

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393257 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.16

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.18

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ АНТИТЕЛО-ПЕПТИД ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДНЫХ
ДИСТРОФИЙ

(31) 63/190,191

(32) 2021.05.18

(33) US

(86) PCT/US2022/072413

(87) WO 2022/246433 2022.11.24

(71) Заявитель:

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

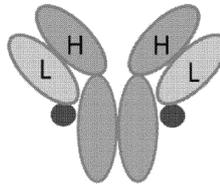
(72) Изобретатель:

Уолл Джонатан С., Фостер Джеймс С.,
Гатри Спенсер, Понз Хауме, Клейн
Майкл Л. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предложены слитые белки антитело-пептид, содержащие реактивный к амилоиду пептид, связанный с антителом. В данном документе также предложены способы лечения связанных с амилоидом заболеваний путем введения слитого белка антитело-пептид.



A1

202393257

202393257

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579655EA/085

СЛИТЫЕ БЕЛКИ АНТИТЕЛО-ПЕПТИД ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДНЫХ ДИСТРОФИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/190191, поданной 18 мая 2021 г., содержание которой полностью включено посредством ссылки.

ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[2] Содержание поданного в текстовом файле ASCII полностью включено в данный документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 165992000640SEQLIST.TXT, дата записи: 18 мая 2022 г., размер: 69104 байт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Данная заявка относится к слитым белкам антитело-пептид, которые связываются с человеческими амилоидными фибриллами, и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Амилоидоз - летальное нарушение сворачивания белков, которое характеризуются агрегацией и отложением белковых фибрилл и гепарансульфатпротеогликана в жизненно важных органах и тканях (Merlini, G. *et al.* (2003) *N. Engl. J. Med.* 349, 583-596; Merlini, G. *et al.* (2004) *J. Intern. Med.* 255, 159-178; De Lorenzi, E. *et al.* (2004) *Curr. Med. Chem.* 11, 1065-1084; Merlini, G. (2004) *Neth. J. Med.* 62, 104-105). Непрерывающееся накопление амилоида неизменно приводит к дисфункции органов и тяжелой заболеваемости или смерти. Отложения могут быть церебральными, как у пациентов с болезнью Альцгеймера, Гентингтона или с прионными заболеваниями, или периферическими, как у пациентов с амилоидозом легких цепей (AL), транстиретин-ассоциированным (ATTR) амилоидозом и диабетом 2 типа. Дальнейшее разделение на локализованную или системную подгруппы указывает, вырабатывается ли белок-предшественник локально (в месте отложения) или циркулирует в кровотоке и откладывается в отдаленных анатомических зонах, соответственно, (Westermarck, P. *et al.* (2007) *Amyloid.* 14, 179-183). Амилоид может поражать любой орган или ткань, но почки, поджелудочная железа, печень, селезенка, нервная ткань и сердце являются основными местами отложения у пациентов с семейными или спорадическими формами системного амилоидоза. Болезнь Альцгеймера в настоящее время поражает более 4 миллионов американцев, и, по оценкам, к 2050 году эта цифра увеличится до более чем 16 миллионов. Это, безусловно, самая распространенная форма амилоидоза, которую обычно считают орфанным заболеванием, но она широко не диагностируется: по оценкам, в США зарегистрировано более 200000 случаев.

[5] Из них основным периферическим амилоидозом является транстиретин-ассоциированный (ATTR) амилоидоз, за которым следует амилоидоз легких цепей (AL).

Первый возникает в результате отложения транстиретина дикого типа (спорадический) или варианта транстиретина (наследственный) и клинически проявляется преимущественно в периферических нервах и сердце; однако поражение опорно-двигательного аппарата является обычным явлением и может предшествовать отложению в органах на десятилетия. Последняя представляет собой спорадическую дискразию моноклональных плазматических клеток, которая приводит к отложению фибрилл, состоящих из белков легкой цепи иммуноглобулина. На AL приходится примерно две трети всех случаев периферического амилоидоза, и его расчетная заболеваемость составляет ~ 1,4 на 100 000 человек в год в США, что сравнимо с частотой острого лимфоцитарного и хронического миелоидного лейкоза (Group, U. S. C. S. W. (2007) United States Cancer Statistics: 1999-2003 Incidence and Mortality Web-Based Report, Министерство здравоохранения США и Центры социальных служб по контролю и профилактике заболеваний, Национальный институт рака, Атланта). Хотя AL встречается в пять раз реже, чем связанная с ней плазматическая дискразия, множественная миелома, она, возможно, является более разрушительной со средней выживаемостью всего 13,2 месяца, отчасти из-за быстро прогрессирующего характера разрушения органов, отсутствия эффективных антиамилоидных препаратов и неспособности эффективно диагностировать заболевание до возникновения органной недостаточности. Менее 5% всех пациентов с AL проживают 10 и более лет с момента постановки диагноза (Comenzo, R. L. *et al.* (2002) *Blood* 99, 4276-4282). Более того, у пациентов с AL-амилоидозом сердца медиана выживаемости составляет менее 5 мес.

[6] АТТР является формой системного амилоидоза. 25% пациентов с АТТР-амилоидозом умирают в течение 24 месяцев после постановки диагноза. (Gertz and Dispenzieri *JAMA* 324(1)79-89 (2002)). Современные методы лечения не предотвращают повреждение органов. АТТР-амилоидоз вызывается фибриллами на основе транстиретина (ТТР). Транстиретин представляет собой белок, вырабатываемый печенью, который помогает переносить гормон щитовидной железы и витамин А в кровь. Обычно ТТР представляет собой тетрамер, состоящий из 4 одноцепочечных мономеров. Считается, что при наследственном АТТР-амилоидозе мутации гена ТТР дестабилизируют белок и вызывают диссоциацию тетрамера на мономеры, которые агрегируют в амилоидные фибриллы. При АТТР-амилоидозе дикого типа нормальный белок ТТР становится нестабильным, неправильно сворачивается и образует амилоидные фибриллы.

[7] Эти амилоидные фибриллы затем накапливаются во многих органах по всему телу, например, в запястье, в узком проходе, называемом запястным каналом. Это может вызвать синдром запястного канала, который вызывает онемение и покалывание в руке и плече. В спинномозговом канале, что может вызвать сужение позвоночного столба (спинальный стеноз). В сердце, что может вызвать сердечную недостаточность и/или нарушение сердечного ритма, называемое мерцательной аритмией.

[8] Другой распространенной формой периферического амилоидоза в США является ассоциированный с воспалением амилоидоз (АА), который связан с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как артрит, туберкулез и семейная

средиземноморская лихорадка. Заболеваемость АА наиболее высока в некоторых регионах Европы, и частота варьирует среди этнических групп (Buck, F. S. *et al.* (1989) *Mod. Pathol.* 2, 372-377). В районах, где семейная средиземноморская лихорадка распространена и не лечится, заболеваемость АА может достигать 100%. В Европе заболеваемость, основанная на патолого-анатомических исследованиях, проведенных в Дании, оценивается в 0,86% (Lofberg, H. *et al.* (1987) *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 95, 297-302); однако у пациентов с ревматоидным или псориатическим артритом частота АА может достигать 26%. Такая высокая распространенность может потребовать программы скрининга для более раннего выявления заболевания. Амилоидное отложение связано с устойчивым повышением концентрации в плазме сывороточного амилоидного белка А (сАА), предшественника амилоидных фибрилл (Rocken, C. *et al.* (2002) *Virchows Arch.* 440, 111-122). АА отличается от АL типом откладываемого белка-предшественника, но оба имеют общие механистические особенности, связанные с образованием и отложением фибрилл (Rocken, C. *et al.* (2006) *J. Pathol.* 210, 478-487; Rocken, C. *et al.* (2001) *Am. J. Pathol.* 158, 1029-1038).

[9] В дополнение к нарушениям, при которых этиопатология амилоида хорошо установлена, фибриллярные отложения со структурными и тинкториальными свойствами амилоида были идентифицированы при других синдромах, хотя их связь с болезненным состоянием еще предстоит установить. Например, при диабете 2 типа островковый белок-предшественник амилоида (IAPP) откладывается в виде амилоида в островках Лангерганса (Jaikaran, E. T. *et al.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1537, 179-203). Агрегация IAPP приводит к образованию олигомерных структур, токсичных для клеток поджелудочной железы (Lin, C. Y. *et al.* (2007) *Diabetes* 56, 1324-1332). Таким образом, предполагается, что образование амилоида IAPP у пациентов с сахарным диабетом 1 типа способствует разрушению β -клеток и способствует переходу к инсулиновой зависимости (Jaikaran, E. T. *et al.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1537, 179-203). В другом примере бляшки, содержащие амилоидные фибриллы, состоящие из аполипопротеина А-I, были идентифицированы более чем у половины пациентов с атеросклерозом сонных артерий (Westermarck, P. *et al.* (1995) *Am. J. Pathol.* 147, 1186-1192; Mucchiano, G. I. *et al.* (2001) *J. Pathol.* 193, 270-275). Отложение этих фибрилл чаще встречается у пожилых пациентов, но apoA-I, несомненно, присутствует на ранних стадиях развития бляшек (Vollmer, E. *et al.* (1991) *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 419, 79-88). В качестве последнего примера, амилоид Апо-А-I также был недавно идентифицирован в менисках коленного сустава, полученных от пациентов, перенесших операцию по замене коленного сустава, и он может способствовать физическому износу сустава (Solomon, A. *et al.* (2006) *Arthritis Rheum.* 54, 3545-3550).

[10] Всего более 29 белков химически или серологически идентифицированы как составляющие фибрилл в амилоидных отложениях. Хотя амилоидные фибриллы связаны с клинически гетерогенной группой заболеваний и могут образовываться из структурно различных и функционально различных белков-предшественников, сами отложения обладают рядом удивительно схожих характеристик, включая структуру фибрилл, эпитопы

фибрилл и накопление сходных вспомогательных молекул, включая гепарансульфат протеогликаны (ГСПГ). Амилоид представляет собой гетерогенный комплекс, включающий, помимо фибрилл, гликозаминогликаны (GAG) и, в частности, ГСПГ перлекана (Ancsin, J. B. (2003) *Amyloid* 10, 67-79; Ailles, L. *et al.* (1993) *Lab. Invest.* 69, 443-448; Kisilevsky, R. (1994) *Mol. Neurobiol.* 9, 23-24; Kisilevsky, R. (1990) *Lab. Invest.* 63, 589-591; Snow, A. D. *et al.* (1987) *Lab. Invest.* 56, 120-123; Li, J. P. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 6473-6477).

[11] На сегодняшний день наиболее эффективным терапевтическим вмешательством для удаления амилоидных отложений, которое может способствовать восстановлению функции органа и привести к улучшению прогноза, является использование реактивных к амилоиду антител в качестве средства для иммунотерапии. Для связанных с амилоидом заболеваний было разработано несколько иммунотерапевтических препаратов (антител), в том числе моноклональное антитело 11-1F4 для лечения AL-амилоидоза, NEOD001 для пациентов с AL-амилоидозом, GSK2398852 (моноклональное антитело к SAP) при амилоидозе, соланезумаб при болезни Альцгеймера, IgG для внутривенного введения (IVIg) при болезни Альцгеймера и бапинеузумаб при болезни Альцгеймера. И адукаумаб для лечения болезни Альцгеймера. Каждый из этих подходов имеет ограничения или не соответствует первичным результатам на поздних стадиях клинических исследований (фаза 2/3).

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[13] В данном документе предложены слитые белки антитело-пептид, содержащие реактивный к амилоиду пептид, связанный с антителом, а также способы их получения и применения.

[14] В одном аспекте в данном документе предложен слитый белок антитело-пептид, содержащий: реактивный к амилоиду пептид; и антитело, которое связывается с амилоидными фибриллами, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), где реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи или легкой цепи, где реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с человеческими амилоидными фибриллами.

[15] В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи.

[16] В некоторых вариантах осуществления спейсер выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:86.

[17] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь дополнительно содержит константную область легкой цепи, а тяжелая цепь содержит константную область тяжелой

цепи.

[18] В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичности последовательности с любой из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1-13.

[19] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, причем каждая легкая цепь связана на своем С-конце с реактивным к амилоиду пептидом.

[20] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

[21] В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20; CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

[22] В некоторых вариантах осуществления VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

[23] В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48. В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51. В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50. В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49.

[24] В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55.

[25] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления область Fc относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG1.

[26] В еще одном аспекте в данном документе предложен слитый белок антитело-пептид, содержащий антитело, которое связывается с амилоидными фибриллами, содержащее первый полипептид и второй полипептид, каждый из которых содержит легкую цепь антитела, а также третий и четвертый полипептиды, каждый из которых содержит тяжелую цепь антитела, и реактивный к амилоиду пептид, который связан с N-концом или C-концом легкой цепи или тяжелой цепи, где первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, а третий и четвертый полипептиды включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91.

[27] В еще одном аспекте в данном документе предложен слитый белок антитело-пептид, содержащий реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2; и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22; при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86.

[28] В еще одном аспекте в данном документе предложен слитый белок антитело-пептид, содержащий реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2; и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, включающую в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22; при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

[29] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет EC50 менее 1,5 нМ для амилоидного субстрата.

[30] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид конъюгирован с обнаруживаемой меткой, причем обнаруживаемая метка содержит флуоресцентную метку или радиоактивную метку. В некоторых вариантах осуществления радиоактивная метка представляет собой I-123, I-124, F-18, ZR-89 или Tc-99m.

[31] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует одно или более свойств *in vivo*, выбранных из улучшенного биораспределения, панамилоидной реактивности и усиленного фагоцитоза по сравнению с

эталонным антителом IgG.

[32] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с фибриллами $\gamma V\lambda 6W11$, A β , A β (1-40), IAAP, AL κ 4, A λ 1, ATTR, α -синуклеина или Tau 441.

[33] В другом аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая слитый белок антитело-пептид, включающий i) реактивный к амилоиду пептид; и ii) антитело, при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL), причем реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-концевом конце легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера; и при этом по меньшей мере 90% слитого белка антитело-пептид является интактным. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

[34] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит не более 10% продукта расщепления, причем продукт расщепления содержит VH, в котором отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:89, и VL, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91.

[35] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид проявляет аффинность связывания EC50 с одним или более амилоидными субстратами, при этом аффинность связывания EC50 составляет менее 1,5 нМ.

[36] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[37] В еще одном аспекте в данном документе предложен полинуклеотид, кодирующий слитый белок антитело-пептид. В еще одном аспекте в данном документе предложен вектор, содержащий полинуклеотид. В еще одном аспекте в данном документе предложена клетка-хозяин, содержащая вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (CHO).

[38] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ получения слитого белка антитело-пептид, включающий а) культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий слитый белок антитело-пептид, в условиях перфузионной культуры клеток, подходящих для экспрессии слитого белка антитело-пептид; и б) выделение слитого белка антитело-пептид примерно каждые 12-36 часов; при этом слитый белок антитело-пептид содержит i) реактивный к амилоиду пептид; и ii) антитело, при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых

вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с С-концом константного домена легкой цепи антитела.

[39] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает нанесение слитого белка антитело-пептид, полученного на стадии b), на колонку для катионообменной хроматографии и элюирование слитого белка антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии.

[40] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид элюируется отдельно от укороченного слитого белка антитело-пептид.

[41] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

[42] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение чистоты слитого белка антитело-пептид, при этом чистоту слитого белка антитело-пептид определяют с использованием одного или более аналитических методов, включающих капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (КЭ-ДСН), жидкостную хроматографию (ЖХ), масс-спектрометрию (МС) или их комбинацию.

[43] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид очищают до по меньшей мере 90% интактного слитого белка антитело-пептид.

[44] В еще одном аспекте в данном документе предложен слитый белок антитело-пептид, полученный способом, описанным в данном документе.

[45] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего связанное с амилоидом нарушение, характеризующееся амилоидными отложениями, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления связанное с амилоидом нарушение представляет собой системный или локализованный амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления связанное с амилоидом нарушение выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретинового амилоидоза, AA-, AApоAI-, AApоAII-, AGel-, ALys-, ALEct2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-амилоидоза, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера или A β -амилоидоза.

[46] В некоторых вариантах осуществления отложения амилоида опсонизированы слитым белком антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта слитым белком антитело-пептид вызывает фагоцитоз амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта слитым белком антитело-пептид приводит к улучшению одного или более клинических признаков, выбранных из группы, включающей отек нижних конечностей, сильную усталость, сильную слабость, одышку, затрудненное дыхание, онемение, боль в руках, запястьях или ногах, диарея, запор, непреднамеренную потерю веса, увеличенный язык, изменения кожи, сердечную аритмию, затрудненное глотание.

[47] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ лечения субъекта, страдающего связанным с амилоидом заболеванием, или субъекта с подозрением на связанное с амилоидом заболевание, включающий а) определение наличия у субъекта

отложений амилоида путем i) введения слитого белка антитело-пептид субъекту, где слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и ii) определение того, может ли сигнал, связанный с обнаруживаемой меткой, быть обнаружен у субъекта; и b) если сигнал обнаружен, назначение субъекту лечения амилоидоза.

[48] В некоторых вариантах осуществления, если сигнал не обнаружен, проводят мониторинг пациента на предмет последующего формирования амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, при превышении которого у субъекта определяется наличие амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выявляют с помощью ОФЭКТ/КТ, ПЭТ/КТ, гамма-сцинтиграфии или оптической визуализации.

[49] В некоторых вариантах осуществления лечение амилоидоза включает введение субъекту слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления введение слитого белка антитело-пептид вызывает фагоцитоз отложений амилоида у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение слитого белка антитело-пептид приводит к удалению отложений амилоида у субъекта.

[50] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ идентификации отложения амилоида у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка антитело-пептид, причем слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и обнаружение сигнала от слитого белка антитело-пептид.

[51] В другом аспекте в данном документе предложен способ мониторинга клиренса амилоида у субъекта, включающий приведение в контакт амилоидного субстрата у субъекта со слитым белком антитело-пептид, при этом слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и при этом пептид слитый белок антитело-пептид обладает аффинностью связывания с амилоидным субстратом; и определение сигнала от обнаруживаемой метки, тем самым обнаруживая клиренс амилоида.

[52] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[53] В еще одном аспекте в данном документе предложен набор, содержащий слитый белок антитело-пептид, для применения в способе, предложенном в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[54] **На Фиг. 1** показано схематическое изображение слитого белка антитело-пептид, в котором пептид слит с N-концом легкой цепи через короткий жесткий спейсер

[55] **На Фиг. 2** показано схематическое изображение слитого белка антитело-пептид, в котором пептид слит C-концом тяжелой цепи через короткий жесткий спейсер.

[56] **На Фиг. 3** показано схематическое изображение слитого белка антитело-пептид, в котором пептид слит C-концом легкой цепи через короткий жесткий спейсер.

[57] **На Фиг. 4** показано схематическое изображение слитого белка антитело-пептид, в котором пептид слит с C-концом легкой цепи через длинный гибкий спейсер.

[58] **На Фиг. 5A** показаны данные для иммуносорбентного анализа с европием (EuLISA) по измерению связывания химерного (с) 11-1F4 и гуманизированных вариантов,

VH10/VL4, VH9/VL4, VH8/VL4, VH7/VL4 или VH6/VL3, с синтетическим амилоидоподобными фибриллами легкой цепи $rV\lambda 6Wil$. На **Фиг. 5B** показаны данные для EuLISA по измерению связывания VH6/VL3-p5 (6-3-p5), VH6/VL3-p5R (6-3-p5R), c11-1F4, или VH6/VL3 с фибриллами $rV\lambda 6Wil$. На **Фиг. 5C** показаны данные для EuLISA по измерению связывания VH9/VL/4-p5R с фибриллами $rV\lambda 6Wil$, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ или экстрактом печени TAL AL κ . На **Фиг. 5D** показаны данные для EuLISA по измерению связывания VH9/VL/4-p5 с фибриллами $rV\lambda 6Wil$, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SHI AL λ или экстрактом печени TAL AL κ . На **Фиг. 5E** показаны данные для EuLISA по измерению связывания c11-1F4, m11-1F4 или VH9/VL4 с фибриллами $rV\lambda 6Wil$. На **Фиг. 5F** показаны данные EuLISA по измерению связывания VH6/VL3-p5 с экстрактом Sno ATTR (темно-серые кружки) или экстрактом Ken ATTR (светло-серые кружки) и связывание c11-1F4 с экстрактом Sno ATTR (черные квадраты). На **Фиг. 5G** показаны данные EuLISA по измерению связывания VH6/VL3-p5R с Per125 wtATTR (серые кружки, см. метку), экстрактом Sno ATTR (темно-серые кружки) или экстрактом Ken ATTR (светло-серые кружки) и связывание c11-1F4 с экстрактом Sno ATTR (черные квадраты). Логарифмически преобразованная молярная концентрация моноклонального антитела ($-\log(M)$) показана на оси x, а уровень связывания (фемтомолей европия) показан на оси y.

[59] На **Фиг. 6** показаны результаты связывания ^{125}I -mIgp5 с амилоидоподобными фибриллами $rV\lambda 6Wil$ и экстрактами амилоида человека, полученные из тканей в анализе с аффинной адсорбцией. По оси Y показан процент связанного ^{125}I -mIgG-p5, а процент связанного для каждого образца указан над столбиками гистограмм. На оси X показан тип тестируемого амилоидного экстракта, включая фибриллы $rV\lambda 6Wil$, SNO наследственный (h) ATTR, KEN hATTR, Per 125 wtATTR, Per253 дикого типа (ДТ) ATTR, экстракт AL κ HIG, экстракт AL κ TAL, экстракт AL λ SHI и экстракт AL λ TYL. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

[60] На **Фиг. 7A** показано поглощение меченных pHrodo Red фибрилл $rV\lambda 6Wil$ макрофагами THP-1 человека отдельно или в присутствии контрольного IgG человека (h), ch11-1F4, muIgp5 (продуцируемого в линии клеток хриНЕК293), VH6/VL3-p5 или VH6/VL3-p5R, как указано слева направо по оси x. По оси y показан уровень поглощения фибрилл $rV\lambda 6Wil$ (измеряемый в единицах флуоресценции), а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. На **Фиг. 7B** показан фагоцитоз меченных pHrodo Red фибрилл $rV\lambda 6Wil$ макрофагами в присутствии THP-1 отдельно или с контролем hIgG, c11-1F4, mIgp5, VH9/VL4-p5 или VH9/VL4-p5R, как показано слева направо по оси x. По оси Y показан уровень фагоцитоза (единицы флуоресценции), а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. На **Фиг. 7C** показан фагоцитоз меченных pHrodo Red фибрилл $rV\lambda 6Wil$ макрофагами в присутствии контроля hIgG, 5 мкг Ритуксана (химерного mAt в качестве отрицательного контроля), 5 мкг c11-1F4, 5 мкг VH6/VL3, 5 мкг VH9/VL4, VH6/VL3-p5R или VH6/VL3-p5, как указано слева направо по оси x. По оси y показан уровень фагоцитоза (флуоресценция pHrodo), а планки погрешностей

представляют собой стандартное отклонение.

[61] **На Фиг. 8А** показаны технологические процессы периодического культивирования с подпиткой и перфузионного культивирования, используемые для получения интактного V_H9-D54E/VL4-N33S-VSPSV-p5R. Чистота (% интактного слитого белка) указана для каждого способа получения. **На Фиг. 8В** показаны результаты эксперимента по связыванию, в котором проверяется аффинность очищенного из периодической культуры с подпиткой FB.1 и очищенного из перфузионной культуры PF.1 к rV λ WIL. Левая шкала по оси y используется для очищенного из периодической культуры с подпиткой FB.1, а правая используется для очищенного из перфузионной культуры PF.1.

[62] **На Фиг. 9А** показан гель-анализ радиоактивно меченного (125I) слитого белка антитело-пептид PF.1 в сравнении с контрольным радиоактивно меченным (125I) антителом hIgG1. Показаны образцы в восстанавливающих (В) и невосстанавливающих (НВ) условиях, а также указаны положения IgG, IgH и IgL для каждого белка. Также указан свободный радиоактивный йод (125I). **На Фиг. 9В** показаны изображения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и компьютерной томографии (КТ) мышей с системным АА-амилоидозом через 24 часа после инъекции либо PF.1, либо 125I-hIgG1. **На Фиг. 9С** показано биораспределение 125I-PF.1 и 125I-hIgG1 среди различных тканей мышей с АА через 24 часа после инъекции. **На Фиг. 9D** показана микроауторадиография тканей печени (слева), селезенки (в центре) и сердца (справа) через 24 часа после инъекции мышам с АА либо 125I-PF.1, либо 125I-hIgG1.

[63] **На Фиг. 10А-10Е** показано иммуногистохимическое окрашивание различных тканей человека (сердца, почек, селезенки и головного мозга), содержащих АТТ_R, AL, ALETС2 или А β -амилоид, биотинилированным PF.1 и конго красным. Черные стрелки указывают на биотинилированный PF.1, связанный с образцом ткани, а белые стрелки указывают на наличие амилоида в образце ткани (окрашивание конго красным).

[64] **На Фиг. 11А** показано количественное излучение флуоресценции от pHrodo red у мышей после инъекции амилоида, меченного pHrodo red, при этом инъецированный амилоид либо предварительно инкубировали с PF.1, либо отдельно. Повышенное излучение флуоресценции свидетельствует о фагоцитозе амилоида. **На Фиг. 11В** показано излучение флуоресценции мышей, получавших PF.1, и мышей, получавших контроль, через 12 дней после инъекции.

[65] **На Фиг. 12А-12D** показаны результаты анализа фагоцитоза *ex vivo*, выполненного с PF.1 и контролем IgG1 человека (hIgG1) для амилоидных экстрактов AL κ , AL λ , АТТ_{Rv} и АТТ_{Rwt}. Фагоцитоз выявляют путем мечения pH-чувствительным красителем сукцинимидил - флуорофором pHrodo red, где увеличение эмиссии флуоресценции свидетельствует об усилении фагоцитоза. АТТ_{Rwt} представляет собой ассоциированный с транстиретином дикого типа амилоидоз. АТТ_{Rv} представляет собой ассоциированный с вариантом транстиретина амилоидоз.

[66] **На Фиг. 13А** показаны результаты эксперимента по связыванию, в котором определяли аффинность PF.1 к амилоидным экстрактам rV λ WIL А β (1-40), АТТ_{Rwt},

ATTRV, AL λ и AL κ . ATTRwt представляет собой ассоциированный с транстиретином дикого типа амилоидоз. ATTRv представляет собой ассоциированный с вариантом транстиретины амилоидоз. На **Фиг. 13В** показаны результаты эксперимента по связыванию, в котором определяется аффинность контроля человеческого IgG1 к той же самой панели амилоидных экстрактов, используемой на **Фиг. 12А**.

[67] На **Фиг. 14** показаны результаты эксперимента по связыванию, в котором определяется аффинность PF.7 к синтетическим амилоидоподобным фибриллам α -синуклеина, Tau 441, и A β (1-40). PF.7 представляет собой слитый белок антитело-пептид VN9-D54E/VL4-N33S-VSPSV-p5R, собранный после 7 дней перфузионного культивирования.

[68] На **Фиг. 15** показаны результаты анализа фагоцитоза *ex vivo*, выполненного с помощью PF.1 в отношении фибрилл rV λ WIL (WIL) и AL κ (TAL) в присутствии или в отсутствие 20% человеческой сыворотки в качестве источника человеческого комплемента. +C указывает на присутствие человеческого сывороточного комплемента.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[69] В данном документе представлены слитые белки антитело-пептид, которые связывают амилоиды.

Определения

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

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

скорее для объяснения того, что аспект, обсуждаемый далее, является просто одним примером представленного аспекта.

[72] Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеров аминокислот, а также все значения молекулярной массы или молекулярной массы, указанные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и приведены для описания. Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеров аминокислот и все значения молекулярной массы или молекулярной массы, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и представлены для описания. В случае конфликта настоящая спецификация, включая пояснения терминов, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения.

[73] Для облегчения обзора различных вариантов осуществления настоящего изобретения предоставляются следующие пояснения конкретных терминов:

[74] Термины «**амилоиды**», «**амилоидные отложения**», «**амилоидные фибриллы**» и «**амилоидные волокна**» относятся к нерастворимым волокнистым белковым агрегатам, имеющим общие структурные особенности. Агрегаты белков имеют третичную структуру, например, которая образуется путем агрегации любого из нескольких различных белков и состоит из упорядоченного расположения β -складок, уложенных друг на друга перпендикулярно оси волокна. См. Sunde *et al.*, J. Mol. Biol. (1997) 273:729-39. Аномальное накопление амилоидов в органах может привести к амилоидозу. Хотя они разнообразны по своему происхождению, все амилоиды имеют общие морфологические свойства, заключающиеся в том, что они окрашиваются определенными красителями, такими как конго красный, и после окрашивания имеют характерный красно-зеленый двулучепреломляющий вид в поляризованном свете. Амилоиды также имеют общие ультраструктурные особенности и общие рентгеновские и инфракрасные спектры.

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

[76] Термин «**амилоидогенный**» относится к образованию или склонности к образованию амилоидных отложений. Например, некоторые растворимые мономерные белки могут претерпевать обширные конформационные изменения, приводящие к их агрегации в хорошо упорядоченные, неразветвленные фибриллы шириной 8-10 нм, что завершается образованием амилоидных агрегатов. Например, было обнаружено, что более

тридцати белков образуют амилоидные отложения (или амилоиды) у человека. Не все белки в классе разнообразных белков, такие как легкие цепи иммуноглобулинов, способны образовывать амилоиды, т. е. некоторые белки не являются амилоидогенными, что означает, что они не имеют тенденции к образованию амилоидов. Однако другие белки этого класса могут образовывать амилоидные отложения и, таким образом, являются амилоидогенными. Кроме того, в классе белков легкой цепи некоторые из них могут считаться более «амилоидогенными», чем другие, на основании способности легко образовывать амилоидные фибриллы. Некоторые белки легкой цепи считаются неамилоидогенными или менее амилоидогенными из-за их неспособности легко образовывать амилоидные фибриллы у пациентов или *in vitro*.

[77] **Животное:** живые многоклеточные позвоночные организмы, категория, которая включает, например, млекопитающих и птиц. Термин «млекопитающее» включает как человека, так и отличных от человека млекопитающих. Точно так же термин «субъект» включает как людей, так и ветеринарных субъектов. В некоторых примерах субъект представляет собой субъекта, например, субъекта, страдающего амилоидным заболеванием.

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

[79] **Конъюгат:** используемый в данном документе термин «конъюгат» относится к продукту связывания или сочетания двух или более материалов, а полученный продукт имеет по меньшей мере два отдельных элемента, таких как по меньшей мере два домена. Соединяемые материалы могут быть одинаковыми или могут быть разными. Такое связывание может осуществляться через одну или более связывающих групп. Например, «белковый конъюгат» получается в результате сочетания двух или более аминокислотных последовательностей. Конъюгат двух белков, например, приводит к образованию одного белка, который имеет домен, соответствующий каждому из отдельно соединенных белков.

[80] Термин «**антитело**» используется в данном документе в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

[81] «**Выделенное**» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественной среды. Загрязняющие компоненты его естественной среды представляют собой материалы, которые могут мешать исследовательскому, диагностическому или терапевтическому использованию антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или

небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления антитело очищено (1) до более чем 95% по массе антитела, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более чем 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием, например, секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью ДНС-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием, например, Кумасси синего или серебряного красителя. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, поскольку по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела отсутствует. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

[82] «**Нативные антитела**», как правило, представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины около 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьируется среди тяжелых цепей разных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность взаимодействия между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

[83] Термин «**константная область**» относится к части молекулы иммуноглобулина, имеющей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, переменным доменом, который содержит антигенсвязывающий сайт. Константная область содержит домены CR1, CR2 и CR3 (также называемые CH1, CH2 и CH3; вместе CH) тяжелой цепи и домен CHL (или CL или CL1) легкой цепи.

[84] «**Переменная область**» или «**переменный домен**» антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменный домен тяжелой цепи может обозначаться как «VH». Переменный домен легкой цепи может обозначаться как «VL». Эти домены, как правило, представляют собой наиболее переменные части антитела и содержат антигенсвязывающие сайты.

[85] Термин «**переменный**» относится к тому факту, что определенные части переменных доменов сильно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время переменность не является равномерно распределенной по переменным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах, называемых

определяющими комплементарность областями (CDR), как в переменных доменах легкой цепи, так и в переменных доменах тяжелой цепи. Более консервативные фрагменты переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелых и легких цепей состоит из четырех областей FR, в значительной степени принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть бета-складчатой структуры. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью областей FR и, вместе с CDR из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител с мишенью (см. Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md, (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

[86] «**Легкие цепи**» антител (иммуноглобулинов) от любых видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различимых типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

[87] В контексте данного документа термин «**изотип**» или «**подкласс**» IgG означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определяемых химическими и антигенными характеристиками их константных областей.

[88] В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов их тяжелых цепей антитела (иммуноглобулины) можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в целом описаны, например, в Abbas *et al.* *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Антитело может быть частью более крупной слитой молекулы, образованной путем ковалентной или нековалентной ассоциации антитела с одним или более другими белками или пептидами.

[89] Термины «**полноразмерное антитело**», «**интактное антитело**» и «**цельное антитело**» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу интактной форме, а не фрагментов антитела, как определено ниже. Эти термины, в частности, относятся к антителу с тяжелыми цепями, содержащими область Fc.

[90] «**Голое антитело**» для целей данного документа представляет собой антитело, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоактивной меткой.

[91] «**Фрагменты антитела**» включают часть интактного антитела, предпочтительно содержащую его антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, описанный в данном документе, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab,

Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антители; молекулы одноцепочечных антител; и полиспецифические антители, образованные из фрагментов антител.

[92] При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые фрагментами «**Fab**», каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный фрагмент «**Fc**», название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к образованию фрагмента F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих активных центра и все еще способен к поперечному связыванию с антигеном.

[93] «**Fv**» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенсвязывающий сайт. В одном варианте осуществления двухцепочечный вид Fv состоит из димера одной переменной области тяжелой цепи и одной переменной области легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В одноцепочечных молекулах Fv (scFv) один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны с помощью гибкого пептидного линкера, так что легкая и тяжелая цепи могут объединяться в «димерную» структуру, аналогичную двухцепочечному Fv. Именно в этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют, определяя антигенсвязывающий сайт на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и при более низкой аффинности, чем весь сайт связывания.

[94] Фрагмент Fab содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи, а также константный домен легкой цепи и первый константный домен (СН1) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена СН1 тяжелой цепи, в том числе одного или более цистеинов из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH является обозначением для фрагмента Fab', в котором цистеиновые остатки константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антитела первоначально получали в виде пар фрагментов Fab, которые имеют шарнирные цистеины между ними. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела.

[95] Фрагменты антител «одноцепочечные Fv» или «scFv» содержат домены VH и VL антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать желаемую структуру для связывания антигена. Для обзора scFv, см., например, Pluckfhun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[96] В контексте данного документа термин «**моноклональное антитело**» относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антители в составе популяции являются идентичными, за исключением возможных мутаций, например, встречающихся в природе мутаций, которые

могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, определение «моноклональное» указывает на то, что антитело не представляет собой смесь отдельных антител. В определенных вариантах осуществления такое моноклональное антитело, как правило, включает антитело, содержащее полипептидную последовательность, связывающую мишень, при этом последовательность полипептида, связывающего мишень, была получена с помощью процесса, который включает отбор единственной последовательности полипептида, связывающего мишень, из множества последовательностей полипептида. Например, процесс отбора может представлять собой отбор уникального клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантной ДНК. Следует понимать, что выбранная мишень-связывающая последовательность может быть дополнительно изменена, например, для улучшения аффинности к мишени, для гуманизации последовательности, связывающейся с мишенью, для улучшения ее продукции в клеточной культуре, для снижения ее иммуногенности *in vivo*, для создания полиспецифического антитела и т.д., и что антитело, содержащее измененную мишень-связывающую последовательность, также является моноклональным антителом по данному изобретению. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Помимо своей специфичности, препараты моноклональных антител имеют преимущество в том, что они обычно не загрязнены другими иммуноглобулинами.

[97] Определение «**моноклональное**» указывает на характер антитела, полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с данным изобретением, могут быть получены с помощью различных методик, включая, например, метод гибридомы (например, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 1,4 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4,8.16,567), технологии на основе фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Способы* 284(1-2):119-132 (2004), и технологии получения человеческих или человекоподобных антител у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулинов человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits 11 et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993);

патенты США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

[98] В контексте данного документа моноклональные антитела, в частности, включают «**химерные**» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (см. патент США № 4816567; и Morrison et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают приматизированные антитела, в которых антигенсвязывающая область антитела получена из антитела, полученного, например, путем иммунизации макака представляющим интерес антигеном.

[99] «**Гуманизированные**» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте гуманизированное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором остатки из CDR реципиента заменены остатками из CDR нечеловеческого вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, имеющий желаемую специфичность, аффинность и/или активность. В некоторых случаях, остатки FR человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации могут быть сделаны для дальнейшего улучшения эффективности антител. В общем, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют таким областям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а все или практически все FR соответствуют таким областям последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации, см., например, Jones et al, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol* 2:593-596 (1992), См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409.

[100] «**Человеческое антитело**» представляет собой антитело, которое имеет

аминокислотную последовательность, которая соответствует таковой из антитела, вырабатываемого человеком, и/или было создано с помощью любых технологий получения человеческих антител, описанных в данном документе. Из этого определения антитела человека, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Антитела человека можно получать различными способами, известными в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001), человеческие антитела можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы были инактивированы, например, иммунизированным ксено-мышам (см., например, патент США № 6075181 и 6150584 по технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) по вопросу человеческих антител, полученных с помощью технологии человеческой В-клеточной гибридомы.

[101] В контексте данного документа термин «**определяющая комплементарность область**» или «**CDR**» относится к областям переменного домена антитела, которые связываются с эпитопом, таким как амилоидные фибриллы человека. Обычно антитела содержат шесть CDR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести CDR, и, как полагают, в частности, H3 играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. См., например, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Действительно, встречающиеся в природе антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными без легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993) и Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[102] Применяют большое число вариантов разграничения CDR, которые включены в данный документ. В некоторых вариантах осуществления CDR могут представлять собой CDR по Kabat, в основе которых лежит переменность последовательностей и которые являются наиболее часто используемыми (Kabat *et al.*, *выше*). В некоторых вариантах осуществления CDR могут представлять собой CDR по Chothia. Нумерация Chothia вместо этого указывает на расположение структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления CDR могут представлять собой CDR по AbM. CDR по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. В некоторых вариантах осуществления CDR могут представлять собой CDR по «Contact». CDR по «Contact» основаны на анализе

доступных кристаллических структур комплексов. Остатки из каждой из этих CDR приведены ниже.

<u>Петля</u>	<u>Kabat</u>	<u>AbM</u>	<u>Chothia</u>	<u>Contact</u>
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация по Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация по Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[103] CDR могут включать «расширенные CDR» следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (предпочтительный вариант) (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки варибельного домена пронумерованы в соответствии с Kabat *et al.*, *выше*, для каждого из этих определений расширенного CDR.

[104] «**Каркасные**» или «**FR**» остатки представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков CDR, как определено в данном документе.

[105] В контексте данного документа термин «**специфически связывается с**» или «**специфичен в отношении**» относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, которое определяет присутствие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфически связывается с целью (которая может быть эпитопом), представляет собой антитело, которое связывается с этой целью с большей аффинностью, авидностью, с большей готовностью и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими целями. В одном варианте осуществления степень связывания антитела с неродственной мишенью составляет менее около 10% от связывания антитела с мишенью, измеренной, *например*, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с мишенью, имеет константу диссоциации (K_d) <1 M, <100 мкМ, <10 нМ, <1 нМ или $<0,1$ нМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело специфически связывается с эпитопом на белке, который является консервативным среди белков разных видов. В другом варианте осуществления данного изобретения специфичное связывание может включать исключительное связывание, но не требует его.

[106] **Эффективное количество** или **терапевтически эффективное количество**: количество агента, достаточное для предотвращения, лечения (включая профилактику), уменьшения и/или облегчения симптомов и/или основных причин любого нарушения или заболевания, например, для предотвращения, ингибирования амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления «эффективное количество» достаточно для уменьшения или

устранения симптома заболевания. Эффективное количество можно вводить один или более раз. Например, эффективное количество пептида представляет собой количество, достаточное для связывания амилоида. Пептид может быть эффективным, например, при парентеральном введении в количествах от около 1 мкг на кг массы тела до около 30 мг/кг.

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

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

[109] Что касается образования амилоидных отложений, «ингибирование» относится к предотвращению уменьшения образования амилоидных отложений, например, по сравнению с контролем. Например, ингибирование может привести к уменьшению на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или более амилоидных отложений по сравнению с контролем.

[110] **Метка** относится к любому поддающемуся обнаружению соединению или композиции, которая прямо или косвенно конъюгирована с другой молекулой для облегчения обнаружения этой молекулы. Конкретные неограничивающие примеры меток включают флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, гаптены, ферментативные связи и радиоактивные изотопы. Белок, который является «обнаружимо меченым», например, означает, что присутствие белка можно определить по метке, связанной с белком.

[111] **Выделенный**: «выделенный» биологический компонент, такой как пептид (например, один или более пептидов, описанных в данном документе), образцы клеток, нуклеиновых кислот или сыворотки были по существу отделены, получены отдельно от других биологических компонентов или очищены от них в клетке организма, в которой компонент встречается в природе, например, других хромосомных и внехромосомных ДНК

и РНК, а также белках. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки. Этот термин также включает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке, а также химически синтезированные пептиды и нуклеиновые кислоты. Термин «выделенный» или «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее, это относительный термин. Так, например, выделенный пептидный препарат представляет собой препарат, в котором пептид или белок более обогащен, чем пептид или белок в естественной среде внутри клетки. Предпочтительно, препарат очищают таким образом, что белок или пептид составляет по меньшей мере 50% от общего содержания пептидов или белков в препарате, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 99% от концентрации пептидов или белков.

[112] **Соединение:** используемый в данном документе термин «соединение», «соединенный», «связь» или «связанный» относится к любому известному в данной области методу функционального соединения белков и/или белковых доменов. Например, один белковый домен может быть связан с другим белковым доменом ковалентной связью, например, в рекомбинантном слитом белке, с промежуточными последовательностями или доменами или без них. Термин «соединенный» также включает, например, объединение двух последовательностей вместе, такое как размещение двух последовательностей нуклеиновых кислот вместе в одной и той же цепи нуклеиновой кислоты, так что последовательности экспрессируются вместе.

[113] **Нуклеиновая кислота:** полимер, состоящий из нуклеотидных звеньев (рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов), связанных фосфодиэфирными связями, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. Таким образом, этот термин включает нуклеотидные полимеры, в которых нуклеотиды и связи между ними включают неприродные синтетические аналоги, такие как, например, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хирально-метилфосфонаты, 2-О-метил рибонуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) и т.п. Такие полинуклеотиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического синтезатора ДНК. Термин «олигонуклеотид» обычно относится к коротким полинуклеотидам, обычно не превышающим около 50 нуклеотидов. Следует понимать, что когда нуклеотидная последовательность представлена последовательностью ДНК (т.е. А, Т, G, С), она также включает последовательность РНК (т.е. А, U, G, С), в которой «U» заменяет «Т».

[114] **Нуклеотид** включает, но не ограничивается этим, мономер, который включает азотистое основание, связанное с сахаром, например, пиримидин, пурин или их синтетические аналоги, или азотистой основание, связанное с аминокислотой, как в пептидной нуклеиновой кислоте (ПНК). Нуклеотид представляет собой один мономер в

полинуклеотиде. Нуклеотидная последовательность относится к последовательности оснований в полинуклеотиде.

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

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

[117] **Термин «кодирование»** относится к неотъемлемому свойству специфических последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологического свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, продуцируемой этим геном, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставлена в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК. Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать интроны.

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

[119] В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного используемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости,

такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и рН-буферные агенты и т.п., например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

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

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

[122] **Рекомбинантная:** рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая имеет последовательность, не встречающуюся в природе, или имеет последовательность, созданную искусственным сочетанием двух иначе разделенных сегментов последовательности. Эту искусственную комбинацию часто получают посредством химического синтеза или, чаще, посредством искусственной манипуляции с выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, с помощью методов генной инженерии.

[123] **Идентичность последовательностей:** сходство между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или двумя аминокислотными последовательностями выражается в терминах сходства между последовательностями, иначе называемого идентичностью последовательностей. Идентичность последовательностей часто измеряют с точки зрения процентной идентичности (или сходства, или гомологии); чем выше процент, тем более похожи две последовательности.

[124] Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. *Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith & Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443,*

1970; Pearson & Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp *Gene* 73: 237-244, 1988; Higgins & Sharp *CABIOS* 5: 151-153, 1989; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* 16, 10881-90, 1988; Huang *et al. Computer Appls. In the Biosciences* 8, 155-65, 1992; and Pearson *et al. Meth. Mol. Bio.* 24, 307-31, 1994. Altschul *et al. (J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990), которое представляет подробное рассмотрение способов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

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

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

[127] **Фармацевтический агент:** химическое соединение или композиция, способная вызывать желаемый терапевтический или профилактический эффект при правильном введении субъекту или клетке.

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

[129] **Субъект** или **индивид** относится к млекопитающему, например, человеку. Субъект может представлять собой пациента-человека. Субъект может представлять собой пациента, страдающего заболеванием или патологическим состоянием или с подозрением на заболевание или патологическое состояние, и может нуждаться в лечении или диагностике или может нуждаться в наблюдении за прогрессированием заболевания или патологического состояния. Пациент также может находиться на лечебной терапии,

эффективность которой необходимо контролировать. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления субъект включает индивида, имеющего амилоидоз, например, болезнь Альцгеймера, Гентингтона или прионные заболевания, или периферический амилоидоз, например, наблюдаемые у пациентов с амилоидозом легких цепей (AL) и диабетом 2 типа.

[130] Предпочтительно неидентичные положения остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами. Термин «**консервативные аминокислотные замены**» относится к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, представляет собой серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амидосодержащие боковые цепи, представляет собой аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамин-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

[131] Как обсуждается в данном документе, незначительные вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулина рассматриваются как охватываемые данным изобретением, при условии, что вариации в аминокислотной последовательности сохраняются на по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно 99%. В частности, предложены консервативные замены аминокислот. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, связанных в их боковых цепях. Генетически кодируемые аминокислоты, как правило, делятся на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, принадлежащие к семейству алифатических гидроксилсодержащих аминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, принадлежащие семейству амидсодержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, принадлежащие семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, принадлежащие семейству ароматических аминокислот. Например,

разумно ожидать, что выделенная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет иметь значительный эффект на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту в каркасном сайте. Можно легко определить, приводит ли изменение аминокислоты к функциональному пептиду, анализируя удельную активность производного полипептида; в данном документе подробно описаны анализы. Специалисты в данной области техники могут легко получить фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулинов. Предпочтительные amino- и карбокси-концы фрагментов или аналогов находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или проприетарными базами данных последовательностей. Предпочтительно использовать компьютеризированные методы сравнения для идентификации мотивов последовательности или доменов предсказанной конформации белка, которые встречаются в других белках известной структуры и/или функции. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые складываются в известную трехмерную структуру. (Bowie *et al. Science* 253:164 (1991)). Таким образом, приведенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут определять мотивы последовательностей и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с изобретением.

[132] Предпочтительные аминокислотными заменами являются такими, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) уменьшают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и (4) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутации с последовательностью, отличной от природной пептидной последовательности. Например, одиночные или множественные аминокислотные замены (предпочтительно, консервативные аминокислотные замены) могут быть произведены в природной последовательности (предпочтительно, в части полипептида вне домена(-ов), образующего межмолекулярные контакты. Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна иметь тенденцию к разрыву спирали, которая встречается в исходной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры признанных в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в «Proteins, Structures and Molecular Principles» (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton *et al. Nature* 354:105 (1991).

[133] За исключением CDR1 в VH, CDR обычно содержат аминокислотные остатки,

образующие гипервариабельные петли. CDR также содержат «определяющие специфичность остатки» или «SDR», которые представляют собой остатки, которые контактируют с антигеном. SDR содержатся в областях CDR, называемых сокращенно CDR или a-CDR. Примеры a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, и a-CDR-H3) соответствуют аминокислотным остаткам 31-34 L1, 50-55 L2, 89-96 L3, 31-35B H1, 50-58 H2 и 95-102 H3. (См. Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008)).

Слитые белки антитело-пептид

[134] В данном документе представлены слитые белки антитело-пептид, нацеленные на амилоиды. Такие слитые белки антитело-пептид включают, например, реактивные к амилоиду пептиды, которые связаны с антителом, например, посредством удлинения N-конца или C-конца белка легкой цепи антитела, его фрагмента, антигенсвязывающей области (Fab) или через N-конец или C-конец тяжелой цепи антитела, образуя тем самым слитый пептид-антитело, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. Слитые белки антитело-пептид можно использовать для лечения субъекта, имеющего амилоидоз или с подозрением на амилоидоз, например, путем введения субъекту слитых белков антитело-пептид.

[135] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен слитый белок антитело-пептид, содержащий: реактивный к амилоиду пептид; и антитело, которое индуцирует фагоцитоз или действует как опсонин. В некоторых вариантах осуществления опсонин представляет собой белок, который связывается с мишенью и индуцирует фагоцитоз этой мишени. В некоторых вариантах осуществления опсонин включает антитело или слитый белок антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, представленные в данном документе, действуют как опсонины, связываясь с амилоидом и способствуя фагоцитозу амилоида. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N- и/или C-конце легкой цепи и/или на N- и/или C-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит более одного реактивного к амилоиду пептида, связанного с антителом. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом

через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, как показано в **таблице 1** ниже.

[136] В некоторых вариантах осуществления слитая молекула антитело - реактивный к амилоиду пептидом содержит тяжелую цепь в направлении от N-конца к C-концу, содержащую по порядку реактивный к амилоиду пептид, спейсер, VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления слитая молекула антитело - реактивный к амилоиду пептид содержит тяжелую цепь в направлении от N-конца к C-концу в порядке следования VH, CH1, CH2, CH3, спейсер и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления слитая молекула реактивный к амилоиду пептид - антитело содержит легкую цепь в направлении от N-конца к C-концу в порядке следования реактивный к амилоиду пептид, спейсер, VL и CL. В некоторых вариантах осуществления слитая молекула реактивный к амилоиду пептид - антитело содержит легкую цепь в направлении от N-конца к C-концу в порядке следования VL и CL, спейсер и реактивный к амилоиду пептид.

Таблица 1. Иллюстративные реактивные к амилоиду пептидные последовательности

Пептид	Первичная последовательность	SEQ ID NO
P5	KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO: 1
P5R	RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR Q	SEQ ID NO: 2
P8	КАКАК АКАКА КАКАК	SEQ ID NO: 3
P9	KAQAK AQAKA QAKAQ AKAQA KAQAK AQAK	SEQ ID NO: 4
P19	KAQQA QAKQA QQAQK AQQAQ AKQAA Q	SEQ ID NO: 5
P20	QAQKA QAQQA KQAQQ AQKAQ AQQAK Q	SEQ ID NO: 6
P31	KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO: 7
P37	KTVKT VTKVT KVTVK TVKTV TKVTK V	SEQ ID NO: 8
P42	VYKVK TKVKT KVGTK VKT	SEQ ID NO: 9
P43	AQAYS KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKAK Q	SEQ ID NO: 10

P44	AQAYA RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR Q	SEQ ID NO: 11
P5+14	KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK QAQKA QKAQA KQAKQ	SEQ ID NO: 12
P5R+14	RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR QAQRA QRAQA RQARQ	SEQ ID NO: 13

[137] Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что реактивный к амилоиду пептид слитого белка антитело-пептид при введении субъекту нацеливает слитый белок антитело-пептид на амилоидные отложения. Затем домен Fc запускает иммунный ответ в месте расположения амилоида, что приводит к удалению амилоида, например, путем опсонизации. Кроме того, считается, что слитый белок антитело-пептид имеет более длительный период полужизни, чем отдельные реактивные к амилоиду пептиды. Например, период полужизни IgG из крови у людей составляет примерно 21 день, тогда как период полужизни только реактивного к амилоиду пептида у людей составляет приблизительно 11 часов. Таким образом, Ig увеличивает период полужизни слитого белка антитело-пептид в системе кровообращения. В некоторых вариантах осуществления период полужизни слитого белка антитело-пептид увеличивается примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более по сравнению с только реактивным к амилоиду пептидом. Таким образом, слитый белок антитело-пептид при введении субъекту может дольше оказывать свое иммуностимулирующее действие в месте расположения амилоидного отложения, тем самым усиливая иммунный ответ в месте расположения амилоидного отложения.

[138] В некоторых вариантах осуществления реактивные к амилоиду пептиды слитых белков антитело-пептид, описанные в данном документе, включают аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-13, например, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивные к амилоиду пептиды, связанные с антителом или его функциональными фрагментами, могут содержать или состоять из примерно 10-55 аминокислот. Реактивные к амилоиду пептиды по настоящему изобретению могут, например, содержать или состоять из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55 аминокислот. Такие пептиды описаны, например,

в международной патентной заявке WO2016032949 и Wall *et al.* (*PLoS One*. 2013 Jun 4;8(6):e66181), которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-13, содержащие одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:1-13.

[139] Аминокислоты, образующие все или часть реактивных к амилоиду пептидов, связанных с антителом или его фрагментом, могут быть стереоизомерами и модификациями природных аминокислот, неприродных аминокислот, посттрансляционно модифицированных аминокислот, ферментативно синтезированных аминокислот, дериватизированных аминокислот, конструкций или структур, предназначенных для имитации аминокислот, и т.п. Аминокислоты, образующие пептиды по настоящему изобретению, могут представлять собой одну или более из 20 обычных аминокислот, встречающихся в природных белках, или одну или более модифицированных и необычных аминокислот. Слитый белок антитело-пептид может быть получен любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая химический синтез или рекомбинантные способы с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

[140] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR антитела, как показано в **таблице 2**.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR m11-1F4

11-1F4 CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
CDR-H1	GFSLSSYGVS	17
CDR-H2	VIWGDGSTNYHPNLMS	18
CDR-H3	LDY	19
CDR-L1	RSSQSLVHRNGNTYLH	20
CDR-L2	KVSNRFS	21
CDR-L3	FQTTYVPNT	22

[141] В конкретном варианте осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, причем антитело содержит VH, содержащую (a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (b) CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18 и (c) CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, при этом антитело связано с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[142] В конкретном варианте осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, причем антитело содержит VL, которая содержит (a) CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; (b) CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; и (c) CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где антитело связано с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86.

[143] В одном варианте осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, где антитело связано с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16 представлены ниже.

VH M11-1F4 SEQ ID NO:15

**QVQLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVIWGDGS
TNYHPNLMSRLSISKDISKSQVLFKLSLQTD D TATYYCVTLDYWGQGTSVTVSS**

VL M11-1F4 SEQ ID NO:16

**DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKV
SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCFQT TTYVPNTFGGGTKLEIK**

[144] В другом аспекте слитый белок антитело-пептид содержит антитело, при этом антитело содержит VH, содержащую CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19; и VL, содержащую CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и при этом антитело связано с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим любую из аминокислотных последовательностей, перечисленных в **таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-13.

[145] В еще одном аспекте слитый белок антитело-пептид содержит антитело, причем антитело содержит VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из VH, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, и VL CDR1 и VL CDR2 из VL, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:16; и при этом антитело связано с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим любую из аминокислотных последовательностей, перечисленных в **таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-13.

[146] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое содержит тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, где легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 без C-концевого остатка лизина, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, где антитело связано с реактивным к амилоиду пептидом.

[147] В еще одном аспекте слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим любую из аминокислотных последовательностей, перечисленных в **таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с N-концом или C-концом легкой цепи антитела или N- или C-концом тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело также содержит спейсерную аминокислотную последовательность между реактивным к амилоиду пептидом и N-концом или C-концом легкой цепи антитела или N- или C-концом тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер является гибким или жестким. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27 и 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:83

и SEQ ID NO:86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с С-концом легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид, указанный в SEQ ID NO:2, связан с С-концом легкой цепи через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

[148] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, где тяжелая цепь связана с пептидом, включающим любую из аминокислотных последовательностей **таблицы 1**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, где тяжелая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, где тяжелая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, где тяжелая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность любую из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[149] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое содержит легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, где легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим любую из аминокислотных последовательностей из **таблицы 1**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, где легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, легкая цепь которого содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, причем легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, легкая цепь которого

содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, причем легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[150] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, при этом легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим любую из аминокислотных последовательностей из **таблицы 1**. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[151] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, при этом легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с легкой цепью на N-конце. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с легкой цепью на C-конце. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[152] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, тяжелая цепь которого содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, при этом легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с легкой цепью на N-конце. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с легкой цепью на C-конце. В некоторых вариантах осуществления

реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[153] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, тяжелая цепь которого содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, где легкая цепь связана с реактивным к амилоиду пептидом, включающим аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с легкой цепью на N-конце. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с легкой цепью на C-конце. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[154] В данном документе также представлены слитые белки антитело-пептид, содержащие гуманизованное антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, слитыми с реактивным к амилоиду пептидом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело содержит гуманизованную последовательность VH и/или VL, полученную из m11-1F4. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, как описано в международной заявке № PCT/US2020/060596, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные аминокислотные последовательности гуманизованных областей VH и VL представлены ниже в **таблицах 3-4**. В **таблицах 3-4** последовательности CDR подчеркнуты, а обратные мутированные остатки и дополнительные мутации, которые были введены в гуманизованные варианты VL4 и VH9, выделены жирным шрифтом и курсивом. Дополнительные мутации, которые были введены в VL4 и VH9, перечислены в столбце IgG **таблиц 3-4**; эти мутации пронумерованы относительно N-конца VL или VH. Аминокислотные последовательности CDR для вариантов VL4 и VH9 с модифицированной CDR представлены в **таблице 5** и **таблице 6** по сравнению с VL4 и VH9 ниже.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности гуманизованной вариabельной области легкой цепи

IgG	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
-----	--------------------------------------	-----------

VL1	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	32
VL2	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQRP GQSPRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	33
VL3	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQRP GQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	34
VL4	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	35
VL4-N33S	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	36
VL4-N33Q	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRQGNNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	37
VL4-N33E	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHREGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	38
VL4-N33A	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRAGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	39
VL4-N33H	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRHGNNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	40
VL4-G34A	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRAGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	41
VL4-G34V	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRVGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK	42

Таблица 4. Аминокислотные последовательности переменной области гуманизированной тяжелой цепи

IgG	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO
VH1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS ^W IRQPPGKGL EWIGVIWGDGSTNYHPNLM ^S RV ^T ISVDTSKNQFSLKLS ^S VTAAD TAVYYCARLDYWGQ ^T SVTVSS	43

VH2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARLDYWGQGTSVTVSS	44
VH3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWIGVIWGDGSTNYHPNLMSR L SISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT ATYYCV T LDYWGQGTSVTVSS	45
VH4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLMSR L SISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARLDYWGQGTSVTVSS	46
VH5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLMSR L SISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCV T LDYWGQGTSVTVSS	47
VH6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLMSR L SISKDTSKNQFSLKLSSVTAAD TATYYCV T LDYWGQGTSVTVSS	48
VH7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWIGVIWGDGSTNYHPNLMSRVTISKDTSKNQ V LKLSSVTAAD TAVYYCV T LDYWGQGTSVTVSS	49
VH8	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWIGVIWGDGSTNYHPNLMSRVTISKDTSK S QFSLKLSSVTAADT AVYYCV T LDYWGQGTSVTVSS	50
VH9	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLMSRVTISVDTSK S Q V L F KLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	51
VH10	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLMSR L SISKDTSK S Q V L L KLSSVTAAD TAVYYCV T LDYWGQGTSVTVSS	52
VH9- D54S	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIWGS G STNYHPNLMSRVTISVDTSK S Q V L F KLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	53
VH9- D54Q	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIW Q GSTNYHPNLMSRVTISVDTSK S Q V L F KLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	54
VH9- D54E	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIW G EGSTNYHPNLMSRVTISVDTSK S Q V L F KLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	55
VH9- D54A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIW G AGSTNYHPNLMSRVTISVDTSK S Q V L F KLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	56
VH9- D54H	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVS W IRQPPGKGL EWLGVIW G HGSTNYHPNLMSRVTISVDTSK S Q V L F KLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	57

VH9-G55A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGDASTNYHPNLMSRVTISVDTSK.SQVLFKLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	58
VH9-G55V	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGDVSTNYHPNLMSRVTISVDTSK.SQVLFKLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	59
VH9-M64V	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLVSRVTISVDTSK.SQVLFKLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	60
VH9-M64I	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLISRVTISVDTSK.SQVLFKLSSVTAADT AVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	61
VH9-M64L	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLLSRVTISVDTSK.SQVLFKLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	62
VH9-M64A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGDGSTNYHPNLASRVTISVDTSK.SQVLFKLSSVTAAD TAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS	63

Таблица 5. Аминокислотные последовательности CDR VL4

IgG	CDR-L1		CDR-L2		CDR-L3	
	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VL4	RSSQSLVHRNGNT YLH	20	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-N33 S	RSSQSLVHRSGNT YLH	64	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-N33 Q	RSSQSLVHRQGNT YLH	65	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-N33 E	RSSQSLVHREGNT YLH	66	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-N33 A	RSSQSLVHRAGNT YLH	67	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-N33 H	RSSQSLVHRHGNT YLH	68	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-G34 A	RSSQSLVHRNANT YLH	69	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22
VL4-G34 V	RSSQSLVHRNVNT YLH	70	KVSNRFS	21	FQTTYVPNT	22

Таблица 6. Аминокислотные последовательности CDR VH9

IgG	CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3	
	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH9	GFSLSYGVV	17	VIWGDGSTNYHP NLMS	18	LDY	19
VH9-D54S	GFSLSYGVV	17	VIWGSGSTNYHP NLMS	71	LDY	19
VH9-D54Q	GFSLSYGVV	17	VIWGQGSTNYHP NLMS	72	LDY	19
VH9-D54E	GFSLSYGVV	17	VIWGEGSTNYHP NLMS	73	LDY	19
VH9-D54A	GFSLSYGVV	17	VIWGAGSTNYHP NLMS	74	LDY	19
VH9-D54H	GFSLSYGVV	17	VIWGHGSTNYHP NLMS	75	LDY	19
VH9-G55A	GFSLSYGVV	17	VIWGDASTNYHP NLMS	76	LDY	19
VH9-G55V	GFSLSYGVV	17	VIWGDVSTNYHP NLMS	77	LDY	19
VH9-M64V	GFSLSYGVV	17	VIWGDGSTNYHP NLVS	78	LDY	19
VH9-M64I	GFSLSYGVV	17	VIWGDGSTNYHP NLIS	79	LDY	19
VH9-M64L	GFSLSYGVV	17	VIWGDGSTNYHP NLLS	80	LDY	19
VH9-M64A	GFSLSYGVV	17	VIWGDGSTNYHP NLAS	81	LDY	19

[155] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее варибельную область легкой цепи (VL) и варибельную область тяжелой цепи (VH), где VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1 включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело

содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR антитела, как показано в **таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, включающие аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:15; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно включающие аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[156] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH), где VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, с одним или более консервативными аминокислотными заменами, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, с одной или более консервативными аминокислотными заменами, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, с одной или более консервативными аминокислотными заменами, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, с одной или более консервативными аминокислотными заменами, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, с одной или более консервативных аминокислотных замен, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, с одной или более консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR антитела, как показано в **таблице 2**, с одной или более консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, включающие аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, с одной или более консервативными аминокислотными заменами; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно, включающие аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 VL, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, с одной или более консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер,

включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[157] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL, содержащую CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64-70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH, содержащую CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, при этом гуманизованное антитело содержит VL, содержащую CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20; CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH, содержащую CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[158] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, при этом гуманизованное антитело содержит VL, содержащую CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64-70; CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH, содержащую CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:71; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[175] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, при этом гуманизированное антитело содержит VL, содержащую CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 70; CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH, содержащую CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[176] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, содержащее VL, содержащую CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH, содержащую CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, указанным в SEQ ID NO:2, через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к С-концу в порядке следования VL, CL, спейсер и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид слит с С-концом легкой цепи через спейсер.

[177] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, содержащее аминокислотную последовательность VL, как показано в **таблице 3**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, при этом гуманизированное антитело содержит VL, выбранную из группы, состоящей из VL2, VL3, VL4, VL4-N33S, VL4-N33Q, VL4-N33E, VL4-N33A, VL4-N33H, VL4-G34A, или VL4-G34V, как показано в **таблице 3**. В некоторых вариантах осуществления VL включает аминокислотную последовательность, указанную в группе, состоящей из SEQ ID NO: 32-42. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[178] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, содержащее аминокислотную последовательность VH, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, при этом гуманизированное антитело содержит VH, выбранный из группы, состоящей из VH2, VH3, VH4, VH5, VH6, VH7, VH8, VH9, VH10, VH9-D54S, VH9-D54Q, VH9-D54E, VH9-D54A, VH9-D54H, VH9-G55A, VH9-G55V, VH9-M64V, VH9-M64I, VH9-M64L, или VH9-M64A, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления VH включает аминокислотную последовательность, указанную в группе, состоящей из SEQ ID NO: 43-63. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[179] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид

SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[216] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид слит с С-концом легкой цепи через спейсер. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, указанным в SEQ ID NO:2, через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

[217] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL с VL4, как показано в **таблице 3**, и VH с VH9, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[218] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL с VL4-N33S, как показано в **таблице 3**, и VH с VH9-D54E, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[219] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL с VL3, как показано в **таблице 3**, и VH с VH6, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[220] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL с VL4, как показано в **таблице 3**, и VH с VH10, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, содержащее VL с VL4, как показано в **таблице 3**, и VH с VH8, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит

гуманизированное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, содержащее VL с VL4, как показано в **таблице 3**, и VH с VH7, как показано в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, содержащее VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13.

[221] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид, содержащий гуманизированное антитело, содержит реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид содержит один или более пептидов, приведенных в **таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

[222] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, при этом гуманизированное антитело содержит легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид слит с N-концом легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид слит с C-концом легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, при этом гуманизированное антитело содержит легкую цепь, причем реактивный к амилоиду пептид слит с N-концом легкой цепи с помощью спейсера. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизированное антитело, при этом гуманизированное антитело содержит легкую цепь, причем реактивный к амилоиду пептид слит с C-концом легкой цепи с помощью спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой гибкий спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит остатки глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления спейсер

включает аминокислотную последовательность GGGYS. В некоторых вариантах спейсер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой жесткий спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер не заряжен. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83-86.

[223] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, при этом гуманизованное антитело содержит легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид слит с N-концом тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид слит с C-концом тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, причем гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, причем реактивный к амилоиду пептид слит с N-концом тяжелой цепи с помощью спейсера. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит гуманизованное антитело, причем гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, причем реактивный к амилоиду пептид слит с C-концом тяжелой цепи с помощью спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой гибкий спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой жесткий спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер не заряжен. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

[224] В определенных вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид могут включать спейсерные последовательности аминокислот между C- или N-концом легкой цепи или C- или N-концом тяжелой цепи и реактивным к амилоиду пептидом. В определенных вариантах осуществления конъюгаты пептид-Ig могут включать спейсерные последовательности аминокислот между N-концом пептида и лидерной последовательностью, необходимые для секреции пептида Ig клетками, экспрессирующими реагент. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой гибкий спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой жесткий спейсерный пептид. В некоторых вариантах осуществления спейсер не заряжен. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид может содержать или состоять из примерно от 3 до примерно 55 аминокислот. Спейсерные пептиды по настоящему изобретению могут содержать или состоять из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, или 55 аминокислот. Предпочтительно использовать

компьютеризированные методы сравнения для идентификации мотивов последовательности или предсказанных доменов конформации белка, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией. Например, две последовательности нуклеиновых кислот могут располагаться рядом друг с другом, как описано в данном документе, но все же включать промежуточную спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность, представленную в **таблице 9** ниже. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83-86.

Таблица 7. Иллюстративные спейсерные последовательности

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Короткий жесткий спейсер	VSPSV	SEQ ID NO: 83
Длинный жесткий спейсер	VSPSVVSPSV	SEQ ID NO: 84
Гибкий короткий спейсер	GGSGG	SEQ ID NO: 85
Гибкий длинный спейсер	GGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 86

[225] В некоторых вариантах осуществления один или более пептидов, представленных в **таблице 1**, могут быть связаны с гуманизированным антителом или его функциональным фрагментом через С- или N-конец белка легкой цепи или С- или N-конец тяжелой цепи, тем самым образуя слитый белок антитело-пептид, содержащий гуманизированное антитело. То есть любая из последовательностей, идентифицированных ниже в **таблице 1**, может быть связана с тяжелой или легкой цепью гуманизированного антитела или его функциональным фрагментом независимо или одновременно с образованием слитого белка антитело-пептид. Например, два реактивных к амилоиду пептида могут быть связаны с одним антителом, например, путем связывания аминокислотных последовательностей реактивного к амилоиду пептида с N-концом легкой цепи гуманизированного антитела или присоединения аминокислотных последовательностей реактивного к амилоиду пептида к С-концу легкой цепи гуманизированного антитела.

[226] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, дополнительно содержащую константную область легкой цепи (например, содержащую CL1), и тяжелую цепь, содержащую константную область тяжелой цепи (например, содержащую CH1, CH2 и CH3). В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи.

[227] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид

содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к С-концу, реактивный к амилоиду пептид и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от N-конца к С-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N- к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат в направлении от N-конца к С-концу реактивный к амилоиду пептид, спейсер, переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, и первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N- до С-конца VH, CH1, CH2 и CH3, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелой цепи образуют димер.

[228] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к С-концу легкую цепь и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от N-конца к С-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N- к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат в направлении от N-конца к С-концу переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи, спейсер и реактивный к амилоиду пептид, и первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N-конца до С-концу VH, CH1, CH2 и CH3, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелой цепи образуют димер.

[229] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к С-концу реактивный к амилоиду пептид, спейсерный пептид и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от N-конца к С-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N- к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат от N-конца к С-концу реактивный к амилоиду пептид, спейсер, VL и CL1, и первую и вторую тяжелые цепи,

которые содержат от N-конца к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелых цепей образуют димер.

[230] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к С-концу легкую цепь, спейсерный пептид, и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от N-конца к С-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N- к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат от N-конца к С-концу VL, CL1, спейсер и реактивный к амилоиду пептид, и первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N-конца к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелых цепей образуют димер.

[231] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит от N-конца к С-концу секреторный лидерный пептид, первый спейсерный пептид, реактивный к амилоиду пептид второй спейсерный пептид и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления первый спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления первый спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления второй спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от N-конца к С-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N- к С-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе.

[232] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит от N-конца к С-концу секреторный лидерный пептид, первый спейсерный пептид, легкую цепь, второй спейсерный пептид и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления первый спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления первый

спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления второй спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N-к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе.

[233] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к C-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N-конца к C-концу реактивный к амилоиду пептид, VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат от N-конца к C-концу VL и CL1, а также первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N-конца к C-концу реактивный к амилоиду пептид, VH, CH1, CH2 и CH3, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелых цепей образуют димер.

[234] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к C-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3 и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат от N-конца к C-концу VL и CL1, и первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3 и реактивный к амилоиду пептид, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелых цепей образуют димер.

[235] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к C-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N-конца к C-конца реактивный к амилоиду пептид, спейсерный пептид, VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В

некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат от N-конца к C-концу спейсер, VL и CL1, и первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N-конца к C-концу реактивный к амилоиду пептид, спейсер, VH, CH1, CH2 и CH3, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелых цепей образуют димер.

[236] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к C-концу VL и CL1. В некоторых вариантах осуществления VL представляет собой любую из описанных в данном документе VL. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3, спейсерный пептид и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления VH представляет собой любой из VH, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первую и вторую легкие цепи, которые содержат от N-конца к C-концу VL и CL1, и первую и вторую тяжелые цепи, которые содержат от N-конца до C-конца VH, CH1, CH2, CH3, спейсер и реактивный к амилоиду пептид, причем CH2 и CH3 первой и второй тяжелых цепей образуют димер.

[237] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к C-концу реактивный к амилоиду пептид, спейсерный пептид и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N- к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первый полипептид и второй

полипептид, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с N-концом легкой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, а также третий и четвертый полипептид, которые содержат тяжелую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем первый полипептид и второй полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87, а третий и четвертый полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет структуру, приведенную на **Фиг. 1**.

[238] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит тяжелую цепь, содержащую от N-конца к C-концу тяжелую цепь, спейсерный пептид, и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 88, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первый полипептид и второй полипептид, которые содержат легкую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, и третий и четвертый полипептиды, содержащие реактивный к амилоиду пептид, связанный с C-концом тяжелой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, где первый полипептид и второй полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88, а третий и четвертый полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет структуру, приведенную на **Фиг. 2**.

[239] В некоторых вариантах осуществления слитая молекула антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца к C-концу переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи, спейсер и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотные последовательности из SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89, и

тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первый полипептид и второй полипептид, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с С-концом легкой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, а также третий и четвертый полипептид, которые содержат тяжелую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем первый полипептид и второй полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89, а третий и четвертый полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет структуру, приведенную на **Фиг. 3**.

[240] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую от N-конца к С-концу легкую цепь, спейсерный пептид, и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO:86. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит первый полипептид и второй полипептид, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с С-концом легкой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, а также третий и четвертый полипептид, которые содержат тяжелую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем первый полипептид и второй полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90, а третий и четвертый полипептид содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет структуру, приведенную на **Фиг. 4**.

[241] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое связывается с амилоидными фибриллами, содержащее первый полипептид и второй полипептид, каждый из которых содержит легкую цепь антитела, а также третий и четвертый полипептиды, каждый из которых содержит тяжелую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид, который связан с N-концом или С-концом легкой цепи или тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй

полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-13. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, указанным в SEQ ID NO:2, через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

[242] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на

С-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления слитая молекула антитело-пептид содержит легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца к С-концу переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи, спейсер и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

[243] В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с одним или более амилоидогенными пептидами в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитыми белками антитело-пептид, содержат амилоидогенный белок переменного домена $\lambda 6$ ($V\lambda 6W1l$) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, амилоидоподобную фибриллу $A\beta(1-40)$ или амилоидогенный белок-предшественник $A\beta$, или сывороточный амилоидный белок А (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные со слитым белком антитело-пептид, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин ($A\beta_2M$), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гелозолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин ($A\alpha Syn$), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF) или IAAP, ALk4, AI11, другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные слитыми белками антитело-пептид, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания.

[244] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, специфически связываются с амилоидными фибриллами из легких цепей. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связывается с различными амилоидными фибриллами, такими как амилоидогенный белок переменного домена $\lambda 6$ ($V\lambda 6W1l$) или легкая цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, $A\beta(1-40)$ амилоидоподобная фибрилла или амилоидогенный белок-предшественник $A\beta$, или сывороточный амилоидный белок А (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные со слитым белком антитело-пептид, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин ($A\beta_2M$), варианты транстиретина (ATTR),

аполипопротеин AI (A_{po}AI), аполипопротеин AII (A_{po}AII), гельзолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена а (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин (ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин (A α Syn), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF) или IAAP, AL κ 4, AI λ 1, другие амилоидогенные пептиды. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связывается с гепарансульфат гликозаминогликанами.

[245] В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или фибриллы расположены в одном или более органах. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения расположены в одном или более типах тканей. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или фибриллы расположены в одной или более из печени, селезенки, сердца, почках, головного мозга, мышц, поджелудочной железы, желудка, верхнего отдела кишечника, нижнего отдела кишечника и крови. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид связываются с амилоидными отложениями или фибриллами, расположенными по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 типах органов или тканей. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид проявляют панамилоидную реактивность. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид проявляют реактивность в отношении амилоидных отложений или фибрилл, расположенных в печени, селезенки, сердца, почек, головного мозга, мышц, поджелудочной железы, желудка, верхнего отдела кишечника, нижнего отдела кишечника и/или крови.

[246] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый пептид антитела содержит легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца к C-концу переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи, спейсер и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах

осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид проявляет панамилоидную реактивность. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид проявляет реактивность в отношении амилоидных отложений или фибрилл, расположенных в печени, селезенки, сердца, почек, головного мозга, мышц, поджелудочной железы, желудка, верхнего отдела кишечника, нижнего отдела кишечника и/или крови.

[247] В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами с высокой аффинностью связывания. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, связываются с амилоидными субстратами с высокой аффинностью связывания. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания составляет менее 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40, нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания составляет менее 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания составляет менее 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания составляет менее 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания составляет менее 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания составляет от 0,05 до 100 нМ, от 0,1 до 50 нМ, от 0,2 до 25 нМ, от 0,3 до 10 нМ, от 0,4 до 5 нМ, от 0,5 до 2 нМ, от 0,6 до 1 нМ или от 0,2 до 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания одинакова или различна для разных амилоидных субстратов. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания одинакова или различна для человеческих амилоидных субстратов. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания одинакова или различна для синтетических амилоидных субстратов.

[248] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую

аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами с аффинностью связывания, описываемой аффинностью связывания EC50. В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в настоящем документе, связываются с амилоидными субстратами со аффинностью связывания, описываемой аффинностью связывания EC50. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет менее 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40, нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет менее 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет менее 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 одинакова или различна для разных амилоидных субстратов. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 одинакова или различна для человеческих амилоидных субстратов. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 одинакова или различна для синтетических амилоидных субстратов.

[249] Как понятно специалистам в данной области техники, антигенсвязывающий фрагмент (или область Fab) представляет собой головную часть антитела, которое естественным образом взаимодействует с антигеном-мишенью. Компоненты области Fab, например, позволяют антителам связываться со специфическими лигандами и посредством этого взаимодействия дополнительно активировать иммунную систему. Для изотипов антител IgG, IgA, IgD, IgE и IgM Ig состоит из двух белков, тяжелой цепи и легкой цепи, которые взаимодействуют попарно с образованием интактного Ig, состоящего из 2 тяжелых цепей и 2 легких цепей. Как тяжелая, так и легкая цепи далее подразделяются на переменные домены и константные домены - легкие и тяжелые переменные домены, включающие функциональную область Fab, и тяжелые цепи, образующие кристаллизующиеся фрагменты (Fc), которые взаимодействуют с клеточными рецепторами и комплементом. Области Fc Ig несут высококонсервативный сайт N-гликозилирования.

[250] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления один или более пептидов, приведенных в **таблице 1** ниже, могут быть связаны с антителом или его

функциональным фрагментом через С- или N-конец белка легкой цепи или С- или N-конец белка тяжелой цепи, тем самым образуя слитый белок антитело-пептид. То есть любая из последовательностей, идентифицированных ниже в **таблице 1**, может быть связана с тяжелой или легкой цепью антитела или его функциональным фрагментом независимо или одновременно с образованием конъюгата пептид-антитело. Например, два реактивных к амилоиду пептида могут быть связаны с одним антителом, например, путем присоединения аминокислотных последовательностей реактивного к амилоиду пептида к N-концу белков легкой цепи Ig.

[251] В некоторых примерах осуществления может применяться технология рекомбинантной ДНК, при которой нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид по изобретению, клонируется, сливается с легкой цепью Ig в вектор экспрессии, трансформируется или трансфицируется в подходящую клетку-хозяина и культивируется в условиях, которые подходят для экспрессии. Затем выделяют слитую молекулу пептид-легкая цепь Ig. Преимущественно, и как специалисты в данной области техники поймут, в связи с этим описанием, способы, описанные в данном документе, могут быть использованы для присоединения любой пептидной последовательности к антителу. То есть, хотя реактивные к амилоиду пептиды используются в качестве примера пептида, присоединенного к антителу, способ присоединения пептида к антителу, например, к N- и/или С-концу белка легкой цепи и/или N- и/или С-концу белка тяжелой цепи Ig, может использоваться для множества различных пептидов для соединения пептида и антител.

[252] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления несколько одинаковых или разных пептидов могут быть присоединены к одному антителу или его функциональному фрагменту. Например, первый вектор экспрессии может включать последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, интегрированную с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид А, причем последовательность нуклеиновой кислоты для пептида А расположена в векторе таким образом, что пептид А экспрессируется как присоединенный к N-концу белка легкой цепи. Кроме того, второй вектор экспрессии может включать последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, интегрированную с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид В, причем последовательность нуклеиновой кислоты для пептида В расположена в векторе таким образом, что пептид В экспрессируется как присоединенный к N-концу белка легкой цепи.

[253] В таких примерных вариантах осуществления, когда оба вектора экспрессии экспрессируются в одной и той же клетке, полученный белок Ig может иметь одну последовательность пептида А на N-конце каждой легкой цепи (всего два пептида А) и пептид В на конце N-конца тяжелой цепи. В определенных иллюстративных вариантах осуществления вектор может включать пептид С на С-конце, в результате чего образуется антитело, имеющее две последовательности пептида А (по одной на каждой легкой цепи), последовательность пептида В на N-конце тяжелой цепи, а последовательность пептида С присоединена к С-концу тяжелой цепи. Как таковые, и как будет понятно специалисту в

данной области техники на основе этого изобретения, векторы экспрессии могут быть адаптированы для модификации иммуноглобулина, чтобы иметь одинаковые или разные комбинации белков. В качестве конкретного примера применения реактивного к амилоиду пептида слитый белок антитело-пептид может включать две последовательности белков р5 (SEQ ID NO: 1), т.е. по одной на N-конце каждой легкой цепи. В других примерах вариантов осуществления пептиды, присоединенные к иммуноглобулину, могут иметь аффинность к лиганду и, следовательно, могут использоваться для обнаружения лиганда.

[254] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид, содержащий гуманизованное антитело по настоящему изобретению, содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид, содержащий гуманизованное антитело, способствует опосредованной Fc эффекторной функции антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид, содержащий гуманизованное антитело, способствует антителозависимому клеточному фагоцитозу.

[255] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с константой диссоциации (K_d), которая составляет менее около 100, 10, 1, 0,1, 0,01 мкМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d , которая составляет около 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75 или 100 мкМ, включая любое значение или диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d , которая составляет менее 500, 100, 10 или 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d , которая составляет менее около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 или 2200 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d , которая составляет около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 или 2200 нМ, включая любое значение или диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с человеческими амилоидными фибриллами с K_d , которая составляет около 40-50 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d , которая составляет 40-50 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d , которая составляет менее 50 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с K_d которая меньше, чем K_d для связывания c11-1F4 с человеческими амилоидными фибриллами.

[256] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с полумаксимальным связыванием при

концентрации антитела (EC_{50}), которая составляет менее около 0,01, 0,1 или 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с полумаксимальным связыванием при концентрации антитела (EC_{50}), которая составляет около 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 мкМ, включая любое значение или диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с человеческими амилоидными фибриллами с полумаксимальным связыванием при концентрации антитела (EC_{50}), которая составляет менее около 1, 10, 100 или 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с полумаксимальным связыванием при концентрации антитела (EC_{50}), которая составляет около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 100, 250, 500, 750 или 1000 нМ, включая любое значение или диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с полумаксимальным связыванием при концентрации антитела (EC_{50}), которая составляет около 17 нМ, 7 нМ, 16 нМ, 75 нМ или 95 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с человеческими амилоидными фибриллами с полумаксимальным связыванием при концентрации антитела (EC_{50}), которая составляет менее около 10 нМ, 20 нМ, 80 нМ, или 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидными фибриллами человека с полумаксимальным связыванием при концентрации антитела (EC_{50}), которая меньше, чем EC_{50} для связывания с11-1F4 с человеческими амилоидными фибриллами.

[257] Способы расчета констант диссоциации и EC_{50} известны в данной области техники и включают, например, поверхностный плазмонный резонанс и иммуносорбентные анализы с европием (EuLISA). В некоторых вариантах осуществления константу диссоциации определяют путем измерения связывания с мономерным пептидом Len(1-22), например, с использованием поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} определяют с помощью EuLISA. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} определяют с использованием EuLISA для измерения уровня связывания с фибриллами rV λ 6Wil, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом Ken ATTR, экстрактом печени SH1 AL λ или экстрактом печени TAL κ AL.

[258] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид конъюгируют с обнаруживаемой меткой. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из радионуклидов (например, I-¹²⁵, I-¹²³, I-¹²⁴, I-¹³¹, Zr-⁸⁹, Tc-^{99m}, Cu-⁶⁴, Br-⁷⁶, F-¹⁸); ферментов (пероксидазы хрена); биотина; флуорофоров и др. Любые средства, известные в данной области техники для обнаруживаемого мечения белка, могут быть использованы и/или адаптированы для использования с описанными в данном документе способами. Например, слитые белки антитело-пептид могут быть помечены радиоактивным изотопом или помечены флуоресцентной меткой или хемилюминесцентной меткой. Примеры радиоизотопов

включают, например, ^{18}F , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, and ^{123}I , и ^{125}I . Эти и другие радиоизотопы могут быть присоединены к слитому белку антитело-пептид с использованием хорошо известных химических процессов, которые, могут включать или не включать использование хелатирующих агентов, таких как ДТРА или DOTA, например, ковалентно связанных с белком легкой цепи слитый белок антитело-пептид. Примеры флуоресцентных или хемилюминесцентных меток включают флуоресцеин, Техасский красный, родамин, красители Alexa и люциферазу, которые могут быть конъюгированы со слитым белком антитело-пептид посредством реакции с боковыми цепями лизина, цистеина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. В одном иллюстративном варианте осуществления метку обнаруживают с помощью микропланшетного ридера для считывания флуоресценции или флуориметра с использованием длин волн возбуждения и эмиссии, соответствующих используемой метке. Радиоактивные метки можно обнаруживать, например, с помощью гамма- или сцинтилляционного счетчика в зависимости от типа радиоактивного излучения и с помощью окон для направленной передачи энергии, подходящих для точного обнаружения конкретного радионуклида. Однако для обнаружения метки можно также использовать любую другую подходящую методику обнаружения радиоизотопов. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой ^{125}I .

[259] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с фибриллами $\gamma\text{V}\lambda\text{6Wil}$, экстрактом Per125 wtATTR, экстрактом KEN hATTR, экстрактом печени SH1 AL λ и/или экстрактом печени TAL AL κ . В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, связываются с амилоидными отложениями или фибриллами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с одним или более амилоидогенными пептидами в амилоидах. В некоторых вариантах осуществления амилоиды, связанные слитым белком антитело-пептид, содержат амилоидогенный белок переменного домена λ6 ($\text{V}\lambda\text{6Wil}$) или легкую цепь (AL) амилоидогенного иммуноглобулина, амилоидоподобную фибриллу $\text{A}\beta(1-40)$ или амилоидогенный белок-предшественник $\text{A}\beta$, или сывороточный амилоидный белок A (AA). В других вариантах осуществления амилоиды, связанные со слитым белком антитело-пептид, включают амилоидогенные формы тяжелой цепи иммуноглобулина (AH), β_2 -микроглобулин ($\text{A}\beta_2\text{M}$), варианты транстиретина (ATTR), аполипопротеин AI (AApoAI), аполипопротеин AII (AApoAII), гельзолин (AGel), лизоцим (ALys), лейкоцитарный хемотаксический фактор (ALect2), варианты фибриногена a (AFib), варианты цистатина (ACys), кальцитонин ((ACal), лактадгерин (AMed), островковый амилоидный полипептид (AIAPP), пролактин (APro), инсулин (AIns), прионный белок (APrP), α -синуклеин (A α Syn), Тау (ATau), предсердный натрийуретический фактор (AANF) или IAAP, AL κ 4, AL λ 1, другие амилоидогенные пептиды. Амилоидогенные пептиды, связанные слитым белком антитело-пептид, могут представлять собой белок, фрагмент белка или домен белка. В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения или амилоидные фибриллы содержат

рекомбинантные амилоидогенные белки. В некоторых вариантах осуществления амилоиды являются частью патологии заболевания.

[260] В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка антитело-пептид с амилоидом человека способствует фагоцитозу человеческих амилоидных фибрилл. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид опсонизирует амилоидные фибриллы человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид опсонизирует фибриллы $\gamma\text{V}\lambda\text{6W}11$. В некоторых вариантах осуществления контакт амилоидных фибрилл человека со слитым белком антитело-пептид по настоящему изобретению в присутствии макрофагов способствует поглощению амилоидных фибрилл человека макрофагами. В некоторых вариантах осуществления контакт амилоидных фибрилл человека со слитым белком антитело-пептид по настоящему изобретению в присутствии макрофагов способствует опсонизации амилоидных фибрилл человека. В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка антитело-пептид с человеческим амилоидом способствует фагоцитозу человеческих амилоидных фибрилл в равной или большей степени, чем контрольное антитело (например, hIgG и/или c11-1F4). В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид способствует антителозависимому клеточному фагоцитозу.

[261] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует одно или более свойств *in vivo*, выбранных из улучшенного биораспределения, панामीлоидной реактивности и усиленного фагоцитоза по сравнению с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует улучшенное биораспределение по сравнению с эталонным антителом, при этом слитый белок антитело-пептид обнаруживается в органах по всему телу. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует улучшенное биораспределение, при этом слитый белок антитело-пептид обнаруживается в одном или более из печени, селезенки, сердца, почек, головного мозга, мышц, поджелудочной железы, желудка, верхнего отдела кишечника, нижнего отдела кишечника, и крови. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид проявляет панामीлоидную реактивность по сравнению с эталонным антителом, при этом слитый белок антитело-пептид является реактивным по отношению к одному или более различным амилоидным субстратам *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид является реактивным по отношению к амилоидным субстратам в печени, селезенке, сердце, почках, головном мозге, мышцах, поджелудочной железе, желудке, верхнем отделе кишечника, нижнем отделе кишечника и крови. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует усиленный фагоцитоз по сравнению с эталонным антителом, при этом приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид приводит к повышенным уровням фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид приводит к клиренсу амилоидного субстрата. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo*

со слитым белком антитело-пептид приводит к усилению фагоцитоза и клиренсу амилоидного субстрата. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид обеспечивает терапевтический эффект у индивида, имеющего связанное с амилоидом нарушение. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело не предназначено для связывания амилоидных субстратов. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело не содержит реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело не слито с реактивным к амилоиду пептидом. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело служит в качестве отрицательного контроля. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело относится к изотипу IgG1.

[262] В данном документе также предложены композиции, содержащие слитый белок антитело-пептид, содержащий реактивный к амилоиду пептид и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит слитый белок антитело-пептид, где по меньшей мере 80% слитого белка антитело-пептид является интактным. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит слитый белок антитело-пептид, где по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% слитого белка антитело-пептид является интактным. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид представляет собой белок, который не подвергался протеолитической деградации. В некоторых вариантах осуществляется интактный слитый белок антитело-пептид состоит из полноразмерного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид включает полноразмерную аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87-92. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

[263] В некоторых вариантах осуществления композиция имеет чистоту, которая определяется количеством интактного слитого белка антитело-пептид, присутствующего в композиции. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-

пептид представляет собой белок, который не подвергался протеолитической деградации. В некоторых вариантах осуществляется интактный слитый белок антитело-пептид состоит из полноразмерного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид включает полноразмерную аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87-92. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет чистоту по меньшей мере 80%. Например, композиция, имеющая чистоту 80%, содержит 80% интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет чистоту по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%. В некоторых вариантах осуществляется интактный слитый белок антитело-пептид состоит из полноразмерного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87-92.

[264] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит слитый белок антитело-пептид, содержащий реактивный к амилоиду пептид и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера.

[265] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца к C-концу вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи, спейсер и реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на C-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит антитело, связанное с реактивным к амилоиду пептидом, причем в антителе или реактивном к амилоиду пептиде отсутствует один или более остатков на N- или C-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца к C-концу реактивный к амилоиду пептид, спейсер, вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит

реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на N-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления.

[266] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 87-90. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, содержащую реактивный к амилоиду пептид, в котором отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:87. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 87-90. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, содержащую реактивный к амилоиду пептид, в котором отсутствует один или более аминокислотных остатков на C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 89-90. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 91-92. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 91-92. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь или тяжелую цепь, которая содержат реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления.

[267] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:89. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более

аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:89. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на С-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит антитело, слитое с реактивным к амилоиду пептидом, где реактивный к амилоиду пептид укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления в продукте расщепления отсутствуют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 аминокислот на N- или С-конце по сравнению с интактным слитым белком. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления.

[268] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:87. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на N-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:87. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления.

[269] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более

аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:92. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на С-конце. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления.

[270] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:90. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:90. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит реактивный к амилоиду пептид, лишенный одного или более аминокислотных остатков на С-конце. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления.

[271] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит слитый белок антитело-пептид, причем слитый белок антитело-пептид проявляет аффинность связывания EC50 с одним или более амилоидными субстратами. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет менее 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет около или менее 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет около или менее 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 составляет около или менее 1,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 одинакова или различна для разных амилоидных субстратов. В некоторых

вариантах осуществления аффинность связывания EC50 одинакова или различна для человеческих амилоидных субстратов. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания EC50 одинакова или различна для синтетических амилоидных субстратов.

[272] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит слитый белок антитело-пептид, причем слитый белок антитело-пептид проявляет одну или более характеристик *in vivo*, выбранных из улучшенного биораспределения, панамилоидной реактивности и усиленного фагоцитоза по сравнению с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует улучшенное биораспределение по сравнению с эталонным антителом, при этом слитый белок антитело-пептид обнаруживается в органах по всему телу. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует улучшенное биораспределение, при этом слитый белок антитело-пептид обнаруживается в одном или более из печени, селезенки, сердца, почек, головного мозга, мышц, поджелудочной железы, желудка, верхнего отдела кишечника, нижнего отдела кишечника, и крови. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид проявляет панамилоидную реактивность по сравнению с эталонным антителом, при этом слитый белок антитело-пептид является реактивным по отношению к одному или более различным амилоидным субстратам *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид является реактивным по отношению к амилоидным субстратам в печени, селезенке, сердце, почках, головном мозге, мышцах, поджелудочной железе, желудке, верхнем отделе кишечника, нижнем отделе кишечника и крови. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид демонстрирует усиленный фагоцитоз по сравнению с эталонным антителом, при этом приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид приводит к повышенным уровням фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид приводит к клиренсу амилоидного субстрата. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид приводит к усилению фагоцитоза и клиренсу амилоидного субстрата. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт амилоидного субстрата *in vivo* со слитым белком антитело-пептид обеспечивает терапевтический эффект у индивида, имеющего связанное с амилоидом нарушение. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело не связывает амилоидные субстраты. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело не содержит реактивный к амилоиду пептид. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело относится к изотипу IgG1.

[273] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал или

их комбинацию.

[274] В различных вариантах осуществления композиции согласно изобретению могут быть составлены для доставки любым путем введения. Это может включать, например, аэрозольный, интраназальный, пероральный, трансмукозальный, трансдермальный, парентеральный или энтеральный. В некоторых вариантах осуществления введение является внутривенным или подкожным.

[275] Предложены фармацевтические составы, включающие слитый белок антитело-пептид. Фармацевтические композиции и составы обычно включают один или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

[276] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться данный состав.

[277] «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

[278] Буферные агенты в некоторых аспектах включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или его смеси, как правило, присутствуют в количестве от около 0,001% до около 4% от массы всей композиции. Известны способы приготовления фармацевтических композиций, пригодных для введения. Иллюстративные способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[279] В данном документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие любой из слитых белков антитело-пептид, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[280] В некоторых примерах осуществления слитый белок антитело-пептид могут быть получены путем выделения или очистки. Методы очистки белков включают, на одном уровне, гомогенизацию и грубое фракционирование клеток, тканей или органов на пептидные и непептидные фракции. Другие методы очистки белков включают, например, осаждение сульфатом аммония, полиэтиленгликолем (ПЭГ), антителами и т.п. или денатурацию нагреванием с последующим: центрифугированием; стадиями хроматографии, такие как ионный обмен, гель-фильтрация, обращенно-фазовая, гидроксипатитная и аффинная хроматография; изоэлектрическая фокусировка; гель-электрофорез, например,

электрофорез в полиакриламидном геле; и комбинации этих и других способов.

[281] Различные хроматографические методы включают, но не ограничиваются ими, ионообменную хроматографию, гель-эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, иммуноаффинную хроматографию и обращенно-фазовую хроматографию. Особенно эффективным методом очистки пептидов является жидкостная хроматография быстрого разрешения (FPLC) или даже высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC). В некоторых примерах осуществления домен Fc может быть присоединен к реактивному к амилоиду пептиду посредством линкерной последовательности GGGYS (SEQ ID NO:27).

Способы диагностики и обнаружения

[282] В данном документе также предложены способы обнаружения амилоидных отложений у субъекта.

[283] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ идентификации амилоидных отложений у субъекта, включающий введение субъекту любого из слитых белков антитело-пептид, описанных в данном документе, причем слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и обнаружение сигнал от слитого белка антитела и пептида. Можно использовать любой из описанных в данном документе слитых белков антитело-пептид, меченных обнаруживаемыми метками. В некоторых вариантах осуществления установлено, что у субъекта отсутствуют амилоидные отложения или он страдает моноклональной гаммапатией неясного значения (MGUS), множественной миеломой (MM) или одним или более родственными плазмоклеточными заболеваниями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

[284] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ обнаружения лиганда, включающий: приведение лиганда в контакт с любым из слитых белков антитело-пептид, описанных в данном документе, причем слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, при этом слитый белок антитело-пептид обладает аффинностью связывания с лигандом и, определяя сигнал от обнаруживаемой метки, тем самым обнаруживает лиганд. Можно использовать любой из описанных в данном документе слитых белков антитело-пептид, меченных обнаруживаемыми метками.

[285] В некоторых вариантах осуществления слитые белки антитело-пептид могут быть помечены различными агентами, чтобы обеспечить их обнаружение *in vivo* и в анализах *in vitro*, например, после очистки слитых пептидов. Без ограничения это может включать радионуклиды (например, I-¹²⁵, I-¹²³, I-¹³¹, Zr-⁸⁹, Tc-^{99m}, Cu-⁶⁴, Br-⁷⁶, F-¹⁸); ферменты (пероксидазу хрена); биотин; флуорофоры и др. Любые средства, известные в данной области техники для обнаруживаемого мечения белка, могут быть использованы и/или адаптированы для использования с описанными в данном документе способами. Например, антитела или их фрагменты и/или реактивные к амилоиду пептиды могут быть помечены радиоактивным изотопом или помечены флуоресцентной меткой или хемилюминесцентной меткой. Примеры радиоизотопов включают, например, ¹⁸F, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, и ¹²³I, и ¹²⁵I. Эти и другие радиоизотопы могут быть присоединены к выделенной легкой цепи иммуноглобулина с использованием хорошо известных химических процессов, которые могут включать или не включать использование хелатирующего агента, такого как DTPA или DOTA, например, ковалентно связанного с белком легкой цепи антитела. Примеры флуоресцентных или хемилюминесцентных меток включают флуоресцеин, Техасский красный, родамин, красители Alexa и люциферазу, которые могут быть конъюгированы с белком путем реакции с боковыми цепями лизина, цистеина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. В одном иллюстративном варианте осуществления метку обнаруживают с помощью флуоресцентного микропланшетного ридера или флуориметра с использованием длин волн возбуждения и эмиссии, соответствующих используемой метке. Радиоактивные метки можно обнаруживать, например, с помощью гамма- или сцинтилляционного счетчика в зависимости от типа радиоактивного излучения и с помощью окон для направленной передачи энергии, подходящих для точного обнаружения конкретного радионуклида. Однако для обнаружения метки можно также использовать любую другую подходящую методику обнаружения радиоизотопов.

[286] В отношении амилоидоза такое мечение, например, можно использовать для диагностики наличия амилоида, для определения нагрузки амилоидным белком, для мониторинга способности слитых белков антитело-пептид связывать амилоид у

конкретного субъекта, для мониторинга прогрессирования амилоидоза и/или для наблюдения ответа субъекта на лечение амилоидоза (включая лечение, связанное с введением субъекту слитых белков антитело-пептид). Например, слитые белки антитело-пептид, метят обнаруживаемой меткой, как описано в данном документе, а затем вводят субъекту, который имеет или предположительно имеет связанное с амилоидом заболевание (например, амилоидоз, моноклональную гаммапатию неясного генеза значения (MGUS), множественную миелому (ММ) или родственные плазмоклеточные заболевания). После этого субъект может быть визуализирован, например, для обнаружения присутствия обнаружимо меченых слитых белков антитело-пептид.

[287] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления сигналы от обнаружимо меченых слитых белков антитело-пептид могут быть количественно оценены, тем самым обеспечивая показатель уровня амилоидного отложения у субъекта. Например, интенсивность сигнала можно сравнить со стандартным порогом сигнала, выше которого амилоидоз присутствует, но ниже которого амилоидоз отсутствует или находится на низком уровне. У субъекта может быть диагностировано наличие амилоида, и в этом случае может быть назначено лечение, такое как химиотерапия, кортикостероидные препараты (леналидомид или талидомид) и/или бортезомиб (Velcade). Дополнительно или альтернативно, слитые белки антитело-пептид, описанные в данном документе, можно вводить субъекту с целью лечения субъекта, как описано в данном документе. В определенных примерах осуществления субъект может быть разделен на одну или более групп, таких как низкая амилоидная нагрузка, средняя амилоидная нагрузка или высокая амилоидная нагрузка, а затем лечиться соответствующим образом. Для мониторинга прогресса лечения субъекту могут быть повторно введены обнаружимо меченые слитые белки антитело-пептид и, следовательно, повторно оценены на их амилоидную нагрузку.

Способы лечения

[288] В данном документе также представлены способы лечения субъекта, страдающего связанным с амилоидом нарушением, включающие введение субъекту эффективного количества слитого белка антитело-пептид по настоящему изобретению.

[289] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения амилоидного заболевания (например, амилоидоза), включающий введение терапевтически эффективного количества любого из слитых белков антитело-пептид, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

[290] В других вариантах осуществления амилоидоз представляет собой системный амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления амилоидоз представляет собой семейный амилоидоз. В других вариантах осуществления амилоидоз представляет собой спорадический амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления амилоидоз или связанное с амилоидом нарушение представляет собой АА-амилоидоз, АL-амилоидоз, АН-амилоидоз, А β -амилоидоз, АТТR-амилоидоз, hАТТR-амилоидоз, ALect2-амилоидоз и IAPP-амилоидоз диабета II типа, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в мозг с амилоидозом голландского типа, церебральную бета-амилоидную

ангиопатию, губчатую энцефалопатию, опухоли щитовидной железы, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Льюиса, таупатию, болезнь Гентингтона, старческий системный амилоидоз, семейный амилоидоз, старческое системное старение, старческое поражение гипофиза, ятрогенный синдром, губчатые энцефалопатии, реактивное хроническое воспаление, опухоли щитовидной железы, миелому или другие формы злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления связанное с амилоидом нарушение, выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретинового, AA-, AApoAI-, AApoAII-, AApoAIV-, AApoCII-, AApoCII-, AGel-, ALys-, ALEct2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-, ASPC-, AGal7-, ACor-, AKer-, ALac-, AOAPP-, ASem1-, AEnf-, или A β - амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления лечение слитым белком антитело-пептид приводит к клиренсу амилоида. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидами, связанными с нормальным старением. В других вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид применяют для диагностики, лечения или прогнозирования амилоидоза или связанного с амилоидом заболевания у субъекта.

[291] В некоторых вариантах осуществления связанное с амилоидом заболевание представляет собой локализованный амилоидоз.

[292] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид вводят посредством внутрикожного, подкожного, внутримышечного, внутрисердечного, внутрисосудистого, внутривенного, интраокулярного, внутриартериального, эпидурального, интраспинального, экстракорпорального, интратекального, внутрибрюшинного, внутриплеврального, внутрипросветного, интравитреального, интракавернозного, внутрижелудочкового, внутрикостного, внутрисуставного, внутриклеточного или легочного пути.

[293] В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид вводят в достаточных количествах, чтобы индуцировать фагоцитоз амилоида клетками иммунной системы (например, макрофагами).

[294] В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, такое как примат, крупный рогатый скот, грызун или свинья. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[295] Также в данном документе предложены способы нацеливания на амилоидные отложения для клиренса. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение в контакт амилоидного отложения со слитым белком антитело-пептид по настоящему изобретению.

[296] В некоторых вариантах осуществления амилоидные отложения могут способствовать патологии заболевания. В других вариантах осуществления амилоидные отложения могут указывать на амилоидоз или связанное с амилоидом нарушение у субъекта. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид связывается с амилоидами у субъекта с амилоидозом. В некоторых вариантах осуществления амилоидоз локализован в определенной ткани или системе органов, таких

как печень, сердце или центральная нервная система.

[297] В некоторых вариантах осуществления амилоидное отложение удаляют. В некоторых вариантах осуществления амилоидное отложение подвергают клиренсу. В некоторых вариантах осуществления отложения амилоида опсонизированы слитым белком антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка антитело-пептид с человеческими амилоидными фибриллами способствует фагоцитозу человеческих амилоидных фибрилл и удалению амилоидных отложений. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид опсонизирует человеческие амилоидные фибриллы, тем самым удаляя амилоидное отложение. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид опсонизирует фибриллы rVλ6Wil. В некоторых вариантах осуществления связывание слитого белка антитело-пептид с человеческими амилоидными фибриллами способствует фагоцитозу и/или опсонизации человеческих амилоидных фибрилл в равной или большей степени, чем контрольное антитело (например, mIgp5 и/или c11-1F4).

[298] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения связанного с амилоидом нарушения, включающий введение слитого белка антитело-пептид, конъюгированного с обнаруживаемой меткой, обнаружение метки и введение субъекту средства для лечения амилоидоза, если сигнал обнаружен. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивную метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой метку I¹²⁵, Tc⁹⁹. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой флуоресцентную метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой ферментативную метку. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу. Метки дополнительно включают химические фрагменты, такие как биотин, которые могут быть обнаружены посредством связывания со специфическим родственным обнаруживаемым фрагментом, например, меченым авидином. В некоторых вариантах осуществления амилоидное отложение идентифицируют в печени, селезенке или крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления лечение амилоидоза включает слитый белок антитело-пептид, представленный в данном документе.

[299] В данном документе также предложен способ выявления амилоидных отложений у субъекта, включающий введение слитого белка антитело-пептид, причем слитый белок антитело-пептид конъюгирован с обнаруживаемой меткой. В некоторых вариантах осуществления способ включает обнаружение сигнала от слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивную метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой метку I¹²⁵, Tc⁹⁹. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой флуоресцентную метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой ферментативную метку. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой

пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу. Метки дополнительно включают химические фрагменты, такие как биотин, которые могут быть обнаружены посредством связывания со специфическим родственным обнаруживаемым фрагментом, например, меченным авидином. В некоторых вариантах осуществления амилоидное отложение идентифицируют в печени, селезенке или крови субъекта.

[300] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ обнаружения лиганда, включающий приведение лиганда в контакт со слитым антителом и пептидом, конъюгированным с обнаруживаемой меткой, и определение сигнала от обнаруживаемой метки. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивную метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой метку I^{125} , Tc^{99} . В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой флуоресцентную метку. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка представляет собой ферментативную метку. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу. Метки дополнительно включают химические фрагменты, такие как биотин, которые могут быть обнаружены посредством связывания со специфическим родственным обнаруживаемым фрагментом, например, меченным авидином. В некоторых вариантах осуществления обнаружение проводится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления обнаружение проводится *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы получения слитых белков пептид-антитело

[301] В данном документе также представлена нуклеиновая кислота(-ы), кодирующая слитый белок антитело-пептид по настоящему изобретению. Слитый белок антитело-пептид может быть любым слитым белком антитело-пептид, описанным в данном документе.

[302] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, представленная в данном документе, находится в одном или более векторах. Например, в некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен вектор, содержащий тяжелую цепь и легкую цепь антитела, причем легкая цепь присоединена к пептиду. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь и легкая цепь, присоединенные к пептиду, находятся в разных векторах.

[303] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую слитый белок антитело-пептид по настоящему изобретению.

[304] Для продукции антител тяжелая цепь и легкая цепь, присоединенные к векторам экспрессии пептида, могут быть введены в соответствующие продуцирующие линии клеток, известные в данной области техники. Введение векторов экспрессии может быть осуществлено котрансфекцией посредством электропорации или любой другой подходящей технологии трансформации, доступной в данной области техники. Затем можно отобрать и размножить линии клеток, продуцирующие антитела, и очистить антитела. Затем очищенные антитела можно анализировать стандартными методами,

такими как ДСН-ПААГ-электрофорез.

[305] Также предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из слитых белков антитело-пептид, описанных в данном документе. Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе. Например, слитый белок антитело-пептид может продуцироваться бактериями, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., *например*, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело, присоединенное к пептиду, может быть выделено из биомассы бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

[306] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую слитый белок антитело-пептид по настоящему изобретению.

[307] Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии гликозилированного антитела, также можно получать из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

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

[309] В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных почечек человека (клетки 293 или 293, как описано, *например*, в Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK); мышинные почки Сертолли (клетки TM4, описанные, *например*, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, *например*, в Mather *et al.*, *Annals N Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216

(1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Способы очистки

[310] В данном документе также предложены способы получения слитого белка антитело-пептид по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок антитело-пептид, и выделение слитого белка антитело-пептид.

[311] В некоторых вариантах осуществления способ получения слитого белка антитело-пептид включает i) культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий слитый белок антитело-пептид, в условиях перфузионного культивирования клеток, подходящих для экспрессии слитого белка антитело-пептид; и ii) выделение слитого белка антитело-пептид примерно каждые 12-36 часов. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце легкой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

[312] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина с использованием способа периодического культивирования с подпиткой. Периодическое культивирование с подпиткой относится к способу культивирования клеток, при котором культура клеток дополняется свежей средой, т.е. клетки «подпитываются» новой средой, в то время как отработанную среду не удаляют. Как правило, процесс культивирования с «подпиткой» проводят в биореакторе, и дополнительные компоненты (например, пищевые добавки) добавляют к культуре через некоторое время после начала процесса культивирования. Контролируемое добавление питательных веществ напрямую влияет на скорость роста культуры и позволяет избежать накопления метаболитов (см., например, Wlaschin, K. F. et al., "Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding," *Cell Culture Engineering*, 101:43-74 (2006) and Lee, J. et al., "Control of fed-batch fermentations," *Biotechnol. Adv.*, 17:29-48 (1999)). Периодическое культивирование с

подпиткой, как правило, прекращают в какой-то момент, а клетки и/или компоненты среды собирают и, при необходимости, очищают.

[313] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина с использованием способа перфузионного культивирования. Перфузионное культивирование относится к способу культивирования клеток, при котором в культуру вводят дополнительную свежую среду, а отработанную среду удаляют из культуры. Перфузионное культивирование начинается после посева культуры и может проводиться как непрерывно, так и периодически, по необходимости, в течение определенного периода времени. Свежая среда, добавляемая во время перфузии, как правило, обеспечивает питательные добавки для клеток, истощенных в процессе культивирования. Перфузионное культивирование также позволяет удалить из клеточной культуры продукты обмена веществ клеток и токсичные побочные продукты. Перфузионное культивирование проводят во время фазы роста клеток, но ее также можно продолжать после того, как клетки были перенесены в периодическую культуру клеток с подпиткой.

[314] В некоторых вариантах осуществления способ получения слитого белка антитело-пептид включает культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий слитый белок антитело-пептид, в условиях перфузионного культивирования клеток, подходящих для экспрессии слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение способа периодического культивирования с подпиткой для продукции слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение способа перфузионного культивирования для продукции слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце легкой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

[315] В некоторых вариантах осуществления способ получения слитого белка антитело-пептид дополнительно включает способ непрерывного культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в условиях перфузионной культуры. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение слитого белка антитело-пептид примерно каждые 12-36 часов. В некоторых

вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждые 12-24 часа, при этом слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждые 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждые 24-36 часа, при этом слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждые 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 часа. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид извлекается примерно каждые 12-16 часов, 14-18 часов, 16-20 часов, 16-24 часа, 20-32 часа, 18-36 часов, 24-32 часа или 16-28 часов. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяется не более чем через 12, 16, 20, 24, 28, 32 или 36 часов. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждый день. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяют примерно каждые 1-4 дня, 2-5 дней, 3-6 дней, 1-5 дней, 3-7 дней или 1-7 дней. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид выделяют не более чем через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит реактивный к амилоиду пептид и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце легкой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

[316] В некоторых вариантах осуществления способ получения слитого белка антитело-пептид дополнительно включает нанесение слитого белка антитело-пептид, полученного на стадии выделения, на колонку для катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления колонку для катионообменной хроматографии используют для выделения интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления колонку для катионообменной хроматографии используют для отделения укороченного слитого белка антитело-пептид от интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления выделенная слитую молекулу антитело-пептид наносят на колонку для катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления колонку для катионообменной хроматографии промывают одним или более буферами, содержащими растворенную соль. В некоторых вариантах осуществления колонку для катионообменной хроматографии промывают буфером с

низким содержанием соли. В некоторых вариантах осуществления колонку для катионообменной хроматографии промывают буфером с высоким содержанием соли. В некоторых вариантах осуществления колонку для катионообменной хроматографии сначала промывают буфером с низким содержанием соли, а затем наносят буфер для элюирования с высоким содержанием соли. В некоторых вариантах осуществления буфер с низким содержанием соли элюирует укороченный слитый белок антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления буфер с высоким содержанием соли элюирует интактный слитый белок антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления способ включает нанесение слитого белка антитело-пептид на колонку для катионообменной хроматографии, затем промывание колонки первым буфером, содержащим низкие концентрации соли, затем элюирование интактного слитого белка антитело-пептид вторым буфером, имеющим высокую концентрацию соли. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид элюируют отдельно от укороченного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к обогащению интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к удалению укороченного слитого белка антитело-пептид из выделенного интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ включает нанесение слитого белка антитело-пептид на колонку для катионообменной хроматографии, затем промывание колонки первым буфером, содержащим низкие концентрации соли, а затем нанесение второго буфера, содержащего высокие концентрации соли, что приводит к выделению интактного слитого белка антитело-пептид.

[317] В некоторых вариантах осуществления способ включает нанесение слитого белка антитело-пептид на колонку для катионообменной хроматографии, затем промывку колонки первым буфером, содержащим низкие концентрации соли, а затем промывание вторым буфером, содержащим высокие концентрации соли, что приводит к выделению интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления промывание колонки первым буфером, содержащим низкие концентрации соли, элюирует усеченный слитый белок антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления первый буфер с низкой концентрацией соли имеет концентрацию соли не выше 200 мМ, 210 мМ, 220 мМ, 230 мМ, 240 мМ, 250 мМ, 260 мМ, 270 мМ, 280 мМ, 290 мМ, или 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления первый буфер с низкой концентрацией соли имеет концентрацию соли 200-300 мМ, 210-280 мМ, 220-260 мМ, 210-290 мМ, 240-270 мМ или 230-260 мМ. В некоторых вариантах осуществления первый буфер с низкой концентрацией соли имеет концентрацию соли, которая составляет около 220 мМ, 240 мМ, 260 мМ или 280 мМ или любой диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах первый буфер содержит концентрацию соли от около 200 мМ до около 300 мМ или от около 220 мМ до около 280 мМ. В некоторых вариантах осуществления первый буфер с низкой концентрацией соли имеет концентрацию

соли около 260 мМ. В некоторых вариантах осуществления промывка колонки вторым буфером с высокими концентрациями соли после промывки колонки первым буфером с низкой концентрацией соли элюирует интактный слитый белок антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления второй буфер с высокой концентрацией соли имеет концентрацию соли не менее 350 мМ, 360 мМ, 370 мМ, 380 мМ, 390 мМ, 400 мМ, 410 мМ, 420 мМ, 430 мМ, 440 мМ или 450 мМ. В некоторых вариантах осуществления второй буфер с высокой концентрацией соли имеет концентрацию соли 350-450 мМ, 360-430 мМ, 370-410 мМ, 360-440 мМ, 390-420 мМ или 380-410 мМ или в любом диапазоне между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления второй буфер имеет концентрацию соли 350-450 мМ или 380-420 мМ. В некоторых вариантах осуществления первый буфер с низкой концентрацией соли имеет концентрацию соли около 380 мМ, 400 мМ, 420 мМ или 440 мМ. В некоторых вариантах осуществления первый буфер с низкой концентрацией соли имеет концентрацию соли около 400 мМ. В некоторых вариантах осуществления рН первого и второго буферов составляет 4,5- 6,5, 4,7-6,3, 5,1-5,7, 4,7-6,1, 5,5-5,9 или 5,3-5,7. В некоторых вариантах осуществления рН первого и второго буферов составляет около 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0. В некоторых вариантах осуществления рН первого и второго буферов составляет около 5,5. В некоторых вариантах осуществления рН первого и второго буферов одинаковы. В некоторых вариантах осуществления рН первого и второго буферов различны.

[318] В некоторых вариантах осуществления способ получения включает нанесение слитого белка антитело-пептид на колонку для катионообменной хроматографии, затем промывание колонки первым буфером с низкими концентрациями соли, а затем элюирование вторым буфером с высокими концентрациями соли, что приводит к выделению интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ включает нанесение слитого белка антитело-пептид на колонку для катионообменной хроматографии с плотностью загрузки, причем плотность загрузки определяется как граммы слитого белка антитело-пептид на литр смолы (г/л). В некоторых вариантах осуществления плотность загрузки составляет не более 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 55 г/л, или любой диапазон между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления плотность загрузки составляет по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 г/л. В некоторых вариантах осуществления плотность загрузки составляет 15-55, 20-45, 25-50, 20-35, 30-40, 35-50 или 20-50 г/л. В некоторых вариантах осуществления плотность загрузки составляет 50 г/л.

[319] В некоторых вариантах осуществления способ получения слитого белка антитело-пептид включает культивирование клетки-хозяина, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку СНО. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, кодирующий слитый белок антитело-пептид, включая любой из слитых белков антитело-пептид, описанных в данном документе.

[320] В некоторых вариантах осуществления способ получения слитого белка антитело-пептид дополнительно включает определение чистоты слитого белка антитело-пептид. Например, капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН) представляет собой аналитический метод, используемый для оценки чистоты белков, включая количественный анализ моноклональных антител. Образцы антител смешивают со сменным буфером для ДСН-содержащего геля, а затем подвергают электрофорезу через капилляр, заполненный ДСН-содержащим гелем. Образцы вводятся во входные отверстия капилляра с помощью высокого напряжения. Миграция белка через разделительную матрицу происходит в анодном направлении, а количественное обнаружение происходит вблизи дистального конца капилляра с использованием системы обнаружения УФ-поглощения. В некоторых вариантах осуществления чистоту слитого белка антитело-пептид определяют с использованием одного или более аналитических методов, включающих капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН), жидкостную хроматографию (ЖХ), масс-спектрометрию (МС) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления чистоту слитого белка антитело-пептид определяют с помощью капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН).

[321] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение чистоты, при этом слитый белок антитело-пептид очищают до по меньшей мере 80% интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет чистоту, которая определяется количеством присутствующего интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид состоит из слитого полноразмерного антитела-пептида. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет чистоту по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет чистоту по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 99,5%. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет чистоту 80-100%, 82-96%, 85-90%, 84-92%, 80-88%, 90-98%, или 95-100%. В некоторых вариантах осуществления чистота слитого белка антитело-пептид положительно коррелирует со связыванием амилоидного субстрата.

[322] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение чистоты, при этом слитый белок антитело-пептид очищают до по меньшей мере 80% интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид имеет чистоту, которая определяется количеством присутствующего интактного слитого белка антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления интактный слитый белок антитело-пептид состоит из слитого полноразмерного антитела-пептида. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит не более 20% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит легкую цепь, включающую легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце. В

некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит тяжелую цепь, содержащую тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или C-конце. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит не более 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% продукта расщепления. В некоторых вариантах осуществления слитый белок антитело-пептид содержит 20-0%, 15-2%, 12-4%, 15-8%, 10-1%, 5-2% или 2-0% продукта расщепления.

Наборы

[323] В настоящем изобретении также предложены наборы, содержащие слитый белок антитело-пептид по настоящему изобретению. Наборы по настоящему изобретению могут включать один или более контейнеров, содержащих очищенный слитый белок антитело-пептид. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно включают инструкции по применению в соответствии со способами по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления эти инструкции содержат описание введения слитого белка антитело-пептид, как описано в данном документе, для лечения амилоидной дистрофии в соответствии с любыми способами по данному изобретению.

[324] В некоторых вариантах осуществления инструкции содержат описание того, как обнаруживать амилоидного отложения, например, у субъекта, в образце ткани или в клетке. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивида, подходящего для лечения, на основе определения наличия у этого индивида амилоидной дистрофии, как описано в данном документе.

[325] На этикетке или на листке-вкладыше указано, что композиция используется для лечения, например, заболевания по настоящему изобретению. Могут быть предложены инструкции по применению любого из описанных в данном документе способов.

ПРИМЕРЫ

[326] Следующие примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но их не следует рассматривать как ограничивающие каким-либо образом его объем. В свете настоящего описания и общего уровня квалификации в данной области техники специалисты поймут, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации и что могут быть использованы многочисленные изменения, модификации и изменения, которые не выходят за рамки объема раскрываемого в настоящий момент объекта изобретения. Прилагаемые графические материалы следует рассматривать как неотъемлемую часть раскрытия и описания изобретения.

Пример 1. Разработка слитых белков антитело-пептид

[327] В следующем примере описывается создание иллюстративных конструкций слитого белка реактивный к амилоиду пептид-антитело. Структуры иллюстративных конструкций представлены на **Фиг. 1-4**. Аминокислотные последовательности конструкций представлены в **таблице E1** и **таблице E2** ниже. В **таблицах E1-E2**, аминокислотная последовательность реактивного к амилоиду пептида p5R показана жирным шрифтом, а спейсерные последовательности подчеркнуты и выделены курсивом.

Таблица E1. Последовательности легкой цепи слитого белка антитело-пептид

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Фигура с иллюстративной структурой
VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с N-концом легкой цепи через короткий жесткий спейсер (VSPSV).	APGGGRAQRAQARQARQAQRAQR AQARQARQ <u>VSPSV</u> DVVMTQSPLSLP VTLGQPASISCRSSQSLVHRSGNTYLH WFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY FCFQTTYVPNTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	87	Фиг. 1
VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с C-концом тяжелой цепи через короткий жесткий спейсер (VSPSV).	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQ SLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	88	Фиг. 2
VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с C-концом легкой цепи через короткий жесткий спейсер (VSPSV).	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQ SLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC <u>VSPSV</u> RAQRAQARQ ARQAQRAQRAQARQARQ	89	Фиг. 3
VH9-D54E/VL4-N33S.	DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQ SLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLI	90	Фиг. 4

<p>p5R, слитый с C-концом легкой цепи через длинный спейсер (GGGGSGGGGS).</p>	<p>YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC<u>GGGGSGGGGS</u>RAQR AQARQARQAQRAQRAQARQARQ</p>		
---	---	--	--

Таблица E2. Последовательности тяжелой цепи слитого белка антитело-пептид

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Фигура с иллюстративной структурой
<p>VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с N-концом легкой цепи через короткий жесткий спейсер (VSPSV).</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG FSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIW GEGSTNYHPNLMSRVTISVDTSKSQV LFLKSSVTAADTAVYYCATLDYWGQ GTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK</p>	91	Фиг. 1
<p>VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с C-концом тяжелой цепи через</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG FSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIW GEGSTNYHPNLMSRVTISVDTSKSQV LFLKSSVTAADTAVYYCATLDYWGQ GTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</p>	92	Фиг. 2

короткий жесткий спейсер (VSPSV).	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK <u>VSPSV</u> RAQRAQARQARQAQR AQRAQARQARQ		
VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с C-концом легкой цепи через короткий жесткий спейсер (VSPSV).	<i>См. аминокислотную последовательность выше.</i>	91	Фиг. 3
VH9-D54E/VL4-N33S. p5R, слитый с C-концом легкой цепи через длинный спейсер (GGGGSGGGGS).	<i>См. аминокислотную последовательность выше.</i>	91	Фиг. 4

Пример 2. Аффинность связывания гуманизированных антител к амилоиду с мономерным пептидом Len(1-22)

[328] Аффинность связывания гуманизированных антител к амилоиду определяли, например, как описано в международной заявке № PCT/US2020/060596. В таблице ЕЗ ниже представлены результаты анализов поверхностного плазмонного резонанса (ППР), измеряющих связывание гуманизированных антител к амилоиду с мономерным пептидом Len(1-22). В частности, гуманизированные последовательности VH9 и VL4 тестировали с дополнительными аминокислотными заменами или без них, как указано в столбце

«Лиганд» таблицы ЕЗ.

Таблица ЕЗ. Иллюстративный анализ связывания гуманизированных антител с мономерным пептидом Len(1-22) методом ППР

Лиганд	Аналит	χ^2 (RU ²)	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{max} (RU)
VH9-D54S+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	2,29E-02	2,30E+03	1,39E-04	6,05E-08	9,8
VH9-D54Q+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	5,00E-03	3,90E+03	9,97E-04	2,56E-07	21,8
VH9-D54E+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	1,04E-02	8,28E+03	1,35E-03	1,63E-07	26,8
VH9-D54A+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	3,06E-02	3,56E+02	7,78E-04	2,18E-06	10,7
VH9-D54H+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	1,97E-02	5,93E+03	1,39E-03	2,35E-07	15,1
VH9-G55A+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	7,41E-02	2,82E+04	4,84E-04	1,72E-08	21,3
VH9-G55V+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	8,29E-02	3,38E+03	1,63E-03	4,83E-07	9,8
VH9-M64V+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	6,24E-02	2,38E+04	5,20E-04	2,18E-08	12,8
VH9-M64I+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	1,07E-01	9,29E+04	1,92E-03	2,07E-08	6,5
VH9-M64L+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	1,16E-01	9,30E+04	2,08E-03	2,24E-08	7,8
VH9-M64A+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	1,50E-01	7,79E+04	1,04E-03	1,33E-08	10,5
VH9+VL4-N33S	Мономерный пептид Len 1-22	1,10E-01	1,43E+04	9,54E-04	6,69E-08	23,8
VH9+VL4-N33Q	Мономерный пептид Len 1-22	6,49E-02	1,33E+04	1,04E-03	7,84E-08	21,7
VH9+VL4-N33E	Мономерный пептид Len 1-22	5,27E-02	1,23E+04	1,31E-03	1,06E-07	15,4
VH9+VL4-N33A	Мономерный пептид Len 1-22	5,56E-02	1,13E+04	1,00E-03	8,85E-08	17,4

VH9+VL4- N33H	Мономерный пептид Len 1-22	7,20E-02	1,31E+04	7,43E- 04	5,66E- 08	17,6
VH9+VL4- G34A	Мономерный пептид Len 1-22	9,04E-01	5,95E+04	1,81E- 03	3,04E- 08	24,9
VH9+VL4- G34V	Мономерный пептид Len 1-22	5,83E-01	4,18E+04	1,46E- 03	3,50E- 08	29,7
VH9+VL4	Мономерный пептид Len 1-22	1,88E+00	6,04E+04	2,60E- 03	4,30E- 08	47,2

Пример 3. Аффинность связывания гуманизованных антител к амилоиду с фибриллами rV λ 6Wil

[329] Способность гуманизованных антител к амилоиду связывать фибриллы rV λ 6Wil тестировали, например, с помощью иммуносорбентного анализа с европием (EuLISA) по сравнению с химерным антителом c11-1F4 (**Фиг. 5A**). На основании этих данных, представленных на **Фиг. 5A**, c11-1F4, связанный со значением EC₅₀, равным ~72 нМ, VH10/VL4, связанный со значением EC₅₀, равным 17 нМ, VH9/VL4, связанный со значением EC₅₀, равным 7 нМ, VH8/VL4, связанный со значением EC₅₀, равным 16 нМ, VH7/VL4, связанный со значением EC₅₀, равным 75 нМ и VH6/VL3, связанный со значением EC₅₀, 95 нМ. VH9/VL4 демонстрировало повышенное связывание по сравнению с c11-1F4 (**Фиг. 5A**). Антитело VH9/VL4 связывало амилоидные фибриллы в большей степени, чем VH6/VL3 (**Фиг. 5A**).

[330] Как дополнительно описано в документе PCT/US2020/060596, который полностью включен в данный документ посредством ссылки, пептиды p5 и p5R были добавлены к N-концу легкой цепи гуманизованных антител с VH9/VL4 и VH6/VL3. Как показано на **Фиг. 5B**, добавление пептидов p5 и p5R к N-концу легкой цепи VH6/VL3 усиливало связывание с фибриллами rV λ 6Wil примерно в 30 раз (на основании EC₅₀). На основании этих данных, представленных на **Фиг. 5B**, VH6/VL3-p5, связанный со значением EC₅₀, равным 3 нМ, VH6/VL3-p5R, связанный со значением EC₅₀, равным 3 нМ, c11-1F4, связанный со значением EC₅₀, равным ~100 нМ, и VH6/VL3, связанный со значением EC₅₀, равным 95 нМ.

[331] В общем, варианты с аргининовым вариантом p5 (p5R) превосходили варианты p5 (**Фиг. 5C** и **Фиг. 5D**).

[332] Как показано на **Фиг. 5E**, VH9/VL4 обладал такой же реактивностью по отношению к фибриллам rV λ 6Wil, что и мышинное исходное антитело.

[333] Как показано на **Фиг. 5E** и **Фиг. 5F**, как VH6/VL3-p5, так и VH6/VL3-p5R демонстрируют связывание с амилоидными экстрактами hATTR. На основании данных на **Фиг. 5E** и **Фиг. 5F**, VH6/VL3-p5, связанный с экстрактом Sno hATTR со значением EC₅₀, равным 50 нМ, и экстрактом Ken ATTR со значением EC₅₀, равным 90 нМ, и VH6/VL3-p5R, связанный с экстрактом Sno ATTR со значением EC₅₀, равным 47 нМ, экстрактом Ken ATTR со значением EC₅₀, равным 70 нМ, и Per125 wtATTR со значением EC₅₀, равным 85 нМ.

[334] В **таблице Е4** ниже представлены результаты для EuLISA, в которых измеряют способность mIgp5, hIgG1, c11-1F4, m11-1F4, VH6/VL3-p5, VH9/VL4-p5, и VH9/VL4-p5R связывать фибриллы rVλ6Wil, экстракт Per125 wtATTR, экстракт KEN hATTR, экстракт печени SHI ALλ и экстракт печени TAL ALκ. Для каждой комбинации антитела и субстрата показаны логарифмически трансформированная EC₅₀, EC₅₀ и максимальный уровень связывания в анализе. Условия с пометкой «н/д» не тестировались. Как показано в **таблице Е4**, гуманизированные антитела к амилоиду, слитые с p5 или p5R, были способны связывать различные амилоидные фибриллы и амилоидные экстракты. VH6/VL3-p5, VH9/VL4-p5 и VH9/VL4-p5R связывали все протестированные фибриллы и экстракты с более высокой аффинностью (на основе измерений EC₅₀), чем m11-1F4 и все другие контрольные антитела. VH9/VL4-p5R, как правило, демонстрировали более низкие значения EC₅₀, чем VH9/VL4-p5, а VH9/VL4-p5, как правило, демонстрировали более низкие значения EC₅₀, чем VH6/VL3-p5.

Таблица Е4. Иллюстративные данные EuLISA

	mIgp5		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	8,541	2,88E-09	58,5
Per125 wtATTR	8,205	6,24E-09	31,7
KEN hATTR	8,448	3,56E-09	19,9
SHI ALλ печени	8,532	2,94E-09	24,0
TAL ALκ печени	8,472	3,37E-09	24,6
	hIgG1		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	5,894	1,28E-06	39,3
Per125 wtATTR	~ 7,917	н/д	~ 8,378
KEN hATTR	~ 9,061	н/д	-0,8
SHI ALλ печени	~ 7,878	н/д	2,5
TAL ALκ печени	~ 3,001	н/д	~ 2217
	c11-1F4		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	6,536	2,91E-07	63,9
Per125 wtATTR	6,419	3,81E-07	71,12
KEN hATTR	~ -1,360	н/д	~ 19728
SHI ALλ печени	6,592	2,56E-07	51,31
TAL ALκ печени	~ 0,5994	н/д	~ 17788
	m11-1F4		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	6,265	5,43E-07	183,6
Per125 wtATTR	5,725	1,88E-06	208,8
KEN hATTR	~ 2,386	н/д	~ 294290
SHI ALλ печени	~ 4,447	н/д	~ 1506
TAL ALκ печени	~ 3,028	н/д	~ 35143

	VH6/VL3-p5		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	8,457	3,49E-09	65,3
Per125 wtATTR	7,404	3,94E-08	33,9
KEN hATTR	7,18	6,61E-08	16,9
SHI ALλ печени	7,303	4,98E-08	29,8
TAL ALκ печени	7,314	4,85E-08	29,5
	VH9/VL4-p5		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	8,393	4,05E-09	71,02
Per125 wtATTR	7,611	2,45E-08	58,06
KEN hATTR	7,357	4,40E-08	37,79
SHI ALλ печени	7,709	1,95E-08	41,93
TAL ALκ печени	7,613	2,44E-08	60,05
	VH9/VL4-p5R		
Субстрат	LogEC₅₀	EC₅₀	Макс.
rVλ6Wil	8,408	3,91E-09	82,68
Per125 wtATTR	7,855	1,40E-08	55,74
KEN hATTR	7,683	2,07E-08	26,64
SHI ALλ печени	7,823	1,50E-08	40
TAL ALκ печени	7,901	1,26E-08	45,28

Пример 4. Субстрат из фибрилл Wil аффинно абсорбируется гуманизированными антителами к амилоиду

[335] Способность антител к амилоиду аффинно абсорбировать субстраты исследовали, как описано в PCT/US2020/060596. mIgG-p5 продемонстрировал превосходное связывание с фибриллами Wil и амилоидными экстрактами в анализе с аффинной адсорбцией (Фиг. 6). Способность исходного белка VH9/VL4 и его вариантов к аффинной адсорбции субстратов была значительно снижена по сравнению с mIgp5, как показано в таблице E5 ниже. В таблице E5 приведенные значения представляют собой процент связывания, а ячейки без данных представляют комбинации антитело/субстрат, которые не тестировались.

Таблица E5. Краткое изложение иллюстративных экспериментов с аффинной адсорбцией

Субстрат	mIgp5	VH9/VL4-p5	VH9/VL4-p5R	VH9/VL4	VH6/VL3-p5
Синтетические фибриллы rVλ6Wil	71	24,73	22,62	10,45	22,53
Фибриллы Aβ(1-40)				7,38	20,57
Фибрилла hIAPP				2,46	4,82
Частицы Vκ4(LEN(1-22)) ^c		54,44	50,17	57,44	54,87
HIG ALκ1	10			0,19	0,51

TAL AL _κ	37			0,72	0,94
SHI AL _λ	34	1,97	1,22	0,68	0,60
TYL AL _λ	21			0,56	0,69
CAB AL _{κ4}				2,43	2,80
SNO hATTR	12			0,41	0,49
KEN hATTR	15			0,61	0,79
wtATTR - PER125	31	1,33	1,12	1,36	1,00
wtATTR - PER253	17			0,80	1,58

[336] Проверяли способность гуманизированных антител к амилоиду действовать подобно опсонинам в отношении амилоидных фибрилл (т.е. стимулировать фагоцитоз амилоидных фибрилл), как описано в PCT/US2020/060596. VH9/VL4-p5 и VH9/VL4-p5R стимулировали поглощение фибрилл rV_λ6Wil лучше, чем VH6/VL3-p5 и VH6/VL3-p5R, что согласуется с различием в данных связывания ELISA, которые описаны выше (см. **Фиг. 7А** и **Фиг. 7В**). VH9/VL4 без пептида было примерно так же эффективно, как VH6/VL3 с присоединенным p5 или p5R, и во много раз лучше, чем VH6/VL3 без пептида, как показано на **Фиг. 7С**. Только VH9/VL4 было более эффективным опсоном, чем c11-1F4 (**Фиг. 7В**). VH6/VL3-p5 и VH6/VL3-p5R способствовали эквивалентным уровням поглощения фибрилл по сравнению с mIgp5, и продемонстрировали лучшие результаты, чем c11-1F4 (**Фиг. 7А**). VH9/VL4-p5 и VH9/VL4-p5R также способствовали эквивалентным уровням поглощения фибрилл по сравнению с mIgp5, и продемонстрировали лучшие результаты, чем c11-1F4 (**Фиг. 7В**). Неожиданно гуманизированные антитела к амилоиду, конъюгированные с пептидами p5 или p5R, обеспечивали значительно лучшую опсонизацию, чем c11-1F4.

Пример 5. Получение VH9-D54E/VL4-N33S-p5R с помощью периодического культивирования с подпиткой и перфузионного культивирования; связывание амилоидного субстрата

[337] Периодическое культивирование с подпиткой и другие способы полунепрерывного культивирования часто используются для производства рекомбинантных белков и антител благодаря высокой плотности культивирования, высокому выходу продукта и гибкости в плане оптимизации производительности. Однако культуры с высокой плотностью могут влиять на активность ингибирующих ферментов и токсинов, что может негативно повлиять на общий выход продукции или стратегию производства. Оценка экспрессии ранних конструкций слитого белка антитело-пептид клетками млекопитающих показала, что слитый белок очень чувствителен к укорочению, предположительно протеазами клетки-хозяина. Перфузионное культивирование представляет собой тип способа непрерывного культивирования, который позволяет избежать проблем, связанных со способами культивирования с высокой плотностью (например, периодического культивирования с подпиткой), но перфузионное культивирование характеризуется более низким выходом продукта и повышенной степенью сложности. В этом примере VH9-D54E/VL4-N33S-p5R (со спейсером VSPSV)

выделяли и оценивали на чистоту (процент интактного слитого белка) с использованием иллюстративных способов в режиме периодического культивирования с подпиткой и перфузионного культивирования, представленных на **Фиг. 8А**. Аффинность связывания слитого белка антитело-пептид, полученного с использованием способов культивирования в режиме периодического культивирования с подпиткой и перфузионного культивирования, где субстратом была амилоидоподобная фибрилла rV λ 6WIL (**Фиг. 8В**).

[338] Клетки яичника китайского хомячка использовали для продукции белка в способах в режиме периодического культивирования с подпиткой и в перфузионного культивирования. Клетки высевали на чашки диаметром 3-15 см с плотностью $0,1-2 \times 10^6$ клеток/мл на свежую культуральную среду (химически определенную, не содержащую белков) при перемешивании со скоростью 120 об/мин и инкубировали при 37 °C (5% CO₂). Для получения VH9-D54E/VL4-N33S-VSPSV-p5R $50-200 \times 10^6$ клеток переносили в свежую среду при концентрации 1×10^6 клеток/мл за день до трансфекции плазмидой, кодирующей тяжелую цепь антитела, содержащую VH9-D54E, и другой плазмидой, кодирующей легкую цепь антитела, содержащую VL4-N33S-VSPSV-p5R. Клетки промывали и переносили в свежую среду для культивирования либо в периодическом режиме с подпиткой, либо в перфузионном режиме. Секретируемый слитый белок антитело-пептид (VH9-D54E/VL4-N33S-VSPSV-p5R) собирали из периодической культуры с подпиткой примерно через 7 дней. Собранный слитый белок антитело-пептид затем наносили на колонку для хроматографии на основе белка А, а затем на колонку для анионообменной хроматографии. Элюат из анионообменной колонки собирали, и выделенный слитый белок антитело-пептид, полученный в результате этого способа периодического культивирования с подпиткой, обозначали FB.1 (партия из периодической культуры с подпиткой 1).

[339] В таблице Е6 показан масс-спектрометрический анализ чистоты слитого белка антитело-пептид с использованием альтернативного способа периодического культивирования с подпиткой.

Таблица Е6. Масс-спектрометрический (МС) анализ чистоты слитого белка антитело-пептид после альтернативного способа в режиме периодического культивирования с подпиткой

Легкая цепь антитела	% (10 день)	% (14 день)
Укороченный	27,0	39,9
Полноразмерный	73,0	60,1

[340] Для решения проблемы укорочения, наблюдаемой при периодическом культивировании клеток с подпиткой, использовали перфузионное культивирование клеток. Клетки перфузионной культуры выращивали в биореакторе, где культуру клеток пропускали через мембранный картридж, который задерживал клетки, но пропускал белки, отделяя их от клеток и клеточного дебриса. Секретированный слитый белок антитело-пептид (VH9-D54E/VL4-N33S-VSPSV-p5R) собирали через 1 или 7 дней и сразу же отправляли на обработку образца. Секретированный слитый белок антитело-пептид затем

наносили на колонку для хроматографии на основе белка А, а затем на колонку для анионообменной хроматографии. Элюат из анионообменной колонки собирали и далее подвергали катионообменной хроматографии (СЕХ), при этом образец загружали при плотности загрузки смолы от 20,0 до 50,0 г/л, промывали промывочным буфером, содержащим 260 мМ NaCl (рН 5,5) и затем элюировали буфером для элюирования, содержащим 400 мМ NaCl (рН 5,5). Нанесение слитого белка антитело-пептид на колонку СЕХ позволило отделить укороченные формы слитого белка антитело-пептид от интактного слитого белка антитело-пептид. Укороченные формы слитого белка антитело-пептид удаляли на стадии промывки промывочным буфером. Интактный слитый белок антитело-пептид элюировали буфером для элюирования. Элюат из колонки СЕХ собирали и анализировали капиллярным электрофорезом с применением додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН) для определения чистоты выделенного слитого белка антитело-пептид. Чистота более 99% была достигнута с использованием способа перфузионного культивирования с катионообменной колоночной хроматографией (таблица Е7). Этот элюат был обозначен PF.1 (партия из перфузионной культуры 1) и был подготовлен для анализа связывания амилоидного субстрата.

Таблица Е7. Анализ чистоты слитого белка антитело-пептид после катионообменной хроматографии

№ пика	Загрузочный материал	Промывочный буфер (NaCl, мМ)	Выход (%)	КЭ-ДСН (% , чистота)
1	Загрузка СЕХ (чистота 47,5%)	200	42,2	12,1
2		260	18,1	62,6
3		400	34,5	99,9

[341] Для оценки функционального влияния чистоты слитых белков антитело-пептид, получаемых по технологической схеме в режиме периодического культивирования с подпиткой или в перфузионного культивирования, были получены слитые белки антитело-пептид FB.1 и PF.1 для анализа связывания амилоидного субстрата. Амилоидоподобную фибриллу гVλ6WIL использовали в качестве субстрата для исследования аффинности связывания FB.1 или PF.1. Слитый белок антитело-пептид FB.1 добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 100 нМ, а слитый белок антитело-пептид PF.1 добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 5 нМ. Обнаружение связанного FB.1 или PF.1 оценивали путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления биотинилированного козьего вторичного антитела к Fc человека и конъюгата стрептавидин-европей. Среднее значение и стандартное отклонение (станд. откл.) для трех повторностей рассчитывали, а эффективность (EC50) определяли после аппроксимации сигмоидальной четырехпараметрической логистической функции (4PL) с логарифмической осью x (Prism) (Фиг. 8В).

[342] Расчетное значение активности (EC50) связывания FB.1 с гVλ6WIL составляло 13,4 нМ, тогда как значение EC50 для связывания PF.1 с гVλ6WIL составляло 0,15 нМ. Эти

данные демонстрируют, что слитый белок антитело-пептид высокой степени чистоты, полученный с использованием способа культивирования в перфузионном режиме и катионообменной хроматографии (PF.1), имеет значительно более высокую аффинность связывания с амилоидным субстратом rV λ 6WIL, чем слитый белок антитело-пептид, полученный с использованием способа периодического культивирования с подпиткой (FB.1). Во всех последующих примерах слитый белок антитело-пептид получали с использованием метода перфузионного культивирования и катионообменной хроматографии, описанного в этом примере.

Пример 6. Биораспределение PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R) у мышей

[343] Для этого исследования PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R со спейсером VSPSV) экспрессировали стабильно трансфицированными клетками CHO и получали способом перфузионного культивирования ткани в течение 1 дня. Слитую молекулу антитело-пептид PF.1 очищали с помощью хроматографии на основе белка A и катионообменной хроматографии, как описано в Примере 5. Слитую молекулу антитело-пептид PF.1 и контрольный hIgG1 метили радиоактивным изотопом йодом-125 путем окислительного включения в боковые цепи тирозина. Свободный радиоактивный йод отделяли с помощью эксклюзионной хроматографии и радиоактивную чистоту оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и ауторадиографии (**Фиг. 9А**). Белки как тяжелой, так и легкой цепи реагентов были мечены радиоактивным изотопом, причем присутствие свободного радиоактивного йода не наблюдали. Легкая цепь PF.1 была представлена в виде одинаковых молекул (один тип молекул) и имела заметно более высокую молекулярную массу по сравнению с контрольным IgG1 из-за присутствия пептида p5R.

[344] Примерно 100 мкКи (10 мкг реагента) вводили внутривенно (в/в) в латеральную хвостовую вену мышей с системным АА-амилоидозом, преимущественно поражающим печень и селезенку. Через 24 часа после инъекции мышам ($n=3$ на группу) подвергали эвтаназию путем передозировки изофлураном и получали изображения ОФЭКТ/КТ (**Фиг. 9В**). Изображения 125I-PF.1 выявили сохранение радиоактивности в печени, селезенке и желудочно-кишечном тракте мышам с АА, что контрастировало с изображениями 125I-hIgG1 у мышам с АА через 24 часа после инъекции. Кроме того, у животных, которым вводили 125I-PF.1, радиоактивность в области предсердий сердца была визуальнее выше по сравнению с контрольным реагентом, что может свидетельствовать о большей радиоактивности пула крови или о связывании с незначительными отложениями амилоида в сердце в данной мышинной модели.

[345] Сразу после этого отбирали образцы или органы и кровь для измерения ассоциированной с тканями радиоактивности в качестве меры биораспределения реагентов в органах, причем биораспределение определяли в виде процента введенной дозы, измеренной на грамм ткани. Исследовали три мыши на группу и рассчитывали среднее биораспределение со стандартным отклонением (станд. откл.). Анализ органов включал мышцы, печень, поджелудочную железу, селезенку, левую почку, правую почку, желудок, верхний отдел кишечника, нижний отдел кишечника, сердце, легкие и кровь. Этот анализ

выявил значительно более высокое накопление 125I-PF.1 в печени, селезенке, почках и желудке по сравнению с контрольным hIgG1 (**Фиг. 9C**). Это позволяет предположить, что реагент PF.1 селективно удерживается амилоидом в этих органах.

[346] Затем с помощью микроавторадиографии оценивали распределение радиоактивно меченных реагентов в органах мышей. Вкратце, образцы ткани фиксировали в течение 24 часов в 10% забуференном формалине, заливали в парафиновые блоки, а срезы ткани толщиной 6 мкм помещали на предметные стекла. Микропрепараты покрывали фотоэмульсией в течение трех дней, а затем докрашивали гематоксилином и эозином (H&E). О наличии радиоактивности в тканях свидетельствовало отложение черных зерен серебра. Во всех оцениваемых органах наблюдали связывание 125I-PF.1 в местах отложения амилоида в ткани, что указывает на специфическое связывание с патологическими образованиями (**Фиг. 9D**), демонстрируя репрезентативные участки печени, селезенки и сердца (масштабная линейка=500 мкм). Напротив, накопление контроля 125I-hIgG1 не наблюдали.

Пример 7. Связывание PF.1 с амилоидом в тканях человека

[347] Зафиксированные в формалине и залитые парафином срезы получали из нескольких тканей человека, содержащих ATTR- (**Фиг. 10A**), AL- (**Фиг. 10B** и **10C**) или ALECT2-амилоид (**Фиг. 10D**). Также был оценен дополнительный образец ткани головного мозга пациента с болезнью Альцгеймера (**Фиг. 10E**). Ткани окрашивали биотинилированным PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R со спейсером VSPSV; 2 мкг/мл в PBS) с использованием стандартных иммуногистохимических методов и визуализировали после добавления диаминобензидина (черные стрелки). Присутствие амилоида в микропрепаратах из тех же тканей визуализировали по флуоресценции конго красного после окрашивания тканей раствором щелочного конго красного (белые стрелки).

[348] PF.1 специфически связывался с сердечными амилоидными отложениями, окружающими кардиомиоциты, в двух образцах ATTRv-амилоидоза (T60A KEN и T60A SNO) (**Фиг. 10A**) и двух образцах AL-амилоидоза (ALк TAL и ALк BAB) (**Фиг. 10B**). Подобным образом специфическое связывание с амилоидом наблюдали при отложениях AL-амилоида (ALк HUN и ALк JON) в почках (**Фиг. 10C**). Специфическое связывание PF.1 с ALECT2-амилоидом наблюдали в образцах тканей почек и селезенки (**Фиг. 10D**). Наконец, диффузные и плотные бляшки, состоящие из Aβ-амилоида в головном мозге пациента с болезнью Альцгеймера, были положительно окрашены PF.1 (**Фиг. 10E**).

[349] Эти данные демонстрируют специфическую реактивность PF.1 в отношении тканевых амилоидных отложений различного типа в различных тканях. Таким образом, панामीлоидная реактивность PF.1, опосредованная пептидом p5R, подтверждается иммуногистохимическим окрашиванием с использованием тканей четырех наиболее распространенных форм связанных с амилоидом заболеваний.

Пример 8. Фагоцитоз человеческого Al-амилоидного экстракта с помощью PF.1 *in vivo*

[350] Образец человеческого Al-амилоидного экстракта (BAL) метили рН-

чувствительным красителем сукцинимидил - флуорофором pHrodo red. pHrodo red проявляет слабую флуоресценцию при pH 7,5, но усиливается по мере того, как pH становится более кислым, что наблюдается в фаголизосомах макрофагов после фагоцитоза. Человеческий AL-амилоидный экстракт (BAL) (примерно 10% по весу материала, меченного pHrodo red) предварительно инкубировали с PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R со спейсером VSPSV; 500 мкг PF.1 на 2 мг экстракт AL) в течение примерно 30 минут. В качестве контроля экстракт AL инкубировали в аналогичном объеме PBS без PF.1. Мышам с иммунодефицитом (NU/NU) ($n=4$ на группу) вводили 2 мг покрытого PF.1 экстракта AL подкожно в спину. Флуоресцентную эмиссию амилоида, меченного pHrodo red, обнаруживали с помощью оптической визуализации мышей под анестезией изофлураном (1-2% в воздухе). Мышей визуализировали через 1 день, 5 дней, 7 дней, 10 дней и 12 дней после инъекции амилоида и количественно определяли флуоресцентную эмиссию.

[351] Предварительная инкубация амилоида с PF.1 приводила к быстрому и устойчивому увеличению фагоцитоза амилоида в течение 12 дней после инъекции, о чем свидетельствует увеличение флуоресцентной эмиссии pHrodo red (**Фиг. 11А**). Напротив, флуоресцентная эмиссия только амилоидного экстракта (контроль) была значительно ниже (**Фиг. 11А**). Разница во флуоресцентной эмиссии между обработанной PF.1 и контрольной группами через 12 дней после инъекции была заметно увеличена в получавшей лечение группе (репрезентативные мыши показаны на **Фиг. 11В**).

[352] Эти данные демонстрируют, что связанный с амилоидом PF.1 может усиливать фагоцитоз амилоида фагоцитирующими клетками, главным образом макрофагами, *in vivo*.

Пример 9. Фагоцитоз человеческого AL-амилоидного экстракта с помощью PF.1 *in vitro*

[353] Человеческие AL экстракты (AL_κ или AL_λ) и человеческие ATTR-амилоидные (v или ДТ) экстракты метили pH-чувствительным красителем сукцинимидил - флуорофором pHrodo red для применения в анализе фагоцитоза *ex vivo*. Клетки THP-1 человека активировали добавлением форболмиристата ацетата (PMA) и высевали в лунки 24-луночного планшета для тканевых культур. В лунки добавляли 20 мкг амилоидного экстракта с возрастающими количествами PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R со спейсером VSPSV) или контрольного антитела hIgG1 (6 нМ, 20 нМ, 60 нМ и 200 нМ) и планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Лунки просматривали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Keyence BZ X800) и получали четыре цифровых изображения (4-кратный объектив) для каждой лунки. Флуоресценцию на каждом изображении определяли количественно с использованием спектральной сегментации и определяли среднее и стандартное отклонение (станд. откл.) для четырех изображений (**Фиг. 12А-12D**).

[354] Результаты демонстрируют, что PF.1 усиливает фагоцитоз различных амилоидных экстрактов активированными человеческими макрофагами THP-1 дозозависимым образом, при этом максимальный эффект в этих условиях анализа наблюдается при приблизительно 60 нМ PF.1 для экстрактов AL_κ (**Фиг. 12А**), экстрактов

AL λ (Фиг. 12B), экстрактов ATTR ν (Фиг. 12C) и экстрактов ATTRwt (Фиг. 12D). Усиление флуоресцентной эмиссии за счет усиления фагоцитоза амилоидных субстратов во всех случаях было значительно выше, чем у контрольного hIgG1.

[355] Эти данные демонстрируют, что опсонизация человеческого амилоида с помощью PF.1 приводит к значительному фагоцитозу материала макрофагами человека.

Пример 10. Мощное связывание различных амилоидных субстратов с помощью PF.1

[356] Синтетические амилоидные фибриллы (rV λ 6WIL и A β (1-40)), а также человеческие AL-экстракты (AL λ или AL κ) и человеческие ATTRV- и ATTRwt-амилоидные экстракты использовали в качестве субстрата для исследования аффинности связывания PF.1. Конъюгат антитело-пептид добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 100 нМ. Для лунок, содержащих rV λ 6WIL, конъюгат антитело-пептид добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 5 нМ. Обнаружение связанного PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R со спейсером VSPSV) оценивали путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления биотинилированного козьего вторичного антитела к Fc человека и конъюгата стрептавидин-европей. Среднее значение и стандартное отклонение (станд. откл.) для трех повторностей рассчитывали, а эффективность (EC50) определяли после аппроксимации сигмоидальной четырехпараметрической логистической функции (4PL) с логарифмической осью x (Prism) (Фиг. 13A). Нереактивный hIgG1 использовали в качестве отрицательного контроля в параллельном анализе (Фиг. 13B).

[357] Расчетные значения активности (EC50) связывания PF.1 с амилоидными субстратами варьировались от 0,15 нМ для синтетических фибрилл до 0,6 нМ для AL κ (GRA)-амилоидного экстракта (таблица E8). Эти данные демонстрируют высокую аффинность связывания PF.1 с синтетическими фибриллами и человеческими AL- и ATTR-амилоидными экстрактами.

Таблица E8. Значения EC50 для связывания PF.1 различных амилоидных субстратов

Амилоидный субстрат	EC50 (нМ)
rV λ 6WIL	0,15
A β (1-40)	0,15
ATTRwt (125)	0,18
ATTR ν (T60A, KEN)	0,45
AL λ (SHI)	0,32
AL κ (TAL)	0,40
AL λ (BAL)	0,36
AL λ (GRA)	0,60

A β (1-40), версия A β из 40 аминокислот; ДТ, дикий тип; ν , тип варианта; T60A, мутация транстиретина. 125, KEN, SHI, TAL, BAL и GRA - обозначения образцов пациентов для фибрилл AL κ и AL λ .

Пример 11. Связывание синтетических амилоидных субстратов с помощью PF.7 *in vitro*

[358] Для этого исследования VH9-D54E/VL4-N33S-p5R (со спейсером VSPSV) экспрессировали клетками CHO и получали способом перфузионного культивирования ткани в течение 7 дней, используя способ, аналогичный описанному для PF.1. Слитую молекулу антитело-пептид очищали с помощью хроматографии на основе белка А и катионообменной хроматографии - выделенный материал обозначили PF.7. Синтетические амилоидные фибриллы (Тау 441, α -синуклеин и А β (1-40)) использовали в качестве субстрата для анализа связывания PF.7. PF.7 добавляли в лунки в 2-кратном серийном разведении, начиная с 100 нМ. Обнаружение связанного PF.7 оценивали путем измерения флуоресценции с временным разрешением после добавления биотинилированного козьего вторичного антитела к Fc человека и конъюгата стрептавидин-европей. Среднее значение и стандартное отклонение (станд. откл.) для трех повторностей рассчитывали, а эффективность (EC50) определяли после аппроксимации сигмоидальной четырехпараметрической логистической функции (4PL) с логарифмической осью x (Prism) (Фиг. 14). Нереактивный hIgG1 использовали в качестве отрицательного контроля в параллельном анализе (Фиг. 13В).

[359] Расчетные значения активности (EC50) связывания PF.7 с различными субстратами из фибрилл составляли 127 нМ, 1,3 мкМ и 0,4 нМ для α -синуклеина, Тау 441 и А β (1-40) (таблица Е9).

Таблица Е9. Значения EC50 для PF.7 для субстратов из синтетических фибрилл.

Синтетический субстрат из фибрилл	EC50 (нМ)
α -синуклеин	127 нМ
Тау 441	1300 нМ
А β (1-40)	0,4 нМ

Пример 12. Фагоцитоз человеческого AL-амилоидного экстракта с помощью PF.1 *in vitro* усиливается сывороткой человека.

[360] Синтетические фибриллы rV λ 6WIL (Wil) и человеческий ALк-амилоидный (TAL) экстракт метили рН-чувствительным красителем сукцинимидил - флуорофором рHrodo red для применения в анализе фагоцитоза *ex vivo*. Клетки THP-1 человека активировали добавлением форболмиристата ацетата (PMA) и высевали в лунки 24-луночного планшета для тканевых культур. Амилоидный экстракт массой 20 мкг добавляли в лунки с 60 нМ PF.1 (VH9-D54E/VL4-N33S-p5R со спейсером VSPSV) в присутствии или в отсутствие 20% человеческой сыворотки в качестве источника комплемента. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Лунки просматривали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Keyence BZ X800) и получали четыре цифровых изображения (4-кратный объектив) для каждой лунки. Флуоресценцию на каждом изображении определяли количественно с использованием спектральной сегментации и определяли среднее и стандартное отклонение (станд. откл.) для четырех

изображений (Фиг. 15).

[361] Результаты демонстрируют, что человеческая сыворотка как источник комплемента значительно усиливает фагоцитоз амилоидных субстратов после опсонизации PF.1 активированными человеческими макрофагами ТНР-1.

[362] Эти данные демонстрируют, что опсонизация амилоида человека с помощью PF.1 и фагоцитоз макрофагами человека могут быть значительно усилены сывороткой человека как источником комплемента.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок антитело-пептид, содержащий: реактивный к амилоиду пептид; и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи через спейсер или без спейсера.

2. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид связан с С-концом легкой цепи через спейсер.

3. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, отличающийся тем, что спейсер представляет собой пептидный спейсер.

4. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что легкая цепь дополнительно содержит константную область легкой цепи, а тяжелая цепь содержит константную область тяжелой цепи.

5. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи.

6. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27 и 83-86.

7. Слитый белок антитело-пептид, содержащий: реактивный к амилоиду пептид; и антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N- и/или С-конце легкой цепи и/или на N- и/или С-конце тяжелой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, при этом спейсер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-86.

8. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце легкой цепи или N-конце тяжелой цепи.

9. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи или на С-

конце тяжелой цепи.

10. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 7-9, отличающийся тем, что легкая цепь дополнительно содержит константную область легкой цепи, а тяжелая цепь содержит константную область тяжелой цепи.

11. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 7-10, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи.

12. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1-13.

13. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид содержит по меньшей мере два реактивных к амилоиду пептида и при этом реактивные к амилоиду пептиды представляют собой один и тот же пептид или разные пептиды.

14. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

15. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

16. Слитый белок антитело-пептид по вариантам осуществления 1-13 и 15, отличающийся тем, что а) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19; б) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20; CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH, содержащую

CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19; или с) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

17. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 14-16, отличающийся тем, что VL включает аминокислотную последовательность, указанную в группе, состоящей из SEQ ID NO:32-42.

18. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 14-17, отличающийся тем, что VH включает аминокислотную последовательность, указанную в группе, состоящей из SEQ ID NO: 43-63.

19. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 14-18, отличающийся тем, что а) VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48; б) VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51; в) VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; г) VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:52; д) VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50; или е) VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:69.

20. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 14-19, отличающийся тем, что VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48.

21. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 14-19, отличающийся тем, что VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51.

22. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 14-19, отличающийся тем, что VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID

NO:55.

23. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело представляет собой полноразмерное антитело, фрагмент Fab или scFv.

24. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело содержит область Fc.

25. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 24, отличающийся тем, что область Fc относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

26. Слитый белок антитело-пептид, содержащий а) первый полипептид и второй полипептид, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с N-концом легкой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, и третий и четвертый полипептиды, которые содержат тяжелую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91; б) первый полипептид и второй полипептид, которые содержат легкую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, и третий и четвертый полипептиды, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с C-концом тяжелой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, причем первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92; в) первый полипептид и второй полипептид, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с C-концом легкой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, и третий и четвертый полипептиды, которые содержат тяжелую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91; или д) первый полипептид и второй полипептид, которые содержат реактивный к амилоиду пептид, связанный с C-концом легкой цепи антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, и третий и четвертый полипептиды, которые содержат тяжелую цепь антитела, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, а третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91.

27. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид конъюгирован с обнаруживаемой меткой.

28. Слитый белок антитело-пептид по любому из предшествующими вариантами

осуществления, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид связывается с фибриллами rV λ 6Wil, A β , A β (1-40), IAAP, AL κ 4, A λ 1, или ATTR.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28.

30. Нуклеиновая кислота(-ы), кодирующая слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28.

31. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту(-ы) по варианту осуществления 30.

32. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 31.

33. Клетка-хозяин по варианту осуществления 32, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (СНО).

34. Способ получения слитого белка антитело-пептид, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 32 или варианту осуществления 33 в условиях, подходящих для экспрессии вектора, кодирующего слитый белок антитело-пептид.

35. Способ по варианту осуществления 34, отличающийся тем, что способ дополнительно включает выделение слитого белка антитело-пептид.

36. Способ лечения субъекта, имеющего связанное с амилоидом нарушение, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28.

37. Способ по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что связанное с амилоидом нарушение представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

38. Способ по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что связанное с амилоидом нарушение выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, AA-, A α poAI-, A α poAII-, AGel-, ALys-, ALECT2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-, или A β -амилоидоза.

39. Способ по любому из вариантов осуществления 36-38, отличающийся тем, что лечение слитым белком антитело-пептид приводит к клиренсу амилоида.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 36-39, отличающийся тем, что субъект является человеком.

41. Способ нацеливания на амилоидные отложения для клиренса, включающий приведение в контакт амилоидных отложений со слитым белком антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28.

42. Способ по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что амилоидное отложение удаляют.

43. Способ по варианту осуществления 41 или 42, отличающийся тем, что амилоидные отложения опсонизируются слитым белком антитело-пептид.

44. Способ лечения субъекта, страдающего или предположительно страдающего связанным с амилоидом заболеванием, включающий а) определение наличия у субъекта амилоидных отложений посредством и) введения субъекту слитого белка антитело-пептид

по любому из вариантов осуществления 1-28, причем слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и ii) определения того, может ли сигнал, связанный с обнаруживаемой меткой, быть обнаружен у субъекта; и b) если сигнал обнаружен, назначение субъекту лечения амилоидоза.

45. Способ по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что, если сигнал не обнаружен, за субъектом наблюдают на предмет последующего формирования амилоидных отложений.

46. Способ по варианту осуществления 45, дополнительно включающий определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, при превышении которого у субъекта определяется наличие амилоидных отложений.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 44-46, отличающийся тем, что лечение амилоидоза включает введение субъекту слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28.

48. Способ по варианту осуществления 47, отличающийся тем, что введение слитого белка антитело-пептид приводит к клиренсу амилоидных отложений у субъекта.

49. Способ идентификации амилоидных отложений у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28, при этом слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку и обнаружение сигнала от слитого белка антитело-пептид.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 44-49, отличающийся тем, что установлено, что у субъекта отсутствует амилоиды или он страдает моноклональной гаммапатией неясного значения (MGUS), множественной миеломой (MM) или одним или более связанными плазмоклеточными заболеваниями.

51. Способ обнаружения лиганда, включающий приведение лиганда в контакт со слитым белком антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, при этом слитый белок антитело-пептид обладает аффинностью связывания с лигандом и, определяя сигнал от обнаруживаемой метки, тем самым обнаруживает лиганд.

52. Набор, содержащий слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1-28, для применения в способе по любому из вариантов осуществления 36-51.

1А. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

реактивный к амилоиду пептид; и

антитело, способное индуцировать фагоцитоз и выполнять функцию опсонина, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), где реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи или легкой цепи,

причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86.

2А. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 1А, отличающийся тем, что легкая цепь содержит константную область легкой цепи, а тяжелая цепь содержит константную область тяжелой цепи.

3А. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 1А или 2А, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи.

4А. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 1А или 2А, отличающийся тем, что спейсер выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:86.

5А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-4А, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1-13.

6А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-5А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи и при этом каждая легкая цепь связана на С-конце с реактивным к амилоиду пептидом.

7А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-6А, отличающийся тем, что антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

8А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-7А, отличающийся тем, что антитело связывается с человеческими амилоидными фибриллами.

9А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-8А, отличающийся тем, что

а) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19;

б) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19; или

с) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

10A. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1A-8A, отличающийся тем, что VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

11A. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1A-8A, отличающийся тем, что:

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:52;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50; или

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49.

12A. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1A-11A, отличающийся тем, что VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55.

13A. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1A-12A, отличающийся тем, что антитело представляет собой полноразмерное антитело.

14A. Слитый белок антитело-пептид по варианту осуществления 13A, отличающийся тем, что область Fc относится к изотипу IgG1.

15A. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

антитело, которое связывается с амилоидными фибриллами, содержащее первый полипептид и второй полипептид, каждый из которых содержит легкую цепь антитела, и

третий и четвертый полипептиды, каждый из которых содержит тяжелую цепь антитела, и реактивный к амилоиду пептид, который связан с N-концом или C-концом легкой цепи или тяжелой цепи, при этом

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91;

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92;

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91; или

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91.

16A. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2; и

антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22; при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи,

при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86.

17A. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2; и

антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1,

включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22; при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи,

при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

18А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-17А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид имеет EC50 менее 1,5 нМ для амилоидного субстрата.

19А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-18А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид конъюгирован с обнаруживаемой меткой, причем обнаруживаемая метка содержит флуоресцентную метку или радиоактивную метку.

20А. Способ по варианту осуществления 19А, отличающийся тем, что радиоактивная метка представляет собой I-123, I-124, F-18, ZR-89 или Tc-99m.

21А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-20А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид демонстрирует одно или более свойств *in vivo*, выбранных из улучшенного биораспределения, панамилоидной реактивности и усиленного фагоцитоза по сравнению с эталонным антителом IgG.

22А. Слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-21А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид связывается с фибриллами rV λ 6Wil, A β , A β (1-40), IAAP, AL κ 4, A1 λ 1, ATTR, α -синуклеина, или Tau 441.

23А. Композиция, содержащая
слитый белок антитело-пептид, содержащий:

- i) реактивный к амилоиду пептид; и
- ii) антитело, способное индуцировать фагоцитоз и выполнять функцию опсонина, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или С-конце тяжелой цепи или легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера; и при этом по меньшей мере 90% слитого белка антитело-пептид является интактным.

24А. Композиция по варианту осуществления 23А, отличающийся тем, что интактный слитый белок антитело-пептид содержит слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А.

25А. Композиция по варианту осуществления 23А, отличающаяся тем, что композиция содержит не более 10% продукта расщепления, причем продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:89, или легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных

остатков на N-конце или C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91.

26A. Композиция по любому из вариантов осуществления 23A-25A, отличающаяся тем, что слитый белок антитело-пептид проявляет аффинность связывания EC50 с одним или более амилоидными субстратами, причем аффинность связывания EC50 составляет менее 1,5 нМ.

27A. Композиция по любому из вариантов осуществления 23A-26A, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

28A. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1A-22A.

29A. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 28A.

30A. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 29A.

31A. Клетка-хозяин по варианту осуществления 30A, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (CHO).

32A. Способ получения слитого белка антитело-пептид, включающий

a) культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий слитый белок антитело-пептид, в условиях перфузионной культуры клеток, подходящих для экспрессии слитого белка антитело-пептид; и

b) выделение слитого белка антитело-пептид примерно каждые 12-36 часов; при этом слитый белок антитело-пептид содержит

i) реактивный к амилоиду пептид; и

ii) антитело, способное индуцировать фагоцитоз и выполнять функцию опсонина, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера.

33A. Способ по варианту осуществления 32A, дополнительно включающий нанесение слитого белка антитело-пептид, полученного на стадии b), на колонку для катионообменной хроматографии и элюирование слитого белка антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии.

34A. Способ по варианту осуществления 33A, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид элюируется отдельно от укороченного слитого белка антитело-пептид.

35A. Способ по любому из вариантов осуществления 32A-34A, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид включает слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1A-22A.

36A. Способ по любому из вариантов осуществления 32A-35A, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

37A. Способ по любому из вариантов осуществления 32A-36A, дополнительно включающий определение чистоты слитого белка антитело-пептид, при этом чистоту

слитого белка антитело-пептид определяют с использованием одного или более аналитических методов, включающих капиллярный электрофорез с применением додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН), жидкостную хроматографию (ЖХ), масс-спектрометрию (МС) или их комбинацию.

38А. Способ по любому из вариантов осуществления 32А-37А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид очищают по меньшей мере до 90% интактного слитого белка антитело-пептид.

39А. Слитый белок антитело-пептид, полученный с помощью способа по любому из вариантов осуществления 32А-38А.

40А. Способ лечения субъекта, имеющего связанное с амилоидом нарушение, характеризующееся амилоидными отложениями, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А и 39А или композиции по любому из вариантов осуществления 23А-27А.

41А. Способ по варианту осуществления 40А, отличающийся тем, что связанное с амилоидом нарушение представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

42А. Способ по варианту осуществления 40А или 41А, отличающийся тем, что связанное с амилоидом нарушение выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретинового амилоидоза, AA-, A α poAI-, A α poAII-, AGel-, ALys-, ALEct2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-амилоидоза, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера или A β -амилоидоза.

43А. Способ по любому из вариантов осуществления 40А-42А, отличающийся тем, что амилоидные отложения опсонизируются слитым белком антитело-пептид.

44А. Способ по любому из вариантов осуществления 40А-43А, отличающийся тем, что лечение субъекта слитым белком антитело-пептид вызывает фагоцитоз амилоидных отложений.

45А. Способ лечения субъекта, страдающего связанным с амилоидом заболеванием, или субъекта с подозрением на связанное с амилоидом заболевание, включающий:

а) определение наличия у субъекта амилоидного отложения путем:

i) введение слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А и 39А или композиции по любому из вариантов осуществления 23А-27А субъекту, причем слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и

ii) определения того, может ли быть обнаружен сигнал, связанный с обнаруживаемой меткой, у субъекта; и

б) если сигнал обнаружен, введение субъекту средства для лечения амилоидоза.

46А. Способ по варианту осуществления 45А, отличающийся тем, что, если сигнал не обнаружен, за субъектом наблюдают на предмет последующего формирования амилоидных отложений.

47А. Способ по варианту осуществления 45А или 46А, дополнительно включающий определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, при

превышении которого у субъекта определяется наличие амилоидных отложений.

48А. Способ по любому из вариантов осуществления 45А-47А, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид выявляют с помощью ОФЭКТ/КТ, ПЭТ/КТ, гамма-сцинтиграфии или оптической визуализации.

49А. Способ по любому из вариантов осуществления 45А-48А, отличающийся тем, что лечение амилоидоза включает введение субъекту слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А и 39А или композиции по любому из вариантов осуществления 23А-27А.

50А. Способ идентификации амилоидных отложений у субъекта, включающий введение слитого белка антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А и 39А или композиции по любому из вариантов осуществления 23А-27А, при этом слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и обнаружение сигнала от слитого белка антитела-пептида.

51А. Способ мониторинга клиренса амилоида у субъекта, включающий приведение в контакт амилоидного субстрата у субъекта со слитым белком антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А и 39А или композиции по любому из вариантов осуществления 23А-27А, при этом слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, причем пептид слитого белка антитело-пептид обладает аффинностью связывания с амилоидным субстратом; и

определение сигнала от обнаруживаемой метки, тем самым обнаруживая клиренс амилоида.

52А. Способ по любому из вариантов осуществления 40А-51А, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

53А. Набор, содержащий слитый белок антитело-пептид по любому из вариантов осуществления 1А-22А и 39А или композицию по любому из вариантов осуществления 23А-27А, для применения в способе по любому из вариантов осуществления 40А-52А.

ТИПОВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Все полинуклеотидные последовательности показаны в направлении 5'→3'. Все полипептидные последовательности показаны в направлении от N-конца к C-концу.

Последовательность VH 11-1F4 (SEQ ID NO:15)
 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTN
 YHPNLMSRLSISKDISKSQVLFKLNLSLQTD TATYYCVTLDYWGQGTSVTVSS

Последовательность VL 11-1F4 (SEQ ID NO:16)
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIY
 KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

Последовательность CDR-H1 11-1F4 (SEQ ID NO:17)
 GFSLSSYGVS

Последовательность CDR-H2 11-1F4 (SEQ ID NO:18)
 VIWGDGSTNYHPNLMS

Последовательность CDR-H3 11-1F4 (SEQ ID NO:19)

LDY

Последовательность CDR-L1 11-1F4 (SEQ ID NO:20)

RSSQSLVHRNGNTYLH

Последовательность CDR-L2 11-1F4 (SEQ ID NO:21)

KVSNRFS

Последовательность CDR-L3 11-1F4 (SEQ ID NO:22)

FQTTYVPNT

5' спейсерная последовательность (SEQ ID NO:23)

AQAGQAGQAQGGGYS

3' спейсерная последовательность (SEQ ID NO:24)

VTPTV

Конструкция легкой цепи Igp5 (SEQ ID NO:25)

AQAGQAGQAQGGGYSKAQKAQAKQAKQAQKAQKAQAKQAKQVTPTVDVVM
TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

Последовательность р5-3' спейсер-VL 11-1F4 (SEQ ID NO:26)

KAQKAQAKQAKQAQKAQKAQAKQAKQVTPTVDVVMTQTPLSLPVSLGDQASI
SCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDLGLYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

Линкерная последовательность (SEQ ID NO:27)

GGGYS

IGKV2-30*02- человеческая последовательность зародышевой линии (SEQ ID NO:28)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK
VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPP

Последовательность акцептора VL человека (SEQ ID NO:29)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

IGHV4-4*08- человеческая последовательность зародышевой линии (SEQ ID NO:30)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYTSGS
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

Последовательность акцептора VL человека (SEQ ID NO:31)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYTSGS
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYWGQGTSTVTVSS

VL1 (SEQ ID NO:32)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL2 (SEQ ID NO:33)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPRRLIYK

VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL3 (SEQ ID NO:34)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQRPQGSPRLLIYK

VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4 (SEQ ID NO:35)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK VSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-N33S (SEQ ID NO:36)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-N33Q (SEQ ID NO:37)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRQGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-N33E (SEQ ID NO:38)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHREGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-N33A (SEQ ID NO:39)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRAGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-N33H (SEQ ID NO:40)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRHGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-G34A (SEQ ID NO:41)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRAGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VL4-G34V (SEQ ID NO:42)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRVGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK

VH1 (SEQ ID NO:43)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWSIRQPPGKGLEWIGVIWGDG
STNYHPNLMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYWGQGTSVTVSS

VH2 (SEQ ID NO:44)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWSVRQPPGKGLEWLGIWGD
GSTNYHPNLMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYWGQGTSVTVSS

VH3 (SEQ ID NO:45)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWSIRQPPGKGLEWIGVIWGDG
STNYHPNLMSRSLISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVTLDYWGQGTSVTVSS

VH4 (SEQ ID NO:46)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWSVRQPPGKGLEWLGIWGD
GSTNYHPNLMSRSLISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYWGQGTSVTVSS

VH5 (SEQ ID NO:47)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGD
GSTNYHPNLMSRLSISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTLDDYWGQGTSTVTVSS

VH6 (SEQ ID NO:48)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGD
GSTNYHPNLMSRLSISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVTLDDYWGQGTSTVTVSS

VH7 (SEQ ID NO:49)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGDG
STNYHPNLMSRVTISKDTSKNQVLLKLSSVTAADTAVYYCVTLDDYWGQGTSTVTVSS

VH8 (SEQ ID NO:50)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGDG
STNYHPNLMSRVTISKDTSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9 (SEQ ID NO:51)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDG
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH10 (SEQ ID NO:52)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDG
STNYHPNLMSRLSISKDTSKQVLLKLSSVTAADTAVYYCVTLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-D54S (SEQ ID NO:53)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGS
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-D54Q (SEQ ID NO: 54)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGGQ
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-D54E (SEQ ID NO: 55)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGEG
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-D54A (SEQ ID NO: 56)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGAG
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-D54H (SEQ ID NO:57)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGHG
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-G55A (SEQ ID NO:58)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDA
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-G55V (SEQ ID NO:59)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDV
STNYHPNLMSRVTISVDTSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDDYWGQGTSTVTVSS

VH9-M64V (SEQ ID NO:60)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDG
STNYHPNLVSRVTISVDTSKSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS

VH9-M64I (SEQ ID NO:61)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDG
STNYHPNLISRVTISVDTSKSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS

VH9-M64L (SEQ ID NO:62)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDG
STNYHPNLLSRVTISVDTSKSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS

VH9-M64A (SEQ ID NO:63)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWGDG
STNYHPNLASRVTISVDTSKSKQVLFKLSSVTAADTAVYYCATLDYWGQGTSVTVSS

CDR-L1 VL4-N33S (SEQ ID NO: 64)

RSSQSLVHRSGNTYLH

CDR-L1 VL4-N33Q (SEQ ID NO: 65)

RSSQSLVHRQGNTYLH

CDR-L1 VL4-N33E (SEQ ID NO: 66)

RSSQSLVHREGNTYLH

CDR-L1 VL4-N33A (SEQ ID NO: 67)

RSSQSLVHRAGNTYLH

CDR-L1 VL4-N33H (SEQ ID NO: 68)

RSSQSLVHRHGNTYLH

CDR-L1 VL4-G34A (SEQ ID NO: 69)

RSSQSLVHRNANTYLH

VL4-G34V CDR-L1 (SEQ ID NO: 70)

RSSQSLVHRNVNTYLH

VH9-D54S CDR-H2 (SEQ ID NO: 71)

VIWGSSTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-D54Q (SEQ ID NO: 72)

VIWGQGSTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-D54E (SEQ ID NO: 73)

VIWGEGSTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-D54A (SEQ ID NO: 74)

VIWGAGSTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-D54H (SEQ ID NO: 75)

VIWGHGSTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-G55A (SEQ ID NO: 76)

VIWGDASTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-G55V (SEQ ID NO: 77)

VIWGDVSTNYHPNLMS

CDR-H2 VH9-M64V (SEQ ID NO: 78)

VIWGDGSTNYHPNLVS

CDR-H2 VH9-M64I (SEQ ID NO: 79)

VIWGDGSTNYHPNLIS

CDR-H2 VH9-M64L (SEQ ID NO: 80)

VIWGDGSTNYHPNLLS

CDR-H2 VH9-M64A (SEQ ID NO: 81)

VIWGDGSTNYHPNLAS

N-конец легкой цепи Ig (SEQ ID NO: 82)

DVVMTQTP

Короткий жесткий спейсер (SEQ ID NO: 83)

VSPSV

Длинный жесткий спейсер (SEQ ID NO: 84)

VSPSVVSPSV

Короткий гибкий спейсер (SEQ ID NO: 85)

GGSGG

Длинный гибкий спейсер (SEQ ID NO: 86)

GGGGSGGGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:
реактивный к амилоиду пептид; и
антитело, способное индуцировать фагоцитоз и выполнять функцию опсонина, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL), где реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или C-конце тяжелой цепи или легкой цепи,
причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86.
2. Слитый белок антитело-пептид по п. 1, отличающийся тем, что легкая цепь содержит константную область легкой цепи, а тяжелая цепь содержит константную область тяжелой цепи.
3. Слитый белок антитело-пептид по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи.
4. Слитый белок антитело-пептид по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что спейсер выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:86.
5. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что реактивный к амилоиду пептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1-13.
6. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи и при этом каждая легкая цепь связана на C-конце с реактивным к амилоиду пептидом.
7. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.
8. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что антитело связывается с человеческими амилоидными фибриллами.
9. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что
 - a) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19;
 - b) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность,

указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19; или

с) VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64-70, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71-81; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

10. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-8,

отличающийся тем, что VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19.

11. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что:

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:52;

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50; или

VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49.

12. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, а VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55.

13. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что антитело представляет собой полноразмерное антитело.

14. Слитый белок антитело-пептид по п. 13, отличающийся тем, что область Fc относится к изотипу IgG1.

15. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

антитело, которое связывается с амилоидными фибриллами, содержащее первый полипептид и второй полипептид, каждый из которых содержит легкую цепь антитела, и третий и четвертый полипептиды, каждый из которых содержит тяжелую цепь антитела, и реактивный к амилоиду пептид, который связан с N-концом или C-концом легкой цепи или тяжелой цепи, при этом

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91;

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92;

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91; или

первый полипептид и второй полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, и третий и четвертый полипептид включают аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91.

16. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2; и

антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22; при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на C-конце легкой цепи,

при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-24, 27, 83-86.

17. Слитый белок антитело-пептид, содержащий:

реактивный к амилоиду пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2; и

антитело, которое связывается с человеческими амилоидными фибриллами, при этом антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, включающую аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73, и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL содержит CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22; при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи,

при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

18. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что имеет EC50 менее 1,5 нМ для амилоидного субстрата.

19. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что конъюгирован с обнаруживаемой меткой, причем обнаруживаемая метка содержит флуоресцентную метку или радиоактивную метку.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что радиоактивная метка представляет собой I-123, I-124, F-18, ZR-89 или Tc-99m.

21. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что демонстрирует одно или более свойств *in vivo*, выбранных из улучшенного биораспределения, панамилоидной реактивности и усиленного фагоцитоза по сравнению с эталонным антителом IgG.

22. Слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что связывается с фибриллами γ V λ 6Wil, A β , A β (1-40), IAAP, ALk4, Al λ 1, ATTR, α -синуклеина или Tau 441.

23. Композиция, содержащая

слитый белок антитело-пептид, содержащий:

i) реактивный к амилоиду пептид; и

ii) антитело, способное индуцировать фагоцитоз и выполнять функцию опсонина, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на N-конце или С-конце тяжелой цепи или легкой цепи, при этом реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера; и при этом по меньшей мере 90% слитого белка антитело-пептид является интактным.

24. Композиция по п. 23, отличающаяся тем, что интактный слитый белок антитело-пептид включает слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-22.

25. Композиция по п. 23, отличающаяся тем, что композиция содержит не более 10% продукта расщепления, причем продукт расщепления содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце или С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:89, или легкую цепь, в которой отсутствует один или более аминокислотных остатков на N-конце

или С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:91.

26. Композиция по любому из пп. 23-25, отличающаяся тем, что слитый белок антитело-пептид проявляет аффинность связывания EC50 с одним или более амилоидными субстратами, причем аффинность связывания EC50 составляет менее 1,5 нМ.

27. Композиция по любому из пп. 23-26, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

28. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-22.

29. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 28.

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

31. Клетка-хозяин по п. 30, отличающийся тем, что представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку яичника китайского хомячка (СНО).

32. Способ получения слитого белка антитело-пептид, включающий

а) культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий слитый белок антитело-пептид, в условиях перфузионной культуры клеток, подходящих для экспрессии слитого белка антитело-пептид; и

б) выделение слитого белка антитело-пептид примерно каждые 12-36 часов; при этом слитый белок антитело-пептид содержит

i) реактивный к амилоиду пептид; и

ii) антитело, способное индуцировать фагоцитоз и выполнять функцию опсонина, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), при этом реактивный к амилоиду пептид и антитело связаны на С-конце легкой цепи, причем реактивный к амилоиду пептид связан с антителом через спейсер или без спейсера.

33. Способ по п. 32, дополнительно включающий нанесение слитого белка антитело-пептид, полученного на стадии б), на колонку для катионообменной хроматографии и элюирование слитого белка антитело-пептид из колонки для катионообменной хроматографии.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид элюируют отдельно от укороченного слитого белка антитело-пептид.

35. Способ по любому из пп. 32-34, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид включает слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-22.

36. Способ по любому из пп. 32-35, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

37. Способ по любому из пп. 32-36, дополнительно включающий определение чистоты слитого белка антитело-пептид, при этом чистоту слитого белка антитело-пептид определяют с использованием одного или более аналитических методов, включающих капиллярный электрофорез с применением додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН), жидкостную хроматографию (ЖХ), масс-спектрометрию (МС) или их комбинацию.

38. Способ по любому из пп. 32-37, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид очищают по меньшей мере до 90% интактного слитого белка антитело-пептид.

39. Слитый белок антитело-пептид, полученный с помощью способа по любому из пп. 32-38.

40. Способ лечения субъекта, имеющего связанное с амилоидом нарушение, характеризующееся амилоидными отложениями, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка антитело-пептид по любому из пп. 1-22 и 39 или композиции по любому из пп. 23-27.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что связанное с амилоидом нарушение представляет собой системный или локализованный амилоидоз.

42. Способ по п. 40 или п. 41, отличающийся тем, что связанное с амилоидом нарушение выбрано из группы, состоящей из AL-, AH-, A β 2M-, ATTR-, транстиретинового амилоидоза, AA-, A α oAI-, A α oAII-, AGel-, ALys-, ALect2-, AFib-, ACys-, ACal-, AMed-, AIAPP-, APro-, AIns-, APrP-амилоидоза, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера или A β -амилоидоза.

43. Способ по любому из пп. 40-42, отличающийся тем, что амилоидные отложения опсонизируются слитым белком антитело-пептид.

44. Способ по любому из пп. 40-43, отличающийся тем, что лечение субъекта слитым белком антитело-пептид вызывает фагоцитоз амилоидных отложений.

45. Способ лечения субъекта, страдающего связанным с амилоидом заболеванием, или субъекта с подозрением на связанное с амилоидом заболевание, включающий:

а) определение наличия у субъекта амилоидного отложения путем:

i) введение субъекту слитого белка антитело-пептид по любому из пп. 1-22 и 39 или композиции по любому из пп. 23-27, причем слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и

ii) определения того, может ли быть обнаружен сигнал, связанный с обнаруживаемой меткой, у субъекта; и

б) если сигнал обнаружен, введение субъекту средства для лечения амилоидоза.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что, если сигнал не обнаружен, за субъектом наблюдают на предмет последующего формирования амилоидного отложения.

47. Способ по п. 45 или п. 46, дополнительно включающий определение интенсивности сигнала и сравнение сигнала с пороговым значением, при превышении которого у субъекта определяется наличие амилоидного отложения.

48. Способ по любому из пп. 45-47, отличающийся тем, что слитый белок антитело-пептид выявляют с помощью ОФЭКТ/КТ, ПЭТ/КТ, гамма-сцинтиграфии или оптической визуализации.

49. Способ по любому из пп. 45-48, отличающийся тем, что лечение амилоидоза включает введение субъекту слитого белка антитело-пептид по любому из пп. 1-22 и 39 или композиции по любому из вариантов осуществления 23-27.

50. Способ идентификации амилоидных отложений у субъекта, включающий

введение слитого белка антитело-пептид по любому из пп. 1-22 и 39 или композиции по любому из пп. 23-27, при этом слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, и обнаружение сигнала от слитого белка антитело-пептид.

51. Способ мониторинга клиренса амилоида у субъекта,

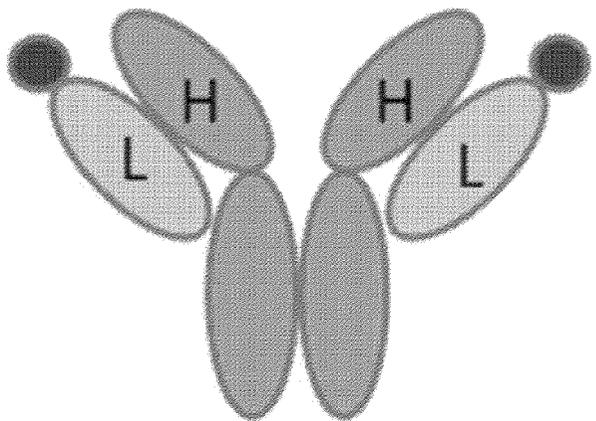
включающий приведение в контакт амилоидного субстрата у субъекта со слитым белком антитело-пептид по любому из пп. 1-22 и 39 или композиции по любому из пп. 23-27, при этом слитый белок антитело-пептид содержит обнаруживаемую метку, причем пептид слитого белка антитело-пептид обладает аффинностью связывания с амилоидным субстратом; и

определение сигнала от обнаруживаемой метки, тем самым обнаруживая клиренс амилоида.

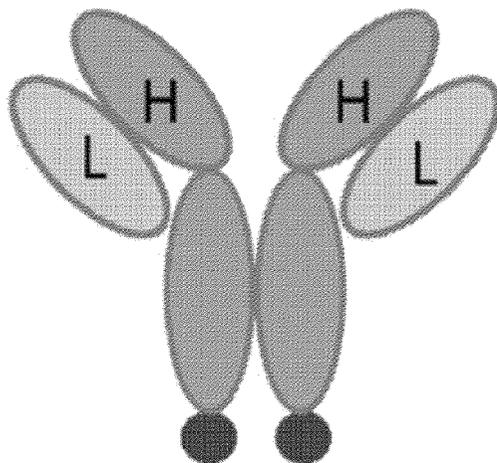
52. Способ по любому из пп. 40-51, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

53. Набор, содержащий слитый белок антитело-пептид по любому из пп. 1-22 и 39 или композицию по любому из пп. 23-27, для применения в способе по любому из пп. 40-52.

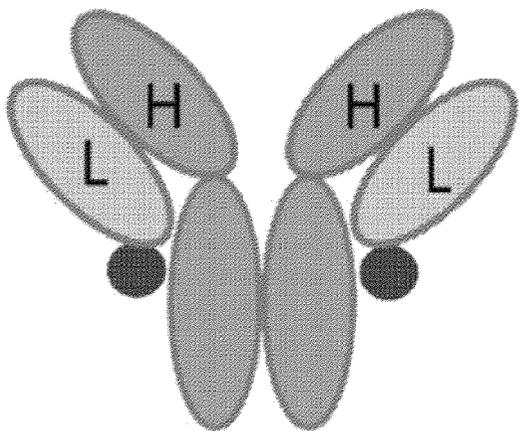
По доверенности



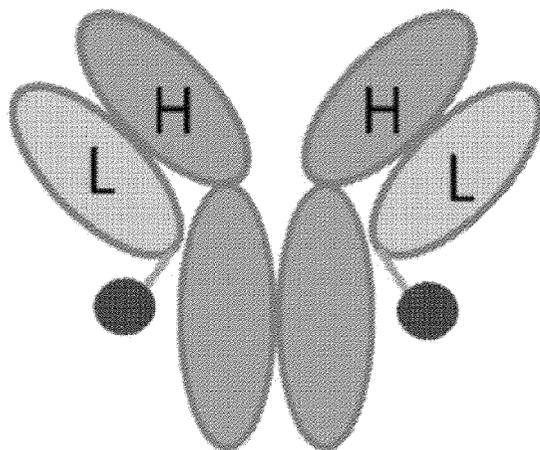
ФИГ. 1



Фиг. 2

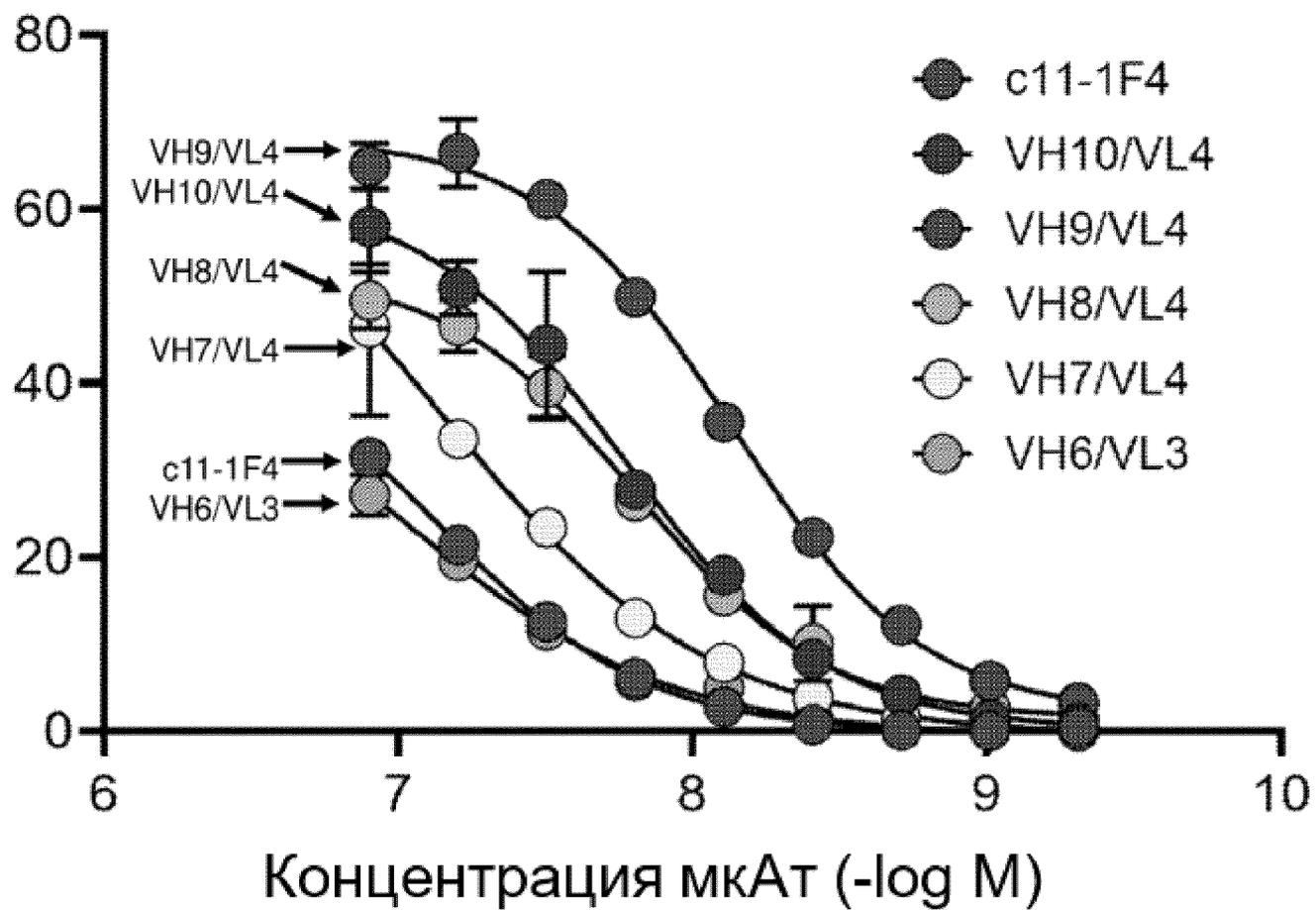


ФИГ. 3

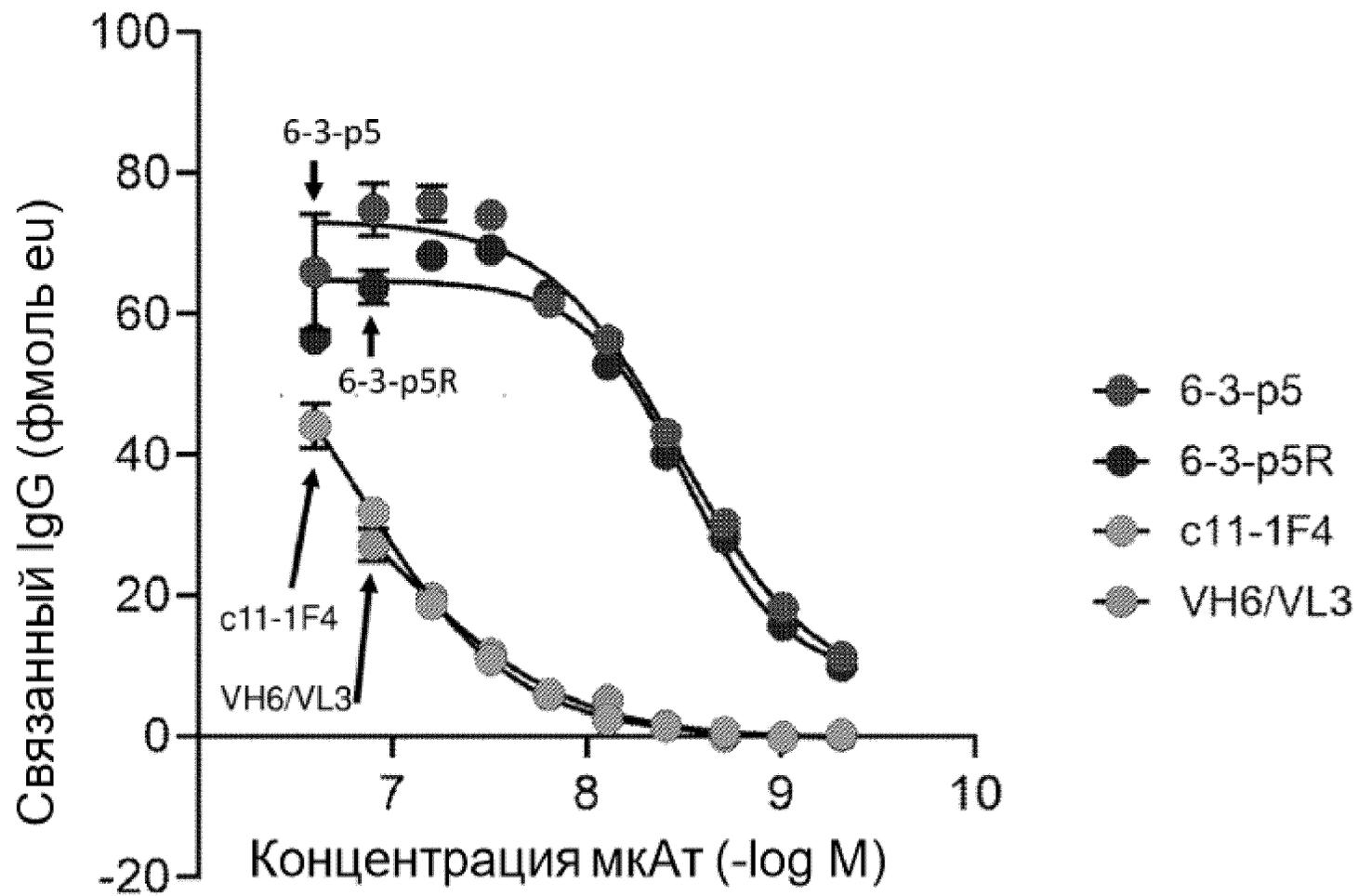


ФИГ. 4

Связанный реагент (фмоль европия)

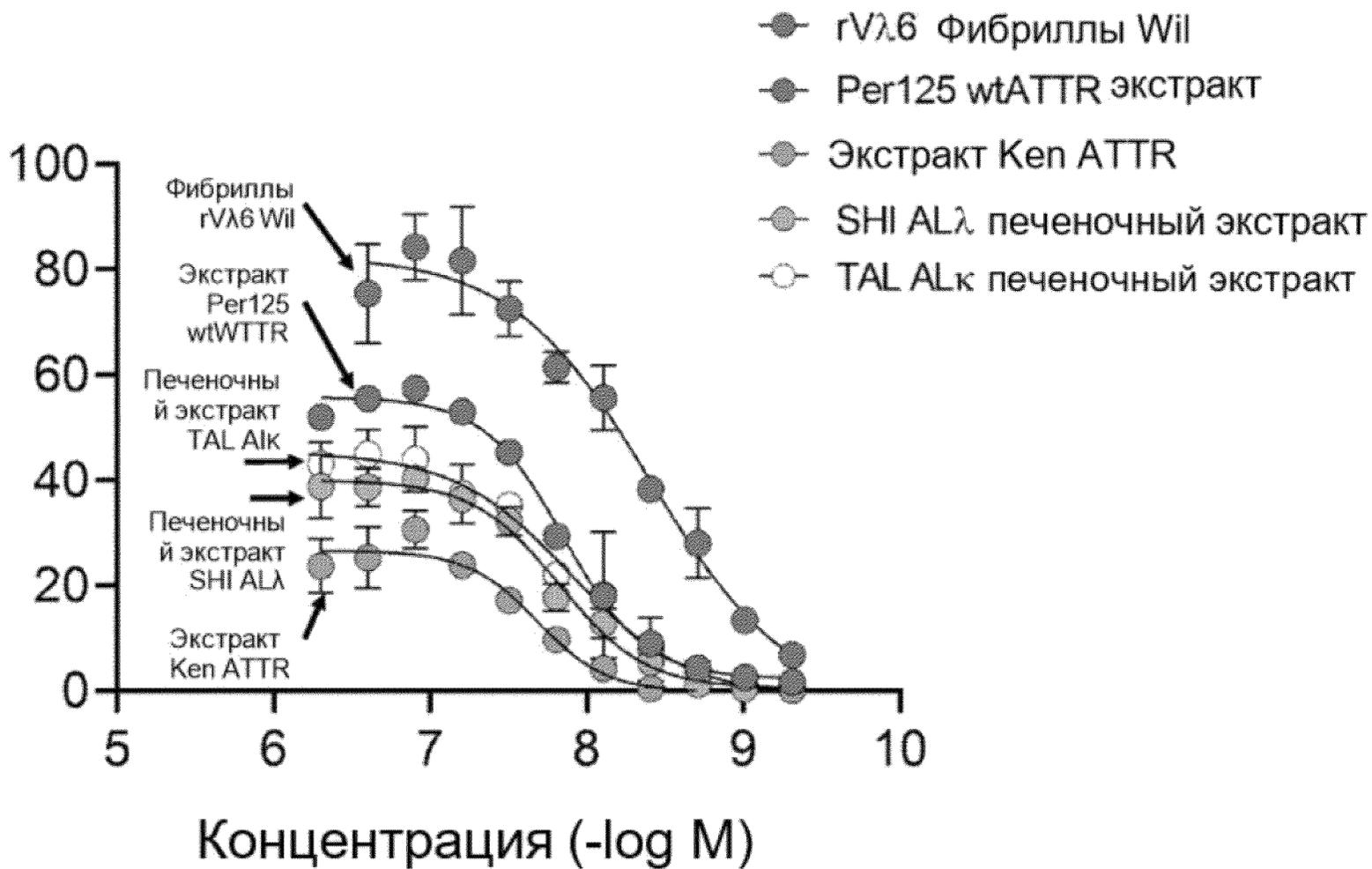


ФИГ. 5А



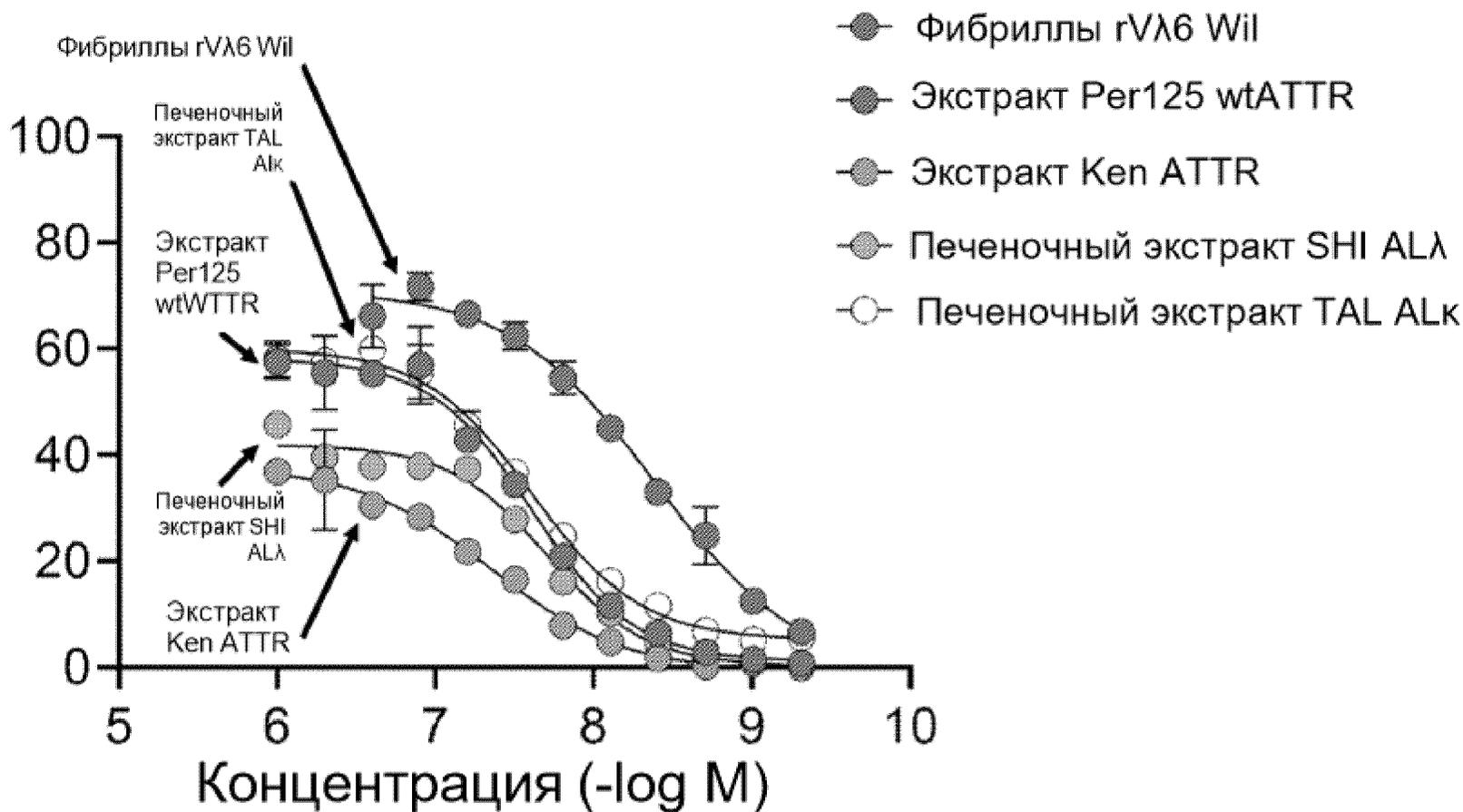
ФИГ. 5В

Связанный V_{H9/VL4}-p5R (фмоль eu)

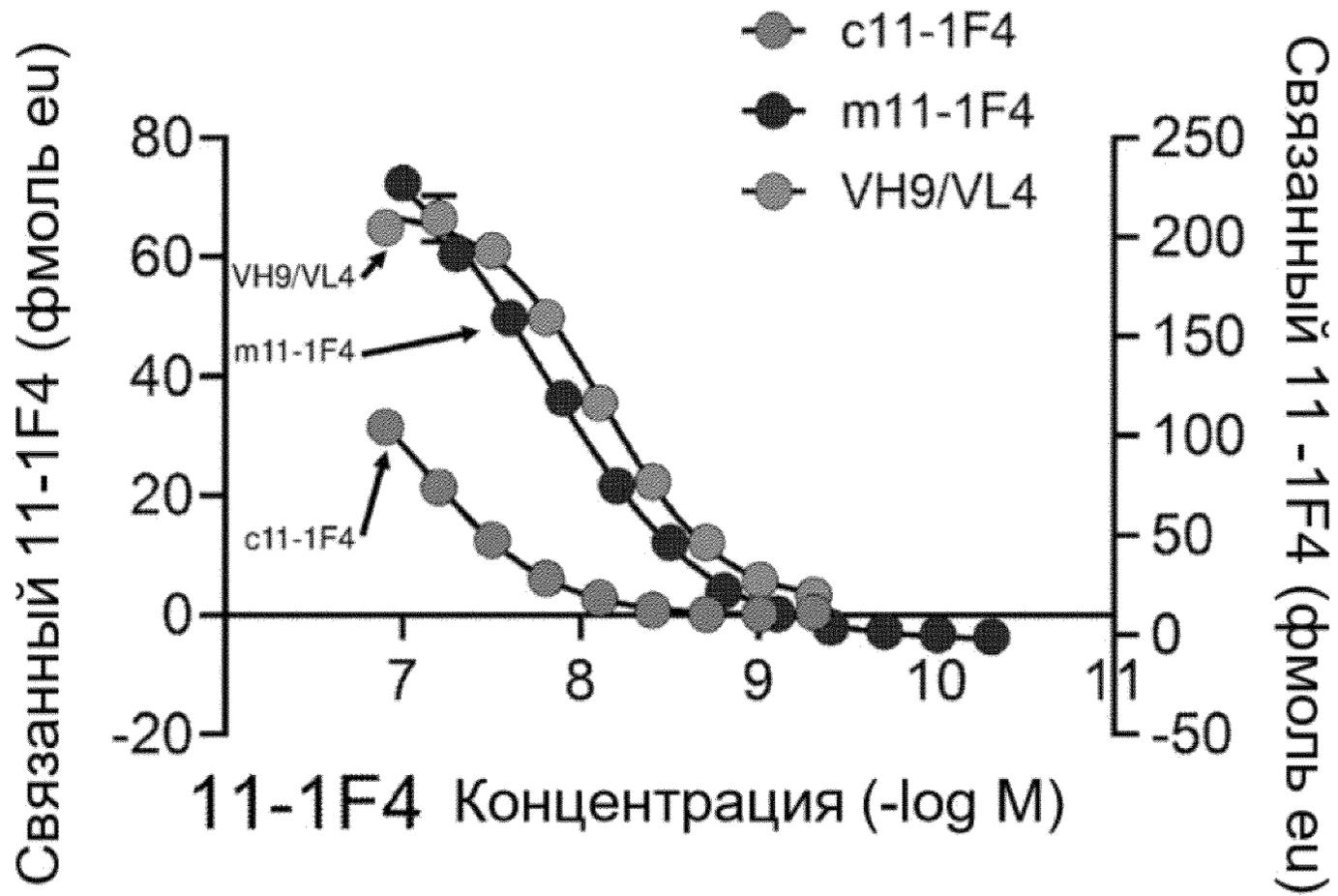


ФИГ. 5С

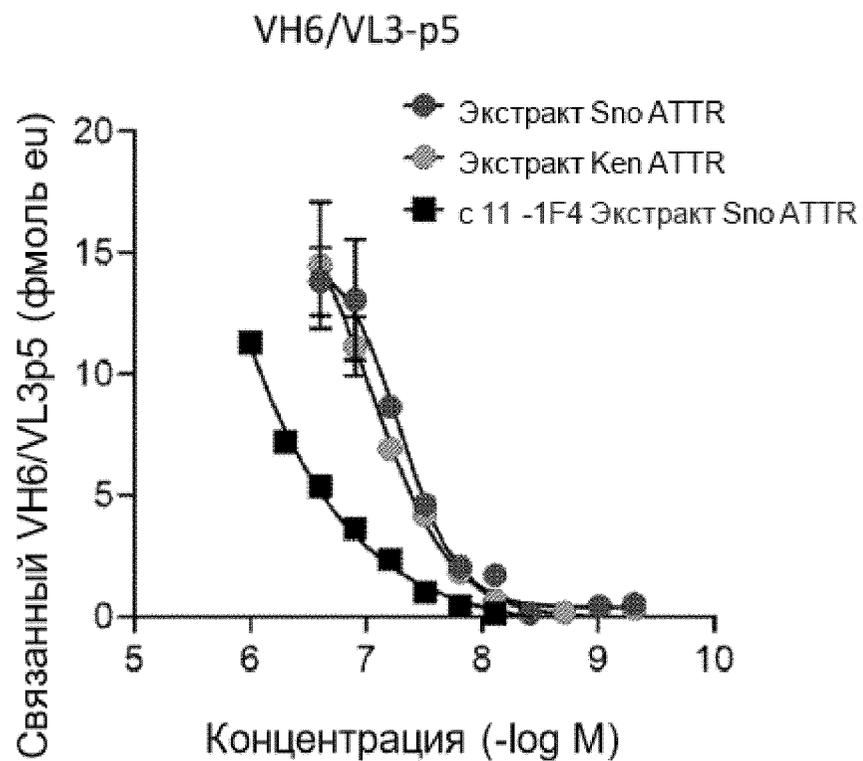
Связанный VH9/VL4-p5 (фмоль eu)



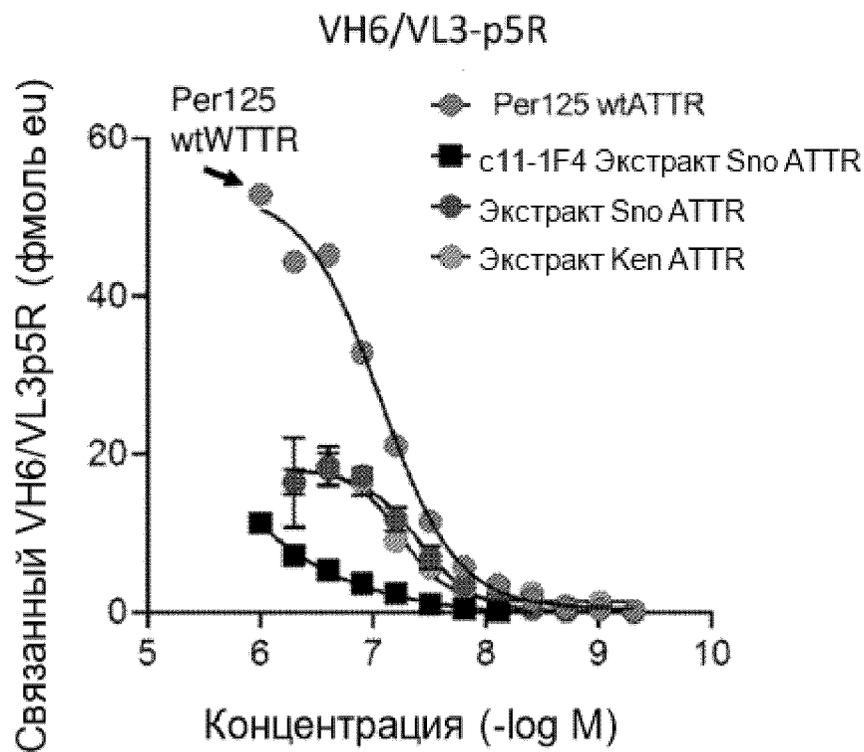
ФИГ. 5D



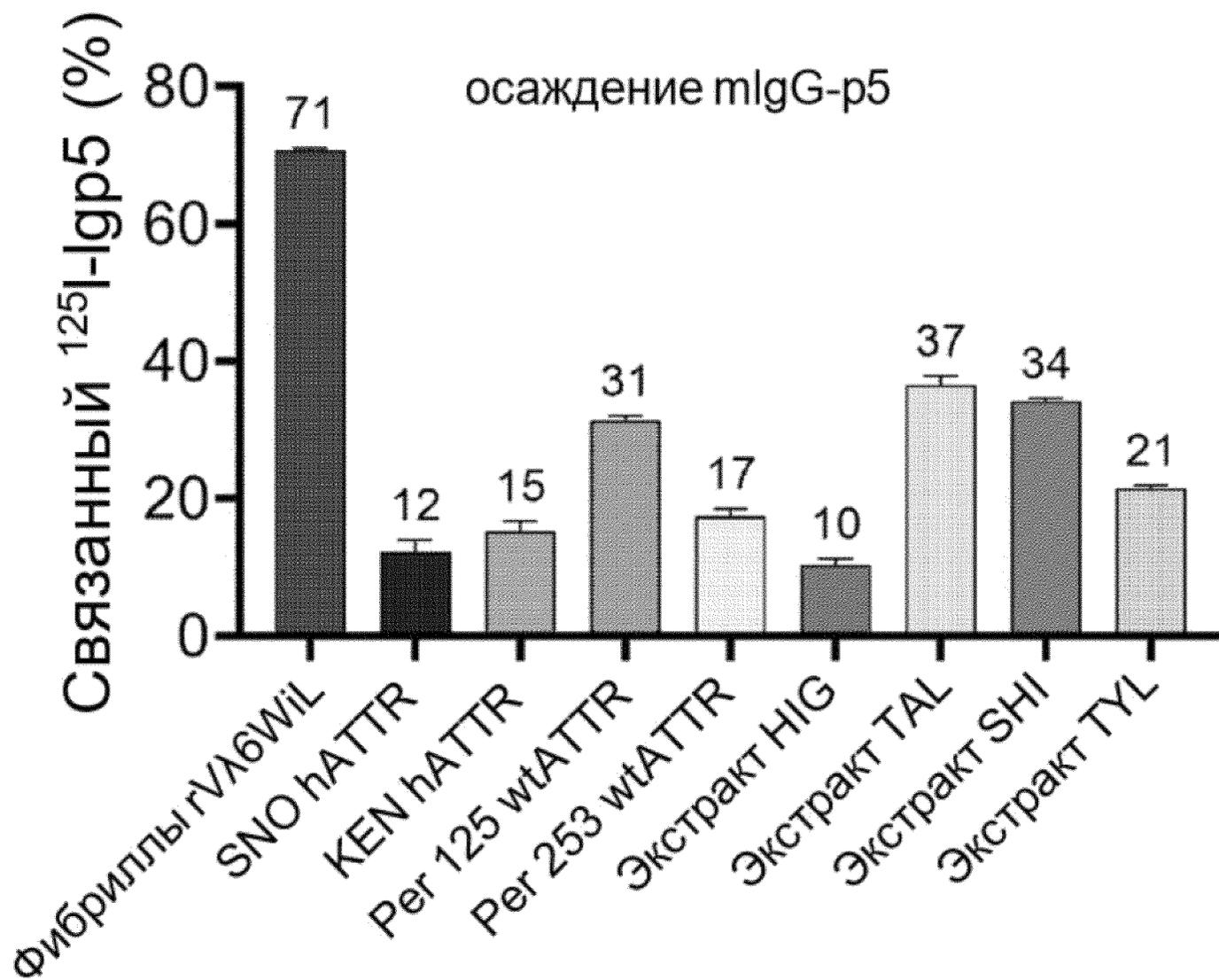
ФИГ. 5Е



ФИГ. 5F

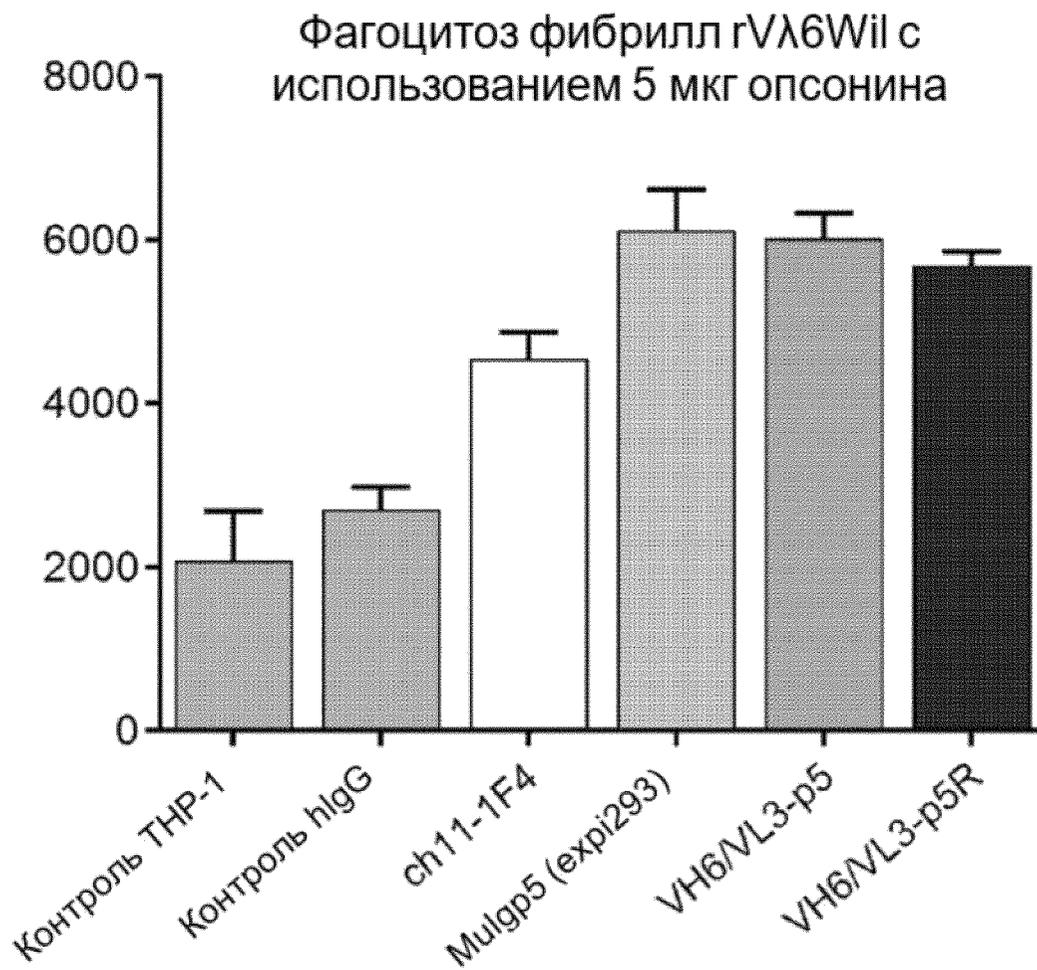


ФИГ. 5G

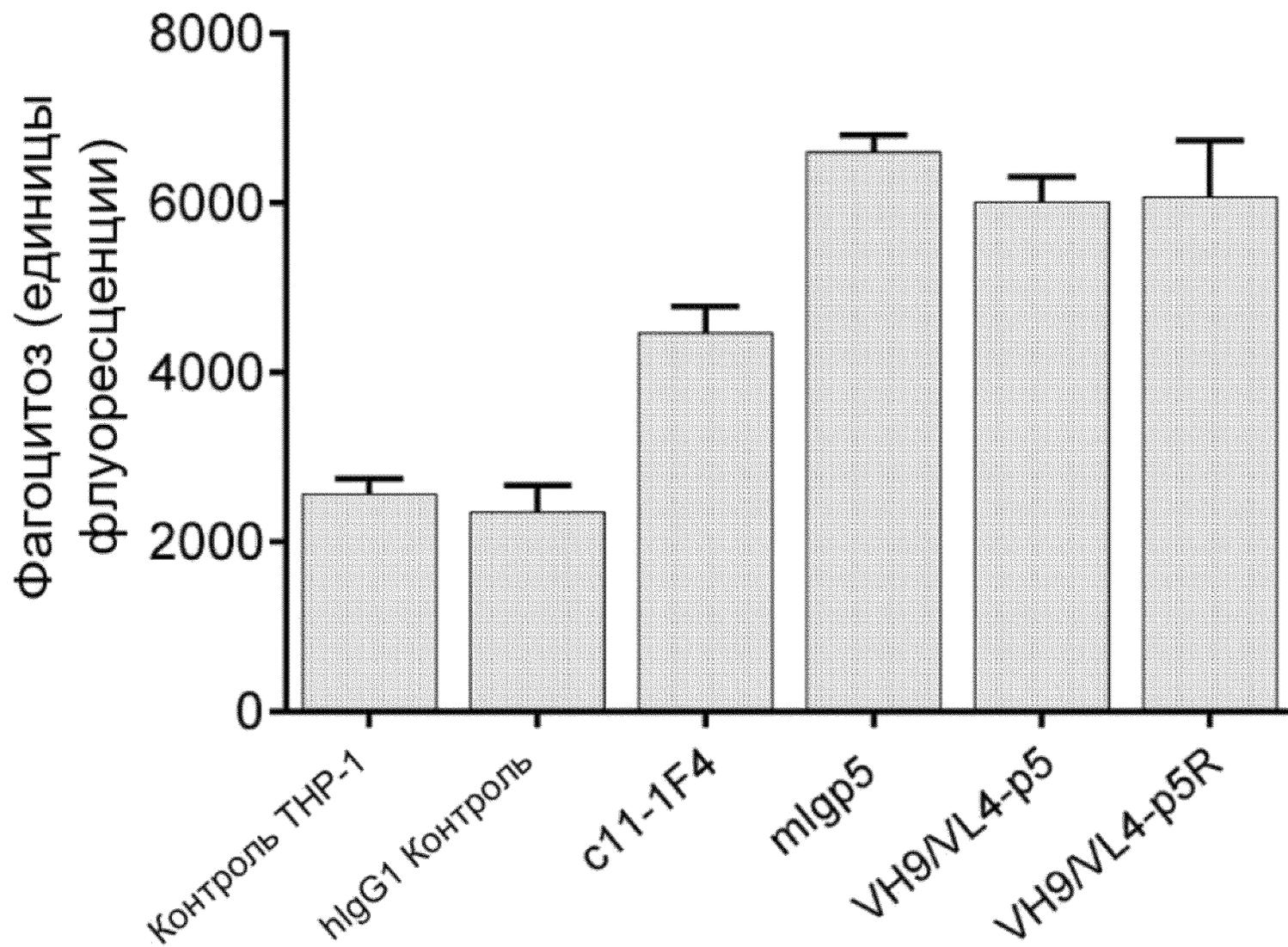


ФИГ. 6

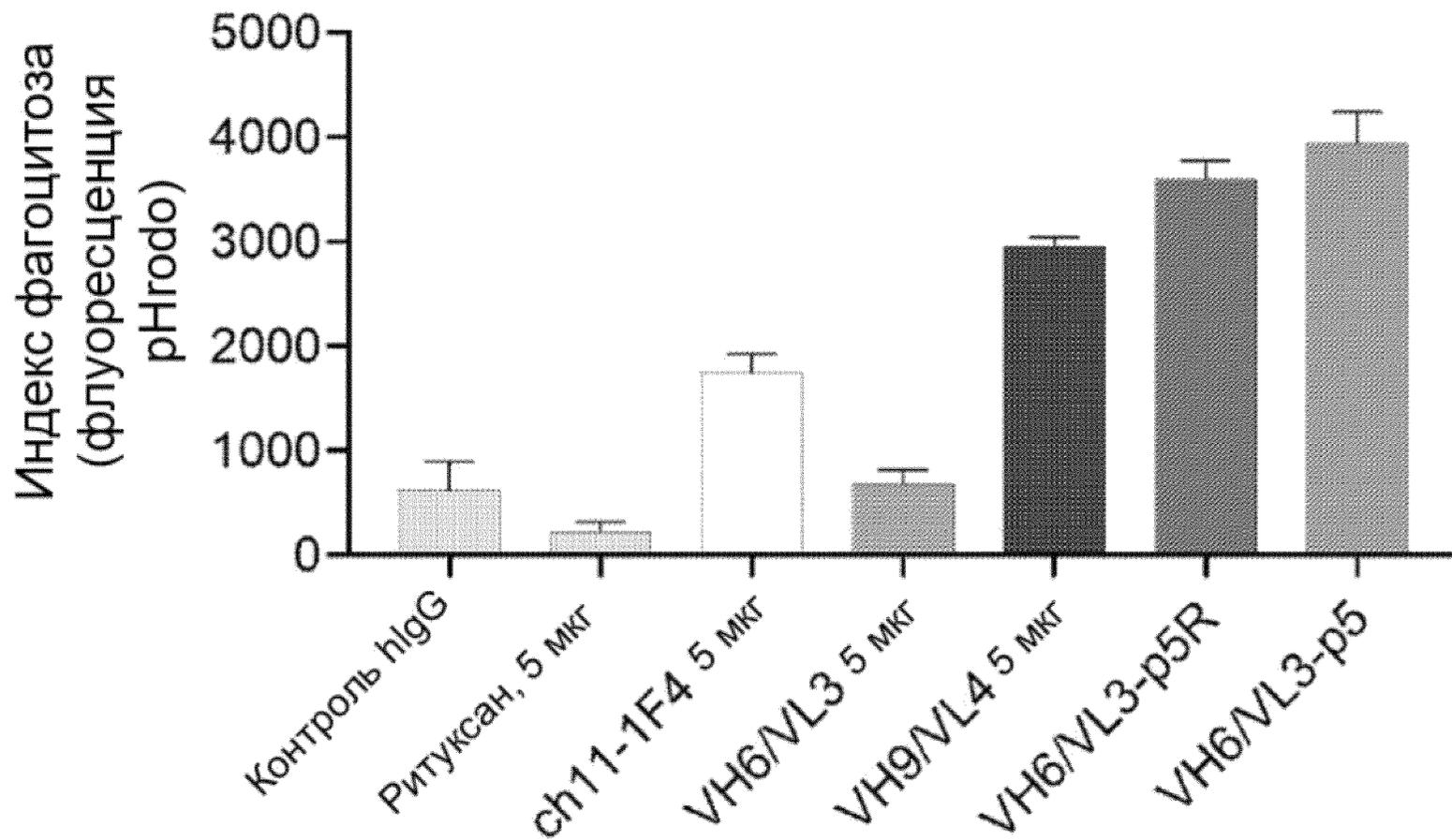
Поглощение фибрилл гVЛ6Wii (единицы флуоресценции)



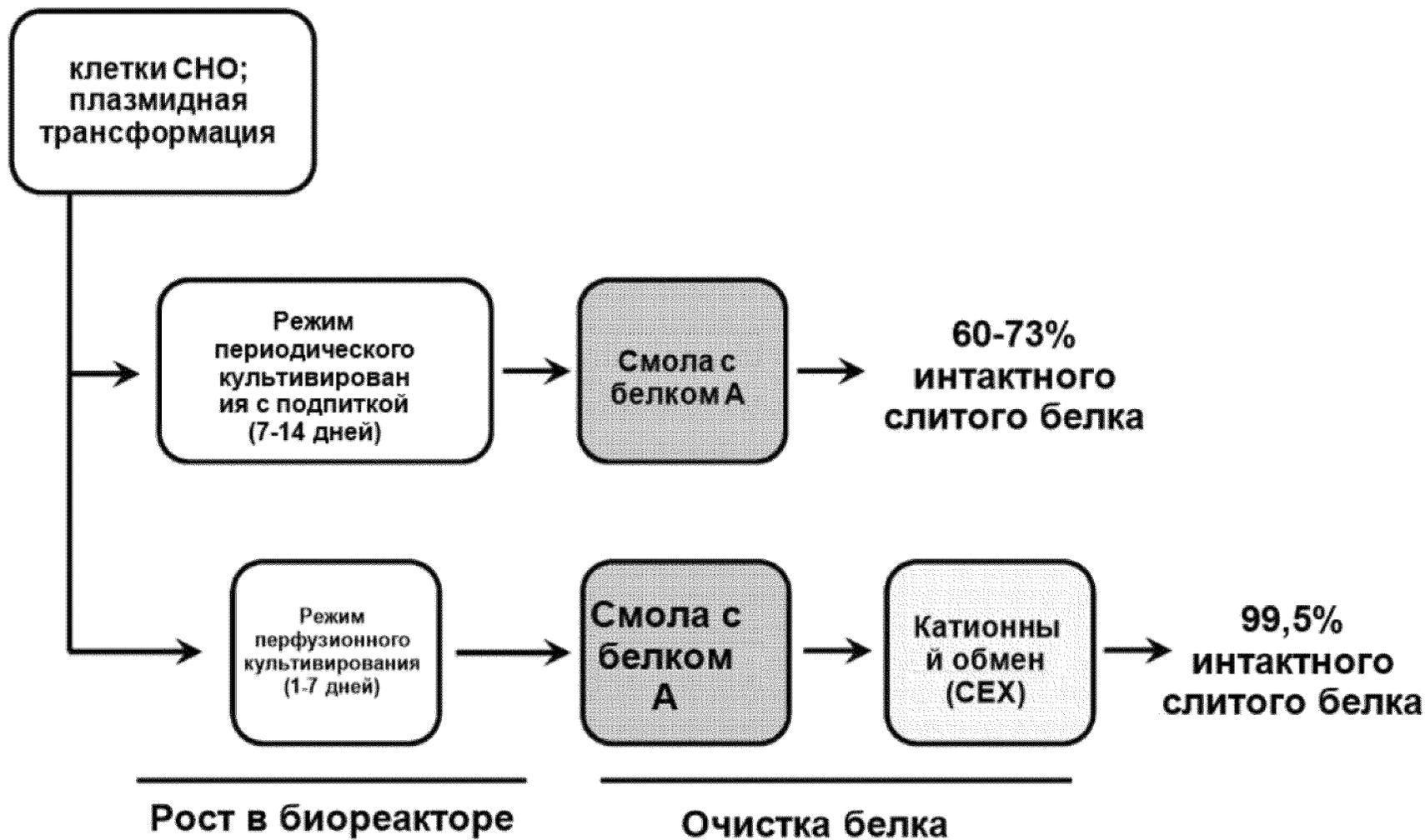
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В



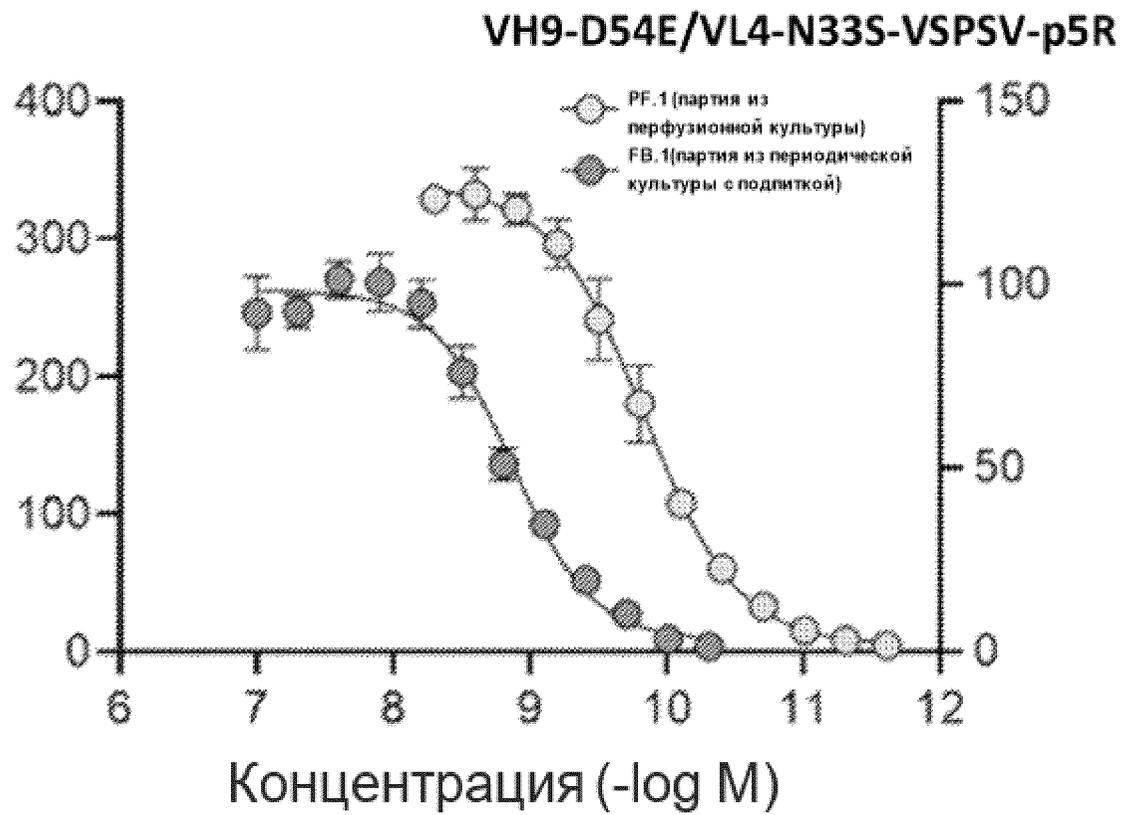
ФИГ. 7С



12/27

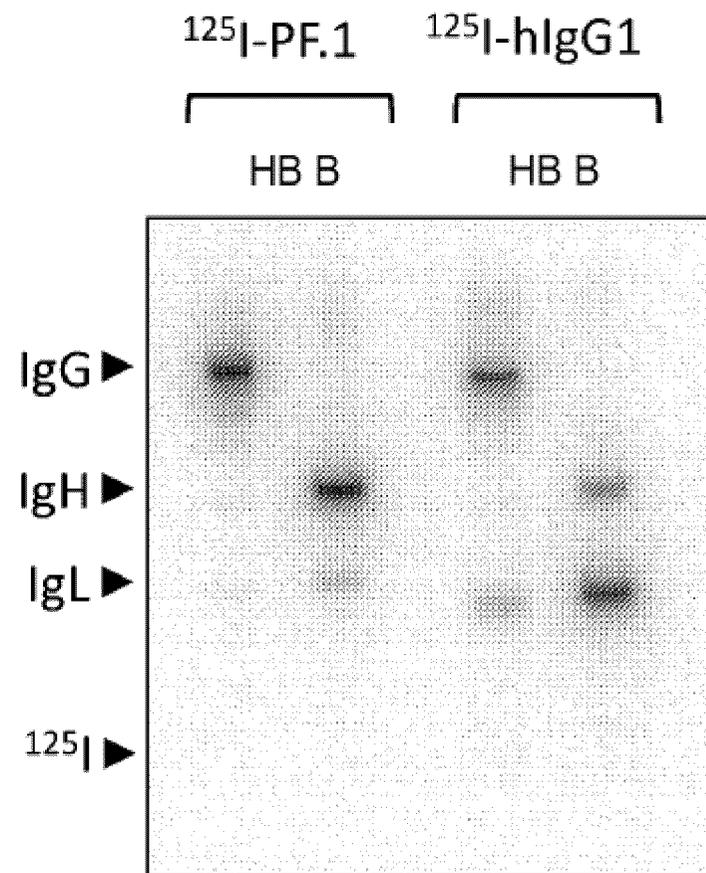
ФИГ. 8А

Связанный FB.1 (партия из
периодической культуры с подпиткой)
(фмогель, европий)



Связанный PF.1 (партия из перфузионной культуры)
(фмогель, европий)

ФИГ. 8В



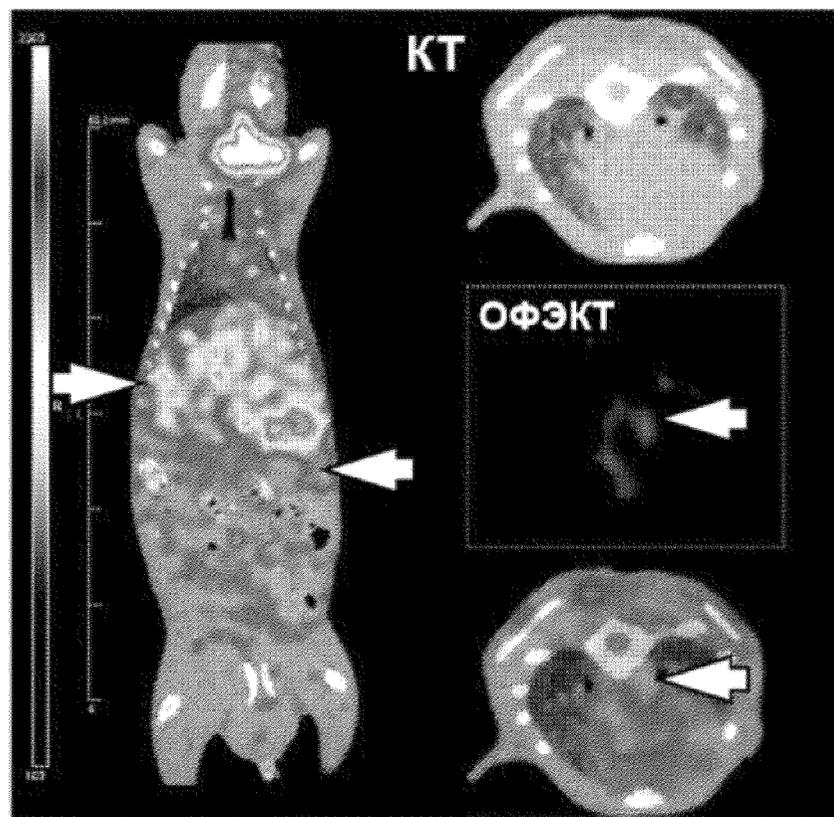
ФИГ. 9А

^{125}I -PF.1

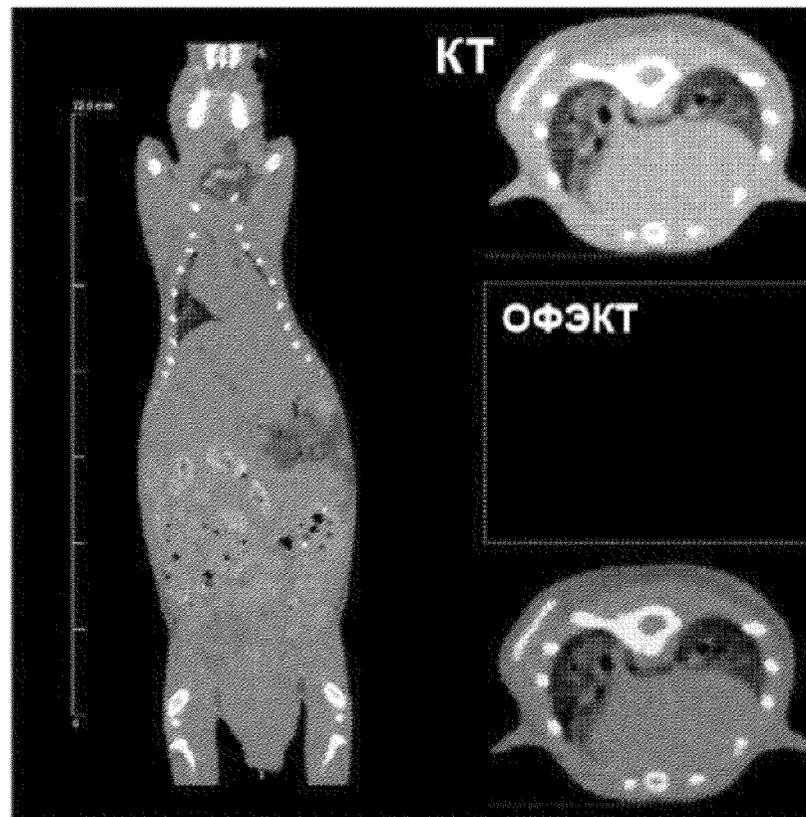
^{125}I -PF.1 - сердце

^{125}I -hlgG1

^{125}I -hlgG1 - сердце

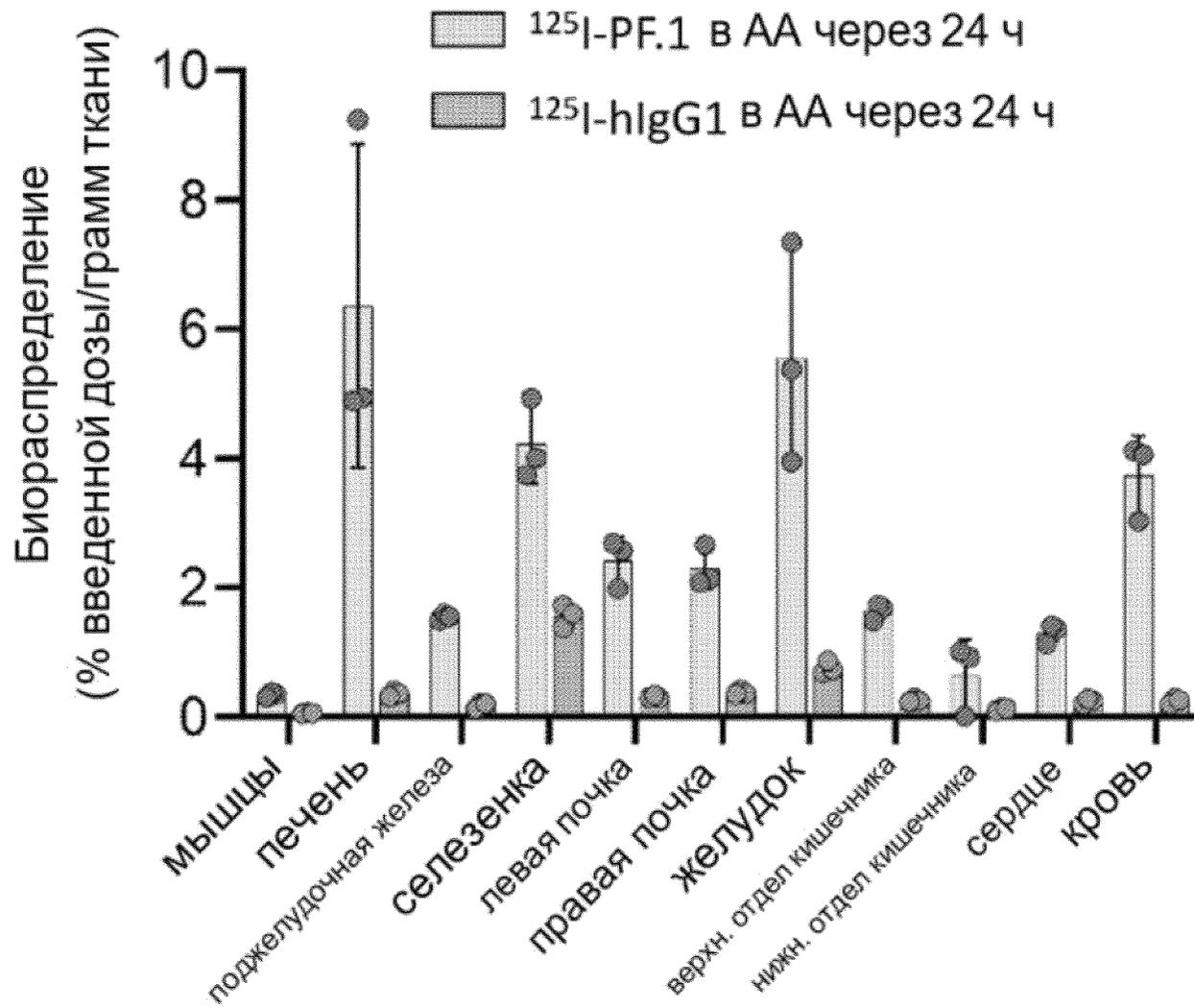


ОФЭКТ/КТ

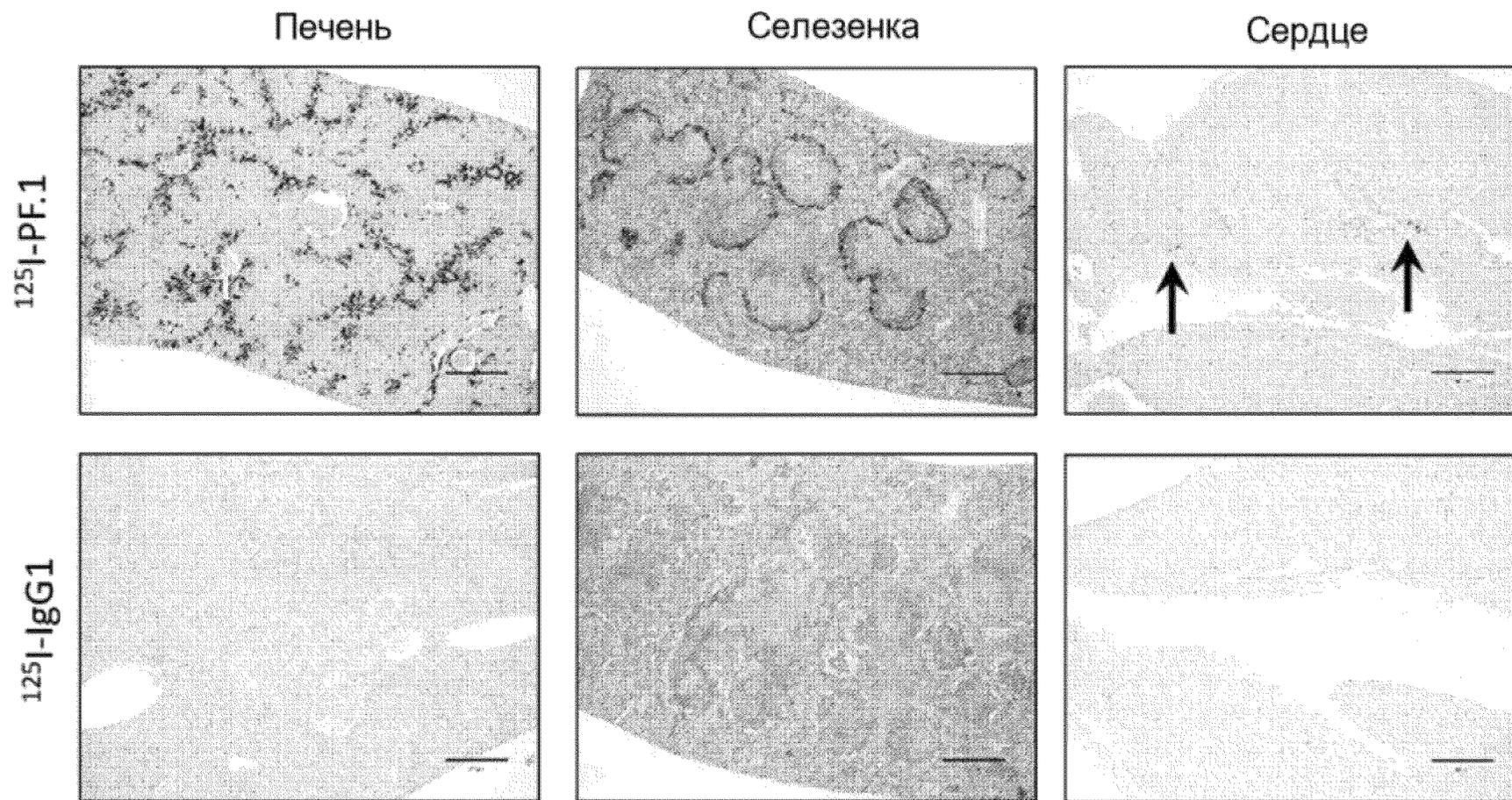


ОФЭКТ/КТ

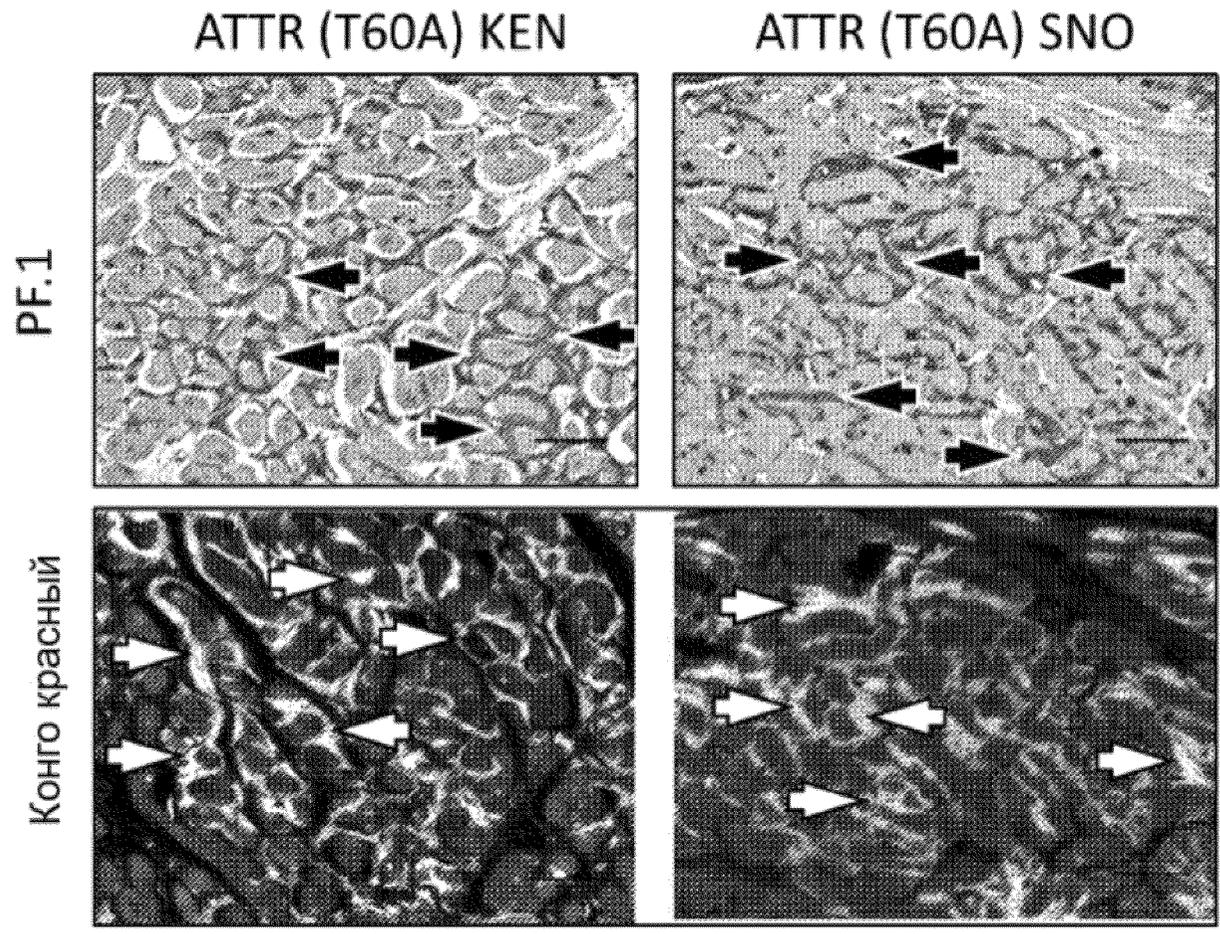
ФИГ. 9В



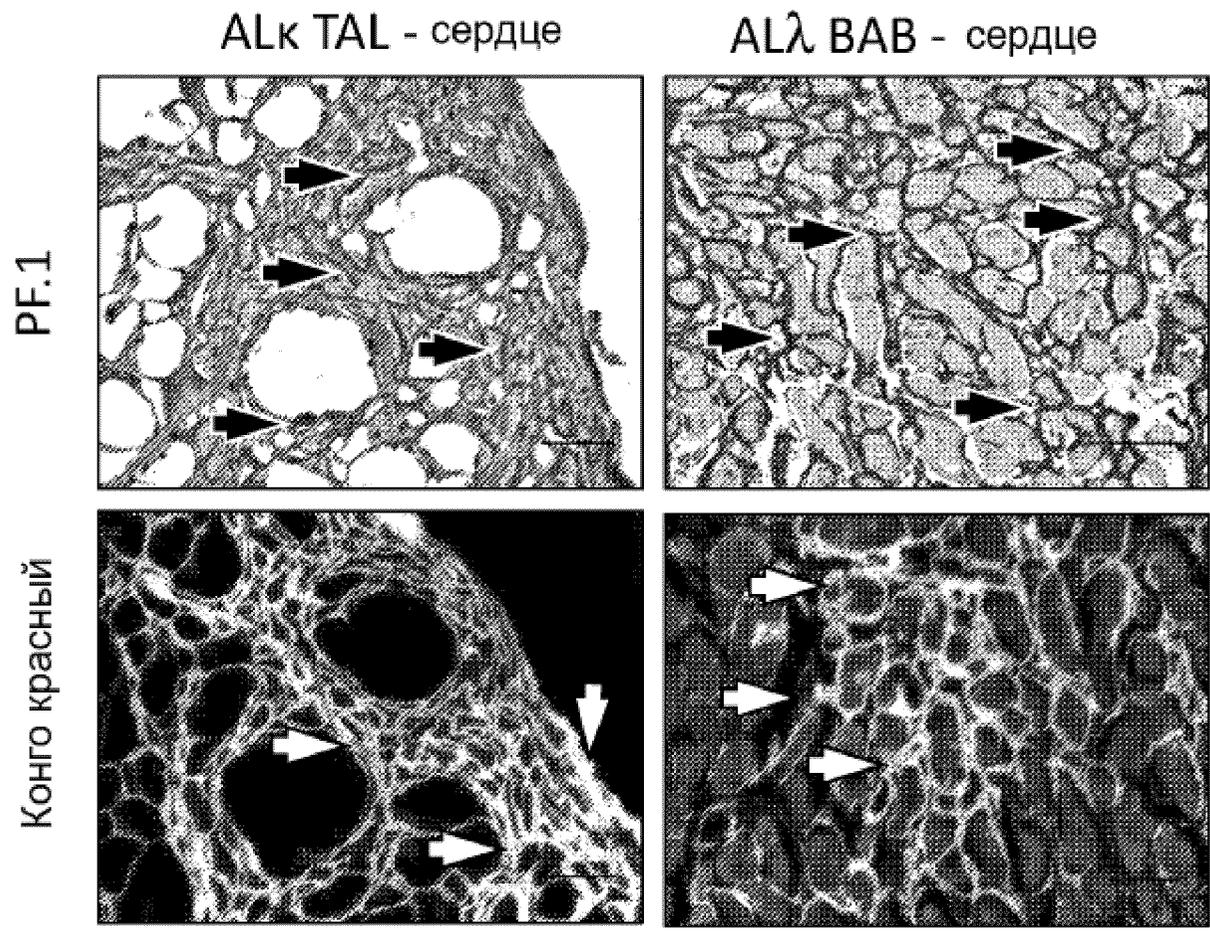
ФИГ. 9С



ФИГ. 9D



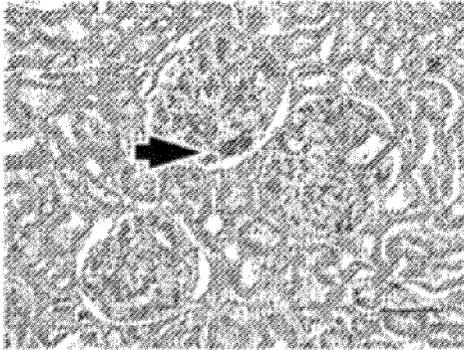
ФИГ. 10А



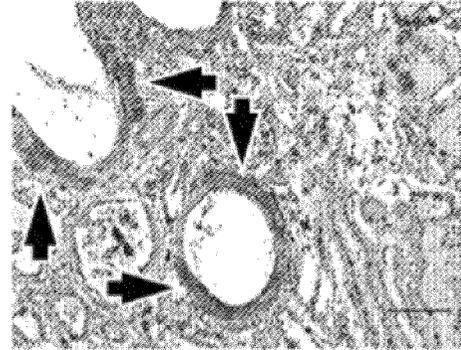
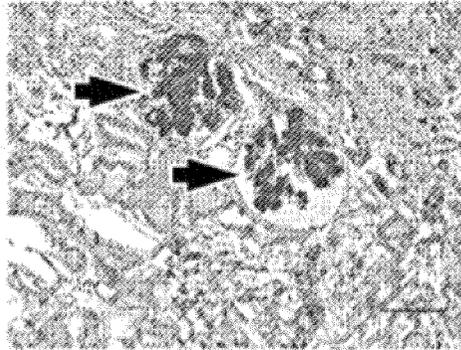
ФИГ. 10В

PF.1

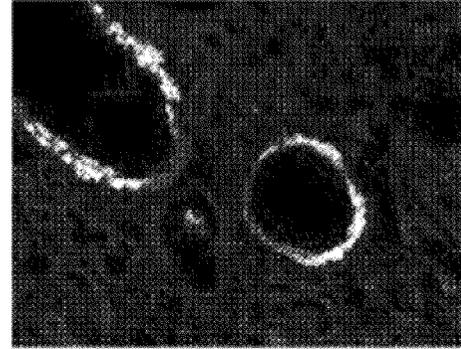
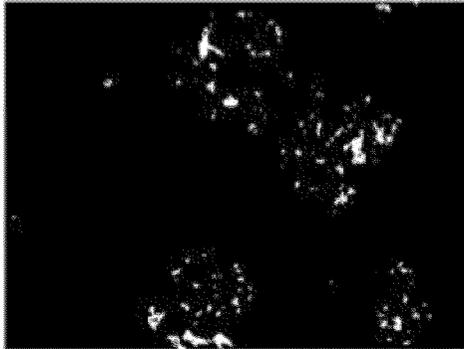
ALκ HUN - почка



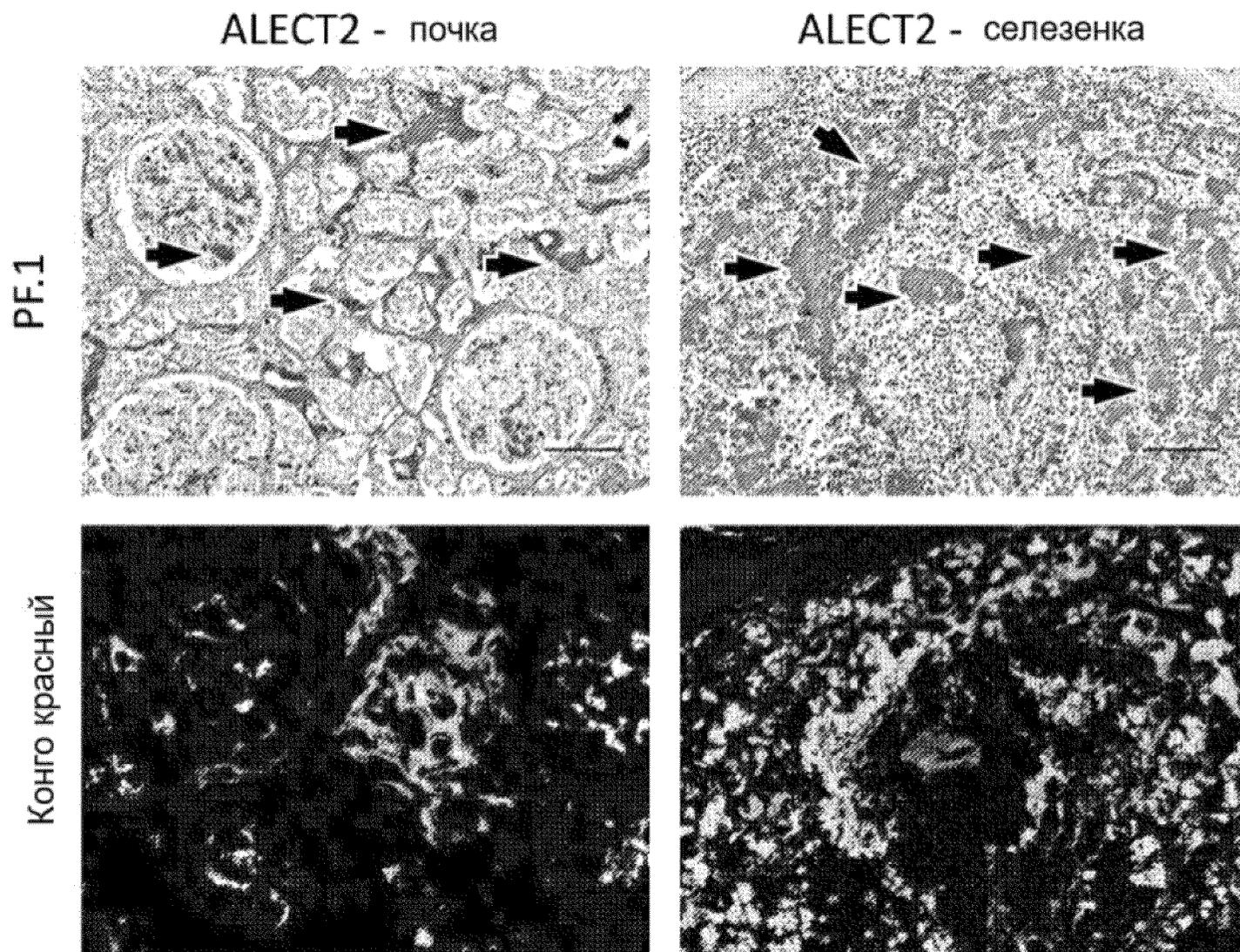
ALλ JON - почка



Конго красный



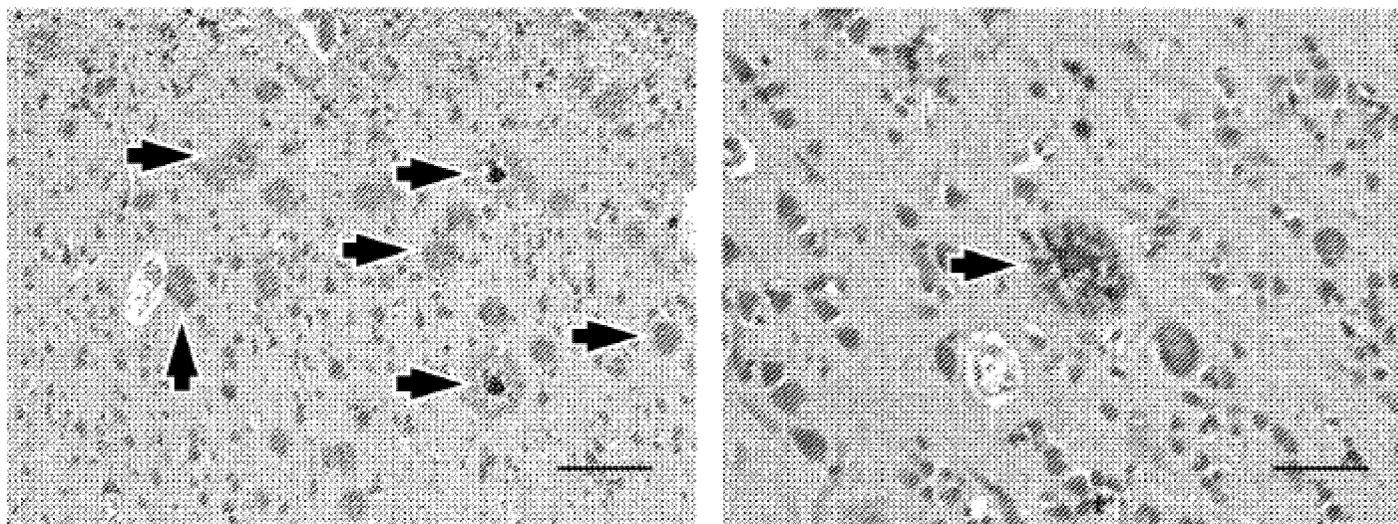
ФИГ. 10С



ФИГ. 10D

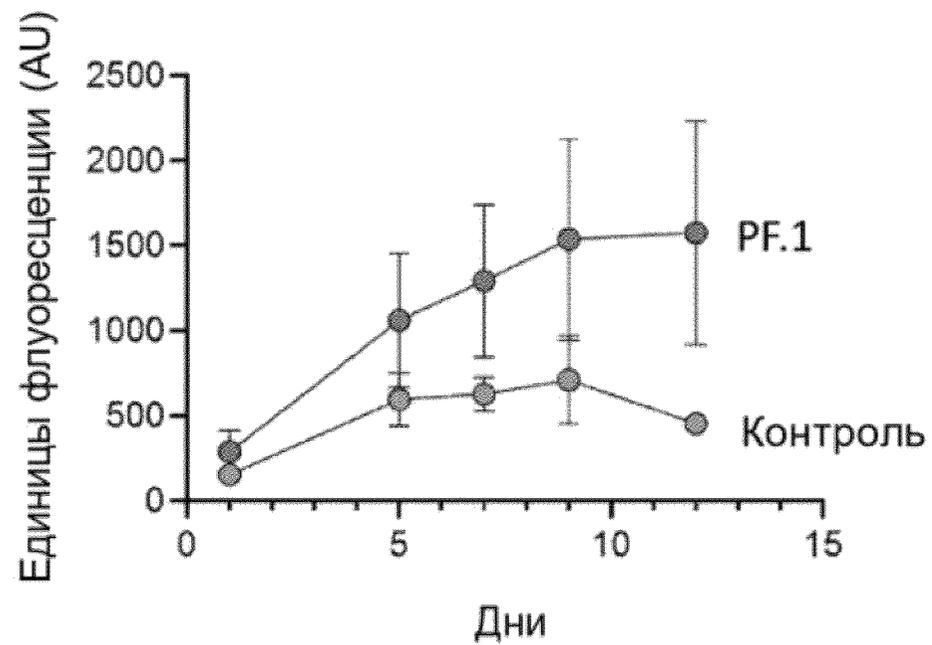
Болезнь Альцгеймера - головной мозг

PF.1

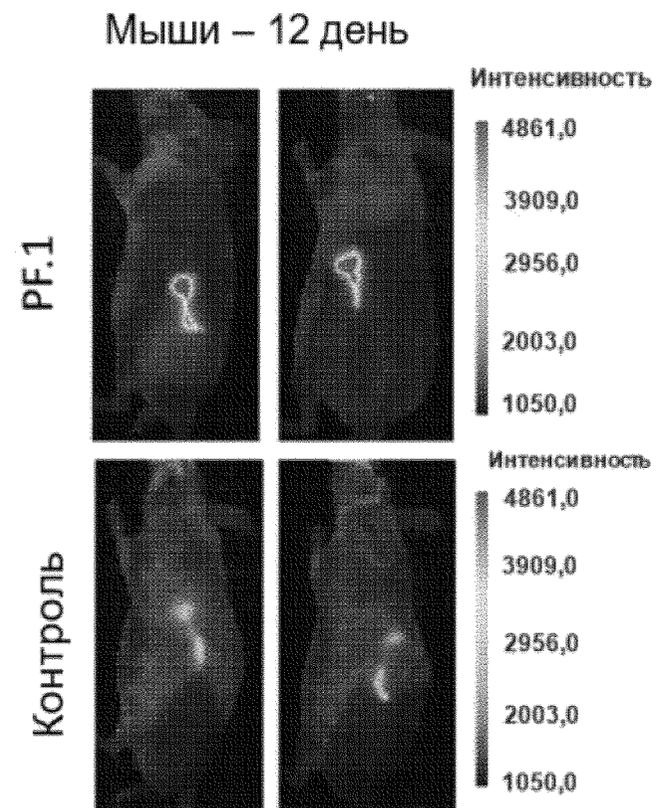


ФИГ. 10Е

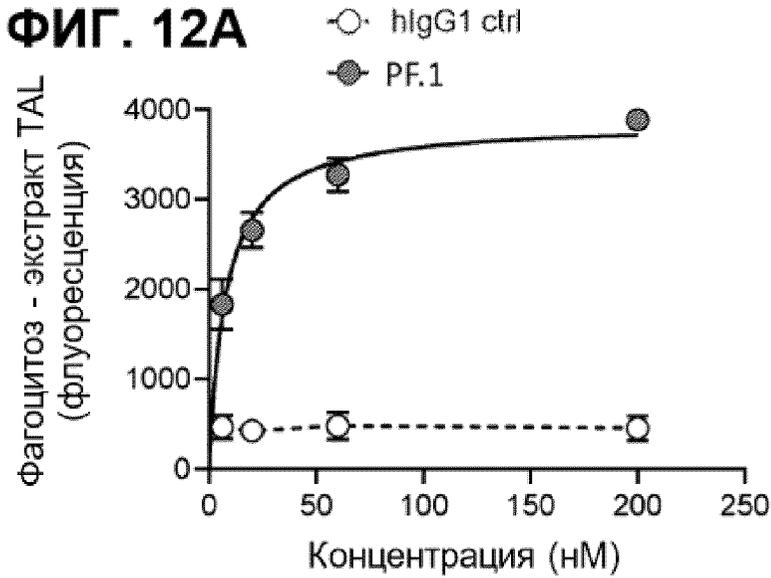
ФИГ. 11А



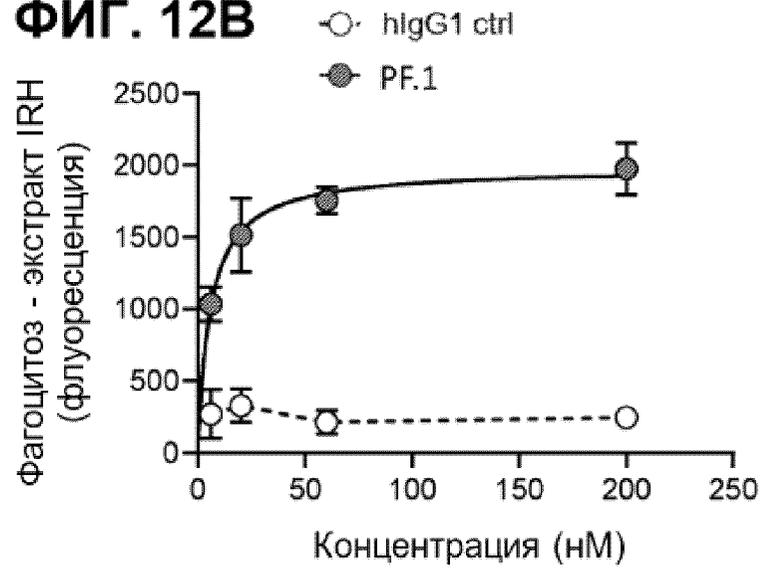
ФИГ. 11В



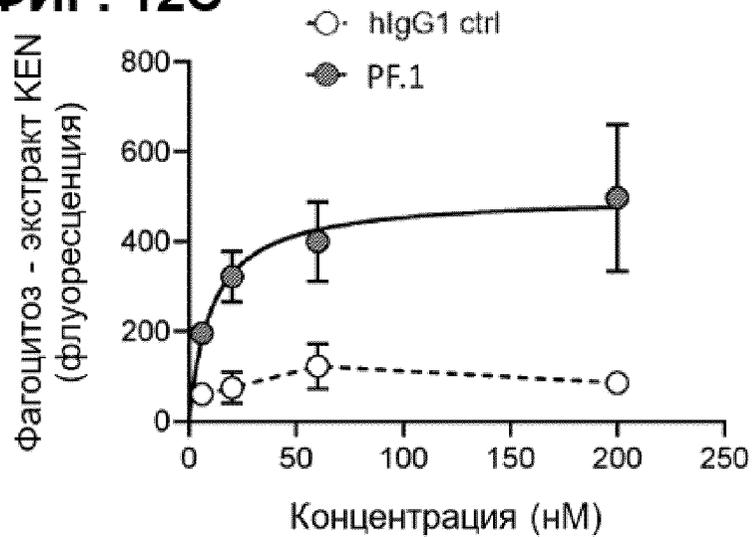
ФИГ. 12А



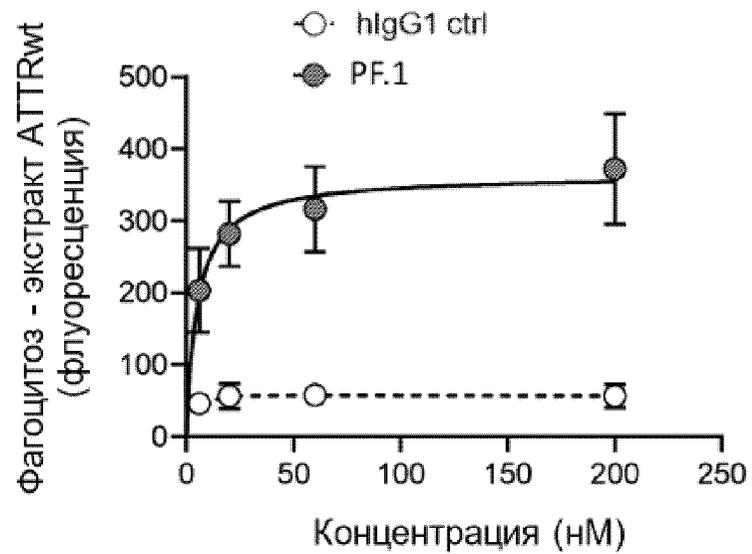
ФИГ. 12В



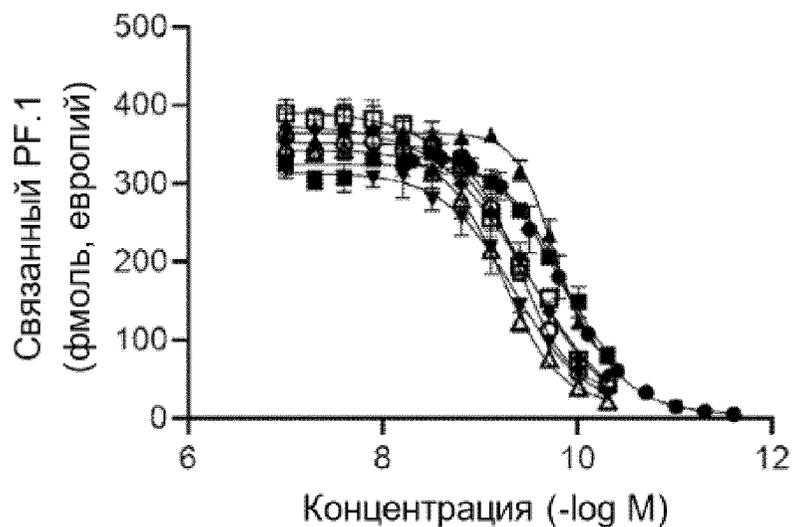
ФИГ. 12С



ФИГ. 12D

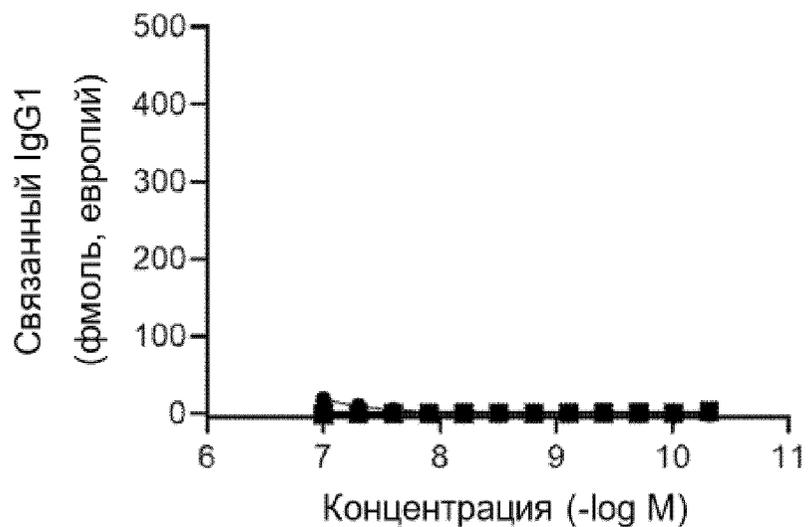


ФИГ. 13А

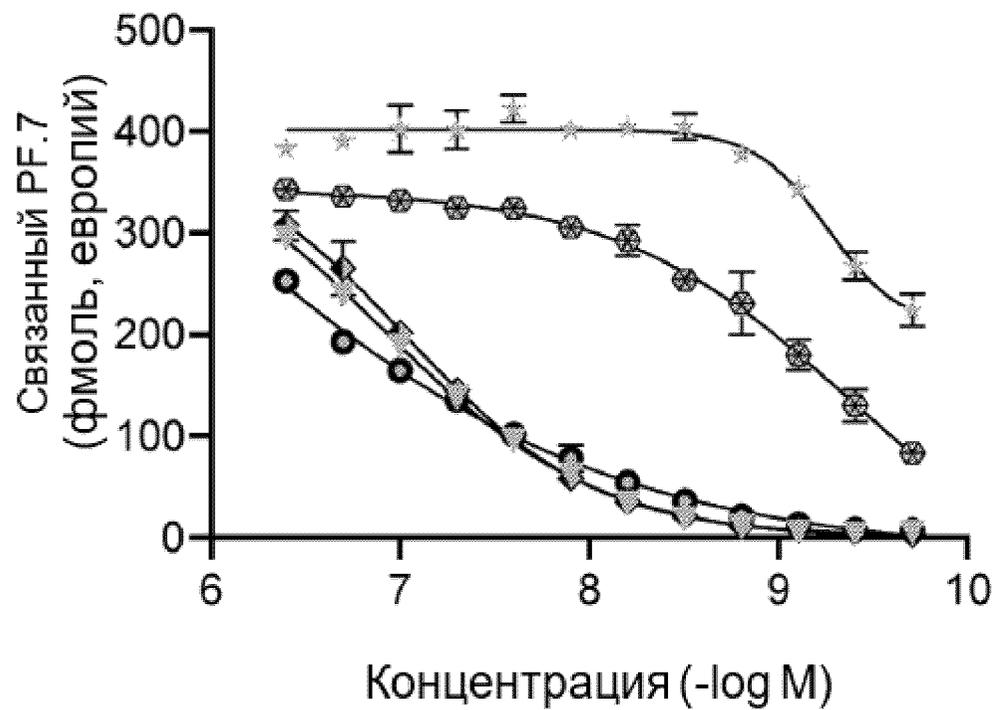


- rV λ 6 Фибриллы Wil
- A β (1-40) фибриллы
- ▲ ATTRwt (125)
- ▼ ATTRv (T60A; KEN)
- ◆ AL λ (SHI)
- AL κ (TAL)
- AL λ (BAL)
- △ AL κ (GRA)

ФИГ. 13В

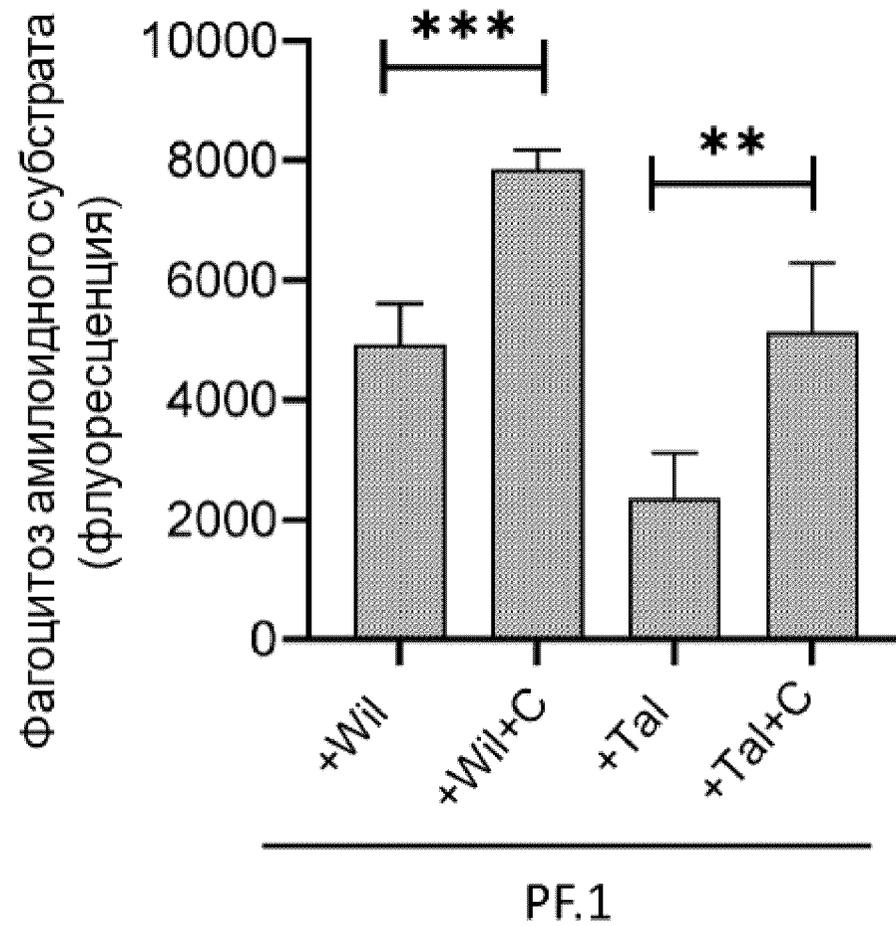


- rV λ 6 Фибриллы Wil
- A β (1-40) фибриллы
- ▲ ATTRwt (125)
- ▼ ATTRv (T60A; KEN)
- ◆ AL λ (SHI)
- AL κ (TAL)
- AL λ (BAL)
- △ AL κ (GRA)



- ▽ фибриллы α-синуклеина (0,14 мкМ)
- фибриллы Тау 441 (0,14 мкМ)
- ◇ фибриллы Aβ (0,83 мкМ)
- ⊗ фибриллы Aβ (0,14 мкМ)
- ◆ Мономер Aβ (0,14 мкМ)

ФИГ. 14



ФИГ. 15