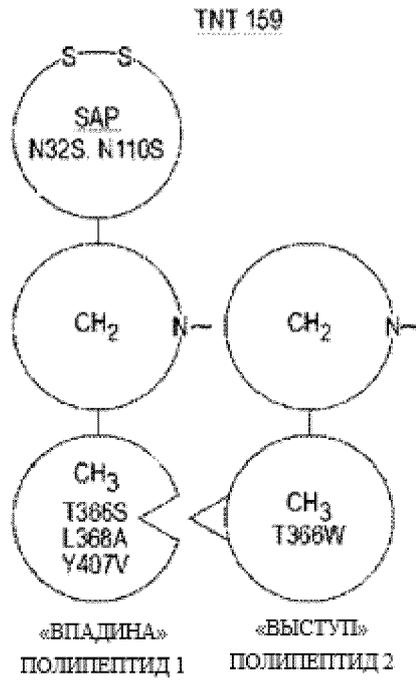
Фиг. 4С



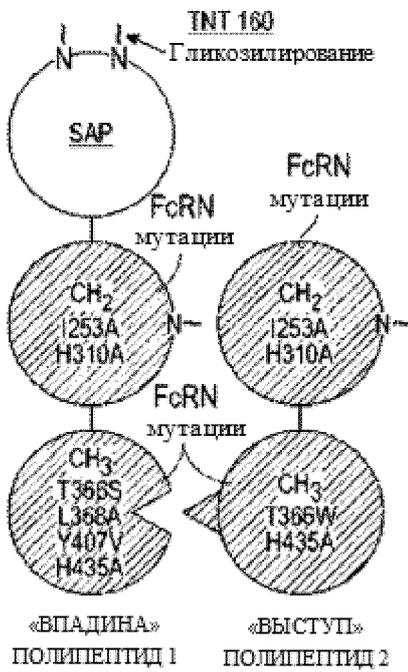
Фиг. 4D



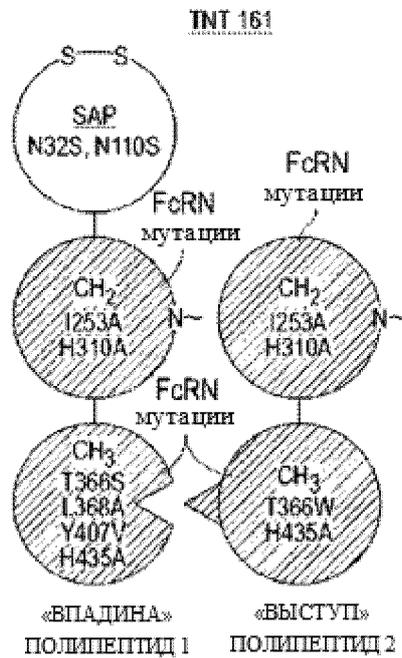
Фиг. 5А



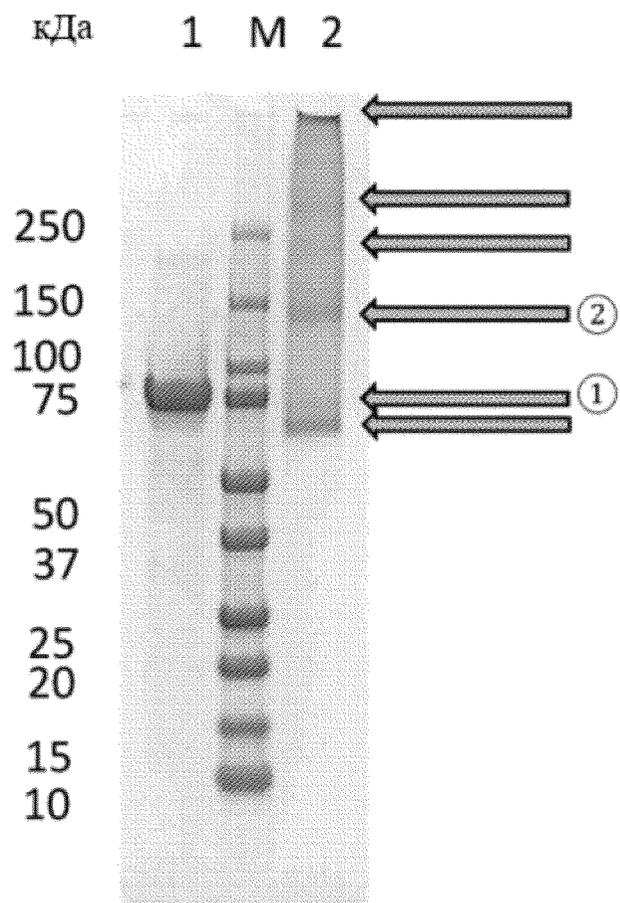
Фиг. 5В



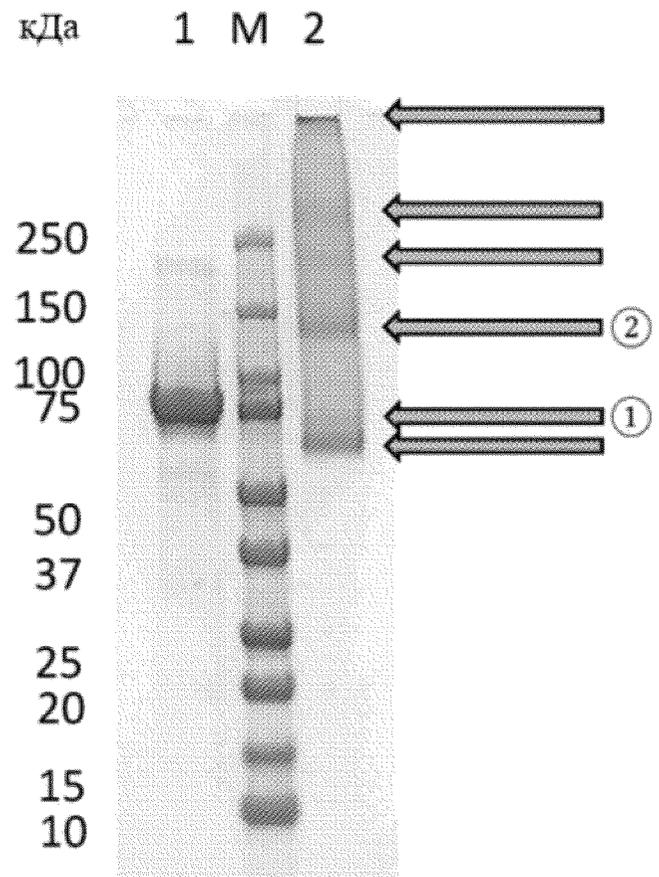
Фиг. 5С



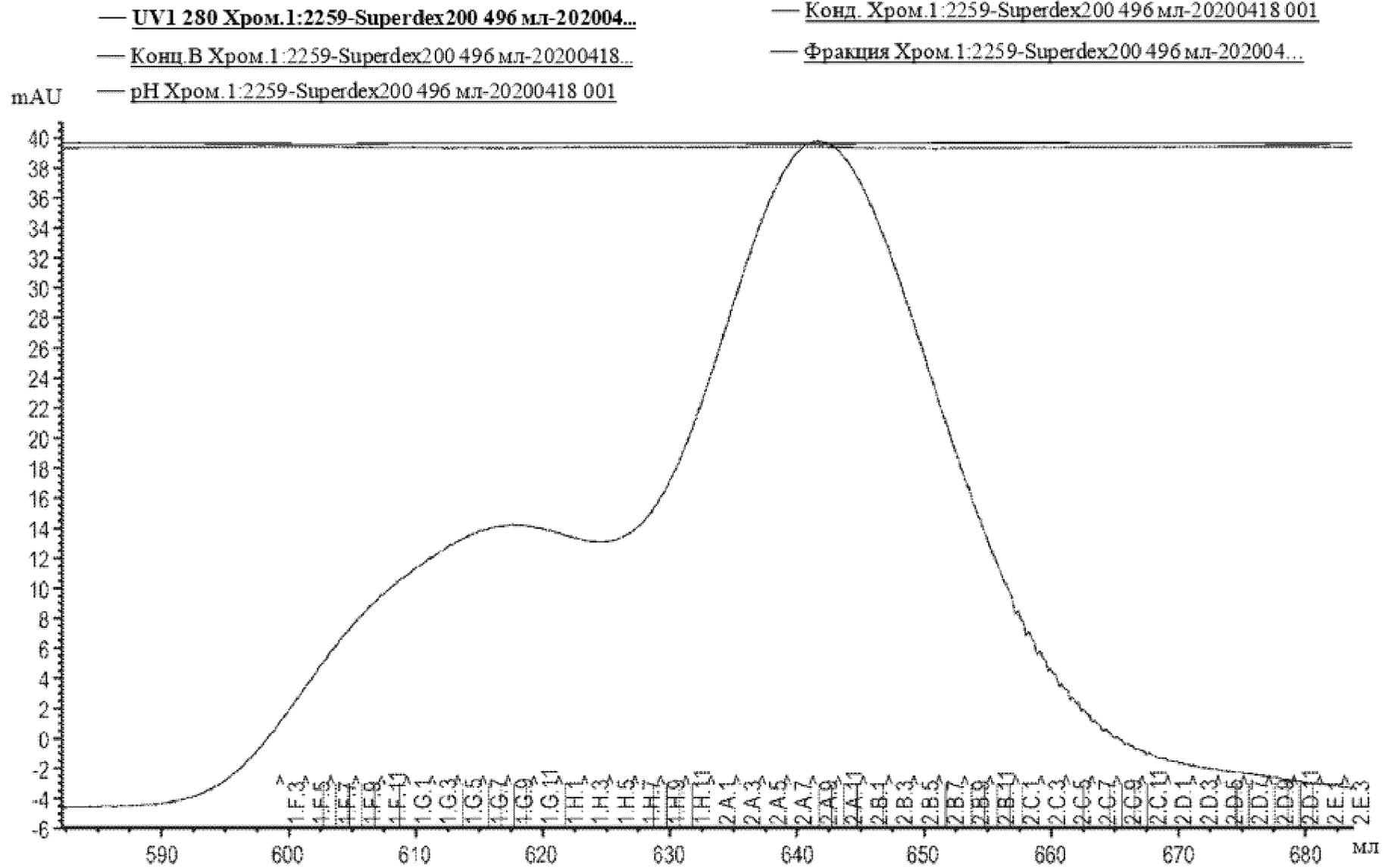
Фиг. 5D



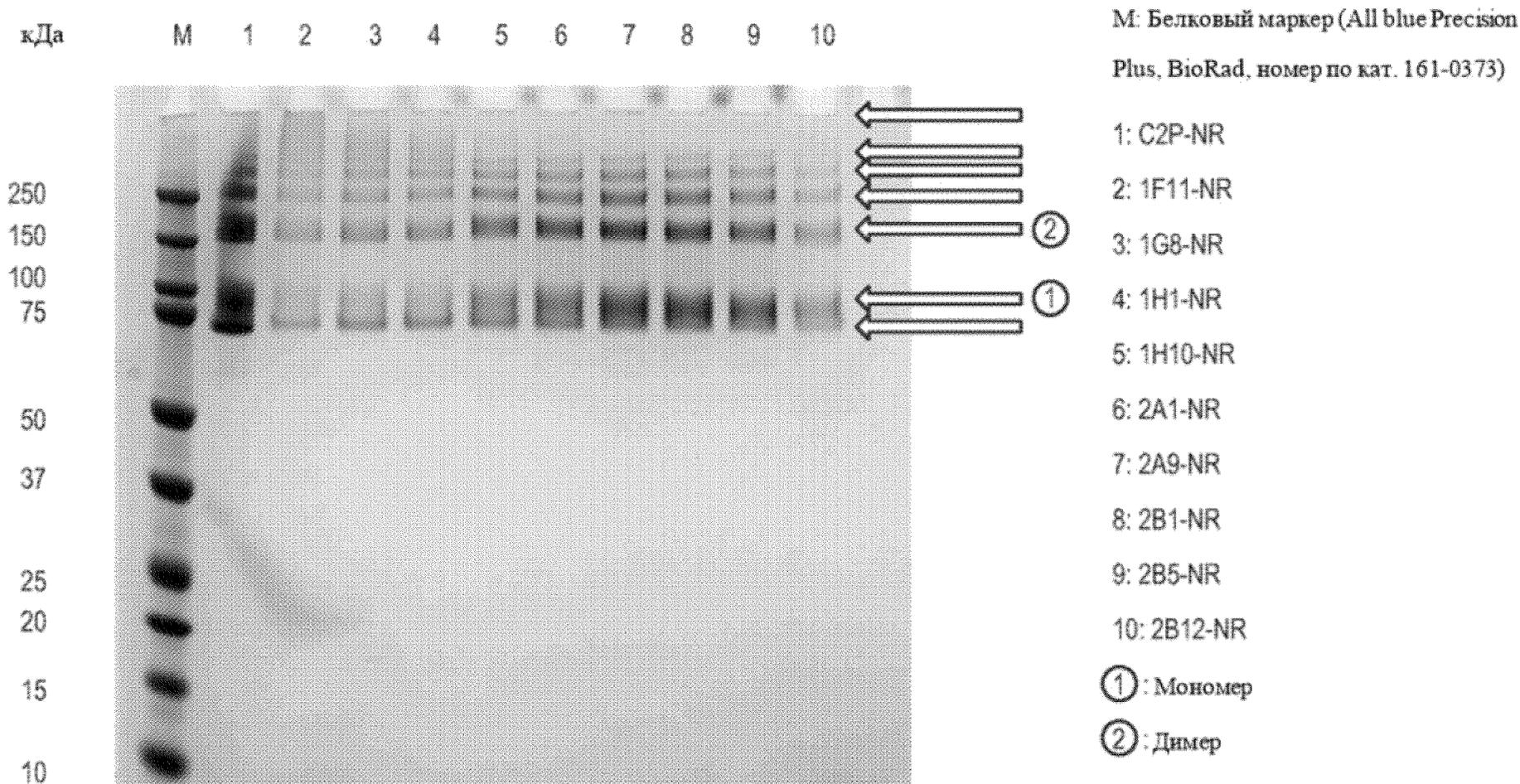
Фиг. 6А



Фиг. 6В

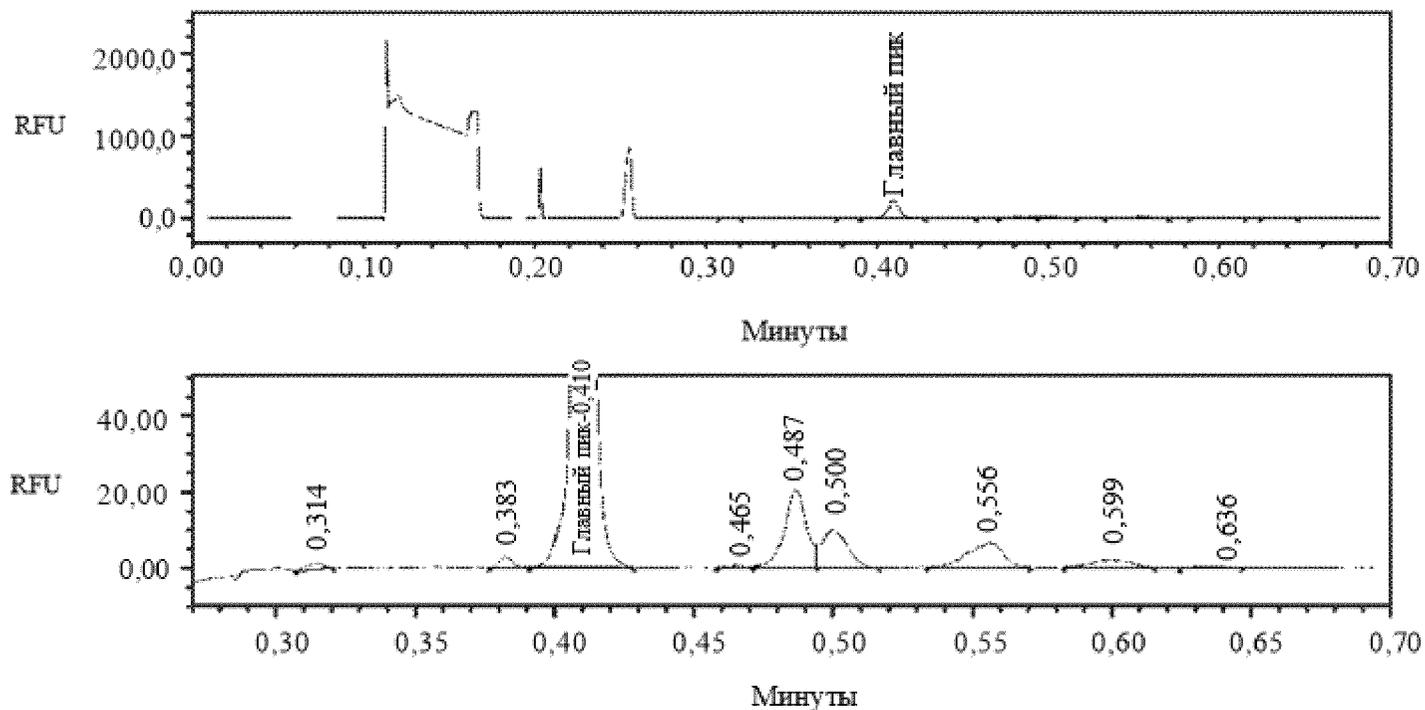


Фиг. 7А



Фиг. 7В

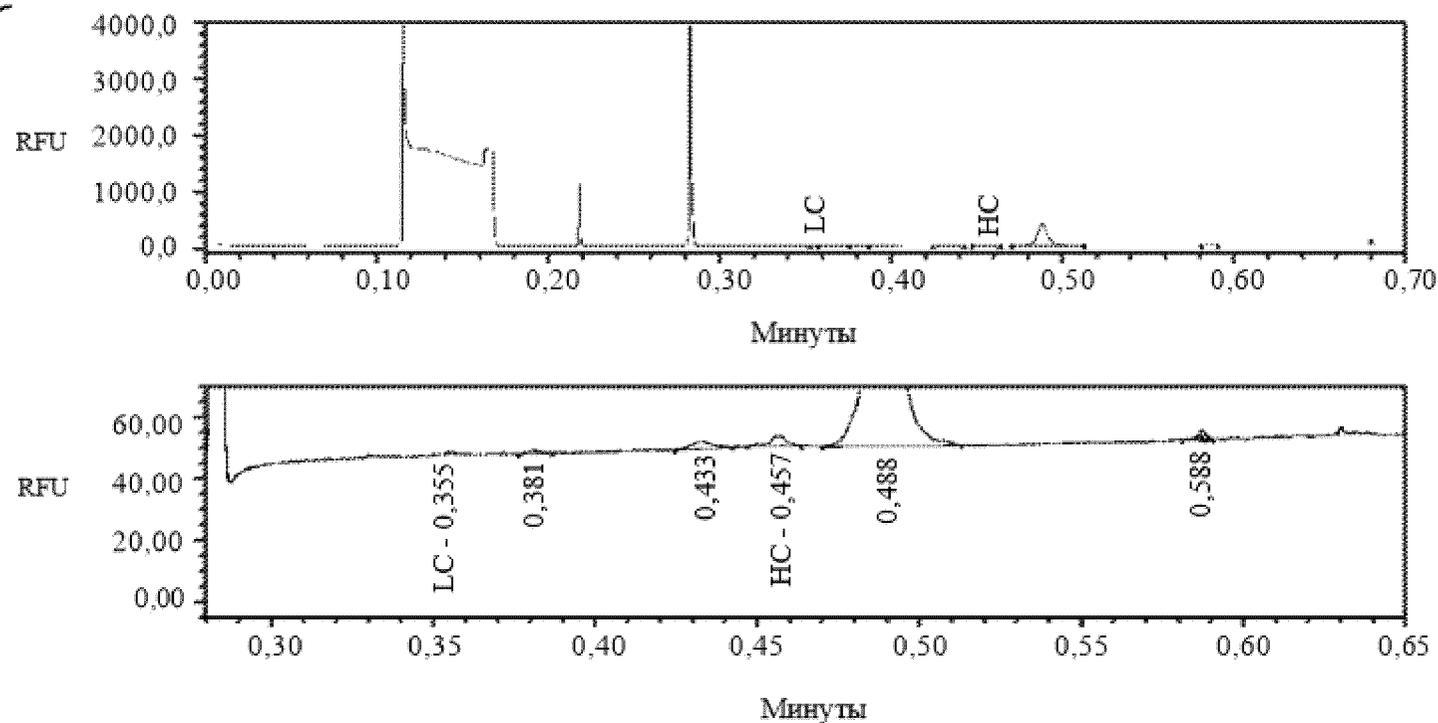
Фиг. 7С



Результаты пика

	Название	МТ	Высота	Время корр. Площадь	% Время корр. Площадь
1		0,314	1860621	2212002,0	0,809
2		0,383	2985630	2624710,8	0,960
3	Главный пик	0,410	200263098	217353827,8	79,499
4		0,465	634929	622674,0	0,228
5		0,487	20360612	23555708,2	8,616
6		0,500	9858857	12692376,0	4,642
7		0,556	6426822	10293618,6	3,765
8		0,599	2176184	3529907,3	1,291
9		0,636	421765	520399,1	0,190
Сумма				273405223,8	

Фиг. 7D

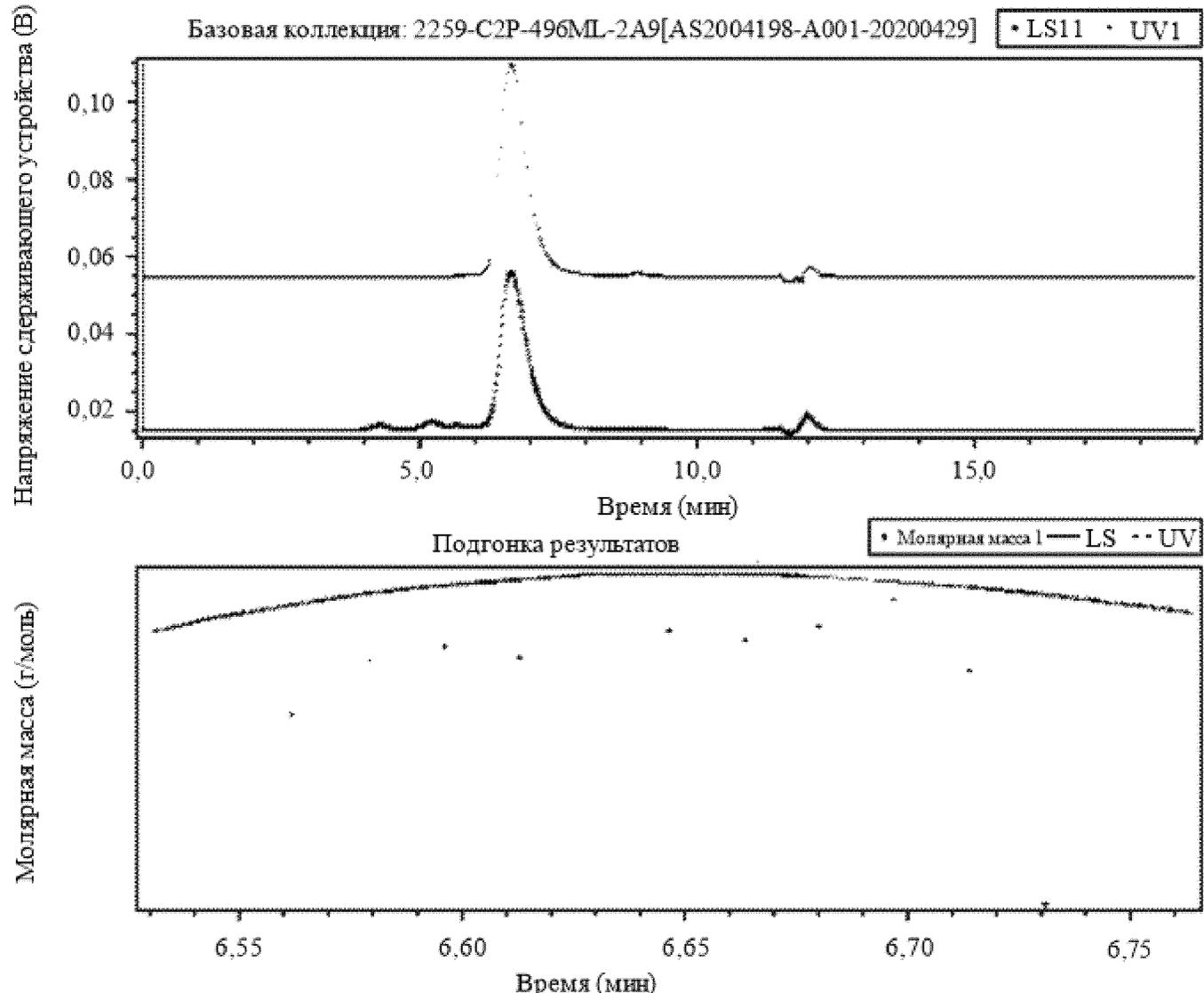


10/31

Результаты пика

	Название	MT	Высота	Время корр. Площадь	% Время корр. Площадь	(LC+HC)%
1	LC	0,36	833640	381648,1	0,115	0,948
2		0,38	1148313	863683,0	0,259	0,948
3		0,43	2494156	2829452,6	0,850	0,948
4	HC	0,46	3397425	2774632,8	0,833	0,948
5		0,49	375622745	325290924,8	97,684	0,948
6		0,59	2844137	862907,6	0,259	0,948
Сумма				333003248,9		

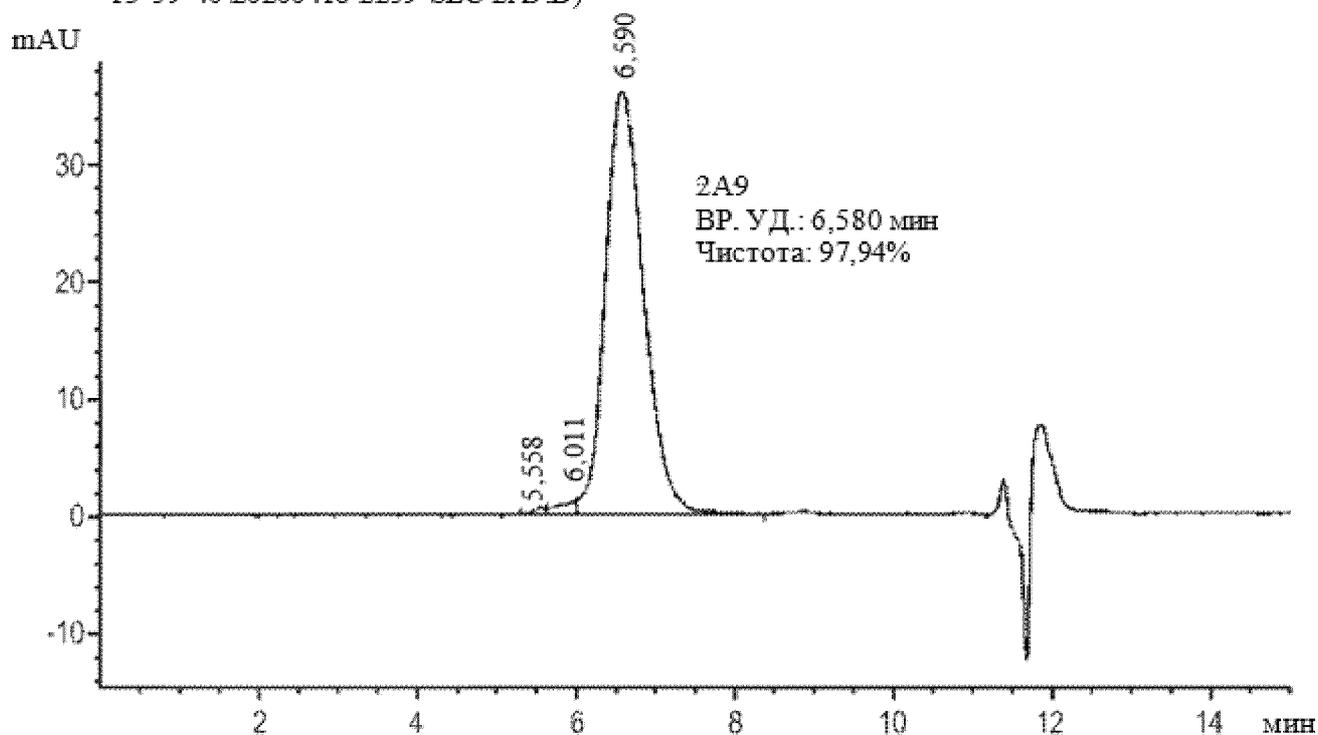
Фиг. 7E



Результаты пика	Пик 1
Моменты молярной массы (г/моль)	$4,246 \times 10^5 (\pm 0,220\%)$
Время удерживания (канал 1) (мин)	6,8

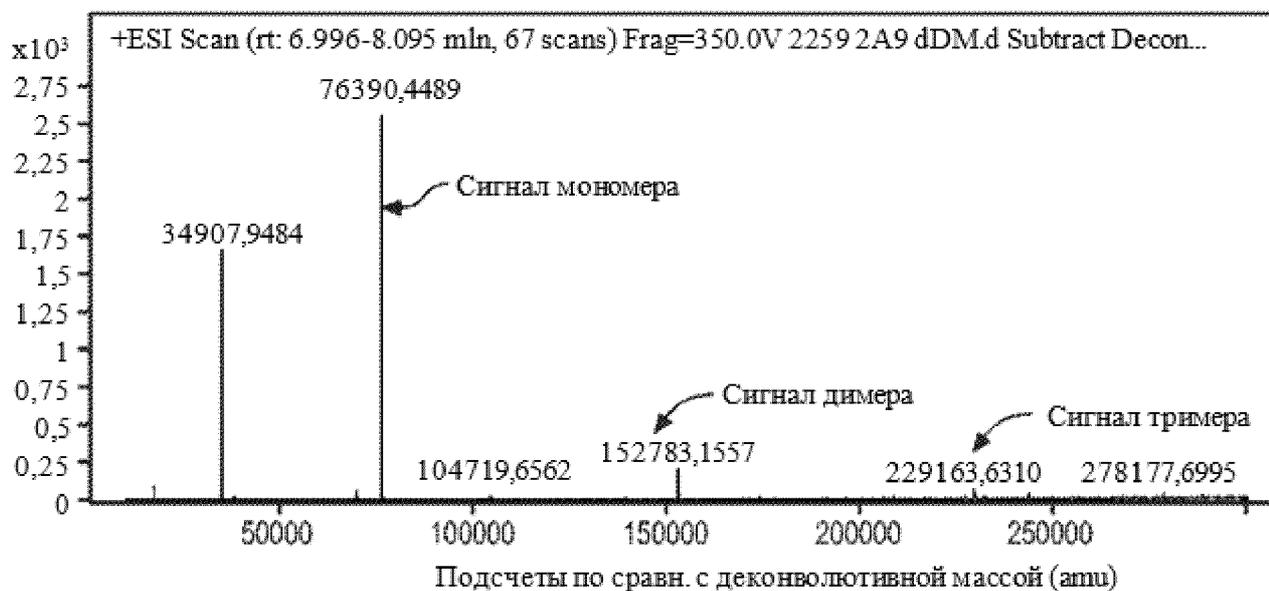
SEC-HPLC результаты

DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off (D:\Data\2020\0417\20200414-2 2020-04-18
13-59-40\20200418-2259-SEC-2A9.D)

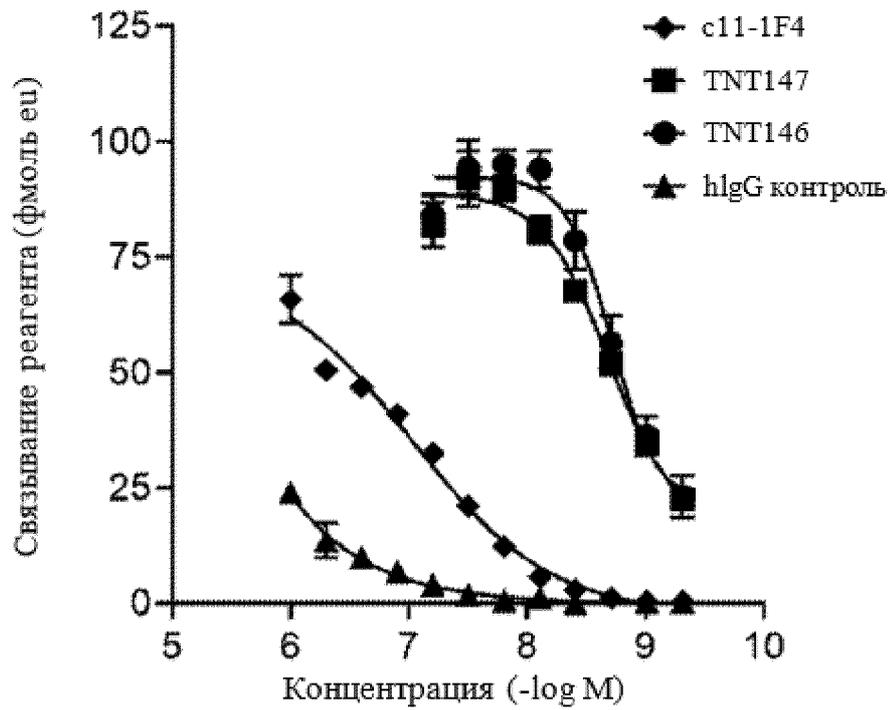


Фиг. 7F

Денатурированная дегликозилированная масса

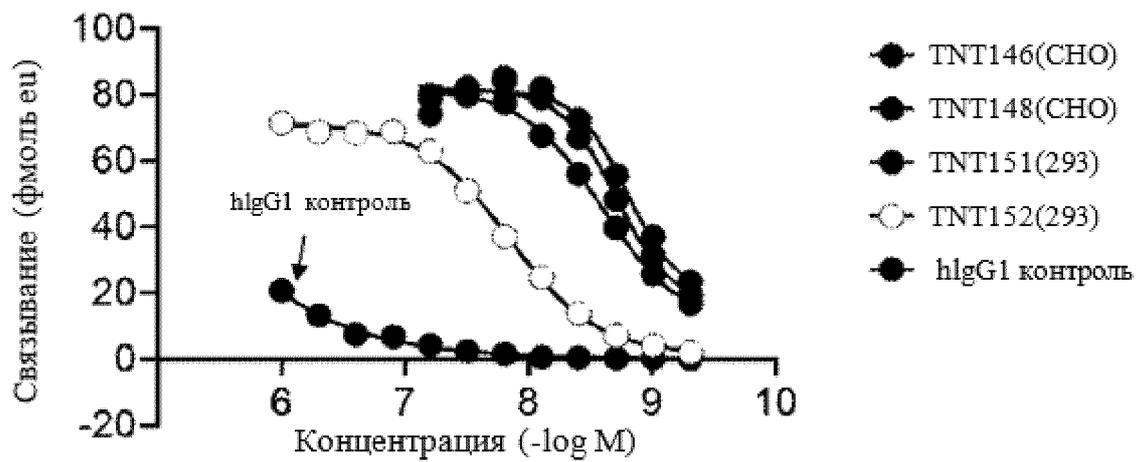


Фиг. 7G

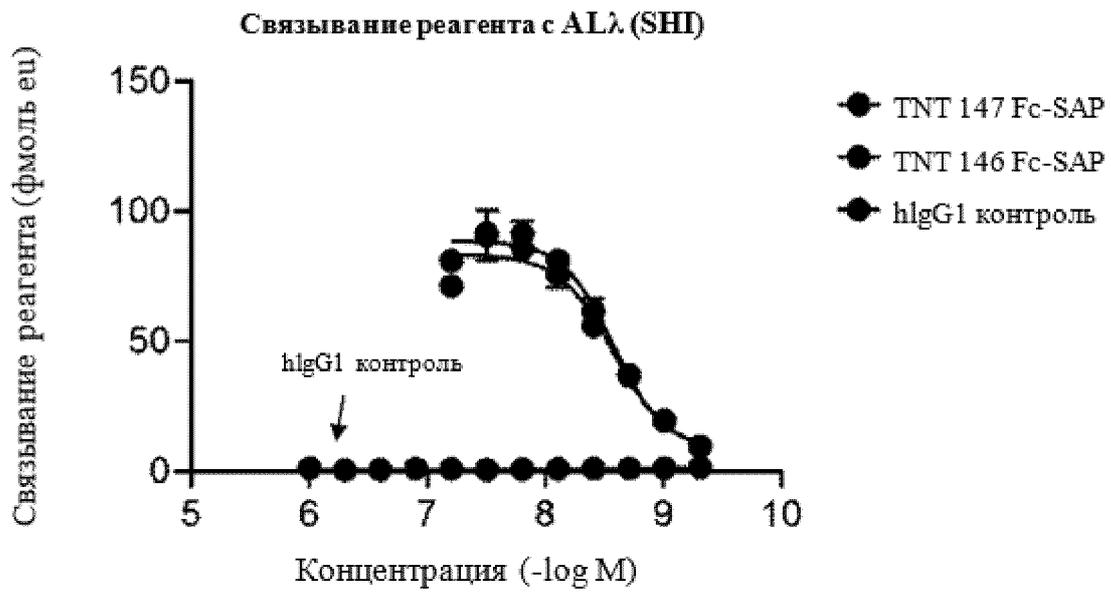


Фиг. 8А

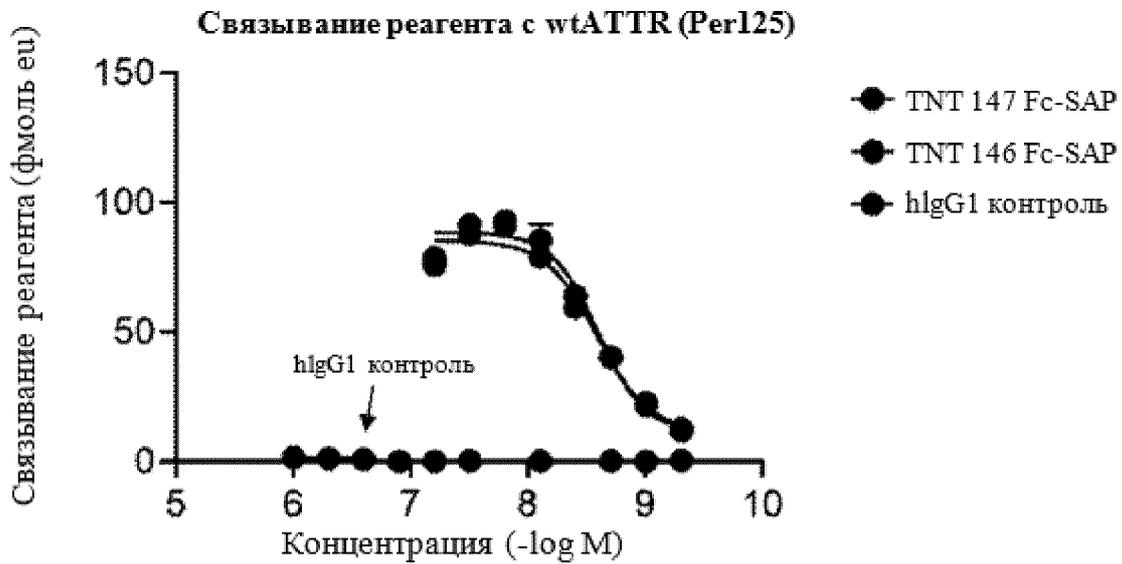
Конструкции Fc-SAP связываются с фибриллами rV λ 6W11



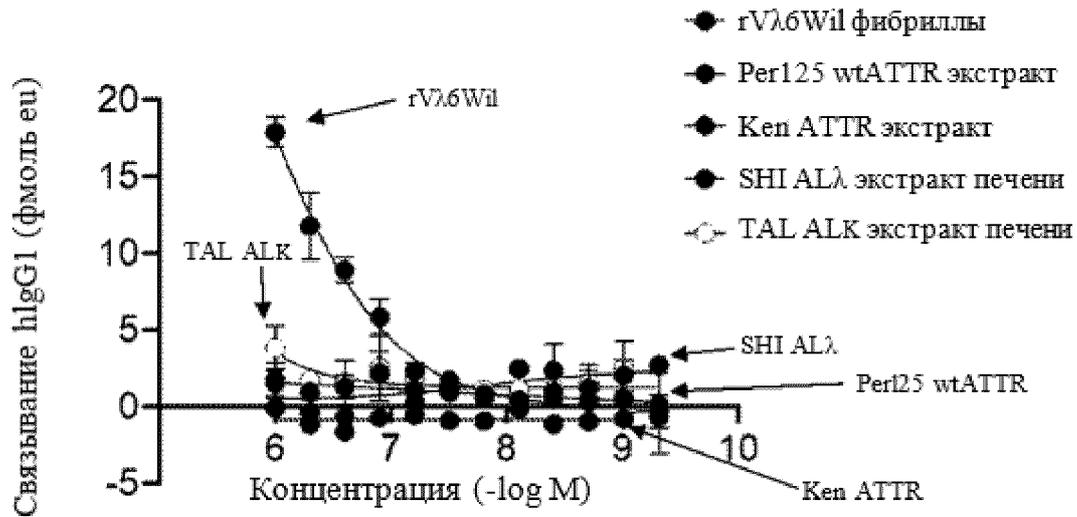
Фиг. 8В



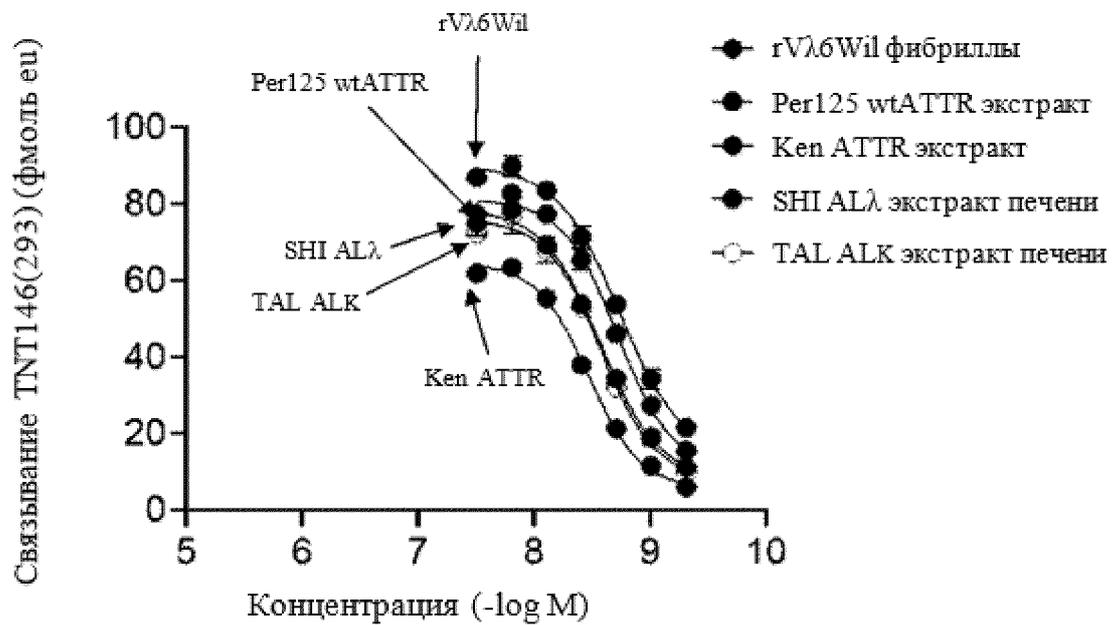
Фиг. 9А



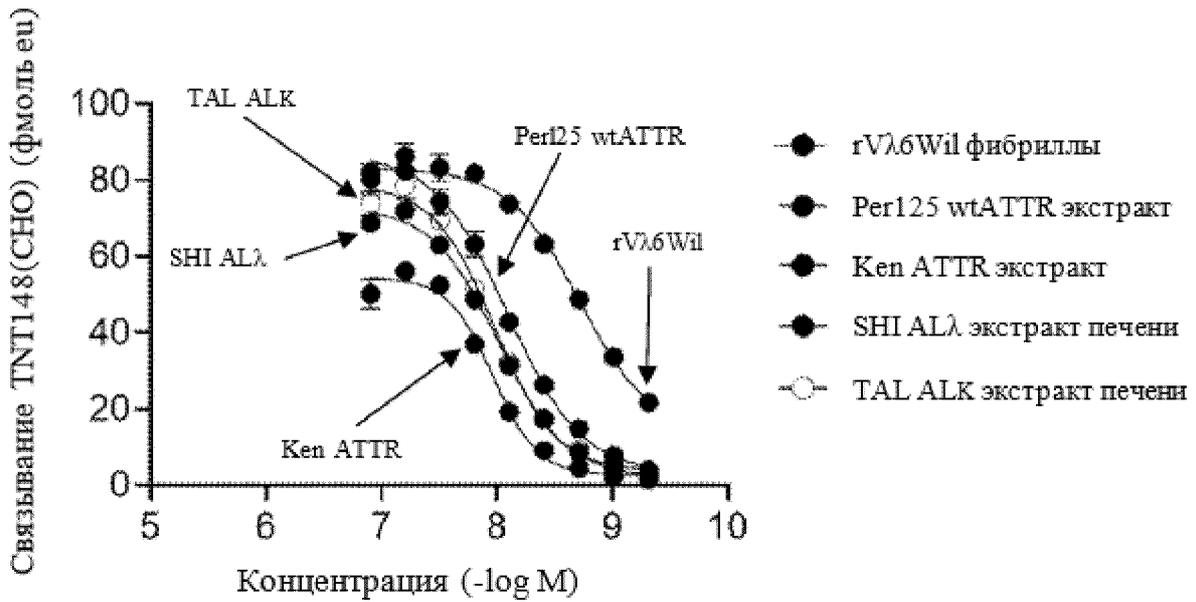
Фиг. 9В



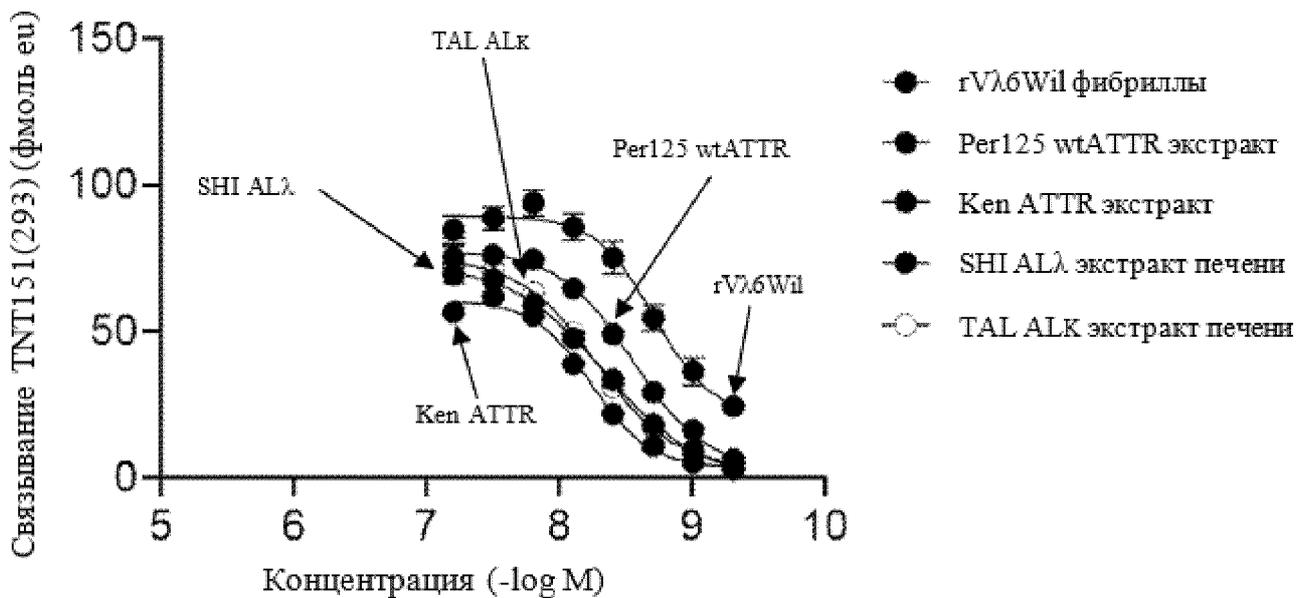
Фиг. 10А



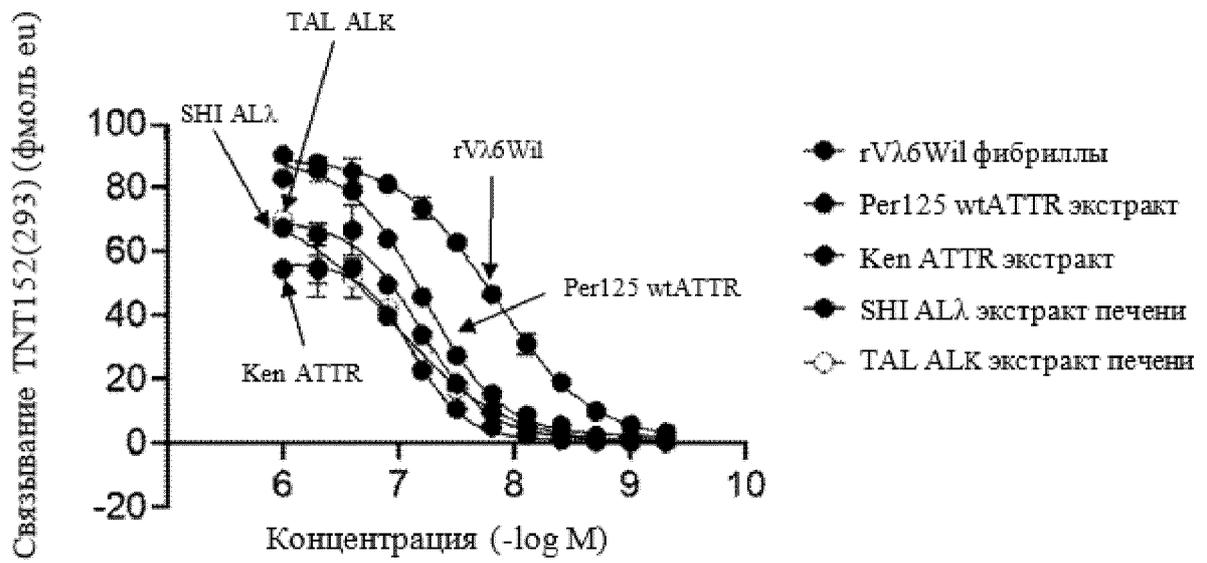
Фиг. 10В



Фиг. 10С



Фиг. 10D

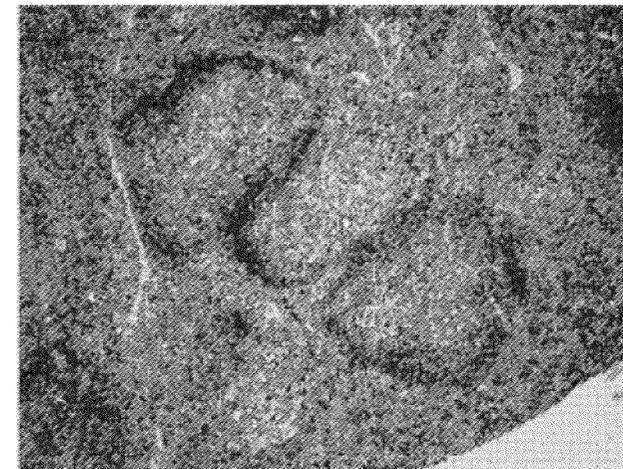
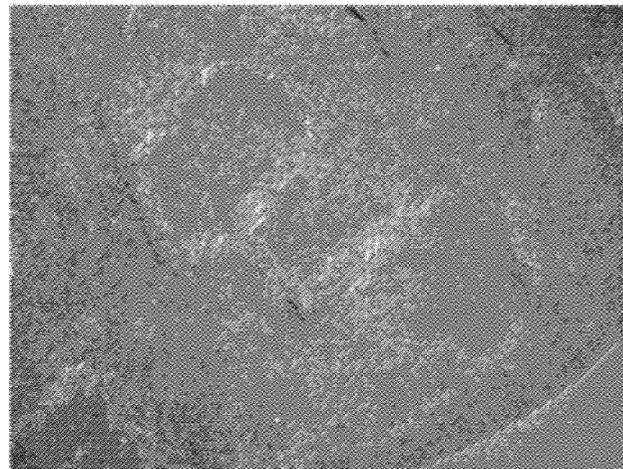


Фиг. 10Е

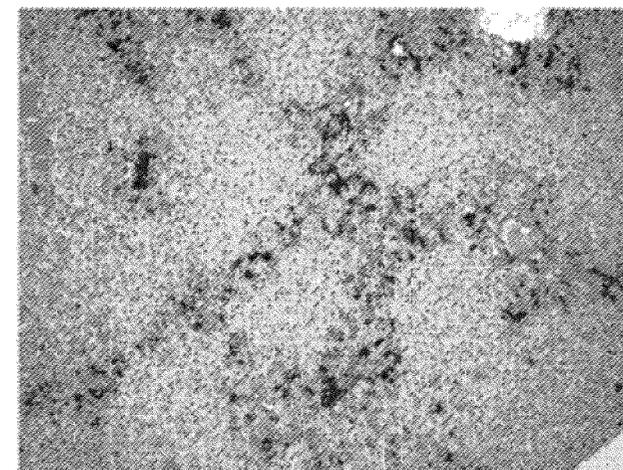
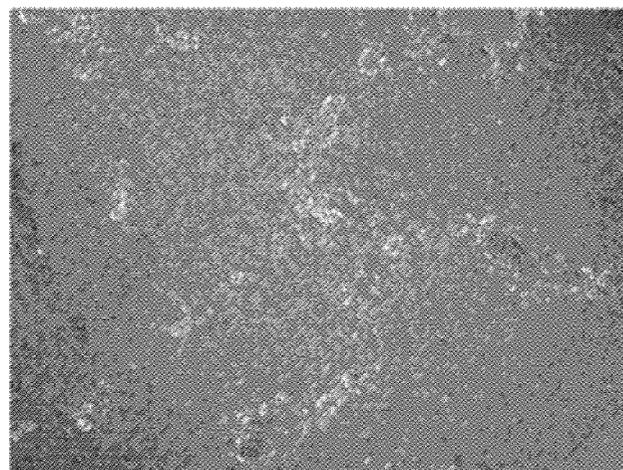
Конго красный

Autorad

Селезенка



Печень

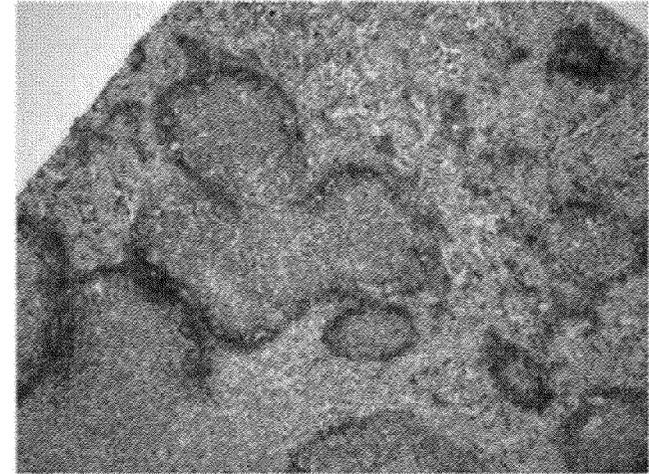
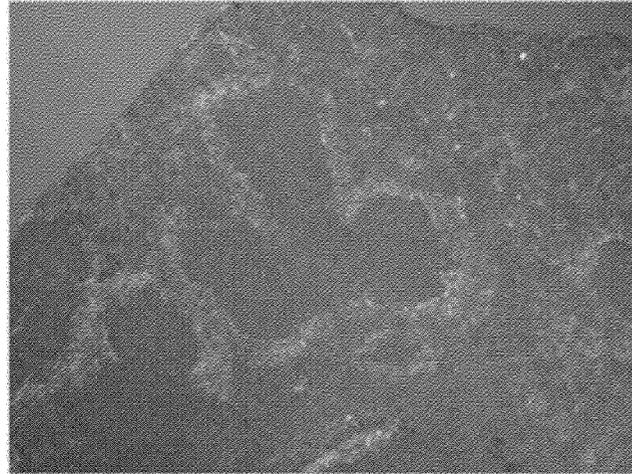


Фиг. 11А

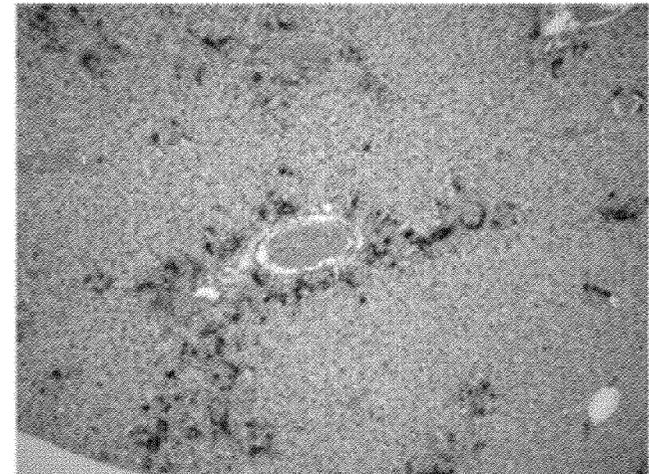
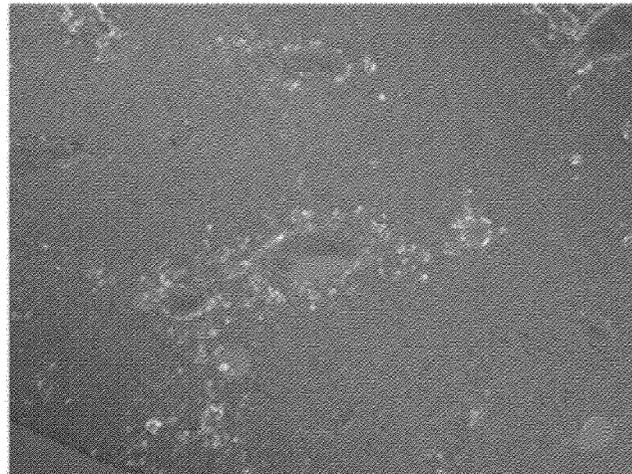
Конго красный

Autorad

Селезенка



Печень



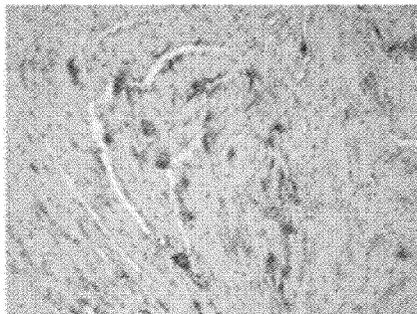
19/31

Фиг. 11В

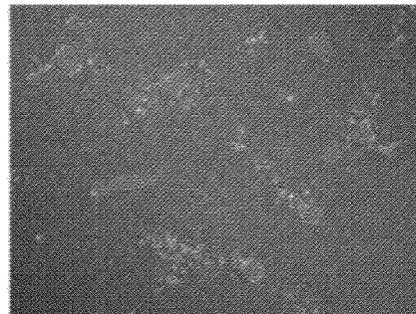
Конго красный
Сердце



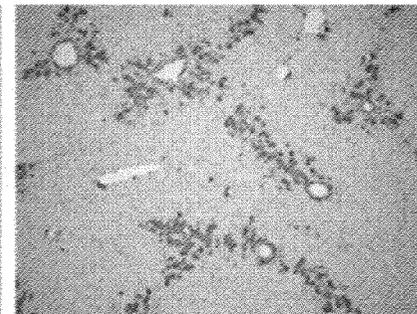
Анти-Fc-SAP



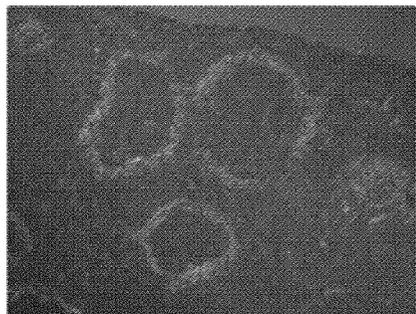
Конго красный
Печень



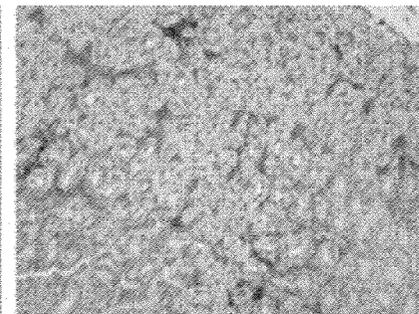
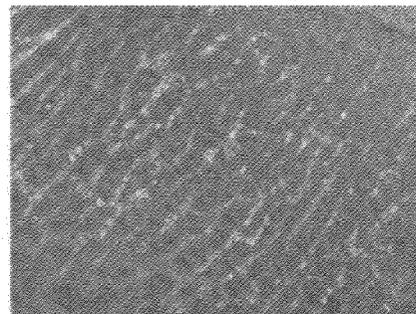
Анти-Fc-SAP



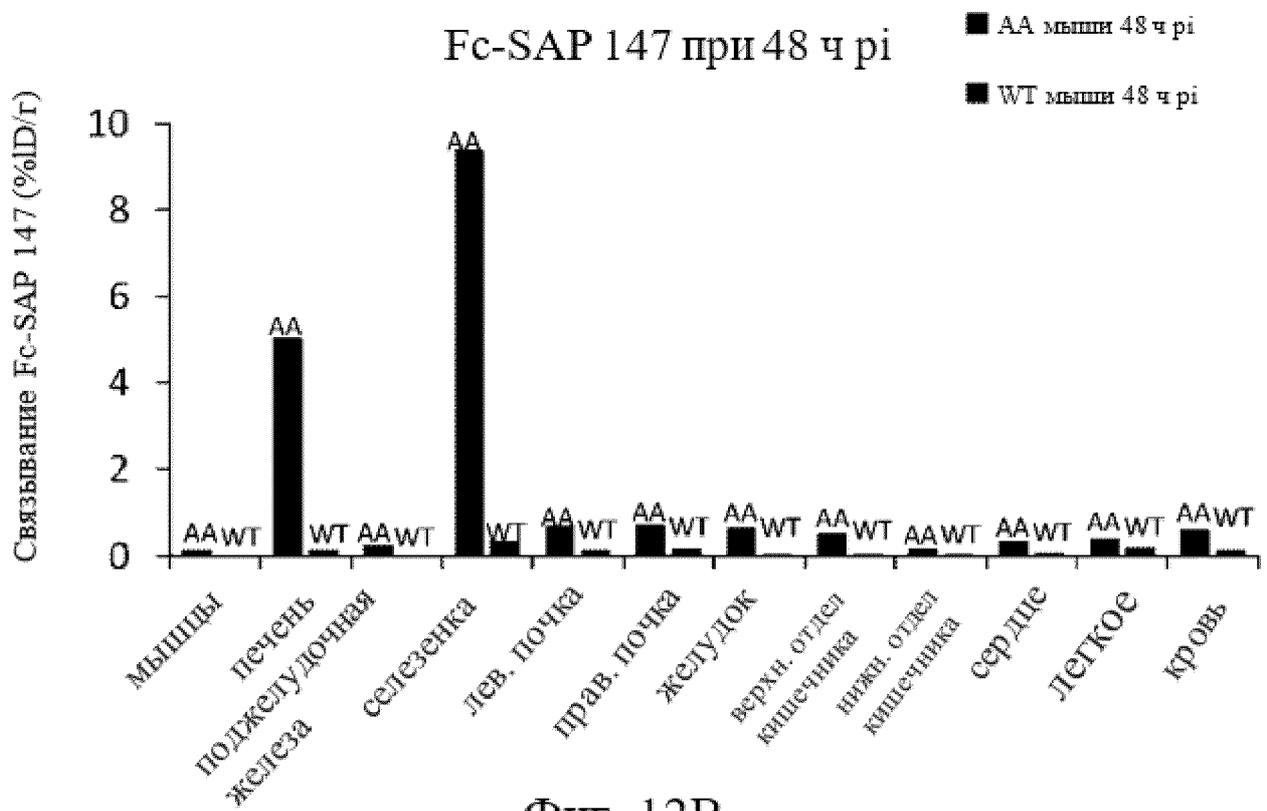
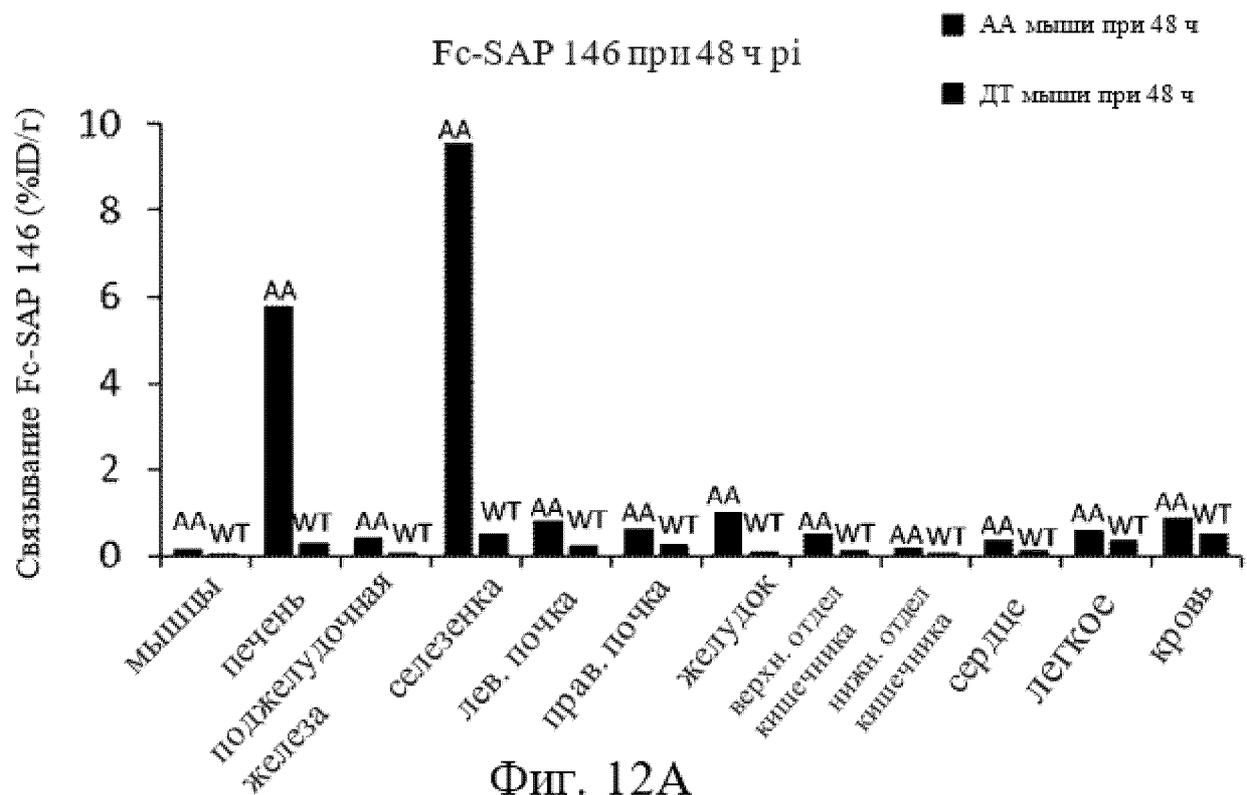
Селезенка



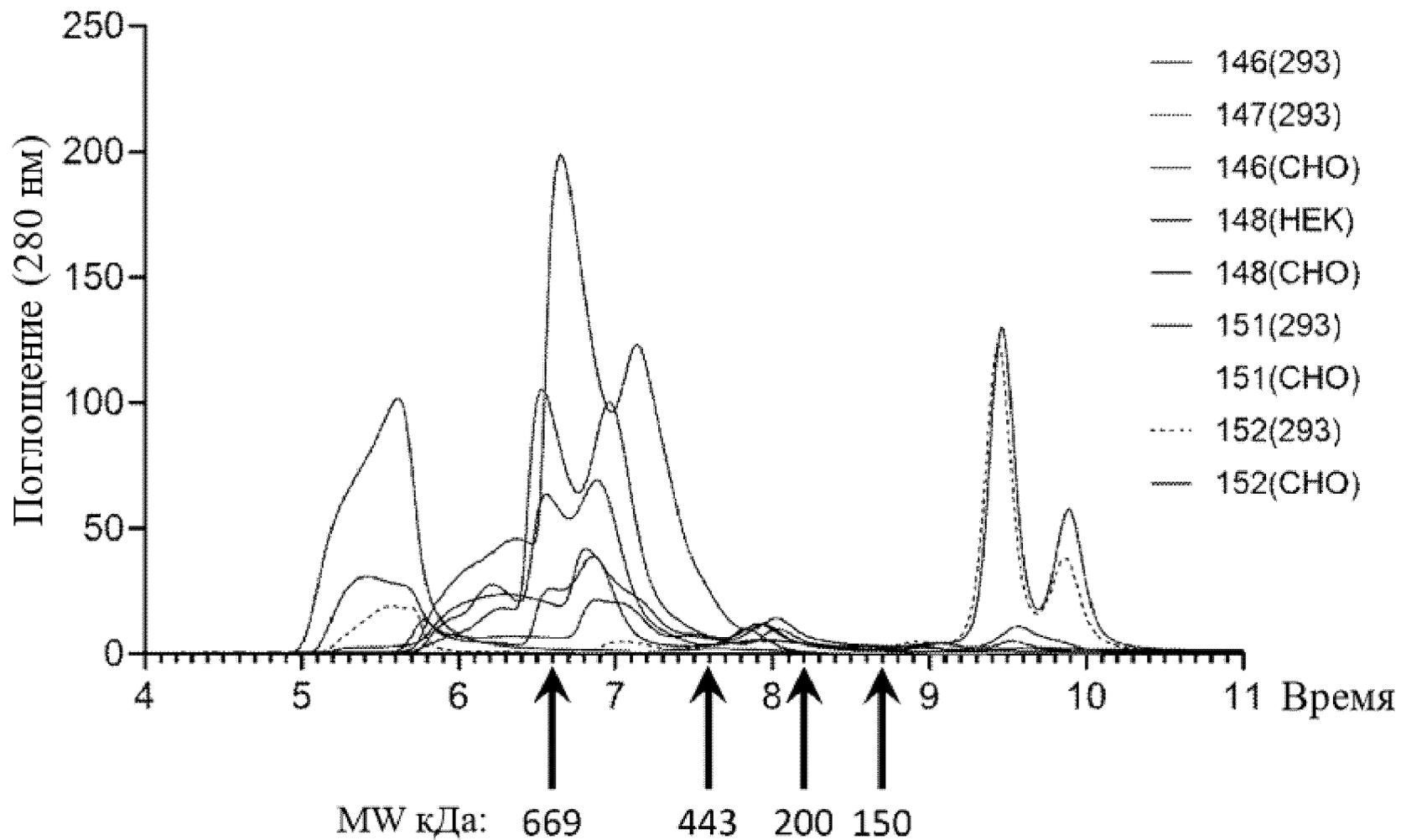
Стенка желудка



Фиг. 11С

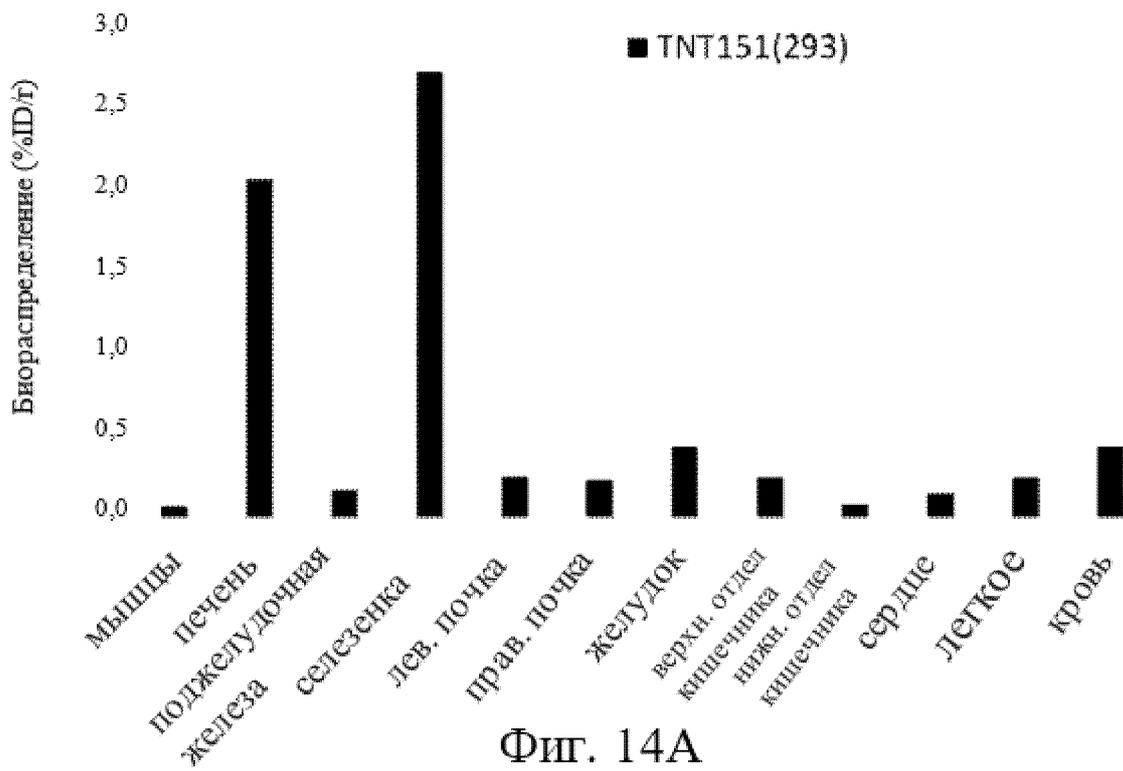


Обобщение Fc-SAP SEC

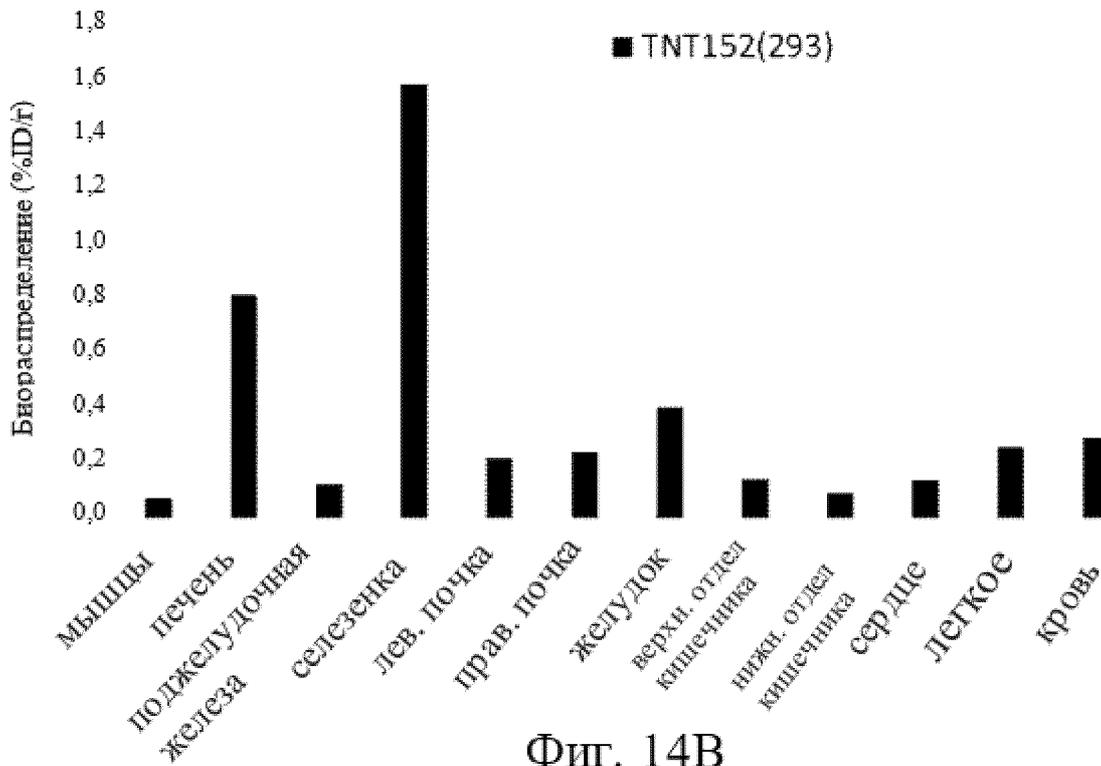


Фиг. 13

23/31

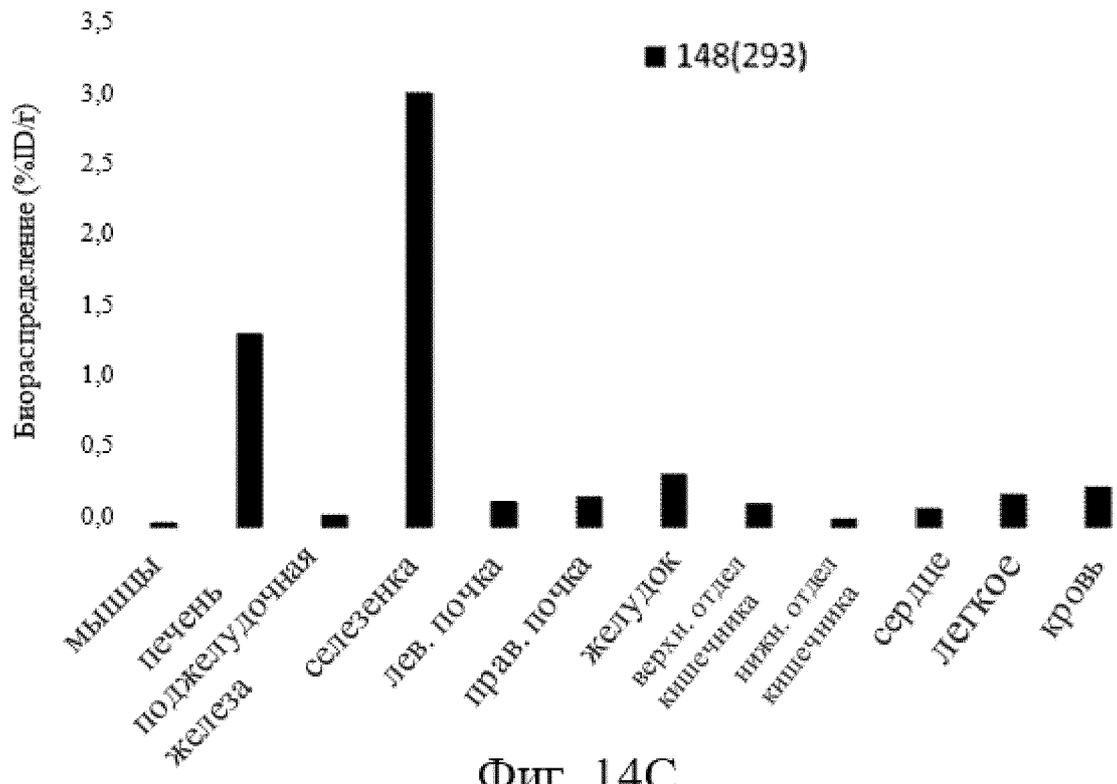


Фиг. 14А

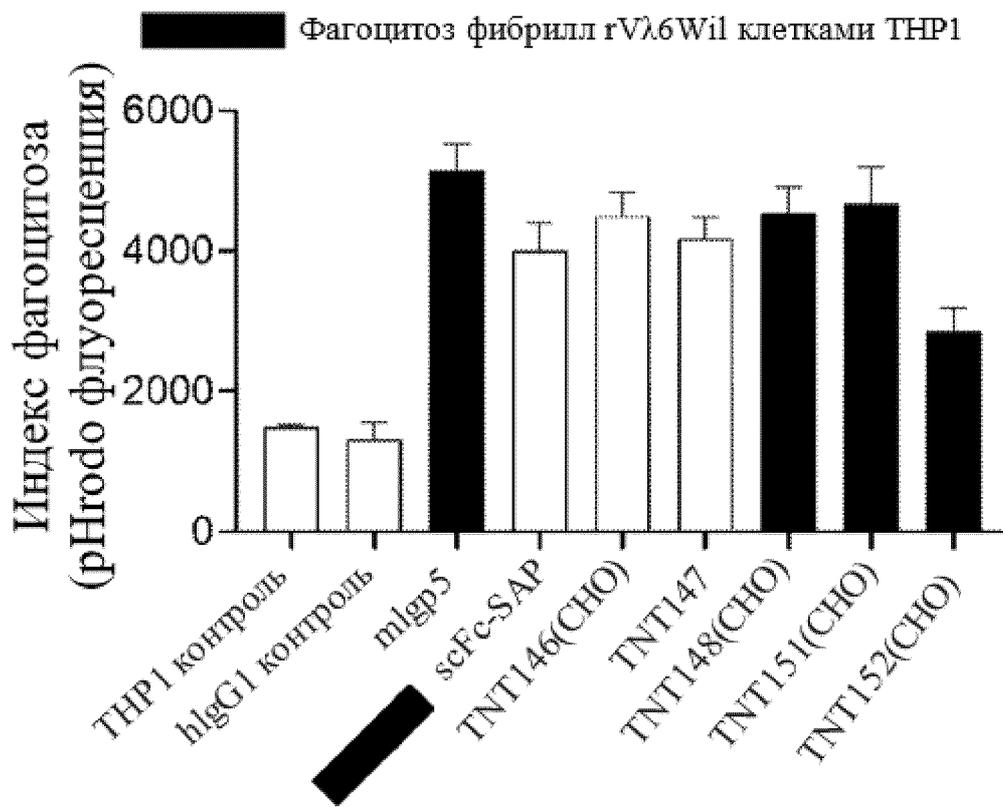


Фиг. 14В

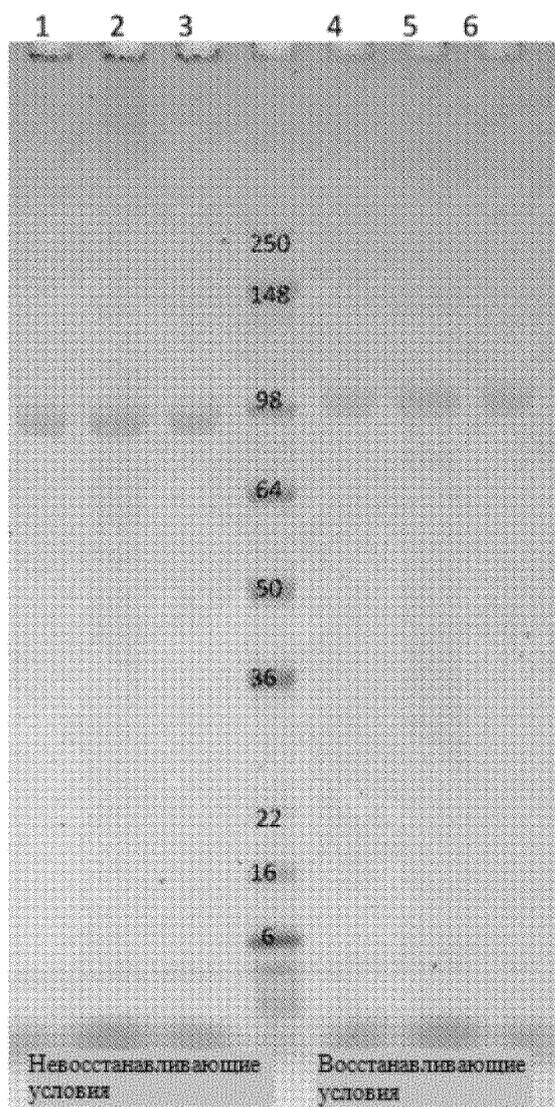
24/31



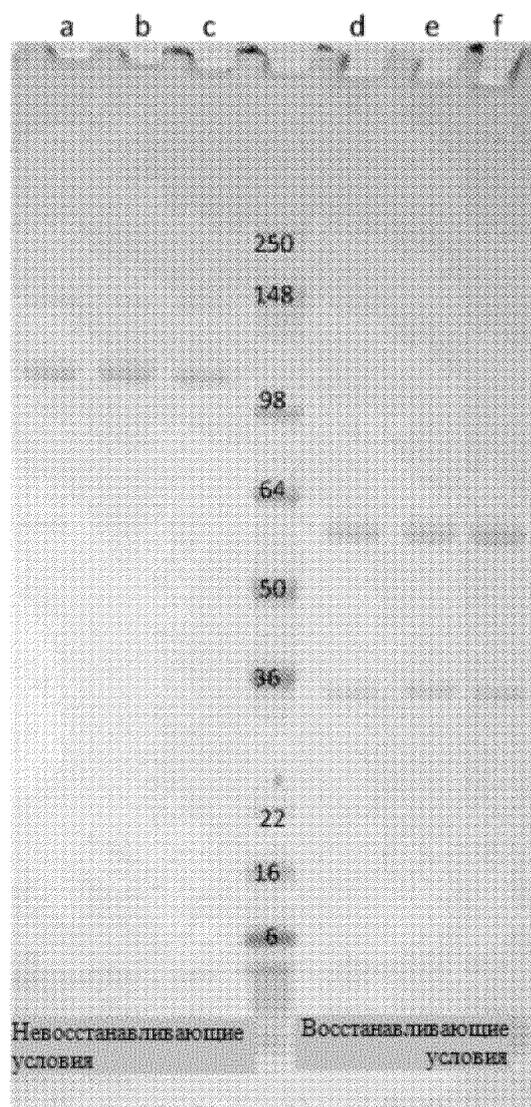
Фиг. 14С



Фиг. 15

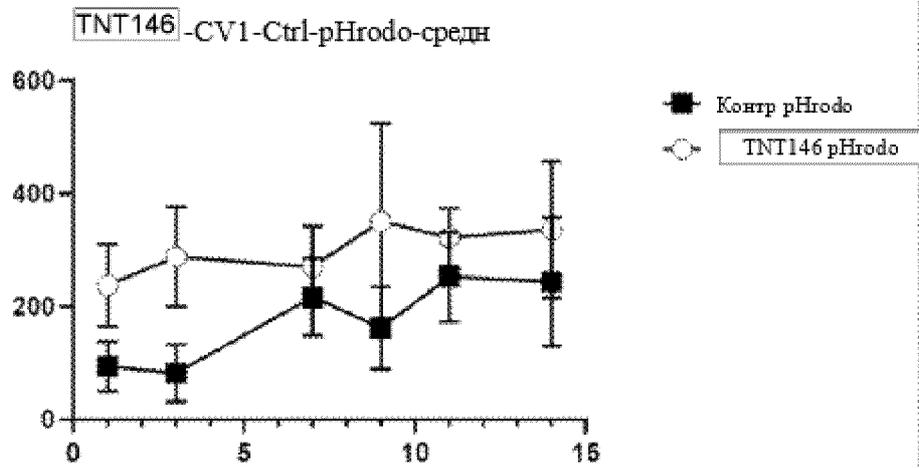


Фиг. 16А

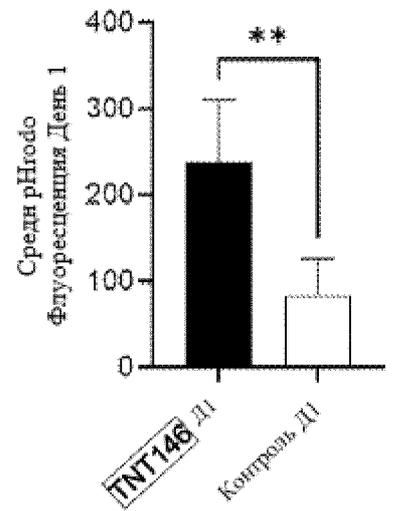


Фиг. 16В

Фиг. 17А



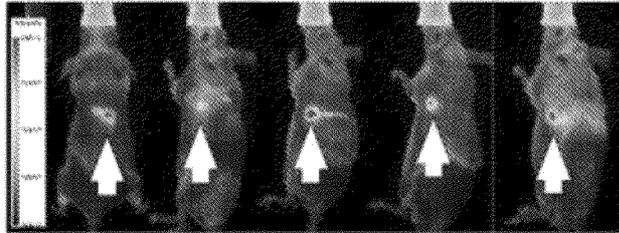
Фиг. 17В



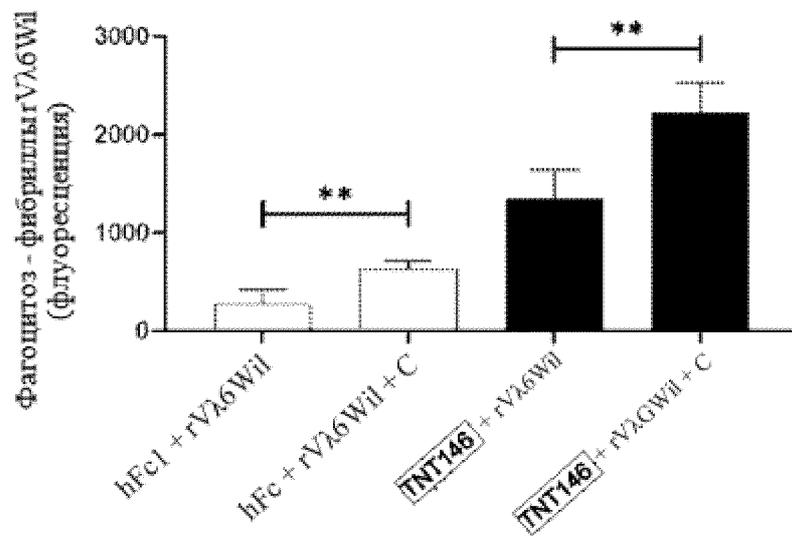
Фиг. 18А

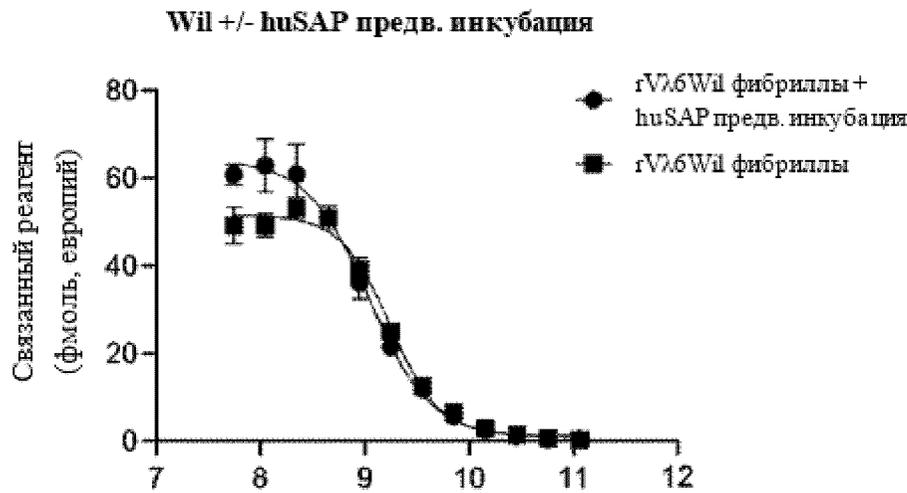


Фиг. 18

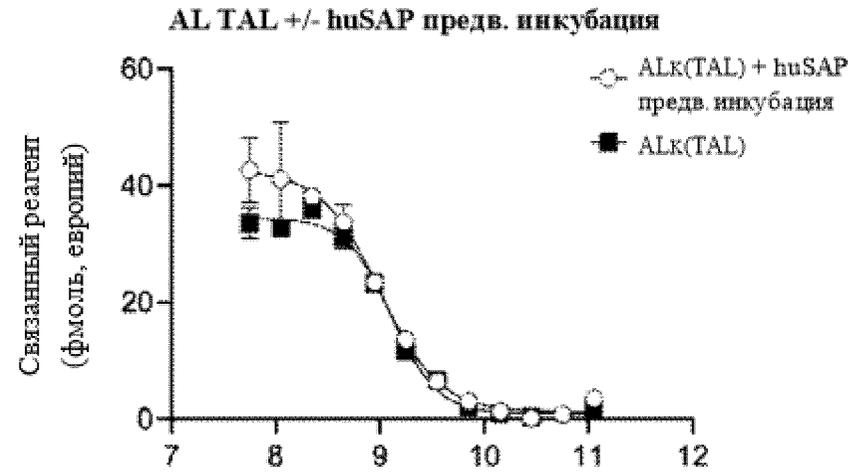


Фиг. 19

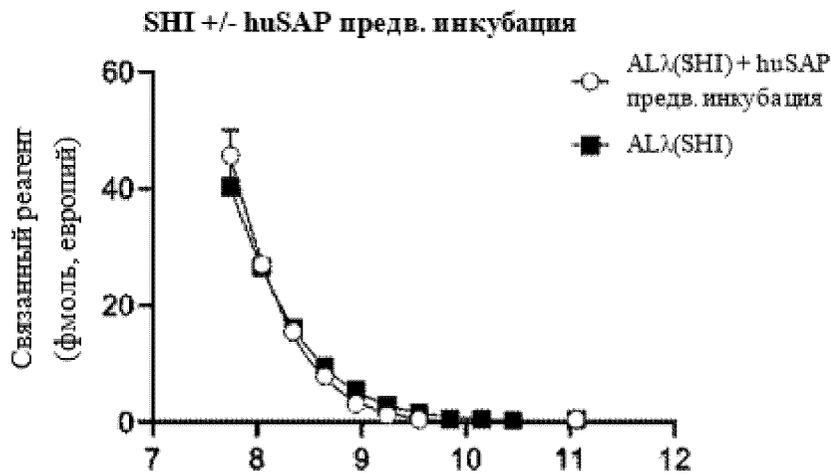




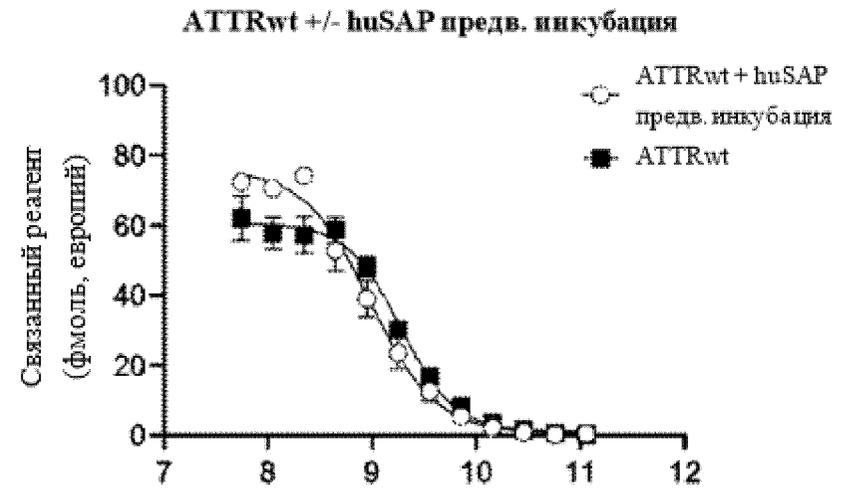
Фиг. 20А



Фиг. 20В



Фиг. 20С



Фиг. 20D

Фиг. 21

