

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393103** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.28

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.04

(54) **СЛИТЫЕ ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА-Fc ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДНЫХ НАРУШЕНИЙ**

(31) **63/184,682; 63/186,605**

(32) **2021.05.05; 2021.05.10**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/072112**

(87) **WO 2022/236286 2022.11.10**

(71) Заявитель:

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

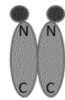
(72) Изобретатель:

**Уолл Джонатан С., Фостер Джеймс С.,
Понз Хауме (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе представлены слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, содержащие амилоид-реактивный пептид, связанный с Fc-областью человека. В данном документе также представлены способы лечения заболеваний, обусловленных амилоидом, и идентификации амилоидных отложений с помощью введения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, содержащего амилоид-реактивный пептид, связанный с Fc-областью человека.



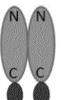
IgG1-Fc5R
Короткий жесткий спейсер - VSPSV
hFc1NV1
Fc5RNV1



IgG1-Fc5R
Короткий жесткий спейсер - VSPSV
hFc1CV1
Fc5RCV1



IgG1-Fc5R
Гибкий длинный C-концевой спейсер
GGGGSGGGGS
hFc1CV2



IgG1-Fc5R+14
Короткий жесткий спейсер - VSPSV
hFc1CV3

A1

202393103

202393103

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579654EA/085

СЛИТЫЕ ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА-Fc ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДНЫХ НАРУШЕНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет перед предварительной заявкой США № 63/184682, поданной 5 мая 2021 г., и предварительной заявкой США № 63/186605, поданной 10 мая 2021 г., содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[2] Содержимое следующего текстового файла ASCII включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 165992000840SEQLIST.TXT, дата записи: 4 мая 2022 г., размер: 16694 байта).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Настоящее изобретение относится к слитым белкам на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, способам лечения связанных с амилоидом нарушений с помощью введения слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc и способам обнаружения амилоида с использованием слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Амилоидоз представляет собой широкую группу заболеваний, которые принадлежат к группе заболеваний, связанных с конформацией белка, которые включают другие заболевания, такие как AA-амилоидоз, AL-амилоидоз, AN-амилоидоз, A β -амилоидоз, ATTR-амилоидоз, hATTR-амилоидоз, ALect2-амилоидоз и IAPP-амилоидоз при сахарном диабете II типа, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом голландского типа, церебральная бета-амилоидная ангиопатия, губчатая энгелопатия, опухоли щитовидной железы, болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Льюиса, таупатия, болезнь Хантингтона, старческий системный амилоидоз, семейный гемодиализ, старческое системное старение, старческое заболевание гипофиза, ятрогенный синдром, губчатые энцефалопатии, реактивное хроническое воспаление, опухоли щитовидной железы, миелома или другие формы рака.

[5] Амилоидоз представляет собой редкое заболевание, характеризующееся наличием в тканях нерастворимых белковых отложений с аномальной фибриллярной конформацией. Чаще всего причиной являются фрагменты сывороточных белков-предшественников. Многие органы могут быть поражены этими внеклеточными отложениями, называемыми «амилоидным веществом». Основными органами, поражаемыми отложениями амилоида, являются почки, сердце, пищеварительный тракт, печень, кожа, периферические нервы и глаза. Органы, пораженные этим заболеванием,

обычно имеют значительный объем. В конечном счете, амилоидоз может поражать все органы, а также центральную нервную систему, поэтому симптомы являются очень разнообразными.

[6] Соответственно, существует потребность в эффективном лечении амилоидоза и связанных с амилоидом заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] В одном аспекте в данном документе представлен слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит первый амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер.

[8] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13.

[9] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

[10] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1 человека.

[11] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

[12] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид связан с первым и/или вторым Fc-доменом человека посредством спейсера.

[13] В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер.

[14] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

[15] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-до С-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, а второй полипептид содержит от N- до С-конца второй домен Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид.

[16] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

[17] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с rV λ 6Wil-, A β -, A β (1-40)-, IAAP-, ALk4-, AL λ 1- или ATTR-амилоидом.

[18] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc конъюгирован с детектируемой меткой.

[19] В другом аспекте в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из абзацев [0006]-[0017].

[20] В другом аспекте в данном документе представлены нуклеиновая(ые) кислота(ы), кодирующая(ие) слитый белок на основе амилоид-реактивный пептид-Fc по любому из пп. [0006]-[0017].

[21] В другом аспекте в данном документе представлен вектор, содержащий нуклеиновую(ые) кислоту(ы) по абзацу [0019].

[22] В другом аспекте в данном документе представлена клетка-хозяин, содержащая вектор по абзацу [0020].

[23] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (CHO).

[24] В другом аспекте в данном документе представлен способ получения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, включающий культивирование клетки-хозяина по абзацу [0021] или абзацу [0022] в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок.

[25] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает извлечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

[26] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из абзацев [0006]-[0017] индивидууму, нуждающемуся в этом.

[27] В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с амилоидом, представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

[28] В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с амилоидом, выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретин-, AA-, AApоAI-, AApоAII-, AGel-, ALys-, ALEct2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP- или A β -амилоидоза.

[29] В некоторых вариантах осуществления лечение слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc приводит к клиренсу амилоида.

[30] В другом аспекте в данном документе представлен способ нацеливания на амилоидные отложения для клиренса, включающий приведение в контакт амилоидных отложений со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из абзацев [0006]-[0017].

[31] В некоторых вариантах осуществления нацеливание на амилоидные отложения для клиренса приводит к клиренсу амилоидных отложений.

[32] В некоторых вариантах осуществления клиренс происходит в результате опсонизации амилоидных отложений.

[33] В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

[34] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения индивидуума, страдающего или предположительно страдающего от амилоидного заболевания, включающий: определение наличия у индивидуума амилоидных отложений с помощью: детектируемым образом мечения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из абзацев [0006]-[0017], введение индивидууму меченого слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, определение того, может ли сигнал, связанный с детектируемой меткой, быть обнаружен у индивидуума; и, если сигнал обнаружен, введения индивидууму средства лечения амилоидоза.

[35] В некоторых вариантах осуществления, если сигнал не обнаружен, у индивидуума проводят мониторинг в отношении дальнейшего развития амилоидных отложений.

[36] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, выше которого определяется, что индивидуум имеет амилоидные отложения.

[37] В некоторых вариантах осуществления лечение амилоидоза включает введение индивидууму слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида и Fc по любому из абзацев [0006]-[0017].

[38] В другом аспекте в данном документе представлен способ идентификации амилоидных отложений у индивидуума, включающий детектируемым образом мечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из абзацев [0006]-[0017], введение индивидууму слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc и обнаружение сигнала от слитого белка.

[39] В некоторых вариантах осуществления определяется, что у индивидуума отсутствует амилоид или он страдает моноклональной гаммапатией неизвестного значения (MGUS), множественной миеломой (ММ) или одним или более связанными заболеваниями плазматических клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[40] **На фиг. 1** показаны схематические диаграммы иллюстративных конструкций на основе пептида-Fc вместе с номенклатурой, используемой в данном документе для обозначения каждой конструкции.

[41] **На фиг. 2** показаны результаты анализа электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) белков, продуцируемых в клетках яичника китайского хомячка (CHO), с 2% FBS. На дорожках слева направо показаны стандарт молекулярной массы, контрольное антитело на основе IgG1 («IgG1 к VH9/VL4»), слитый белок на основе пептид-антитело с пептидом p5R, слитым с N-концом IgG человека («hFcNV1»), контрольный Fc IgG1 («hFc1») и слитый пептид-Fc с пептидом p5R, слитым с C-концом Fc IgG1 («hFc1CV1»). Линии указывают электрофоретическую подвижность нативной легкой цепи иммуноглобулина (дорожка 2) и контрольного Fc-домена (дорожка 4), что позволяет проводить сравнение с модифицированной легкой цепью на основе

слитого продукта на основе пептида (дорожка 3), и слитого продукта на основе пептид-Fc (дорожки 5 и 6). Звездочка на дорожке 6 указывает вариант Fc-пептида с полностью интактным пептидом, ассоциированным с Fc-доменом.

[42] На **фиг. 3** показаны результаты анализа на основе эксклюзионной хроматографии (SEC) слитых белков на основе пептида-Fc Fcp5RCV1 (линия светло-серого цвета, нижняя диаграмма) и Fcp5RNV1 (линия черного цвета, верхняя диаграмма). На оси x показано время в минутах, на левой оси y показано поглощение при 280 нм для Fcp5RCV1, а на правой оси y показано поглощение при 280 нм для Fcp5RNV1.

[43] На **фиг. 4** показаны результаты радиойодирования конструкции на основе пептида Fcp5R CV1-Fc по сравнению с антителом 11-1F4. Белки получали в клетках CHO с 2% FBS. Каждый из Fcp5RCV1 и 11-1F4 показан восстановленным («восст.») и не восстановленным («н.в.»). Указаны положения 11-1F4 IgG, тяжелой цепи IgG («HC»), легкой цепи IgG («LC») и Fcp5R CV1.

[44] На **фиг. 5** показано биораспределение ^{125}I - hFc1CV1 (^{125}I - I-CV1) у мышей AA через 1 час после инъекции ^{125}I - hFc1CV1 (столбцы черного цвета), через 4 часа после инъекции (столбцы средне-серого цвета) или через 24 часа после инъекции (столбцы светло-серого цвета). Ось x указывает измеряемую ткань (включая слева направо мышцы, печень, поджелудочную железу, селезенку, левую почку, правую почку, желудок, верхний отдел кишечника, нижний отдел кишечника, сердце, легкие и кровь), а ось y указывает уровень биораспределения в процентах от введенной дозы на грамм ткани (среднее значение+SD из расчета три мыши на группу).

[45] На **фиг. 6** показано изображение ^{125}I - hFc1CV1 на основе однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT) у мышей AA через 1, 4 или 24 часа после инъекции ^{125}I - hFc1CV1.

[46] На **фиг. 7** показана микроавтордиография (ARG; нижний ряд) и окрашивание конго красным (верхний ряд) тканей селезенки (слева), сердца (в центре) и печени (справа), демонстрирующие ^{125}I - hFc1CV1 у мышей AA через 1 час после инъекции ^{125}I - hFc1CV1.

[47] На **фиг. 8** показана микроавтордиография (ARG; нижний ряд) и окрашивание конго красным (верхний ряд) тканей селезенки (слева), сердца (в центре) и печени (справа), демонстрирующие ^{125}I - hFc1CV1 у мышей AA через 24 часа после инъекции ^{125}I - hFc1CV1.

[48] На **фиг. 9** показано поглощение меченых красным pHrodo фибрилл rV λ 6Wil активированными РМА макрофагами человека THP-1 отдельно (контроль) или в присутствии Fc1 человека (h), 1 мкг Fc1NV1, 3 мкг Fc1NV1, 10 мкг Fc1NV1, 1 мкг Fc1CV1, 3 мкг Fc1CV1 или 10 мкг Fc1CV1 в течение одного часа, как указано слева направо на оси x. По оси y показан уровень поглощения фибрилл rV λ 6Wil (измеренный в единицах флуоресценции). Данные представляют собой среднее значение+стандартное отклонение ($n=4$).

[49] На **фиг. 10** показано поглощение меченых красным pHrodo фибрилл rV λ 6Wil активированными РМА макрофагами человека THP-1 отдельно (контроль) или в присутствии 1 мкг Fc1 человека (контроль hFc1), 1 мкг hFc1CV1, 3 мкг hFc1, 3 мкг hFc1CV1,

10 мкг hFc1, 10 мкг hFc1CV1, 30 мкг hFc1 или 30 мкг Fc γ 5R CV1, как указано слева направо на оси x. По оси y показан уровень поглощения фибрилл гV λ 6Wil (измеренный в единицах флуоресценции), а столбцы ошибок представляют собой стандартное отклонение. hFc1 и Fc γ 5R CV1 продуцировались клетками CHO. Данные представляют собой среднее значение+стандартное отклонение ($n=4$).

[50] На **фиг. 11** показано связывание hFc1CV1 с фибриллами гV λ 6Wil (светло-серый цвет) по сравнению с контролем Fc1 человека (h) (темно-серый цвет). На оси x показана концентрация Fc γ 5R CV1 или hFc1 в нМ, а на оси y показано количество связанного реагента в произвольных единицах флуоресценции (au). EC₅₀ связывания hFc1CV1 с фибриллами гV λ 6Wil составляла 2,5 нМ.

[51] На **фиг. 12A-12B** показано связывание hFc1CV1 у мышей с амилоидозом, ассоциированным с системным амилоидным белком A. Изображения на основе СПЕКТ/Ct получали с помощью обнаружения радиоактивно меченого Fc γ 5RCV1 через 1, 4, 24 и 48 часов после инъекции Fc γ 5RCV1. На **фиг. 12A** показано распределение в различных органах в каждой временной точке у мышей AA. На **фиг. 12B** показано распределение в различных органах мышей AA по сравнению с мышами дикого типа через 48 часов после инъекции.

[52] На **фиг. 13A-13B** показана совместная локализация меченого I-125 hFc1CV1 (¹²⁵I Fc γ 5RCV1) и амилоида в различных тканях. ARG (аудиорентгенограмма) показывает локализацию меченого hFc1CV1 (и CR (конго красный) показывает локализацию амилоида через 1 час (**фиг. 13A**) и 24 часа (**фиг. 13B**) после инъекции hFc1CV1.

[53] На **фиг. 14A-D** показаны результаты анализа фагоцитоза *ex vivo*, выполненного с Fc γ 5RCV1 или контролем IgG1 человека. Фагоцитоз обнаруживают с помощью мечения pH-чувствительным красителем флуорофором сукцинимидил-pHrodo красный.

[54] На **фиг. 15** показаны результаты анализа фагоцитоза *ex vivo*, проведенного с hFc1CV1 в отношении фибрилл гV λ WIL, AL κ и AL λ в присутствии (+C) или в отсутствие 20% плазмы человека (источника комплемента).

[55] На **фиг. 16** показаны результаты эксперимента по связыванию, в котором тестировали аффинность hFc1CV1 в отношении ATTRV, ATTRwt, гV λ WIL, AL κ и AL λ . ATTRwt представляет собой ассоциированный с транстиретином дикого типа амилоидоз. ATTRv представляет собой вариант ассоциированный с транстиретином амилоидоз.

[56] На **фиг. 17** показаны результаты эксперимента по связыванию, в котором тестируется аффинность Fc γ 5RCV1 в отношении синтетических амилоидоподобных фибрилл Tau 441, α -синуклеина и A β (1-40).

[57] На **фиг. 18A-18C** показано иммуногистохимическое окрашивание для обнаружения hFc1CV1 (верхние панели) и флуоресценция конго красного с обнаружением амилоидных фибрилл в срезах тканей человека от индивидуумов с отложениями фибрилл. На **фиг. 18A** показано связывание hFc1CV1 с фибриллами ATTR и AL κ в срезах ткани головного мозга человека. На **фиг. 18B** показано связывание hFc1CV1 с AL κ и отложения амилоида AL λ в срезах тканей почек и печени человека. На **фиг. 18C** показано связывание

hFc1CV1 с фибриллами ATTR и ALк в срезах ткани сердца человека. Стрелки показывают расположение амилоида и связывание hFc1CV1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[58] В данном документе представлены слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, которые способны связываться с амилоидами и индуцировать фагоцитоз.

I. Определения

[59] Используемые в данном документе формы единственного числа относятся как к единственному, так и к множественному числу, если из контекста явно не указано иное. Аббревиатура «например». происходит от латинского *exempli gratia* и используется в данном документе для обозначения неограничивающего примера. Таким образом, сокращение «например» является синонимом слова «в качестве примера». Используемый в данном документе термин «содержит» означает «включает».

[60] Диапазоны могут быть указаны в данном документе в виде от «около» одного конкретного значения и/или до «около» другого конкретного значения. Когда выражен такой диапазон, другой аспект включает в себя от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Далее будет понятно, что конечные точки каждого из диапазонов значимы как по отношению к другой конечной точке, так и независимо от другой конечной точки. Точно так же, когда значения выражены как приблизительные значения, с использованием предшествующего слова «около», будет понятно, что конкретное значение формирует другой аспект. В определенных иллюстративных вариантах осуществления термин «около» понимается как в пределах диапазона нормального допуска в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. «Около» можно понимать как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, или 0,01% от указанного значения. Если из контекста не следует иное, все приведенные в данном документе числовые значения могут быть изменены термином «около». Кроме того, термины, используемые в данном документе, такие как «пример», «иллюстративный» или «приведенный в качестве примера», не предназначены для демонстрации предпочтения, а скорее для объяснения того, что аспект, обсуждаемый далее, является просто одним примером представленного аспекта.

[61] Термины «амилоиды», «амилоидные отложения», «амилоидные фибриллы» и «амилоидные волокна» относятся к нерастворимым волокнистым белковым агрегатам, имеющим общие структурные особенности. Агрегаты белков имеют третичную структуру, например, которая образуется путем агрегации любого из нескольких различных белков и состоит из упорядоченного расположения β -складок, уложенных друг на друга перпендикулярно оси волокна. См. Sunde *et al.*, J. Mol. Biol. (1997) 273:729-39. Аномальное накопление амилоидов в органах может привести к амилоидозу. Хотя они разнообразны по своему происхождению, все амилоиды имеют общие морфологические свойства, заключающиеся в том, что они окрашиваются определенными

красителями, такими как конго красный, и после окрашивания имеют характерный красно-зеленый двулучепреломляющий вид в поляризованном свете. Амилоиды также имеют общие ультраструктурные особенности и общие рентгеновские и инфракрасные спектры.

[62] **Амилоидоз** относится к патологическому состоянию или заболеванию, характеризующемуся наличием амилоидов, например наличием амилоидных отложений. «Амилоидные заболевания» или «амилоидоз» представляют собой заболевания, ассоциированные с образованием, отложением, накоплением или сохранением амилоидных фибрилл. Такие заболевания включают без ограничения болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, наследственную предрасположенность к кровоизлиянию в мозг с амилоидозом голландского типа и церебральную бета-амилоидную ангиопатию. Другие амилоидные заболевания, такие как системный AA-амилоидоз, AL-амилоидоз, ATTR-амилоидоз, ALect2-амилоидоз и IAPP-амилоидоз при диабете II типа, также являются амилоидными заболеваниями.

[63] Термин «**амилоидогенный**» относится к образованию или склонности к образованию амилоидных отложений. Например, некоторые растворимые мономерные белки могут претерпевать обширные конформационные изменения, приводящие к их агрегации в хорошо упорядоченные, неразветвленные фибриллы шириной 8-10 нм, что завершается образованием амилоидных агрегатов. Например, было обнаружено, что более тридцати белков образуют амилоидные отложения (или амилоиды) у человека. Не все белки в классе разнообразных белков, такие как легкие цепи иммуноглобулинов, способны образовывать амилоиды, т. е. некоторые белки не являются амилоидогенными, что означает, что они не имеют тенденции к образованию амилоидов. Однако другие белки этого класса могут образовывать амилоидные отложения и, таким образом, являются амилоидогенными. Кроме того, в классе белков легкой цепи некоторые из них могут считаться более «амилоидогенными», чем другие, на основании способности легко образовывать амилоидные фибриллы. Некоторые белки легкой цепи считаются неамилоидогенными или менее амилоидогенными вследствие их неспособности легко образовывать амилоидные фибриллы у пациентов или *in vitro*.

[64] **Животное**: живые многоклеточные позвоночные организмы, категория, которая включает, например, млекопитающих и птиц. Термин «млекопитающее» включает как человека, так и отличных от человека млекопитающих. Точно так же термины «субъект» и «индивидуум» включают как индивидуумов-людей, так и индивидуумов-животных. В некоторых примерах животное представляет собой индивидуума, страдающего амилоидным заболеванием.

[65] **Клиренс**: термины «очистить» или «клиренс» относятся к уменьшению или удалению в измеримой степени. Например, удаление амилоидных отложений, как описано в данном документе, относится к уменьшению или удалению отложений до измеримой или различимой степени. Клиренс может привести к 100% удалению, но не обязательно. Скорее, клиренс может привести к удалению менее 100%, например, к удалению около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или более.

[66] **Конъюгат:** Используемый в данном документе термин «конъюгат» относится к продукту сопряжения или соединения двух или более материалов, при этом полученный продукт имеет по меньшей мере два различных элемента, например, по меньшей мере, два домена. Сопряженные материалы могут быть одинаковыми или разными. Такое сопряжение может осуществляться посредством одной или более связывающих групп. Например, «белковый конъюгат» образуется в результате соединения двух или более аминокислотных последовательностей. Например, конъюгат из двух белков приводит к образованию одного белка, имеющего домен, соответствующий каждому из отдельно соединенных белков.

[67] **Эффективное количество** или **терапевтически эффективное количество:** количество средства, достаточное для предупреждения, лечения (включая профилактику), уменьшения и/или облегчения симптомов и/или основных причин любого нарушения или заболевания, например, для предупреждения, ингибирования амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления «эффективное количество» достаточно для уменьшения или устранения симптома заболевания. Эффективное количество можно вводить один или более раз.

[68] **Ингибировать:** уменьшить в измеримой степени. Ингибирование, например, не требует полной потери функции или полного прекращения измеряемого аспекта. Например, ингибирование образования бляшек может означать остановку дальнейшего роста бляшки, замедление дальнейшего роста бляшки или уменьшение размера бляшки.

[69] **Ингибирование или лечение заболевания:** ингибирование полного развития заболевания или патологического состояния, например ингибирование амилоидоза. Термин «лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое ослабляет признак или симптом заболевания или патологического состояния после того, как оно начало развиваться. Термин «облегчение», по отношению к заболеванию или патологическому состоянию, относится к любому наблюдаемому благоприятному эффекту лечения. Положительный эффект может быть подтвержден, например, задержкой появления клинических симптомов заболевания у восприимчивого индивидуума, уменьшением степени тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, более медленным прогрессированием заболевания, улучшением общего состояния здоровья или самочувствия индивидуума или других параметров, хорошо известных в данной области техники, которые являются специфическими для конкретного заболевания. «Профилактическое» лечение представляет собой лечение, которое проводят индивидууму, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, в целях снижения риска развития патологии.

[70] Касательно образования амилоидных отложений, «ингибирование» относится к предупреждению снижения образования амилоидных отложений, например, по сравнению с контролем. Например, ингибирование может приводить к уменьшению амилоидных отложений на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или более по сравнению с контролем.

[71] **Метка** относится к любому детектируемому соединению или композиции,

которые прямо или опосредованно конъюгированы с другой молекулой для облегчения обнаружения этой молекулы. Конкретные неограничивающие примеры меток включают флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, гаптены, ферментативные связи и радиоактивные изотопы. Например, белок, который «является детектируемым образом меченым», означает, что присутствие белка можно определить с помощью метки, ассоциированной с белком.

[72] **Выделенный:** «выделенный» биологический компонент, такой как пептид (например, один или более пептидов, раскрытых в данном документе), клетка, нуклеиновая кислота или образцы сыворотки, были по сути отделены, получены отдельно или очищены от других биологических компонентов в клетке организма, в которых этот компонент встречается в природе, например, других хромосомных и внехромосомных ДНК и РНК, а также белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные с помощью стандартных методов очистки. Этот термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные с помощью рекомбинантной экспрессии в клетке, а также химически синтезированные пептиды и нуклеиновые кислоты. Термин «выделенный» или «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее, это относительный термин. Так, например, выделенный пептидный препарат представляет собой препарат, в котором пептид или белок более обогащен, чем пептид или белок в его естественной среде внутри клетки. Предпочтительно препарат очищают так, чтобы белок или пептид составлял по меньшей мере 50% от общего содержания пептида или белка в препарате, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 99% концентрации пептида или белка.

[73] **Соединяться:** используемый в данном документе термин «соединяться», «соединенный», «связываться» или «связанный» относится к любому известному в данной области техники методу функционального соединения белков и/или белковых доменов. Например, один белковый домен может быть связан с другим белковым доменом посредством ковалентной связи, например, в рекомбинантном слитом белке, с промежуточными последовательностями или доменами или без них. Соединенные также включает, например, интеграцию двух последовательностей вместе, например, размещение двух последовательностей нуклеиновой кислоты вместе в одной и той же цепи нуклеиновой кислоты, так что последовательности экспрессируются вместе.

[74] **Нуклеиновая кислота:** полимер, состоящий из нуклеотидных единиц (рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов), связанных посредством фосфодиэфирных связей, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов. Таким образом, этот термин включает нуклеотидные полимеры, в которых нуклеотиды и связи между ними включают не встречающиеся в природе синтетические аналоги, такие как,

например, и без ограничения фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и т.п. Такие полинуклеотиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического синтезатора ДНК. Термин «олигонуклеотид» обычно относится к коротким полинуклеотидам, обычно не превышающим около 50 нуклеотидов. Следует понимать, что когда нуклеотидная последовательность представлена последовательностью ДНК (т.е. А, Т, G, С), она также включает последовательность РНК (т.е. А, U, G, С), в которой «U» заменяет «Т».

[75] **Нуклеотид** включает без ограничения мономер, который содержит основание, связанное с сахаром, например, пиримидин, пурин или их синтетические аналоги, или основание, связанное с аминокислотой, как в пептидной нуклеиновой кислоте (PNA). Нуклеотид представляет собой один мономер в полинуклеотиде. Нуклеотидная последовательность относится к последовательности оснований в полинуклеотиде.

[76] Для описания нуклеотидных последовательностей в данном документе используются общепринятые обозначения: левый конец одноцепочечной нуклеотидной последовательности представляет собой 5'-конец; направление влево двухцепочечной нуклеотидной последовательности называют 5'-направлением. Направление добавления нуклеотидов с 5'- к 3'-концу к зарождающимся РНК-транскриптам называется направлением транскрипции. Цепь ДНК, имеющая ту же последовательность, что и мРНК, называется «кодирующей цепью»; последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и мРНК, транскрибированная с этой ДНК, и которые расположены 5' относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называются «вышележащими последовательностями»; последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые расположены 3' относительно 3'-конца транскрипта кодирующей РНК, называются «нижележащими последовательностями».

[77] **кДНК** относится к ДНК, которая комплементарна или идентична мРНК в одноцепочечной или двухцепочечной форме.

[78] **Термин «кодирование»** относится к неотъемлемому свойству специфических последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, такого как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, продуцируемая этим геном, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставлена в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК. Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные

последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать интроны.

[79] **Фармацевтически приемлемые носители:** используемые фармацевтически приемлемые носители являются стандартными. В *Remington's Pharmaceutical Sciences* за авторством E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition (1995) описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки слитых белков, раскрытых в данном документе.

[80] В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного используемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты и рН-буферные средства и т.п., например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

[81] **Полипептид:** полимер, в котором мономеры представляют собой аминокислотные остатки, соединенные между собой амидными связями. Когда аминокислоты представляют собой альфа-аминокислоты, можно использовать либо L-оптический изомер, либо оптический D-изомер, L-изомеры являются предпочтительными. Термины «полипептид» или «белок», используемые в данном документе, охватывают любую аминокислотную последовательность и включают модифицированные последовательности, такие как гликопротеины. Термин «полипептид» специально предназначен для обозначения встречающихся в природе белков, а также белков, полученных рекомбинантным или синтетическим путем. В некоторых примерах пептид представляет собой один или более пептидов, раскрытых в данном документе.

[82] **Очищенный:** термин «очищенный» не подразумевает абсолютной чистоты; скорее, это относительный термин. Так, например, очищенный белковый препарат представляет собой препарат, в котором указанный белок является более чистым, чем белок в его естественной среде внутри клетки или внутри производственной реакционной камеры (в зависимости от ситуации).

[83] **Идентичность последовательностей:** сходство между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или двумя аминокислотными последовательностями выражается в терминах сходства между последовательностями, иначе называемого идентичностью последовательностей. Идентичность последовательностей часто измеряют с точки зрения процентной идентичности (или

сходства, или гомологии); чем выше процент, тем более похожи две последовательности.

[84] Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. *Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith & Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson & Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp Gene 73: 237-244, 1988; Higgins & Sharp CABIOS 5: 151-153, 1989; Corpet et al. Nuc. Acids Res. 16, 10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. B Biosciences 8, 155-65, 1992; and Pearson et al. Meth. Mol. Bio. 24, 307-31, 1994. Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)* представлено подробное рассмотрение способов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

[85] Средство поиска основного локального выравнивания NCBI (BLAST)(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) доступен из нескольких источников, включая Национальный центр биологической информации (NCBI, Бетесда, штат Мэриленд) и в интернете, для использования с программами анализа последовательностей blastp, blastm, blastx, tblastn и tblastx.

[86] **Функционально связанный:** первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально связанной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, при необходимости, для соединения двух кодирующих белок областей в одной и той же рамке считывания.

[87] **Фармацевтическое средство:** химическое соединение или композиция, способные вызывать требуемый терапевтический или профилактический эффект при надлежащем введении индивидууму или в клетку.

[88] **Вектор:** Молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку-хозяин, в результате чего образуется трансформированная клетка-хозяин. Векторы рекомбинантной ДНК представляют собой векторы, содержащие рекомбинантную ДНК. Вектор может содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такой как точка начала репликации. Вектор также может содержать один или более селективируемых маркерных генов и другие генетические элементы, известные в данной области техники. Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные ДНК-векторы, имеющие по меньшей мере некоторые последовательности нуклеиновых кислот, полученные из одного или более вирусов. Термин «вектор» включает плазмиды, линейные молекулы нуклеиновых кислот и, как описано в других документах, аденовирусные векторы и аденовирусы.

[89] **Субъект** или **индивидуум** относится к млекопитающему, например, человеку. Индивидуум может представлять собой пациента-человека. Индивидуум может

представлять собой пациента, страдающего заболеванием или состоянием или с подозрением на заболевание или состояние, и может нуждаться в лечении или диагностике или может нуждаться в наблюдении за прогрессированием заболевания или состояния. Пациент также может находиться на лечебной терапии, эффективность которой необходимо контролировать. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления индивидуум включает индивидуума, имеющего амилоидоз, например, болезнь Альцгеймера, Гентингтона или прионные заболевания, или периферический амилоидоз, например, наблюдаемые у пациентов с амилоидозом легких цепей (AL) и диабетом 2 типа.

[90] Термин «**осуществление лечения**» или «**лечение**» относится к терапевтическому вмешательству, которое ослабляет признак или симптом заболевания или состояния после того, как оно начало развиваться. Термин «облегчение», по отношению к заболеванию или состоянию, относится к любому наблюдаемому благоприятному эффекту лечения. Положительный эффект может быть подтвержден, например, задержкой появления клинических симптомов заболевания у восприимчивого индивидуума, уменьшением степени тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, более медленным прогрессированием заболевания, улучшением общего состояния здоровья или самочувствия индивидуума или других параметров, хорошо известных в данной области техники, которые являются специфическими для конкретного заболевания. «Профилактическое» лечение представляет собой лечение, которое проводят индивидууму, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, в целях снижения риска развития патологии.

II. СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ АМИЛОИД-РЕАКТИВНОГО ПЕПТИДА И Fc

[91] В данном документе представлены слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида и Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc содержит первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит первый амилоид-реактивный пептид, связанный с первым Fc-доменом человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, реактивный пептид, связанный со вторым Fc-доменом человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc представляет собой гомодимер. Слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно применять для лечения субъекта, страдающего амилоидозом, например, путем введения индивидууму слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению.

[92] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, как показано в **таблице 1** ниже. В некоторых вариантах осуществления один или более пептидов, показанных в **таблице 1** ниже, могут быть присоединены к Fc-области человека посредством N-конца Fc-области человека или C-конца Fc-области человека, образуя тем самым слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит два или более

пептидов, показанных в **таблице 1**, которые могут быть присоединены к одной Fc-области человека. Например, два амилоид-реактивных пептида могут быть соединены с одной Fc-областью человека.

Таблица 1. Иллюстративные амилоид-реактивные пептидные последовательности

| Пептид | ПЕРВИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: | SEQ ID NO |
|--------|--|---------------|
| p5 | KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q | SEQ ID NO: 1 |
| p5R | RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR Q | SEQ ID NO: 2 |
| p8 | КАКАК АКАКА КАКАК | SEQ ID NO: 3 |
| p9 | KAQAK AQAQA QAQAQ AKAQA KAQAK AQAK | SEQ ID NO: 4 |
| p19 | KAQQA QAKQA QQAQK AQQAQ AKQAA Q | SEQ ID NO: 5 |
| p20 | QAQKA QAQQA KQAQQ AQKAQ AQQAK Q | SEQ ID NO: 6 |
| p31 | KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q | SEQ ID NO: 7 |
| p37 | KTVKT VTKVT KVTVK TVKTV TKVTK V | SEQ ID NO: 8 |
| p42 | VYKVK TKVKT KVKT VKT | SEQ ID NO: 9 |
| p43 | AQAYS KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKAK Q | SEQ ID NO: 10 |
| p44 | AQAYA RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR Q | SEQ ID NO: 11 |
| p5+14 | KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK QAQKA QKAQA KQAKQ | SEQ ID NO: 12 |
| p5R+14 | RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR QAQRA QRAQA RQARQ | SEQ ID NO: 13 |

[93] Без ограничения какой-либо конкретной теорией, предполагается, что пептидный домен слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc при введении индивидууму нацеливает слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc на амилоидные отложения. Затем Fc-домен стимулирует иммунный ответ в месте расположения амилоида, что приводит к удалению амилоида, например, путем опсонизации. Кроме того, считается, что слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc имеет более длительный период полужизни, чем амилоид-реактивные пептиды в отдельности. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного отложения со слитым белком по настоящему изобретению приводит к периоду полужизни, которое увеличивается на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или больше по сравнению с приведением в контакт амилоидного отложения с амилоид-реактивным пептидом в отдельности. Таким образом, слитый белок на основе

амилоид-реактивного пептида-Fc при введении индивидууму может вызывать более длительные иммуностимулирующие эффекты в месте амилоидного отложения, тем самым увеличивая иммунный ответ в месте амилоидного отложения.

[94] В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивные пептиды слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность, которая на по меньшей степени 80%, 85%, 90% или больше идентична аминокислотной последовательности, представленной как любая одна из SEQ ID NO: 1-13, например, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной как любая одна из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивные пептиды, связанные с Fc-областью человека, могут содержать или состоять из от около 10 до около 55 аминокислот. Амилоид-реактивные пептиды по настоящему изобретению могут, например, содержать или состоять из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55 аминокислот. Такие пептиды описаны, например, в международной заявке на патент WO2016032949, который включен в данный документ во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый и второй амилоид-реактивный пептид содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотные последовательности, представленные как SEQ ID NO: 1-13, содержащие 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления первый и второй амилоид-реактивный пептид содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления первый и второй амилоид-реактивный пептид содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления первый и второй амилоид-реактивный пептид содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления первый и второй амилоид-реактивный пептид содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[95] Аминокислоты, образующие все или часть амилоид-реактивных пептидов, связанных с Fc-областями человека, могут быть стереоизомерами и модификациями встречающихся в природе аминокислот, не встречающихся в природе аминокислот, посттрансляционно модифицированных аминокислот, ферментативно синтезированных аминокислот, производных аминокислот, конструкций или структур, предназначенных для

имитации аминокислот и т.п. Аминокислоты, образующие пептиды по настоящему изобретению, могут представлять собой одну или более из 20 обычных аминокислот, обнаруженных во встречающихся в природе белках, или одну или более модифицированных и необычных аминокислот.

[96] В некоторых вариантах осуществления первый амилоид-реактивный пептид связан с N-концом первого Fc-домена человека, а второй амилоид-реактивный пептид связан с N-концом второго Fc-домена человека. В некоторых вариантах осуществления первый амилоид-реактивный пептид связан с C-концом первого Fc-домена человека, а второй амилоид-реактивный пептид связан с C-концом второго Fc-домена человека. Иллюстративные структуры слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc представлены на **фиг. 1**.

[97] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домен человека представляют собой Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления первый и второй человек Fc-домен человека содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 18 представлена ниже.

Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 18)

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMNEALHNHYTQKSLSLSPGK

[98] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой вариант Fc с повышенной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями). В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой вариант Fc с повышенной способностью стимулировать фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой вариант Fc с повышенной способностью связываться с FcγR. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой вариант Fc с повышенной способностью рекрутировать систему комплемента. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека содержит одну или более аминокислотных замен, которые придают повышенную эффекторную функцию и/или повышенное связывание с FcγR. Такие аминокислотные замены описаны, например, в международных публикациях под номерами WO2004/099249, WO2005/063815, WO2006/019447, WO2006/020114, WO2007/041635, WO2009/058492, WO2009/086320 и публикациях США № US20070224192 и US20080161541, каждое из которых включено в

данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен человека с одной или более аминокислотными заменами имеет повышенную способность стимулировать фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека являются гликоинженерными. В некоторых вариантах осуществления гликоинженерный Fc-домен человека имеет повышенную способность стимулировать фагоцитоз.

[99] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc содержит спейсерную последовательность аминокислот между Fc-областью человека и амилоид-реактивным пептидом. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид связан с первым и/или вторым Fc-доменом человека посредством спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй амилоид-реактивный пептид слит с первым и/или вторым Fc-доменом человека посредством пептидного спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой гибкий спейсерный пептид. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит остатки глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит мотив GGGGS. В некоторых вариантах осуществления спейсер состоит из остатков глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой жесткий спейсерный пептид. В некоторых вариантах осуществления спейсер является не заряженным. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит глицин-сериновый линкер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит или состоит из от около 3 до около 55 аминокислот. Спейсерные пептиды по настоящему изобретению могут содержать или состоять из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, или 55 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид имеет длину около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 100 или 155 аминокислот, включая любое значение или диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид содержит 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в **таблице 2** ниже. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14-17.

Таблица 2. Иллюстративные спейсерные последовательности

| Описание | Аминокислотная последовательность | SEQ ID NO |
|--------------------------|--|------------------|
| Короткий жесткий спейсер | VSPSV | SEQ ID NO: 14 |
| Длинный жесткий спейсер | VSPSVVSPSV | SEQ ID NO: 15 |

| | | |
|-------------------------|------------|---------------|
| Гибкий короткий спейсер | GGSGG | SEQ ID NO: 16 |
| Гибкий длинный спейсер | GGGGSGGGGS | SEQ ID NO: 17 |

[100] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N- до С-конца первый амилоид-реактивный пептид, первый спейсер и первый Fc-домен человека, а второй полипептид содержит от N- до С-конца второй амилоид-реактивный пептид, второй спейсер и второй Fc-домен человека. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды имеют разные последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, первый спейсер и первый Fc-домен человека, а второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, второй спейсер и второй Fc-домен человека. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N- до С-конца первый амилоид-реактивный пептид, первый спейсер и первый Fc-домен IgG1 человека, а второй полипептид содержит от N- до С-конца второй амилоид-реактивный пептид, второй спейсер и второй Fc-домен IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N- до С-конца первый амилоид-реактивный пептид, первый короткий жесткий спейсер и первый Fc-домен человека, а второй полипептид содержит от N- до С-конца второй амилоид-реактивный пептид, второй короткий жесткий спейсер и второй Fc-домен человека. В некоторых вариантах осуществления короткий жесткий спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, первый короткий жесткий спейсер и первый Fc-домен IgG1 человека, а второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, второй короткий жесткий спейсер и второй Fc-домен IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc содержит структуру и/или аминокислотную последовательность hFc1NV1.

[101] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-до С-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, а второй полипептид содержит от N- до С-конца второй домен Fc-домен человека, второй

спейсер и второй амилоид-реактивный пептид. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-до С-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, а второй полипептид содержит от N-до С-конца второй Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N- до С-конца первый Fc-домен IgG1 человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, а второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй Fc-домен IgG1 человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-до С-конца первый Fc-домен человека, первый короткий жесткий спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, и второй полипептид содержит от N- до С-конца второй домен Fc-домен человека, второй короткий жесткий спейсер и второй амилоид-реактивный пептид. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый Fc-домен IgG1 человека, первый короткий жесткий спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй Fc-домен IgG1 человека, второй короткий жесткий спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления короткий жесткий спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc содержит структуру и/или аминокислотную последовательность hFc1CV1.

[102] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-до С-конца первый Fc-домен человека, первый гибкий длинный спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, и второй полипептид содержит от N- до С-конца второй домен Fc-домен человека, второй гибкий длинный спейсер и второй амилоид-реактивный пептид. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый Fc-домен человека, первый гибкий длинный спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит от N- до С-конца второй Fc-домен человека, второй гибкий длинный спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N- до С-конца, первый Fc-домен IgG1 человека первый гибкий

длинный спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит от N- до С-конца второй Fc-домен IgG1 человека, второй гибкий длинный спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый Fc-домен IgG1 человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13, и второй полипептид содержит от N- до С-конца второй Fc-домен IgG1 человека, второй спейсер и второй амилоидный-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13, и второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый Fc-домен человека, первый гибкий длинный спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13, и второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй Fc-домен человека, второй гибкий длинный спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-конца до С-конца первый Fc-домен IgG1 человека, первый гибкий длинный спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13, и второй полипептид содержит от N-конца до С-конца второй Fc-домен IgG1 человека, второй гибкий длинный спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, представленный в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[103] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21.

[104] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, а второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

[105] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены слитые белки, содержащие первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит первый амилоид-реактивный пептид и второй амилоид-реактивный пептид, связанный с первым Fc-доменом человека, где второй полипептид содержит третий амилоид-реактивный пептид и четвертый амилоид-реактивный пептид, связанные со вторым Fc-доменом человека, при этом первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены человека образуют димер посредством ковалентной связи в шарнирной области антитела. В некоторых вариантах осуществления первый и второй Fc-домены человека связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc представляет собой гомодимер. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит от N-до C-конца первый амилоид-реактивный пептид, первый спейсер, первый Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид, и также второй полипептид содержит от N-до C-конца третий амилоид-реактивный пептид, третий спейсер, второй Fc-домен человека, четвертый спейсер и четвертый амилоид-реактивный пептид. В некоторых вариантах осуществления первый, второй, третий и четвертый амилоид-реактивные пептиды представляют собой любой из амилоид-реактивных пептидов, описанных в данном документе, например, любой из амилоид-реактивных пептидов, описанных в **таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления первый, второй, третий и четвертый спейсеры представляют собой любой из спейсеров, описанных в данном документе.

[106] В некоторых вариантах осуществления слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с одним или более амилоидогенными пептидами в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с гепаринсульфатгликозаминогликанами в амилоиде. В некоторых вариантах осуществления слитые белки связываются с фибриллами человека. В некоторых вариантах осуществления слитые белки связываются с синтетическими фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом KEN hATTR, экстрактом печени SHI AL λ и/или экстрактом печени TAL AL κ . В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, содержат амилоидогенный белок переменного домена λ 6 (V λ 6Wil) 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 некоторых вариантах

осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидом γ V λ 6W11, A β , A β (1-40), IAAP, AL κ , AL λ или ATTR. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидом AL κ 4, AL λ . В других вариантах осуществления амилоиды, связываемые гуманизированным антителом или слитым белком на основе антитела-пептида, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулина (A β_2 M), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гельсолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин ((ACal), лактадерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), белок-предшественник (APrP); α -синуклеин (A α Syn), тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF) или IAAP, другие амилоидогенные пептиды AL κ 4, Al λ 1. Амилоидогенные пептиды, связанные гуманизированным антителом или слитым белком на основе антитела-пептида, могут представлять собой белок, фрагмент белка или белковый домен. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания.

[107] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc имеет реактивность в отношении всех амилоидов и способен связываться с различными типами амилоидов в различных тканях с амилоидами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc способен связываться с амилоидом в центральной нервной системе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc способен связываться с амилоидом в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc способен связываться с тау-фибриллами и/или агрегатами альфа-синуклеина.

[108] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными фибриллами человека с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC₅₀), которая составляет менее около 1, 10, 100 или 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными фибриллами человека с EC₅₀, которая составляет около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 100, 250, 500, 750 или 1000 нМ, включая любое значение или диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными фибриллами человека с EC₅₀, которая составляет около 1 нМ, 2 нМ, 2,5 нМ, 3 нМ, 4 нМ или 5 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными фибриллами человека с EC₅₀, которая составляет около 2,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными фибриллами человека с EC₅₀, которая составляет менее около

3 нМ, 4 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 80 нМ или 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными фибриллами человека с EC_{50} , которая меньше, чем EC_{50} контрольной Fc-области человека, связывающейся с амилоидными фибриллами человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидными отложениями или фибриллами в большей степени, чем контрольный Fc1 человека. Способы расчета EC_{50} известны в данной области техники и включают, например, поверхностный плазмонный резонанс. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} определяют с помощью измерения связывания с фибриллами $\gamma V\lambda 6Wil$. Иллюстративный способ измерения связывания с амилоидными фибриллами представлен в **примере 4**, как показано на **фиг. 11**.

[109] В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc с амилоидом человека способствует фагоцитозу амилоидных фибрилл человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc опсонизирует амилоидные фибриллы человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc опсонизирует фибриллы $\gamma V\lambda 6Wil$. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидных фибрилл человека со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению в присутствии макрофагов способствует поглощению амилоидных фибрилл человека макрофагами. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидных фибрилл человека со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению в присутствии макрофагов способствует опсонизации амилоидных фибрилл человека. В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc с амилоидом человека способствует фагоцитозу амилоидных фибрилл человека в равной или большей степени, чем контрольная молекула (например, Fc-область человека). В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc способствует антителозависимому клеточному фагоцитозу.

[110] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc конъюгирован с детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из радионуклидов (например, $I-^{124}$, $I-^{125}$, $I-^{123}$, $I-^{131}$, $Zr-^{89}$, $Tc-^{99m}$, $Cu-^{64}$, $Br-^{76}$, $F-^{18}$); ферментов (пероксидазы хрена); биотина; и флуорофоров и т.д. Любые средства, известные в данной области техники для детектируемым образом мечения белка, могут быть использованы и/или адаптированы для использования со способами, описанными в данном документе. Например, слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc может быть помечен радиоактивным изотопом или помечен флуоресцентной меткой или хемилюминесцентной меткой. Иллюстративные радиоизотопы включают, например, ^{18}F , ^{111}In , ^{99m}Tc , ^{123}I и ^{125}I . Эти и другие радиоизотопы могут быть присоединены к слитому белку на основе амилоид-

реактивного пептида-Fc с использованием хорошо известных химических методов, которые могут включать или не включать использование хелатирующего средства, такого как DTPA или DOTA, ковалентно связанного со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, в качестве примера. Иллюстративные флуоресцентные или хемилюминесцентные метки включают флуоресцеин, техасский красный, родамин, красители Alexa и люциферазу, которые могут быть конъюгированы со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc с помощью реакции с лизином, цистеином, глутаминовой кислотой и боковыми цепями аспарагиновой кислоты. В одном иллюстративном варианте осуществления метку обнаруживают с помощью флуоресцентного микропланшет-ридера или флуориметра с использованием длин волн возбуждения и излучения, соответствующих метке, которая используется. Радиоактивные метки можно обнаружить, например, с помощью гамма-счетчика или сцинтилляционного счетчика в зависимости от типа радиоактивного излучения и с помощью энергетических окон, подходящих для точного обнаружения конкретного радионуклида. Однако для обнаружения метки также можно использовать любую другую подходящую методику обнаружения радиоизотопов. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка представляет собой ¹²⁵I.

[111] В данном документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие любой из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

III. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ, КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ СЛИТЫХ БЕЛКОВ

[112] В данном документе также представлена нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует любой из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе.

[113] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, представленная в данном документе, содержится в одном или более векторах. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую(ые) кислоту(ы), кодирующую(ие) слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению.

[114] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc представляет собой гомодимер. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую как первый, так и второй полипептид слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

[115] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc представляет собой гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид слитого белка на основе амилоид-

реактивного пептида-Fc. В некоторых вариантах осуществления первый вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, и второй вектор содержит вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

[116] Для продуцирования слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc вектор(ы) экспрессии слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно вводить в соответствующие линии продуцирующих клеток, известные в данной области техники. Введение вектора(ов) экспрессии можно осуществлять с помощью котрансфекции посредством электропорации или любой другой подходящей технологии трансформации, доступной в данной области техники. Затем можно отобрать и размножить клеточные линии, продуцирующие слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, и очистить антитела. Очищенный слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc затем можно анализировать с помощью стандартных методик, таких как SDS-PAGE или SEC.

[117] Также представлена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе. Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе. Например, слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно продуцировать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не являются необходимыми. Информацию об экспрессии полипептидов в бактериях см., например, в патентах США №№ 5648237, 5789199 и 5840523. (см. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254). После экспрессии слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно выделять из бактериальной клеточной пасты в растворимую фракцию и можно подвергать дальнейшей очистке.

[118] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий нуклеиновую(ые) кислоту(ы), кодирующую(ие) слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению.

[119] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[120] В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток. См., например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающие технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных

растениях).

[121] Клетки позвоночных могут также использоваться в качестве хозяев. Например, могут быть подходящими клеточные линии млекопитающих, которые приспособлены для роста в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK); мышинные почки Сертолли (клетки TM4, описанные, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather *et al.*, *Annals N Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие применимые линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

[122] В данном документе также представлены способы получения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает извлечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc. В некоторых вариантах осуществления извлечение белка включает разрушение клетки-хозяина, например, путем осмотического шока, обработки ультразвуком или лизиса. После разрушения клеток клеточный дебрис удаляют центрифугированием или фильтрованием. Затем слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно дополнительно очищать. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc 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 слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc 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 слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc конъюгируют с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. Примером маркерной аминокислотной последовательности является гексагистидиновый пептид, 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.

[123] Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc может быть получен любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая химический синтез или рекомбинантные способы с использованием стандартных молекулярно-биологических методик.

IV. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[124] В данном документе также представлены способы лечения связанного с амилоидом нарушения, включающие введение индивидууму слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, раскрытого в данном документе.

[125] В некоторых вариантах осуществления представлен способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе, индивидууму, нуждающемуся в этом.

[126] 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 на основе амилоид-реактивного пептида-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.

[127] 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, hATTR 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 заболевание, связанное с амилоидом, выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретин-, AA, AАpoAI, AАpoAII, AАpoAIV, AАpoCII, AАpoCII, AGel, ALys, ALEct2, AFib, ACys, ACal, AMed, AIAPP, APro, AIns, APrP, ASPC, AGal7, ACor, AKer, ALac, AOAPP, ASem1, AEnf или A β -амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления лечение слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc приводит к клиренсу амилоида. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с амилоидами, ассоциированными с нормальным старением. В других вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc используется для диагностики, лечения или прогнозирования амилоидоза или связанного с амилоидом заболевания у индивидуума.

[128] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен способ лечения связанного с амилоидом нарушения у индивидуума, включающий введение слитого белка, представленного в данном документе, при этом у индивидуума имеется амилоид в почках, печени и/или сердце. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются отложения AL λ в почках. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются отложения AL κ в почках. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются отложения AL λ в печени. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются отложения AL κ в печени. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются отложения ATTR в сердце. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются отложения AL κ в сердце. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются тау-фибриллы или агрегаты альфа-синуклеина. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются фибриллы в селезенке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый полипептид, содержащий первый амилоид-реактивный пептид, связанный с C-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с C-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-домен человека содержит пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

[129] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен способ лечения связанного с амилоидом нарушения у индивидуума, включающий введение слитого белка, представленного в данном документе, где связанное с амилоидом заболевание выбрано из группы, состоящей из AA-амилоидоза, AL-амилоидоза и ATTR-амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый

полипептид, содержащий первый амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый/и/или второй Fc-домен человека содержит пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются амилоидные отложения в селезенке, почках, печени и/или сердце. В некоторых вариантах осуществления слитый белок способствует фагоцитозу с помощью фиксации системы комплемента.

[130] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc вводят посредством внутрикожного, подкожного, внутримышечного, внутрисердечного, внутрисосудистого, внутривенного, внутриглазного, внутриартериального, эпидурального, интраспинального, экстракорпорального, интратекального, внутрибрюшинного, внутриплеврального, внутрипросветного, интравитреального, интракавернозного, внутрижелудочкового, внутрикостного, внутрисуставного, внутриклеточного или легочного пути.

[131] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc вводят в достаточных количествах, чтобы индуцировать фагоцитоз амилоида клетками иммунной системы (например, макрофагами).

[132] В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, такое как примат, крупный рогатый скот, грызун или свинья. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

[133] В данном документе также представлены способы нацеливания на амилоидные отложения для клиренса, включающие приведение в контакт амилоидных отложений с любым из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нацеливание на амилоидные отложения для клиренса приводит к клиренсу амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления клиренс происходит в результате опсонизации амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к фагоцитозу амилоида. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый полипептид, содержащий первый амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную любой из

аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый/и/или второй Fc-домен человека содержит пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

[134] Также в данном документе представлены способы лечения индивидуума, у которого имеется амилоидное заболевание, или предположительно страдающего от него, включающий: определение наличия у индивидуума амилоидных отложений с помощью: детектируемым образом мечения любого из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе, введение индивидууму меченого слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, определение того, может ли сигнал, связанный с детектируемой меткой, быть обнаружен у индивидуума; и, если сигнал обнаружен, введения индивидууму средства лечения амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления, если сигнал не обнаружен, у индивидуума проводят мониторинг в отношении дальнейшего развития амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, выше которого определяется, что индивидуум имеет амилоидные отложения. В некоторых вариантах осуществления лечение амилоидоза включает введение индивидууму любого из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый полипептид, содержащий первый амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый/и/или второй Fc-домен человека содержит пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

[135] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены способы идентификации амилоидных отложений у индивидуума, включающие введение индивидууму детектируемым образом меченого слитого белка и детектирование сигнала от слитого белка.

V. СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

[136] В данном документе также представлены способы идентификации амилоидных отложений у индивидуума.

[137] Способ включает получение образца ткани от субъекта, нанесение пептида или слитого пептида на образец ткани и обнаружение связывания продукта слияния на основе амилоид-реактивного пептида-Fc с амилоидом. Обнаружение присутствия амилоидов может включать визуализацию связывания пептида или слитого пептида с амилоидом с

использованием флуоресценции или стандартных гистохимических методик. Способ может дополнительно включать получение срезов ткани из образцов ткани, окрашивание срезов ткани и обнаружение присутствия амилоидов в образцах тканей путем визуализации связывания пептида с амилоидом с использованием флуоресценции или стандартных гистохимических методик.

[138] В некоторых вариантах осуществления представлен способ идентификации амилоидных отложений у индивидуума, включающий детектируемым образом мечение любого из слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе, введение индивидууму слитого белка и обнаружение сигнала от слитого белка. Можно использовать любой из детектируемым образом меченых слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе пептида-Fc является меченым радиоактивным изотопом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе пептида-Fc является меченым радиоактивным изотопом I-¹²⁵. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc обнаруживают с помощью визуализации на основе СПЕКТ/СТ, визуализации на основе ПЕТ/СТ, гамма-сцинтиграфии или оптической визуализации. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе пептида-Fc является флуоресцентно меченым. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение интенсивности сигнала. В некоторых вариантах осуществления интенсивность сигнала определяют с помощью сканирования на основе СПЕКТ/СТ или микрорентгенографии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый полипептид, содержащий первый амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер. В некоторых вариантах осуществления амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления первый/и/или второй Fc-домен человека содержит пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

[139] В определенных вариантах осуществления слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению могут быть присоединены к средствам визуализации, применимым для визуализации амилоидов в органах и тканях. Например, слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению могут быть присоединены к средству визуализации, вводимому субъекту, и точное местоположение амилоида может быть определено с помощью стандартных методик визуализации. Пептиды, которые не являются селективными в отношении амилоидов, можно использовать в качестве контроля для сравнения. Таким образом, биораспределение слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по

настоящему изобретению можно сравнить с биораспределением одного или более неселективных или контрольных пептидов для обеспечения еще более высокой избирательности при обнаружении и/или локализации амилоидов.

[140] Способы визуализации амилоидов включают без ограничения магнитно-резонансную томографию (MRI), компьютерную аксиальную томографию (САТ), позитронно-эмиссионную томографию (РЕТ), ультразвуковую визуализацию, рентгеновские лучи, радионуклидную визуализацию, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT) и мультифотонную микроскопию.

[141] Для повышения чувствительности сканирования можно использовать различные контрастные вещества. Контрастные вещества для сканирования могут включать все молекулы, которые ослабляют рентгеновские лучи. Для позитронно-эмиссионной томографии и радионуклидной визуализации можно использовать радиоизотопы. Все изотопы, излучающие позитроны, применимы для визуализации радионуклидов позитронно-эмиссионной томографии, а все изотопы, излучающие γ -фотоны, применимы для визуализации радионуклидов для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии или сцинтиграфии.

[142] Контрастные средства для ультразвуковой визуализации включают положительные средства и отрицательные средства. Положительные средства отражают ультразвуковую энергию и, таким образом, создают положительное (световое) изображение. Соответственно, отрицательные средства усиливают проницаемость или акустическую прозрачность и, таким образом, создают отрицательное (темное) изображение. Различные вещества - газы, жидкости, твердые вещества и их комбинации - исследовали в качестве потенциальных средств, усиливающих контрастность. Примеры контрастных веществ на основе твердых частиц, раскрытые в патенте США № 5558854 включают без ограничения частицы IDE и SHU454. В европейской патентной заявке 0231091 раскрыты эмульсии типа «масло в воде», содержащие высокофторированные органические соединения, обеспечивающие повышенный контраст ультразвукового изображения. Эмульсии, содержащие перфтороктилбромид (PFOB), также исследовали в качестве средств ультразвуковой визуализации. В патенте США № 4900540 описано применение липосом на основе фосфолипидов, содержащих газ или предшественник газа, в качестве средства, усиливающего контрастность.

[143] Средства визуализации могут быть присоединены к слитым белкам на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению с использованием известных способов. Определенные способы прикрепления включают использование металлохелатного комплекса с использованием, например, органического хелатирующего средства, такого как ДТРА. Приемлемые хелаты известны в данной области техники. Они включают без ограничения 1,4,7,10-тетраазаацетилдодекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (ДОТА); 1,4,7,10-тетраазаацетилдодекан-N, N',N''-триуксусную кислоту (ДОЗА); 1,4,7-трис(карбоксиметил)-10-(2-гидроксипропил)-1,4,7,10-тетраазаацетилдодекан (HP-ДОЗА); диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DPTA); и многие другие.

[144] Некоторые классы соединений потенциально могут использоваться в качестве контрастных средств для МРТ. К этим классам относятся супрапарамагнитные частицы оксида железа, нитроксиды и парамагнитные хелаты металлов (Mann et al., 1995). Предпочтительным является сильный парамагнитный металл. Обычно парамагнитные лантаноиды и ионы переходных металлов являются токсичными *in vivo*. Таким образом, необходимо включать эти соединения в хелаты с органическими лигандами. Слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению можно использовать для усиления доставки таких хелатных металлов к амилоидам, что позволяет снизить общую дозу композиции для визуализации, которая в противном случае потребовалась бы.

[145] Для хелатирования подходящими являются парамагнитные металлы широкого спектра. Подходящие металлы включают металлы, имеющие атомные номера 22-29 (включительно), 42, 44 и 58-70 (включительно) и степени окисления 2 или 3. Примеры таких металлов включают без ограничения хром (III), марганец (II), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь (II), празеодим (III), неодим (III), самарий (III), гадолиний (III), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III), эрбий (III), иттербий (III) и ванадий (II). Ионы, применимые в других контекстах, таких как рентгеновская визуализация, включают без ограничения лантан (III), золото (III), свинец (II) и особенно висмут (III).

[146] Среди радиоизотопов, которые можно использовать для мечения слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению, которые являются подходящими для исследований локализации, являются гамма-излучатели, излучатели позитронов, рентгеновские излучатели и излучатели флуоресценции. Подходящие радиоизотопы для мечения пептидов и слитых белков включают астат²¹¹, бром⁷⁶, ¹⁴углерод, ¹¹углерод, ⁵¹хром, ³⁶хлор, ⁵⁷кобальт, ⁵⁸кобальт, медь⁶⁷, медь⁶⁴, ¹⁵²европий, фтор¹⁸, галлий⁶⁷, галлий⁶⁸, ³водород, йод¹²³, йод¹²⁴, йод¹²⁵, йод¹²⁶, йод¹³¹, индий¹¹¹, индий^{113m}, ⁵⁹железо, ¹⁷⁷лютеций, ртуть¹⁰⁷, ртуть²⁰³, ³²фосфор, рений¹⁸⁶, рений¹⁸⁸, рутений⁹⁵, рутений⁹⁷, рутений¹⁰³, рутений¹⁰⁵, рений^{99m}, рений¹⁰⁵, рений¹⁰¹, ⁷⁵селен, ³⁵сера, технеций^{99m}, теллур^{121m}, теллур^{122m}, теллур^{125m}, тулий¹⁶⁵, тулий¹⁶⁷, тулий¹⁶⁸ и иттрий⁹⁰. Галогены могут использоваться в качестве меток более или менее взаимозаменяемо. Гамма-излучатели, йод¹²³ и технеций^{99m}, также могут использоваться, поскольку такие радиометаллы обнаруживаются с помощью гамма-камеры и имеют период полураспада, благоприятный для визуализации *in vivo*. Также можно использовать излучатели позитронов ¹⁸фтор или ¹²⁴йод, которые являются подходящими для визуализации PET и имеют период полураспада, подходящий для визуализации пептидов. Пептиды и слитые пептиды по настоящему изобретению можно пометить индием¹¹¹ или технецием^{99m} посредством конъюгированного хелатора металла, такого как ДТРА (диэтилентриаминпентауксусная кислота), или ковалентно и непосредственно к фланкирующему пептиду, который содержит остаток Cys.

[147] Радиоактивно меченые слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению можно получить в соответствии с хорошо известными в

данной области техники способами. Например, их можно йодировать путем контакта с йодидом натрия или калия и химическим окислителем, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окислителем, таким как лактопероксидаза. Пептиды или слитые пептиды в соответствии с настоящим изобретением можно пометить технецием^{99m} с помощью процесса лигандной замены, например, путем восстановления пертехната раствором олова, хелатирования восстановленного технеция на колонке с сефадексом и нанесения пептида на эту колонку, или с помощью методик прямого мечения, например, путем инкубации с пертехнатом, восстанавливающим средством, таким как SnCl₂, буферным раствором, таким как раствор фталата натрия-калия, и пептидом. Промежуточными функциональными группами, которые часто используются для связывания радиоизотопов, которые существуют в виде ионов металлов, с пептидами, являются диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) и этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), как упоминалось ранее.

[148] Другие применимые метки включают флуоресцентные метки, хромогенные метки и биотиновые метки. Флуоресцентные метки включают без ограничения родамин, флуоресцеинизотиоцианат, флуоресцеин натрия, ренографин и сульфонилхлорид Texas Red. В определенных вариантах осуществления пептиды и слитые пептиды по настоящему изобретению могут быть связаны со вторичным связывающим лигандом или с ферментом (ферментной меткой), который будет образовывать окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, гидропероксидазу (хрена) и глюкозооксидазу. Вторичные связывающие лиганды включают биотин и соединения авидина или стрептавидина. Применение таких меток хорошо известно специалистам в данной области техники в свете и описано, например, в патентах №№ 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149 и 4366241; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

[149] Слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению также могут подвергаться реакции с ферментом в присутствии связующего средства, такого как глутаральдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами готовят в присутствии этих связующих средств или реакцией с изотиоцианатом.

[150] Слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по настоящему изобретению выступают в качестве средств, которые нацеливаются на амилоиды и связывают их, обеспечивая обнаружение амилоидов. Пептиды и слитые пептиды по настоящему изобретению можно применять для определения того, имеется ли у субъекта амилоид и страдает ли субъект амилоидозом или опосредованным амилоидом состоянием.

[151] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ обнаружения амилоидов у субъекта. Способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество одного или более пептидов или слитых пептидов по настоящему изобретению, и обнаружение пептидов или слитых пептидов, связанных с амилоидами. Слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно метить визуализирующим средством, таким как радиоизотоп. Слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc имеют специфическую аффинность

связывания в отношении отложений, и это связывание является детектируемым. Связывание пептидов слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc с амилоидами можно обнаружить с помощью МРТ, компьютерной томографии, ПЭТ-визуализации, ультразвуковой визуализации, визуализации на основе СПЕКТ, рентгеновской визуализации, флуоресцентной визуализации или радионуклидной визуализации.

[152] В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется один или более факторов риска, ассоциированных со связанным с амилоидом заболеванием. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется один или более симптомов связанного с амилоидом заболевания.

[153] Касательно амилоидоза, такое мечение, например, можно использовать для диагностики наличия амилоида, для определения нагрузки амилоидным белком, для мониторинга способности слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывать амилоид у конкретного индивидуума, для мониторинга прогрессирования амилоидоза и/или для мониторинга ответа индивидуума на лечение амилоидом (включая лечение, ассоциированное с введением индивидууму слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc). Например, слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc метят детектируемой меткой, как описано в данном документе, и после этого вводят индивидууму, который страдает или предположительно страдает от амилоидного заболевания (например, амилоидоза, моноклональной гаммапатии неизвестного значения (MGUS), множественной миеломы (MM) или связанных заболеваний плазматических клеток). После этого индивидуума можно визуализировать, например, для обнаружения присутствия детектируемым образом меченых слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

[154] В определенных иллюстративных вариантах осуществления сигналы от детектируемым образом меченых слитых белков на основе амилоид-реактивного пептида-Fc можно определить количественно, тем самым обеспечивая указание уровня амилоидных отложений у индивидуума. Например, интенсивность сигнала можно сравнить со стандартным порогом сигнала, выше которого присутствует амилоидоз, но ниже которого амилоидоз отсутствует или находится на низком уровне. У индивидуума может быть диагностирован амилоид, и в этом случае можно назначить лечение, например, химиотерапию, применение кортикостероидных лекарственных препаратов (леналидомида или талидомида) и/или бортезомиба (велкейда). В качестве дополнения или в качестве альтернативы слитые белки на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, описанные в данном документе, можно вводить индивидууму с целью лечения индивидуума, как описано в данном документе. В определенных иллюстративных вариантах осуществления индивидуумы могут быть разделены на одну или более групп, таких как низкая амилоидная нагрузка, средняя амилоидная нагрузка или высокая амилоидная нагрузка, и затем лечиться соответствующим образом. Для мониторинга прогресса лечения индивидууму могут повторно вводить детектируемым образом меченые слитые белки на основе амилоид-

реактивного пептида-Fc и, следовательно, повторно оценивать его амилоидную нагрузку.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит первый амилоид-реактивный пептид, связанный с N-концом или C-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с N-концом или C-концом второго Fc-домена человека, и при этом первый и второй Fc-домены человека образуют димер.

2. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 1, где первый и второй амилоид-реактивные пептиды связаны с C-концом первого и второго Fc-доменов человека.

3. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13.

4. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-3, где первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

5. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-4, где первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1 человека.

6. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-5, где первый и/или второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

7. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-6, где первый и/или второй амилоид-реактивный пептид связан с первым и/или вторым Fc-доменом человека посредством спейсера.

8. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 7, где спейсер представляет собой пептидный спейсер.

9. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 8, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

10. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-9, где первый полипептид содержит от N- до C-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, и второй полипептид содержит от N-конца до C-конца второй Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид.

11. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 13.

12. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14.

13. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

14. Слитый белок по варианту осуществления 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:17.

15. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-10, где

i) первый полипептид и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20;

ii) первый полипептид и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

iii) первый полипептид и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

16. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 15, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

17. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-9, где первый полипептид содержит от N- до C-конца первый амилоид-реактивный пептид, первый спейсер и первый Fc-домен человека, и второй полипептид содержит от N-конца до C-конца второй амилоид-реактивный пептид, второй спейсер и второй Fc-домен человека.

18. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 16, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 13.

19. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 17 или варианту осуществления 18, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

20. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 17, где первый и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

21. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из

вариантов осуществления 1-20, где первый и второй полипептиды содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

22. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-15 и 17-21, где первый и второй полипептид содержат разные аминокислотные последовательности.

23. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-22, где слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с γ V λ 6Wil-, A β -, A β (1-40)-, IAAP-, AL κ -, AL λ - или ATTR-амилоидом.

24. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-23, где слитый белок конъюгирован с детектируемой меткой.

25. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по варианту осуществления 23, где детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из флуоресцентной метки и радиоактивной метки.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-24.

27. Нуклеиновая(ые) кислота(ы), кодирующая(ие) слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-25.

28. Вектор, содержащий нуклеиновую(ые) кислоту(ы) по варианту осуществления 26.

29. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 28.

30. Клетка-хозяин по варианту осуществления 29, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (СНО).

31. Способ получения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 29 или варианту осуществления 30 в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

32. Способ по варианту осуществления 31, где способ дополнительно включает извлечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

33. Способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-24 индивидууму, нуждающемуся в этом.

34. Способ по варианту осуществления 33, где связанное с амилоидом заболевание представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

35. Способ по варианту осуществления 33, где связанное с амилоидом заболевание выбрано из группы, состоящей из AL, AH, A β 2M-, ATTR-, транстиретин-, AA-, AApoAI-, AApoAII-, AGel-, ALys-, ALect2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-амилоидоза, болезни Паркинсона, болезнь Альцгеймера или A β -амилоидоза.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 33-35, где лечение слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc приводит к клиренсу амилоида.

37. Способ нацеливания на амилоидные отложения для клиренса, включающий приведение в контакт амилоидных отложений со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-25.

38. Способ по варианту осуществления 37, где нацеливание на амилоидные отложения для клиренса приводит к клиренсу амилоидных отложений.

39. Способ по варианту осуществления 37 или варианту осуществления 38, где клиренс происходит в результате опсонизации амилоидных отложений.

40. Способ лечения индивидуума, у которого имеется заболевание обусловленное амилоидом, или индивидуума с подозрением на заболевание, обусловленное амилоидом, включающий:

определение наличия у индивидуума амилоидного отложения с помощью:

детектируемым образом мечение слитого белка обусловленное амилоид-реактивным пептидом-Fc по любому из вариантов осуществления 1-25,

введение индивидууму меченого слитого белка обусловленного амилоид-реактивного пептида-Fc,

определение того, может ли сигнал, ассоциированный с детектируемой меткой, быть обнаружен у индивидуума; и,

если сигнал обнаружен, индивидууму назначают лечение амилоидоза.

41. Способ по варианту осуществления 40, где, если сигнал не обнаружен, у индивидуума осуществляют мониторинг в отношении дальнейшего развития амилоидных отложений.

42. Способ по варианту осуществления 40 или варианту осуществления 41, дополнительно включающий определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, выше которого определяется, что индивидуум имеет амилоидные отложения.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 40-42, где лечение амилоидоза включает введение индивидууму слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-25.

44. Способ идентификации амилоидных отложений у индивидуума, включающий детектируемым образом мечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-25, введение индивидууму слитого белка и обнаружение сигнала от слитого белка.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 40-44, где определяется, что у индивидуума отсутствует амилоид или он страдает моноклональной гаммапатией неизвестного значения (MGUS), множественной миеломой (MM) или одним или более связанными заболеваниями плазматических клеток.

46. Способ по варианту осуществления 44 или варианту осуществления 45, где слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc является детектируемым образом меченым.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 40-43 и 46, где слитый белок на

основе амилоид-реактивного пептида-Fc является детектируемым образом меченым радионуклидом или флуорофором.

48. Способ по варианту осуществления 47, где радионуклид представляет собой I-123, I-124, F-18, ZR-89 или Tc-99m.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 40-43 и 46-48, где слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc обнаруживают с помощью визуализации на основе СПЕКТ/СТ, визуализации на основе ПЕТ/СТ, гамма-сцинтиграфии или оптической визуализации.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 33-49, где индивидуум представляет собой человека.

51. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из вариантов осуществления 1-25, где амилоид-реактивный пептид-Fc, первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны дисульфидной связью в Fc-домене.

1A. Слитый белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит первый амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с С-концом второго Fc-домена человека, и где первый и второй Fc-домены человека образуют димер.

2A. Слитый белок по варианту осуществления 1A, где первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13.

3A. Слитый белок по варианту осуществления 1A или варианту осуществления 2A, где первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

4A. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1A-3A, где первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1 человека.

5A. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1A-4A, где первый и/или второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

6A. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1A-5A, где первый и/или второй амилоид-реактивный пептид связан с первым и/или вторым Fc-доменом человека посредством спейсера.

7A. Слитый белок по варианту осуществления 6A, где спейсер представляет собой пептидный спейсер.

8A. Слитый белок по варианту осуществления 7A, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

9A. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 6A-8A, где первый полипептид содержит от N- до С-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, и второй полипептид содержит от N-конца до С-конца

второй Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид.

10А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-9А, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

11А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-10А, где слитый белок связывается с γ V λ 6Wil-, A β -, A β (1-40)-, IAAP-, ALk4-, A1 λ 1- или ATTR-амилоидом.

12А. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-11А, где слитый белок конъюгирован с детектируемой меткой.

13А. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-12А.

14А. Нуклеиновая(ые) кислота(ы), кодирующая(ие) слитый белок по любому из вариантов осуществления 1А-12А.

15А. Вектор, содержащий нуклеиновую(ые) кислоту(ы) по варианту осуществления 14А.

16А. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 15А.

17А. Клетка-хозяин по варианту осуществления 16А, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (СНО).

18А. Способ получения слитого белка, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 16А или варианту осуществления 17А в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок.

19А. Способ по варианту осуществления 18А, где способ дополнительно включает извлечение слитого белка.

20А. Способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из вариантов осуществления 1А-12А индивидууму, нуждающемуся в этом.

21А. Способ по варианту осуществления 20А, где связанное с амилоидом заболевание представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

22А. Способ по варианту осуществления 20А, где связанное с амилоидом заболевание выбрано из группы, состоящей из AL, AH, A β 2M-, ATTR-, транстиретин-, AA-, A ρ oAI-, A ρ oAII-, AGel-, ALys-, ALEct2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP- или A β -амилоидоза.

23А. Способ по любому из вариантов осуществления 20А-22А, где лечение слитым белком приводит к клиренсу амилоида.

24А. Способ нацеливания на амилоидные отложения для клиренса, включающий приведение в контакт амилоидных отложений со слитым белком по любому из вариантов осуществления 1А-12А.

25А. Способ по варианту осуществления 24А, где нацеливание на амилоидные отложения для клиренса приводит к клиренсу амилоидных отложений.

26А. Способ по варианту осуществления 24А или варианту осуществления 25А, где клиренс происходит в результате опсонизации амилоидных отложений.

27А. Способ по любому из вариантов осуществления 20А-26А, где индивидуум представляет собой человека.

28А. Способ лечения индивидуума, страдающего или предположительно страдающего обусловленным амилоидом заболеванием, включающий:

определение наличия у индивидуума амилоидного отложения с помощью:

детектируемым образом мечение слитого белка по любому из вариантов осуществления 1А-12А,

введение индивидууму меченого слитого белка,

определение того, может ли сигнал, ассоциированный с детектируемой меткой, быть обнаружен у индивидуума; и,

если сигнал обнаружен, индивидууму назначают лечение амилоидоза.

29А. Способ по варианту осуществления 28А, где, если сигнал не обнаружен, у индивидуума осуществляют мониторинг в отношении дальнейшего развития амилоидных отложений.

30А. Способ по варианту осуществления 29А, дополнительно включающий определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, выше которого определяется, что индивидуум имеет амилоидные отложения.

31А. Способ по любому из вариантов осуществления 28А-30А, где лечение амилоидоза включает введение индивидууму слитого белка по любому из вариантов осуществления 1А-12А.

32А. Способ идентификации амилоидных отложений у индивидуума, включающий детектируемым образом мечение слитого белка по любому из вариантов осуществления 1А-12А, введение индивидууму слитого белка и обнаружение сигнала от слитого белка.

33А. Способ по любому из вариантов осуществления 28А-32А, где определяется, что у индивидуума отсутствует амилоид или он страдает моноклональной гаммапатией неизвестного значения (MGUS), множественной миеломой (MM) или одним или более связанными заболеваниями плазматических клеток.

ПРИМЕРЫ

[155] Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, но не должны рассматриваться как каким-либо образом ограничивающие его объем. В свете настоящего изобретения и общего уровня квалификации в данной области техники специалисты поймут, что следующие примеры предназначены только для иллюстративного характера и что многочисленные изменения, модификации и изменения могут быть использованы без выхода за рамки объема объекта изобретения, раскрытого в настоящем изобретении. Прилагаемые фигуры следует рассматривать как неотъемлемую часть описательной части и описания настоящего изобретения.

Пример 1. Получение конструкций на основе пептида-Fc

[156] В следующем примере описано получение конструкций слитого белка на

основе амилоид-реактивного пептида-Fc. Структуры иллюстративных конструкций представлены на **фиг. 1**. В одной конструкции, обозначаемой Fcp5R NV1, пептид p5R был слит с N-концом первого и второго Fc-домена посредством короткого жесткого спейсера (VSPSV, SEQ ID NO: 15), как показано в верхнем ряду **фиг. 1**. Во второй конструкции, обозначаемой Fcp5R CV1, пептид p5R был слит с C-концом первого и второго Fc-домена посредством короткого жесткого спейсера (VSPSV, SEQ ID NO: 15), как показано во втором ряду **фиг. 1**. Аминокислотные последовательности Fcp5R NV1 и Fcp5R CV1 представлены в **таблице 3** ниже.

ТАБЛИЦА 3. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА-FC

| КОНСТРУКЦИЯ | АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ | SEQ ID NO |
|-----------------------------|--|------------------|
| Fcp5R NV1 ИЛИ HFC1NV1 | APGGGRAQRAQARQARQAQRAQRAQARQARQVSPSVD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK | SEQ ID NO: 19 |
| Fcp5R CV1 ИЛИ HFC1CV1 | APGGGSVSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLS LSPGKVSPSVRAQRAQARQARQAQRAQRAQARQARQ | SEQ ID NO: 20 |

[157] Анализ электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) проводили для сравнения препаратов слитых конструкций на основе пептида-Fc со слитыми конструкциями на основе пептида-антитела. Слитые конструкции получали в клетках яичника китайского хомячка (CHO) с 2% фетальной бычьей сывороткой (FBS). Образцы измельчали и кипятили. 4-12% гели Bis-Tris использовали с буфером 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), а для обнаружения белков использовали краситель Кумасси синий. Как показано на **фиг. 2**, конструкция Fcp5R CV1 (дорожка 6) была больше по размеру, чем конструкция Fcp5R NV1 (дорожка 5). Не желая ограничиваться теорией, полагают, что этот способ получения привел к созданию конструкций, которые были чувствительны к расщеплению амилоидсвязывающего пептида (в случае Fcp5R NV1, дорожка 5) или устойчивы к расщеплению пептида (в случае Fcp5R

CV1, дорожка 6). Данные показали, что положение пептида в Fc-доме может защитить его от протеолиза во время продуцирования.

[158] Для дальнейшего анализа Fcp5R NV1 и Fcp5R CV1 проводили эксклюзионную хроматографию (SEC). Как показано на **фиг. 3**, Fcp5R NV1 и Fcp5R CV1 элюировались из колонки в разное время, что указывает на то, что две конструкции имели разный размер. Fcp5R CV1 элюировался раньше NV1, что указывает на то, что он имел более высокую молекулярную массу, что согласуется с наблюдениями анализа на основе SDS-PAGE (**фиг. 2**), согласно которым пептид был устойчив к протеолитическому расщеплению во время получения реагента. В отличие от этого, Fcp5R NV1 был чувствителен к протеолитическому расщеплению.

Пример 2. Биораспределение пептида-Fc у мышей

[159] В следующем примере описано радиоактивное йодирование Fcp5R CV1 и введение радиоактивно меченого Fcp5R CV1 мышам с АА-амилоидозом.

[160] Fcp5R CV1 метили радиоактивным изотопом I-¹²⁵. Антитело 11-1F4 выступало в качестве контроля реакции радиоактивного мечения. Как показано на **фиг. 4**, Fcp5R CV1, продуцируемый клетками HD CHO, выращенными в 2% FBS, легко метили радиоактивным изотопом I-¹²⁵ и элюировали синим декстраном. Извлечение из колонки и пробирок было превосходным. С помощью геля для SDS-PAGE было показано, что во время процедуры радиоактивного мечения агрегаты не образовывались и препарат имел высокую чистоту и высокую радиочистоту (т.е. признаки наличия свободного радиойодида в геле SDS-PAGE отсутствовали).

[161] ¹²⁵I-Fcp5R CV1 вводили мышам с системным АА-амилоидозом. Модель АА-амилоидоза создавали с помощью IV введения 0,1 мг выделенного фактора усиления амилоидоза (AEF, Axelrad *et al.*, *Lab Invest* (1982)47: 139-146) в 100 мкл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) трансгенным мышам H2-Ld-huIL-6 Tg Balb/c, конститутивно экспрессирующим трансген интерлейкина-6 человека. Мыши, используемые в этих исследованиях, находились в состоянии, соответствующем 4-6 неделям после индукции амилоидоза. Модель мышей с АА характеризуется обширными синусоидальными амилоидными отложениями в печени, начальными и массивными перифолликулярными амилоидными отложениями в селезенке, а затем амилоидными отложениями в поджелудочной железе, почках, надпочечниках, кишечнике и незначительными интерстициальными амилоидными отложениями в сердце.

[162] ¹²⁵I-Fcp5R CV1 (~10 мкг, ~ 100 мкCi) вводили с помощью внутривенной инъекции в хвостовую вену мышам с АА-амилоидозом, и биораспределение ¹²⁵I-Fcp5R CV1 определяли в определенные временные точки после инъекции. В частности, группам мышей с АА (*n*=4 на группу) вводили меченый ¹²⁵I Fcp5R CV1, а затем подвергали эвтаназии через 1, 4 или 24 часа после инъекции. Образцы селезенки, поджелудочной железы, левой и правой почки, печени, сердца, мышц, желудка, верхнего и нижнего отдела кишечника и легочной ткани собирали у мышей с АА после эвтаназии. Каждый образец помещали в тарированный пластиковый флакон и взвешивали, а радиоактивность ¹²⁵I

измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика Wizard 3 (гамма-счетчик Уоллака 1480, 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 в течение 24 часов и заливали в парафин для гистологического и автордиографического анализа. Для автордиографии срезы толщиной 4-6 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 воздействия 96 часов. Каждый срез контрокрашивали гематоксилином.

[163] Как показано на **фиг. 5-8**, ^{125}I -Fcp5R CV1 обнаруживали у мышей, в частности, в печени и селезенке, основных местах амилоидных отложений в этой мышинной модели. Дополнительное поглощение индикатора наблюдали в почках (**фиг. 5**). Связывание с амилоидными отложениями в печени и селезенке визуализировали с помощью изображений на основе СPECT/СТ небольших животных, которые продемонстрировали гепато-селезеночное поглощение радиоактивного йода Fcp5R CV1 в течение более 24 часов после инъекции (**фиг. 6**). Специфическое связывание с амилоидными отложениями в сердце, печени и селезенке демонстрировали с помощью микроавтордиографии (**фиг. 7-8**). На микроавторентгенограммах (ARG) наличие радиоактивно меченого Fcp5R CV1 указывали на отложение черных зерен серебра. Распределение зерен серебра и, следовательно, ^{125}I -Fcp5R CV1 коррелировало с распределением амилоида, показанным на последовательных срезах ткани, окрашенных конго красным (конго красный). Специфическая реактивность ^{125}I -Fcp5R CV1 по отношению к амилоиду в этих тканях наблюдали также в более поздние временные точки (24 часа) после инъекции (**фиг. 8**).

Пример 3. Связывание и фагоцитоз фибрилл rV λ 6Wil

[164] Способность слитых белков на основе пептида-Fc стимулировать фагоцитоз амилоидных фибрилл изучали с использованием системы меченых красным pHrodo фибрилл rV λ 6Wil.

[165] Клетки THP1 человека (10^6 клеток/лунка) наносили на лунки 24-луночного обработанного тканевой культурой планшета. Добавляли аликвоту 50 нг/мл форболмиристата ацетата (PMA) и клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Через 24 часа культуральную среду, содержащую PMA, осторожно удаляли и заменяли полной средой DMEM-F12, и клетки оставляли в течение минимум 48 часов. Для проведения анализа фагоцитоза среду удаляли из лунок, после чего промывали PBS в модификации Дульбекко и в каждую лунку добавляли аликвоту 500 мкл RPMI. Варианты Fcp5R или контрольный hFc1 смешивали с мечеными красным pHrodo фибриллами в соответствующей концентрации перед началом добавления к клеткам в 24-луночном планшете. После осторожного перемешивания планшет инкубировали в течение 1 часа при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ для облегчения фагоцитоза. В конце 1-часовой инкубации флуоресцентное излучение красного флуорофора pHrodo визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа с использованием объектива 4x и красного

флуоресцентного фильтра. Для каждой лунки получали четыре изображения, чтобы гарантировать, что все области лунки охвачены и представлены без какого-либо смещения. Количество флуоресценции на каждом изображении определяли количественно с помощью сегментации и количественного анализа изображений (Image ProPlus). Единицы флуоресценции измеряли в виде цифровых спектральных показателей.

[166] Как показано на **фиг. 9**, Fcp5R CV1 способствовал поглощению фибрилл Wil в большей степени, чем Fcp5R NV1. Не желая ограничиваться теорией, полагают, что повышенная фагоцитарная активность, индуцированная Fcp5R CV1, обусловлена присутствием полноразмерного амилоид-реактивного пептида в этом варианте по сравнению с Fcp5R NV1. Кроме того, Fcp5R CV1 проявлял дозозависимый ответ на поглощение фибрилл Wil, как показано на **фиг. 10**.

[167] Кроме того, измеряли способность Fcp5R CV1 связывать фибриллы rV λ 6Wil по сравнению с контролем Fc1 человека. Как показано на **фиг. 11**, Fcp5R CV1 связывал фибриллы rV λ 6Wil с EC₅₀ 2,5 нМ, тогда как контрольный Fc1 человека не связывал фибриллы.

Пример 4. Разработка дополнительных конструкций на основе пептида-Fc

[168] Рассматривают дополнительные конструкции на основе пептида-Fc. В одной конструкции пептид p5R слит с С-концом первого и второго Fc-домена посредством гибкого длинного спейсера (GGGSGGGGS, SEQ ID NO: 16), как показано в третьем ряду **фиг. 1**. В другой конструкции пептид p5R+14 (удлиненный вариант p5R с еще 14 аминокислотами, включая дополнительные четыре амилоидсвязывающих остатка аргинина) слит с С-концом первого и второго Fc-домена посредством короткого жесткого спейсера (VSPSV, SEQ ID NO: 15), как показано в нижнем ряду **фиг. 1**. Аминокислотные последовательности этих конструкций представлены в **таблице 4** ниже.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности конструкций на основе пептида-Fc

| КОНСТРУКЦИЯ | АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ | SEQ ID NO |
|---|--|------------------|
| HFC1CV2 IGG1-FC P5R, ГИБКИЙ ДЛИННЫЙ СПЕЙСЕР | APGGGSVSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSRAQRAQARQARQ AQRAQRAQARQARQ | SEQ ID NO: 21 |
| HFC1CV3 IGG1- FC P5R+L4, | APGGGSVSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI | SEQ ID NO: 22 |

| | | |
|-----------------|--|--|
| КОРОТКИЙ | SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT | |
| ЖЕСТКИЙ | KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN | |
| СПЕЙСЕР | KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV | |
| | SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS | |
| | DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNY | |
| | TQKLSLSLSPGKVSFVRAQRAQARQARQARQARQ | |
| | ARQARQARQARQARQARQ | |

Пример 5. БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ^{125}I -FCP5RCV1 У МЫШЕЙ С СИСТЕМНЫМ АМИЛОИДОЗОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С АМИЛОИДНЫМ БЕЛКОМ А (AA) СЫВОРОТКИ КРОВИ.

[169] hFc1CV1 экспрессировался временно трансфицированными клетками CHO. Слитый Fc-пептид очищали с помощью белка А. hFc1CV1 подвергали радиоактивному мечению йодом-125 путем окислительного включения в боковые цепи тирозина. Свободный радиоактивно меченый йодид отделяли эксклюзионной хроматографией и радиочистоту оценивали с помощью SDS-PAGE и автордиографии.

[170] Примерно 100 мкCi (10 мкг реагента) вводили IV в латеральную хвостовую вену мышам с системным AA-амилоидозом или мышам дикого типа без амилоида (в качестве контроля). У трансгенных мышей с AA развивается системный амилоидоз во всех органах и тканях, но он характеризуется тяжелым амилоидозом в печени, селезенке и почках и лишь незначительными отложениями в сердце. Через 1 час, 4 часа, 24 часа и 48 часов после инъекции мышей (n=4 на группу) подвергали эвтаназии передозировкой изофлурана и получали изображения на основе СPECT/CT.

[171] Непосредственно после этого собирали образцы или органы и кровь для измерения тканевой радиоактивности как показателя биораспределения реагентов в органах. Этот анализ выявил быстрое накопление в органах, насыщенных амилоидом, в течение 1 часа после инъекции, в частности, задержку ^{125}I -hFc1CV1 в печени, селезенке, почках, желудке и сердце с уменьшением радиоактивности, наблюдаемым в этих органах с течением времени (фиг. 12А).

[172] Через 48 часов после инъекции наблюдалось значительное удержание радиоактивно меченого hFc1CV1 в печени, селезенке, поджелудочной железе, желудке и сердце по сравнению с ^{125}I -hFc1CV1 у мышей дикого типа, что указывает на специфическое связывание с лигандом амилоидом в этих органах (фиг. 12В).

[173] Распределение радиоактивно меченого hFc1CV1 в органах мышей с AA оценивали с помощью микроавтордиографии. Образцы ткани фиксировали в течение 24 ч в 10% забуференном формалине, заливали в парафиновые блоки и срезы ткани толщиной 6 мкм готовили на предметных стеклах. Предметные стекла подвергали воздействию фотоэмульсии в течение трех дней, а затем контрокрашивали Н и Е. О наличии радиоактивности в тканях свидетельствовало отложение черных зерен серебра. Во всех исследуемых органах наблюдали связывание радиоактивно меченого hFc1CV1,

ассоциированное с амилоидными отложениями в ткани, что указывает на специфическое связывание с патологическим участком (фиг. 13А и фиг. 13В). Через 1 час после инъекции (фиг. 13А) 125I-hFc1CV1 уже накапливался в определенных участках тканей, о чем свидетельствуют автордиограммы (ARG), что коррелировало с наличием амилоида, наблюдаемого как зелено-золотое двойное лучепреломление в окрашенных конго красным (CR) срезах тканей. Через 24 часа после инъекции (фиг. 13В) интенсивное и специфическое связывание амилоида 125I-hFc1CV1 все еще было заметным в ARG.

Пример 6. hFc1CV1 УСИЛИВАЕТ ФАГОЦИТОЗ ЭКСТРАКТА AL-АМИЛОИДА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

[174] hFc1CV1 экспрессировали стабильно трансфицированные клетки СНО, выращенные в условиях перфузионного культивирования и очищенные в день 7. Слитый Fc-пептид очищали с помощью белка А.

[175] Амилодоподобные фибриллы (rVλ6WIL), экстракты AL человека (ALλ или ALκ) и экстракты амилоида ATTRwt человека метили рН-чувствительным красителем сукцинимидил-флуорофором рHгодо красным для использования в анализе фагоцитоза *ex vivo*. Клетки ТНР-1 человека активировали добавлением форболмиристата ацетата (РМА) и высевали в лунки 24-луночного планшета для культивирования тканей. Массу амилоидного экстракта массой 20 мкг добавляли в лунки с возрастающими количествами hFc1CV1 или контрольного антитела на основе hIgG1 (6 нМ, 20 нМ, 60 нМ и 200 нМ) и планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Лунки просматривали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Keyence BZ X800) и получали четыре цифровых изображения (объектив 4x) для каждой лунки. Флуоресценцию на каждом изображении оценивали количественно с использованием спектральной сегментации и определяли среднее значение и стандартное отклонение на основе четырех изображений (фиг. 14А-14D).

[176] Результаты показывают, что hFc1CV1 усиливает фагоцитоз различных экстрактов амилоида активированными человеческими макрофагами ТНР-1 дозозависимым образом с насыщением эффекта при примерно 60 нМ для экстрактов AL и ATTRwt. Усиление эмиссии флуоресценции за счет усиления фагоцитоза амилоидных субстратов было значимо больше, чем у контрольного hIgG1 при всех концентрациях.

[177] Эти данные демонстрируют, что опсонизация амилоида человека с помощью hFc1CV1 приводит к значительному фагоцитозу амилоида макрофагами человека.

Пример 7. ПЛАЗМА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, КАК ИСТОЧНИК СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА, УСИЛИВАЕТ hFc1CV1-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ФАГОЦИТОЗ ЭКСТРАКТА AL-АМИЛОИДА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

[178] hFc1CV1 экспрессировали стабильно трансфицированные клетки СНО, выращенные в условиях перфузионного культивирования и очищенные в день 7. Слитый пептид очищали с помощью белка.

[179] Амилодоподобные фибриллы (rVλ6WIL) и экстракты AL человека (ALλ или ALκ) метили рН-чувствительным красителем сукцинимидил-флуорофором рHгодо. Клетки

ТНР-1 человека активировали добавлением форболмиристата ацетата (РМА) и высевали в лунки 24-луночного планшета для культивирования тканей. Массу экстракта амилоида массой 20 мкг добавляли в лунки с 60 нМ hFc1CV1 в присутствии или в отсутствие 20% плазмы крови человека (в качестве источника системы комплемента). Лунки просматривали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Keyance BZ X800) и получали четыре цифровых изображения (объектив 4x) для каждой лунки. Флуоресценцию на каждом изображении оценивали количественно с использованием спектральной сегментации и определяли среднее значение и стандартное отклонение на основе четырех изображений. Результаты демонстрируют, что плазма крови/система комплемента значительно повышают эффективность hFc1CV1 в индуцировании фагоцитоза экстрактов амилоида человека активированными макрофагами ТНР-1 человека (фиг. 15).

[180] Эти данные демонстрируют, что опсонизация амилоида человека hFc1CV1 в присутствии компонентов системы комплемента в плазме крови приводит к значительно усиленному фагоцитозу амилоида макрофагами человека.

Пример 8. hFc1CV1 СВЯЗЫВАЕТ РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ АМИЛОИДА С СУБНАНОМОЛЯРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

[181] hFc1CV1 экспрессировали стабильно трансфицированные клетки СНО, выращенные в условиях перфузионного культивирования и очищенные в день 7. Слитый пептид очищали с помощью белка А.

[182] В качестве субстрата для связывания hFc1CV1 использовали синтетические амилоидные фибриллы (rVλ6WIL), а также экстракты AL человека (ALλ или ALκ) и экстракты ATTRV- и ATTRwt- амилоида человека. Конъюгат Fc-пептид добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 400 нМ. Обнаружение связанного hFc1CV1 оценивали путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления биотинилированного конъюгата на основе козьего вторичного антитела к человеческому Fc-реактивному пептиду и стрептавидин-европия (фиг. 16). Среднее значение и SD для трех повторов рассчитывали, а активность (EC50) определяли после аппроксимации сигмоидальным уравнением 4 PL с логарифмической осью x (Prism) (таблица 5).

[183] Расчетные значения эффективности (EC50) связывания hFc1CV1 с амилоидными субстратами варьировались от 0,5 нМ (для синтетических фибрилл) до 1,8 нМ для экстракта ATTRv-амилоида. Эти данные демонстрируют высокую аффинность связывания hFc1CV1 с синтетическими фибриллами и экстрактами AL- и ATTR-амилоида человека.

ТАБЛИЦА 5. EC50

| EC50 (M) | ФИБРИЛЛЫ RVλ6WIL | ATTR ДТ (125) | ATTR TV (KEN) | ALA (SHI) | AL K (TAL) |
|-----------------|---------------------|------------------|------------------|-----------|---------------|
| WXPFCP5R CV1 | 5,0E-10 | 7,0E-10 | 1,8E-09 | 1,7E-09 | 5,3E-10 |

[184] Синтетические амилоидные фибриллы (Tau 441, α-синуклеин и Aβ (1-40))

использовали в качестве субстрата для связывания hFcCV1. hFc1CV1 добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 400 нМ (показано 50 нМ для фибрилл A β). Обнаружение связанного hFcCV1 оценивали путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления биотинилированного конъюгата на основе козьего вторичного антитела к человеческому Fc-реактивному пептиду и стрептавидин-европия (фиг. 17). Среднее значение и SD для трех повторов рассчитывали, а активность (EC50) определяли после аппроксимации сигмоидальным уравнением 4 PL с логарифмической осью x (Prism) (таблица 5).

РАСЧЕТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ (EC50) СВЯЗЫВАНИЯ hFc1CV1 С ФИБРИЛЛАМИ СОСТАВЛЯЛИ 7,3 нМ, 7 нМ И 0,7 нМ ДЛЯ А-СИНУКЛЕИНА, TAU 441 И A β (1-40) (ТАБЛИЦА 5).

ПРИМЕР 8. СВЯЗЫВАНИЕ БИОТИНИЛИРОВАННОГО hFc1CV1 С АМИЛОИДОМ В СРЕЗАХ ТКАНИ

[185] Фиксированные формалином и залитые парафином срезы готовили из тканей, содержащих AL- или ATTR-амилоид. Также оценивали дополнительный образец ткани головного мозга пациента с болезнью Альцгеймера. Ткани окрашивали биотинилированным hFc1CV1 (2 мкг/мл в PBS) с использованием стандартных иммуногистохимических методов и визуализировали после добавления диаминобензидина. Присутствие амилоида в препаратах из тех же тканей визуализировали по флуоресценции конго красным после окрашивания тканей раствором щелочного конго красного.

[186] hFcCV1 специфически связывается с диффузными и центральными бляшками, состоящими из бета-амилоида в головном мозге пациента с болезнью Альцгеймера, а также бета-амилоида в сосудистых стенках (фиг. 18A).

[187] Подобным образом специфическое связывание с амилоидом наблюдали при отложениях AL-амилоида в почках и печени (фиг. 18B). Специфическое связывание hFc1CV1 с амилоидными отложениями в сердце, окружающими кардиомиоциты, в двух образцах ATTR- и AL- амилоидоза сердца (фиг. 18C).

[188] Эти данные демонстрируют специфическую реактивность hFc1CV1 в отношении тканевых амилоидных отложений различного типа в различных тканях. Таким образом, реактивность hFc1CV1 в отношении всех видов амилоида, опосредованная пептидом p5R, подтверждается иммуногистохимическим окрашиванием с использованием тканей трех наиболее распространенных форм связанных с амилоидом заболеваний.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит первый амилоид-реактивный пептид, связанный с N-концом или C-концом первого Fc-домена человека, где второй полипептид содержит второй амилоид-реактивный пептид, связанный с N-концом или C-концом второго Fc-домена человека, и при этом первый и второй Fc-домены человека образуют димер.

2. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 1, где первый и второй амилоид-реактивные пептиды связаны с C-концом первого и второго Fc-доменов человека.

3. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 1 или п. 2, где первый и/или второй амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-13.

4. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-3, где первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

5. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-4, где первый и/или второй Fc-домен человека представляет собой Fc IgG1 человека.

6. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-5, где первый и/или второй Fc-домен человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

7. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-6, где первый и/или второй амилоид-реактивный пептид связан с первым и/или вторым Fc-доменом человека посредством спейсера.

8. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 7, где спейсер представляет собой пептидный спейсер.

9. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 8, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-17.

10. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-9, где первый полипептид содержит от N- до C-конца первый Fc-домен человека, первый спейсер и первый амилоид-реактивный пептид, и второй полипептид содержит от N-конца до C-конца второй Fc-домен человека, второй спейсер и второй амилоид-реактивный пептид.

11. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 13.

12. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ

ID NO:2, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14.

13. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14.

14. Слитый белок по п. 10, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:17.

15. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-10, где

i) первый полипептид и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20;

ii) первый полипептид и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

iii) первый полипептид и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

16. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 15, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

17. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-9, где первый полипептид содержит от N- до C-конца первый амилоид-реактивный пептид, первый спейсер и первый Fc-домен человека, и второй полипептид содержит от N-конца до C-конца второй амилоид-реактивный пептид, второй спейсер и второй Fc-домен человека.

18. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 16, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 13.

19. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 17, где амилоид-реактивный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, и спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14.

20. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 17, где первый и/или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

21. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-20, где первый и второй полипептиды содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

22. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-15 и 17-21, где первый и второй полипептиды содержат разные аминокислотные

последовательности.

23. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-22, где слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc связывается с rV λ 6Wil-, A β -, A β (1-40)-, IAAP-, AL κ -, AL λ - или ATTR-амилоидом.

24. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-23, где слитый белок конъюгирован с детектируемой меткой.

25. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по п. 23, где детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из флуоресцентной метки и радиоактивной метки.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-24.

27. Нуклеиновая(ые) кислота(ы), кодирующая(ие) слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-25.

28. Вектор, содержащий нуклеиновую(ые) кислоту(ы) по п. 26.

29. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 28.

30. Клетка-хозяин по п. 29, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (СНО).

31. Способ получения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 29 или п. 30 в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

32. Способ по п. 31, где способ дополнительно включает извлечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc.

33. Способ лечения амилоидного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-24 индивидууму, нуждающемуся в этом.

34. Способ по п. 33, где связанное с амилоидом заболевание представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

35. Способ по п. 33, где связанное с амилоидом заболевание выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретин-, AA-, AAp α AI-, AAp α AI-, AGel-, ALys-, ALect2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-амилоидоза, болезни Паркинсона, болезнь Альцгеймера или A β -амилоидоза.

36. Способ по любому из пп. 33-35, где лечение слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc приводит к клиренсу амилоида.

37. Способ нацеливания на амилоидное отложение для клиренса, включающий приведение в контакт амилоидного отложения со слитым белком на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-25.

38. Способ по п. 37, где нацеливание на амилоидное отложение для клиренса приводит к клиренсу амилоидного отложения.

39. Способ по п. 37 или п. 38, где клиренс происходит в результате опсонизации

амилоидного отложения.

40. Способ лечения индивидуума, у которого имеется заболевание обусловленное амилоидом, или индивидуума с подозрением на заболевание, обусловленное амилоидом, включающий:

определение наличия у индивидуума амилоидного отложения с помощью:

детектируемым образом мечения слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-25,

введение индивидууму меченого слитого белка обусловленного амилоид-реактивного пептида-Fc,

определение того, может ли сигнал, ассоциированный с детектируемой меткой, быть обнаружен у индивидуума; и,

если сигнал обнаружен, индивидууму назначают лечение амилоидоза.

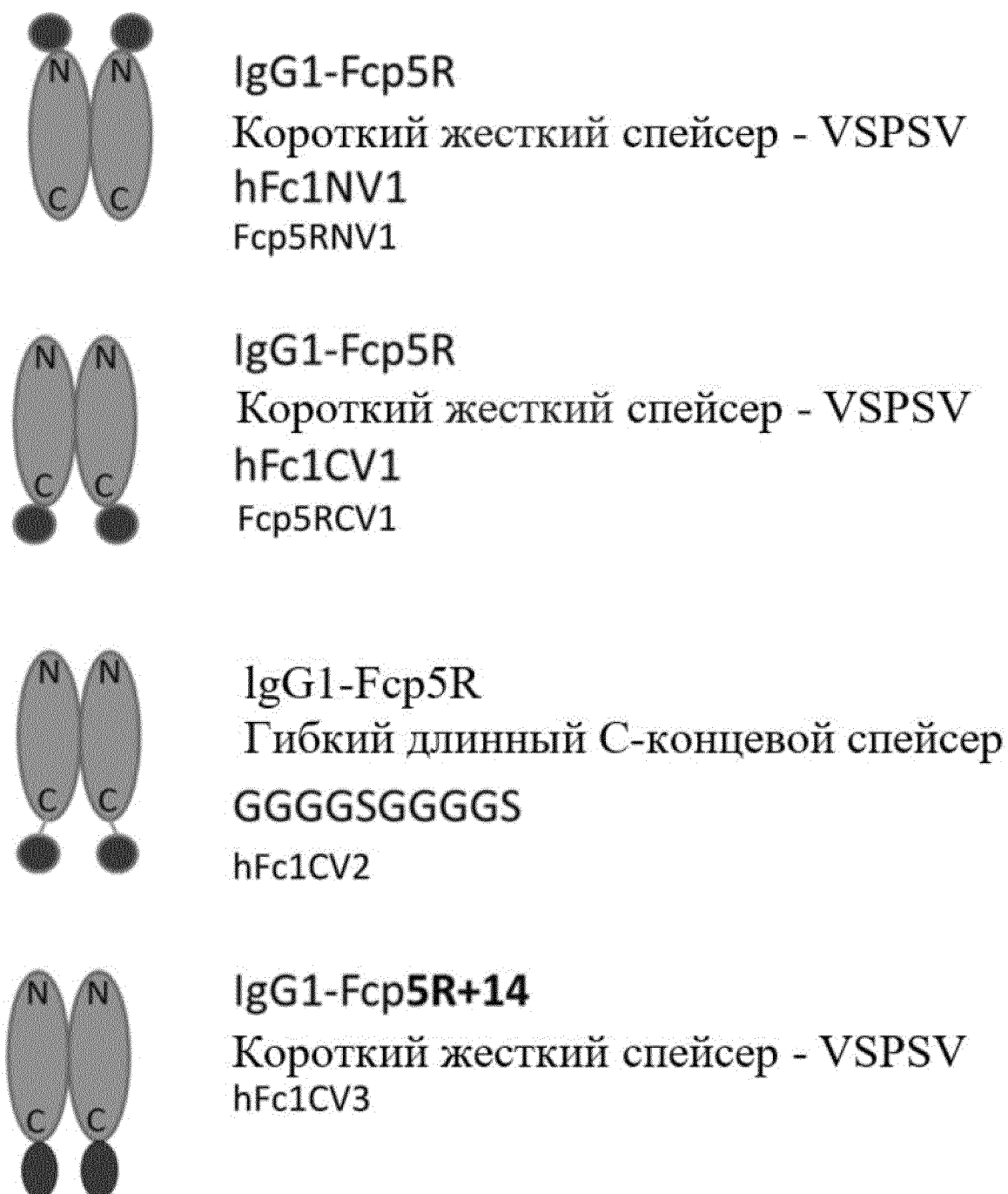
41. Способ идентификации амилоидного отложения у индивидуума, включающий детектируемым образом мечение слитого белка на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-25, введение индивидууму слитого белка и обнаружение сигнала от слитого белка.

42. Способ по п. 40 или п. 41, где слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc является детектируемым образом меченым.

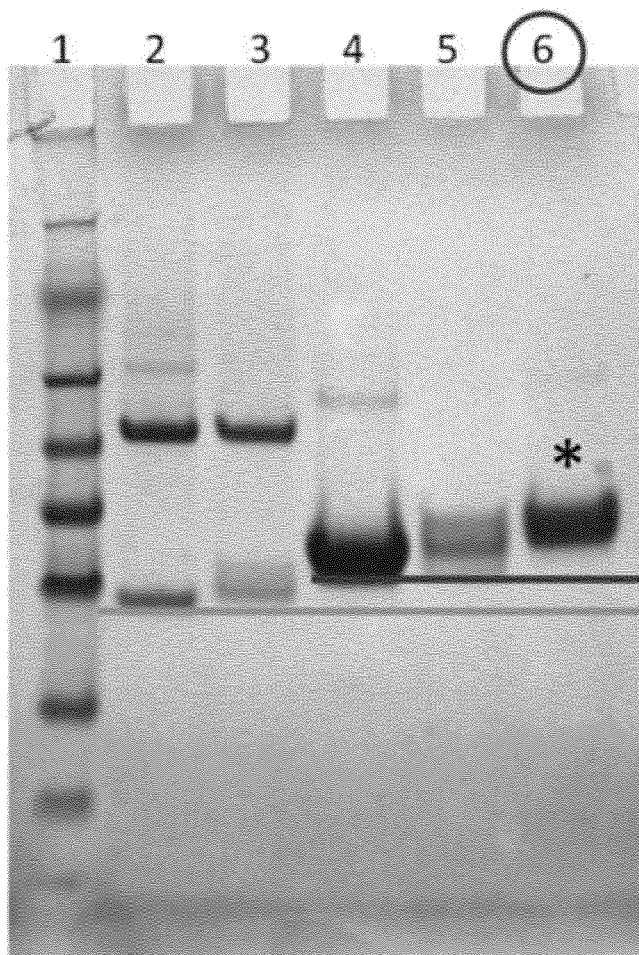
43. Способ по любому из пп. 31-42, где индивидуум представляет собой человека.

44. Слитый белок на основе амилоид-реактивного пептида-Fc по любому из пп. 1-25, где первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны дисульфидной связью в Fc-домене.

По доверенности



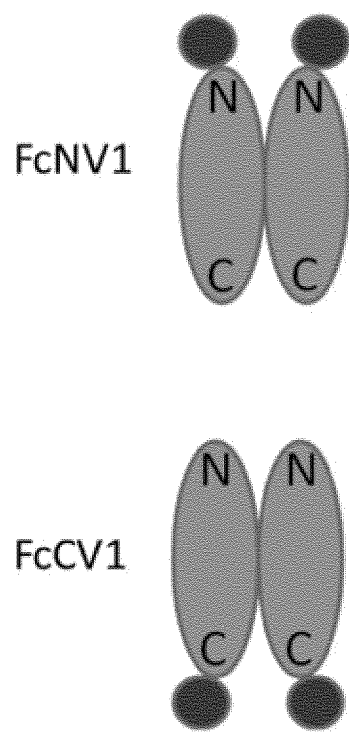
Фиг. 1



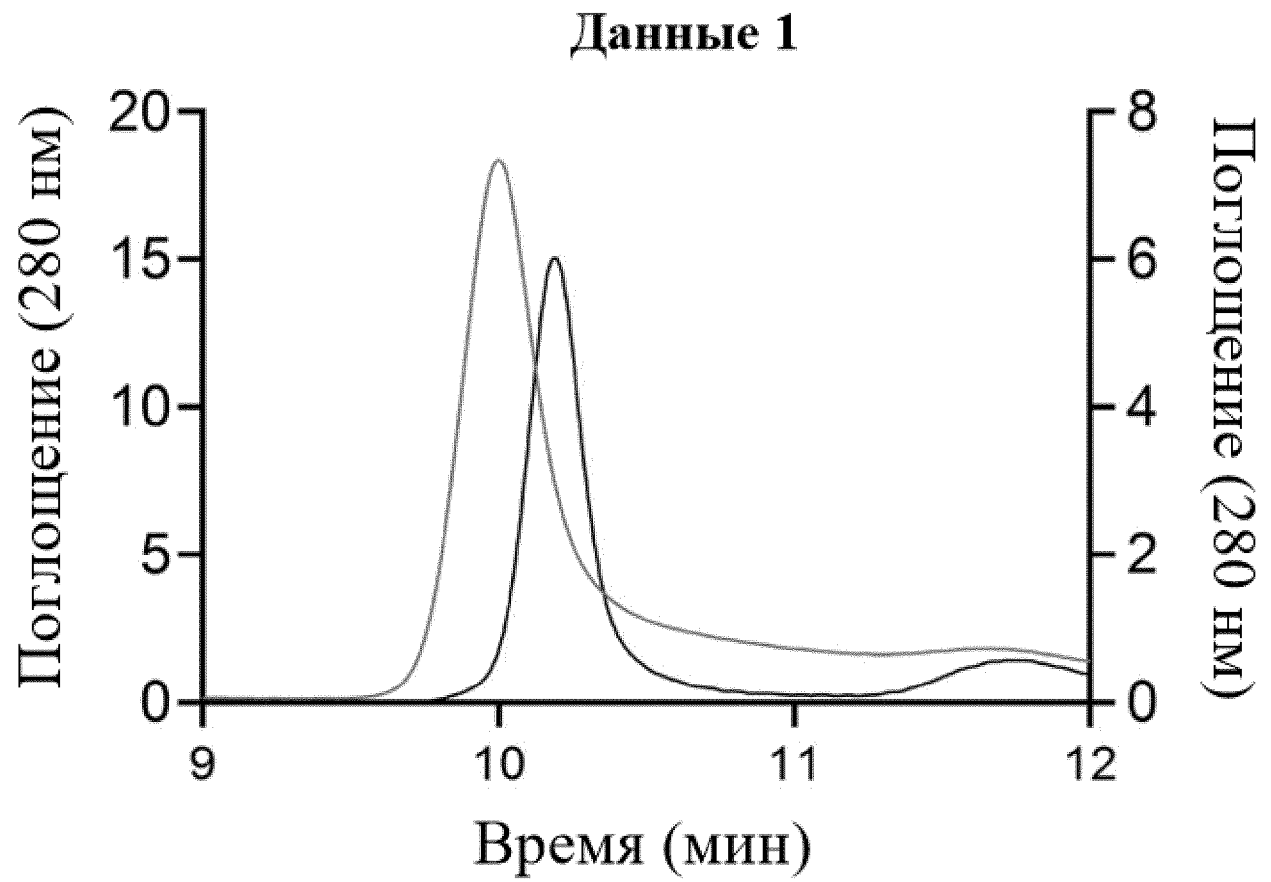
ДОРОЖКА

- | | | |
|-----------------------------|-----------------------|--------|
| 1) MW, стандарты | 10 мкл (синий плюс 2) | |
| 2) Контрольный VH9/VL4 IgG1 | ~2 мг/мл | |
| 3) UT-hlgp5R-NV1-CHO | ~0,9 мг/мл | |
| 4) Контрольный UT-hFc1 | ~0,68 мг/мл | |
| 5) UT-Fcp5R NV1-CHO | ~0,35 мг/мл | hFcNV1 |
| 6) UT-Fcp5R CV1-CHO | ~1,3 мг/мл | hFcCV1 |

Фиг. 2



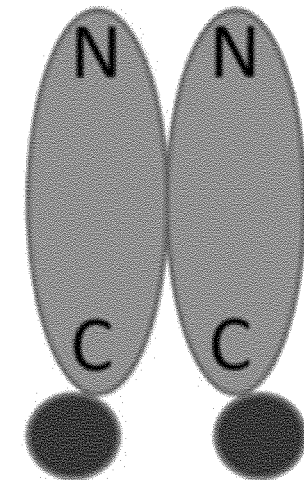
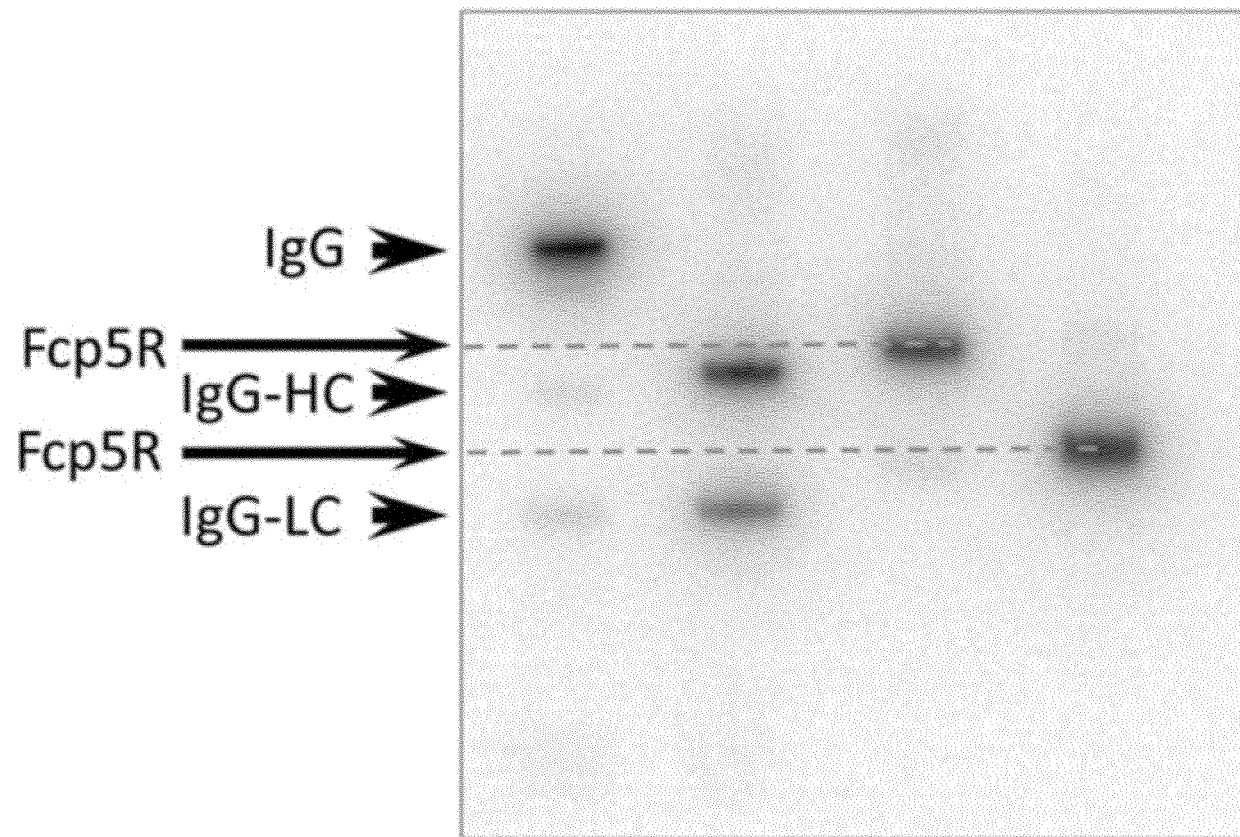
— UT-Fc α 5RCV1(CHO) левая ось
 — UT-Fc α 5RNV1(CHO) правая ось



Фиг. 3

IgG1 МЫШИ ^{125}I -Fcp5RCV1 (CHO 2% FBS)

Н.В. ВОССТ. Н.В. ВОССТ.

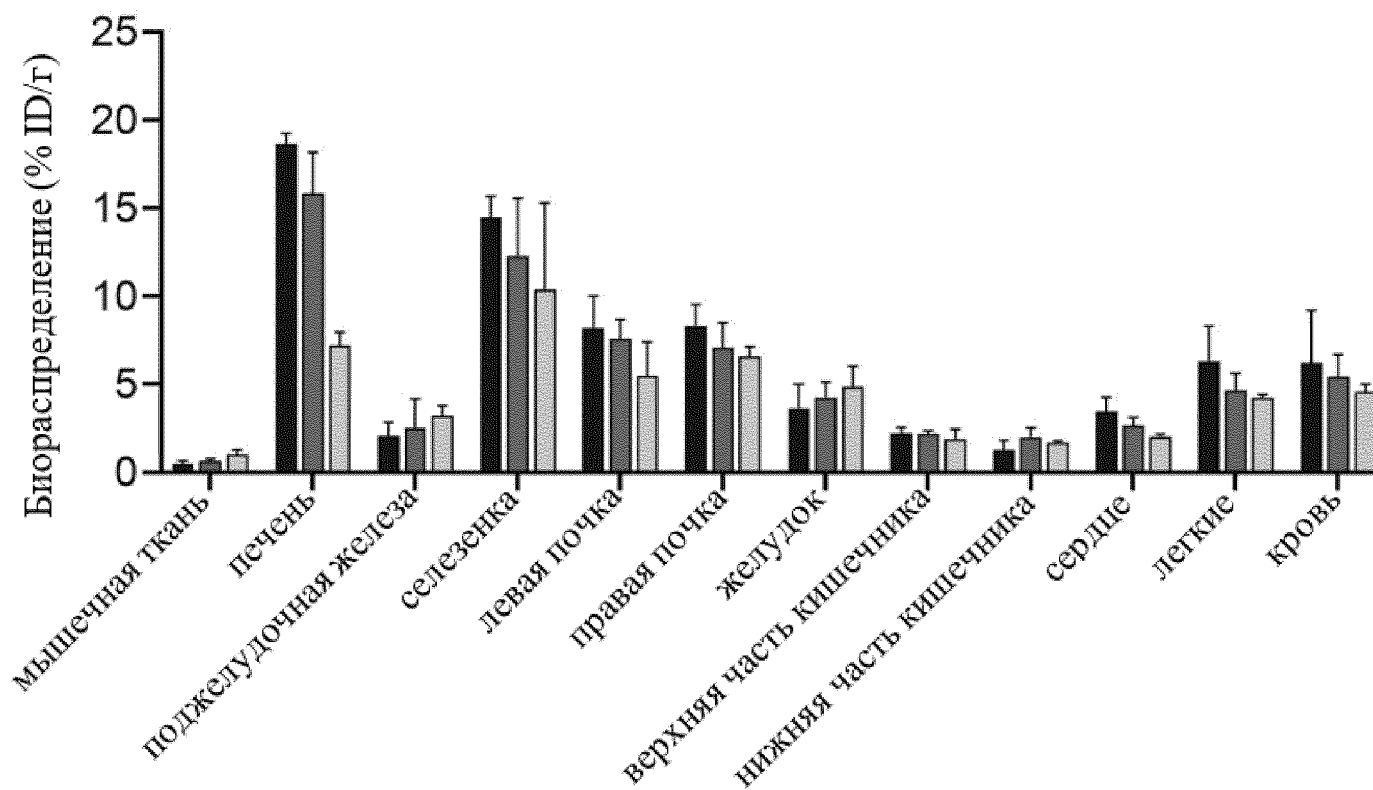


4/20

Фиг. 4

- ^{125}I -CV1 в АА 1 ч после инъекции
- ^{125}I -CV1 в АА 4 ч после инъекции
- ^{125}I -CV1 в АА 24 ч после инъекции

^{125}I -CV1 у мышей с АА с течением времени



Фиг. 5

1 ч после
инъекции 3D

1 ч после
инъекции 2D



4 ч после
инъекции 3D

4 ч после
инъекции 2D

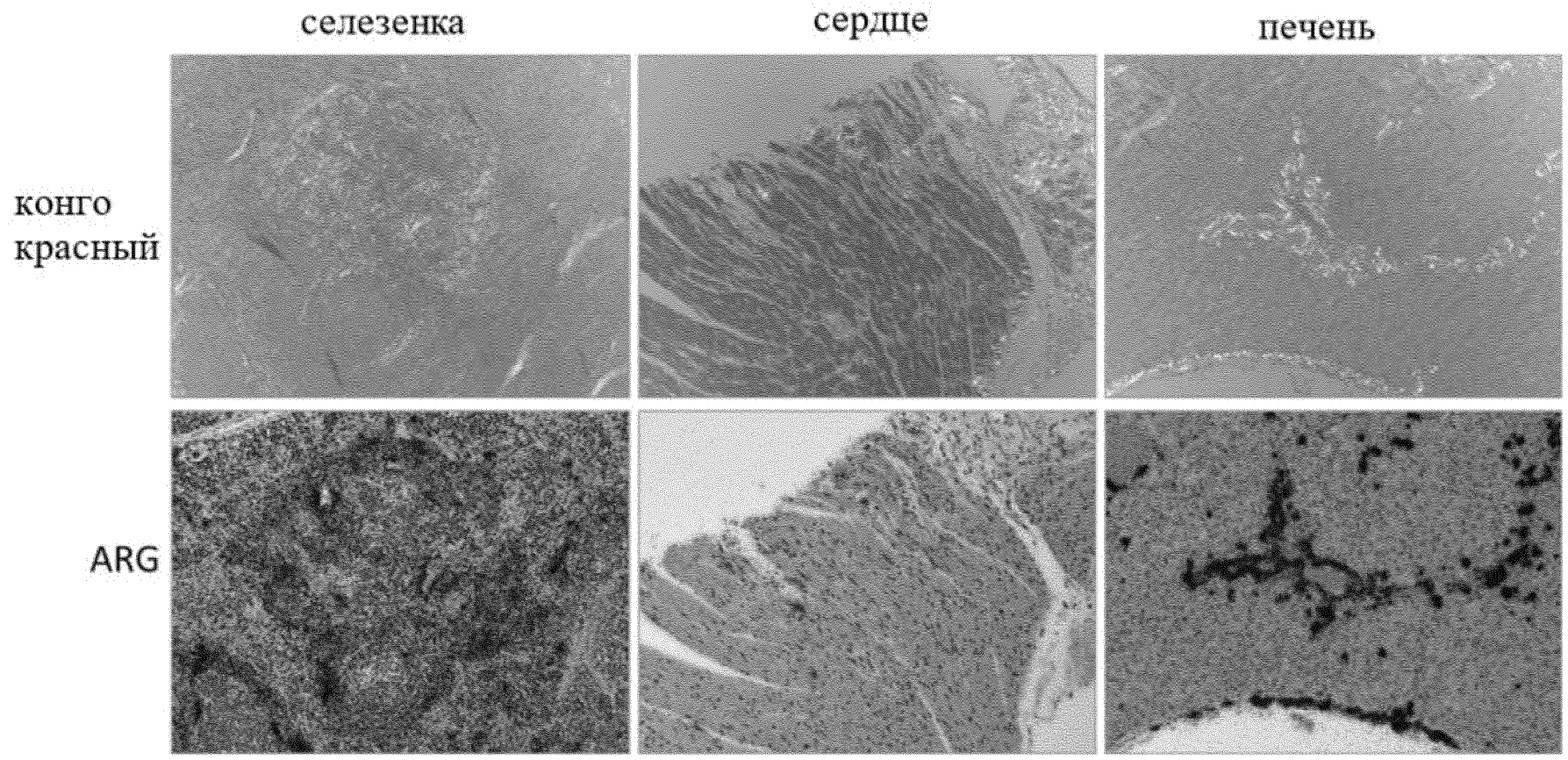


24 ч после
инъекции 3D

24 ч после
инъекции 2D



Фиг. 6



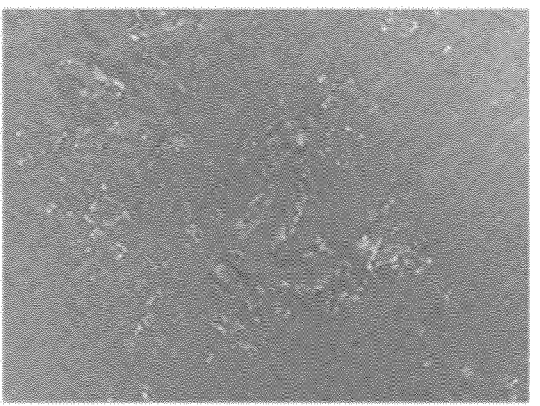
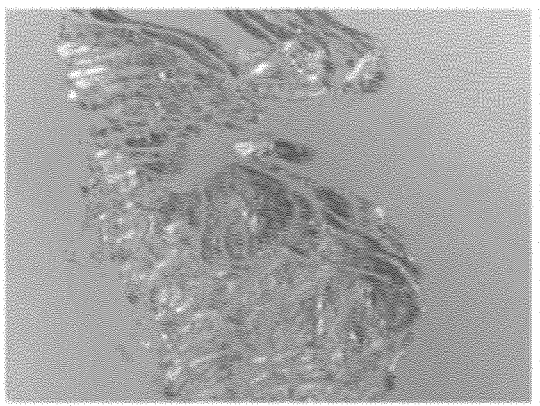
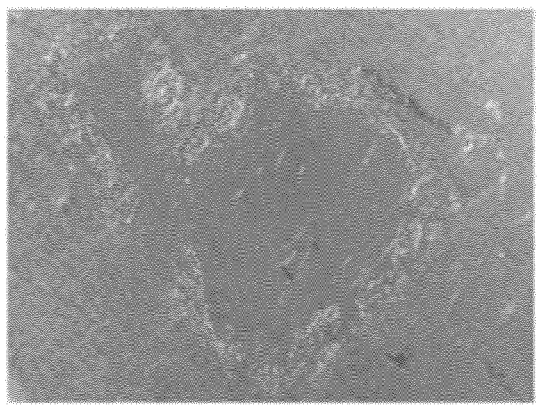
Фиг. 7

селезенка

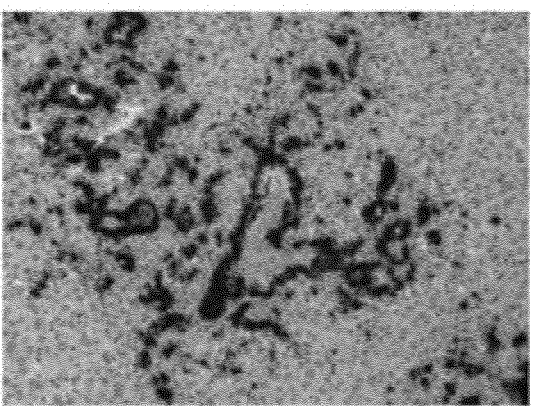
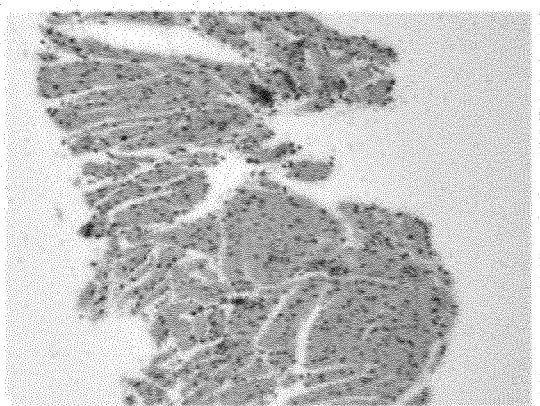
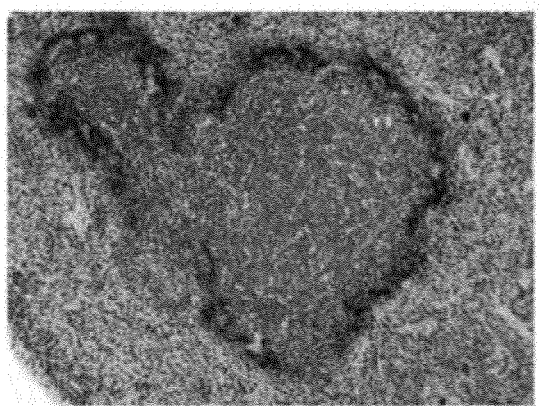
сердце

печень

конго
красный



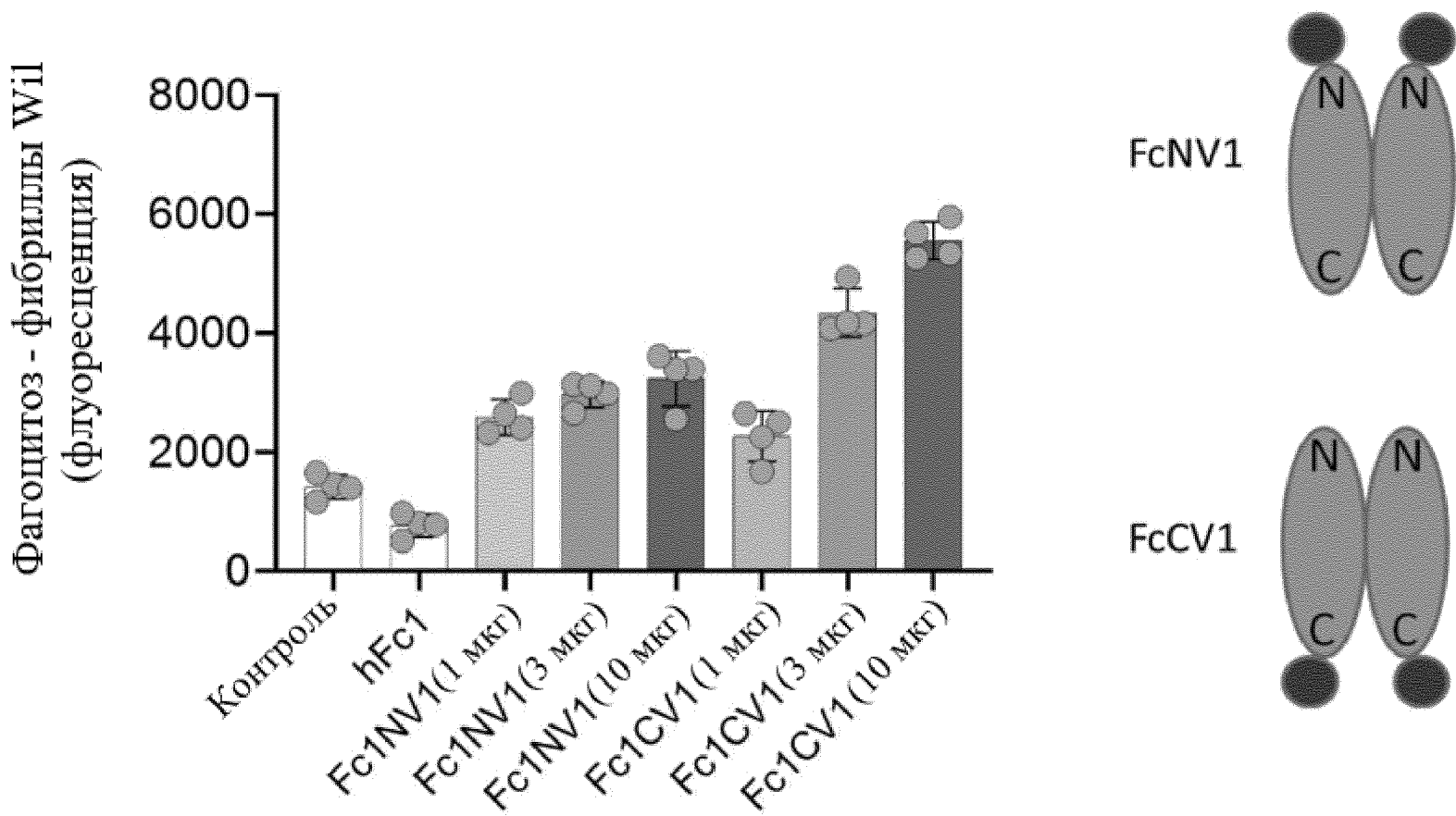
ARG



8/20

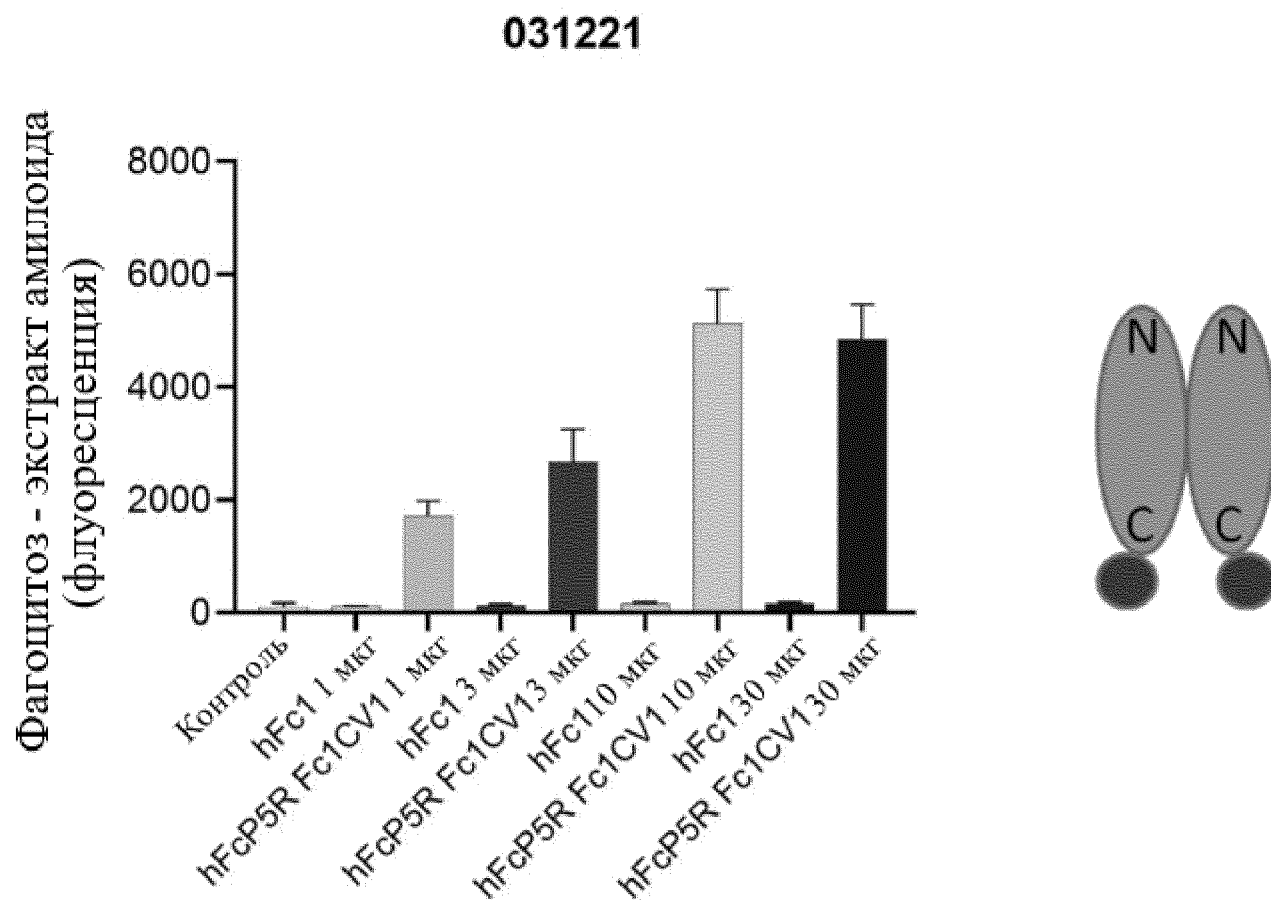
Фиг. 8

Фагоцитоз в течение одного часа фибрилл W11 с помощью PMA-активированного ТНР1 Доза-ответ (показатель микроскопической флуоресценции)



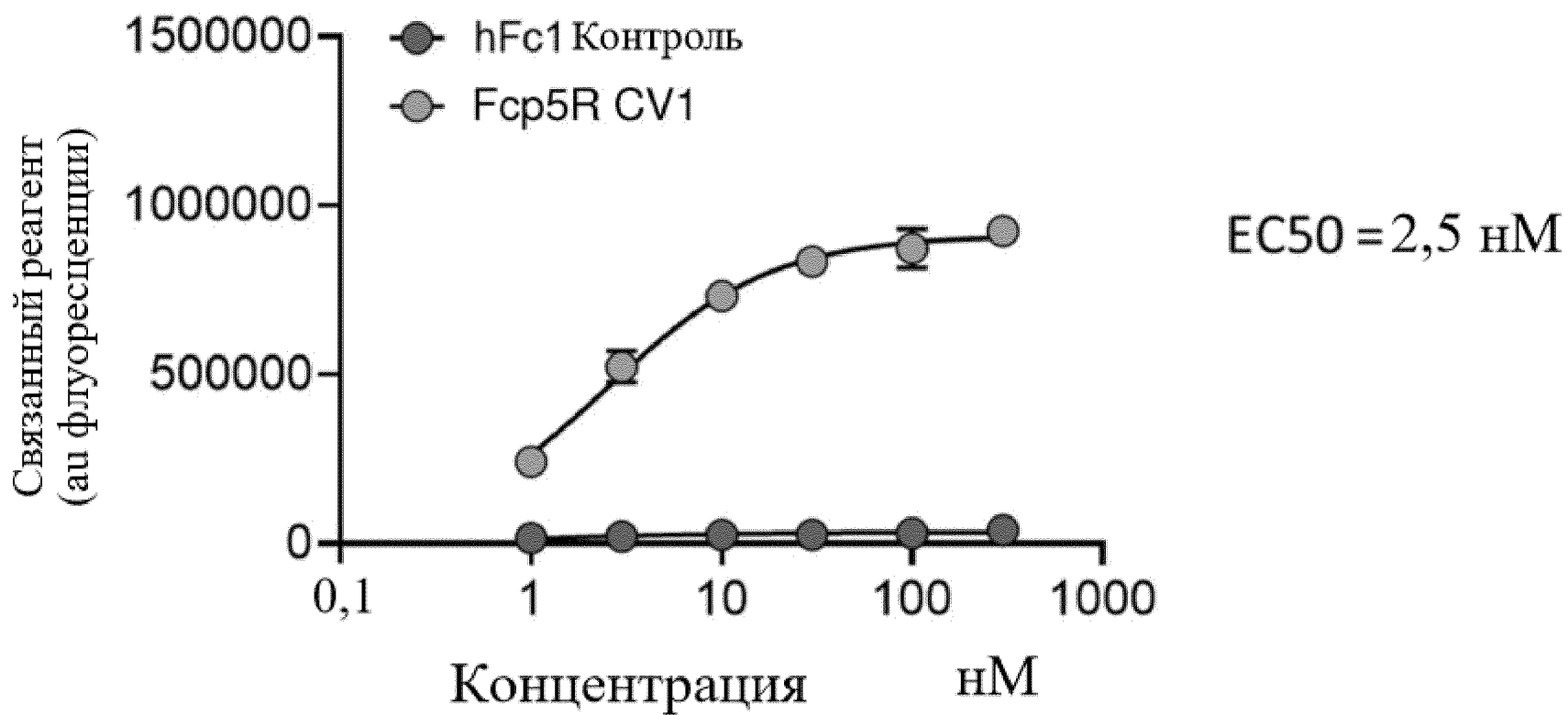
Фиг. 9

Доза-ответ с использованием hFc1 (CHO) и hFcP5R Fc1CV1 (CHO) в дозе 1 мкг, 3 мкг, 10 мкг и 30 мкг в отношении фибрилл Wil



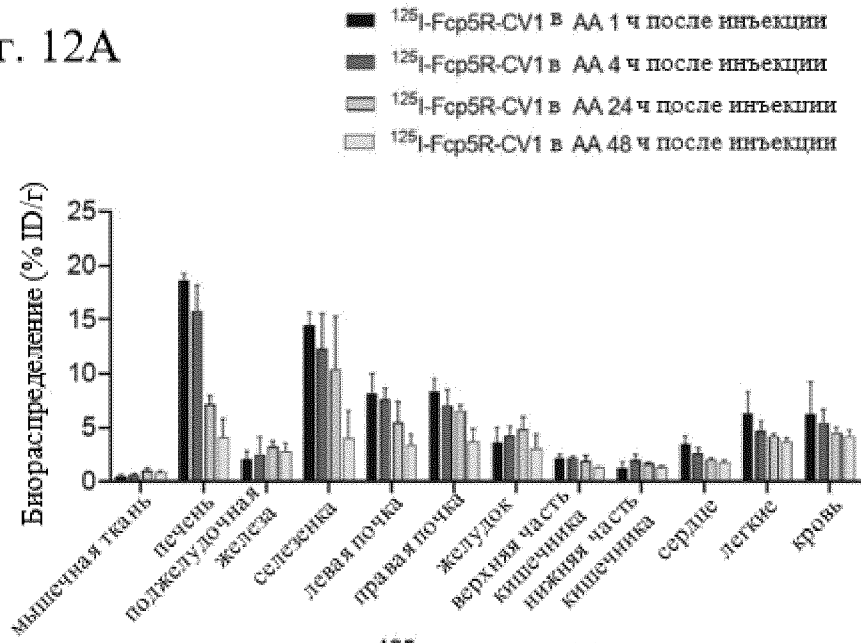
Фиг. 10

Фибриллы rVλ6W11

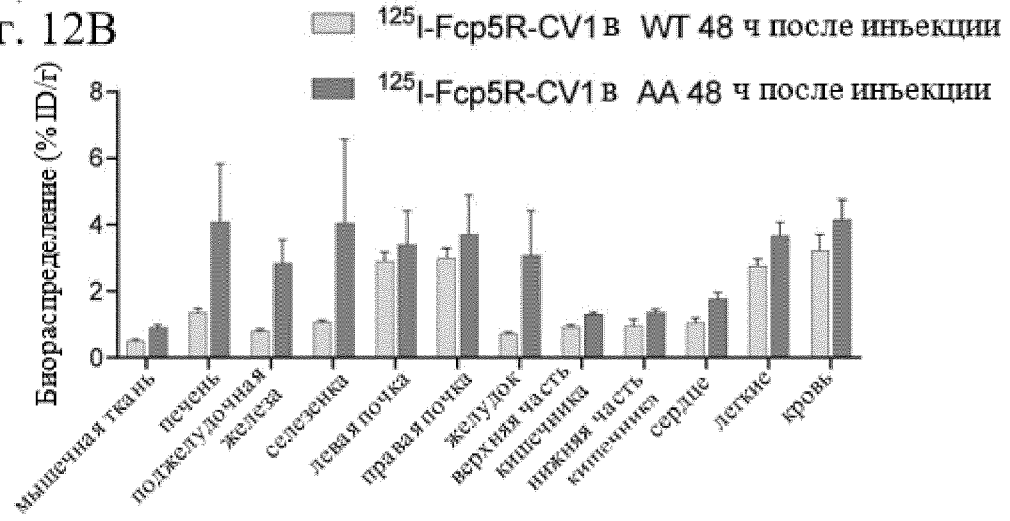


Фиг. 11

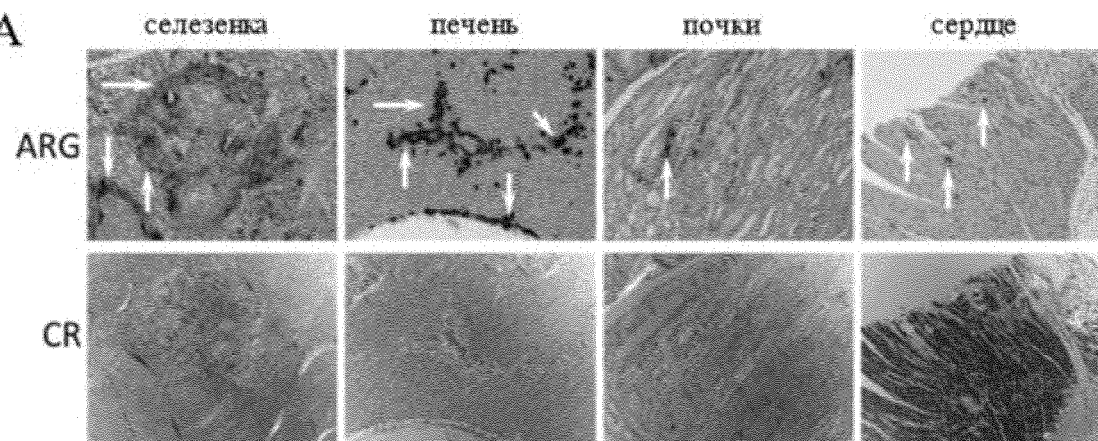
Фиг. 12А



Фиг. 12В

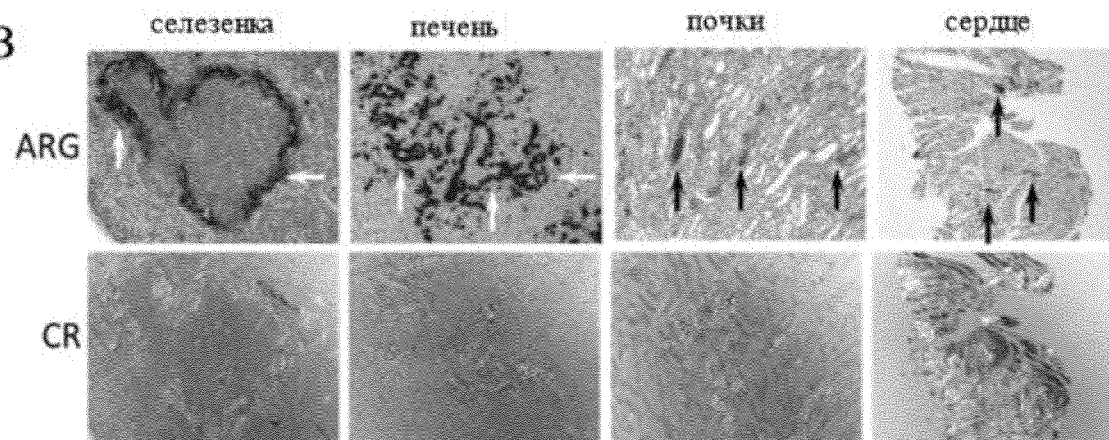


Фиг. 13А



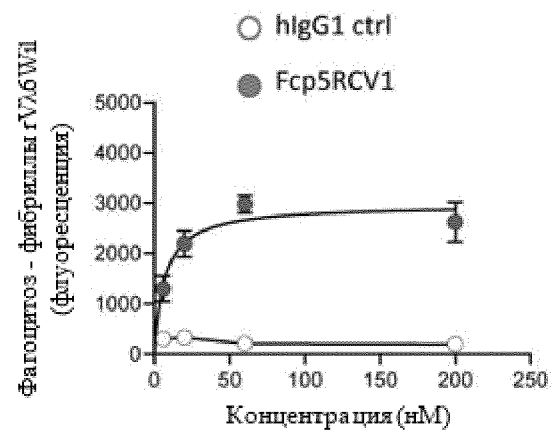
^{125}I -Fcp5RCV1 ARGs в АА мышцей 20х
1 ч после инъекции

Фиг. 13В

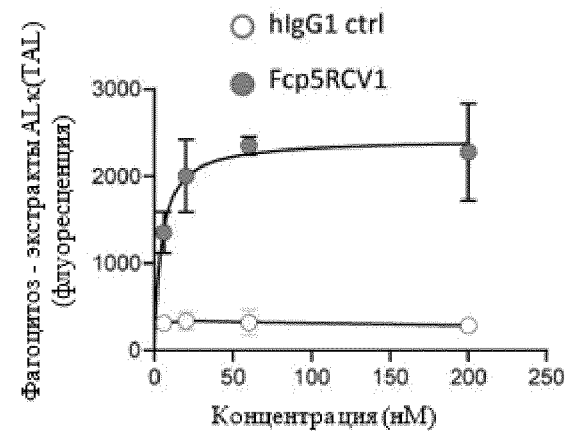


^{125}I -Fcp5RCV1 ARGs в АА мышцей 20х
24 ч после инъекции

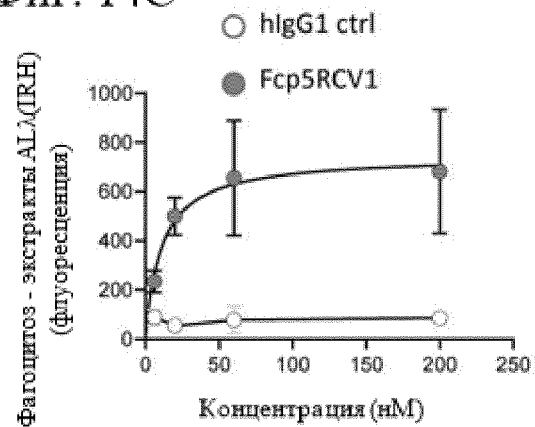
Фиг. 14А



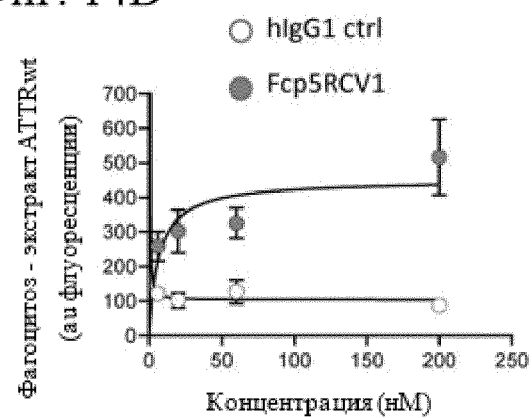
Фиг. 14В



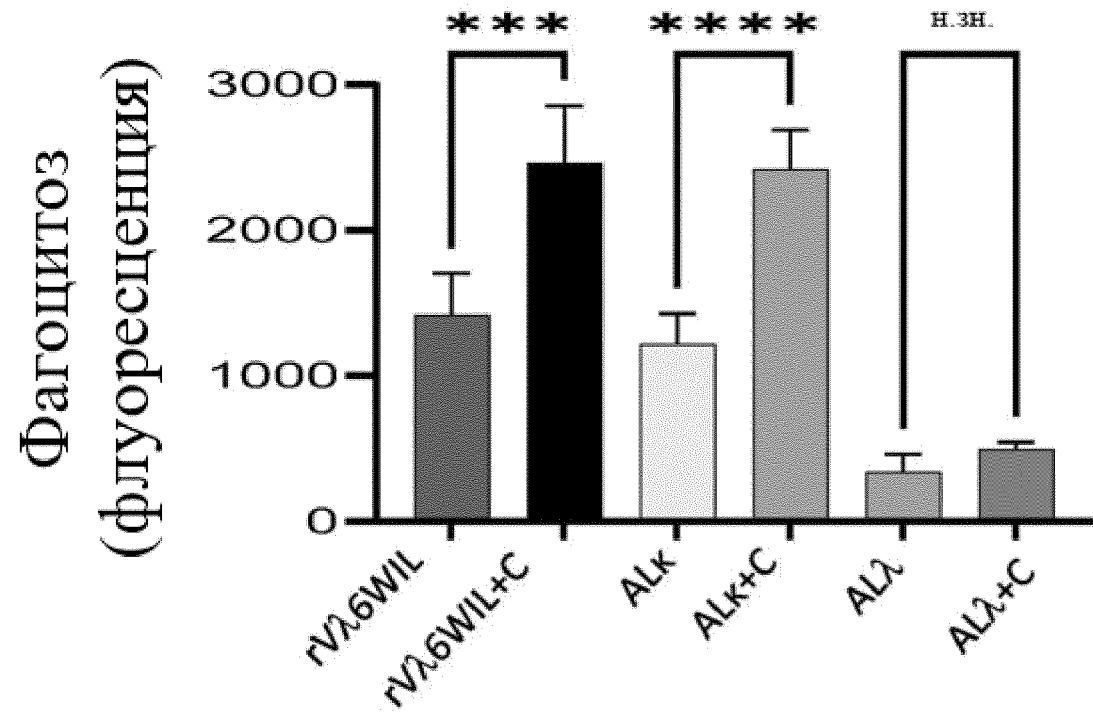
Фиг. 14С



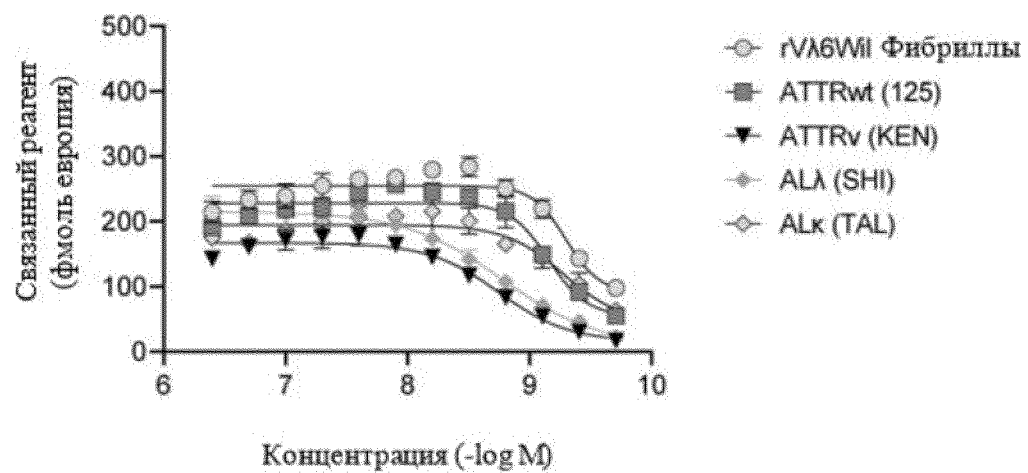
Фиг. 14D



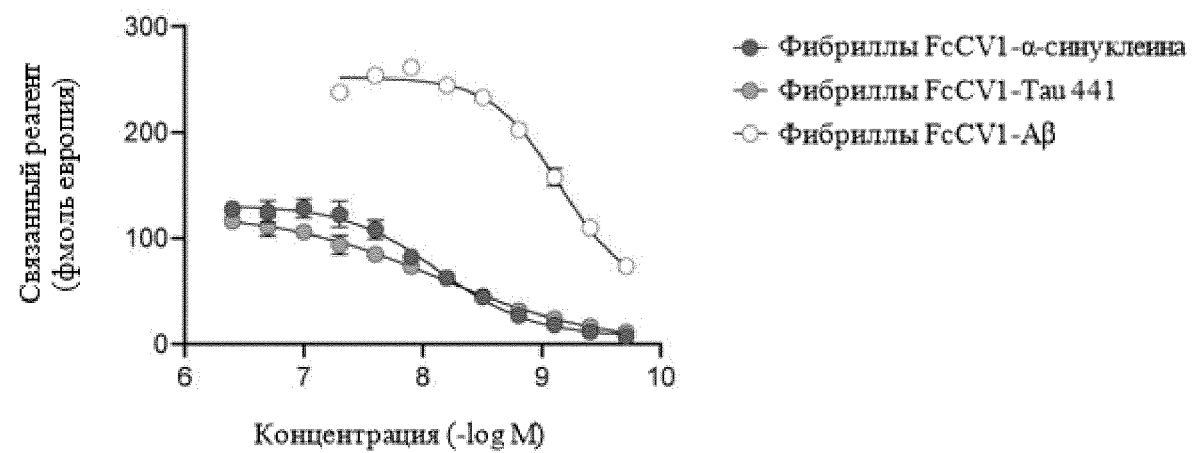
Фиг. 15



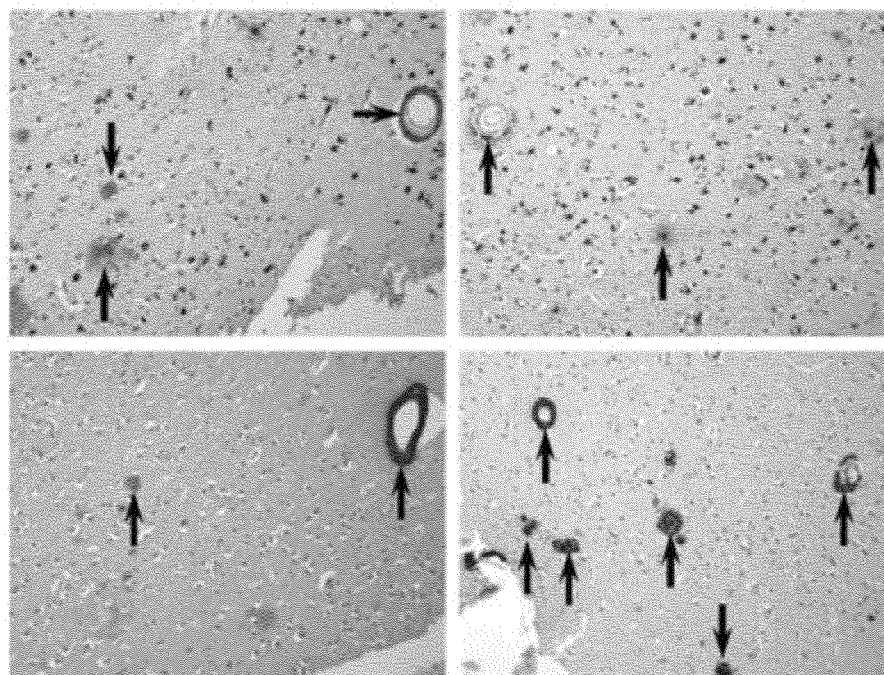
Фиг. 16



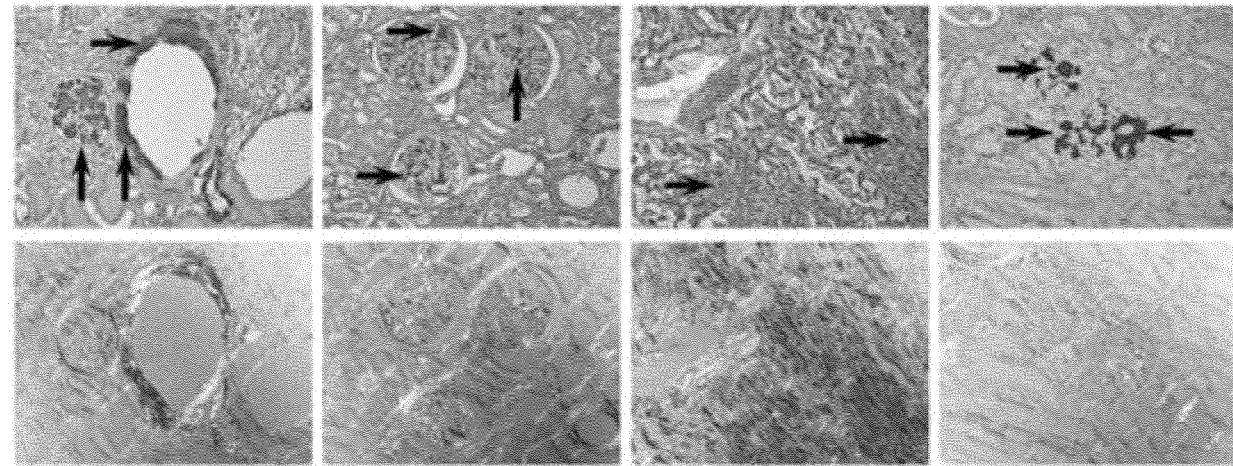
Фиг. 17



Фиг. 18А



Фиг. 18В



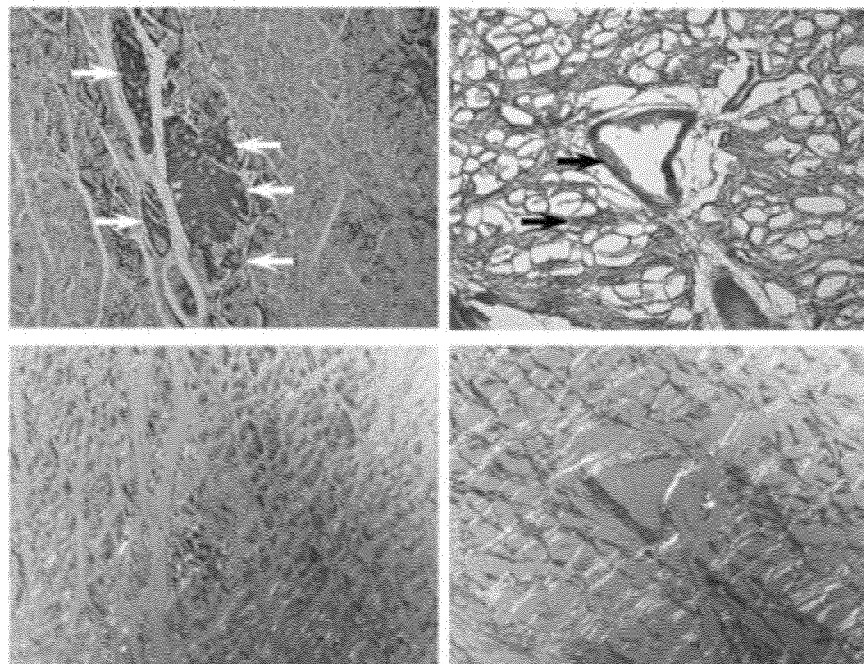
ALλ почки

ALκ почки

ALκ печень

ALλ почки

Фиг. 18С



АТTR сердце

АLк сердце