

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046070**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.05

(21) Номер заявки
202190048

(22) Дата подачи заявки
2019.06.14

(51) Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)

(54) **ОБЩИЙ АМИЛОИД-ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЙ МОТИВ (GAIM)**

(31) **62/685,757; 62/749,499**

(32) **2018.06.15; 2018.10.23**

(33) **US**

(43) **2021.04.16**

(86) **PCT/US2019/037179**

(87) **WO 2019/241628 2019.12.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМИЛ ТЕРАПЬЮТИКС (BE)

(72) Изобретатель:
**Кришнан Раджараман, Эсп Ева,
Прошитски Минг, Фишер Ричард (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) FESSEL JEFFREY ED - WIEN MICHELLE:
"Alzheimer's disease combination treatment",
NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY,
US, vol. 63, 8 November 2017 (2017-11-08), page
165, XP085345003, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/
J.NEUROBIOAGING.2017.10.022 page 165

MARC MANIX ET AL: "Creutzfeldt-Jakob
disease: updated diagnostic criteria, treatment
algorithm, and the utility of brain biopsy",

NEUROSURGICAL FOCUS, vol. 39, no. 5,
1 November 2015 (2015-11-01), page E2,
XP055618585, United States ISSN: 1092-0684,
DOI: 10.3171/2015.8.FOCUS15328 page 6, left-hand
column, last paragraph - right-hand column, paragraph
1

RAJARAMAN KRISHNAN ET AL: "A
Bacteriophage Capsid Protein Provides a General
Amyloid Interaction Motif (GAIM) That Binds and
Remodels Misfolded Protein Assemblies", JOURNAL
OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 426, no. 13,
1 June 2014 (2014-06-01), pages 2500-2519,
XP055266872, United Kingdom ISSN: 0022-2836,
DOI: 10.1016/j.jmb.2014.04.015 page 2506; figure 3a
page 2511; figure 7a page 2512, left-hand column,
paragraph 2

RAJARAMAN KRISHNAN ET AL:
"Conformation as the Therapeutic Target
for Neurodegenerative Diseases", CURRENT
ALZHEIMER RESEARCH, vol. 14, no. 4,
16 February 2017 (2017-02-16), pages 393-402,
XP055618346, NL ISSN: 1567-2050, DOI:
10.2174/1567205014666170116152622 abstract page
393, right-hand column, last paragraph - page 394, left-
hand column, paragraph 1

WO-A1-2014193935

WO-A1-2016090022

(57) Настоящее изобретение относится к вариантам общего амилоид-взаимодействующего мотива (GAIM) из белка гена 3 бактериофага (g3p) и его слитых белков. Варианты GAIM и слитые белки по настоящему изобретению частично или полностью деиммунизированы и демонстрируют превосходное связывание и специфичность в отношении различных групп амилоидных белков, а также демонстрируют усиленное ремоделирование амилоида и ингибирование агрегации амилоида. Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и способам получения вариантов GAIM и их слитых белков. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и способам повышения инфекционности бактериофага, способам обнаружения амилоидных агрегатов и способам диагностики и/или лечения заболевания, ассоциированного с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком.

B1**046070****046070 B1**

Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/685757, поданной 15 июня 2018 г., и по предварительной заявке США № 62/749499, поданной 23 октября 2018 г., раскрытие которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Изобретение относится к полипептидам, содержащим вариант общего амилоид-взаимодействующего мотива (GAIM) белка гена 3 нитчатого бактериофага ("g3p", также известного как "p3" или "pIII"), так что полипептиды частично или полностью не вызывают иммунный ответ ("деиммунизированы") и демонстрируют превосходную эффективность, превосходную структурную стабильность и повышенную специфичность связывания с амилоидными белками по сравнению с предшествующим уровнем техники. Изобретение включает в себя молекулы нуклеиновых кислот и конструкции, кодирующие такие полипептиды, клетки-хозяева, трансформированные такими молекулами нуклеиновых кислот, и способы получения таких полипептидов рекомбинантными методами. Кроме того, изобретение относится к диагностическим и фармацевтическим композициям, содержащим полипептиды, раскрытые в данном документе, к применению диагностических композиций для обнаружения амилоидных агрегатов и/или для диагностики заболевания, связанного с неправильно свернутым и/или агрегированным белком, а также к терапевтическому и/или профилактическому применению фармацевтических композиций для снижения амилоидной нагрузки, предотвращения агрегации, дезагрегации амилоида или иного лечения или предупреждения заболевания, связанного с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, такого как системные и периферические амилоидные заболевания, нейродегенеративные заболевания, включая нейродегенеративные таупатии и трансмиссивные формы губчатых энцефалопатий (прион-ассоциированных заболеваний). Полипептиды по изобретению включают слитые белки и их амилоид-связывающие участки.

Белок g3p бактериофага напрямую связывает амилоидные фибриллы, и опосредованная бактериофагом дезагрегация амилоида (например, ремоделирование) зависит от этой начальной стадии связывания. См., например, заявку WO 2013/082114 A1, полностью включенную в настоящее описание посредством ссылки. Авторы изобретения ранее идентифицировали минимальную последовательность g3p, необходимую для связывания амилоида, дезагрегации амилоида и/или предотвращения образования агрегатов амилоида. Id. Эта минимальная последовательность входит в общий амилоид-взаимодействующий мотив (GAIM), который включает домены N1 и N2 белка g3p, и обеспечивает образование полипептидов g3p (включая мутанты, фрагменты, слитые белки или их фармацевтические композиции), которые способны связываться с амилоидным белком и/или дезагрегировать амилоидные белки. См. Id.; WO 2014/055515 A1, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Полипептиды g3p, раскрытые в WO 2013/082114 A1 и WO 2014/055515 A1, эффективны для профилактики или лечения заболеваний, связанных с неправильно свернутыми и/или агрегированными амилоидными белками. Id. Однако эти полипептиды g3p также содержат эпитопы Т-клеток человека, которые могут вызывать нежелательный иммунный ответ у пациентов. Поэтому были разработаны частично деиммунизированные полипептиды g3p, содержащие мутации, которые удаляют до четырех из пяти эпитопов Т-клеток, присутствующих в нативном g3p. См. заявку WO 2014/193935 A1, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки.

Кроме того, рекомбинантная продукция в клетках животных полипептидов g3p, которые связывают амилоид и которые могут быть использованы для обнаружения, диагностики, предотвращения или лечения заболеваний или состояний, связанных с амилоидом, была ограничена из-за наличия потенциального сайта N-гликозилирования. Таким образом, были получены улучшенные полипептиды g3p, включая частично деиммунизированные полипептиды g3p, в которых потенциальный сайт N-гликозилирования был удален с помощью одной или более мутаций. См. WO 2016/090022 A8, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки.

Несмотря на эти достижения, в данной области остается потребность в полипептидах g3p, которые были бы более стабильными, сильнодействующими и специфичными, а также полностью или почти полностью деиммунизированными.

Создание полипептидов с этими наборами терапевтических качеств до сих пор представляло собой серьезную проблему, по меньшей мере частично, из-за определенных реверсивных взаимодействий в полипептидах g3p: во-первых, предыдущие попытки авторов удалить Т-клеточный эпитоп 2, что требуется для полной деиммунизации полипептида g3p, постоянно приводили к снижению способности связывать амилоид. Во-вторых, предыдущие попытки авторов повысить стабильность N1-N2 доменов GAIM также последовательно вызвали снижение активности связывания амилоида. Например, сверхстабилизированный вариант GAIM, PB113, плохо связывает амилоид. В-третьих, нестабильность домена N2 приводит к беспорядочным взаимодействиям с неамилоидными субстратами, такими как растворимые белки, липкие структуры расплавленных глобул и неамилоидные фибриллярные полимеры, такие как коллаген и эластин. Таким образом, дестабилизация N2 для увеличения активности в отношении связывания амилоида приносит в жертву специфичность, в то время как стабилизация N2 во избежание нецелевого связывания жертвует связыванием с амилоидом. Неожиданно все три реверсивные взаимодействия были преодолены путем создания гибридных белков, содержащих варианты GAIM и их слитые белки в "открытой стабилизированной" конформации.

В отличие от предшествующего уровня техники, открытые стабилизированные полипептиды, описанные в настоящем документе, демонстрируют высокую амилоид-связывающую активность и ремоделирующую активность в отношении широкого спектра амилоидов при сохранении стабильности белка и специфичности связывания. Таким образом, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к открытым стабилизированным вариантам GAIM (GAIM), слитым белкам GAIM-иммуноглобулинам (GAIM-Ig) или их фармацевтическим композициям, которые по меньшей мере частично деиммунизированы и обладают превосходными активностью связывания амилоида, специфичностью связывания амилоида и активностью ремоделирования амилоида. В некоторых аспектах эти открытые стабилизированные варианты GAIM, слитые белки GAIM-Ig или их фармацевтические композиции полностью деиммунизируются без ущерба для сильного и специфичного связывания амилоида и без ущерба для структурной стабильности. Открытые стабилизированные варианты GAIM и слитые белки GAIM-Ig, описанные в настоящем документе, способны взаимодействовать и удалять амилоиды в головном мозге и периферических органах и представляют собой новый набор полипептидов с превосходной способностью обнаруживать, диагностировать, предотвращать, задерживать начало и/или лечить заболевания, связанные с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком.

Дополнительные цели и преимущества изобретения частично изложены в нижеследующем описании и будут очевидны из описания или могут быть изучены при практическом применении изобретения. Цели и преимущества изобретения будут реализованы и достигнуты с помощью элементов и комбинаций, в частности, указанных в прилагаемой формуле изобретения. Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявленное изобретение.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A представляет собой графическое изображение третичной структуры доменов N1 и N2 из GAIM (показанных с использованием PDB-структуры 2G3P). β -цепи, в которых был осуществлен сайт-направленный мутагенез, показаны темно-серым цветом. Стрелки указывают расположение полярных остатков в N1 и гидрофобных остатков в N2. Фиг. 1B представляет собой графическое изображение слитого белка GAIM-Ig по настоящему изобретению. Фиг. 1C представляет собой графическое изображение димера GAIM.

На фиг. 2 изображены результаты исследований обмена водород/дейтерий (H/D), показывающие взаимодействующие с GAIM последовательности в fA β 42.

На фиг. 3A показано сравнение соответствующих участков аминокислотной последовательности участка N1 белка g3r фага fd (SEQ ID NO: 1) и соответствующего участка N1 белка g3r фага IF1 (SEQ ID NO: 2). Рамкой сверху выделены аминокислоты 23-28 (DDKTLG; SEQ ID NO: 3) в PB106 и каркаса GAIM в PB120 (производного от PB106), а внизу - замена на EGDS (SEQ ID NO: 4) присутствующая в открытых стабилизированных слитых белках GAIM-Ig по изобретению (EGDS = SEQ ID NO: 4). Фиг. 3B представляет собой графическое изображение третичной структуры N1 и N2 доменов GAIM (показаны с использованием PDB структуры 2G3P). Открытый прямоугольник на фиг. 3B показывает расположение SEQ ID NO: 3 в белке g3r фага fd. Фиг. 3C представляет собой графическое изображение трех медленно-сворачивающихся петель (также называемых "поворотами"), участвующих в стабилизации домена N2. T1 = поворот 1 (FQNN; SEQ ID NO: 5); T2 = поворот 2 (RQGA; SEQ ID NO: 6); T3 = поворот 3 (QGTPVK; SEQ ID NO: 7). Как показано ниже, удаление одного или более из T1, T2 или T3 с помощью мутагенеза стабилизирует домен N2. На фиг. 3D изображены изменения связывания и стабильности исходя из выбранных аминокислотных замен T50.

На фиг. 4A и 4B представлены репрезентативные данные экспериментов по термическому плавлению для слитого белка GAIM-Ig по сравнению с димером или мономером GAIM. За термическим плавлением наблюдали по связыванию SYPRO® Orange. Первый переход, Tm1, рассчитывали методом нелинейной аппроксимации из нормированных интенсивностей флуоресценции.

На фиг. 5A и 5B изображены спектры излучения флуоресценции GAIM в 0 М гуанидин гидрохлориде (GuHCl) (пунктирные линии), 2 М GuHCl (сплошные линии) и 5 М GuHCl (точечный пунктир) при возбуждении при 295 нм (фиг. 5A) и 280 нм (фиг. 5B). На фиг. 5C показано равновесное разворачивание димера GAIM под действием GuHCl. На фиг. 5C показаны два перехода, первый - между 1 и 2 М GuHCl, а второй - между 2 и 4 М GuHCl. Относительные интенсивности флуоресценции при 340 нм (возбуждение 280 нм) наносили на график при различных концентрациях GuHCl. На фиг. 5D изображено разворачивание домена N2 при 1,5 М GuHCl. На фиг. 5E изображено разворачивание домена N1 при 2,6 М GuHCl.

На фиг. 6A и 6B изображено картирование остатков GAIM, которые модулируют связывание с амилоидом. Фиг. 6A представляет собой диаграмму разброса, показывающую активность связывания фибрилл A β 42 для вариантов GAIM, коррелирующую с Tm1 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,703, $p < 0,0001$). Фиг. 6B представляет собой диаграмму разброса, показывающую эффективность связывания фибрилл ftau для вариантов GAIM, коррелирующую с Tm1 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,878, $p < 0,0001$). Для вариантов с плохим связыванием ftau EC₅₀ представлено как 1000 нМ из-за неточности

кривой, построенной для вариантов, которые не достигают насыщения в ELISA. Как на фиг. 6А, так и на фиг. 6В, каркас GAİM PB120 показан серым треугольником, а варианты показаны кружками. Снижение $Tm1$ указывает на более открытую конформацию GAİM, что приводит к увеличению связывания, тогда как стабилизированные варианты с более высоким $Tm1$ имеют тенденцию терять связывающую активность.

На фиг. 7А и 7В показано связывание амилоида для выбранных слитых белков GAİM-Ig. На фиг. 7А сравнивается связывание амилоида каркасом GAİM (закрашенные кружки) и его стабилизированными вариантами. Варианты FQGN, VNGV и QGGK представляют собой SEQ ID NO: 8-10, соответственно. На фиг. 7В показано превосходное связывание открытых стабилизированных (но не сверхстабилизированных) слитых белков GAİM-Ig. Открытые стабилизированные полипептиды (отличные от сверхстабилизированного полипептида PB113, показанного справа) выделены рамкой.

На фиг. 8А-8Б показано связывание репрезентативного открытого стабилизированного слитого белка GAİM-Ig (кружки) с различными фибриллами Аβ по сравнению со связыванием контрольного каркаса с этими фибриллами Аβ (квадраты). На фиг. 8А показано связывание с фибриллами Аβ3-42-Руго; на фиг. 8В показано связывание с фибриллами Аβ1-42-E22Q; на фиг. 8С показано связывание с фибриллами Аβ11-42; на фиг. 8Д показано связывание с фибриллами Аβ11-42-Руго. Агрегаты, используемые для этих экспериментов, демонстрируют очень разнообразную морфологию, от длинных неразветвленных фибрилл (фибриллы Аβ1-42-E22Q) до конформеров с плотной зигзагообразной укладкой (фибриллы Аβ3-42-Руго). Руго = пиро-глутамат.

На фиг. 9 показано влияние N2-стабилизирующих мутаций на неспецифичное связывание с коллагеном. FQGN = SEQ ID NO: 8, VNGV = SEQ ID NO: 9; QGGK = SEQ ID NO: 10.

На фиг. 10А-10D представлены данные по эффективности ремоделирования для различных слитых белков GAİM-Ig, инкубированных с фибриллами Аβ42. На фиг. 10А дополнительно показано сравнение с ремоделированием, осуществляемым 6E10 MAб. Кружки = среднее; планки = стандартное отклонение. На фиг. 10В дополнительно продемонстрирована корреляция между связыванием Аβ42 и ремоделированием различными слитыми белками GAİM-Ig. Открытые стабилизированные слитые белки GAİM-Ig представлены темно-серыми перевернутыми треугольниками. Каркас GAİM показан светло-серым треугольником, смотрящим вверх. Кружки представляют другие протестированные слитые белки GAİM-Ig. На фиг. 10С сравнивается эффективность ремоделирования репрезентативным открытым стабилизированным полипептидом (кружки) с эффективностью ремоделирования каркасом GAİM (треугольники) или одними фибриллами (квадраты). Планки = стандартное отклонение. Более высокая эффективность ремоделирования демонстрируется большим растворением фибрилл в мочеvine (например, более низкой флуоресценцией ThТ). На фиг. 10D приведены изображения, полученные просвечивающей электронной микроскопией (ТЕМ), на которых показаны фибриллы Аβ42 до (слева) и после (справа) инкубации с 0,8 мкМ PB108 при 37°C в течение шести дней.

На фиг. 11А-11С представлены данные по эффективности ремоделирования для различных слитых белков GAİM-Ig, инкубированных с тау-фибриллами. На фиг. 11А сравниваются эффективности ремоделирования репрезентативным открытым стабилизированным слитым белком GAİM-Ig, PB108, и суперстабилизированным слитым белком PB113. На ремоделирование указывает присутствие мономеров и димеров tauKL (средняя панель) в обработанных агрегатах. На фиг. 11В сравниваются эффективности ремоделирования двух репрезентативных открытых стабилизированных слитых белков GAİM-Ig и каркаса GAİM при различных концентрациях слитых белков. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. На фиг. 11С показаны ПЭМ-изображения, показывающие фибриллы tauKL до (слева) и после (справа) инкубации со 100 нМ PB108 при 37°C в течение трех дней.

На фиг. 12А-12D показано ингибирование сборки амилоида слитыми белками GAİM-Ig по настоящему изобретению. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение из трех или большего числа независимых экспериментов. На фиг. 12А показано зависимое от концентрации ингибирование сборки фибрилл Аβ42. PB120 (контрольный каркас) представлен кружками, PB108 - квадратами, и PB116 - треугольниками. На фиг. 12В сравнивается ингибирование сборки фибрилл Аβ42 при 250 нМ слитом белке GAİM. На фиг. 12С показано зависимое от концентрации ингибирование сборки фибрилл tauKL. PB120 (контрольный каркас) представлен кружками, PB108 - квадратами, а PB116 - треугольниками. На фиг. 12Д сравнивается ингибирование сборки фибрилл tauKL при 250 нМ слитом белке GAİM.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO:1 = AETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYAN

SEQ ID NO:2 = ATDAECLSKPAFDGTLNFWKEGDSRYAN

SEQ ID NO:3 = DDKTLD; SEQ ID NO:4 = EGDS

SEQ ID NO:5 = FQNN; SEQ ID NO:6 = RQGA; SEQ ID NO:7 = QGTDPVK;

SEQ ID NO:8 = FQGN; SEQ ID NO:9 = VNGV; SEQ ID NO:10 = QGGK

SEQ ID NO:11 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCYG
TWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTE
QNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTFQTDPVKTYYYQYTPVSSR
AMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSE
GGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:12 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCYG
TWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTE
QNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTFQTDPVKTYYYQYTPVSSR
AMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSE
GGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:13 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCYG
HWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTE
QNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTFQTDPVKTYYYQYTPVSSR
AMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSE
GGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:14 =
MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYG
HWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTE
QNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYYYQYTPVSSR
AMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGG
GGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:15 =
MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYGHW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYYYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGG
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:16 =
MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYGHW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYYYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGG
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:17 =
MAETVSSLAKPHIEGSFTNVWKDDKTLDWYANYEGILWKATGVVVITGDETQVYAI
WVPVGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYIYINPLDGTYPGTEQ
NPANPNPSLEESHPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYYYQYTPVSSRA
MYDAYWNGKFRDVAFHSGFNEDPLVAEYQGQLSYLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGG
GSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:18 =
MAETVSSLAKPHIEGSFTNVWKDDKTLDWYANYEGILWKATGVVVITGDETQVYAI
WVPVGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYIYINPLDGTYPGTEQ

NPANPNPSLEESHPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRA
 MYDAYWNGKFRDVAFHSGFNEDPLVAEYQGQLSYLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGG
 GSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:19 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYGHW
 VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
 ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
 YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
 EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:20 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYGHW
 VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
 ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNVNGVLTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
 YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
 EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:21 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYGHW
 VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
 ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
 YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
 EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:22 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETQCYGHW
 VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
 ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVAVNGVLTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
 YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
 EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:23 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDEHQCYGTW
 VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
 ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
 YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
 EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:24 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDEHQCYGTW

VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVNGVLTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:25 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQCYGTW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:26 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWAAGGVVCTGDEHQCYGTW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

SEQ ID NO:27 = GGGGS; SEQ ID NO:28 = GGGG

SEQ ID NO:29 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETCYGHW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:30 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETCYGHW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNVNGVLTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETCQYGHW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:32 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDETCQYGHW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVAVNGVLTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:33 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDEHQCYGTW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:34 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDEHQCYGTW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP

ANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVNGVLTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:35 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVVCTGDEHQCYGTW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:36 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWAAGGVVVCTGDEHQCYGTW
VPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNP
ANPNPSLEESQPLNTFMFQGNFRNRQGALTVYTGFTQGTDPVKTYQYTPVSSRAM
YDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGS
EGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:37 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATAACCGAGAACTCCTTAC
CAACGTCTGGAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
ACGCCGGTGGAGTGGTCTGCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGACACTGG
GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA

CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
 AACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
 GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
 AAGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:38 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCTGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGAACTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAAACAACCGCTTCAGGAACGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTA
 CACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCC
 TGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGC
 TTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCTC
 CGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGAG
 GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCGA
 AAGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:39 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCTGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGAACTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
 AACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA

GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:40 =

ATGGCCGAAACCGTGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGACACTGG
GTGCCTATCGGACTGGCCATCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGGCGG
ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
CACCTTCATGTTCCAAAACAACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTA
CACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCC
TGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGC
TTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCTC
CGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGAG
GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCGA
AGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:41 =

ATGGCCGAAACCGTGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCAGTGCTACGGAACTTGG
GTGCCTATCGGACTGGCCATCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGGCGG
ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
CACCTTCATGTTCCAAGGAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
ACACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:42 =

ATGGCCGAAACCGTGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA

ACGCCGGTGGAGTGGTTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCAGTGCTACGGAACCTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAAACAACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTA
 CACTGGCACCTTACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCC
 TGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGG
 TTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCTC
 CGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGAG
 GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCGA
 AGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:43 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTTCGTCTGCACCGGGGATGAGCATCAGTGCTACGGAACCTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAAGGAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
 AACTGGCACCTTACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
 GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
 AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

SEQ ID NO:44 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGG
 CCGCCGGTGGAGTGGTTCGTCTGCACCGGGGATGAGCATCAGTGCTACGGAACCTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA

CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
 ACACTGGCACCTTACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
 GCGCGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
 AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCCGGGA

SEQ ID NO:45 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCTGTCACCGGGGATGAGACTCAGTGTACGGACACTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
 ACACTGGCACCTTACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
 GCGCGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
 AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCCGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:46 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGACACTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAAACAACCGCTTCAGGAACGTGAACGGAGTGCTGACCCTGTA
 CACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCC
 TGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGC
 TTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCTC
 CGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGAG
 GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCGA
 AGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCACA
 CATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
 CCCCCAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTACAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ

ID

NO:47

=

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGACACTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAGGAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCCTGT

AACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCCCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 TTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
 GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
 AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTCAGCGTCCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ

ID

NO:48

=

ATGGCCGAAACCGTGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGTGCTACGGACACTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAAACAACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTA
 CACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCC
 TGTGTCCCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGC
 TTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCTC
 CGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGAG
 GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCGA
 AGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCACA
 CATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG

GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAG
 ACCACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:49 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTAC
 CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
 ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCAGGGGATGAGCACCAGTGCTACGGAACCTGG
 GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
 ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
 ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
 ACTGAGCAGAACCCGGCCAAACCCAAACCTAGCCTCGAGGAATCCCAAGCCGTTGAA
 CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCCTGT
 AACTGGCACCTTACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
 CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
 CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
 CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
 GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
 AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAG
 ACCACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACC

GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA\

SEQ ID NO:50 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCAGTGCTACGGAACCTGG
GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
CACCTTCATGTTCCAAAACAACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTA
CACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCC
TGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGC
TTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCTC
CGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGAG
GCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCGA
AGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCACA
CATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTACGCTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:51 =

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTCAC
CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGA
ACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCTGGGGATGAGCACCAGTGCTACGGAACCTGG
GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC

ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
ACACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG
AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCAC
ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:52 =

ATGGCCGAAACCGTGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCTTAC
CAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCTGCCTGTGGG
CCGCCGTGGAGTGGTCTGCTGCACTGGGGATGAGCACCAGTGTACGGAACCTGG
GTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGGGTGGTAGCGAAGGCGGCGG
ATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGAACCAAGCCTCCGGAATACGGCGAC
ACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCAATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGA
ACTGAGCAGAACCCGGCCAACCCAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAA
CACCTTCATGTTCCAAGGGAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGT
ACACTGGCACCTTCACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTC
CTGTGTCTCGCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCG
CTTTCCACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGGAGAATCCGGAGGGGGATCAGGA
GGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGTGGAGGCTCCG

AAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAGATCTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCCCACCGTGCCACAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO:53 = НННННН; SEQ ID NO:54 = EDGS

Определения

Термины, используемые в этом описании, обычно имеют свои стандартные значения в данной области техники в контексте этого изобретения и в конкретном контексте, где используется каждый термин. Некоторые термины обсуждаются ниже или в другом месте в описании, чтобы предоставить применяющему изобретение на практике специалисту дополнительное руководство в отношении описания композиций и способов по изобретению, а также в отношении того, как их создавать и использовать. Единственное число относится к одному или более чем одному (то есть по меньшей мере к одному) указанному объекту. Термин "или" означает и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекст явно не указывает иное. В этой заявке использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. Кроме того, использование термина "содержащий", а также других форм, таких как "содержит" и "содержал", является не ограничивающим. Следует понимать, что любой описанный в настоящем документе диапазон включает конечные точки и все значения между конечными точками.

Термин "g3p" при использовании отдельно или в таких терминах, как "производное g3p" или "слитый g3p", относится к любому белку g3p дикого типа или к рекомбинантному белку g3p нитчатого фага, включая фрагменты, варианты и мутанты g3p, которые сохраняют способность связываться с амилоидом. Эти термины не следует рассматривать как ограниченные каким-либо конкретным g3p нитчатого бактериофага.

Термины "нитчатый бактериофаг", "бактериофаг" и "фаг" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают как нитчатый бактериофаг дикого типа, так и рекомбинантный нитчатый бактериофаг.

Термин "нитчатый бактериофаг дикого типа" в контексте настоящего описания относится к нитчатому бактериофагу, встречающемуся в природе, нитчатому бактериофагу, который указан как "дикий тип" в любой базе данных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, нитчатым бактериофагам, которые коммерчески доступны и охарактеризованы как "дикий тип", и нитчатым бактериофагам, которые приобрели нереконбинантные мутации относительно любого из вышеперечисленных в результате пассирования.

Используемый в настоящем документе термин "домен" означает область полипептида или белка, имеющую некоторые отличительные физические особенности или отличительную роль, включая, например, независимо укладываемую структуру, состоящую из участка полипептидной цепи. Домен может содержать последовательность отличительного физического признака полипептида, или он может содержать фрагмент физического признака, который сохраняет свои характеристики связывания (например, он сохраняет способность связываться со вторым доменом). Домен может быть связан с другим доменом. Например, домен N2 из g3p связывает F-пили, а домен N1 из g3p связывает TolA.

Используемый в настоящем документе термин "общий амилоид-взаимодействующий мотив" или "GAIM" относится к двудоменному полипептиду (домены N1 и N2 в g3p), который опосредует связывание с амилоидом с использованием комбинации как гидрофобных, так и полярных остатков, выстилающих внутренние поверхности молекулы. Домены N1 и N2 мономера GAIM имеют асимметричное распределение ароматических аминокислот. Домен N2 из GAIM содержит 11 остатков тирозина (Tyr) и 1 экспонированный остаток триптофана (Trp); домен N1 содержит 3 остатка Trp и 3 остатка Tyr. Домены N1 и N2 принимают конформацию перевернутой подковы и удерживаются вместе в замкнутой конформации (заблокированной конформации) за счет сложной сети водородных связей (Weininger et al., 2009). Цис-транс-изомеризация пролинов в междоменном линкере приводит к прогрессирующему разрыву во-

дородных связей и частичному раскрытию двух доменов. "Открывающая" перегруппировка доменов N1 и N2 GAIM обнажает β -тяжи 4 и 5 в N1 (содержащие полярные остатки) и β -тяжи 9 и 10 в N2 (содержащие ароматические/гидрофобные остатки) и позволяет связываться с амилоидом. См. фиг. 1A.

Используемый в настоящем документе термин "контрольный каркас" или "каркас GAIM" соответствует слитому белку GAIM-Ig, PB120, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. Участок GAIM каркаса GAIM имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. PB120 является производным PB106, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Участок GAIM в PB106 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В контексте настоящего описания "PB106 + EDGS" ("EDGS" раскрыт в SEQ ID NO: 54) представляет собой полипептид с открытой конформацией, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. Участок GAIM из "PB106 + EDGS" ("EDGS" раскрыт в SEQ ID NO: 54) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Используемый в настоящем документе термин "суперстабилизированный" GAIM или слитый GAIM относится к слитому белку GAIM-Ig, PB113, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. Участок GAIM из PB113 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Термины "слитый GAIM-Ig", "слитый белок GAIM-Ig" и "слитый GAIM" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к полипептиду, содержащему GAIM-домены белка g3r, соединенные напрямую или через короткий линкер с константной областью иммуноглобулина. Как показано на фиг. 1B, Fc-область слитых белков GAIM-Ig по изобретению димеризуется, в результате чего образуется комплекс, который включает две копии GAIM, присоединенные напрямую или через короткий линкер к константной области иммуноглобулина. Слитый GAIM по настоящему изобретению может дополнительно содержать сигнальную последовательность. В настоящем изобретении рассматривается GAIM, слитый с любой константной областью иммуноглобулина, например, константной областью иммуноглобулина IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgD, IgA, IgE или IgM. В некоторых аспектах слитый GAIM-Ig представляет собой открытый стабилизированный слитый GAIM-Ig. В некоторых аспектах слитый GAIM-Ig частично или полностью деиммунизирован.

"Димер GAIM" в контексте настоящего описания относится к двум доменам GAIM слитого белка GAIM-Ig, описанного в данном документе. Димер GAIM графически представлен на фиг. 1C.

Термины "открытый стабилизированный слитый белок", "открытый стабилизированный слитый GAIM-Ig", "открытый стабилизированный вариант" и "открытый стабилизированный вариант GAIM-Ig" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к слитому GAIM-Ig, включающему по меньшей мере одну мутацию открытой конформации и по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в участке GAIM слитого белка. Мутация открытой конформации в открытых стабилизированных вариантах, описанных в настоящем документе, представляет собой замену SEQ ID NO: 3 (DDKTLG; аминокислоты 24-29 в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15) на SEQ ID NO: 4 (EGDS). Стабилизирующая мутация может представлять собой N2-стабилизирующую мутацию, например, выбранную из замены SEQ ID NO: 5 (FQNN; аминокислоты 137-140 в SEQ ID NO: 13; аминокислоты 135-138 в SEQ ID NO: 15) на SEQ ID NO: 8 (FQGN), замены SEQ ID NO: 6 (RQGA; аминокислоты 145-148 в SEQ ID NO: 13; аминокислоты 143-146 в SEQ ID NO: 15) на SEQ ID NO: 9 (VNGV), замены SEQ ID NO: 7 (QGTPVK; аминокислоты 158-164 в SEQ ID NO: 13; аминокислоты 156-162 в SEQ ID NO: 15) на SEQ ID NO: 10 (QGGK) или их комбинации. Другие N2-стабилизирующие мутации описаны ниже. Открытые стабилизированные слитые белки, описанные в данном документе, могут дополнительно включать одну или более замен, вставок или делеций. Например, открытый стабилизированный слитый GAIM-Ig может быть дополнительно модифицирован для снижения или устранения иммуногенности, для удаления потенциального сайта гликозилирования или для дополнительной модуляции связывающей активности или специфичности по отношению к амилоидному белку.

В данном контексте слитый белок GAIM-Ig по настоящему изобретению, который "состоит по существу" из данной аминокислотной последовательности, может дополнительно включать короткий линкер, соединяющий домен GALM и домен Fc в слитом белке, N-концевую сигнальную последовательность или ее фрагмент, делецию N-концевого метионина (DM1) или делецию как N-концевого метионина, так и аланина (DM1 и DA2), и/или делецию C-концевого лизина (K) в Fc-домене слитого белка.

Используемый в настоящем документе термин "короткий линкер" относится к пептидному линкеру длиной до 25 аминокислот, который соединяет домен GALM и домен Fc слитого белка GAIM-Ig. Как описано ниже, типовой "короткий линкер", соединяющий домены GALM и Fc в слитом белке GAIM-Ig, может содержать GS-богатую последовательность или может содержать аминокислотную последовательность ARS.

Используемый в настоящем документе термин "сигнальная последовательность" относится к короткому пептиду из примерно 16-30 аминокислот, присутствующих на N-конце полипептида по изобретению. Например, сигнальная последовательность может содержать N-концевую последовательность из 18 аминокислот GenBank Ref Seq NP510891.1. Сигнальная последовательность используется эукариотической клеткой для секреции полипептида по изобретению. Обычно она отщепляется от полипептида перед секрецией и поэтому обычно отсутствует в секретируемом полипептиде.

Термин "амилоид" или "амилоидные фибриллы" используется в данном документе как общий термин для третичной структуры, которая образована неправильной укладкой или агрегацией любого из нескольких различных белков, и которая включает упорядоченное расположение β -листов, уложенных перпендикулярно к оси фибриллы. Sunde et al., *J. Mol Biol.* (1997) 273: 729-39.

Амилоид, используемый в настоящем изобретении, может быть образован из любого из следующих белков: андрогенового рецептора, апополипротеина AI, апополипротеина AN, апополипротеина AIV, амилоида A апосыворотки, A β , ABri, ADan, атрофина-1, предсердного натрийуретического фактора, атаксина, кальцитонина, γ -кристаллина, цистатина C, фибриногена, гельсолина, хантингтина, инсулина, островкового амилоидного полипептида, легкой каппа-цепи иммуноглобулина, легкой лямбда-цепи иммуноглобулина, керато-эпителина, кератина, лактаэдрина, лактоферрина, лизоцима, белка C легочного сурфактанта, медиана, одонтогенного амелобласт-ассоциированного белка, прионного белка, прокальцитонина, пролактина, семеногелина I, сывороточного амилоида A, супероксиддисмутазы I, β 2-микроглобулина, связывающего TATA-бокс белка, тау, транстиретина и α -синуклеина или их комбинации. Амилоид, используемый в настоящем изобретении, также может быть образован из усеченных или посттрансляционно модифицированных форм любого из вышеуказанных белков. "Амилоид" или "амилоидные фибриллы" включает разные или множественные конформации или морфологические формы амилоида.

Используемый в настоящем документе термин "токсичный олигомер" относится к низкомолекулярным сборке или агрегату мономеров, которые обычно участвуют в образовании амилоида.

Типичный амилоид включает агрегаты амилоида- β , образованные при болезни Альцгеймера, содержащие бета-амилоидный пептид "A β ", 39-43 аминокислотные внутренние фрагменты, отщепленные от белка-предшественника амилоида человека (hAPP). A β включает усеченные и посттрансляционно модифицированные формы. Например, A β 40 представляет собой короткую форму A β , а более фибриллогенная изоформа A β 42 представляет собой длинную форму. Дополнительные примеры A β включают, но не ограничиваются ими, мутации N-усеченного A β 11-42, A β 11-42-Пуго, A β -42-Пуго и A β 1-42-E22Q-датскую мутацию. См. Levy et al, 1990; Van Broeckhoven et al, 199. Другие иллюстративные амилоидные белки включают α -синуклеин (связанный с болезнью Паркинсона), хантингтин (связанный с болезнью Хантингтона), тау (связанный с болезнью Альцгеймера), аномальную конформацию прионного белка, PrP^{Sc} и амилоиды, ассоциированные с различными амилоидозными заболеваниями, включая, но не ограничиваясь ими: легкую цепь иммуноглобулина (каппа или лямбда), транстиретин, гельсолин и островковый амилоидный полипептид. Дополнительные примеры представлены во всем описании и известны специалистам в данной области (см., например, Aguzzi (2010), and Eichner and Radford, *Mol. Cell* (2011) 43:8-18). Если не указан белок или пептид, использование терминов "амилоид" или "амилоидные фибриллы" не следует истолковывать как ограниченное каким-либо конкретным белком, морфологией, заболеванием или состоянием.

Термин "бета-амилоидный пептид" является синонимом " β -амилоидного пептида", " β AP", " β " и "A β ". Все эти термины относятся к амилоидообразующему пептиду, полученному из белка-предшественника амилоида человека (hAPP).

Используемые в настоящем документе термины "белок PrP", "PrP" и "прион" относятся к полипептидам, которые способны в соответствующих условиях индуцировать образование агрегатов, ответственных за заболевания, связанные с неправильной укладкой белков. Например, нормальный клеточный прионный белок (PrP^C) превращается в соответствующих условиях в соответствующую скрепи-изоформу (PrP^{Sc}), которая вызывает такие заболевания, как губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (BSE) (коровье бешенство), но не ограниченные этим, губчатая энцефалопатия кошек, куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), болезнь Герстмана-Штройслера-Шейнкера (GSS) и фатальная семейная бессонница (FFI).

В контексте настоящего описания "заболевание, связанное с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком" включает, но не ограничивается этим, болезнь Альцгеймера, болезнь Альцгеймера с ранним началом, болезнь Альцгеймера с поздним началом, пресимптоматическую болезнь Альцгеймера, AL-амилоидоз, боковой амиотрофический склероз (БАС), боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм-деменцию, аргирофильную зерновую деменцию, медиальный амилоидоз аорты, A α 1-амилоидоз, A α 2-амилоидоз, A α 3-амилоидоз, амилоидоз предсердий, британскую/датскую деменцию, катаракту, кортикобазальную дегенерацию, амилоидоз роговицы, связанный с трихиазом, заболевание, связанное с бляшками цистатина C, ишемическая болезнь сердца, связанная с бляшками цистатина C, заболевание почек, связанное с бляшками цистатина C, амилоидный лишай, dementia pugilistica, денаторубрально-паллидолузийскую атрофию, диффузные нейрофибриллярные клубки с обызвествлением, деменцию с тельцами Леви, синдром Дауна, семейную амилоидотическую кардиомиопатию (FAC), семейную амилоидотическую полинейропатию (FAP), семейную британскую деменцию, семейную датскую деменцию, семейную энцефалопатию, семейную средиземноморскую лихорадку, фибриногеновый амилоидоз, финский наследственный амилоидоз, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), лобно-височную деменцию, болезнь Халлервор-

дена-Шпатца, связанный с гемодиализом амилоидоз, наследственную церебральную амилоидную ангиопатию, наследственное кровоизлияние в мозг с амилоидозом, наследственную решетчатую дистрофию роговицы, болезнь Хантингтона, исландскую наследственную церебральную амилоидную ангиопатию, миозит с тельцами включения, инъекционно-локализованный амилоидоз, амилоидоз островковых амилоидных полипептидов, лизоцимный амилоидоз, множественную миелому, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуамскую болезнь моторных нейронов с нейрофибрилярными клубками, болезнь Паркинсона, периферический амилоидоз, болезнь Пика, пролактиному гипофиза, постэнцефалитный паркинсонизм, церебральную амилоидную ангиопатию прионного белка, прионопосредованное заболевание, куру, болезнь Крейтцфельдта-Якоба (СJD), болезнь Герстмана-Штройсслера-Шейнкера (GSS), фатальную семейную бессонницу (FFI), скрепи, губчатую энцефалопатию, легочный альвеолярный протеиноз, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, старческий системный амилоидоз, сывороточный амилоидоз АА, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, спиноцеребеллярную атаксию (SCA1, SCA3, SCA6 или SCA7), подострый склерозирующий панэнцефалит, системный амилоидоз, семейный амилоидоз, амилоидоз дикого типа, деменцию с преобладанием нейрофибрилярных клубков и таупатии. См., например, Chiti & Dobson, *Annu Rev Biochem* (2006) 75:333-66; и Josephs et al., *Acta Neuropathol* (2011) 122:137-153. Существует большая потребность в предупреждении и/или уменьшении образования агрегатов амилоида (т.е. неправильно свернутых и/или агрегированных белков) для лечения или уменьшения симптомов или тяжести этих заболеваний.

В данном контексте полипептид, композиция, состав или нуклеиновая кислота, которая "снижает количество амилоида", выполняет одно или более из следующих действий: ингибирует образование амилоида, вызывает дезагрегацию амилоида, вызывает ремоделирование амилоида, способствует клиренсу амилоида, ингибирует агрегацию амилоида, блокирует и/или предотвращает образование токсичных олигомеров и/или способствует удалению токсичных олигомеров.

Полипептиды, нуклеиновые кислоты или композиции по изобретению, описанные как "дезагрегирующие" или "опосредующие дезагрегацию", уменьшают количество уже сформированных агрегатов. Дезагрегацию можно измерить с помощью анализа с ловушкой на фильтре (Wanker et al., *Methods Enzymol* (1999) 309: 375-86) или другими методами, известными в данной области. Анализ с ловушкой на фильтре можно использовать как для обнаружения агрегатов, так и для мониторинга дезагрегации, опосредованной композициями по изобретению. Дезагрегация определяется по уменьшению удерживания амилоида на фильтре, о чем свидетельствует уменьшение окрашивания в присутствии увеличивающихся концентраций дезагрегирующего агента.

Полипептиды, нуклеиновые кислоты или композиции по настоящему изобретению, описанные как "защищающие нейроны от амилоидного повреждения", предотвращают накопление нового амилоида и/или предотвращают образование токсичных олигомеров. Продукты или композиции по изобретению, описанные как "защищающие нейроны от амилоидного повреждения", можно принимать профилактически. Защищает или нет продукт или композиция нейроны от амилоидного повреждения, можно определить с помощью анализа на цитотоксичность в культуре нейрональных клеток, как описано в заявке WO 2014/055515, которая полностью включена сюда посредством ссылки.

Полипептиды, нуклеиновые кислоты или композиции по изобретению, описанные как "ремоделирующие" амилоид, вызывают частичное или полное превращение фибриллярных конформеров в аморфные агрегаты. Ремоделирование может быть измерено с помощью исследований денатурации с использованием мочевины (например, для форм АJ3) или анализа растворимости в саркозиле (например, для форм тау-белка). Повышенное ремоделирование может быть обнаружено по потере или неспособности амилоида связывать тиофлавин Т (ThT), что приводит к снижению флуоресценции ThT. Ремоделирование также можно обнаружить с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Полипептиды, нуклеиновые кислоты или композиции по изобретению, описанные как "ингибирующие агрегацию амилоида", частично или полностью предотвращают агрегацию амилоида. Ингибирование агрегации амилоида можно измерить с помощью анализа флуоресценции ThT (например, более низкая флуоресценция указывает на более низкий процент агрегации амилоида).

Термин "вариант", используемый в настоящем документе вместе с бактериофагом, белком, полипептидом или аминокислотной последовательностью (например, вариант GAIM) относится к соответствующему веществу, которое содержит отличие по меньшей мере по одной аминокислоте (по меньшей мере одну мутацию, являющуюся заменой, вставкой или делецией) по сравнению с эталонным веществом. В некоторых вариантах осуществления "вариант" имеет высокую гомологию по аминокислотной последовательности и/или консервативные аминокислотные замены, делеции и/или вставки по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения вариант имеет не более 25, 20, 17, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных отличий по сравнению с эталонной последовательностью. Вариант, описанный в настоящем документе, может сохранять или увеличивать: активность связывания амилоида, специфичность связывания амилоида и/или качество белка по сравнению с эталонной последовательностью. Описанный в настоящем документе вариант может быть дегликозилирован. Описанный в настоящем документе вариант может снижать или устранять

иммуногенность.

"Консервативная замена" относится к замене первой аминокислоты второй аминокислотой, которая существенно не изменяет химические, физические и/или функциональные свойства белка g3r или амилоид-связывающего фрагмента g3r (например, белок g3r или амилоид-связывающий фрагмент сохраняет тот же заряд, структуру, полярность, гидрофобность/гидрофильность и/или сохраняет такие функции, как способность распознавать, связываться и/или восстанавливать амилоид). Такие консервативные модификации аминокислот основаны на относительном сходстве заместителей аминокислот в боковой цепи, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т.п. Примеры групп аминокислот, которые являются взаимозаменяемыми в качестве консервативных замен, и которые учитывают различные из вышеперечисленных характеристик, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

Термин "иммуногенный" или "иммуногенность" используется в настоящем описании для обозначения способности композиции вызывать иммунный ответ у млекопитающего, которое подверглось воздействию композиции. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам или композициям с пониженной иммуногенностью или полностью деиммунизированным. Полная деиммунизация указывает на удаление всех пяти эпитопов узнавания Т-клетками, присутствующих в нативной аминокислотной последовательности GAIM, посредством одной или более мутаций в последовательностях этих эпитопов. Такие деиммунизирующие мутации могут представлять собой замену, вставку или делецию одного или более аминокислотных остатков в эпитопе или могут представлять собой частичное или полное удаление последовательности эпитопа.

Общий амилоид-взаимодействующий мотив (GAIM) белка G3r и слитые с ним белки GAIM-Ig.

Общий амилоид-взаимодействующий мотив (GAIM) представляет собой двудоменный полипептид, содержащий домены N1 и N2 из g3r. Домен GAIM N2 состоит из трех различных структурных элементов: глобулярной части, напоминающей по структуре N1 (Holliger et al. (1999) *J Mol Biol*, 288: 649-57), альфа-спирали и неупорядоченной области, которая образует обширную сеть водородных связей с доменом N1. Шарнирная область N2 также содержит несколько остатков пролина, один из которых (P213) участвует в поддержании GAIM в открытом состоянии, способном связывать ToIA. Домены N1 и N2 мономера GAIM имеют асимметричное распределение ароматических аминокислот. Домен GAIM N2 содержит 11 остатков тирозина (Tyr) и 1 экспонированный остаток триптофана (Trp); домен N1 содержит 3 остатка Trp и 3 остатка Tyr. Таким образом, собственная флуоресценция остатков тирозина и триптофана позволяет проводить специфический мониторинг конформационных изменений в доменах N2 и N1 соответственно (Martin and Schmid (2003) *J Mol Biol*, 405: 989-1003), что позволяет обнаруживать открытую конформацию GAIM.

Исследования Н/Д-обмена (водородно-дейтериевого) показывают, что GAIM связывается с центральной сердцевиной фибрилл Aβ42. Как показано на фиг. 2, исследования Н/Д-обмена также показывают, что GAIM связывается с прерывистой последовательности на ядре фибриллы и связывает как последовательности, богатые ароматическими остатками (например, остатки 17-25 в Aβ42), так и алифатические остатки (например, остатки 31-40 в Aβ42). Это приводит к стойкому ингибированию сборки амилоида и эффективному ремоделированию фибрилл в аморфные агрегаты (Krishnan et al. (2014) *J Mol Biol*, 426:2500-19).

В некоторых аспектах полипептид или композиция, содержащая полипептид, включает вариант GAIM. В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM имеет не более 25 аминокислотных отличий по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM имеет не более 17 аминокислотных отличий по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM имеет не более 10 аминокислотных отличий по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет не более 7 аминокислотных отличий по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 12 (участок GAIM из PB120). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 14 (участок GAIM из PB106). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 16 (участок GAIM из "PB106 + EDGS" ("EDGS" раскрыт в SEQ ID NO: 54)).

Если не указано иное, то вся нумерация аминокислотных последовательностей GAIM основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, а вся нумерация аминокислотных последовательностей GAIM-Ig основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, которая представляет собой SEQ ID NO: 16, слитую на С-конце с аминокислотной последовательностью IgG1-Fc человека коротким линкером ARS.

Полипептиды по изобретению включают любой из вариантов GAIM, описанных в настоящем документе. Раскрытые в настоящем документе варианты GAIM содержат замену SEQ ID NO: 3 (DDKTLD; аминокислоты 24-29 относительно SEQ ID NO: 13) на SEQ ID NO: 4 (EGDS). Эта замена присутствует в

эталонной последовательности SEQ ID NO: 16 и дает варианты GAIM по изобретению, имеющим открытую конформацию ("открытую" или "разблокированную").

Варианты GAIM по изобретению также включают по меньшей мере один дополнительный набор аминокислотных изменений, выбранных из (i) альтернативных деммунизирующих изменений Т-клеточного эпитопа-1, (ii) деммунизирующих изменений Т-клеточного эпитопа-2 и (iii) N2-стабилизирующих изменений.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один отличающийся набор аминокислотных замен увеличивает сродство к амилоиду, сохраняя деиммунизацию в Т-клеточном эпитопе 1. В эталонной SEQ ID NO: 16 деиммунизированный Т-клеточный эпитоп-1 состоит из аминокислот G47-H55. H55 в этой последовательности обеспечивает деиммунизацию; белок g3p дикого типа (в котором Т-клеточный эпитоп-1 не деиммунизирован) имеет треонин в соответствующем положении. Хотя сродство к амилоиду остается значительным для вариантов полипептида g3p, содержащих замену треонина на гистидин по аминокислоте 55 в SEQ ID NO: 16, это сродство несколько снижено по сравнению с диким типом. Интересно отметить, что согласно опубликованным данным последовательность YGT, которая присутствует в нативном g3p, является мотивом связывания с Tola (S Pommier et al, J. Bacteriol. (2005), 187 (21), pp. 7526-34). Не выдвигая какой-либо определенной гипотезы, авторы полагают, что связывание GAIM с амилоидом может потребовать взаимодействия аминокислот, аналогичного связыванию g3p с Tola. Поэтому авторы исследовали восстановление последовательности 53YGT55 в SEQ ID NO: 16 путем внесения замены H55T (например, возврата к последовательности Т-клеточного эпитопа-1 дикого типа) и поиска альтернативной замены в теперь восстановленном Т-клеточном эпитопе, который повлияет на деиммунизацию. Авторы обнаружили, что замена T50 вызывает деиммунизацию Т-клеточного эпитопа-1, не влияя на аффинность к амилоиду.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления вариант GAIM по настоящему изобретению содержит замену T50, сопровождаемую заменой H55T. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления замена T50 представляет собой T50R, T50K, T50G или T50H. По меньшей мере в одном аспекте этих вариантов осуществления замена T50 представляет собой T50H.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один отличающийся набор аминокислотных замен деиммунизирует Т-клеточный эпитоп-2 без значительного изменения сродства к амилоиду. В эталонной последовательности SEQ ID NO: 16 Т-клеточный эпитоп-2 занимает аминокислоты M134-N142 (см. патент США № 9988444 В2 и публикацию патента США US 2018/0207231 А1, которые полностью включены посредством ссылки) и не изменяется по сравнению с соответствующей последовательностью g3p дикого типа. До настоящего изобретения авторы не могли деиммунизировать этот эпитоп без значительного снижения связывания с амилоидом и/или значительного снижения стабильности полученного GAIM. Теперь авторы обнаружили, что замена N142 и/или N137 другой аминокислотой деиммунизирует Т-клеточный эпитоп-2 без значительного влияния на связывание или стабильность амилоида. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариант GAIM изобретения содержит замену N142. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления замена N142 представляет собой N142A. В альтернативных вариантах осуществления вариант GAIM по изобретению содержит замену N137. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления замена N137 представляет собой N137G. В других альтернативных вариантах осуществления вариант GAIM по изобретению включает замену N137 и замену N142. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления замена N137 представляет собой N137G, а замена N142 представляет собой N142A.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один отличающийся набор аминокислотных замен увеличивает стабильность N2. Эти замены нацелены на одну или более так называемых петель медленного сворачивания, присутствующих в SEQ ID NO: 16, которые охватывают аминокислоты 135-138 (FQNN; SEQ ID NO: 5; поворот 1), 143-146 (RQGA; SEQ ID NO: 6; поворот 2) и 156-162 (QGTDPVK; SEQ ID NO: 7; поворот 3), как показано на фиг. 3С. Авторы обнаружили, что определенные аминокислотные замены и/или делеции в одной или более из этих областей увеличивают стабильность N2 в GAIM. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один отличающийся набор аминокислотных замен выбран из: (i) N137G; (ii) R143V, Q144N и, необязательно, A146V, A146T или A146K; и (iii) V161G, делеции T158, D159 и P160, необязательно, Q156V или Q156Y, и, необязательно, G157N. Как указано выше, в некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM содержит аминокислотные замены только в одном из поворота 1, поворота 2 и поворота 3, например, одну из: (i) N137G; (ii) R143V, Q144N и, необязательно, A146V, A146T или A146K; и (iii) V161G, делеции T158, D159 и P160, необязательно, Q156V или Q156Y, и, необязательно, G157N. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM включает аминокислотные замены по меньшей мере в двух поворотах, например, две из: (i) N137G; (ii) R143V, Q144N и, необязательно, A146V, A146T или A146K; и (iii) V161G, делеции T158, D159 и P160, необязательно, Q156V или Q156Y и, необязательно, G157N. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления аминокислотная замена представляет собой N137G, что дает SEQ ID NO: 8 по аминокислотам 135-138. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления аминокислотная замена представляет собой R143V, Q144N и A146V, что дает SEQ ID NO: 9 по аминокислотам 143-146. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления замена аминокислот

кислоты представляет собой делецию T158, D159 и P160 и замену V161G, что дает SEQ ID NO: 10 при замене аминокислот 156-162. По меньшей мере, в одном аспекте этих вариантов осуществления вариант GAIM не содержит аминокислотных замен во всех трех поворотах.

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению включает вариант GAIM, имеющий по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любого из описанных выше альтернативных деммунизирующих Т-клеточный эпитоп-1 замен, и по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из описанных выше деммунизирующих Т-клеточный эпитоп-2 замен.

В некоторых вариантах осуществления варианты GAIM имеют по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из описанных выше альтернативных деммунизирующих Т-клеточный эпитоп-1 замен, и по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из описанных выше N2-стабилизирующих замен.

В некоторых вариантах осуществления варианты GAIM имеют по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любого из описанных выше деммунизирующих Т-клеточный эпитоп-2 замен, и по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из вышеперечисленных описанных N2-стабилизирующих замен.

В некоторых вариантах осуществления варианты GAIM имеют по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из описанных выше альтернативных деммунизирующих Т-клеточный эпитоп-1 замен, по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из описанных выше деммунизирующих Т-клеточный эпитоп-2 замен, и по меньшей мере один набор аминокислотных замен, выбранных из любой из описанных выше N₂-стабилизирующих замен.

Выбор конкретного набора аминокислотных замен для каждого из вышеуказанных типов замен может быть осуществлен из любой из замен, описанных в настоящем документе для данного типа. Неограничивающие примеры наборов аминокислотных замен можно найти в табл. 1.

Таблица 1

Мутации открытого-стабилизированных слитых GAIM-Ig относительно SEQ ID NO: 16

Слитый белок GAIM-Ig	SEQ ID NO:	Мутация (мутации) Т-клеточного эпитопа-1*	Мутация (мутации) Т-клеточного эпитопа-2	N2-стабилизирующая мутация (мутации)	Мутация (мутации) сигнала гликозилирования***
PB108	29	Нет	N137G**	N137G	Нет
PB122	30	Нет	Нет	R143V Q144N A146V	Нет
PB116	31	Нет	N137G N142A	N137G	Нет
PB114	32	Нет	N142A	R143V Q144N A146V	Нет
PB109	33	T50H H55T	N137G N142A	N137G	Нет
PB110	34	T50H H55T	N142A	R143V Q144N A146V	Нет
PB105	35	T50H H55T	N137G	N137G	Нет
PB127	36	T50H H55T	N137G	N137G	N38A

*Т-клеточный эпитоп 1 из SEQ ID NO: 16 деиммунизирован заменой T55H относительно g3p дикого типа. Мутации в Т-клеточном эпитопе-1 в открытых стабилизированных слитых GAIM-Ig представляют собой альтернативные деиммунизирующие замены.

**Замена N137G деиммунизирует Т-клеточный эпитоп-2 и стабилизирует домен N2.

***SEQ ID NO: 16 дегликозилирована мутацией T40G по сравнению с g3p дикого типа. Мутации в потенциальном сигнале гликозилирования в открытых стабилизированных слитых GAIM-Ig представляют собой дополнительные дегликозилирующие замены.

Полипептиды по изобретению включают дегликозилированный вариант GAIM. Эталонная последовательность SEQ ID NO: 16 дегликозилирована, поскольку она содержит мутацию T40G относительно g3p дикого типа, таким образом изменяя природный сигнал гликозилирования NAT на NAG. Примеры других дегликозилированных мутантов и/или вариантов g3p можно найти в публикации патента США US 2018/0207231 A1. Однако варианты GAIM, которые имеют другие и/или дополнительные дегликозилирующие мутации в нативном сигнале гликозилирования, также являются частью настоящего изобретения. Например, последовательность из трех аминокислот NX(T/S), где X представляет собой любую аминокислоту, является известным сигналом гликозилирования. Замена аспарагина (N) в такой последовательности любой аминокислотой, отличной от цистеина, разрушит сигнал гликозилирования. Точно так же замена треонина (T) или серина (S) в такой последовательности любой аминокислотой, отличной от цистеина, разрушит сигнал гликозилирования.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариант GAIM, описанный в настоящем документе, включает замену N38 любой аминокислотой, отличной от цистеина, по сравнению с SEQ ID NO: 16, и дополнительно содержит одну или более альтернативных деиммунизирующих Т-клеточный эпитоп-1 замен, деиммунизирующих Т-клеточный эпитоп-2 замен и/или N₂-стабилизирующих замен. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления замена N38 представляет собой N38A. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM дополнительно включает замену G40 на любую аминокислоту, отличную от цистеина.

В некоторых альтернативных вариантах осуществления вариант GAIM, описанный в настоящем документе, включает замену G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина, треонина или серина, по сравнению с SEQ ID NO: 16, и дополнительно содержит одну или более деиммунизирующих Т-клеточный эпитоп-1 замен, деиммунизирующих Т-клеточный эпитоп-2 замен и/или N₂-стабилизирующих замен.

SEQ ID NO: 16 включает N-концевые аминокислоты M1 и A2. Рекombинантная продукция GAIM в линиях клеток животных может приводить к полипептидам, в которых отсутствуют M1 или оба M1 и A2 ("N-концевое усечение"). Такие N-концевые усечения не влияют на активность связывания амилоида. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в варианте GAIM необязательно отсутствует аминокислота 1 (ΔM1) или обе аминокислоты 1 и 2 (ΔM1 и ΔA2) из SEQ ID NO: 16, в дополнение к содержанию одной или более деиммунизирующих Т-клеточный эпитоп-1 замен, деиммунизирующих Т-клеточный эпитоп-2 замен и/или N₂-стабилизирующих замен. В контексте настоящего описания вариант GAIM, в котором отсутствует аминокислота 1 или обе аминокислоты 1 или 2, может относиться к N-концевому усечению (т.е. удалению после трансляции) или делеционной мутации.

В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM представляет собой вариант SEQ ID NO: 16, содержащий замену N137G. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM не содержит аминокислоту 1 (например, ΔM1). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM не содержит аминокислот 1 и 2 (например, ΔM1 и ΔA2). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM дополнительно содержит замену N38 любой аминокислотой, отличной от цистеина, замену G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина, треонина или серина, или замену N38 любой аминокислотой, отличная от цистеина, и замену G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина. По меньшей мере, в одном аспекте этих вариантов осуществления замена N38 представляет собой N38A.

В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM представляет собой вариант SEQ ID NO: 16, содержащий R143V, Q144N и, необязательно, A146V, A146T или A146K. В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM представляет собой вариант SEQ ID NO: 16, содержащий R143V, Q144N и A146V. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM дополнительно не содержит аминокислоту 1 (например, ΔM1). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM дополнительно не содержит аминокислоты 1 и 2 (например, ΔM1 и ΔA2). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вариант GAIM дополнительно содержит замену N38 любой аминокислотой, отличной от цистеина, замену G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина, треонина или серина, или замену N38 любой аминокислотой, отличной от цистеина, и замену G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина. По меньшей мере в одном аспекте этих вариантов осуществления замена N38 представляет собой N38A.

В некоторых вариантах осуществления вариант GAIM представляет собой вариант SEQ ID NO: 16, содержащий замену T50 любой другой аминокислотой, замену H55T и замену N137G. По меньшей мере

имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит вариант GAIM, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит вариант GAIM, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит вариант GAIM, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит вариант GAIM, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит вариант GAIM, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит вариант GAIM, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

Любой из описанных выше вариантов GALM может быть слит на С-конце, напрямую или через короткий линкер, с константной областью иммуноглобулина с образованием слитого белка GAIM-Ig. Константная область иммуноглобулина в слитых белках GALM-Ig, описанных в настоящем документе, может являться константной областью иммуноглобулина IgG (включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA, IgD, IgE или IgM. В некоторых аспектах константная область иммуноглобулина представляет собой IgG. В некоторых аспектах IgG представляет собой IgG1. В других аспектах IgG представляет собой IgG2. В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область иммуноглобулина представляет собой константную область иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина представляет собой Fc-участок IgG человека или его фрагмент. Fc-участки IgG человека, подходящие для слитых белков по настоящему изобретению, включают Fc-участки дикого типа или модифицированные Fc-участки. Например, подходящий модифицированный Fc-участок IgG человека может стабилизировать слитый белок и/или увеличить его период полужизни по сравнению с Fc дикого типа. Неограничивающие примеры модифицированного Fc включают те, которые раскрыты в патенте США № 7083784, патенте США № 7217797, патенте США № 7217798, заявке на патент США № 14/214146 и WO-1997034631. По меньшей мере в одном варианте осуществления константная область иммуноглобулина представляет собой Fc-участок IgG1 человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления константная область иммуноглобулина представляет собой Fc-участок IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина слитого белка GAIM-Ig содержит С-концевой лизин (например, K485). В других вариантах осуществления изобретения слитый белок GAIM-Ig не содержит С-концевого лизина (например, DK485).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из полипептида, содержащего любой вариант GAIM, раскрытый в данном документе, и Fc-участок IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из последовательности, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). В некоторых аспектах этого варианта осуществления аминокислотная последовательность участка GAIM слитого белка GAIM-Ig отличается от последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, на 10-15, 1-10 или 1-5 консервативных замен. В других аспектах этого варианта осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из SEQ ID NO: 19 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). Например, в некоторых аспектах слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 (PB108). В других аспектах этого варианта осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из варианта SEQ ID NO: 29, где вариант не содержит аминокислоту 1 ($\Delta M1$), аминокислоты 1 и 2 ($\Delta M1$ и $\Delta A2$), аминокислоту 485 ($\Delta K485$), аминокислоты 1 и 485 ($\Delta M1$ и $\Delta K485$) или аминокислоты 1, 2 и 485 ($\Delta M1$, $\Delta A1$ и $\Delta K485$).

По меньшей мере в одном варианте слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из последовательности, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности, описанной SEQ ID NO: 20, и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). В некоторых аспектах этого варианта осуществления аминокислотная последовательность участка GAIM слитого белка GAIM-Ig отличается от последовательности, описанной в SEQ ID NO: 20, на 10-15, 1-10 или 1-5 консервативных замен. В других аспектах этого варианта осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из SEQ ID NO: 20 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). Например, в некоторых аспектах слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 (PB122). В других аспектах этого варианта осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из варианта SEQ ID NO: 30, где вариант не содержит аминокислоту 1 ($\Delta M1$), аминокислоты 1 и 2 ($\Delta M1$ и $\Delta A2$), аминокислоту 485 ($\Delta K485$), аминокислоты 1 и 485 ($\Delta M1$ и $\Delta K485$) или аминокислоты 1, 2 и 485 ($\Delta M1$, $\Delta A1$ и $\Delta K485$).

По меньшей мере в одном варианте слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из последовательности, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности, описанной SEQ ID NO: 21, и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). В некоторых аспектах этого вари-

других аспектах этого варианта осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из SEQ ID NO: 26 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). Например, в некоторых аспектах слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 (PB127). В других аспектах этого варианта осуществления слитый белок GAIM-Ig по существу состоит из варианта SEQ ID NO: 36, где вариант не содержит аминокислоту 1 ($\Delta M1$), аминокислоты 1 и 2 ($\Delta M1$ и $\Delta A1$), аминокислоту 485 ($\Delta K485$), аминокислоты 1 и 485 ($\Delta M1$ и $\Delta K485$) или аминокислоты 1, 2 и 485 ($\Delta M1$, $\Delta A1$ и $\Delta K485$).

В некоторых аспектах изобретения участок GAIM и участок Ig слитых форм GAIM-Ig, описанных в данном документе, соединены коротким линкером. В некоторых вариантах осуществления короткий линкер богат глицином, серином и/или треонином, содержа по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления короткий линкер содержит по меньшей мере или около 50%, 55%, 60%, 70% или 75% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления короткий линкер состоит в основном или полностью из глицина, серина и/или треонина. Короткий линкер слитого GAIM-Ig может иметь длину до 25 аминокислот, например, от 1 до 5 аминокислот в длину, от 1 до 20 аминокислот в длину, от 5 до 10 аминокислот в длину, от 5 до 25 аминокислот в длину или от 10 до 25 аминокислот в длину. Короткие линкеры могут иметь, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления короткий линкер не содержит эпитоп для Т-клеток человека и не создает эпитоп для Т-клеток человека с вариантом GAIM или доменом Fc, с которым он связан. Примеры коротких линкеров включают линкеры, имеющие различное количество повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 27) или GGGGS (3GS; SEQ ID NO: 28), например от 2, 3, 4, до 5 повторов такой последовательности. Примеры коротких линкеров могут включать один или более остатков лизина. Другие примеры коротких линкеров включают аминокислотную последовательность ARS.

Слитые белки GAIM-Ig, описанные в настоящем документе, демонстрируют несколько преимуществ по сравнению с предшествующим уровнем техники. Исследования, направленные на выявление патологических форм A β в мозге при болезни Альцгеймера (AD), показали, что как нерастворимые бляшки, так и растворимые A β состоят из гетерогенной популяции N- и C-концевых усеченных пептидов A β (Wildburger et al., (2017) Sci Rep 7:9520), образуя структурно разнообразные конформации (Condello et al. (2018) PNAS, 115:E782-91; Rasmussen et al. (2017) PNAS, 114:13018-23; Liu et al. (2016) Sci Rep, 6:33079). Также наблюдается, что большинство укороченных на N-конце фрагментов A β составляют основную часть амилоидной бляшки (Wildburger et al., (2017) Sci Rep 7: 9520). Однако большинство связанных с антителами методов лечения агрегации или неправильной укладки амилоида потерпели неудачу в клинике, по меньшей мере частично, из-за их неспособности эффективно взаимодействовать с укороченными или модифицированными на N-конце формами амилоида. Слитые белки GAIM-Ig по настоящему изобретению восполняют ранее неудовлетворенную потребность в композиции, которая может быть направлена на множество амилоидных белков, поскольку эти слитые белки способны взаимодействовать с различными агрегатами A β , даже с агрегатами, имеющими различную морфологию и агрегационные свойства.

Описанные в настоящем документе слитые белки GAIM-Ig связывают, среди других агрегатов, укороченные агрегаты 11-42 A β и/или агрегаты посттрансляционно-модифицированного пироглутаматом A β , которые оба имеют клиническое значение при болезни Альцгеймера. Как показано далее в табл. 2 и 3, слитые белки GAIM-Ig по настоящему изобретению нацелены на несколько типов амилоидного белка, включая, помимо прочего, агрегаты A β , агрегаты усеченного с N-конца A β , тау, множественные конформеры транстиретина (TTR) и агрегаты легкой цепи (LC) иммуноглобулина с разнообразной морфологией. Эти мишени включают амилоидный белок, обнаруживаемый у пациентов с риском или страдающих заболеваниями, описанными в настоящем документе.

Терапия на основе антител, известная по предшествующему уровню техники, также может оказаться неэффективной в клинике, поскольку она не может блокировать агрегацию фосфорилированного тау и/или не может блокировать распространение тау из одной области мозга в другую. Открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig по настоящему изобретению удовлетворяют эту потребность. Слитые белки GAIM-Ig по изобретению вызывают ремоделирование тау-белка, таким образом предотвращая высвобождение агрегатами тау-тау растворимого тау и блокируя распространение агрегатов тау.

В итоге, слитые белки GAIM-Ig, раскрытые в настоящем документе, представляют собой уникальный подход к предотвращению или удалению патологических агрегатов амилоида. По сравнению с альтернативами предшествующего уровня техники, открытые стабилизированные слитые белки GAIM, описанные в настоящем документе, демонстрируют большую эффективность, структурную стабильность и специфичность в отношении амилоида, включая как A β , так и тау-фибриллы, а также они являются частично или полностью деммунизированными.

Получение полипептидов.

Полипептиды по изобретению (например, полипептиды, содержащие один или более вариантов

GAIM, включая слитые белки) могут быть синтезированы с использованием методов, хорошо известных в данной области. Например, полипептиды по изобретению можно синтезировать в клетках рекомбинантным способом (см., например, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. и Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). В качестве альтернативы полипептиды по изобретению могут быть синтезированы с использованием известных способов синтеза, таких как твердофазный синтез. Методы синтеза хорошо известны в данной области (см., например, Merrifield, 1973, *Chemical Polypeptides*, (Katsouyannis and Panayotis eds.) pp. 335-61; Merrifield 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Davis et al. 1985, *Biochem. Intl.* 10:394; Finn et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:257; патент США № 3941763). В альтернативном варианте, конечная конструкция может иметь по существу ту же функцию, что и рекомбинантно полученный гибридный белок, но просто производится с использованием нерекомбинантных методов, таких как химия лигирования. Компоненты гибридных белков могут быть получены с использованием той же общей методологии описан для экспрессии g3p и мутаций g3p.

В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть слит с маркерной последовательностью, такой как пептид, который облегчает очистку слитого полипептида (либо отдельно, либо в дополнение к слиянию с другим белком или включению молекулы-носителя). Маркерная аминокислотная последовательность может представлять собой гексагистидиновый пептид (SEQ ID NO: 53), такой как метка, содержащаяся в векторе pQE (Qiagen, Mississauga, Онтарио, Канада), среди других, многие из которых коммерчески доступны. Как описано в Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 86: 821-824, например, гексагистидин (SEQ ID NO: 53) обеспечивает удобную очистку гибридного белка. Другая пептидная метка, полезная для очистки, гемагглютининовая метка (HA) соответствует эпитопу, полученному из белка HA вируса гриппа. (Wilson et al., (1984) *Cell* 37: 767).

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любой полипептид, содержащий вариант GAIM, описанный в настоящем документе, необязательно вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом. "Фармацевтическая композиция" относится к терапевтически эффективному количеству описанной в настоящем документе композиции с физиологически подходящим носителем и/или эксципиентом. Фармацевтическая композиция не вызывает значительного раздражения в организме. Фразы "физиологически подходящий носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель" могут использоваться взаимозаменяемо для обозначения носителя или разбавителя, который не вызывает значительного раздражения в организме и не нарушает биологическую активность и свойства вводимой композиции. Термин "эксципиент" относится к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения действующего ингредиента. Примеры, без ограничения, включают физиологический раствор, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла, полиэтиленгликоли и поверхностно-активные вещества, включая, например, полисорбат 20.

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены обычным способом с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, содержащих эксципиенты и вспомогательные вещества, которые облегчают превращение действующих ингредиентов в композиции, которые можно использовать в фармацевтике. Правильный состав зависит от выбранного пути введения и от природы доставляемой композиции (например, размера и растворимости полипептида). В одном аспекте этих вариантов осуществления фармацевтическая композиция составлена для инъекции или инфузии в кровотока пациента. В другом аспекте этих вариантов осуществления фармацевтическая композиция составлена для прямого введения в мозг или центральную нервную систему пациента, например, путем прямой интрамедуллярной, интратекальной или интравентрикулярной инъекции.

Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы композиции в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии действующих ингредиентов могут быть приготовлены в виде суспензий для инъекций на масляной или водной основе. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или сложные эфиры синтетических жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, увеличивающие вязкость суспензии, такие как натриевая карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты (например, поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат (Tween 20)), которые увеличивают растворимость активных ингредиентов, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Белковый агент, такой как, например, альбумин, может быть использован для предотвращения адсорбции полипептида по настоящему изобретению на поверхности средств доставки (т.е. мешка для внутривенного введения, катетера, иглы и т.п.).

Для перорального введения фармацевтические композиции могут быть составлены путем объединения полипептидов, описанных в настоящем документе, с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области.

Составы могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, во флаконах, ампулах или в многодозовых контейнерах с необязательно добавленным консервантом. Композиции могут представлять собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Однодозовые лекарственные формы могут иметь жидкую или твердую форму. Однодозовые лекарственные формы можно вводить непосредственно пациенту без модификации или их можно разбавлять или восстанавливать перед введением. В некоторых вариантах осуществления однодозовая лекарственная форма может вводиться в виде болуса, например, однократной инъекцией, однократной пероральной дозой, включая пероральную дозу, которая включает несколько таблеток, капсул, пилюль и т.д. В альтернативных вариантах осуществления однодозовая лекарственная форма может вводиться в течение определенного периода времени, например, путем инфузии или с помощью имплантированного насоса, такого как ICV-насос. В последнем варианте осуществления однодозовая лекарственная форма может представлять собой инфузионный мешок или резервуар с насосом, предварительно заполненный соответствующим количеством полипептида, содержащего вариант GA1M. В качестве альтернативы, инфузионный мешок или резервуар с насосом может быть подготовлен непосредственно перед введением пациенту путем смешивания соответствующей дозы полипептида, содержащего вариант GA1M с раствором в инфузионном мешке или резервуаре насоса.

Другой аспект изобретения включает способы получения фармацевтической композиции по изобретению. Методики составления лекарственных препаратов можно найти, например, в последней редакции "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, включают композиции, в которых действующие ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченной цели.

Определение терапевтически или диагностически эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области, особенно в свете подробного описания, представленного в данном документе.

Дозировка и интервал могут регулироваться индивидуально для обеспечения уровней носителя фогового дисплея в головном мозге, которые достаточны для лечения или диагностики конкретного заболевания, расстройства или состояния головного мозга (минимальная эффективная концентрация, МЕС). МЕС будет различаться для каждого препарата, но ее можно оценить на основе данных *in vitro*. Дозировки, необходимые для достижения МЕС, будут зависеть от индивидуальных характеристик.

Диапазоны дозирования также могут быть определены с использованием значения МЕС. Препараты следует вводить по схеме, которая поддерживает уровни в мозге выше МЕС в течение 10-90% времени, предпочтительно, между 30-90% времени и, наиболее предпочтительно, 50-90% времени.

В зависимости от тяжести и чувствительности заболевания, подлежащего лечению, введение может быть однократным или многократным, с курсом лечения, продолжающимся от нескольких дней до нескольких недель или до тех пор, пока не произойдет излечение, или не будет достигнуто ослабление состояния заболевания.

Количество вводимой композиции, конечно, будет зависеть от субъекта, который подлежит лечению или диагностике, тяжести заболевания, заключения лечащего врача и т.п.

Композиции по настоящему изобретению могут, если желательно, быть представлены в упаковке или в дозирующем устройстве, таком как одобренный FDA набор, который может содержать одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих действующий ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К упаковке или дозатору могут прилагаться инструкции по введению. На упаковке или дозаторе также может быть размещено уведомление, связанное с контейнером, в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов, причем это уведомление отражает одобрение агентством формы композиций или введения человеку или животному. Такое уведомление, например, может относиться к маркировке, одобренной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США для рецептурных лекарственных средств или одобренного вкладыша в продукт. Композиции, содержащие препарат по изобретению, составленный в совместимом фармацевтическом носителе, также могут быть приготовлены, помещены в соответствующий контейнер и помечены для лечения указанного заболевания, как дополнительно подробно описано в данном документе.

Терапевтическое применение.

Другой аспект изобретения относится к применению любого из полипептидов, молекул нуклеиновых кислот или композиций по настоящему изобретению при лечении одного или более заболеваний, ассоциированных с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, включая, но не

ограничиваясь ими, те заболеваниями, которые включают: транстиретин, легкую цепь иммуноглобулина (каппа или лямбда), $fA\beta 42$, $f\alpha_{syn}$, fNM или $f\tau au$.

В контексте лечения термины "пациент", "субъект" и "реципиент" используются взаимозаменяемо и включают людей, а также других млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек, у которого обнаружен положительный биомаркер, связанный с болезнью неправильно свернутого белка. В одном варианте осуществления у пациента наблюдаются отложения β -амилоида, обнаруженные с помощью ПЭТ-изображений с флорбетапиром.

Термин "лечение" и его родственные ему термины относятся к снижению, замедлению или обращению вспять прогрессирования заболевания у пациента, проявляющего один или более клинических симптомов заболевания. "Лечение" также относится к уменьшению, замедлению или обращению симптомов заболевания у пациента, проявляющего еще один клинический симптом заболевания. В одном варианте осуществления у пациента наблюдаются отложения β -амилоида, обнаруженные с помощью ПЭТ-изображений с флорбетапиром, и количество отложений β -амилоида снижается при лечении. В одном варианте осуществления у пациента наблюдаются отложения β -амилоида, обнаруженные полипептидами или полипептидными композициями по настоящему изобретению, и количество отложений β -амилоида уменьшается или сохраняется при лечении. В другом варианте осуществления у пациента обнаруживаются амилоидные отложения любого типа, обнаруженные с помощью ПЭТ-визуализации, и когнитивная функция пациента улучшается в результате лечения. Улучшение когнитивной функции можно оценить с помощью методов и тестов McKhann et al., *Alzheimer's & Dementia* 7 (3): 263-9 (2011).

"Профилактика" или "предупреждение" (используемые в настоящем документе взаимозаменяемо) отличаются от лечения и относятся к введению полипептида, нуклеиновой кислоты или композиции индивиду перед появлением каких-либо клинических симптомов. Охватывается профилактика с использованием любых полипептидов, нуклеиновых кислот или их композиций по настоящему изобретению. Профилактика может проводиться у лиц, которые, как известно, подвержены повышенному риску заболевания или у которых наверняка разовьется болезнь, исключительно на основании одного или более генетических маркеров. Для различных заболеваний неправильного сворачивания белков было идентифицировано множество генетических маркеров. Например, люди с одной или более из шведских мутаций, мутаций Индиана или Лондон в $hAPP$ имеют повышенный риск развития болезни Альцгеймера с ранним началом и поэтому являются кандидатами на профилактику. Точно так же у людей с тринуклеотидными повторами CAG в гене хантингтина, особенно с 36 или более повторами, в конечном итоге разовьется болезнь Хантингтона, и они являются кандидатами на профилактику.

Заболевания, связанные с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком или характеризующиеся им, включают заболевания, связанные (например, вызванные или коррелирующие по меньшей мере частично) с неправильно свернутым амилоидным белком, агрегированным амилоидным белком или как неправильно свернутым, так и агрегированным амилоидным белком. Выше описаны пептиды или белки, которые могут образовывать амилоид. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения амилоид образован $A\beta$, включая, но не ограничиваясь ими, $A\beta 40$, $A\beta 42$, N -усеченный $A\beta 11-42$, $A\beta 11-42$ -Руго, $A\beta 3-42$ -Руго, $A\beta 1-42$ -E22Q-датская мутация или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления амилоид представляет собой прионный белок, например PrP^{Sc} . В некоторых вариантах осуществления амилоид образован транстиретином. В некоторых вариантах осуществления амилоид образован легкой цепью иммуноглобулина, например легкой каппа-цепью иммуноглобулина и/или легкой лямбда-цепью иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления амилоид образован τau . В некоторых вариантах осуществления амилоид образован α -синуклеином.

Заболевания, ассоциированные с или отличающиеся неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, описаны выше. Многие из указанных выше заболеваний неправильно свернутого и/или агрегированного амилоидного белка возникают в центральной нервной системе (ЦНС). Неограничивающимися примерами заболеваний, возникающих в ЦНС, являются болезнь Паркинсона; болезнь Альцгеймера; лобно-височная деменция (FTD), включая пациентов со следующими клиническими синдромами: поведенческий вариант FTD (bvFTD), прогрессирующая нелегкая афазия (PNFA) и семантическая деменция (SD); лобно-височные долевые дегенерации (FTLD); и болезнь Хантингтона. Полипептиды, нуклеиновые кислоты и композиции по настоящему изобретению можно использовать для лечения заболеваний, характеризующихся неправильной упаковкой и/или агрегированным амилоидным белком, которые возникают в центральной нервной системе (ЦНС).

Неправильная укладка и/или агрегация белков также может происходить за пределами ЦНС. Амилоидоз А (AA) (для которого белком-предшественником является сывороточный аполипопротеин острой фазы, SAA) и множественная миелома (белки-предшественники иммуноглобулина легкой и/или тяжелой цепи) являются двумя широко известными заболеваниями неправильного сворачивания и/или агрегированных белков, которые возникают вне ЦНС. Другие примеры включают заболевание, связанное с амилоидом, образованным $\alpha 2$ -микроглобулином, транстиретином (например, FAP, FAC, SSA), (апо)сывороточным AA, аполипопротеинами AI, AII и AIV, гельсолином (например, финская форма FAP), легкой цепью иммуноглобулина (каппа или лямбда), лизоцимом, фибриногеном, цистатином С

(например, церебральная амилоидная ангиопатия, церебральная флemorрагия с амилоидозом, исландский тип), кальцитонином, прокальцитонином, островковым амилоидным полипептидом (например, IAPP-амилоидоз), предсердным натрийуретическим фактором, пролактином, инсулином, лактаэдрином, кератоэпителином, лактоферрином, одонтогенным белком, амелобласт-ассоциированным белком и семеноглином I. Полипептиды, нуклеиновые кислоты и композиции по настоящему изобретению можно использовать для лечения заболеваний, включающих неправильную укладку и/или агрегацию белков, происходящие вне ЦНС.

Заболевания, связанные с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком или характеризующиеся им, также могут включать поражения, обусловленные тау-белком. Обзор приведен в Lee et al., *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1121-159 (2001). Тау-белки представляют собой ассоциированные с микротрубочками белки, экспрессируемые в аксонах нейронов как центральной, так и периферической нервной системы. Изобретение охватывает нейродегенеративные таупатии (иногда называемые таупатиями). Примеры таупатий включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм-деменцию, аргирофильную зерновую деменцию, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейтцфельда-Якоба, *dementia pugilistica*, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височную деменцию, включая лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с 17-й хромосомой, болезнь Боуэра-Штройслера-Шейнкера, болезнь Халлервордена-Шпатца, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа C, негуамскую болезнь моторных нейронов с нейрофибриллярными клубочками, болезнь Пика, постэнцефалитный паркинсонизм, церебральный паркинсонизм прионных белков, прогрессирующую супрануклеарную паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит и деменция только с нейрофибриллярными клубочками. Некоторые из этих заболеваний могут также включать отложения фибриллярных пептидов β -амилоида. Например, болезнь Альцгеймера проявляется как отложениями β -амилоида, так и поражениями от тау-белка. Точно так же прион-опосредованные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, церебральная амилоидная ангиопатия прионного белка и синдром Герстманна-Штройслера-Шейнкера также могут иметь тау-поражения. Таким образом, указание на то, что заболевание является "таупатией", не следует интерпретировать как исключяющее это заболевание из других классификаций или групп нейродегенеративных заболеваний или заболеваний неправильно свернутых и/или агрегированных амилоидных белков, которые представлены просто для удобства. Полипептиды и композиции по изобретению можно использовать для лечения нейродегенеративных заболеваний, а также заболеваний, связанных с поражениями от тау-белка.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав предназначены для применения в способе снижения уровня амилоида у пациента, имеющего симптомы, связанные с присутствием амилоида, или который является положительным по биомаркеру, связанному с болезнью неправильного сворачивания белка, включающем в себя введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции или состава, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав предназначены для применения в способе поддержания уровня амилоида у пациента, имеющего симптомы, связанные с присутствием амилоида, или который является положительным по биомаркеру, связанному с болезнью неправильного сворачивания белка, включающем в себя введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции или состава, описанного в настоящем документе. В некоторых аспектах этих вариантов реализации биомаркер представляет собой β -амилоид, который может быть обнаружен с помощью радиофармацевтического агента флорбетапир (AV-45, Eli Lilly). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления путь введения представляет собой интратекальную инъекцию или инфузию, прямую интравентрикулярную инъекцию или инфузию, интрапаренхимальную инъекцию или инфузию, или внутривенную инъекцию или инфузию.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав предназначены для применения в способе дезагрегации или ремоделирования амилоида у пациента. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав предназначены для применения в способе уменьшения образования амилоида в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по настоящему изобретению предназначены для применения в способе стимулирования клиренса амилоида в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по изобретению предназначены для применения в способе ингибирования агрегации амилоида в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по настоящему изобретению предназначены для применения в способе удаления токсичных олигомеров из мозга. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по настоящему изобретению предназначены для применения в способе предотвращения образования токсичных олигомеров в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по настоящему изобретению предназначены для применения в способе защиты нейронов от амилоидного повреждения. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фар-

мацевтическая композиция или композиция предназначена для использования в способе уменьшения распространения агрегатов α -синуклеина от клетки к клетке. В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав предназначены для применения в способе блокирования распространения агрегатов α -синуклеина от клетки к клетке. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав вводят пациенту, нуждающемуся в этом, путем интратекальной инъекции или инфузии, прямой интравентрикулярной инъекции или инфузии, внутривентрикулярной инъекции или инфузии, или внутривенной инъекции или инфузии.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по изобретению предназначены для применения в способе дезагрегации $A\beta$ -амилоидных отложений в головном мозге, включающем в себя инъекцию непосредственно в мозг нуждающегося в этом пациента эффективного количества полипептида, фармацевтической композиции или состава, таким образом вызывая уменьшение отложений $A\beta$ -амилоида в головном мозге. В других вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или композиция по настоящему изобретению предназначены для применения в способе дезагрегации $A\beta$ -амилоидных отложений в головном мозге, включающем в себя введение путем внутривенной доставки нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептида, фармацевтической композиции или препарата, таким образом вызывая уменьшение отложений $A\beta$ -амилоида в головном мозге.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция или состав по настоящему изобретению для применения для защиты нейронов от амилоидного повреждения вводится профилактически.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента есть положительный результат по биомаркеру, связанному с болезнью неправильного свертывания и/или агрегации белка. В одном варианте осуществления биомаркер представляет собой β -амилоид, а агент, используемый для обнаружения β -амилоида, представляет собой флорбетапир (AV45, Eli Lilly).

В отличие от терапии на основе антител предшествующего уровня техники (например, 6E10), слитые белки GA1M-Ig, описанные в настоящем документе, нацелены на ядро амилоида, а не на неструктурированные или частично структурированные N-концевые остатки, и демонстрируют превосходную ремоделирующую активность (фиг. 10A). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептид, фармацевтическая композиция или состав по изобретению предназначены для применения в способе ремоделирования амилоида. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления путь введения представляет собой интратекальную инъекцию или инфузию, прямую интравентрикулярную инъекцию или инфузию, интрапаренхимальную инъекцию или инфузию, или внутривенную инъекцию или инфузию.

В общем, полипептиды, раскрытые в данном документе, связываются с амилоидом по меньшей мере так же эффективно, как фаг M13, белок g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, связываются с амилоидом более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, ремоделируют амилоид более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, ингибируют агрегацию амилоида более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, очищают от токсичных олигомеров более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, снижают распространение агрегатов α -синуклеина от клетки к клетке более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, обнаруживают амилоид более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, предотвращают заболевание, связанное с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, более эффективно, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, лечат заболевание, связанное с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, эффективнее, чем фаг M13, g3r или вариант или слитый белок g3r, раскрытые в предшествующем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, вызывают меньший иммунный ответ у пациента по сравнению с фагом M13, g3r или вариантом или слитым белком g3r, раскрытыми в предшествующем уровне техники. По меньшей мере в одном варианте осуществления полипептиды, раскрытые в настоящем документе, не вызывают иммунного ответа у пациента.

В другом варианте осуществления любое из заболеваний, описанных выше, можно лечить путем введения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (т.е. кодирующей полипептид,

содержащий вариант GAIM, который проявляет пониженную иммуногенность или не имеет ее и обладает способностью связывать амилоид, дезагрегировать/ремоделировать амилоид и/или ингибировать агрегацию амилоида) отдельно или в связке с подходящим носителем, например, липидной наночастицей, полимерным носителем или вектором, таким как вирусный вектор, напрямую пациенту любым подходящим путем, например, с помощью ингаляции и внутривенной инфузии. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий вариант GAIM, может быть ДНК или РНК.

Диагностика.

Диагностические композиции охватываются настоящим изобретением и могут содержать любой из описанных выше полипептидов по изобретению (например, полипептид, содержащий вариант GAIM, такой как полипептид, содержащий слитый GAIM-Ig. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды, фармацевтические композиции и составы, описанные в настоящем документе, используются в диагностических приложениях, связанных с различными заболеваниями, описанными в настоящем документе. Например, связывание полипептида по настоящему изобретению с амилоидным белком можно использовать для обнаружения связанного амилоидного белка. Точно так же связывание полипептида по изобретению при использовании в качестве визуализирующего агента *in vivo* или *in vitro* может являться частью диагностики описанного в настоящем документе нарушения связывания белка, агрегации белка или нейродегенеративного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в настоящем документе, используется в качестве агента для визуализации амилоида, где визуализирующий агент может обнаруживать амилоидный белок и диагностировать заболевание, связанное с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком. Поскольку описанные в настоящем документе полипептиды связывают амилоид независимо от типа фибрилл, они могут отображать и обнаруживать любой амилоидный агрегат (A β , тау, α -синуклеин, транстиретин, легкую цепь иммуноглобулина и т.д.) и могут диагностировать широкий спектр амилоид-ассоциированных болезней и состояний. В некоторых вариантах осуществления полипептид, используемый в качестве агента для визуализации амилоида, дополнительно содержит детектируемую метку.

Различные метки могут быть присоединены к полипептиду, содержащему вариант GAIM, описанный в данном документе, с использованием стандартных методик мечения белков. Примеры меток включают флуоресцентные метки и радиоактивные метки. Существует большое разнообразие радиоактивных меток, которые можно использовать, но в целом метки часто выбирают из радиоактивных меток, включающих, но не ограниченных ими, ^{18}F , ^{11}C , и ^{123}I . Эти и другие радиоизотопы могут быть присоединены к белку с использованием хорошо известных химических реакций. В одном варианте осуществления метку обнаруживают с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Однако любой другой подходящий метод обнаружения радиоизотопов также может быть использован для обнаружения радиоактивного трейсера.

Полипептиды и композиции по настоящему изобретению можно использовать в качестве средств диагностической визуализации в комбинации с агентом визуализации, специфичным для β -амилоида, таким как, например, F18-AV-45, Eli Lilly. Поскольку использование диагностической композиции по настоящему изобретению вместе с визуализирующим агентом, специфичным к β -амилоиду, приведет к обнаружению не- β -амилоидных агрегатов в результате дифференциального обнаружения, в одном варианте осуществления диагностическая композиция по настоящему изобретению используется в качестве визуализирующего агента в сочетании с агентом для визуализации β -амилоида для обнаружения не- β -амилоидных агрегатов.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды, описанные в настоящем документе, или их композиции используются для обнаружения β -амилоида в ЦНС, включая головной мозг.

Диагностические композиции по настоящему изобретению можно вводить с использованием тех же способов, которые описаны для терапевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления путь введения представляет собой интратекальную инъекцию или инфузию, прямую интравентрикулярную инъекцию или инфузию, интрапаренхимальную инъекцию или инфузию, или внутривенную инъекцию или инфузию.

Рекомбинантные методы.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по изобретению. Например, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, содержащий вариант GAIM, включая полипептиды, содержащие вариант GAIM, присоединенный напрямую или через короткий линкер к константной области иммуноглобулина, раскрытый в настоящем документе. В общем, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, содержащий вариант GAIM, или слитый белок GAIM-Ig, получают с использованием обычных методов рекомбинантной ДНК, таких как клонирование мутантных доменов GALM, прямой синтез ДНК или путем выделения соответствующей ДНК из библиотеки с использованием, например, последовательности M13 в качестве зонда. См., например, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.;

Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. Нуклеиновые кислоты, кодирующий полипептид, содержащий вариант GALM или слитый белок GALM-Ig, также могут быть получены, как представлено в примерах ниже.

Для рекомбинантного получения любую из последовательностей нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно вставить в соответствующий экспрессионный вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности, или, в случае вирусного РНК-вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции. Кодирующая нуклеиновая кислота вставляется в вектор в надлежащей рамке считывания. Соответственно, изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты по изобретению. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, ДНК-векторы, фаговые векторы, вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.д. Векторы могут включать, например, бакуловирус, вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, R1-плазмиду или T1-плазмиду. Выбор подходящего вектора для клонирования нуклеиновых кислот по изобретению может быть сделан специалистами в данной области, используя хорошо известные знания о совместимости вектора с выбранной клеткой-хозяином, в которой будет осуществляться экспрессия. Она может быть осуществлена в любых клетках млекопитающих, растительных клетках, клетках насекомых, бактериальных клетках, грибковых клетках, трансгенных клетках животных и т.д. Примеры клеток млекопитающих, подходящих для получения полипептидов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, клетки HEK293, клетки-производные HEK293, клетки CHO, клетки-производные CHO, клетки HeLa и клетки COS. Примеры бактериальных клеток включают, но не ограничиваются ими, клетки *E. coli*. Примеры растительных клеток включают, но не ограничиваются ими, клетки ряски. См., например, патент США 8022270. Подходящие векторы для каждого из этих типов клеток хорошо известны в данной области и обычно коммерчески доступны. Неограничивающие примеры способов трансфекции описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты могут быть транзитивно или стабильно трансфицированы в желаемые клетки-хозяева в соответствии со способами, известными в данной области.

По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 19 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 20 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 21 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий в основном из SEQ ID NO: 22 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 23 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 24 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 25 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из SEQ ID NO: 26 и Fc-участка IgG человека (например, IgG1 человека).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 (PB108). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 (PB122). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 (PB116). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32 (PB114). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 33 (PB109). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 (PB110). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35 (PB105). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 (PB127). Как описано выше, эти варианты осуществления включают нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36, где в варианте отсутствуют аминокислота 1 ($\Delta M1$), аминокислоты 1 и 2 ($\Delta M1$ и $\Delta A1$), аминокислота 485 ($\Delta K485$), аминокислоты 1 и 485 ($\Delta M1$ и $\Delta K485$) или аминокислоты 1, 2 и 485 ($\Delta M1$, $\Delta A1$ и $\Delta K485$).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению, содержит SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, содержащая любую из SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-участок IgG (например, IgG1 или IgG2 человека). По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая открытый стабилизированный вариант GAIM, и нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-участок IgG, связаны нуклеиновой кислотой, кодирующей короткий линкер. По меньшей мере в одном варианте нуклеиновая кислота кодирует короткий линкер ARS. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно кодирует сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно кодирует сигнальную последовательность, имеющую N-концевую последовательность из 18 аминокислот GenBank Ref Seq NP_510891.1.

По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению, представляет собой SEQ ID NO: 45. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 46. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 47. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 48. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 49. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 50. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 51. По меньшей мере в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 52.

Векторы, используемые при трансформации, обычно содержат селективируемый маркер, используемый для идентификации трансформантов. В бактериальных системах он может включать ген устойчивости к антибиотикам, таким как ампициллин или канамицин. Селективные маркеры для использования в культивируемых клетках млекопитающих включают гены, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как неомидин, гиромидин и метотрексат. Селективный маркер может быть амплифицируемым селективным маркером. Один амплифицируемый селективный маркер представляет собой ген DHFR. Другим амплифицируемым маркером является кДНК DHFRr (Simonsen and Levinson, PNAS (1983) 80: 2495). Селективные маркеры описаны Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA), и выбор селективных маркеров находится в пределах среднего уровня квалификации в данной области. Экспрессионные элементы экспрессионных систем различаются по силе и специфике. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор, любой из многих подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцируемые промоторы, можно использовать в экспрессионном векторе. Например, при клонировании в бактериальных системах можно использовать индуцируемые промоторы, такие как pL бактериофага λ , pIac, ptrp, ptac (гибридный промотор ptrp-Iac) и т.п.; при клонировании в системах клеток насекомых можно использовать промоторы, такие как промотор бакуловирусного полиэдра; при клонировании в системах клеток растений можно использовать промоторы, происходящие из генома растительных клеток (например, промоторы теплового шока; промотор малой субъединицы RUBISCO; промотор для связывающего хлорофилл-a/b белка) или из вирусов растений (например, промотор 35S РНК CaMV; промотор белка оболочки TMV); при клонировании в клеточных системах млекопитающих можно использовать промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5 К вируса осповакцины); при создании клеточных линий, содержащих множество копий продукта экспрессии, могут использоваться векторы на основе SV40, BPV и EBV с подходящим селективным маркером. В случаях, когда используются векторы для экспрессии в растениях, экспрессия последовательностей, кодирующих линейные или нециклизованные формы продукта экспрессии по изобретению, может управляться любым из ряда промоторов. Например, могут

использоваться вирусные промоторы, такие как промоторы 35S РНК и 19S РНК CaMV (Brisson et al., *Nature* (1984) 31 0:511-514) или промотор белка оболочки TMV (Takamatsu et al., *EMBO J* (1987) 6:307-311); в альтернативном варианте могут использоваться промоторы растений, такие как малая субъединица RUBISCO (Coruzzi et al., *EMBO J.* (1984) 3:1671-1680; Broglie et al., *Science* (1984) 224: 838-843) или промоторы теплового шока, например, соевые hsp17.5-Е или hsp17.3-В (Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6: 559-565). Эти конструкции могут быть введены в клетки растений с использованием Ti-плазмид, Ri-плазмид, растительных вирусных векторов, прямой трансформации ДНК, микроинъекции, электропорации и т.д. См., например, Weissbach & Weissbach 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, стр. 421-463; и Grierson & Corey 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9. В одной системе экспрессии в клетках насекомых, которую можно использовать для продукции белков по изобретению, вирус ядерного полигиброза *Autographa californica* (AcNPV) используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная последовательность может быть клонирована в несущественные области (например, в ген полиэдра) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдра). Успешная вставка кодирующей последовательности приводит к инактивации гена полиэдра и образованию не заключенного в полиэдр рекомбинантного вируса, то есть вируса, лишённого белковой оболочки, кодируемой геном полиэдра. Эти рекомбинантные вирусы используются для заражения клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется встроенный ген. См., например, Smith et al., *J. Viral.* (1983) 46:584; патент США № 4215051. Дополнительные примеры этой системы экспрессии можно найти в Ausubel et al., eds. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать любую из нескольких систем экспрессии на основе вирусов. В случаях, когда в качестве вектора экспрессии используется аденовирус, кодирующая последовательность может быть лигирована с аденовирусным комплексом контроля транскрипции/трансляции, например, поздним промотором и тройной лидерной последовательностью. Затем этот гибридный ген может быть вставлен в геном аденовируса путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способным экспрессировать пептид в инфицированных хозяевах (см., например, Logan & Shenk, *PNAS* (1984) 81:3655). В качестве альтернативы можно использовать промотор 7,5 К вируса осповакцины (см., например, Mackett et al., *PNAS* (1982) 79:7415; Mackett et al., *J. Viral.* (1984) 49: 857; Panicali et al., *PNAS* (1982) 79:4927). Другие вирусные экспрессионные системы включают аденоассоциированный вирус и лентивирусы.

В другом варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, несущей вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по изобретению. Способы трансфекции, трансформации или иного введения вектора по изобретению в клетку-хозяина известны в данной области. Клетка, несущая вектор, при культивировании в подходящих условиях будет продуцировать полипептиды по изобретению. Как отмечалось выше, подходящие клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, клетки млекопитающих, трансгенные клетки животных, клетки растений, клетки насекомых, бактериальные клетки и клетки грибов. Например, подходящие клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, клетки НЕК293, клетки-производные НЕК293, клетки CHO, клетки-производные CHO, клетки HeLa и клетки COS.

Клетки-хозяева, содержащие конструкции нуклеиновых кислот (например, векторы), выращивают в соответствующей питательной среде. Используемый в настоящем документе термин "подходящая среда для роста" означает среду, содержащую питательные вещества, необходимые для роста клеток. Полученные рекомбинантно полипептиды по изобретению можно выделить из культуральной среды с использованием методик, известных в данной области.

Конкретные примеры векторов и клеток, используемых для рекомбинантного получения полипептидов по изобретению, приведены в примерах ниже.

Примеры

Пример 1: экспрессия, очистка и сборка фибрилл TauK18P301L.

Фрагмент TauK18P301L человека, соответствующий остаткам 244-372 Tau-441 (2N4R) с мутацией P213L, был экспрессирован и очищен, как описано для tau-MTBR (Krishnan et al. (2014) *J Mol Biol*, 426:2500-19). Сборку фибрилл Tau-K18P301L осуществляли путем добавления 40 мМ низкомолекулярного гепарина (Fisher Scientific) к 40 мкМ мономеру TauK18P301L в 0,1 М ацетат-натриевом буфере, pH 7,0, содержащем 2 мМ DTT, и инкубации в течение 3 дней при 37°C. Образование фибрилл подтверждали с использованием тιοфлавина Т (ThT).

Пример 2: сборка фибрилл Aβ.

Aβ1-42 (rPeptide), N-усеченный Aβ11-42 (Bachem), Aβ11-42-Пуго (AnaSpec), Aβ3-42-Пуго (AnaSpec) и Aβ1-42-E22Q (AnaSpec) растворяли в гексафторизопропанол (HFIP) и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов до появления прозрачного раствора. Раствор пептида сушили под вакуумом в течение 1 ч. Сборку фибрилл осуществляли, как описано Stine et al., 2003. 100 микрограммов пептида Aβ растворяли в 40 мкл DMSO, разбавляли до 1140 мкл в 10 мМ растворе HCl и инкубировали при

встряивании при 500 об/мин в течение 24 часов при 37°C. Образование фибрилл подтверждали с использованием ThT.

Пример 3: получение слитых белков GAIM-Ig.

Сайт-специфичный мутагенез контрольного каркаса PB120 выполняли в β -тяжах, обращенных к внутренней бороздке доменов GAIM (фиг. 1A). Эти β -тяжи, 4 и 5 в домене N1 и 9 и 10 в домене N2, способствуют междоменным взаимодействиям в закрытом состоянии GAIM и предотвращают экспозицию сайта связывания TolA (Floffman-Thoms et al. (2013)) *J Biol Chem*, 288:12979-91), который, как ранее было показано, частично перекрывается с мотивом связывания амилоида в GAIM (Krishnan et al. (2014) *J Mol Biol*, 426: 2500-19). Кроме того, были мутированы участки в N2-шарнирной области, участвующие в сборке домена N1-N2, и специфичные области в N2, важные для связывания F-пилей (Weininger et al. (2009) *PNAS*, 106:12335-40; Deng and Perham (2002) *J Mol Biol*, 319:603-14), чтобы исследовать, как амилоид-связывающая активность GAIM сохраняется в его функции во время фаговой инфекции.

Слитые белки GAIM-Ig экспрессировали с использованием системы экспрессии Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Очистку белков проводили на колонке HiTrap® MabSelect™ SuRe™ (GE Healthcare Lifesciences) в 20 мМ фосфате натрия, pH 7,0 с последующим градиентным элюированием в 20 мМ ацетате натрия с pH от 4,0 до 3,6 за 20 объемов колонки (CV) с использованием FPLC-системы АКТА™ Pure FPLC. Слитые белки диализовали в D-PBS pH 7 и стерилизовали фильтрованием (спин-колонки Ultrafree®-MC, Millipore). Чистоту белка анализировали разделением в геле NuPAGE 4-12% Bis-Tris в электродном буфере MES-SDS (Thermo Fisher Scientific), с последующим окрашиванием раствором InstantBlue™ (Expedeon). Кроме того, аналитическую гель-фильтрацию (SEC) использовали для оценки чистоты слитых белков GAIM-IgG с использованием колонки TSKgel® G3000SW XL, 7,8 мм ID×30 см, 5 мМ (TOSOH BIOSCIENCES) в UHPLC-системе с фокусировкой UltiMate™ 3000 (ThermoFisher Scientific). Для каждого образца 7,5 мкг белка наносили на колонку для SEC, разделение проводили в мобильной фазе D-PBS при скорости потока 0,5 мл/мин. Чистоту пиков анализировали с использованием программного обеспечения Chromeleon™ 7. Варианты слитых белков IgG GAIM были синтезированы компанией ATUM.

Пример 4: получение димеров GAIM.

Димеры GAIM были получены из слитых белков GAIM-Ig с использованием фермента FabRICATOR® (IdeS) (Genovis), который специфически скрепляет слитые белки в шарнирной области иммуноглобулина с образованием димеров GAIM, связанных двумя дисульфидными связями (фиг. 1C), в течение 2 часов при 37°C. За расщеплением следовало отделение от Fc с помощью Capto™ Adhere в соответствии с протоколом производителя. Чистоту димера GAIM подтверждали разделением в геле NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris в электродном буфере MES-SDS. Димер GAIM (0,5 мкМ) инкубировали в течение 2 часов при 25°C в 100 мМ фосфате калия, pH 7,0 с возрастающей концентрацией гуанидина (Sigma). Флуоресценцию измеряли в 10-миллиметровых ячейках при 310 нм и 340 нм после возбуждения при 280 нм и при 360 нм после возбуждения при 295 нм. Данные анализировали с использованием модели сворачивания для двух состояний, предполагающей линейную зависимость эмиссии флуоресценции от концентрации гидрохлорида гуанидина. После подтверждения ожидаемого размера молекулы и клиренса Fc-фрагментов на SDS-полиакриламидном геле, проводили исследования разворачивания белка.

Пример 5: температурное разворачивание GAIM, отслеживаемое с помощью анализа связывания SYPRO® Orange.

Анализ связывания SYPRO® Orange проводили для мониторинга отделения домена GAIM и стабильности домена N2. SYPRO® Orange плохо связывается с закрытой конформацией свернутого GAIM в водном растворе. Когда два домена GAIM диссоциируют и обнажают гидрофобные остатки, краситель связывается с открытыми гидрофобными поверхностями и демонстрирует повышенную флуоресценцию.

Одномикромолярный слитый GAIM-Ig в PBS смешивали с 20-кратным избытком SYPRO® Orange (Invitrogen, кат. № S-6650) в 96-луночной планшете и герметично закрывали. За термическим разворачиванием следили на приборе для ПЦР в реальном времени, Roche LightCycler® 480 RT-PCR, путем непрерывного повышения температуры от 20°C до 95°C со скоростью 0,24°C/мин. Возбуждение было установлено на 465 нм, а испускание на 580 нм с коэффициентом плавления 1, квантовым фактором 10 и максимальным временем интегрирования в течение двух секунд. Произвольные единицы флуоресцентного сигнала регистрировали и нормализовали по шкале от 0 до 100 (Layton and Hellings, 2011).

Термическое разворачивание мономера GAIM, отслеживаемое по связыванию SYPRO® Orange, показало единственный переход при температуре около 43°C, который соответствует открытию домена и переходу к разворачиванию N2 (фиг. 4A-4B). Димеры GAIM, полученные согласно примеру 4, показали идентичные мономерам профили плавления в растворе, тогда как слитые белки GAIM-Ig в растворе показали три различных перехода при термическом разворачивании (фиг. 4A-4B). Первый переход, Tm1, произошел при температуре около 44°C, что наблюдается для GAIM-мономеров и димеров (фиг. 4B). Два дополнительных перехода при 64°C и 81°C подобны переходам разворачивания Fc-доменов (Traхlmaуr et al., 2012, *Biochim Biophys Acta*, 1824:524-529). Сравнение GAIM-специфичного Tm1 пока-

зало, что домены GALM и Fc остаются такими же независимо свернутыми доменами, и новые структурные элементы не образуются в химерной молекуле.

Пример 6: GAİM сохраняет свою природную конформационную стабильность в димере слитых с IgG белков.

Конформационную стабильность GALM в слитом IgG исследовали с использованием индуцированного гидрохлоридом гуанидина (GuHCl) разворачивания димера GAİM по его собственной флуоресценции. Димеры GALM были получены, как описано в примере 4 и уравновешены в растворах 0, 2 и 5 М GuHCl при 25°C в течение 2 часов. Селективное возбуждение остатков Trp при 295 нм показало минимальное изменение интенсивности флуоресценции димера GALM при концентрации от 0 до 2 М без изменения λ_{max} эмиссии (345 нм) (фиг. 5А). При 5 М GuHCl флуоресценция Trp была сдвинута в красную область на 15 нм (λ_{max} 360 нм), а интенсивность флуоресценции была значительно выше, чем у образцов в 0 и 2 М гуанидинхлориде. Затем растворы димеров GALM возбуждали при 280 нм (остатки Trp и Tyr) и записывали спектры флуоресцентного излучения (фиг. 5В). Интенсивность флуоресцентного излучения при 340 нм снизилась при концентрации GuHCl между 0 и 2 М, а затем увеличилась на такую же величину на 5 М GuHCl. Подобные спектральные изменения также наблюдались для g3p (Martin and Schmid, 2003, J Mol Biol, 328:863-75), что указывает на то, что GAİM в вариантах слитых белков GAİM-Ig сохранил нативную конформационную стабильность GAİM из нативного g3p.

Авторы получили подробные профили денатурации димеров GAİM путем регистрации интенсивности излучения флуоресценции при 310, 340 и 360 нм в диапазоне концентраций GuHCl. Димеры GAİM показали двухфазный профиль денатурации на 340 нм при возбуждении при 280 нм (фиг. 5С). Первый переход произошел при концентрации GuHCl между 1 и 2 М, а следующий - между 2 и 3 М GuHCl. Авторы тогда сделали подгонку профилей денатурации при 310 нм (возбуждение 280 нм) и 360 нм (возбуждение 295 нм) к модели разворачивания белка с двумя состояниями (фиг. 5D-5E) и рассчитали переходы денатурации домена N2 и N1 при 1,5 М и 2,6 М GuHCl соответственно. Первый переход при 1,5 М GuHCl представляет собой разделение двух доменов N1 и N2 и одновременное разворачивание менее стабильного домена N2. Второй переход представляет собой разворачивание более стабильного домена N1 в 2,6 М GuHCl. Эти значения соответствуют ранее описанным переходам при денатурации для g3p (Martin and Schmid, 2003, J Mol Biol, 328:863-75). Следовательно, эти данные показывают, что каждый GAİM в димере GAİM в слитом белке GAİM-Ig образует независимую единицу укладки и принимает конформацию аналогичную белку g3p, расположенному в окончаниях нитчатых фагов.

Пример 7: слитые белки GAİM-Ig связывают A β и тау-фибриллы. Пятьдесят микролитров фибрилл A β (0,8 мМ) или фибрилл tauK18P301L (1 мкМ) в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,6 добавляли в лунку 96-луночного планшета MaxiSorp® (Thermo Fisher) и инкубировали 16 часов при 4°C. Лунки промывали 3 раза DPBS-Tween (0,05%) и 2 раза DPBS с последующим блокированием SuperBlock™ (Thermo Scientific) в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Лунки промывали 3 раза PBS. Слитый белок GAİM-Ig добавляли в PBS-T с высокой концентрацией (14,7 мМ KH₂PO₄, 80,6 мМ Na₂HPO₄-7H₂O, 27 мМ KCl, 1,38 М NaCl, 0,05% Tween) в указанных концентрациях и инкубировали при 37°C в течение 2 часов с последующими 3 промывками DPBS-Tween (0,05%) и 3 промывками DPBS. Специфичное к Fc человека антитело-HRP (Jackson ImmunoResearch, номер по каталогу 109-035-008), разведенное 1:5000 в DPBS-Tween (0,05%), содержащем 0,2% желатина, добавляли на 45 минут при 37°C. После 2 промывок DPBS-Tween (0,05%) и 2 промывок DPBS сигнал проявляли раствором ТМВ (Thermo Fisher), реакцию останавливали добавлением 0,25 N HCl, и поглощение при 450 нм регистрировали с помощью планшетного спектрофотометра Tecan Infinite® M1000 PRO.

С помощью ELISA было обнаружено, что большинство мутаций в остатках N1 и N2, обращенных к внутренней бороздке GAİM, влияет на связывание фибрилл A β 1-42 (фиг. 6А). Связывающая активность мутированных вариантов GAİM варьировала от 0,7 до 175 нМ (EC₅₀), что соответствует более чем 250-кратному изменению аффинности связывания с A β 42. Наблюдалась строгая корреляция (Р-значение 10⁻⁴, r_s = 0,703) между эффективностью связывания (EC₅₀) и первым переходом плавления (Tm1). Снижение Tm1 представляет собой более открытую конформацию GAİM с повышенным связыванием, стабилизированные варианты с более высокой Tm1, как правило, теряют свою связывающую активность. Это наводит на мысль о том, что мотив связывания амилоидных фибрилл в GAİM экспонируется, когда междоменное взаимодействие ослаблено, и согласуется с предыдущими данными, показывающими, что связывающие свойства GAİM зависят от температуры (Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19).

Чтобы определить, переходит ли изменение связывающей активности в отношении fA β 42 на другие амилоидные белки, группа вариантов была протестирована с помощью ELISA на связывание с амилоидными фибриллами, образованными областью связывания микротрубочек белка тау. Сравнение активности связывания вариантов GAİM-Ig (EC₅₀) для fA β 42 и ftau (Р-значение 10⁻⁴, r_s = 0,878; фиг. 6В) показало строгую корреляцию в активности связывания GAİM-Ig (Р-значение 10⁻⁴, r_s = 0,862) в отношении двух разных амилоидов.

Пример 8: превосходное связывание открытых стабилизированных слитых белков GAİM-Ig по сравнению со стабилизированными слитыми белками GAİM-Ig.

Несколько мутаций в GAIM, которые стабилизируют домен N2 и способствовали более сильному взаимодействию с доменом N1, приводили к уменьшению связывания с амилоидом. Удаление пролин-содержащей петли в домене N2 путем замены петли Q₁₅₆GTPVK₁₆₂ (SEQ ID NO: 7) на QGGK (SEQ ID NO: 10) увеличивало Tm1 на 3,6°C и приводило к 18-кратному снижению связывания с Aβ42 (фиг. 7A). Аналогичным образом, аминокислотные замены F135QNN138 (SEQ ID NO: 5) на FQGN (SEQ ID NO: 8) и R143QGAI46 (SEQ ID NO: 6) на VNGV (SEQ ID NO: 9) стабилизируют N2 (Tm1) на 1,8°C и 2,5°C соответственно. Эти стабилизированные варианты показали сниженную активность связывания Aβ42 по сравнению с каркасом GAIM (фиг. 7A). Аналогичным образом введение мутации Q128H, которая стабилизирует взаимодействия шарнирного субдомена N2 и N1, снижает связывание с фибриллами (фиг. 7A). Все замены T1, T2 или T3 в домене N2 снижают неспецифичное связывание с коллагеном, хотя Q128H показывает незначительное увеличение в 1,4 раза (фиг. 9). Такие мутанты указывают на обратную зависимость между эффективностью амилоид-связывающей активности варианта GAIM и его стабильностью.

Чтобы создать более открытую конформацию GAIM, петлю D₂₄DKTLD₂₉ (SEQ ID NO: 3) в N1 (фиг. 3A) заменяли на гомологичную последовательность EGDS (SEQ ID NO: 4) из нитчатого фага LF1 и протестировали в сочетании с N2-стабилизирующими мутациями (например, в одном или более поворотах/петлях, указанных на фиг. 3C). Предполагаемые открытые и N2-стабилизированные варианты GAIM были протестированы на качество белка и активность связывания амилоида. Все варианты с открытой стабилизацией демонстрируют повышенную активность связывания фибрилл с EC₅₀ <1,5 нМ, что согласуется с более открытым и доступным сайтом связывания амилоидных фибрилл (фиг. 7B). Единственным исключением был вариант EGDS (SEQ ID NO: 4) с суперстабилизированным N2 (PB113; SEQ ID NO: 17; Tm1=52,7°C), содержащий все три N2-стабилизирующие мутации вместе (F₁₃₅QGN₁₃₈, V₁₄₃NGV₁₄₆, and Q₁₅₆GK₁₆₂) (соответственно, SEQ ID NO: 8, 9, 10), что приводит к потере активности связывания с Aβ42 (фиг. 7B). Это может быть связано с серьезными структурными изменениями в N2, маскирующими сайт(ы) взаимодействия амилоида в GAIM, либо путем введения внутридоменных взаимодействий или чрезмерной стабилизации домена N2. Открытые стабилизированные варианты с повышенным связыванием фибрилл потеряли корреляцию между Tm1 и связыванием fAβ42, что позволяет предположить разобщение сайта(ов) связывания амилоида и стабильности N2 в этих вариантах. Все EGDS-N2 ("EGDS", SEQ ID NO: 4) стабилизированные варианты показали хорошее качество белка по данным SDS-PAGE и представляли собой мономеры, как было показано с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Кроме того, в SEC наблюдалось изменение времени удерживания, что еще раз указывало на более открытую молекулу конформера GAIM.

Пример 9: мишенями слитых белков GAIM-Ig является множество амилоидов с разнообразной морфологией.

Открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig были протестированы на способность взаимодействовать с различными типами и конформациями агрегатов Aβ. Для различных модифицированных пептидов Aβ были получены фибриллы, и измеряли аффинность связывания слитых белков GAIM-Ig с этими агрегатами. Агрегацию N-усеченного Aβ11-42, Aβ11-42-Руго, Aβ3-4242-Руго и Aβ1-42-E22Q-датская мутация (Levy et al, 1990; Van Broeckhoven et al, 1990) проводили в тех же условиях, что и для Aβ42, и формирование фибрилл подтверждали с использованием ThT (фиг. 8A-8D) и TEM (данные не показаны). Агрегаты, образованные с использованием этих пептидов, имели очень различную морфологию. Например, руго-glu 3-42 образует фибриллы, в структуре которых имеется несколько изгибов, вариант E22Q образует гладкие длинные фибриллы, а пептиды 11-42 образуют несколько коротких фибрилл. С помощью ELISA было обнаружено, что оба открытые стабилизированные варианты PB108 и каркас PB120 взаимодействуют с этими фибриллами. PB108 показал увеличение связывания с различными агрегатами приблизительно в 20 раз по сравнению с PB120, EC₅₀ 0,9-1,9 нМ (фиг. 8A-8D). Аналогичное превосходное связывание наблюдалось для других испытанных открытых стабилизированных слитых белков GAIM-Ig (табл. 2).

Таблица 2

Открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig связывают и ремоделируют амилоидный белок

Слитый белок GAIM-Ig	Связывание с $\text{fA}\beta 42$ (нМ)	Связывание с fTauKL (нМ)	Ремоделирование $\text{fA}\beta 42$ (%)
PB108	1	15	87
PB122	1,3	24	80
PB116	0,8	7,0	82
PB114	0,9	8,7	86
PB109	0,8	5,2	82
PB110	0,9	7,6	92
PB105	0,8	НД*	НД
PB127	0,8	НД	НД

* НД = данные не собраны.

Таблица 3

Мишенями открытых стабилизированных слитых белков GAIM-Ig являются различные амилоидные белки

Мишень связывания	PB120 EC ₅₀ (нМ)	PB108 EC ₅₀ (нМ)
A β (1-42)	18,0	0,8 (K _D = 0,5 нМ методом SPR)
A β (11-42)	24,3	0,9
A β 3-42 PyroE3	24,1	1,1
A β 11-42 PyroE11	40,6	1,9
A β 1-42 E22Q	21,9	1,0
TauKL	59	14
TTR дикого типа	105	7
Легкая цепь лямбда_1 (варибельная + константная)	НД*	24
Легкая цепь лямбда_1 (варибельная)	НД	1,3
Легкая цепь лямбда_2 (варибельная)	НД	19

* НД = данные не собраны. Связывание определяют с помощью ELISA, если не указано иное.

Способность открытых стабилизированных слитых белков GAIM-Ig связывать различные типы и конформации амилоидного белка дополнительно показана в табл. 2 и 3. Например, в табл. 2 и 3 показано связывание открытых стабилизированных слитых белков GAIM-Ig с A β 42 и tauKL с низким наномолярным сродством, а таблица 3 дополнительно демонстрирует их связывание с морфологически разнообразными агрегатами легкой цепи (LC) иммуноглобулина и транстиретином (TTR) с низким наномолярным

сродством. Эти данные показывают превосходное направленное действие на разнообразный массив амилоидных фибрилл по сравнению с контрольным каркасом и согласуются с предыдущими ЯМР-исследованиями, показывающими, что GAIM связывается со средними и С-концевыми последовательностями в фибриллах A β 42 (Krishnan et al. (2014) *J Mol Biol*, 426:2500-19).

Пример 10: слитые белки GAIM-Ig специфически связывают амилоидный белок.

Чтобы исключить неспецифическое связывание, слитые GAIM-Ig тестировали при высоких концентрациях (1,8 мМ, в 100 раз выше, чем EC₅₀ для истинного субстрата, такого как fA β 42) на неспецифическое связывание с другими видами фибрилл, такими как коллаген. Двести двадцать пять нанোগرامмов на лунку коллагена человека (Sigma, кат. № C5483) в D-PBS иммобилизовали на 96-луночных планшетах MaxiSorp® (Thermo Fisher Scientific) в течение 16 часов при 37°C с последующим блокированием в SuperBlock™ (Thermo Fisher Scientific) в течение 1 часа при комнатной температуре. Слитые GAIM-Ig в PBS-Tween (0,05%) инкубировали при 37°C в течение 1 часа с последующими 3-кратными 5-минутными промывками в PBS-Tween (0,05%). Специфичное к Fc человека антитело-HRP (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-035-008) добавляли в разведении 1:5000 в PBS-Tween (0,05%) на 45 минут при 37°C с последующими 3-кратными промывками по 5 минут в PBS-Tween (0,05%) и 2 промывками по 5 минут в PBS. Сигнал проявляли с помощью раствора TMB (Sigma), реакцию останавливали добавлением 0,25 N HCl, и поглощение при 450 нм регистрировали с помощью планшетного спектрофотометра Tecan Infinite® M1000 PRO. Слитые белки GAIM-Ig показывали минимальное связывание с неамилоидными субстратами по данным ELISA (Krishnan et al. (2014) *J Mol Biol*, 426: 2500-19).

Пример 11: открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig лучше ремоделируют фибриллы A β .

Анализ ремоделирования проводили в микроцентрифужных пробирках с низким удерживанием (Fisher Scientific 02-681-320). Буферы, используемые в этих анализах, содержат 0,05% азида натрия для предотвращения роста микроорганизмов. Чтобы убедиться, что нет протеазного загрязнения в любом образце, все ремоделированные комплексы разделяли электрофорезом в денатурирующих полиакриламидных гелях и проверяли на предмет деградации. Для анализов с использованием фибрилл <1 мМ, качество белка вместо этого подтверждали с помощью вестерн-блоттинга.

Фибриллы A β 42 (2,5 мкМ) инкубировали совместно с вариантами слитых белков GAIM-Ig или без них в течение трех суток при 37°C. Затем аликвоты комплексов инкубировали с различными концентрациями мочевины. Флуоресценцию ThT комплексов в мочеvine наносили на график как зависимость от концентрации мочевины. Эффективность ремоделирования при фиксированной концентрации мочевины отображали как потерю флуоресценции ThT в процентах по сравнению с фибриллами без какой-либо обработки слитыми белками GAIM-Ig.

Слитые белки GAIM-Ig с различной активностью связывания фибрилл A β 42 были выбраны, чтобы определить, зависит ли эффективность ремоделирования от силы связывания с амилоидом и открытого конформационного состояния. На фиг. 10A показана реконструкция эффективности различных слитых белков GALM, инкубированных с фибриллами A β 42 при идентичных условиях и концентрациях. Открытые стабилизированные варианты с низким наномолярным связыванием с fA β 42 показало увеличение в 2-3 раза активности ремоделирования, при этом средняя ремоделирующая активность составляла 83% по сравнению с контрольным каркасом (35%). Фиг. 10B показывает положительную корреляцию между изменением связывания с fA β 42 и ремоделирующей активностью, так что слитые белки GAIM-Ig с превосходным связыванием A β также демонстрируют превосходную ремоделирующую активность.

Фиг. 10A-10C, а также данные просвечивающей электронной микроскопии (см. пример 13; фиг. 10D), дополнительно демонстрируют, что открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig ремоделируют амилоидные фибриллы, вызывая потерю фибриллярной архитектуры, в отличие от простого прилипания и маскировки фибриллярных структур. Например, при инкубации с возрастающими концентрациями мочевины, но без воздействия слитых белков GAIM-Ig, фибриллы A β 42 сопротивлялись денатурации и показали менее 10% структурных изменений в 1 М мочеvine, измеренных по ThT-флуоресценции (фиг. 10C). При более высоких концентрациях мочевины флуоресценция ThT резко падала, что позволяет предположить потерю фибриллярной структуры. Напротив, фибриллы, обработанные субстехиометрическим количеством слитых белков GAIM-Ig начали показывать снижение связывания ThT на 30-90% в 1 М мочеvine. Это открытие предполагает, что слитые белки GAIM-Ig связывают и изменяют структуру фибрилл до состояния, которое не может связывать ThT, и что активность ремоделирования для GAIM варьируется между разными слитыми белками GALM-Ig, где открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig демонстрируют высокую ремоделирующую активность.

Пример 12: открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig проявляют усиленное ремоделирование фибрилл TauK18P301L.

Анализ ремоделирования также проводили путем совместной инкубации фибрилл Tau-K18P301L со слитыми белками GAIM-Ig, чтобы продемонстрировать, что ремоделирование агрегатов является общим в отношении амилоидных белков.

Анализ ремоделирования проводили в микроцентрифужных пробирках с низким удерживанием (Fisher Scientific 02-681-320). Буферы, используемые в этих анализах, содержат 0,05% азида натрия для

предотвращения роста микроорганизмов. Чтобы убедиться, что нет протеазного загрязнения в любом образце, все ремоделированные комплексы разделяли электрофорезом в денатурирующих полиакриламидных гелях и проверяли на предмет деградации. Для анализов с использованием фибрилл <1 мМ, качество белка вместо этого подтверждали с помощью вестерн-блоттинга.

В отличие от фибрилл fA β 42, фибриллы Tau-K18P301L легко растворяются в растворах с низкой концентрацией мочевины. Таким образом, эффективность ремоделирования слитыми белками GAIM-Ig фибрилл Tau-K18P301L была исследована с использованием анализов растворимости в саркозиле. Фибриллы TauK18P301L (1 мкМ) инкубировали совместно с вариантами слитых белков GAIM-Ig или без них при 37°C в течение 5 дней. Фибриллы и комплексы инкубировали с 1%-м саркозилом или без него в течение 15 минут и центрифугировали при 100000×g в течение 30 минут. Супернатант из каждого образца осторожно удаляли и наносили на 4-12%-е гели NuPAGE® (Invitrogen). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и исследовали на наличие TauK18P301L. Процент ремоделирования рассчитывали путем количественного определения полос геля с использованием системы Biorad Chemidoc™.

Фибриллы, собранные *in vitro* с использованием Tau-K18P301L (не подвергнутые действию GAIM-Ig), показали устойчивость к растворению при инкубации с 1%-м саркозилом. Фибриллы Tau-K18P301L, обработанные слитыми белками GAIM-Ig, растворяются в 1%-м саркозиле легче, чем необработанные фибриллы (фиг. 11A), что указывает на то, что эти фибриллы также могут быть ремоделированы, подобно fA β 42. При инкубации с различными концентрациями слитых белков GAIM-Ig эти фибриллы растворялись в зависимости от концентрации (фиг. 11B).

Эффективность ремоделирующей способности PB120 сравнивали с эффективностью ремоделирующей способности открытых стабилизированных слитых белков GAIM-IgG. PB113, суперстабилизированный, не содержащий дисульфидов GALM с пониженной инфекционностью (Kather et al., 2005, *J Mol Biol*, 354:666-78), не обладает способностью связывать фибриллы A β 1-42 или Tau-K18P301L (данные не показано) и был добавлен в качестве отрицательного контроля. Открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig показали повышенную ремоделирующую активность по сравнению с PB120 (фиг. 11B), тогда как PB113 не имел ремоделирования активности (фиг. 11A).

Авторы исследовали, модифицируют ли слитые белки GAIM фибриллы Tau-K18P301L и высвобождают ли растворимые формы TauK18P301L, когда авторы совместно инкубировали образцы. При концентрациях слитых белков GALM, приводящих к высокой степени ремоделирования (например, 10-250 нМ), растворимых форм не наблюдалось в супернатанте комплексов, которые не подвергались обработке саркозилом (фиг. 11A), что позволяет предположить, что ремоделируемый материал не высвобождает растворимые частицы TauK18P301L или мономеры при связывании со слитыми GAIM.

Пример 13: открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig заставляют амилоидные фибриллы терять свою фибриллярную архитектуру.

Фибриллы A β 1-42 (15 мкл из 20 мМ образца) наносили на покрытые углеродом медные сетки (Ted Pella, кат. № 01844-F). Затем образцы осторожно промывали 0,5 мл воды, переворачивали и оставляли плавать над каплей 2%-го раствора уранилацетата. Через 30 секунд решетки удаляли и высушивали путем удаления излишка жидкости с края решеток с помощью фильтровальной бумаги. Для получения изображения фибрилл использовали ПЭМ, FEI Tecnai™ Spirit. На фиг. 10D показаны типичные ПЭМ-изображения фибрилл A β 42, инкубированных с открытым стабилизированным слитым белком GAIM-Ig в субстехиометрической концентрации. При воздействии открытых стабилизирующих слитых белков GAIM-Ig фибриллы A β 42 утрачивали фибриллярную архитектуру (фиг. 10D). Аналогичным образом ПЭМ-анализ показал, что фибриллы Tau-K18P301L теряли свою характерную фибриллярную конформацию при совместной инкубации с открытым стабилизированным слитым белком GAIM-Ig (фиг. 11C).

Пример 14: открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig демонстрируют повышенное ингибирование агрегации амилоида.

Открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig были протестированы на ингибирующую активность в отношении сборки амилоида путем совместной инкубации с мономерами A β 42 при 37°C в течение 10 часов. За образованием амилоидных фибрилл следили по флуоресценции ThT и сравнивали с образованием фибрилл без GALM, а также в присутствии отрицательного контроля PB113.

Сто микрограмм мономерного образца A β 1-42 (rPeptide), обработанного HFLP, растворяли в 80 мкл DMSO, тщательно перемешивали пипеткой, встряхивали и разбавляли в 5,4 мл D-PBS до конечной концентрации A β 1-42 4,04 мкМ. Слитые образцы GAIM-Ig разводили в PBS до промежуточных исходных растворов с концентрациями 10, 2,5, 0,63 и 0,16 мкМ. По восемьдесят микролитров раствора мономера A β 1-42 распределяли в каждую лунку черного круглодонного 96-луночного планшета (LVL, кат. № 225.LS.PP). Десять микролитров каждого исходного раствора слитых белков GAIM-Ig добавляли в лунки, содержащие A β 1-42, с последующим добавлением 10 мкМ ThT (33 мкМ в PBS) до конечной концентрации 3,2 мкМ A β 1-42 и 3,3 мкМ ThT на лунку. Планшет заклеивали прозрачной пленкой, и флуоресценцию ThT при 430/485 нм (Ex/Em) регистрировали каждые 20 минут в течение 14 часов в планшетном спектрофотометре Tecan Infinite® M1000 PRO при инкубации при 37°C с 3-секундным вертикальным

встряхиванием каждые 20 минут. Процент агрегации A β 42 для каждой концентрации слитых белков GAIM-Ig рассчитывали относительно необработанных лунок A β 42 (лунок с положительным контролем).

Открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig показали дозозависимое ингибирование сборки при добавлении в течение 10 часов в указанных концентрациях (фиг. 12A). Открытые стабилизированные слитые белки также показали повышенную активность ингибирования сборки по сравнению с контрольным каркасом, PB120 (фиг. 12A-12B). Например, при 250 нМ типичные открытые стабилизированные соединения GAIM-Ig PB108 и PB116 показали увеличение блокирования образования фибрилл на 40-20% по сравнению с PB120 (фиг. 12B). Способность субстехиометрических количеств открытых стабилизированных слитых белков GAIM-Ig эффективно блокировать образование амилоидных фибрилл позволяет предположить, что слитые белки блокируют образование амилоидных фибрилл, связываясь с β -тяжами сердцевин в растущей фибрилле или затравками, участвующими в зависимой от нуклеации сборке фибрилл (Krishnan et al. др. (2014) *J Mol Biol*, 426:2500-19).

Аналогичным образом, открытые стабилизированные слитые белки GAIM-Ig показали дозозависимое ингибирование сборки в отношении тау-фибрилл (фиг. 12C). Реакции сборки TauK18P301L осуществляли путем инкубации 10 мкМ тау-мономеров в 0,1 М ацетат-натриевом буфере, pH 7,0, с 2 мкМ низкомолекулярным гепарином (Fisher Scientific) при 37°C в течение 3 дней в присутствии различных концентраций слитых белков GAIM (0-500 нМ). Флуоресценцию ThT для реакций сборки регистрировали разбавлением образцов до 1 мкМ в 5 мкМ растворе ThT. Ингибирующие эффекты GAIM на сборку TauK18P301L рассчитывали путем сравнения со сборкой TauK18P301L без слитых белков GAIM.

Сборка фибрилл *in vitro* из полноразмерного тау-белка или усеченных последовательностей, таких как MTBR или K18, требует присутствия гепарина для ускорения нуклеации и последующей сборки. Тестируемые слитые белки GAIM ингибировали сборку ftauKL в присутствии гепарина. Более того, открытые стабилизированные слитые белки GAIM блокировали нуклеацию в три-пять раз лучше по сравнению с PB120 (фиг. 12C-12D). Взятые вместе, эти результаты показывают, что открытые стабилизированные слитые белки GAIM связывают промежуточные соединения как A β , так и tau в процессе их сборки и ингибируют сборку амилоидных агрегатов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, связывающий амилоид, где указанный полипептид содержит вариант исходной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, где вариант отличается от SEQ ID NO: 16 одним или более наборами аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из:

- a) замены T50 любой аминокислотой и H55T;
- b) N137G;
- c) N142A;
- d) R143V и Q144N; или
R143V, Q144N и A146V; или
R143V, Q144N и A146T; или
R143V, Q144N и A146K; и
- e) Q156V, G157N, Δ T158, Δ D159, Δ P160 и V161G; или
Q156Y, G157N, Δ T158, Δ D159, Δ P160 и V161G; или
G157N, Δ T158, Δ D159, Δ P160 и V161G; или
 Δ T158, Δ D159, Δ P160 и V161G.

2. Полипептид по п.1, дополнительно отличающийся от SEQ ID NO: 16 одним или более наборами аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из:

- a) Δ M1; или
 Δ M1 и Δ A2; и
- b) замены N38 любой аминокислотой, отличной от цистеина; или
замены N38 любой аминокислотой, отличной от цистеина, и замены G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина; или
замены G40 любой аминокислотой, отличной от цистеина, треонина или серина.

3. Полипептид по п.1 или 2, где замену T50 выбирают из группы, состоящей из T50G, T50H, T50K и T50R.

4. Полипептид по п.3, где замена T50 представляет собой T50H.

5. Полипептид по п.1 или 2, где вариант отличается от SEQ ID NO: 16 по меньшей мере на Δ M1 и Δ A2.

6. Полипептид по любому из пп.1-5, где вариант отличается от SEQ ID NO: 16 по меньшей мере на N137G и/или N142A.

7. Полипептид по п.5, где вариант дополнительно отличается от SEQ ID NO: 16 одним или более наборами аминокислотных замен, выбранных из:

- a) замены T50 любой аминокислотой и H55T; и

- b)R143V и Q144N; или
R143V, Q144N и A146V; или
R143V, Q144N и A146T; или
R143V, Q144N и A146K.
8. Полипептид по п.7, где замену T50 выбирают из группы, состоящей из T50G, T50H, T50K и T50R.
9. Полипептид по п.8, где замена T50 представляет собой T50H.
10. Полипептид по п.1, где вариант SEQ ID NO: 16 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26.
11. Полипептид, содержащий полипептид, связывающий амилоид, по любому из пп.1-10, слитый с константной областью иммуноглобулина на его С-конце.
12. Полипептид по п.11, где последовательность константной области иммуноглобулина представляет собой Fc-участок IgG человека.
13. Полипептид по п.12, состоящий по существу из полипептида по любому из пп.1-10 и Fc-участка IgG человека.
14. Полипептид по п.13, где IgG человека представляет собой IgG1 человека.
15. Полипептид по п.14, состоящий по существу из аминокислотной последовательности, выбранной из:
- SEQ ID NO: 29;
 - SEQ ID NO: 30;
 - SEQ ID NO: 31;
 - SEQ ID NO: 32;
 - SEQ ID NO: 33;
 - SEQ ID NO: 34;
 - SEQ ID NO: 35; и
 - SEQ ID NO: 36.
16. Полипептид по п.15, имеющий один или более наборов аминокислотных замен, выбранных из:
- $\Delta M1$; или
 $\Delta M1$ и $\Delta A2$; и
 - $\Delta K485$.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.
18. Способ уменьшения количества амилоида, ингибирования образования амилоида или ингибирования агрегации амилоида у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17.
19. Способ удаления и/или предотвращения образования токсичных олигомеров у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17.
20. Олигонуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по любому из пп.1-16.
21. Олигонуклеотид по п.20, где нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.
22. Олигонуклеотид по п.20, где нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52.
23. Вектор, содержащий олигонуклеотид по любому из пп.20-22.
24. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.23.
25. Клетка-хозяин по п.24, где клетку-хозяина выбирают из группы, состоящей из клетки насекомого, клетки грибов, клетки растения, бактериальной клетки, клетки млекопитающего и клетки трансгенного животного.
26. Клетка-хозяин по п.25, где клетку-хозяина выбирают из группы, состоящей из клеток HEK293, клеток-производных HEK293, клеток CHO, клеток-производных CHO, клеток HeLa и клеток COS.
27. Способ получения белка, связывающего амилоид, включающий экспрессию белка, кодируемого нуклеиновой кислотой, в векторе по п.23 и выделение экспрессированного белка.
28. Белок, связывающий амилоид, полученный путем экспрессии белка, кодируемого нуклеиновой кислотой, в векторе по п.23, и выделения экспрессированного белка.
29. Белок по п.28, где белок экспрессируется путем культивирования клетки-хозяина по любому из пп.24-26.
30. Применение полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 в производстве лекарственного средства для снижения количества амилоида, ингибирования образования

амилоида или ингибирования агрегации амилоида у субъекта, который в этом нуждается.

31. Применение полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 в производстве лекарственного средства для удаления и/или предотвращения образования токсичных олигомеров у субъекта, который в этом нуждается.

32. Применение по п.30 или 31, где амилоид или олигомеры содержат белок, выбранный из андрогенового рецептора, аполипопротеина AI, аполипопротеина AII, аполипопротеина AIV, амилоида A апо-сыворотки, A β , A β g1, ADan, атрофина-1, предсердного натрийуретического фактора, атаксина, кальцитонина, γ -кристаллина, цистатина C, фибриногена, гельсолина, хантингтина, инсулина, островкового амилоидного полипептида, легкой каппа-цепи иммуноглобулина, легкой лямбда-цепи иммуноглобулина, керато-эпителина, кератина, лактаэдрина, лактоферрина, лизоцима, белка C легочного сурфактанта, медулина, одонтогенного амелобласт-ассоциированного белка, прионного белка, прокальцитонина, пролактина, семеногелина I, сывороточного амилоида A, супероксиддисмутазы I, β 2-микроглобулина, связывающего ТАТА-бокс белка, тау, транстиретина и α -синуклеина.

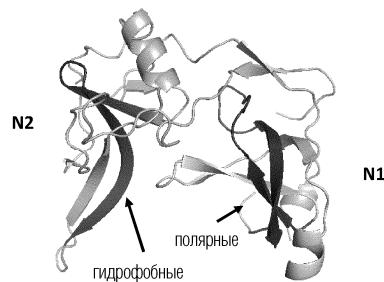
33. Применение полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, вызванного образованием и/или агрегацией амилоида.

34. Применение полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 для уменьшения количества амилоида, ингибирования образования амилоида или ингибирования агрегации амилоида у субъекта, нуждающегося в этом.

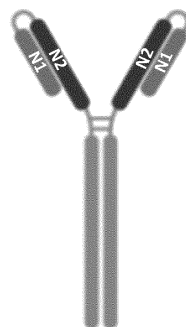
35. Применение полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 для удаления и/или предотвращения образования токсичных олигомеров у субъекта, нуждающегося в этом.

36. Применение по п.34 или 35, где амилоид или олигомеры содержат белок, выбранный из андрогенового рецептора, аполипопротеина AI, аполипопротеина AII, аполипопротеина AIV, амилоида A апо-сыворотки, A β , A β g1, ADan, атрофина-1, предсердного натрийуретического фактора, атаксина, кальцитонина, γ -кристаллина, цистатина C, фибриногена, гельсолина, хантингтина, инсулина, островкового амилоидного полипептида, легкой каппа-цепи иммуноглобулина, легкой лямбда-цепи иммуноглобулина, керато-эпителина, кератина, лактаэдрина, лактоферрина, лизоцима, белка C легочного сурфактанта, медулина, одонтогенного амелобласт-ассоциированного белка, прионного белка, прокальцитонина, пролактина, семеногелина I, сывороточного амилоида A, супероксиддисмутазы I, β 2-микроглобулина, связывающего ТАТА-бокс белка, тау, транстиретина и α -синуклеина.

37. Применение полипептида по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 для лечения заболевания, вызванного образованием и/или агрегацией амилоида, у субъекта, нуждающегося в этом.



Фиг. 1А

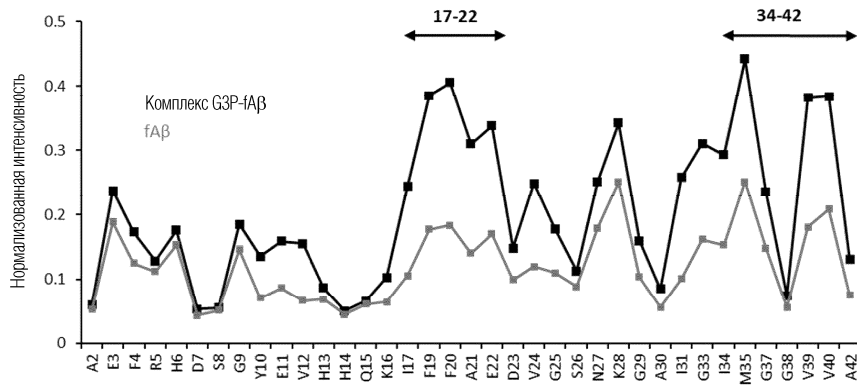


Фиг. 1В

046070



Фиг. 1С



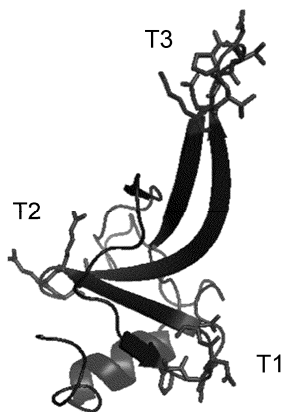
Фиг. 2

10 20 30
.....|.....|.....|.....|.....|.....
SEQ ID NO:1 AETVESCLAKPHTENSFTNVWKKDDKTLDRYAN
SEQ ID NO:2 ATTDAECLSKPAFDGTLNVTWKEGDS--RYAN

ФИГ. 3А

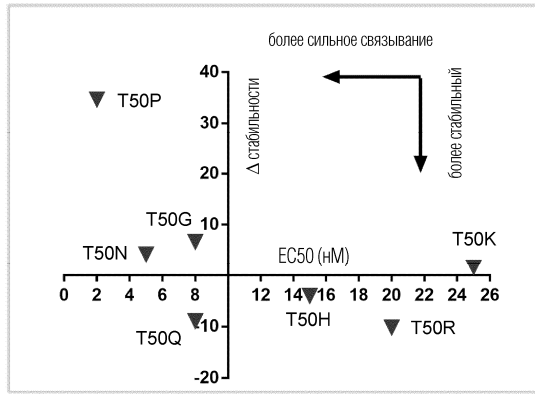


Фиг. 3В

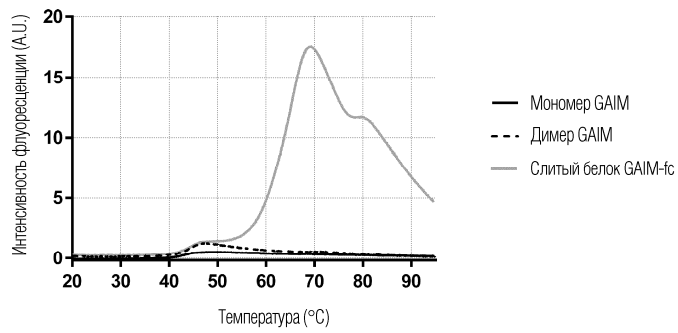


Фиг. 3С

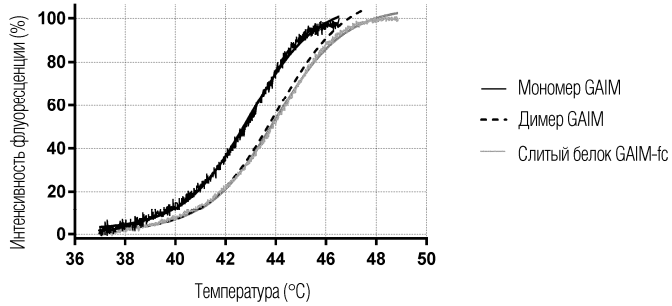
046070



Фиг. 3D



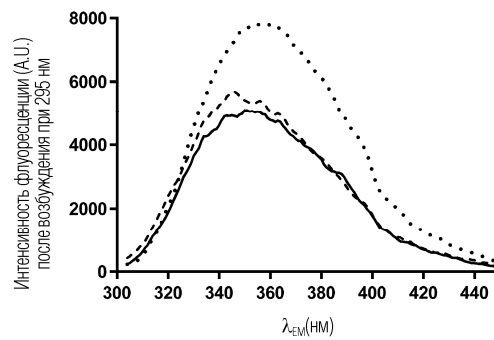
Фиг. 4А



Сигмоидальная, 4-параметрическая логистическая кривая, величина наилучшего согласия

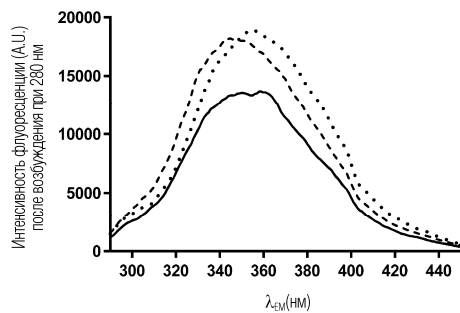
	Мономер GAIM	Димер GAIM	Слитый белок GAIM-fc
T_m (°C)	42.95	44.02	43.98

Фиг. 4В



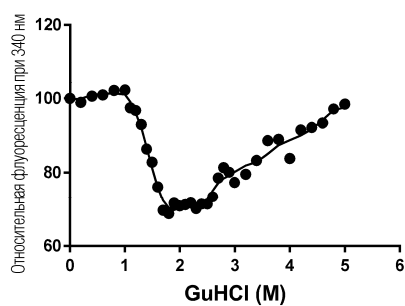
Фиг. 5А

046070

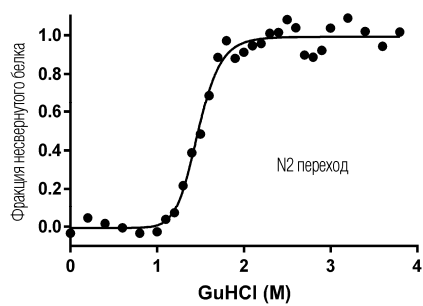


Фиг. 5B

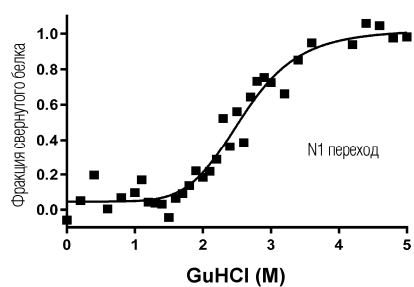
Возбуждение при 280 нм



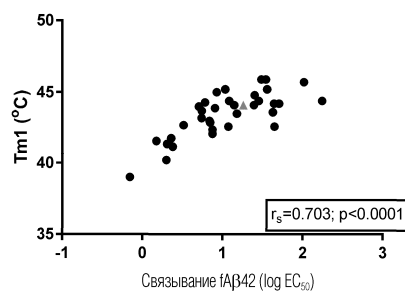
Фиг. 5C



Фиг. 5D

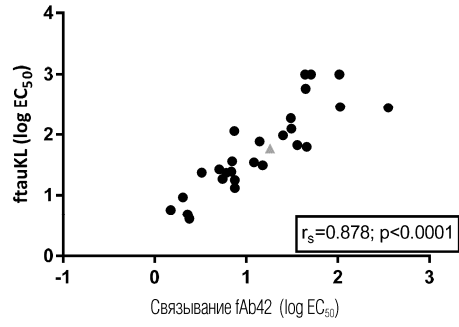


Фиг. 5E

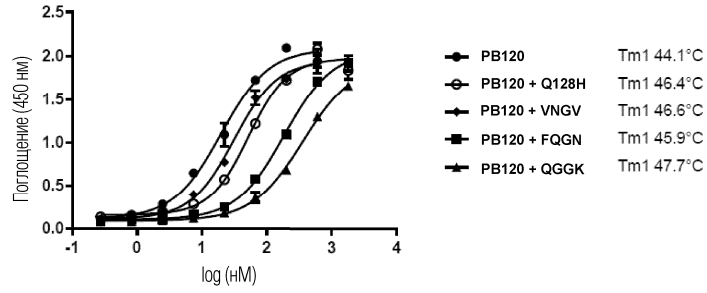


Фиг. 6A

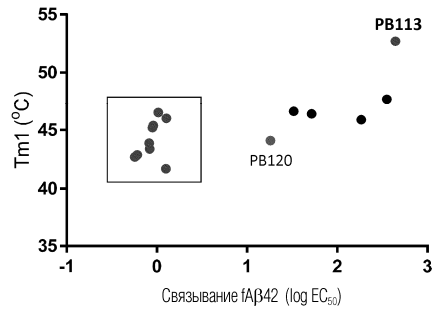
046070



Фиг. 6В

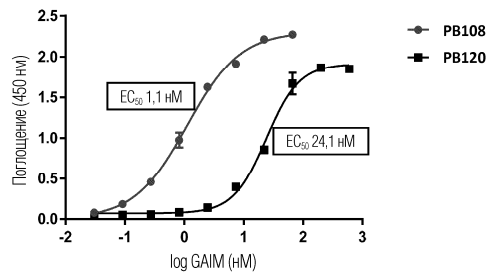


Фиг. 7А



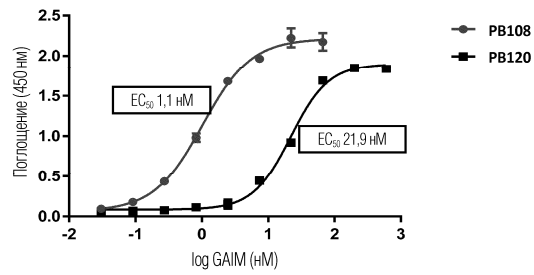
Фиг. 7В

Аβ3-42-Пуго

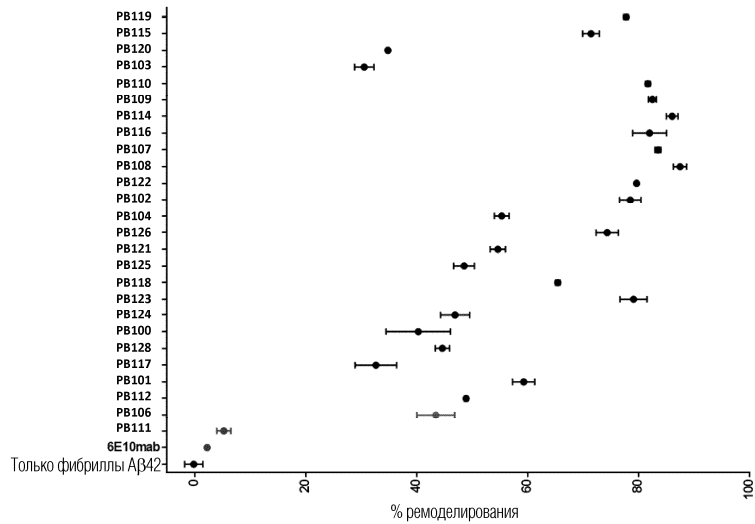
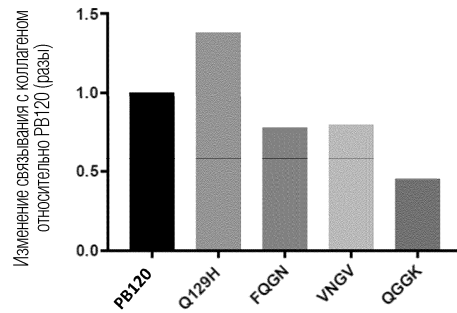
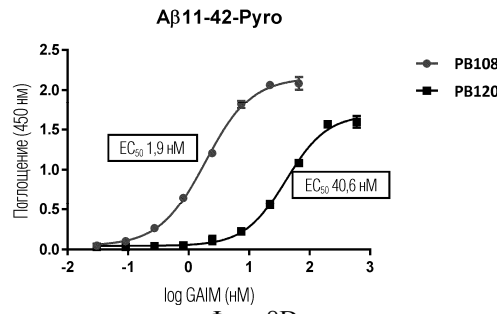
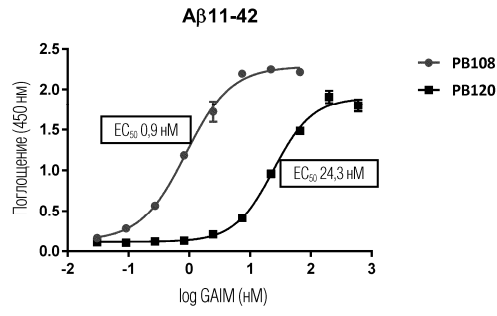


Фиг. 8А

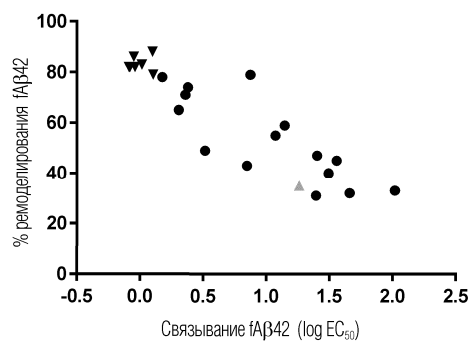
Аβ1-42 E22Q



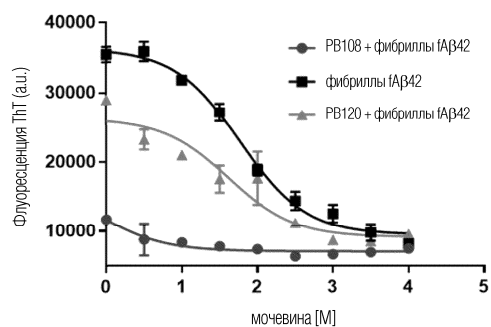
Фиг. 8В



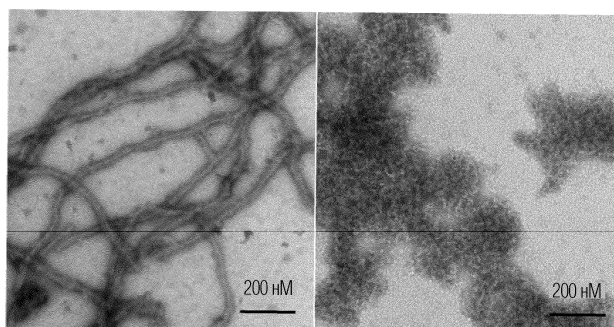
046070



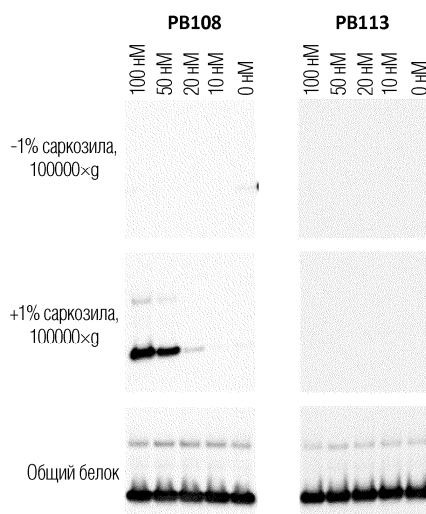
Фиг. 10В



Фиг. 10С

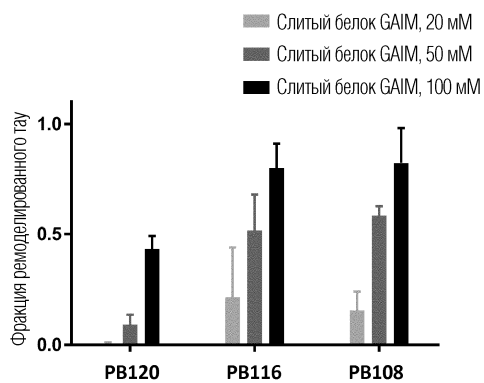


Фиг. 10D

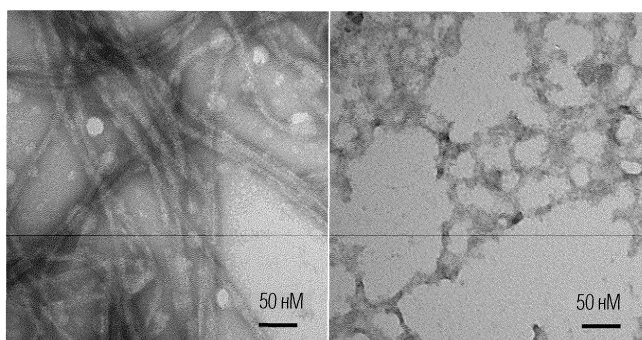


Фиг. 11А

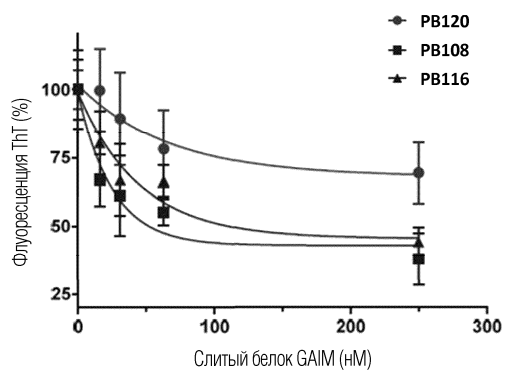
046070



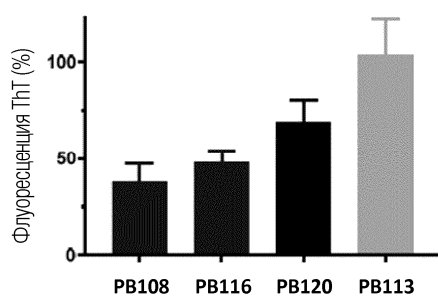
Фиг. 11В



Фиг. 11С



Фиг. 12А



Фиг. 12В

