

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393391** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.21

(22) Дата подачи заявки
2022.05.24

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) **АКТИВНЫЕ В ПОЧКАХ СЛИТЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ИХ ПРИМЕНЕНИЕМ**

(31) **63/192,835**

(32) **2021.05.25**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/030658**

(87) **WO 2022/251168 2022.12.01**

(71) Заявитель:
**АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Бучард Кит, Хантер Джеффри
Уилльям, Эндриен, мл., Брюс А., Ким
Сунг-Квон, Чендлер Джулиан (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе описаны слитые белки, которые включают каталитические домены фактора Н и могут включать домены VHH, домены белка 5, родственного фактору Н, или интегрин-связывающие домены, а также применение таких слитых белков в способах лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, например заболеваний почек.

A1

202393391

202393391

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579946EA/061

АКТИВНЫЕ В ПОЧКАХ СЛИТЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ИХ ПРИМЕНЕНИЕМ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Упомянутая копия в формате ASCII, созданная 16 мая 2022 года, имеет название 50694-083WO2_Sequence_Listing_5_16_22_ST25 и размер 140215 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Система комплемента играет центральную роль в клиренсе иммунных комплексов и в иммунных ответах на возбудителей инфекционных заболеваний, чужеродные антигены, инфицированные вирусами клетки и опухолевые клетки. Активация системы комплемента происходит преимущественно посредством трех путей: классического пути, лектинового пути и альтернативного пути. Альтернативный путь системы комплемента находится в постоянном состоянии активации на низком уровне. Неконтролируемая активация или недостаточная регуляция альтернативного пути системы комплемента (САР) может привести к воспалению, поражению клеток и повреждению тканей. Локальная активация альтернативного пути в пределах почки представляет собой фактор, вносящий вклад в почечную патологию и потерю функции. Таким образом, альтернативный путь системы комплемента вовлечен в патогенез целого ряда почечных заболеваний. Подавление или модулирование активности альтернативного пути системы комплемента в отсутствие запуска лектинового и классического путей признано многообещающей терапевтической стратегией. Например, альтернативный путь играет роль в усилении активации системы комплемента, запускаемой посредством всех трех путей. Число доступных вариантов лечения заболеваний, ассоциированных с альтернативным путем системы комплемента, ограничено. Таким образом, разработка инновационных стратегий для лечения заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, таких как заболевания почек, от которых, по оценкам, страдают 37 миллионов человек только в США, является серьезной неудовлетворенной потребностью.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны слитые полипептиды, которые включают каталитический домен фактора Н. Слитые белки можно применять для лечения пациентов с заболеваниями, ассоциированными с активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, такими как заболевания почек.

В данном документе предусмотрен слитый белок, характеризующийся следующей структурой в направлении от N-конца к С-концу: D1-L1-D2-L2-D3, где D1 включает фрагмент фактора Н (FH) системы комплемента; L1 отсутствует, представляет собой

ковалентную связь или представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из по меньшей мере одной аминокислоты; D2 включает VHH или отсутствует; L2 отсутствует, представляет собой ковалентную связь или представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из по меньшей мере одной аминокислоты; и D3 представляет собой домен распознавания интегрин. В некоторых вариантах осуществления D1 включает один или несколько (например, два, три, четыре, пять или больше) доменов короткого консенсусного повтора (SCR) FH, где необязательно один или несколько доменов SCR выбраны из группы, состоящей из SCR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления домены SCR FH выбраны из группы, состоящей из SCR 1-4; 1-5; 1-6, 19 и 20; 1-5, 19 и 20 или 19 и 20.

В варианте осуществления VHH из D2 включает однодоменное антитело. В другом варианте осуществления VHH из D2 включает однодоменное антитело верблюдовых. В варианте осуществления домен распознавания интегрин из D3 включает домен распознавания интегрин, включающий пептидный мотив, представляющий собой аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD). В другом варианте осуществления домен распознавания интегрин из D3 включает пептидный мотив, представляющий собой цикло(RGD)₄.

В варианте осуществления L1 и L2 включают одинаковую аминокислотную последовательность. В другом варианте осуществления L1 и L2 включают разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: (G₄A)₂G₃AG₄S, G₄SDAA, (G₄A)₂G₄S, G₄AG₃AG₄S, GGGGAGGGGAGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, (EAAAK)₃, PAPAP, G₄SPAPAP, PAPAPG₄S, GSTSGKSSEGKG, (GGGDS)₂, (GGGES)₂, GGGDSGGGGGS, GGGASGGGGGS, GGGESGGGGGS, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, G₃P, G₇P, PAPANLLGPP, G₆, G₁₂, APELPGGP, SEPQPQPG, (G₃S)₂, GGGGGGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGGGGGGGS, (GGSSS)₃, (GS₄)₃, G₄A(G₄S)₂, G₄SG₄AG₄S, G₃AS(G₄S)₂, G₄SG₃ASG₄S, G₄SAG₃SG₄S, (G₄S)₂AG₃S, G₄SAG₃SAG₃S, G₄D(G₄S)₂, G₄SG₄DG₄S, (G₄D)₂G₄S, G₄E(G₄S)₂, G₄SG₄EG₄S, (G₄E)₂G₄S, G₄SDA, G₄A и (G₄A)₃, например G₄A. В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: (G₄A)₂G₃AG₄S, G₄SDAA, (G₄A)₂G₄S, G₄SDAA, (G₄S)₄, G₄AG₃AG₄S, G₄A и (G₄A)₃.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает домены SCR 1-5 FH; L1 включает G₄A; D2 отсутствует; L2 отсутствует, и D3 включает цикло(RGD)₄; D1 включает домены SCR 1-5 FH; L1 отсутствует; D2 включает VHH; L2 включает G₄A, и D3 включает цикло(RGD)₄; D1 включает домены SCR 1-5 FH; L1 включает G₄A; D2 отсутствует; L2 включает G₄A, и D3 включает цикло(RGD)₄; D1 включает домены SCR 1-5 FH; L1 отсутствует; D2 включает VHH; L2 включает G₄A, и D3 включает цикло(RGD)₄; D1 включает домены SCR 1-5 FH; L1 отсутствует; D2 включает VHH; L2 включает G₄A, и D3 включает цикло(RGD)₄; D1 включает домены SCR 1-6 FH; L1 отсутствует; D2 включает VHH; L2 включает G₄A, и D3 включает цикло(RGD)₄; или D1 включает SCR 1-5

FH; L1 включает G₄A; D2 включает VHH; L2 включает G₄A, и D3 включает цикло(RGD)₄.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; или имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 4; имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 5; имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 8; имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 9; имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 13; имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 14; имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен слитый белок, включающий такую структуру в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2, где D1 включает фрагмент FH, такой как FH1-5; L1 включает линкер или отсутствует, и D2

включает домен родственного фактору Н белка 5 (FHRP5), такой как домены 7 и 8 FHRP. В варианте осуществления L1 выбран из группы, состоящей из: G₄A, (G₄A)₃, (G₄A)₂G₃AG₄S, G₄SDAA, (G₄A)₂G₄S, G₄AG₃AG₄S, GGGGAGGGGAGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, (EAAAK)₃, PAPAP, G₄SPAPAP, PAPAPG₄S, GSTSGKSSEGKG, (GGGDS)₂, (GGGES)₂, GGGDSGGGGGS, GGGASGGGGGS, GGGESGGGGGS, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, G₃P, G₇P, PAPNLLGGP, G₆, G₁₂, APELPGGP, SEPQPQPG, (G₃S₂)₃, GGGGGGGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGGGGGGGS, (GGSSS)₃, (GS₄)₃, G₄A(G₄S)₂, G₄SG₄AG₄S, G₃AS(G₄S)₂, G₄SG₃ASG₄S, G₄SAG₃SG₄S, (G₄S)₂AG₃S, G₄SAG₃SAG₃S, G₄D(G₄S)₂, G₄SG₄DG₄S, (G₄D)₂G₄S, G₄E(G₄S)₂, G₄SG₄EG₄S, (G₄E)₂G₄S и G₄SDA, например G₄A. В некоторых вариантах осуществления L1 выбран из группы, состоящей из: G₄A и (G₄A)₃, (G₄A)₂G₃AG₄S, G₄SDAA, (G₄A)₂G₄S, G₄SDAA, (G₄S)₄ и G₄AG₃AG₄S.

В варианте осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; или имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 аминокислотных) замен, добавлений или делеций. В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 6; или имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% и 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен слитый белок, включающий такую структуру в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2-L2-D3, где D1 включает домен распознавания интегрин, такой как цикло(RGD)₄; L1 включает линкер или отсутствует; D2 представляет собой VHH, такой как однодоменное антитело, L2 представляет собой линкер или отсутствует, и D3 представляет собой фрагмент FH, такой как FH1-5. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит C-концевую His-метку. В варианте осуществления L1 и L2 включают одинаковую аминокислотную последовательность. В другом варианте осуществления L1 и L2 включают разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: G₄A, (G₄A)₃, (G₄A)₂G₃AG₄S, G₄SDAA, (G₄A)₂G₄S, G₄AG₃AG₄S, GGGGAGGGGAGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, (EAAAK)₃, PAPAP, G₄SPAPAP, PAPAPG₄S, GSTSGKSSEGKG, (GGGDS)₂, (GGGES)₂, GGGDSGGGGGS, GGGASGGGGGS, GGGESGGGGGS, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, G₃P, G₇P, PAPNLLGGP, G₆, G₁₂, APELPGGP, SEPQPQPG, (G₃S₂)₃, GGGGGGGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGGGGGGGS, (GGSSS)₃, (GS₄)₃, G₄A(G₄S)₂, G₄SG₄AG₄S, G₃AS(G₄S)₂,

$G_4SG_3ASG_4S$, $G_4SAG_3SG_4S$, $(G_4S)_2AG_3S$, $G_4SAG_3SAG_3S$, $G_4D(G_4S)_2$, $G_4SG_4DG_4S$, $(G_4D)_2G_4S$, $G_4E(G_4S)_2$, $G_4SG_4EG_4S$, $(G_4E)_2G_4S$ и G_4SDA , например G_4A . В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: G_4A , $(G_4A)_3$, $(G_4A)_2G_3AG_4S$, G_4SDAA , $(G_4A)_2G_4S$, G_4SDAA , $(G_4S)_4$ и $G_4AG_3AG_4S$.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; или имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций. В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 2; или имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 3.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен слитый белок, включающий такую структуру в направлении от N-конца к C-концу: D1-D2 или D2-D1, где D1 представляет собой VHH, такой как однодоменное антитело, и D2 представляет собой фрагмент FH, такой как FH1-5. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит C-концевую His-метку. В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; или имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций. В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 1; или имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций; или имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 аминокислотных) замен, добавлений или делеций. В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85%

(например, по меньшей мере 90%, 95% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 12.

В варианте осуществления слитый белок характеризуется увеличенным временем внутрипочечного удержания по сравнению со слитым белком, не содержащим домен VHH.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любой из слитых белков, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, кодирующий любой из слитых белков, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор, включающий полинуклеотид, описанный в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, описанный в данном документе, или вектор, описанный в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения любого из слитых белков, описанных в данном документе, включающий стадии культивирования одной или нескольких клеток-хозяев, включающих одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, способных экспрессировать слитый белок в условиях, подходящих для экспрессии слитого белка. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения слитого белка из культуры клеток или культуральной среды.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, включающий введение эффективного количества композиции, включающей любой из слитых белков, описанных в данном документе, фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, полинуклеотид, описанный в данном документе, вектор, описанный в данном документе, или клетку-хозяина, описанную в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок составлен в виде фармацевтической композиции с по меньшей мере одним (например, по меньшей мере одним, двумя, пятью или десятью) фармацевтически приемлемым носителем. В варианте осуществления композиция является лиофилизированной. В другом варианте осуществления композицию восстанавливают перед введением. В другом варианте осуществления по меньшей мере один (например, по меньшей мере один, два, пять или десять) фармацевтически приемлемый носитель представляет собой солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для ежедневного, еженедельного или ежемесячного введения.

В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для внутривенного, подкожного, внутримышечного, перорального, назального, подъязычного,

интратекального и внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для введения в дозе, составляющей от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг (например, приблизительно 0,5-150 мг/кг, 1-150 мг/кг, 10-150 мг/кг, 25-150 мг/кг, 50-150 мг/кг, 100-150 мг/кг, 125-150 мг/кг, 0,1-125 мг/кг, 0,1-100 мг/кг, 0,1-50 мг/кг, 0,1-25 мг/кг, 0,1-10 мг/кг, 0,1-5 мг/кг и 0,1-1 мг/кг). В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для введения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, представляет собой нарушения работы почек, фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS), IgA-нефропатию, болезнь минимальных изменений (MCD), диабетическую нефропатию, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозную нефропатию, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническую протеинурию, хроническую болезнь почек, С3-гломерулопатию (С3G), болезнь плотных депозитов, мембранопролиферативный гломерулонефрит, гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническую нефропатию, нефросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (аHUS), повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен набор, включающий композицию, выбранную из любого из слитых белков, описанных в данном документе, фармацевтической композиции, описанной в данном документе, полинуклеотида, описанного в данном документе, вектора, описанного в данном документе, или клетки-хозяина, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает инструкции по введению эффективного количества композиции субъекту, нуждающемуся в этом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1А-1В** представлены схематические диаграммы, иллюстрирующие слитые белки на основе фактора Н (FH) системы комплемента с формулами I и III, которые включают домен распознавания интегрин (фиг. 1А), и слитые белки на основе фактора Н с формулой II (фиг. 1В), которые включают фрагмент FHRP5.

На **фиг. 2А** представлен график, показывающий результаты анализа сравнительного подавления САР-опосредованного гемолиза с помощью соединения А и SCR 1-5 из фактора Н.

На **фиг. 2В** представлен график, показывающий результаты анализа сравнительного подавления САР-опосредованного гемолиза с помощью соединений D, H, E и I.

На **фиг. 2С** представлен график, показывающий результаты анализа сравнительного подавления САР-опосредованного гемолиза с помощью соединений E, I и

эталонного белка 6, который представляет собой слитый белок фактор H-VNH к HSA, используемый в качестве положительного контроля.

На **фиг. 2D** представлен график, показывающий результаты анализа сравнительного подавления CAP-опосредованного гемолиза с помощью соединений E, M, N и O.

На **фиг. 3** представлен набор изображений всего тела и почек *in vivo*, показывающих мышей дикого типа после обработки соединением В. Изображения получили с применением микроскопа LI-COR Odyssey.

На **фиг. 4** представлен график, показывающий уровни указанных слитых белков в сыворотке крови в нг/мл через 1 час и 24 часа после введения мышам дикого типа.

На **фиг. 5** представлен график, показывающий уровни протеинурии на модели FSGS на основе адриамициновой нефропатии у мышей Balb/c дикого типа после введения слитых белков путем внутривенного введения дозы, выполненного в день 0, и подкожного введения дозы в дни 7, 9, 11 и 13. Данные показаны как средние значения+или - стандартная ошибка среднего (n=4-9). Статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем обозначены с помощью * $p<0,05$ и *** $p<0,001$, а статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем и адриамицином обозначены с помощью † $p<0,5$.

На **фиг. 6** представлен график, показывающий уровни альбуминурии на модели FSGS на основе адриамициновой нефропатии у мышей Balb/c дикого типа после введения слитых белков путем внутривенного введения дозы, выполненного в день 0, и подкожного введения дозы в дни 7, 9, 11 и 13. Данные показаны как средние значения+или - стандартная ошибка среднего (n=4-9). Статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем обозначены с помощью * $p<0,05$ и *** $p<0,001$, а статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем и адриамицином обозначены с помощью † $p<0,5$.

На **фиг. 7** представлен график, показывающий обезличенную балльную оценку тубулярного белка в почках мышей с адриамициновой нефропатией при трихромном окрашивании по Массону с баллами 1-5 в соответствии с принятыми способами. N=8-10. Статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем при использовании t-критериев для множественного сравнения обозначены с помощью ** $p<0,01$, а при применении ANOVA с множественными сравнениями обозначены с помощью # $p<0,5$.

На **фиг. 8A** представлен набор изображений, показывающих иллюстративную иммунофлуоресцентную оценку срезов почек на предмет отложения C3 на модели адриамициновой нефропатии у мышей Balb/c дикого типа через 7 дней после введения соединения E. Другие молекулы дали аналогичные результаты или были ближе к отрицательному контролю со средой-носителем.

На **фиг. 8B** представлен график, показывающий среднюю интенсивность пикселей для результатов **фиг. 9**; значения средней интенсивности пикселей C3 представляют среднюю интенсивность сигнала в пределах выбранной представляющей интерес

области/мозговом веществе почки в день 14 (день 7 после обработки).

На **фиг. 9А** представлен график, показывающий соотношения белок/креатинин в моче у самцов мышей Balb/c с индуцированным адриамицином заболеванием почек после обработки слитыми белками путем внутривенного введения дозы, выполненного в день 0, и подкожного введения дозы в дни 7, 9, 11 и 13. Данные показаны как средние значения+или - стандартная ошибка среднего (n=4-9). Статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем обозначены с помощью ***p<0,001. Отсутствовали статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем и адриамицином. Наблюдали положительные тенденции.

На **фиг. 9В** представлен график, показывающий соотношения альбумин/креатинин в моче после обработки слитыми белками путем внутривенного введения дозы, выполненного в день 0, и подкожного введения дозы в дни 7, 9, 11 и 13. Данные показаны как средние значения+или - стандартная ошибка среднего (n=4-9). Статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем обозначены с помощью ***p<0,001. Отсутствовали статистически значимые различия по сравнению со средой-носителем и адриамицином.

На **фиг. 10А** представлен вестерн-блоттинг, показывающий гель SDS-PAGE для очищенных соединений D и E.

На **фиг. 10В** представлен график, показывающий хроматограмму гидрофобных взаимодействий для соединения E.

На **фиг. 11** представлен график, показывающий масс-спектрометрию для соединения E, который показывает, что молекулярная масса соединения E составляет приблизительно 50 кДа. Наблюдали незначительный пик +162 Да, который, вероятно, обусловлен гликированием.

На **фиг. 12** представлен график, показывающий кривую плавления для соединения E, полученную с применением динамического светорассеяния.

На **фиг. 13А** представлен график, показывающий время удерживания для соединения E в день 0 при 37°C с применением эксклюзионной хроматографии для измерения относительной стабильности соединения.

На **фиг. 13В** представлен график, показывающий время удерживания для соединения E через 14 дней при 37°C с применением эксклюзионной хроматографии для измерения относительной стабильности соединения.

На **фиг. 14А** представлен график, показывающий время удерживания для соединения E через 0 дней при 37°C с применением хроматографии гидрофобных взаимодействий для измерения относительной стабильности соединения.

На **фиг. 14В** представлен график, показывающий время удерживания для соединения E через 14 дней при 37°C с применением хроматографии гидрофобных взаимодействий для измерения относительной стабильности соединения.

На **фиг. 15А** представлен график, показывающий значения времени выравнивания для невозстановленного соединения E через 0 дней и 14 дней при 37°C с применением

капиллярного электрофореза-SDS-хроматографии для измерения относительной стабильности соединения.

На **фиг. 15B** представлен график, показывающий значения времени выравнивания для восстановленного соединения E через 0 дней и 14 дней при 37°C с применением капиллярного электрофореза-SDS-хроматографии для измерения относительной стабильности соединения.

На **фиг. 16** представлен график, показывающий сигнатуру хроматограммы для соединения E, полученную с применением изоэлектрического капиллярного электрофореза (iCE).

На **фиг. 17** представлен график, показывающий масс-спектры для соединения E, измеренные через 0 дней, 3 дня, 7 дней и 14 дней при 37°C, чтобы охарактеризовать стабильность соединения при комнатной температуре.

На **фиг. 18A** представлен график, показывающий кривую связывания для соединения E и соединения K с C3b в сравнении с фактором H (fH) в течение периода от 0 до 2500 секунд.

На **фиг. 18B** представлен график, показывающий увеличенный вид кривой связывания с **фиг. 18A**, охватывающий 40 секунд, где момент времени $t=0$ секунд на **фиг. 18B** соответствует моменту времени $t=720$ секунд на **фиг. 18A**.

На **фиг. 19** представлен график, показывающий результаты анализа сравнительного подавления активации CAP в жидкой фазе соединением E с помощью набора для определения альтернативного пути системы комплемента WIESLAB[®] в двух партиях нормальной человеческой сыворотки крови (NHS).

На **фиг. 20** представлен график, показывающий комбинированные данные фармакокинетики (PK) однократных доз соединения E в сыворотке крови после подкожного (SC) введения самцам мышей C57Bl/6 дикого типа в ходе двух отдельных исследований.

На **фиг. 21A** представлен график, показывающий фармакокинетику соединения E в сыворотке крови после внутривенного (IV) или подкожного (SC) введения самкам яванских макаков. В пределах каждого графика включены сравнительные PK-профили для диапазона уровней доз после введения начальной дозы в день 0 исследования и четвертой дозы, введенной в день 12 исследования.

На **фиг. 21B** включены данные с **фиг. 21A**, перенесенные на график для сравнения эквивалентных уровней доз, вводимых при внутривенном (IV) или подкожном (SC) пути введения.

Определения

Используемый в данном документе термин “приблизительно” относится к значению, которое находится в пределах 10% выше или ниже описываемого значения.

Используемые в данном документе термины “осуществление введения” и “введение” относятся к любому способу предоставления фармацевтического препарата субъекту. Слитые белки можно вводить посредством любого способа, известного

специалистам в данной области техники. Подходящими способами введения слитого белка могут быть, например, пероральный, посредством инъекции (например, внутривенно, внутривнутрино, внутримышечно, интравитреально и подкожно), введение препаратов с помощью капельной инфузии, ингаляция, интраназальный и т. п. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством внутривенной и/или подкожной инфузий. Слитые белки, полученные, как описано в данном документе, можно вводить в различных формах, в зависимости от нарушения, подлежащего лечению, и возраста, состояния и массы тела субъекта, как известно из уровня техники. Препарат можно вводить профилактически, то есть вводить для снижения вероятности развития заболевания или состояния.

Используемые в данном документе термины “аффинность связывания”, “специфически связывается”, “аффинность” относятся к силе общих нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы и ее партнером по связыванию. Если не указано иное, используемый в данном документе термин “аффинность связывания” относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает специфическое взаимодействие между представителями пары по связыванию. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно можно выразить с помощью константы диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить стандартными способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Комплекс с низкой аффинностью содержит молекулу, которая обычно имеет тенденцию легко диссоциировать от своего партнера по связыванию, тогда как комплекс с высокой аффинностью содержит молекулу, которая обычно имеет тенденцию оставаться связанной со своим партнером по связыванию в течение более длительного времени. “Специфически связывается” относится к молекулам и парам партнеров по связыванию, которые характеризуются K_d , составляющей по меньшей мере 1×10^{-6} M или ниже (например, в диапазоне от 1×10^{-6} M до 1×10^{-12} M, например 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M и 1×10^{-12} M).

Используемый в данном документе термин “антитело” относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически или по сути специфически связывается с конкретным антигеном или является иммунологически реактивной в отношении его. Антитело может представлять собой, например, природное или искусственное моно- или поливалентное антитело, включая без ограничения поликлональное, моноклональное, полиспецифическое, человеческое, гуманизированное или химерное антитело. Антитело может представлять собой генетически сконструированную или иным образом модифицированную форму антитела, включая без ограничения гетероконъюгатные антитела (например, би-, три- и тетраспецифические антитела, диатела, триатела и тетратела) и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, однодоменные фрагменты, V_HH, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG и scFv.

Используемый в данном документе термин “альтернативный путь системы комплемента” относится к одному из трех путей активации системы комплемента

(остальные представляют собой классический путь и лектиновый путь).

Используемый в данном документе термин “активация или нарушение регуляции альтернативного пути системы комплемента” относится к любому отклонению от нормы способности альтернативного пути системы комплемента обеспечивать защиту хозяина против патогенов и удалять иммунные комплексы и поврежденные клетки для иммунорегуляции. Активация или нарушение регуляции альтернативного пути системы комплемента может происходить в жидкой фазе и на поверхности клетки. Активация или нарушение регуляции альтернативного пути системы комплемента могут привести к чрезмерной активации или недостаточной регуляции системы комплемента, оба из которых приводят к повреждению тканей.

Используемый в данном документе термин “заболевание” относится к прекращению, приостановке или нарушению функций организма, систем или органов. Представляющие интерес заболевание(-я) или нарушения включают те, при которых будет приносить пользу лечение слитым белком или с помощью способа, описанного в данном документе. Неограничивающими примерами заболеваний или нарушений, подлежащих лечению в данном документе, являются заболевания или нарушения, опосредованные активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, включая без ограничения нарушения работы почек, фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS), IgA-нефропатию, болезнь минимальных изменений (MCD), диабетическую нефропатию, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозную нефропатию, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническую протеинурию, хроническую болезнь почек, С3-гломерулопатию (С3G), болезнь плотных депозитов, гломерулонефрит, мембранопролиферативный гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническую нефропатию, нефросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой FSGS.

Используемый в данном документе термин “фактор Н” относится к белковому компоненту альтернативного пути системы комплемента, кодируемому геном фактора Н системы комплемента (“FN”; NM000186; идентификатор гена: 3075; идентификатор в UniProt P08603; Ripoche, J. *et al.*, *Biochem. J.*, 249:593-602, 1988) (SEQ ID NO: 123). Фактор Н транслируется в виде полипептида-предшественника из 1213 аминокислот, который подвергается процессингу путем удаления сигнального пептида из 18 аминокислот, что приводит к образованию зрелого белка фактора Н (аминокислоты 19-1231). Фактор Н состоит из 20 доменов короткого регулятора комплемента (SCR). Аминокислоты 1-18 составляют сигнальный пептид, остатки 21-80 составляют SCR 1 (SEQ ID NO: 24, остатки 85-141 составляют SCR 2 (SEQ ID NO: 25), остатки 146-205 составляют SCR 3 (SEQ ID NO: 26), остатки 201-262 составляют SCR 4 (SEQ ID NO: 27), остатки 267-320 составляют SCR 5 (SEQ ID NO: 28), остатки 326-384 составляют SCR 6 (SEQ ID NO: 29). Фактор Н

регулирует активацию системы комплемента на собственных клетках, обладая как активностью кофактора в отношении опосредованного фактором I расщепления C3b, так и ускоряющей распад активностью в отношении C3-конвертазы альтернативного пути, C3bBb.

Расщепление C3 первоначально приводит к образованию и отложению C3b на поверхности активирующих клеток. Фрагмент C3b вовлечен в образование ферментативных комплексов, усиливающих каскад системы комплемента. На поверхности клетки C3b быстро превращается в неактивный iC3b, например, при отложении на поверхности хозяина, содержащей регуляторы активации системы комплемента (т. е. на большей части тканей хозяина). Даже в отсутствие мембраносвязанных регуляторов системы комплемента значительные уровни iC3b образуются под действием сывороточного фактора H и сывороточного фактора I. Впоследствии iC3b расщепляется до мембраносвязанных фрагментов C3dg, а затем C3d под действием фактора I и других протеаз и кофакторов, но этот процесс является относительно медленным.

Используемый в данном документе термин “родственный фактору H белок 5” или “FHRP5” относится к белковому компоненту альтернативного пути системы комплемента, кодируемому геном белка 5, родственного фактору H системы комплемента (“CFHR5”; NM_030787.3; идентификатор гена: 81494; идентификатор в UniProt: Q9BXR6) (SEQ ID NO: 124). FHRP5 содержит девять SCR. Первые два SCR характеризуются свойствами связывания гепарина, область в пределах SCR 5-7 характеризуется свойствами связывания гепарина и С-реактивного белка, а два С-концевых SCR подобны домену связывания компонента 3b системы комплемента (C3b). FHRP5 локализуется совместно с C3, связывает C3b дозозависимым образом и рекрутируется в ткани, поврежденные С-реактивным белком.

Используемый в данном документе термин “фрагмент” относится к менее чем 100% аминокислотной последовательности полноразмерного эталонного белка (например, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% полноразмерной последовательности и т. д.), но включающей, например, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или более аминокислот. Фрагмент может иметь достаточную длину, чтобы поддерживать требуемую функцию полноразмерного белка. Например, сохраняется регуляция альтернативного пути системы комплемента в жидкой фазе с помощью фрагментов, например, фактора H. Такие фрагменты являются “биологически активными фрагментами”.

Используемый в данном документе термин “функциональный фрагмент” или “биологически активный фрагмент” относится к фрагменту или части белка, характеризующимся некоторыми или всеми видами активности полноразмерного белка. Например, функциональный или биологически активный фрагмент фактора H относится к любому фрагменту белка фактора H, характеризующимся некоторыми или всеми видами активности фактора H, например, регуляторной активностью полноразмерного белка

фактора Н в отношении альтернативного пути системы комплемента. Примеры включают без ограничения фрагменты фактора Н, содержащие следующие SCR, соединенные в направлении от N-конца к С-концу: [1-4], [1-5], [1-6], [1-7], [1-20], [19-20], [1-4 и 19-20] и [1-5] и [19-20]. “Функциональный фрагмент” или “биологически активный фрагмент” белка FHRP5 представляет собой фрагмент, характеризующийся некоторыми или всеми видами активности FHRP5, например, регуляторной активностью полноразмерного белка FHRP5 в отношении альтернативного пути системы комплемента. Примеры включают без ограничения фрагменты FHRP5, содержащие следующие SCR в направлении от N-конца к С-концу: [7-8]. Используемый в данном документе термин “слитый” или “соединенный” относится к комбинации или присоединению двух или более элементов, компонентов или белковых доменов, например, полипептидов, с помощью способов, включающих химическую конъюгацию, рекомбинантные способы и химические связи, например, дисульфидные связи и амидные связи. Например, два отдельных полипептида могут быть соединены с образованием одной непрерывной белковой структуры посредством рекомбинантной экспрессии, химической конъюгации, химической связи, пептидного линкера или любого другого способа ковалентной связи.

Используемый в данном документе термин “слитый белок” относится к сложному полипептиду, составленному из двух (или более) отдельных гетерологичных полипептидов. Гетерологичные полипептиды могут представлять собой либо полноразмерные белки, либо фрагменты полноразмерных белков. Слитые белки в данном документе могут быть получены с помощью либо синтетических, либо рекомбинантных методик, известных в данной области техники.

Используемый в данном документе термин “клетка-хозяин” относится к любому типу клеточной системы, которую можно сконструировать для получения слитых белков, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры клеток-хозяев включают Expi CHO-S, Expi 293 F, HEK, HEK 293, HT-1080, CHO, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и трансформируемые клетки насекомых, такие как клетки High Five, Sf9 и Sf21.

Используемый в данном документе термин “мотив распознавания интегрин” относится к полипептидному олигомеру из повторяющихся фрагментов аргинилглициласпарагиновой кислоты, например, (RGD)₁₋₈, такому как (RGD)₁₋₄ (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления фрагмент аргинилглициласпарагиновой кислоты может быть циклизированным.

Используемый в данном документе термин “время внутрипочечного удержания” относится к периоду времени, в течение которого соединение, такое как соединения А-О, описанные в данном документе, присутствует во внесосудистых компартментах, например, на эпителии почки или в пределах капсулы Боумена в пределах почки. Время внутрипочечного удержания можно измерить с применением пролонгированной визуализации *in vivo*. Например, в исследованиях на животных для получения изображений можно использовать систему визуализации IVIS Spectrum (PerkinElmer Inc., Уолтем, Массачусетс, США). Анализ флуоресцентной визуализации можно выполнить с

применением программного обеспечения Living Image 4.5.1 (PerkinElmer Inc., Уолтем, Массачусетс, США) с автоматическими настройками экспозиции 2D верхнего освещения, полем зрения (FOV) C, F/Stop 2, средней сортировкой и фильтрами для излучения 800 нм/возбуждения 750 нм, при этом субъекты получали, например, 1 мг/кг тестируемого препарата, меченного AlexaFluor 750, посредством внутривенной инъекции. Например, в клинических условиях пролонгированная визуализация *in vivo* может быть выполнена с применением тестируемого препарата с радиоактивной меткой и визуализации на основе PET или SPECT.

Используемые в данном документе термины “линкер”, “L1” и “L2” относятся к связи между двумя элементами, например, полипептидам или белковым доменам. Линкер может представлять собой ковалентную связь. Линкер также может представлять собой молекулу любой длины, которую можно использовать для связывания, например, фрагмента фактора H, и/или VHH, и/или мотива распознавания интегрин. Линкер также относится к фрагменту (например, полиэтиленгликолевому (PEG) полимеру) или аминокислотной последовательности (например, последовательности из 1-200 аминокислот, 1-150 аминокислот, 1-100 аминокислот, 5-50 аминокислот или 1-10 аминокислот, таких как аминокислоты с меньшими боковыми цепями и/или гибкие аминокислотные последовательности), расположенным между двумя полипептидами или полипептидными доменами для обеспечения пространства и/или гибкости между двумя полипептидами или полипептидными доменами. Аминокислотный линкер может быть частью первичной последовательности полипептида (например, присоединен к связанным полипептидам или полипептидным доменам через полипептидный остов). Неограничивающие примеры включают $(G_4A)_2G_4S$, G_4A , $(G_4A)_3$ и $(G_4A)_2G_3AG_4S$ (SEQ ID NO: 32, 80, 81 и 30).

Используемый в данном документе термин “пациент, нуждающийся в этом” или “субъект, нуждающийся в этом” относится к субъекту, нуждающемуся в лечении, например, на основании наличия заболевания или нарушения (например, одного или более симптомов заболевания или нарушения). Субъект может быть идентифицирован как характеризующийся потребностью в лечении заболевания или нарушения (например, нарушений работы почек, FSGS, IgA-нефропатии, MCD, диабетической нефропатии, синдрома Альпорта, волчаночного нефрита, мембранозной нефропатии, острого повреждения почек, синдрома Гудпасчера, нефротического синдрома, хронической протеинурии, хронического заболевания почек, C3G, болезни плотных депозитов, гломерулонефрита, мембранопролиферативного гломерулонефрита, поликистоза почек, гипертонической нефропатии, нефросклероза, aHUS, повреждения при ишемии-реперфузии или отторжения трансплантированного органа, например почки) до введения средства лечения. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой FSGS, а потребность в лечении основана на более раннем диагнозе, поставленном специалистом в данной области (например, врачом). Например, пациент является млекопитающим, таким как человек.

Термины “пептид”, “полипептид” и “белок” используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован, например, среди прочего, путем образования дисульфидной связи, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, липидирования или конъюгирования с метящим компонентом.

“Процент (%) идентичности последовательностей” по отношению к эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательности определяется как процентная доля нуклеотидов или аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидам или аминокислотам в эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах возможностей специалиста в данной области техники, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2 или Megalign. Специалисты в данной области техники смогут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, значения процента идентичности последовательностей могут быть получены с применением компьютерной программы BLAST для сравнения последовательностей. В качестве иллюстрации процент идентичности последовательностей данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, А, относительно данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, В, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как данная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, А, которая характеризуется определенным процентом идентичности последовательности относительно данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, В, с ней или в сравнении с ней) рассчитывают следующим образом:

$100 \text{ умножают на } (\text{дробь } X/Y),$

где X представляет собой число нуклеотидов или аминокислот, определенных как идентичные совпадения с помощью программы для выравнивания последовательностей (например, BLAST) в данном программном выравнивании А и В, и где Y представляет собой общее число нуклеотидов в В. Будет понятно, что если длина последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности А не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности В, то процент идентичности последовательностей А относительно В будет не равен проценту идентичности последовательностей В относительно А.

Под “фармацевтической композицией” подразумевается любая композиция, которая содержит терапевтически или биологически активное средство (например, слитый белок), которое подходит для введения субъекту. Любой из этих составов можно получать с помощью хорошо известных и общепринятых в данной области техники способов. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, Informa Healthcare, 2006, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин “фармацевтически приемлемый” относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые подходят для контакта с тканями субъекта, такого как млекопитающее (например, человек), без избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции и других проблем или осложнений, сопоставимых с обоснованным соотношением польза/риск.

Термины “полинуклеотид” и “нуклеиновая кислота” используются взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы нуклеотидов любой длины, включая дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды или их аналоги. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные или кэпированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, и может прерываться ненуклеотидными компонентами. Модификации нуклеотидной структуры, если они присутствуют, могут быть внесены до или после сборки полимера. Используемый в данном документе термин “полинуклеотид” взаимозаменяемо относится к двухнитевым и одонитевым молекулам. Если не указано или не требуется иное, любой вариант осуществления настоящего изобретения, описанный в данном документе, который представляет собой двухнитевой полинуклеотид, охватывает как двухнитевую форму, так и каждую из двух комплементарных одонитевых форм, о которых известно или прогнозируется, что они составляют двухнитевую форму.

Используемые в данном документе термины “короткий регулятор комплемента” или “SCR”, также известный как “короткий консенсусный повтор”, “суши-домены”, или “белок контроля комплемента”, или “CCP”, описывают домены, обнаруженные во всех кластерах генов регуляторов активации системы комплемента (RCA), которые вносят вклад в их способность регулировать активацию системы комплемента в крови или на поверхности клеток, с которыми они специфически связываются. Как правило, SCR состоят из приблизительно 60 аминокислот с четырьмя цистеиновыми остатками, связанными дисульфидными связями в порядке 1-3, 2-4, и гидрофобным ядром, построенным вокруг почти инвариантного остатка триптофана. SCR обнаружены в белках, включая без ограничения фактор H и FHRP5.

Используемые в данном документе термины “однодоменное антитело” и “VHH” определяют молекулы, образованные одним доменом иммуноглобулина. Однодоменные антитела включают антитела, чьи определяющие комплементарность области (“CDR”)

являются частью однодоменного полипептида. Однодоменные антитела часто включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают один антиген (например, антитело V_HN связывает антиген с K_D, составляющей 1×10^{-6} М или ниже, например, K_D в диапазоне от 1×10^{-6} М до 1×10^{-12} М, такой как K_D, составляющая 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М и 1×10^{-12} М). Обычно антигенсвязывающий сайт одного переменного домена иммуноглобулина образован не более чем тремя CDR. Один переменный домен может, например, включать последовательность переменного домена легкой цепи (последовательность V_L) или ее подходящий фрагмент; или последовательность переменного домена тяжелой цепи (например, последовательность V_H или последовательность V_HN) или ее подходящий фрагмент. Такие антитела могут быть получены, например, из антител, выработанных у видов *Camelidae*, например, у верблюда, дромадера, ламы, альпаки или гуанако. Дополнительные антитела включают, например, иммуноглобулиновый новый антигенный рецептор (IgNAR) хрящевых рыб (например, акул, например, акул-нянек). Другие виды, помимо *Camelidae* и хрящевых рыб, могут вырабатывать антитела, CDR которых являются частью одного полипептида. Антитела можно получить с помощью либо синтетических, либо рекомбинантных методик, известных в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), включая без ограничения людей, отличных от человека приматов, грызунов и т. п., которое будет получать конкретное средство лечения. Как правило, термины "субъект" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к субъекту-человеку.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество композиции, вводимой для улучшения, подавления или облегчения состояния субъекта или симптома нарушения или заболевания клинически значимым образом. Любое улучшение состояния субъекта считается достаточным для обеспечения лечения. В некоторых вариантах осуществления количество, достаточное для лечения, представляет собой количество, которое уменьшает, подавляет или предотвращает возникновение одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения (например, заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента), или представляет собой количество, которое уменьшает степень тяжести или продолжительность времени, в течение которого субъект страдает от одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, например, любого заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции САР (например, на по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20% или приблизительно 30%, как, например, на по меньшей мере приблизительно 50%, приблизительно 60% или приблизительно 70% и, например, на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 99% или больше по сравнению с контрольным субъектом, который не получал лечение композицией, описанной в данном документе). Эффективное количество

фармацевтической композиции, используемой для применения на практике способов, описанных в данном документе (например, лечения заболеваний почек), может варьироваться в зависимости от способа введения, а также возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта, подвергаемого лечению. Врач или исследователь может определить подходящее количество и схему введения. Дозировка может варьироваться и может вводиться в виде одного или нескольких введений дозы ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно в течение одного или нескольких дней.

Используемые в данном документе термины “лечение”, “осуществление лечения” или “лечить” относятся к терапевтическому лечению, целью которого является подавление или уменьшение нежелательного физиологического изменения или нарушения или содействие благоприятному фенотипу у пациента. Например, “лечение”, “осуществление лечения” или “лечить” относятся к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение недуга, болезни или нарушения у индивидуума. Эти термины включают, например, профилактику до или в ходе клинической патологии. Требуемые эффекты лечения включают без ограничения предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение патологического состояния и улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления слитые белки используют для контроля клеточных и клинических проявлений нарушений работы почек, FSGS, IgA-нефропатии, MCD, диабетической нефропатии, синдрома Альпорта, волчаночного нефрита, мембранозной нефропатии, острого повреждения почек, синдрома Гудпасчера, нефротического синдрома, хронической протеинурии, хронической болезни почек, C3G, болезни плотных депозитов, гломерулонефрита, мембранопролиферативного гломерулонефрита, поликистоза почек, гипертонической нефропатии, нефросклероза, aHUS, повреждения при ишемии-реперфузии или отторжения трансплантированного органа, такого как почка. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой FSGS.

“Вариант” относится к полинуклеотиду или полипептиду, который по сути гомологичен нативному или эталонному полинуклеотиду или полипептиду. Например, вариант полинуклеотида по сути гомологичен нативному или эталонному полинуклеотиду, но имеет полинуклеотидную последовательность, отличную от последовательности нативного или эталонного полинуклеотида из-за одной или множества делеций, вставок и/или замен. В другом примере вариант полипептида по сути гомологичен нативному или эталонному полипептиду, но имеет аминокислотную последовательность, отличную от последовательности нативного или эталонного полипептида из-за одной или множества делеций, вставок и/или замен. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие варианты полипептидных последовательностей, включают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с нативной или

эталонной полинуклеотидной последовательностью, которая кодирует вариант белка или его фрагмент, сохраняющие активность. Из уровня техники известны самые разнообразные подходы к мутагенезу, которые могут быть применены специалистом средней квалификации в данной области техники. Вариант полинуклеотидной или полипептидной последовательности может быть на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или больше идентичен нативной или эталонной последовательности. Степень гомологии (процент идентичности) между нативной последовательностью и вариантом можно определить, например, путем сравнения двух последовательностей с применением находящихся в свободном доступе компьютерных программ, широко используемых для этой цели во всемирной паутине (например, BLASTp или BLASTn с настройками по умолчанию).

Используемый в данном документе термин “вектор” относится к макромолекуле или ассоциации макромолекул, которые содержат полинуклеотид или связаны с ним и которые можно использовать для опосредования доставки полинуклеотида в клетку *in vitro* или *in vivo*. Иллюстративные векторы включают, например, плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие среды-носители для доставки генов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе описаны ингибиторы специфичных для альтернативного пути системы комплемента C3- и C5-конвертаз, которые регулируют активность альтернативного пути системы комплемента. В данном документе описана серия молекул с низкой молекулярной массой, ингибирующих петлю активации и амплификации альтернативного пути системы комплемента (CAP), разработанных с механизмами связывания с эпителиальными клетками почки. Композиции и способы, описанные в данном документе, содержат слитые белки, которые включают фрагмент фактора H системы комплемента (FH), который может быть слит с доменом VNH, фрагментом белка 5, родственного фактору H (FHRP5), и/или одним или несколькими нацеливающими на почки мотивами (например, одним или несколькими мотивами циклической аргинилглицилспарагиновой кислоты (RGD)).

Эти слитые молекулы включают короткие консенсусные повторы (SCR) 1-4 из каталитического домена фактора H (FH) системы комплемента для обеспечения опосредованной фактором I кофакторной активности и функций ускорения распада посредством связывания C3b. Дополнительно, SCR из фактора H (например, SCR 5 и SCR 6) могут быть включены для повышения активности, стабильности или структурной гибкости. Слитые белки согласно настоящему изобретению, содержащие SCR из каталитического домена FH, могут также включать мотивы коротких аминокислотных последовательностей или домены молекул системы комплемента, которые распознают интегрин или маркеры повреждения, присутствующие на поверхностях поврежденных

эпителиальных и канальцевых интерстициальных клеток почек. В данном документе описаны слитые белки, которые могут включать однодоменное антитело верблюдовых, содержащее только вариабельный домен тяжелой цепи (V_HH), для обеспечения отложения на эпителиальных клетках почки, улучшения экспрессии, облегчения очистки и обеспечения экзогенного зонда для обнаружения. В совокупности применение этих нацеливающих остатков в сочетании с присущей кинетикой клиренса низкомолекулярных белков обеспечивает селективную локализацию слитых белков-ингибиторов САР в клетках почечного эпителия.

Заболевания, опосредованные нарушением регуляции системы комплемента, часто являются результатом гиперактивности системы комплемента как в жидкой фазе, так и на поверхности клетки. В данном документе описаны композиции и способы лечения заболеваний, опосредованных нарушением регуляции системы комплемента. Примеры нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, включают, например, нарушения работы почек, FSGS, IgA-нефропатию, MCD, диабетическую нефропатию, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозную нефропатию, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническую протеинурию, хроническую болезнь почек, C3G, болезнь плотных депозитов, гломерулонефрит, мембранопролиферативный гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническую нефропатию, нефросклероз, aHUS, повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой FSGS.

Слитый белок или слитые белки по настоящему изобретению регулируют активность альтернативного пути системы комплемента, например, путем необратимой инактивации C3b и ослабления активности C3- и C5-конвертазы. Конструкции нацелены на альтернативный путь системы комплемента и оставляют активацию (защиту) посредством классического и лектинового путей нетронутыми.

Слитые белки

Как описано в данном документе, слитые белки по настоящему изобретению включают фрагмент фактора Н и могут включать мотив распознавания интегрина или фрагмент FHRP5. Конструкции можно использовать в качестве терапевтических средств для лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента (например, FSGS).

У человека несколько регуляторных белков кодируются кластером генов, расположенных на длинном плече хромосомы 1. Эта область называется кластером генов регулятора активации системы комплемента (RCA). Хотя белки в пределах семейства RCA различаются по размеру, они имеют сходство первичной аминокислотной структуры. Наиболее изученными представителями семейства RCA являются фактор Н, FHL-1, CR1, DAF, MCP и C4b-связывающий белок (C4BP). Представители этого семейства организованы в тандемные структурные единицы, называемые короткими

консенсусными повторами (SCR), которые присутствуют в белке в нескольких копиях. Каждый SCR состоит из ~60-70 высококонсервативных аминокислот, включая четыре остатка цистеина.

В некоторых вариантах осуществления часть слитого белка, подходящая для подавления активности альтернативного пути системы комплемента, слита с VHH для увеличения продолжительности эффекта.

В определенных вариантах осуществления часть слитого белка, подходящая для подавления активности альтернативного пути системы комплемента, включает фрагмент фактора Н. Фрагмент фактора Н может включать по меньшей мере первые четыре N-концевых домена SCR из фактора Н (например, SCR 1, 2, 3 и 4). В определенных вариантах осуществления фрагмент фактора Н включает по меньшей мере первые пять N-концевых доменов SCR из фактора Н (например, SCR 1, 2, 3, 4 и 5); также известные как кофакторный домен и домены ускорения распада. В определенных вариантах осуществления фрагмент фактора Н включает по меньшей мере первые шесть N-концевых доменов SCR из фактора Н (например, SCR 1, 2, 3, 4, 5 и 6).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фактора Н может включать

полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 18.

В дополнение к фрагменту фактора Н слитый белок может включать интегрин-связывающий домен. Фрагмент фактора Н в слитом белке может включать по меньшей мере первые четыре, пять или шесть N-концевых доменов SCR из фактора Н, а интегрин-связывающий домен может содержать пептидный мотив, представляющий собой аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD). Пептидный мотив, представляющий собой аргинилглициласпарагиновую кислоту, может включать пептид, представляющий собой цикло(RGD)₄ (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать интегрин-связывающий домен, содержащий полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности под SEQ ID NO: 21.

В определенных вариантах осуществления, фрагмент фактора Н включает по меньшей мере первые пять N-концевых доменов SCR из фактора Н (например, SCR 1, 2, 3, 4 и 5), а интегрин-связывающий домен включает пептид цикло(RGD)₄. В определенных вариантах осуществления фрагмент фактора Н включает по меньшей мере шесть пять N-концевых доменов SCR из фактора Н (например, SCR 1, 2, 3, 4, 5 и 6), а интегрин-связывающий домен включает пептид цикло(RGD)₄.

В дополнение к фрагменту фактора Н слитый белок может включать фрагмент белка 5, родственного фактору Н (FHRP5). В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать фрагмент домена FHRP5, содержащий полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности под SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать фрагмент домена FHRP5, содержащий полипептидную последовательность под SEQ ID NO: 22. Фрагмент фактора Н в слитом белке может включать по меньшей мере первые четыре, пять или шесть N-концевых доменов SCR из фактора Н, а фрагмент FHRP5 в слитом белке может включать по меньшей мере седьмой и/или восьмой N-концевые домены SCR из FHRP5.

В определенных вариантах осуществления фрагмент фактора Н включает по меньшей мере первые пять N-концевых доменов SCR из фактора Н (например, SCR 1, 2, 3, 4 и 5), а фрагмент FHRP5 включает по меньшей мере седьмой и восьмой N-концевые домены SCR из FHRP5.

В некоторых вариантах осуществления часть слитого белка в виде фрагмента фактора Н представляет собой функциональный фрагмент фактора Н дикого типа. В некоторых вариантах осуществления часть слитого белка в виде фактора Н или его фрагмента получена из замещенного (например, содержащего консервативные замены) фактора Н или сконструированного фактора Н (например, фактора Н, сконструированного

для повышения стабильности, активности и/или других требуемых свойств белка, определенных с помощью прогностической модели или анализа, известного специалисту в данной области техники, например, описанного в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления часть слитого белка, представляющая собой фрагмент FHRP5, представляет собой функциональный фрагмент FHRP5 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления часть композиции на основе слитого белка, представляющая собой FHRP5 или его фрагмент, получена из замещенного (например, содержащего консервативные замены) FHRP5 или сконструированного FHRP5 (например, FHRP5, сконструированного для повышения стабильности, активности и/или других требуемых свойств белка, определенных с помощью прогностической модели или анализа, известного специалисту в данной области техники, например анализа, описанного в данном документе).

Аминокислотные замены могут быть введены в слитые белки, описанные в данном документе, для улучшения функциональности. Например, аминокислотные замены могут быть введены во фрагмент фактора Н, интегрин-связывающий домен или фрагмент FHRP5, где аминокислотная замена увеличивает аффинность связывания фрагмента фактора Н, интегрин-связывающего домена или фрагмента FHRP5 с его лигандом(-ами). Аналогичным образом, аминокислотные замены могут быть введены во фрагмент фактора Н или его фрагмент для увеличения функциональности и/или улучшения фармакокинетики слитого белка.

В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, могут быть слиты с другим соединением, таким как соединение, увеличивающее период полужизни полипептида и/или снижающее потенциальную иммуногенность слитого белка (например, полиэтиленгликоль (PEG)). PEG можно использовать для улучшения водорастворимости, снижения скорости почечного клиренса и снижения иммуногенности слитого белка (см., например, патент США № 6214966, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки). Описанные в данном документе слитые белки можно пэгилировать с помощью любых способов, известных специалисту в данной области техники.

Фрагмент фактора Н можно получить посредством ряда синтетических способов пептидного синтеза путем конденсации фрагментов из одного или нескольких аминокислотных остатков в соответствии с обычными способами пептидного синтеза, известными в данной области техники (Amblard, M. *et al.*, *Mol. Biotechnol.*, 33:239-54, 2006).

В качестве альтернативы фрагмент фактора Н, интегрин-связывающий домен и/или фрагмент FHRP5 можно получить путем экспрессии в подходящей прокариотической или эукариотической системе. В некоторых вариантах осуществления конструкцию на основе ДНК можно вставить в плазмидный вектор, адаптированный для экспрессии в подходящей клетке-хозяине (такой как *E. coli*) или дрожжевой клетке (такой как *S. cerevisiae* или *P. pastoris*), или в бакуловирусный вектор для экспрессии в клетке

насекомого или вирусный вектор для экспрессии в клетке млекопитающего. Примеры клеток млекопитающих, подходящих для рекомбинантной экспрессии, включают, например, клетку эмбриональной почки человека (НЕК) (например, НЕК 293), клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку L, клетку C127, клетку 3T3, клетку ВНК или клетку COS-7. Подходящие векторы экспрессии включают регуляторные элементы, необходимые и достаточные для экспрессии ДНК в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления в слитый белок можно включить лидерную или секреторную последовательность или последовательность, которая используется для очистки слитого белка (например, гистидиновую метку). Фрагмент фактора Н, интегрин-связывающий домен и/или фрагмент FHRP5, полученные посредством генной экспрессии в рекомбинантной прокариотической или эукариотической системе, можно очистить с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, Structural Genomics Consortium, *Nat. Methods*, 5:135-46, 2008).

В определенных вариантах осуществления циклизированный интегрин-связывающий домен и фрагменты FHRP5 также получают с помощью тех же способов, которые описаны для экспрессии и очистки фрагментов фактора Н.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок характеризуется такой структурой в направлении от N-конца к С-концу:

Формула I:

D1-L1-D2-L2-D3,

Формула I

где:

D1 представляет собой фрагмент FH (например, фрагмент FH с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16-18 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней);

L1 отсутствует (например, L1 представляет собой ковалентную связь между D1 и D2 или между D1 и D3) или представляет собой линкер с аминокислотной последовательностью, состоящей из по меньшей мере одной аминокислоты (например, линкер может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 30-122 или ее вариант, характеризующийся 85% или большей идентичностью последовательности с ней) между D1 и D2 или между D1 и D3;

D2 отсутствует (например, D2 представляет собой ковалентную связь между L1 и D3, между D1 и L2 или между L1 и L2) или представляет собой домен VHH, такой как однодоменное антитело (например, однодоменное антитело VHH верблюдовых с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 19-20 и 23 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней);

L2 отсутствует (например, L2 представляет собой ковалентную связь между D2 и D3) или представляет собой линкер с аминокислотной последовательностью, состоящей из по меньшей мере одной аминокислоты (например, линкер может иметь

аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 30-122 или ее вариант, характеризующийся 85% или большей идентичностью последовательности с ней) между D2 и D3; и

D3 представляет собой домен распознавания интегрин (например, пептидный мотив, представляющий собой аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD), например, цикло(RGD)₄ с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 21 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент FH из D1 включает один или несколько доменов SCR FH, где необязательно один или несколько доменов SCR выбраны из группы, состоящей из SCR 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или их варианта, характеризующихся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 24-29. В некоторых вариантах осуществления домены SCR FH выбраны из группы, состоящей из SCR [1-5] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16 или 17, или SCR [1-6] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18.

L1 и L2 могут представлять собой линкеры одного и того же типа и/или содержащие одну и ту же последовательность или разного типа и/или содержащие разные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления композиция формулы I включает аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 4, 5, 8, 9 и 13-15 и ее варианты, характеризующиеся по меньшей мере 85%, 87%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления композиция формулы I кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 128, 129, 132, 133 и 137-139 и ее варианты, характеризующиеся по меньшей мере 85%, 87%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок характеризуется такой структурой в направлении от N-конца к C-концу:

Формула II:

D1-L1-D2,

Формула II

где:

D1 представляет собой фрагмент FH (например, фрагмент FH с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16-18 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней);

L1 отсутствует (например, L1 представляет собой ковалентную связь между D1 и

D2) или представляет собой линкер с аминокислотной последовательностью, состоящей из по меньшей мере одной аминокислоты (например, линкер может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 30-122 или ее вариант, характеризующийся 85% или большей идентичностью последовательности с ней) между D1 и D2; и

D2 представляет собой фрагмент белка 5, родственного фактору H (FHRP5) (например, фрагмент FHRP5 с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 22 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент FH из D1 включает один или несколько доменов SCR FH, где необязательно один или несколько доменов SCR выбраны из группы, состоящей из SCR 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 24-29. В некоторых вариантах осуществления домены SCR FH выбраны из группы, состоящей из SCR [1-5] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16 или 17, или SCR [1-6] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления фрагмент FHRP5 включает один или несколько доменов FHRP5, где необязательно домены выбраны из доменов 7 и 8 (например, аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления фрагмент FHRP5 включает домены 7-8 или их вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления композиция формулы II включает либо SEQ ID NO: 6 или 10, либо их варианты, характеризующиеся по меньшей мере 85%, 87%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности с ними. В некоторых вариантах осуществления композиция формулы II кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 130 или 134, либо ее вариантами, характеризующимися по меньшей мере 85%, 87%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок характеризуется такой структурой в направлении от N-конца к C-концу:

Формула III:

D1-L1-D2-L2-D3,

Формула III

где:

D1 представляет собой домен распознавания интегрин (например, пептидный мотив, представляющий собой аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD), например,

цикло(RGD)₄ с последовательностью под SEQ ID NO: 21 или его вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней);

L1 отсутствует (например, L1 представляет собой ковалентную связь между D1 и D2 или между D1 и D3) или представляет собой линкер с аминокислотной последовательностью, состоящей из по меньшей мере одной аминокислоты (например, линкер может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 30-122 или ее вариант, характеризующийся 85% или большей идентичностью последовательности с ней) между D1 и D2 или между D1 и D3;

D2 отсутствует (например, D2 представляет собой ковалентную связь между L1 и D3, между D1 и L2 или между L1 и L2) или представляет собой домен VHH, такой как однодоменное антитело (например, однодоменное антитело VHH верблюдовых с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 19-20 и 23 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней);

L2 отсутствует (например, L2 представляет собой ковалентную связь между D2 и D3) или представляет собой линкер с аминокислотной последовательностью, состоящей из по меньшей мере одной аминокислоты (например, линкер может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 30-122 или ее вариант, характеризующийся 85% или большей идентичностью последовательности с ней) между D2 и D3; и

D3 представляет собой фрагмент FH (например, фрагмент FH с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16-18 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент FH из D3 включает один или несколько доменов SCR FH, где необязательно один или несколько доменов SCR выбраны из группы, состоящей из SCR 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или их варианта, характеризующихся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 24-29. В некоторых вариантах осуществления домены SCR FH выбраны из группы, состоящей из SCR [1-5] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 16 или 17, или SCR [1-6] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18.

L1 и L2 могут представлять собой линкеры одного и того же типа и/или содержащие одну и ту же последовательность или разного типа и/или содержащие разные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления композиция формулы III включает либо последовательность под SEQ ID NO: 2 или 3, либо ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью

последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления композиция формулы III кодируется либо последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 126 или 127, либо ее вариантами, характеризующимися по меньшей мере 85%, 87%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок характеризуется такой структурой в направлении от N-конца к C-концу:

Формула IV:

D1-D2 или D2-D1,

Формула IV

где:

D1 представляет собой домен VHH, такой как однодоменное антитело (например, однодоменное антитело VHH верблюдовых с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 19-20 и 23 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней);

D2 представляет собой фрагмент FH (например, фрагмент FH под любым из SEQ ID NO: 16 или 17 или ее вариантом, характеризующимся 85% или большей идентичностью последовательности с ней).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент FH из D3 включает один или несколько доменов SCR FH, где необязательно один или несколько доменов SCR выбраны из группы, состоящей из SCR 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или их варианта, характеризующегося 85% или большей идентичностью последовательности с ними. В некоторых вариантах осуществления домены SCR FH выбраны из группы, состоящей из SCR [1-5] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 16 или 17, или SCR [1-6] или их варианта, характеризующегося по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления композиция формулы IV включает последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, 7, 11 и 12 или ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления композиция формулы IV кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 125, 131, 135 и 136 или ее вариантами, характеризующимися по меньшей мере 85%, 87%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичностью последовательности с ней.

Белки и домены иммуноглобулинов

Описанные в данном документе слитые белки могут содержать домен одноцепочечного VHH. Такие антитела в природе существуют у верблюдовых и акул (Saerens et al., *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8:600-608, 2008). Антитела верблюдовых описаны, например, в патентах США №№ 5759808; 5800988; 5840526; 5874541; 6005079 и 6015695, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством

ССЫЛКИ.

Иллюстративные домены VHH включают домены, имеющие последовательность QVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE}FVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDN^{AKNSLYLQMN}SLRAEDTAVYYCAADLGDGSWVDYVNAEPY^{EYDYWGQGT}LVTVSS (SEQ ID NO: 19), EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE}FVSAISGSGGSTYYYADSVKGRFTISRDN^{AKNSLYLQMN}SLRAEDTAVYYCAADLGDGSWVDYVNAEPY^{EYDYWGQGT}LVTVSS (SEQ ID NO: 20) или EVQLLESGGGLV^QPGGSLRLS^{CAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE}FVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLKPEDTAVYYCAADLGDGSWVDYVNMEPY^{EYDYWGQGT}QVTVSS (SEQ ID NO: 23).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать домен VHH, содержащий полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности под SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать домен VHH, содержащий полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать домен VHH, содержащий полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности под SEQ ID NO: 23.

Слитый белок может включать в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2-L2-D3, при этом D1 включает фрагмент белка FH, такой как SCR 1-5 FH или SCR 1-6 FH, L1 отсутствует или включает линкер, D2 включает домен VHH, L2 отсутствует или включает линкер, и D3 включает домен распознавания интегрин, такой как цикло(RGD)₄.

В другом примере слитый белок может включать в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2-L2-D3, при этом D1 включает домен распознавания интегрин, такой как цикло(RGD)₄, L1 отсутствует или включает линкер, D2 включает домен VHH, L2 включает линкер или отсутствует, и D3 включает фрагмент белка FH, такой как SCR 1-5 FH.

В другом примере слитый белок может включать в направлении от N-конца к C-концу: D1-D2 или D2-D1, при этом D1 включает домен VHH, а D2 включает фрагмент белка FH. Слитый белок может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, 7, 11 и 12 или ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1, 7, 11 и 12.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок фактора H, включающий домен VHH, характеризуется увеличенным временем внутривитальной удерживаемости на поверхности эпителия почки по сравнению со слитым белком, не содержащим домен

VНН. Не привязываясь к конкретной теории, полагают, что размер слитых белков, описанных в данном документе (например, приблизительно ≤ 60 кДа (такой как менее 60 кДа)), позволяет слитым белкам проникать во внесосудистые компартменты в пределах почки, недоступные для моноклональных антител и биспецифических средств, связанных с альбумином, и полагают, что применение домена VНН в слитых белках, описанных в данном документе, позволяет слитым белкам откладываться на апикальной мембране проксимальных канальцев и париетальных эпителиальных клеток, где естественно низкие уровни мембран-ассоциированных поверхностных регуляторов придают восприимчивость к продуктам САР, и проявлять увеличенное удержание на эпителии почки. В некоторых вариантах осуществления время внутрпочечного удержания увеличивается в по меньшей мере 1 раз (например, в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз) по сравнению со слитым белком, не содержащим домен VНН. В некоторых вариантах осуществления время внутрпочечного удержания составляет от 24 часов до 96 часов (например, от 36 часов до 96 часов, от 48 часов до 96 часов, от 60 часов до 96 часов, от 72 часов до 96 часов и от 60 часов до 84 часов).

Интегрин-связывающий домен

Слитый белок также может содержать интегрин-связывающий домен, который может действовать как нацеливающий мотив для улучшения фармакокинетики слитого белка и опосредовать специфическое нацеливание на почечные клетки в сайтах повреждения или ремоделирования. Интегрин-связывающий домен можно добавить в качестве дополнительного домена к любому из слитых белков, описанных в данном документе.

Иллюстративные интегрин-связывающие домены включают один или несколько пептидных мотивов, представляющих собой циклическую аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD), слитых либо с N-, либо с C-концом слитого белка. Мотивы RGD задействуют внеклеточные домены α - и β -субъединиц интегрина на поверхности клетки, которые могут активироваться в ответ на повреждение (например, включая фиброз почки, опосредованный передачей сигналов TGF- β). Не привязываясь к конкретной теории, ожидается, что включение мотива циклического RGD может также ограничивать связывание лиганда про-TGF- β и предотвращать передачу профибротических сигналов. Можно конструировать и прикреплять к слитому белку различные варианты интегрин-связывающих мотивов. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать интегрин-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности под SEQ ID NO: 21.

Слитый белок может включать в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2-L2-D3, при этом D1 включает фрагмент белка FH, такой как FH с SCR [1-5] или FH с SCR [1-6]. 1-6, L1 includes a linker or is absent, D2 includes a VНН domain or is absent, L2 includes a linker or is absent, and D3 includes an integrin binding domain, such as a cyclic

arginylglycylaspartic acid motif (e.g., cyclo(RGD)₄). Слитый белок может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 4, 5, 8, 9 и 13-15 или ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 4, 5, 8, 9 и 13-15. Слитый белок также может содержать

The fusion protein may include, from N-terminus to C-terminus, D1-L1-D2-L2-D3, wherein D1 includes an integrin binding domain, such as a cyclic arginylglycylaspartic acid motif (e.g., cyclo(RGD)₄), L1 includes a linker or is absent, D2 includes a VHH domain or is absent, L2 includes a linker or is absent, and D3 includes фрагмент белка FH, такой как FH с SCR [1-5] или FH с SCR [1-6]. 1-6.). Слитый белок может иметь аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 2 или 3 или ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 2 или 3.

Integrin binding domains, such as one or more RGD motifs, can be fused to a fusion protein described herein, e.g., by chemical conjugation. If desired, a linker can be inserted between the fragment of factor H, VHH, or fragment of FHRP5, and the integrin binding domain.

Линкеры для слитых белков

Домены L1 и L2 слитых белков, описанных в данном документе, представляют собой линкеры. Линкер используется для создания связи или соединения между, например, полипептидами или белковыми доменами. Например, фрагмент фактора H может быть связан непосредственно с доменом VHH (например, доменом однодоменного VHH верблюдовых) с помощью одного или нескольких подходящих линкеров. Линкер может представлять собой простую ковалентную связь, например, пептидную связь, синтетический полимер, например, полимер PEG, или связь любого типа, созданную в результате химической реакции, например, химической конъюгации. Пептидный линкер может представлять собой, например, линкер из одного или нескольких аминокислотных остатков, вставленных или включенных в переходный участок между двумя доменами (например, фрагментом белка FH и доменом VHH). Состав и последовательность аминокислотных остатков в линкере могут варьироваться в зависимости от требуемой вторичной структуры. Например, глицин, серин и аланин являются применимыми для линкеров ввиду их гибкости. Любой аминокислотный остаток может считаться линкером в комбинации с одним или несколькими другими аминокислотными остатками, которые могут являться такими же или отличными от первого аминокислотного остатка, для конструирования более крупных пептидных линкеров, при необходимости, в зависимости от требуемой длины и/или свойств.

Для слияния двух или более белковых доменов вместе (например, фрагмента фактора H и домена VHH) можно использовать различные линкеры. Линкеры могут быть гибкими, жесткими или расщепляемыми. Линкеры могут быть структурированными или

неструктурированными. Остатки для линкера могут быть выбраны из встречающихся в природе аминокислот, аминокислот, не встречающихся в природе, и модифицированных аминокислот. Линкер может включать по меньшей мере 1 или больше, 2 или больше, 5 или больше, 10 или больше, 15 или больше или 20 или больше аминокислотных остатков. Пептидные линкеры могут включать без ограничения глициновые линкеры, богатые глицином линкеры, серин-глициновые линкеры и т. п. Богатые глицином линкеры включают по меньшей мере приблизительно 50% глицина.

В некоторых вариантах осуществления используемый(-ые) линкер(ы) придает(-ют) одно или несколько других благоприятных свойств или функциональных возможностей полипептиду(-ам), описанному(-ым) в данном документе, и/или обеспечивает(-ют) один или несколько сайтов для образования производных и/или для присоединения функциональных групп. Например, линкеры, содержащие один или несколько заряженных аминокислотных остатков, могут обеспечивать улучшенные гидрофильные свойства, тогда как линкеры, которые образуют или содержат небольшие эпитопы или метки, могут использоваться в целях обнаружения, идентификации и/или очистки. Специалист в данной области техники сможет определить оптимальные линкеры для применения в конкретном полипептиде.

Когда для полипептида используют два или более линкеров, линкеры могут быть одинаковыми или разными.

Линкеры могут содержать мотивы, например, множественные или повторяющиеся мотивы. В одном варианте осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность GS или ее повторы (Huston, J. *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203:46-88, 1991). В другом варианте осуществления линкер включает аминокислотную последовательность EK или ее повторы (Whitlow, M. *et al.*, *Protein Eng.*, 6:989-95, 1993). В другом варианте осуществления линкер включает аминокислотную последовательность GGS или ее повторы.

В другом варианте осуществления линкер включает аминокислотную последовательность GGGGA (SEQ ID NO: 80) или ее повторы. В определенных вариантах осуществления, линкер содержит более одного повтора GGS или GGGGS (патент США № 6541219, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления пептидный линкер может быть богат небольшими или полярными аминокислотами, такими как G и S, но может содержать дополнительные аминокислоты, такие как T и A, для поддержания гибкости, а также полярные аминокислоты, такие как K и E, для улучшения растворимости.

Иллюстративные линкеры включают без ограничения: G₄S (SEQ ID NO: 36), (G₄A)₂G₄S (SEQ ID NO: 34), (G₄A)₂G₃AG₄S (SEQ ID NO: 30), G₄AG₃AG₄S (SEQ ID NO: 33), G₄SDA (SEQ ID NO: 79), G₄SDAA (SEQ ID NO: 31), G₄S (SEQ ID NO: 36), (G₄S)₂ (SEQ ID NO: 37), (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 35), (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 39), (G₄S)₅ (SEQ ID NO: 40), (G₄S)₆ (SEQ ID NO: 41), EAAAK (SEQ ID NO: 95), (EAAAK)₃ (SEQ ID NO: 42), PAPAP (SEQ ID NO: 43), G₄SPAPAP (SEQ ID NO: 44), PAPAPG₄S (SEQ ID NO: 45), GSTSGKSSEGKG

(SEQ ID NO: 46), (GGGDS)₂ (SEQ ID NO: 47), (GGGES)₂ (SEQ ID NO: 48), GGGDSGGGGGS (SEQ ID NO: 49), GGGASGGGGGS (SEQ ID NO: 50), GGGESGGGGGS (SEQ ID NO: 51), ASTKGP (SEQ ID NO: 52), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 53), G₃P (SEQ ID NO: 54), G₇P (SEQ ID NO: 55), PAPNLLGGP (SEQ ID NO: 56), G₆ (SEQ ID NO: 57), G₁₂ (SEQ ID NO: 58), APELPGGP (SEQ ID NO: 59), SEPQPQPG (SEQ ID NO: 60), (G₃S₂)₃ (SEQ ID NO: 61), GGGGGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 62), GGGGSGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 63), (GGSSS)₃ (SEQ ID NO: 64), (GS₄)₃ (SEQ ID NO: 65), G₄A(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 66), G₄SG₄AG₄S (SEQ ID NO: 67), G₃AS(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 68), G₄SG₃ASG₄S (SEQ ID NO: 69), G₄SAG₃SG₄S (SEQ ID NO: 70), (G₄S)₂AG₃S (SEQ ID NO: 71), G₄SAG₃SAG₃S (SEQ ID NO: 72), G₄D(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 73), G₄SG₄DG₄S (SEQ ID NO: 74), (G₄D)₂G₄S (SEQ ID NO: 75), G₄E(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 76), G₄SG₄EG₄S (SEQ ID NO: 77) и (G₄E)₂G₄S (SEQ ID NO: 78), (GGGGS)_n, где n может быть любым числом, KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 82) и EGKSSSGSSESKST (SEQ ID NO: 83), (Gly)₈ (SEQ ID NO: 84), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 87) и (Gly)₆ (SEQ ID NO: 57). Иллюстративные жесткие линкеры включают без ограничения A(EAAAK)A (SEQ ID NO: 86), A(EAAAK)_nA, где n может быть любым числом, или (XP)_n, где n может быть любым числом, при этом X обозначает любую аминокислоту. Иллюстративные расщепляемые *in vivo* линкеры включают, например, LEAGCKNFFPRSFTSCGSLE (SEQ ID NO: 87), GSST (SEQ ID NO: 88) и CRRRRRREAEAC (SEQ ID NO: 89). В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать от 2 до 12 аминокислот, включая мотивы GS, например, GS, GSGS (SEQ ID NO: 90), GSGSGS (SEQ ID NO: 91), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 92), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 93) или GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 95). В определенных других вариантах осуществления линкер может содержать от 3 до 12 аминокислот, включая мотивы GGS, например, GGS, GGSGGS (SEQ ID NO: 96), GGSGGS (SEQ ID NO: 97) и GGSGGS (SEQ ID NO: 98). В других вариантах осуществления линкер может содержать от 4 до 12 аминокислот, включая мотивы GGSG, например, GGSG (SEQ ID NO: 99), GGSGGGSG (SEQ ID NO: 100) или GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 101). В других вариантах осуществления линкер может содержать мотивы GGGGS (SEQ ID NO: 36). В других вариантах осуществления линкер также может содержать аминокислоты, отличные от глицина и серина, например, GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 102), SACYCELS (SEQ ID NO: 103), RSIAT (SEQ ID NO: 104), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 105), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGT GSG (SEQ ID NO: 16), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 107), GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 108), GGGGAGGGGAGGGGS (SEQ ID NO: 32), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGS (SEQ ID NO: 110), DAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 111), GGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 81), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGS (SEQ ID NO: 30) или GGSSRSSSSGGGGAGGGG (SEQ ID NO: 112).

В одном варианте осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер, такой как ферментативно расщепляемый линкер. Включение расщепляемого

линкера может помочь в обнаружении слитого белка. Ферментативно расщепляемый линкер может быть расщеплен, например, трипсином, протеазой 3С риновируса человека (3С), энтерокиназой (Ekt), фактором Ха (FXa), протеазой вируса гравировки табака (TEV) или тромбином (Thr). Последовательности расщепления для каждого из этих ферментов хорошо известны в данной области техники. Например, трипсин расщепляет пептиды с С-концевой стороны от аминокислотных остатков лизина и аргинина. Если с карбоксильной стороны от сайта расщепления находится остаток пролина, расщепление не произойдет. Было показано, что если по обе стороны от сайта расщепления находится кислотный остаток, скорость гидролиза замедляется. Следующие линкеры являются примерами линкеров, которые можно расщепить с применением трипсина: $K(G_4A)_2G_3AG_4SK$, $R(G_4A)_2G_3AG_4SR$, $K(G_4A)_2G_3AG_4SR$, $R(G_4A)_2G_3AG_4SK$, $K(G_4A)_2G_4SK$, $K(G_4A)_2G_4SR$, $R(G_4A)_2G_4SK$ и $R(G_4A)_2G_4SR$.

Примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в ферментативно расщепляемый линкер, является сайт расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV), например, ENLYTQS, в котором протеаза осуществляет расщепление между глутамином и серином. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в ферментативно расщепляемый линкер, является сайт расщепления энтерокиназой, например, DDDDK, в котором расщепление происходит после остатка лизина. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в ферментативно расщепляемый линкер, является сайт расщепления тромбином, например, LVPR. Для протеазы 3С риновируса человека сайтом расщепления является LEVLFQGP, в котором расщепление происходит между остатками глутамина и глицина. Сайтом расщепления для протеазы фактора Ха является IEDGR, в котором расщепление происходит между остатками глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты.

Включение расщепляемого линкера полезно тем, что он имеет последовательность аминокислот, которая уникальна среди других пептидов в протеоме человека, которые образуются с помощью вышеупомянутых ферментов. По существу, этот вырезанный линкер может служить уникальным идентифицирующим пептидом слитого белка при введении человеку в качестве фармацевтического препарата. Таким образом, расщепляемый линкер можно обнаружить и количественно оценить с помощью масс-спектрометрии и использовать для контроля фармакокинетики слитого белка.

В другом варианте осуществления линкер представляет собой полимерный или олигомерный глициновый линкер и может включать лизин на N-конце, С-конце или как на N-, так и на С-концах.

В контексте формул I и III, приведенных выше, С-конец D1 может быть связан с N-концом D2. В определенном варианте осуществления С-конец фрагмента FH связан с N-концом VNH. В определенных вариантах осуществления С-конец интегрин-связывающего домена связан с N-концом VNH. В определенном варианте осуществления С-конец D2 может быть связан с N-концом D3. В определенном варианте осуществления С-конец

VНН может быть связан с N-концом интегрин-связывающего домена. В определенном варианте осуществления С-конец VНН может быть связан с N-концом фрагмента FH. В другом примере С-конец D1 может быть связан с N-концом D3. В определенных вариантах осуществления С-конец фрагмента FH связан с N-концом интегрин-связывающего домена. В определенном варианте осуществления С-конец интегрин-связывающего домена связан с N-концом фрагмента FH. В другом примере С-конец D2 может быть связан с N-концом D3. В определенных вариантах осуществления С-конец VНН может быть связан с N-концом интегрин-связывающего домена. В определенных вариантах осуществления С-конец VНН может быть связан с N-концом фрагмента FH.

В контексте формулы II, приведенной выше, С-конец D1 может быть связан с N-концом D2. В определенном варианте осуществления С-конец фрагмента FH связан с N-концом фрагмента FHRP5.

Таблица 1. Слитые белки с последовательностью в направлении от N-конца к С-концу: D1-L1-D2-L2-D3

Название соединения	D1	L1	D2	L2	D3	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
Соединение D	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	G ₄ A	--	--	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 128
Соединение E	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	--	VНН (SEQ ID NO: 19)	G ₄ A	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 129
Соединение H	hFH1-5 (SEQ ID NO: 17)	G ₄ A	--	--	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 132
Соединение I	hFH1-5 (SEQ ID NO: 17)	--	VНН (SEQ ID NO: 19)	G ₄ A	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 133

Соединение М	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	--	VHH (SEQ ID NO: 20)	G ₄ A	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 137
Соединение N	hFH1-6 (SEQ ID NO: 18)	--	VHH (SEQ ID NO: 20)	G ₄ A	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 138
Соединение O	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	G ₄ A	VHH (SEQ ID NO: 20)	G ₄ A	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 139

“--” указывает на отсутствие признака.

Таблица 2. Слитые белки с последовательностью в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2-L2-D3

Название соединения	D1	L1	D2	L2	D3	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
Соединение В	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	G ₄ A	ME194 VHH (SEQ ID NO: 23)	(G ₄ A) ₃	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 126
Соединение С	Цикло(RGD) ₄ (SEQ ID NO: 21)	G ₄ A	ME194 VHH (SEQ ID NO: 23)	(G ₄ A) ₃	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 127

Таблица 3. Слитые белки с последовательностью в направлении от N-конца к C-концу: D1-L1-D2

Название соединения	D1	L1	D2	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
Соединение F	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	(G ₄ A) ₃	FHRP5 ₇₋₈ (SEQ ID NO: 22)	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 130
Соединение J	hFH1-5 (SEQ ID NO: 17)	(G ₄ A) ₂ G ₃ A G ₄ S	FHRP5 ₇₋₈ (SEQ ID NO: 22)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 134

Таблица 4. Слитые белки с последовательностью в направлении от N-конца к C-концу: D1-D2

Название соединения	D1	D2	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
Соединение A	ME194 VHH (SEQ ID NO: 23)	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 125
Соединение G	VHH (SEQ ID NO: 19)	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 131

Таблица 5. Слитые белки с последовательностью в направлении от N-конца к C-концу: D2-D1

Название соединения	D1	D2	Аминокислотная последовательность
Соединение K	hFH1-5 (SEQ ID NO: 16)	VHH (SEQ ID NO: 19)	SEQ ID NO: 11
Соединение L	hFH1-5 (SEQ ID NO: 17)	VHH (SEQ ID NO: 19)	SEQ ID NO: 12

Получение слитых белков

В данном документе описаны способы получения слитого белка с применением молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих слитые белки, такие как слитые белки, показанные в таблицах 1-5. Молекула нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с подходящей последовательностью контроля с образованием единицы экспрессии, кодирующей белок. Единицу экспрессии можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина, и трансформированную клетку-хозяина можно культивировать в условиях, которые позволяют осуществлять продукцию

рекомбинантного белка. Необязательно рекомбинантный белок можно выделить из среды или из клеток; в некоторых случаях извлечение и очистка белка могут не потребоваться, если некоторые примеси являются допустимыми. Дополнительные остатки можно включить на N- или C-конце последовательности, кодирующей белок, для облегчения очистки (например, гистидиновую метку) и, при желании, впоследствии удалить с образованием конечного белкового продукта.

Слитый белок можно экспрессировать с одного полинуклеотида, который кодирует весь слитый белок, или с нескольких (например, двух или более) полинуклеотидов, которые можно экспрессировать с помощью подходящих систем экспрессии или можно экспрессировать совместно. Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, которые экспрессируются совместно, могут связываться, например, посредством дисульфидных связей или другими способами с образованием функционального слитого белка. Например, часть моноклонального антитела, представляющая собой легкую цепь, может кодироваться отдельным полинуклеотидом от части моноклонального антитела, представляющей собой тяжелую цепь. При совместной экспрессии в клетке-хозяине полипептиды тяжелой цепи будут связываться с полипептидами легкой цепи с образованием моноклонального антитела.

Как правило, нуклеиновую кислоту, кодирующую требуемый слитый белок, получают с применением способов молекулярного клонирования и обычно помещают в вектор, такой как плаزمид или вирус. Вектор применяют для трансформации нуклеиновой кислотой клетки-хозяина, подходящей для экспрессии слитого полипептида. Репрезентативные способы раскрыты, например, в Maniatis et al. (Cold Springs Harbor Laboratory, 1989). В качестве подходящих клеток-хозяев можно применять клетки многих типов, хотя часто выбирают клетки млекопитающих, поскольку они способны обеспечивать соответствующие посттрансляционные модификации. Клетки-хозяева могут включать, например, клетку эмбриональной почки человека (НЕК) (например, НЕК 293), клетку яичника китайского хомячка (СНО), клетку L, клетку С127, клетку 3Т3, клетку ВНК, клетку COS-7 или любые другие подходящие клетки-хозяева, известные из уровня техники.

В одном варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота или полинуклеотид, кодирующие слитый белок. В одном варианте осуществления предусмотрен вектор, включающий нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, кодирующие слитый белок. В одном варианте осуществления предусмотрена клетка-хозяин, включающая один или несколько полинуклеотидов, кодирующих слитый белок. В определенных вариантах осуществления предусмотрена клетка-хозяин, включающая один или несколько слитых векторов экспрессии. Слитые белки можно получить путем экспрессии нуклеотидной последовательности в любой подходящей системе экспрессии, известной в данной области техники. Можно применять любую систему экспрессии, включая дрожжевые, бактериальные, животные, растительные, эукариотические и прокариотические системы. В некоторых вариантах осуществления можно применять

дрожжевые системы, которые были модифицированы для снижения нативного гликозилирования, гипергликозилирования или протеолитической активности дрожжей. Кроме того, для получения слитых белков, указанных в данном документе, могут применяться любые системы экспрессии *in vivo*, разработанные для экспрессии рекомбинантных белков на высоком уровне в пределах организмов, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе фактора Н, описанный в данном документе, получают путем культивирования одной или нескольких клеток-хозяев, включающих одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, способных экспрессировать слитый белок в условиях, подходящих для экспрессии слитого белка. В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе фактора Н получают из культуры клеток или культуральной среды.

Слитый белок также можно получить с применением химических способов для синтеза требуемой аминокислотной последовательности полностью или частично. Например, полипептиды можно синтезировать с помощью твердофазных методик, отщепить от смолы и очистить посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (например, Creighton (1983) *Proteins: Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co, New York N.Y.). Состав синтетических полипептидов может быть подтвержден посредством аминокислотного анализа или секвенирования. В дополнение аминокислотную последовательность слитого белка или любой его части можно изменить во время прямого синтеза и/или объединить с применением химических способов с последовательностью из других субъединиц или любой их частью с получением варианта полипептида.

Выделение/очистка слитых белков

Секретируемые биологически активные слитые белки, описанные в данном документе, такие как белки, которые описаны в таблицах 1-5, можно очистить с помощью таких методик, как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, например, аффинная хроматография на основе белка А, эксклюзионная хроматография и т. п., известные в данной области техники. Условия, используемые для очистки конкретного белка, отчасти зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность и т. д., как должно быть очевидно специалисту в данной области техники.

Анализ в отношении активности слитого белка

Анализ на гемолитическую активность

Слитые белки, описанные в данном документе, оценивали в отношении активности с применением анализа на гемолитическую активность пути системы комплемента, в котором измеряют опосредованный комплементом лизис эритроцитов кролика, вторичный по отношению к активации альтернативного пути на клеточной поверхности. Эритроциты кролика обычно активируют опосредованный комплементом лизис в сыворотке крови мыши или человека. По мере активации C3 в сыворотке крови C3-конвертазы, фрагменты активации C3 и C5-конвертазы откладываются на эритроцитах

кролика. Активность альтернативного пути системы комплемента в сыворотке крови в присутствии слитого белка, содержащего фрагмент фактора Н и домен VНН, фрагмент фактора Н и фрагмент FHRP5 или фрагмент фактора Н, VНН и интегрин-связывающий домен (например, слитые белки из таблиц 1-5), например, оценивали в зависимости от концентрации в сыворотке крови человека или мыши с добавлением Mg^{++} и EGTA в качестве секвестранта Са, что благоприятствует альтернативному пути активации системы комплемента. Инкубация кроличьих эритроцитов в нормальной сыворотке крови мыши или человека вызывает лизис клеток, тогда как добавление наномолярных количеств слитого белка, содержащего фрагмент фактора Н и домен VНН, или фрагмент фактора Н и фрагмент FHRP5, или фрагмент фактора Н, домен VНН и интегрин-связывающий домен, например, уменьшает степень лизиса (см. фиг. 2А-2D). Слитые белки по настоящему изобретению могут проявлять полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC_{50}), составляющую от приблизительно 15 нМ до приблизительно 250 нМ (например, от приблизительно 15 нМ до приблизительно 240 нМ, от приблизительно 15 нМ до приблизительно 220 нМ, от приблизительно 200 нМ до приблизительно 150 нМ, от приблизительно 15 нМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 15 нМ до приблизительно 40 нМ или от приблизительно 15 нМ до приблизительно 50 нМ). В некоторых вариантах осуществления слитый белок может проявлять IC_{50} , составляющую от 19 нМ до 240 нМ (например, от приблизительно 19 нМ до приблизительно 230 нМ, от приблизительно 50 нМ до приблизительно 240 нМ, от приблизительно 100 нМ до приблизительно 240 нМ, от приблизительно 150 нМ до приблизительно 240 нМ, от приблизительно 200 нМ до приблизительно 240 нМ, от приблизительно 19 нМ до 50 нМ, от приблизительно 19 нМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 19 нМ до приблизительно 150 нМ, от приблизительно 19 нМ до приблизительно 200 нМ и от приблизительно 19 нМ до приблизительно 230 нМ).

Таблица 6. Сводная информация о полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) в анализе на гемолитическую активность альтернативного пути системы комплемента (САР)

Соединение	IC_{50} (нМ)
А	48,27
В	62,63
Д	117,64
Е	165,30
Г	116,40
Н	56,41
І	137,01
К	237,10

L	228,80
M	28,93
N	19,61
O	40,61

Анализ на активность системы комплемента

Описанные в данном документе слитые белки (например, слитые белки из таблиц 1-5) можно оценить в отношении активности альтернативного пути системы комплемента в жидкой фазе с применением набора для анализа альтернативного пути системы комплемента, например, набора для определения альтернативного пути системы комплемента WIESLAB[®], Лунд, Швеция. Этот способ сочетает в себе принципы анализа на гемолитическую активность в отношении активации системы комплемента с применением меченых антител, специфических в отношении неоантигена, образующегося в результате активации системы комплемента. Количество образовавшегося неоантигена пропорционально функциональной активности альтернативного пути. В наборе «Альтернативный путь системы комплемента» лунки планшета покрыты специфическими активаторами альтернативного пути. Сыворотку крови разбавляют разбавителем, содержащим специфические блокаторы, чтобы гарантировать активацию только альтернативного пути. Например, VHH к пропердину можно вводить в кровь пациента зависимым от концентрации образом. Во время инкубации разведенной сыворотки крови пациента в лунках система комплемента активируется под действием специфического покрытия. Затем лунки промывают и выявляют C5b-9 с помощью специфического меченого щелочной фосфатазой антитела к неоантигену, полученному в результате активации системы комплемента. Степень активации системы комплемента коррелирует с интенсивностью окрашивания и измеряется по показателям поглощения (оптической плотности (OD)) при 405 нм. Добавление наномолярных количеств слитого белка на основе фактора Н согласно настоящему изобретению, например, снижает степень активности. Дополнительные иллюстративные анализы для определения активности пути системы комплемента включают анализы, описанные в Hebell et al., (*Science* (1991) 254(5028):102-105).

Фармацевтические композиции, дозировка и введение

Слитые белки, описанные в данном документе (см., например, таблицы 1-5, такие как белки, описанные в таблице 1), могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения субъекту. Фармацевтические композиции, включающие слитые белки на основе фактора Н, описанные в данном документе, могут быть составлены для введения в индивидуальных дозах в диапазоне, например, от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг. Фармацевтическая композиция может содержать, например, от 0,1 мкг/0,5 мл до 1 г/5 мл слитого белка. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит приблизительно 1-200 мг/мл, например приблизительно 30-100 мг/мл, например приблизительно 50 мг/мл

(например, 50 мг/мл) слитого белка.

Композиции, включающие слитые белки на основе фактора Н, также можно составлять для схем однократного или многократного введения. Дозы можно составлять для введения, например, раз в час, раз в два часа, раз в день, два раза в день, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в два месяца или раз в год. В качестве альтернативы дозы можно составлять для введения, например, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз, одиннадцать раз или двенадцать раз в день.

Фармацевтические композиции, включающие слитые белки на основе фактора Н, можно составлять в соответствии со стандартными способами. Получение фармацевтических составов является хорошо разработанной областью техники и дополнительно описано например, в Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al. (1999) *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); и Kibbe (2000) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, American Pharmaceutical Association, 3rd Edition (ISBN: 091733096X).

Фармацевтическая композиция может включать слитый белок и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин “фармацевтически приемлемый носитель” включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Термин “фармацевтически приемлемый носитель” исключает среду для культуры тканей, включающую бычью или лошадиную сыворотку. Фармацевтически приемлемые носители или адъюванты сами по себе и не индуцируют выработку антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и не вызывают защиту. Следовательно, фармацевтически приемлемые носители по своей природе являются нетоксичными и не представляют собой терапевтические препараты, и известны специалисту в данной области техники. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или несколько из воды, солевого раствора, забуференного фосфатом солевого раствора, декстрозы, глицерина, этанола и т. п., а также их комбинации. Некоторые варианты осуществления будут включать в композицию изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества включают незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты, стабилизаторы или буферы, которые повышают срок хранения или эффективность антитела.

Композиции, описанные в данном документе, могут быть приготовлены в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые

лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Такие составы можно получить с помощью способов, известных из уровня техники, таких как, например, способы, описанные в Epstein et al. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3688; Hwang et al. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4030; а также патентах США № 4485045 и № 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты, например, в патенте США № 5013556.

Фармацевтические композиции, включающие слитые белки на основе фактора H, также могут быть составлены с носителем, который будет обеспечивать защиту композиции (например, слитого белка на основе фактора H) от быстрого высвобождения, как, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Из уровня техники известно много способов получения таких составов. См., например, J.R. Robinson (1978) *Sustained and Controlled*

Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York.

Конечная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов, таких как композиции, подобные тем, которые применяются для пассивной иммунизации людей другими антителами. Композиция(-и) может(-гут) быть доставлена(-ы), например, путем парентеральной инъекции (например, внутривенной, подкожной, внутривнутрибрюшинной или внутримышечной инъекции) или путем местного введения (например, непосредственно в почки).

Фармацевтические композиции могут быть обеспечены в стерильной форме и стабильны в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъекционные растворы можно получить путем включения слитого белка в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией перечисленных выше ингредиентов, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают путем включения слитого белка в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов иллюстративными способами получения являются вакуумное высушивание и сублимация, которые позволяют получить порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его раствора, предварительно подвергнутого стерилизации фильтрованием. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем применения такого покрытия, как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем

применения поверхностно-активных веществ. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию реагента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина. Выбранная форма частично зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Например, композиции, предназначенные для системной или местной доставки, могут находиться в форме для инъекционных или инфузионных растворов. Композиция может быть составлена, например, в виде буферного раствора с подходящей концентрацией, и быть подходящей для хранения при 2-8°C (например, 4°C). Композицию также можно составить для хранения при температуре ниже 0°C (например, -20°C или -80°C). Композицию можно дополнительно составить для хранения в течение до 2 лет (например, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 года, 1½ года или 2 лет) при 2-8°C (например, 4°C). Таким образом, композиции, описанные в данном документе, могут быть стабильными при хранении в течение по меньшей мере 1 года при 2-8°C (например, 4°C).

Слитые белки, описанные в данном документе, можно вводить различными способами, известными в данной области техники, хотя для многих терапевтических применений выбранным путем/способом введения является внутривенная инъекция или инфузия. Слитые белки также можно вводить посредством внутримышечной или подкожной инъекции. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будут меняться в зависимости от требуемых результатов.

В определенных вариантах осуществления слитый белок можно получить с носителем, который будет защищать от быстрого высвобождения, как, например, в составе с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки.

Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочная кислота. Пролонгированной абсорбции инъекционных композиций можно добиться путем включения в композицию средства, которое замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина. Специалистам в данной области техники известно множество способов получения таких составов (например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978). Дополнительные способы, применимые для контролируемого или замедленного высвобождения слитых белков, раскрытых в данном документе, описаны, например, в WO 2016/081884, все содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтическая(-ие) композиция(-и) может(-гут) характеризоваться значением pH, составляющим приблизительно 5,6-10,0, приблизительно 6,0-8,8 или приблизительно 6,5-8,0. Например, значение pH может составлять приблизительно 6,2, 6,5, 6,75, 7,0 или 7,5, такое как pH 7,0. Фармацевтические композиции могут быть составлены для перорального, сублингвального, интраназального, внутриглазного, ректального,

трансдермального, слизистого, местного, интравитреального или парентерального введения. Парентеральное введение может включать внутрикожную, подкожную (SC, s.q., sub-Q, Нуро), внутримышечную (i.m.), внутривенную (IV), внутривенную (i.p.), внутриартериальную, интрамедулярную, внутрисердечную, интравитреальную (глаз), внутрисуставную (сустав), интрасиновиальную (область суставной жидкости), внутрочерепную, интраспинальную и интратекальную (спинномозговая жидкость) инъекцию или инфузию. SC-введение может включать SC-инфузию или струйное SC-введение. Для такого введения можно применять любое устройство, подходящее для парентеральной инъекции или инфузии лекарственных составов. Например, фармацевтическая композиция может содержаться в стерильном предварительно заполненном шприце.

В композицию также могут быть включены дополнительные активные соединения. В определенных вариантах осуществления слитый белок составляют совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами и/или вводят совместно с ними. Если композиции следует применять в комбинации со вторым активным средством композиции можно составлять совместно со вторым средством или композиции можно составлять отдельно от состава на основе второго средства. Например, соответствующие фармацевтические композиции можно смешивать, например, непосредственно перед введением, и вводить вместе или можно вводить по отдельности, например, в одно и то же время или в разные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления слитый белок можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или несколькими дополнительными антителами, которые связывают другие мишени (например, антителами, которые связывают регуляторы альтернативного пути системы комплемента). При таких видах комбинированной терапии можно использовать более низкие дозировки вводимых терапевтических средств, что позволяет избежать возможной токсичности или осложнений, ассоциированных с различными видами монотерапии. Кроме того, композиции, описанные в данном документе, можно составлять совместно или вводить совместно с другими терапевтическими средствами для смягчения побочных эффектов введения композиций, описанных в данном документе (например, терапевтическими средствами, которые сводят к минимуму риск инфекции в условиях иммунной недостаточности, например, антибактериальными средствами, противогрибковыми средствами и противовирусными средствами).

Препараты, составленные из композиций, содержащих слитые белки на основе фактора Н, могут быть предоставлены субъекту в комбинации с фармацевтически приемлемыми стерильными водными или неводными растворителями, суспензиями или эмульсиями. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, рыбий жир и инъекционные органические сложные эфиры. Водные носители включают воду, водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые растворы и забуференные медицинские парентеральные среды-носители, в том числе раствор хлорида натрия, раствор Рингера с

декстрозой, раствор хлорида натрия вместе с декстрозой, раствор Рингера, содержащий лактозу, или нелетучие масла.

Среды-носители для внутривенного введения могут включать средства для восполнения жидкости и питательных веществ, средства для восполнения электролитов, такие как средства на основе раствора Рингера с декстрозой, и т. п. В их состав входят фармацевтически приемлемые соли, например соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т. п.; а также соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т. п. Дополнительно в таких средах-носителях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные вещества для поддержания рН и т. п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Фармацевтические композиции могут включать “терапевтически эффективное количество” или “профилактически эффективное количество” слитого белка. “Терапевтически эффективное количество” относится к количеству, эффективному при дозировках и в течение периодов времени, достаточных для достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество слитого белка может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность слитого белка вызывать требуемый ответ у индивидуума. “Профилактически эффективное количество” относится к количеству, эффективному при дозировках и в течение периодов времени, достаточных для достижения требуемого профилактического результата. В некоторых вариантах осуществления профилактическая доза используется у субъектов на более ранней стадии заболевания или до нее, при этом профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Схемы введения доз можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, может вводиться единый болюс, могут вводиться несколько разделенных доз на протяжении определенного времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Для облегчения введения и единообразия дозировки полезно составлять парентеральные композиции в виде лекарственной формы с единичной дозировкой. Используемая в данном документе “лекарственная форма с единичной дозировкой” относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных дозировок для субъектов-млекопитающих, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Следует отметить, что значения дозировки могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, которое необходимо облегчить. Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные схемы введения следует корректировать с

течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением лечащего врача.

Эффективность лечения с помощью слитого белка, описанного в данном документе, можно оценить на основании улучшения одного или нескольких симптомов или показателей патологического состояния или нарушения, подлежащего лечению (например, улучшения одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, опосредованных альтернативным путем системы комплемента (САР), таких как заболевание или нарушение почек, опосредованные нарушением регуляции САР). Улучшение одного или нескольких клинических показателей на по меньшей мере 10% (увеличение или уменьшение, в зависимости от измеряемого показателя) считается “эффективным лечением”, хотя возможно и более значительное улучшение, такое как на 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% или даже 100%, или, в зависимости от измеряемого показателя, на более чем 100% (например, двукратное, трехкратное, десятикратное и т. д., вплоть до достижения состояния без признаков заболевания).

Способы лечения с применением слитых белков

Слитые белки на основе фактора Н системы комплемента, описанные в данном документе (см., например, таблицы 1-5), можно применять для лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, путем подавления активации альтернативного пути системы комплемента у млекопитающего (например, человека). Описанный(-ые) в данном документе слитый(-ые) белок(белки) можно применять для лечения различных заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента. Такие нарушения включают без ограничения нарушения работы почек, FSGS, IgA-нефропатию, MCD, диабетическую нефропатию, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозную нефропатию, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническую протеинурию, хроническую болезнь почек, C3G, болезнь плотных депозитов, гломерулонефрит, мембранопролиферативный гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническую нефропатию, нефросклероз, aHUS, повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка.

Терапевтически эффективное количество слитого белка на основе фактора Н системы комплемента, раскрытого в данном документе (например, слитого белка, имеющего последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15 или ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с ней), можно ввести субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека. Вводимое количество должно быть достаточным для подавления активации системы комплемента и/или восстановления нормальной регуляции альтернативного пути системы комплемента. Определение терапевтически эффективной

дозы находится в пределах возможностей практикующих специалистов в данной области техники; однако, в качестве примера, в вариантах осуществления описанного в данном документе способа с использованием системного введения слитого белка для лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, эффективная доза для человека будет находиться в диапазоне 0,01 мг/кг-150 мг/кг ((например, от 0,05 мг/кг до 500 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг, от 5 мг/кг до 500 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, от 10 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 25 мг/кг, от 1,0 мг/кг до 10 мг/кг, от 1,5 мг/кг до 5 мг/кг или от 2,0 мг/кг до 3,0 мг/кг) или от 1 мкг/кг до 1000 мкг/кг (например, от 5 мкг/кг до 1000 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 750 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 750 мкг/кг, от 10 мкг/кг до 750 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 500 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 500 мкг/кг, от 10 мкг/кг до 500 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 10 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 50 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 50 мкг/кг или от 10 мкг/кг до 50 мкг/кг). На рекомендуемую дозу может влиять путь введения. Подразумевается, что повторные системные дозы поддерживают эффективный уровень, например, для ослабления или подавления активации системы комплемента в организме пациента, в зависимости от принятого способа введения.

Описанные в данном документе композиции и способы могут быть применимы для лечения нарушения работы почек, опосредованного нарушением регуляции САР, такого как FSGS. FSGS характеризуется облитерацией пучков капилляров клубочков с повышенным отложением матрикса и рубцеванием (D'Agati et al., *Am J Kidney Dis.* 43(2):368-382, 2004). За последние десятилетия частота возникновения FSGS увеличилась, и он является одной из ведущих причин нефротического синдрома у взрослых (Korbet, *J Am Soc Nephrol.* 23(11):1769-1776, 2012). Спонтанная ремиссия встречается редко (<5%), а наличие персистирующего нефротического синдрома указывает на плохой прогноз, при этом у 50% пациентов происходит прогрессирование до терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD) через 6-8 лет после первоначальной постановки диагноза (Korbet, *Nephrol Dial Transplant.* 14 Suppl 3:68-73, 1999). На первичный FSGS приходится 3,3% всех случаев терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD), возникающей в результате первичного заболевания почек в США. Было показано, что система комплемента у пациентов с первичным FSGS активируется, а повышенные уровни Ва в плазме крови, свидетельствующие об активации альтернативного пути, коррелируют с тяжестью заболевания. Пациенты с низким уровнем С3 в сыворотке крови характеризовались более высокой процентной долей интерстициального повреждения. Кроме того, обнаружили, что почечная выживаемость выше у пациентов с нормальным уровнем С3 в сыворотке крови по сравнению с пациентами с низким уровнем С3 в сыворотке крови. Низкий уровень С3 в сыворотке крови указывает на активацию системы комплемента. Следовательно, активация системы комплемента может играть критически важную роль в патогенезе и исходе FSGS (Liu et al., *Scientific Reports*, 7: 4095, 2017). У человека тубулоинтерстициальное отложение мембраноатакующего комплекса системы комплемента (С5b-9) коррелирует с интерстициальным накоплением миофибробластов и

протеинурией. Экспериментальным путем обнаружили, что при фокально-сегментарном гломерулосклерозе интратубулярное образование C5b-9 способствует перитубулярному накоплению миофибробластов. Миофибробласты могут действовать как сигнальные воспалительные клетки и откладывать внеклеточный матрикс. Эти клетки могут также сжимать почечные канальцы, что приводит к образованию атубулярных клубочков. За счет этого механизма активация системы комплемента может вносить вклад в тубулоинтерстициальное повреждение и фиброз при FSGS (Rangan et al., *Kidney Int.* 66:1838-1848, 2004). Мыши с дефицитом фактора В и фактора D характеризуются более низкой протеинурией, чем контрольные мыши WT на модели FSGS, индуцированного адриамицином, что позволяет предположить, что активация САР играет роль в патогенезе (Lenderink et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293:F555-F564, 2007). Альтернативный путь системы комплемента активируется в клубочках и тубулоинтерстиции мышей с адриамициновой нефропатией (Turnberg et al., *J Immunol.* 177(6):4094-4102, 2006). Кроме того, у мышей с дефицитом фактора Н системы комплемента наблюдается более выраженное отложение C3b в клубочках и более тяжелое повреждение почек, чем у контрольных мышей дикого типа (Morigi et al., *Sci Rep.* 6:28445, 2016), что подтверждает ранее непризнанную роль C3a при протеинурической прогрессирующей нефропатии. Следовательно, ингибитор альтернативного пути активации системы комплемента можно применять для достижения клинической пользы при FSGS.

Способы, описанные в данном документе, могут быть применимы для лечения поражения почек, гистологически характеризующегося преимущественным накоплением C3 в клубочках в отсутствие значительного отложения иммуноглобулина (Nester and Smith, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 22:231-237, 2013) в результате aberrантной регуляции альтернативного пути системы комплемента, также известного как C3G.

Способы, описанные в данном документе, могут быть применимы для лечения болезни плотных депозитов; при этом болезнь плотных депозитов представляет собой редкое заболевание почек, приводящее к персистирующей протеинурии, гематурии и нефритическому синдрому. В нескольких случаях при болезни плотных депозитов сообщалось о дефиците фактора Н и сопутствующей дисфункции. Например, у пациентов с болезнью плотных депозитов были обнаружены мутации фактора Н. Симптомы болезни плотных депозитов включают, например, одно или оба из гематурии и протеинурии; острый нефритический синдром; развитие друз и/или нарушение зрения; приобретенную частичную липодистрофию и ее осложнения; а также наличие C3-нефритического фактора (C3NeF) в сыворотке крови, аутоантитело, направленное против C3bBb, C3-конвертазу альтернативного пути системы комплемента (Appel et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16:1392-1404, 2005). Нацеливание фактора Н на сайты активации системы комплемента оказывает терапевтические эффекты на индивидуума с болезнью плотных депозитов. В некоторых вариантах осуществления введение индивидууму композиции, включающей слитую молекулу, описанную в данном документе, является эффективным при лечении болезни плотных депозитов. На рекомендуемую дозу может влиять путь введения.

Подразумевается, что повторные системные дозы поддерживают эффективный уровень, например, для ослабления или подавления активации системы комплемента в организме пациента, в зависимости от принятого способа введения.

Описанные в данном документе композиции и способы могут быть применимы для лечения воспаления почек, вызванного системной красной волчанкой (SLE), такого как волчаночный нефрит. Волчаночный гломерулонефрит включает разнообразные и сложные морфологические поражения в зависимости от доли пораженных клубочков, активного или хронического поражения, степени интерстициального воспаления или фиброза, а также поражения сосудов (Weening *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:241-250, 2004). Волчаночный нефрит представляет собой серьезное осложнение, возникающее у части пациентов с SLE. SLE является классическим аутоиммунным заболеванием, приводящим к множественному поражению органов. Этот аутоиммунный ответ характеризуется появлением аутоантител, направленных против различных ядерных и цитоплазматических компонентов клетки. Эти аутоантитела связываются со своими соответствующими антигенами, образуя иммунные комплексы, которые циркулируют и в конечном итоге откладываются в тканях. Отложение иммунных комплексов вызывает хроническое воспаление и повреждение тканей. Пути системы комплемента (включая альтернативный путь системы комплемента) вовлечены в патологию SLE, и, таким образом, слитые белки, предусмотренные в данном документе, применимы для лечения волчаночного нефрита.

Композиции и способы, описанные в данном документе, могут быть применимы для лечения мембранозной нефропатии (MN), заболевания клубочков и наиболее распространенной причины идиопатического нефротического синдрома у белых взрослых, не страдающих диабетом. При отсутствии лечения у приблизительно одной трети пациентов с MN в течение 10 лет происходит прогрессирование до терминальной стадии почечной недостаточности. Число случаев ESRD, обусловленной MN, в США составляет приблизительно 1,9 на миллион в год. В большинстве случаев первичной MN (70%) имеются циркулирующие патогенные аутоантитела IgG4 к мембранному антигену подоцитов PLA2R. Также обычно присутствуют компоненты системы комплемента, включая C3, C4d и C5b-9, но не C1q, что указывает на участие лектина и, возможно, альтернативных путей активации системы комплемента. Со временем отложение IgG4 и C5b-9 приводит к повреждению подоцитов, экскреции белка с мочой и нефротическому синдрому (Couser, *Clin J Am Soc Nephrol* 12: 983-997, 2017). У мышей, лишенных фактора В, необходимого компонента альтернативного пути активации системы комплемента, не наблюдалось отложения C3 и C5b-9 и не развивалась альбуминурия на мышинной модели MN (Wentian *et al.*, *Front Immunol.* 9: 1433, 2018). Следовательно, ингибиторы комплемента, которые уменьшают количество C3- и C5-конвертаз, откладываемых в поражениях клубочков, такие как слитые белки, описанные в данном документе, можно применять для эффективного лечения этого заболевания.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта с

заболеванием или нарушением, опосредованным активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15 или ее вариант, характеризующийся по меньшей мере 85% (или большей) идентичностью последовательности с ней).

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего заболевание почек, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего мембранозную нефропатию, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего FSGS, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего гломерулонефрит, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего мембранопротролиферативный гломерулонефрит, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения E,

соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего гломерулопатию компонента 3 системы комплемента (C3G), путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего IgA-нефропатию, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего MCD, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего диабетическую нефропатию, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего синдром Альпорта, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего болезнь плотных депозитов, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего поликистоз почек, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего гипертоническую нефропатию, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего нефросклероз, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего aHUS, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего повреждение при ишемии-реперфузии, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы,

состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего отторжение трансплантированного органа, такого как почка, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка, выбранного из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитого белка, имеющего аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15) или его варианта.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитые белки, предусмотренные выше, для применения в лечении заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции САР. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из нарушений работы почек, FSGS, IgA-нефропатии, MCD, диабетической нефропатии, синдрома Альпорта, волчаночного нефрита, мембранозной нефропатии, острого повреждения почек, синдрома Гудпасчера, нефротического синдрома, хронической протеинурии, хронической болезни почек, С3G, болезни плотных депозитов, гломерулонефрита, мембранопролиферативного гломерулонефрита, поликистоза почек, гипертонической нефропатии, нефросклероза, aHUS, повреждения при ишемии-реперфузии или отторжения трансплантированного органа, такого как почка.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении заболеваний почек.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с

последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении FSGS.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении мембранозной нефропатии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении IgA-нефропатии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении MCD.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении диабетической нефропатии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и

соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении синдрома Альпорта.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении волчаночного нефрита.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении острого повреждения почек.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении синдрома Гудпасчера.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении

нефротического синдрома.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении хронической протеинурии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении хронической болезни почек.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении С3G.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении болезни плотных депозитов.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и

соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении гломерулонефрита.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении мембранопролиферативного гломерулонефрита.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении поликистоза почек.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении гипертонической нефропатии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении

нефросклероза.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении aHUS.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении повреждения при ишемии-реперфузии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) для применения в лечении отторжения трансплантированного органа, такого как почка.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции САР. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой нарушения работы почек, FSGS, IgA-нефропатию, MCD, диабетическую нефропатию, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозную нефропатию, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническую протеинурию, хроническую болезнь почек, C3G, болезнь плотных депозитов, гломерулонефрит, мембранопролиферативный гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническую нефропатию, нефросклероз, aHUS, повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения нарушений работы почек, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В,

соединения С, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения FSGS, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения IgA-нефропатии, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения диабетической нефропатии, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения острого повреждения почек, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения A, соединения B, соединения C, соединения D, соединения E, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок,

характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения хронической болезни почек, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения мембранозной нефропатии, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения отторжения трансплантированного органа, такого как почка, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения MCD, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

фармацевтической композиции для лечения синдрома Альпорта, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения нефротического синдрома, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения волчаночного нефрита, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения гломерулонефрита, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения мембранопролиферативного гломерулонефрита, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L,

соединения М, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения синдрома Гудпасчера, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения хронической протеинурии, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения СЗГ, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения болезни плотных депозитов, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с

последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения поликистоза почки, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения гипертонической нефропатии, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения нефросклероза, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения aHUS, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения повреждения при ишемии-реперфузии, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А,

соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15) в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, предусмотренный выше, для изготовления лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции САР. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из нарушений работы почек, FSGS, IgA-нефропатии, MCD, диабетической нефропатии, синдрома Альпорта, волчаночного нефрита, мембранозной нефропатии, острого повреждения почек, синдрома Гудпасчера, нефротического синдрома, хронической протеинурии, хронической болезни почек, СЗГ, болезни плотных депозитов, гломерулонефрита, мембранопролиферативного гломерулонефрита, поликистоза почек, гипертонической нефропатии, нефросклероза, aHUS, повреждения при ишемии-реперфузии или отторжения трансплантированного органа, такого как почка.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения нарушений работы почек.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения FSGS.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L,

соединения М, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения IgA-нефропатии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения М, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения диабетической нефропатии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения М, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения острого повреждения почек.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения М, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения хронической болезни почек.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения М, соединения N и соединения О (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при

изготовлении лекарственного препарата для лечения мембранозной нефропатии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения отторжения трансплантированного органа, такого как почка.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения MCD.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения синдрома Альпорта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения нефротического синдрома.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из

соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения хронической протеинурии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения волчаночного нефрита.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения мембранопротролиферативного гломерулонефрита.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения гломерулонефрита.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий

аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения синдрома Гудпасчера.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения С3-гломерулопатии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения болезни плотных депозитов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения поликистоза почек.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения гипертонической нефропатии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения нефросклероза.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения aHUS.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей слитый белок, выбранный из группы, состоящей из соединения А, соединения В, соединения С, соединения D, соединения Е, соединения F, соединения G, соединения H, соединения I, соединения J, соединения K, соединения L, соединения M, соединения N и соединения O (например, слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1-15), или его вариант (например, слитый белок, характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID NO:1-15), при изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения при ишемии-реперфузии.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для того, чтобы обеспечить специалистам средней квалификации в данной области техники раскрытие и описание того, как выполнять способы и получать соединения, заявленные в данном изобретении. Они предназначены исключительно для примера и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Разработка и конструирование *in silico* локализующихся в почках слитых белков на основе фактора H

Конструкции, включающие различные комбинации N-концевого функционального домена фактора H, домена VHH и домена полиаргинилглициласпарагиновой кислоты (RGD), разрабатывали *in silico*. Иллюстративные конструкции показаны на фиг. 1A и 1B.

Аминокислотные последовательности конструкций, показанных на фиг. 1A и 1B,

предоставили компании GeneArt (ThermoFisher) для оптимизации кодонов и синтеза генов. Нуклеотидные последовательности клонировали в вектор собственной разработки для экспрессии в клетках млекопитающих. Затем осуществляли временную трансфекцию плазмидной ДНК в клетки HEK293 и CHO. Через 4-5 дней собирали надосадочную жидкость. Концентрации слитых белков определяли с помощью SDS-PAGE и денситометрии.

Пример 2. Подавление активации альтернативного пути с применением слитых белков

Соединения согласно настоящему изобретению тестировали в отношении их способности подавлять активацию альтернативного пути с применением CAP-специфического анализа на гемолитическую активность. Результаты показаны на фиг. 2A, 2B, 2C и 2D. Вкратце, кроличьи эритроциты промывали и добавляли к 10% человеческой сыворотке крови, содержащей Mg^{2+} и EGTA. Добавляли серийные разведения ингибиторов и инкубировали клетки в течение 30 мин при 37°C. Клетки удаляли центрифугированием и степень лизиса клеток определяли путем измерения поглощения в надосадочной жидкости при 415 нм. Подавление лизиса, обусловленного альтернативным путем, показано для всех протестированных молекул, что подтверждает, что молекулы были функциональными, как и ожидалось.

Пример 3. Визуализация слитых белков в почке

Визуализацию *in vivo* для конструкций с флуоресцентными метками проводили на самках аутбредных бестимусных мышей J:NU (Jackson Laboratories, Бар-Харбор, Мэн, США). На фиг. 3 показана репрезентативная пролонгированная визуализация *in vivo* у одного и того же субъекта, полученная на протяжении периода 4 дней. Для получения изображения субъектов поддерживали под анестезией с помощью 2-3% изофлурана на подогреваемой платформе для визуализации в системе для визуализации IVIS Spectrum (PerkinElmer Inc., Уолтем, Массачусетс, США). Анализ флуоресцентных изображений выполняли с применением программного обеспечения Living Image 4.5.1 (PerkinElmer Inc., Уолтем, Массачусетс, США) с автоматическими настройками экспозиции 2D верхнего освещения, полем зрения (FOV) C, F/Stop 2, средним сортировкой и фильтрами для излучения 800 нм/возбуждения 750 нм. Субъекты получали 1 мг/кг тестируемого препарата, меченного AlexaFluor 750, посредством нормализованной по объему 100 мкл внутривенной инъекции в хвостовую вену. Все исследования на животных проводили в соответствии с положениями Закона о защите животных и принципами Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных. Все процедуры были одобрены IACUC компании Alexion Pharmaceuticals, Inc., Нью-Хейвен, Коннектикут, США, протокол № 917103.

На фиг. 3 также показана почка той же мыши, визуализированная с помощью флуоресцентной микроскопии. Сигнал показывает биораспределение тестируемого соединения с селективностью в отношении апикальной стороны эпителиальных клеток париетальных и проксимальных канальцев. Время внутривенного удержания

увеличивалось за счет присутствия VHH и RGD-содержащих мотивов.

Пример 4. Определение фармакокинетики выбранных слитых белков

Значения фармакокинетической экспозиции для однократной дозы выбранных соединений определяли у самок аутбредных бестимусных мышей J:NU (Jackson Laboratories, Бар-Харбор, Мэн, США). Значения экспозиции в сыворотке крови измеряли с помощью анализа с электрохемилюминесцентным обнаружением, разработанного на платформе MSD (Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд, США). На фиг. 4 показана PK соединений через 1 и 24 часа после IV болюсного введения. В отличие от кинетики внутривитричного удержания, показанной на фиг. 3, в сыворотке крови соединения находились ниже нижнего предела обнаружения через 24 часа после введения, что подтверждает специфичность нацеливания соединений.

Пример 5. Определение терапевтической эффективности на модели FSGS

Соединение D, соединение E и соединение G оценивали в отношении терапевтической эффективности на мышинной модели фокального сегментарного гломерулосклероза (FSGS) на основе нефропатии, индуцированной адриамицином. На фиг. 5 показаны терапевтические эффекты по показателю содержание белка в моче. Фактора H₁₋₅ отдельно было недостаточно для обеспечения значительного положительного эффекта. Эффективность повышалась за счет присутствия VHH и RGD-содержащих мотивов.

Пример 6. Определение терапевтической эффективности на модели FSGS

Соединение D, соединение E и соединение G оценивали в отношении терапевтической эффективности на мышинной модели FSGS на основе нефропатии, индуцированной адриамицином. На фиг. 6 показаны терапевтические эффекты по показателю содержание альбумина в моче. Фактора H₁₋₅ отдельно было недостаточно для обеспечения значительного положительного эффекта. Эффективность повышалась за счет присутствия VHH и RGD-содержащих мотивов.

Пример 7. Определение терапевтической эффективности на модели FSGS

Соединение D, соединение E и соединение G оценивали в отношении терапевтической эффективности на мышинной модели FSGS на основе нефропатии, индуцированной адриамицином. На фиг. 7 показаны терапевтические эффекты по показателю содержание тубулярного белка. Фактора H₁₋₅ отдельно было недостаточно для обеспечения значительного положительного эффекта.

Пример 8. Визуализация почек у модели FSGS после введения слитого белка

Иммунофлуоресцентное окрашивание продукта активации C3 проводили на срезах почек мышей на мышинной модели FSGS на основе нефропатии, индуцированной адриамицином, через 7 дней после терапевтического введения соединения E (день исследования 14). На фиг. 8A показаны для примера представляющие интерес области (ROI), нанесенные вручную, чтобы приблизительно соответствовать мозговому слою почки, для выполнения анализа нормализованной по площади средней интенсивности пикселей фрагмента C3 и оценки локальной активации альтернативного пути системы

комплемента (САР). На фиг. 8В проиллюстрирована качественная оценка регуляции САР в зоне мозгового вещества, которая происходит после обработки соединением Е.

Пример 9. Определение терапевтической эффективности на модели FSGS

Соединение D, соединение E и соединение G оценивали в отношении терапевтической эффективности на мышинной модели FSGS на основе нефропатии, индуцированной адриамицином. В день 13 исследования животных помещали по отдельности в клетки для оценки метаболизма на 16 часов. Собранную мочу анализировали на содержание альбумина, белка и креатинина с помощью анализатора Cobas. Рассчитанные соотношения белок/креатинин (фиг. 9А) и альбумин/креатинин (фиг. 9В) в моче демонстрируют положительные, но статистически незначимые тенденции положительного эффекта после обработки соединением E.

Пример 10. Определение чистоты слитых белков

Белки оценивали с помощью SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях для подтверждения чистоты и молекулярной массы.

Большинство слитых белков легко очищали с помощью анионообменной хроматографии с последующей хроматографией гидрофобных взаимодействий (НІС) до высокой степени чистоты. Анионный обмен осуществляли на колонке объемом 34 мл Capto Q Impres. НІС (HiTrap фенил-FF (HS)) уравнивали в буфере А (20 мМ Трис-НСІ, 3 М NaCl, рН 8,2) и элюировали буфером В (20 мМ Трис-НСІ, рН 8,2). Чистота соединения E превышала 95%. SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях показал одну полосу при загрузке 2 мкг на лунку после двухстадийной очистки. Выбранные белки легко очищали с помощью хроматографии с белком А до высокой степени чистоты. Концентрации очищенных слитых белков определяли с помощью УФ-спектроскопии по поглощению при 280 нм с поправкой на молярный коэффициент экстинкции. Чистоту оценивали с помощью SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографии (SEC)-HPLC. Иллюстративные собранные надосадочные жидкости клеточных культур, оцененные с помощью SDS-PAGE, и белок, очищенный с помощью SEC-HPLC, показаны на фиг. 10А и 10В соответственно.

Пример 11. Определение характеристик слитых белков с помощью масс-спектрометрии

Выбранные соединения оценивали для определения интактной молекулярной массы с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI-TOF). На фиг. 11 показано подтверждение ожидаемой теоретической молекулярной массы для типичного соединения E.

Пример 12. Определение характеристик слитых белков с применением динамического светорассеяния

Температуру плавления определяли методом динамического светорассеяния (DLS). Представляющие интерес соединения сначала разбавляли до концентрации 1 мг/мл в PBS, рН 7,4, и оценивали при скорости сканирования 60°С-час. На фиг. 12 представлена иллюстративная сканограмма и показана удовлетворительная температура плавления

соединения E, измеренная с помощью DLS. Для других соединений получили аналогичные результаты.

Пример 13. Определение характеристик слитых белков с применением эксклюзионной хроматографии

Хроматограмму по методу эксклюзионной хроматографии для соединения E получали после 0 и 14 дней инкубации при 37°C. Относительный процент агрегированного белка и относительный процент интактного слитого белка рассчитывали по хроматограммам, измеренным через 0 дней (фиг. 13A), с 1,1% агрегатов и 98,4% слитого белка, и через 14 дней (фиг. 13B), с 2,4% агрегатов и 97,4% слитого белка. Незначительное повышение уровня агрегированного белка на 1,3% на протяжении 14-дневного периода указывает на то, что слитый белок является стабильным на протяжении в этого периода времени.

Пример 14. Определение характеристик слитого белка с помощью гидрофобных взаимодействий

Хроматограмму по методу хроматографии гидрофобных взаимодействий для соединения E получали после 0 и 14 дней инкубации при температуре 37°C. Полученные хроматограммы показывают, что время удерживания и площадь под пиком остаются неизменными от 0 дней до 14 дней, как показано на фиг. 14A и 14B, что указывает на то, что слитый белок является стабильным на протяжении этого периода времени.

Пример 15. Определение стабильности слитого белка с применением капиллярного электрофореза

Стабильность соединений с течением времени (14 дней при 37°C) оценивали с помощью CE-SDS. На фиг. 15A показана хроматограмма CE-SDS в невозстанавливающих условиях для соединения E в нулевой момент времени и через 14 дней. На фиг. 15B показана хроматограмма CE-SDS в восстанавливающих условиях через нуль дней и через 14 дней. Профили в нулевой день и день 14 были схожими, что подтверждает стабильность соединения. Никакой заметной разницы не показано при сравнении восстанавливающих и невозстанавливающих условий, что дополнительно подтверждает стабильность белка.

Пример 16. Определение стабильности слитого белка с применением изоэлектрического капиллярного электрофореза

Для определения стабильности и отсутствия гетерогенности заряда проводили изоэлектрический капиллярный электрофорез (ICE) в соответствии со стандартными методиками. На фиг. 16 показаны репрезентативный результат ICE для соединения E. Шесть полных повторов подтвердили последовательные профили стабильности и технологичности соединения E.

Пример 17. Определение стабильности слитого белка с применением масс-спектрометрии

Стабильность интактной молекулярной массы соединений измеряли в различные моменты времени на протяжении 14 дней при 37°C и оценивали с помощью MS с

использованием стандартных методик. На фиг. 17 показано соединение E в нулевой момент времени, день 3, день 7 и день 14. Все профили были схожими, что подтверждает стабильность соединения E. Аналогичные результаты получали для таких соединений, как соединение D и соединение G.

Пример 18. Определение характеристик связывания слитых белков с C3b

Связывание соединений с C3b оценивали с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Биотинилированный C3b иммобилизовали на наконечниках биосенсора со стрептавидином и подвергали воздействию молярно-эквивалентных концентраций аналитов, разбавленных буфером для кинетического анализа. На фиг. 18A показаны ожидаемые профили связывания соединения E и соединения K по сравнению с несвязывающими контролями (эталонный белок 11, который представляет собой эталонный белок VNH к C5, используемый в качестве отрицательного контроля, и эталонный белок 6, который представляет собой слитый белок фактор H-VNH к HSA, используемый в качестве положительного контроля), представленные по сдвигам оптической толщины на наконечниках сенсоров. На фиг. 18B показан увеличенный вид кривой связывания с фиг. 18A, охватывающий 40 секунд, где момент времени $t=0$ секунд на фиг. 18B соответствует моменту времени $t=720$ секунд на фиг. 18A. Эти результаты подтверждают связывание соединений с C3b.

Пример 19. Измерение эффекта слитого белка на регуляцию альтернативного пути системы комплемента

Регуляцию альтернативного пути системы комплемента (CAP) в нормальной сыворотке крови человека (NHS) с помощью соединения E оценивали в соответствии с инструкциями производителя в анализе с набором для определения альтернативного пути системы комплемента WIESLAB[®]. Сопоставимое дозозависимое подавление неоантигена C5b-9, экспрессируемого во время образования MAC, наблюдали в двух протестированных партиях NHS в остальном при идентичных условиях, как показано на фиг. 19.

Пример 20. Оценка фармакокинетики соединения E у мышей дикого типа

Значения фармакокинетической экспозиции для однократной дозы определяли для соединения E в диапазоне подкожных (SC) доз у самцов мышей C57Bl/6J дикого типа (Jackson Laboratories, Бар-Харбор, Мэн, США). На фиг. 20 показаны совокупные данные двух отдельных исследований, иллюстрирующие дозозависимую фармакокинетику соединения E, введенного в дозах 10, 30 и 100 мг/кг. Концентрации в сыворотке крови измеряли с помощью LC-MS/MS.

Пример 21. Оценка фармакокинетики соединения E у яванских макаков

Значения фармакокинетической экспозиции для однократной дозы определяли для соединения E в диапазоне внутривенных (IV) и подкожных (SC) доз у самок яванских макаков (*Macaca fascicularis*) (Charles River Laboratories, Inc., Маттаван, Мичиган, США). На фиг. 21A показана фармакокинетика соединения E в сыворотке крови после введения начальной дозы в день 0 исследования и четвертой дозы, введенной в день 12

исследования. На фиг. 21В включены данные с фиг. 21А, перенесенные на график для сравнения эквивалентных уровней доз, вводимых при внутривенном (IV) или подкожном (SC) пути введения. Концентрации в сыворотке крови измеряли с помощью LC-MS/MS.

Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или заявка на патент были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки. Несмотря на то, что в данном документе описаны конкретные варианты осуществления, специалисту в данной области техники будет понятно, что охватываются дополнительные модификации и варианты осуществления, включая вариации, варианты применения или адаптации, в целом следующие описанным в данном документе принципам и включающие такие отклонения от настоящего изобретения, которые относятся к известной или общепринятой практике в данной области техники и могут быть применены к существенным признакам, указанным выше и изложенным в объеме формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, характеризующийся следующей структурой в направлении от N-конца к С-концу:

D1-L1-D2-L2-D3,

где

D1 предусматривает фрагмент фактора H (FH) системы комплемента;

L1 отсутствует, представляет собой ковалентную связь или представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из по меньшей мере одной аминокислоты;

D2 предусматривает VHH или отсутствует;

L2 отсутствует, представляет собой ковалентную связь или представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из по меньшей мере одной аминокислоты; и

D3 представляет собой домен распознавания интегрина.

2. Слитый белок по п. 1, где D1 содержит один или несколько доменов короткого консенсусного повтора (SCR) FH, где необязательно один или несколько доменов SCR выбраны из группы, состоящей из SCR 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

3. Слитый белок по п. 2, где домены SCR FH выбраны из группы, состоящей из SCR 1-4; 1-5 и 1-6.

4. Слитый белок по любому из пп. 1-3, где VHH из D2 предусматривает однодоменное антитело.

5. Слитый белок по любому из пп. 1-4, где VHH из D2 предусматривает однодоменное антитело верблюдовых.

6. Слитый белок по любому из пп. 1-5, где домен распознавания интегрина из D3 предусматривает домен распознавания интегрина, содержащий пептидный мотив, представляющий собой аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD).

7. Слитый белок по любому из пп. 1-6, где домен распознавания интегрина из D3 содержит пептидный мотив, представляющий собой цикло(RGD)₄.

8. Слитый белок по любому из пп. 1-7, где L1 и L2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

9. Слитый белок по любому из пп. 1-7, где L1 и L2 содержат разные аминокислотные последовательности.

10. Слитый белок по п. 8 или п. 9, где L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: (G₄A)₂G₃AG₄S, G₄SDAA, (G₄A)₂G₄S, G₄AG₃AG₄S, GGGGAGGGGAGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, (EAAAK)₃, PAPAP, G₄SPAPAP, PAPAPG₄S, GSTSGKSSEGKG, (GGGDS)₂, (GGGES)₂, GGGDSGGGGGS, GGGASGGGGGS, GGGESGGGGGS, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, G₃P, G₇P, PAPNLLGGP, G₆, G₁₂, APELPGGP, SEPQPQPG, (G₃S₂)₃, GGGGGGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGGGGGGGS, (GGSSS)₃, (GS₄)₃, G₄A(G₄S)₂, G₄SG₄AG₄S, G₃AS(G₄S)₂, G₄SG₃ASG₄S, G₄SAG₃SG₄S, (G₄S)₂AG₃S, G₄SAG₃SAG₃S, G₄D(G₄S)₂, G₄SG₄DG₄S,

$(G_4D)_2G_4S$, $G_4E(G_4S)_2$, $G_4SG_4EG_4S$, $(G_4E)_2G_4S$, G_4SDA , G_4A и $(G_4A)_3$.

11. Слитый белок по п. 10, где L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: $(G_4A)_2G_3AG_4S$, G_4SDAA , $(G_4A)_2G_4S$, G_4SDAA , $(G_4S)_4$, $G_4AG_3AG_4S$, G_4A и $(G_4A)_3$.

12. Слитый белок по п. 1, где

(a) D1 предусматривает домены SCR 1-5 FH; L1 предусматривает G_4A ; D2 отсутствует; L2 отсутствует, и D3 предусматривает цикло(RGD)₄;

(b) D1 предусматривает домены SCR 1-5 FH; L1 отсутствует; D2 предусматривает VHH; L2 предусматривает G_4A , и D3 предусматривает цикло(RGD)₄;

(c) D1 предусматривает домены SCR 1-5 FH; L1 предусматривает G_4A ; D2 отсутствует; L2 предусматривает G_4A , и D3 предусматривает цикло(RGD)₄;

(d) D1 предусматривает домены SCR 1-5 FH; L1 отсутствует; D2 предусматривает VHH; L2 предусматривает G_4A , и D3 предусматривает цикло(RGD)₄;

(f) D1 предусматривает домены SCR 1-5 FH; L1 отсутствует; D2 предусматривает VHH; L2 предусматривает G_4A , и D3 предусматривает цикло(RGD)₄;

(g) D1 предусматривает домены SCR 1-6 FH; L1 отсутствует; D2 предусматривает VHH; L2 предусматривает G_4A , и D3 предусматривает цикло(RGD)₄; или

(h) D1 предусматривает домены SCR 1-5 FH; L1 предусматривает G_4A ; D2 предусматривает VHH; L2 предусматривает G_4A , и D3 предусматривает цикло(RGD)₄.

13. Слитый белок по п. 1, где слитый белок

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций;

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций;

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций;

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций;

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций; или

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций;

имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или ее вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

14. Слитый белок по п. 1, где слитый белок

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 4;

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 5;

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 8;

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 9;

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 13;

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 14;

имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 15.

15. Слитый белок, содержащий следующую структуру в направлении от N-конца к C-концу:

D1-L1-D2, где:

D1 предусматривает фрагмент FH, такой как FH1-5;

L1 предусматривает линкер или отсутствует, и

D2 предусматривает домен белка 5, родственного фактору H (FHRP5), такой как домены 7 и 8 FHRP.

16. Слитый белок по п. 15, где L1 выбран из группы, состоящей из: G_4A , $(G_4A)_3$, $(G_4A)_2G_3AG_4S$, G_4SDAA , $(G_4A)_2G_4S$, $G_4AG_3AG_4S$, $GGGGAGGGGAGGGGS$, $GGGGSGGGGSGGGGS$, G_4S , $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$, $(G_4S)_4$, $(G_4S)_5$, $(G_4S)_6$, $(EAAAK)_3$, $PAPAP$, $G_4SPAPAP$, $PAPAPG_4S$, $GSTSGKSSEGKG$, $(GGGDS)_2$, $(GGGES)_2$, $GGGDSGGGGGS$, $GGGASGGGGGS$, $GGGESGGGGGS$, $ASTKGP$, $ASTKGPSVFPLAP$, G_3P , G_7P , $PAPNLLGGP$, G_6 , G_{12} , $APELPGGP$, $SEPQPQPG$, $(G_3S_2)_3$, $GGGGGGGGGGSGGGGS$, $GGGGSGGGGGGGGGGS$, $(GGSSS)_3$, $(GS_4)_3$, $G_4A(G_4S)_2$, $G_4SG_4AG_4S$, $G_3AS(G_4S)_2$, $G_4SG_3ASG_4S$, $G_4SAG_3SG_4S$, $(G_4S)_2AG_3S$, $G_4SAG_3SAG_3S$, $G_4D(G_4S)_2$, $G_4SG_4DG_4S$, $(G_4D)_2G_4S$, $G_4E(G_4S)_2$, $G_4SG_4EG_4S$, $(G_4E)_2G_4S$ и G_4SDA .

17. Слитый белок по п. 16, где L1 выбран из группы, состоящей из: G_4A и $(G_4A)_3$, $(G_4A)_2G_3AG_4S$, G_4SDAA , $(G_4A)_2G_4S$, G_4SDAA , $(G_4S)_4$ и $G_4AG_3AG_4S$.

18. Слитый белок по любому из пп. 15-17, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций; или

(b) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

19. Слитый белок по любому из пп. 15-17, где слитый белок:

(a) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 6, или

(b) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 10.

20. Слитый белок, содержащий следующую структуру в направлении от N-конца к C-концу:

D1-L1-D2-L2-D3, где:

D1 предусматривает домен распознавания интегрин, такой как цикло(RGD)₄;

L1 предусматривает линкер или отсутствует;

D2 представляет собой VHH, такой как однодоменное антитело,

L2 представляет собой линкер или отсутствует, и

D3 представляет собой фрагмент FH, такой как FH1-5.

21. Слитый белок по п. 20, где слитый белок содержит C-концевую His-метку.

22. Слитый белок по п. 20 или п. 21, где L1 и L2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

23. Слитый белок по любому из пп. 20-22, где L1 и L2 содержат разные аминокислотные последовательности.

24. Слитый белок по п. 22 или п. 23, где L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: G_4A , $(G_4A)_3$, $(G_4A)_2G_3AG_4S$, G_4SDAA , $(G_4A)_2G_4S$, $G_4AG_3AG_4S$, $GGGGAGGGGAGGGGS$, $GGGSGGGGSGGGGS$, G_4S , $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$, $(G_4S)_4$, $(G_4S)_5$, $(G_4S)_6$, $(EAAAK)_3$, $PAPAP$, $G_4SPAPAP$, $PAPAPG_4S$, $GSTSGKSSEKKG$, $(GGGDS)_2$, $(GGGES)_2$, $GGGDSGGGGGS$, $GGGASGGGGGS$, $GGGESGGGGGS$, $ASTKGP$, $ASTKGPSVFPLAP$, G_3P , G_7P , $PAPNLLGPP$, G_6 , G_{12} , $APELPGGP$, $SEPQPQPG$, $(G_3S_2)_3$, $GGGGGGGGGSGGGGS$, $GGGSGGGGGGGGGGS$, $(GGSSS)_3$, $(GS_4)_3$, $G_4A(G_4S)_2$, $G_4SG_4AG_4S$, $G_3AS(G_4S)_2$, $G_4SG_3ASG_4S$, $G_4SAG_3SG_4S$, $(G_4S)_2AG_3S$, $G_4SAG_3SAG_3S$, $G_4D(G_4S)_2$, $G_4SG_4DG_4S$, $(G_4D)_2G_4S$, $G_4E(G_4S)_2$, $G_4SG_4EG_4S$, $(G_4E)_2G_4S$ и G_4SDA .

25. Слитый белок по п. 24, где L1 и/или L2 выбраны из группы, состоящей из: G_4A , $(G_4A)_3$, $(G_4A)_2G_3AG_4S$, G_4SDAA , $(G_4A)_2G_4S$, G_4SDAA , $(G_4S)_4$ и $G_4AG_3AG_4S$.

26. Слитый белок по п. 18 или п. 19, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций; или

(b) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

27. Слитый белок по любому из пп. 20-26, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 2, или

(b) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 3.

28. Слитый белок, содержащий следующую структуру в направлении от N-конца к C-концу:

D1-D2 или D2-D1, где:

D1 представляет собой VHH, такой как однодоменное антитело, и

D2 представляет собой фрагмент FH, такой как FH1-5.

29. Слитый белок по п. 28, где слитый белок содержит C-концевую His-метку.

30. Слитый белок по п. 28 или п. 29, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций; или

(b) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или вариант,

содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

31. Слитый белок по п. 28 или п. 29, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 1, или

(b) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 7.

32. Слитый белок по п. 28 или п. 29, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций; или

(b) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или вариант, содержащий не более 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

33. Слитый белок по п. 28 или п. 29, где слитый белок

(a) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 11, или

(b) имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 12.

34. Слитый белок по любому из пп. 1-33, где слитый белок характеризуется увеличенным временем внутривитального удержания по сравнению со слитым белком, не содержащим домен VHH.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп. 1-34 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 1-35.

37. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 36.

38. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 36 или вектор по п. 37.

39. Способ получения слитого белка по любому из пп. 1-34, включающий стадии культивирования одной или нескольких клеток-хозяев, содержащих одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, способных экспрессировать слитый белок в условиях, подходящих для экспрессии слитого белка.

40. Способ по п. 39, где способ дополнительно включает стадию получения слитого белка из культуры клеток или культуральной среды.

41. Способ лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей слитый белок по любому из пп. 1-34, фармацевтическую композицию по п. 35, полинуклеотид по п. 36, вектор по п. 37 или клетку-хозяина по п. 38, субъекту, нуждающемуся в этом.

42. Способ по п. 41, где слитый белок составлен в виде фармацевтической композиции с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем.

43. Способ по п. 42, где композиция является лиофилизированной.

44. Способ по п. 43, где композицию восстанавливают перед введением.

45. Способ по п. 42, где по меньшей мере один фармацевтически приемлемый

носитель представляет собой солевой раствор.

46. Способ по любому из пп. 41-45, где композиция составлена для ежедневного, еженедельного или ежемесячного введения.

47. Способ по любому из пп. 41-46, где композиция составлена для внутривенного, подкожного, внутримышечного, перорального, назального, подъязычного, интратекального и внутрикожного введения.

48. Способ по любому из пп. 41-47, где композиция составлена для введения при дозировке, составляющей от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг.

49. Способ по любому из пп. 41-48, где композиция составлена для введения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством.

50. Способ по любому из пп. 41-49, где заболевание представляет собой нарушение работы почек, такое как фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS), IgA-нефропатия, болезнь минимальных изменений (MCD), диабетическая нефропатия, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозная нефропатия, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническая протеинурия, хроническая болезнь почек, С3-гломерулопатия (С3G), болезнь плотных депозитов, гломерулонефрит, мембранопролиферативный гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническая нефропатия, нефросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка.

51. Способ по любому из пп. 41-50, где заболевание представляет собой FSGS.

52. Способ по любому из пп. 41-51, где субъект является млекопитающим.

53. Способ по п. 52, где млекопитающее является человеком.

54. Набор, содержащий композицию, выбранную из слитого белка по любому из пп. 1-34, фармацевтической композиции по п. 35, полинуклеотида по п. 36, вектора по п. 37 или клетки-хозяина по п. 38.

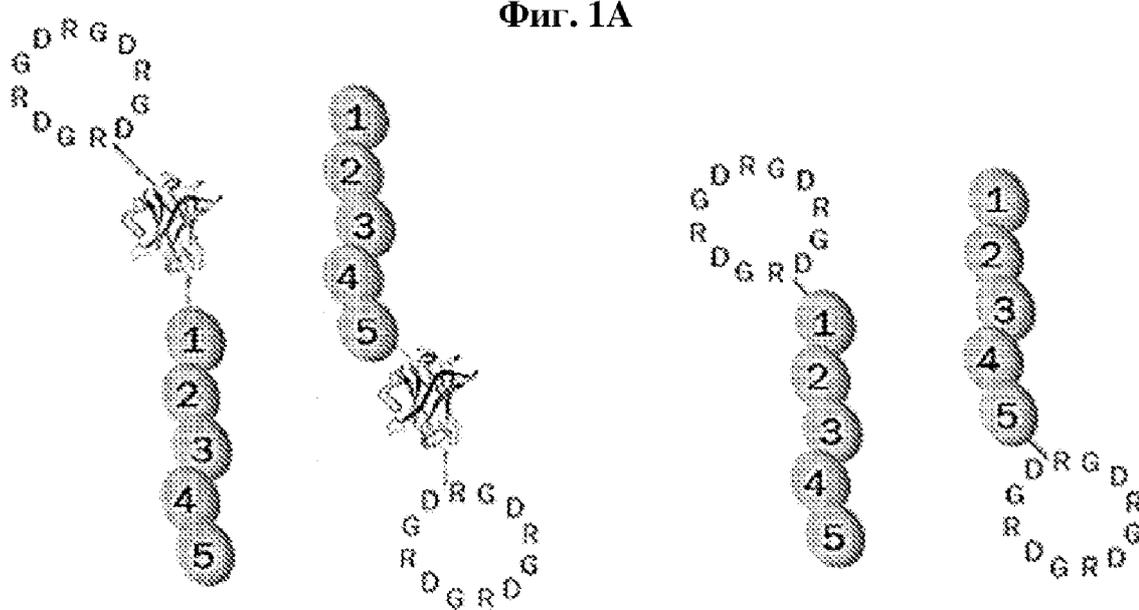
55. Набор по п. 54, дополнительно содержащий инструкции по введению эффективного количества композиции субъекту, нуждающемуся в этом.

56. Применение композиции, содержащей слитый белок по любому из пп. 1-34, для изготовления лекарственного препарата для лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции альтернативного пути системы комплемента.

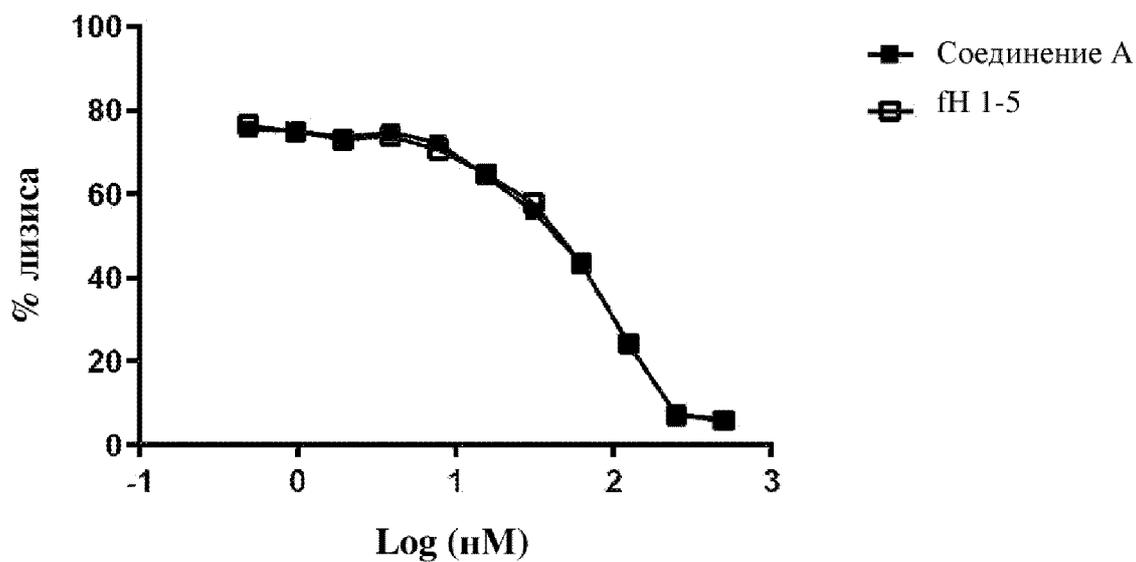
57. Применение по п. 56, где заболевание представляет собой нарушение работы почек, такое как FSGS, IgA-нефропатия, MCD, диабетическая нефропатия, синдром Альпорта, волчаночный нефрит, мембранозная нефропатия, острое повреждение почек, синдром Гудпасчера, нефротический синдром, хроническая протеинурия, хроническая болезнь почек, С3G, болезнь плотных депозитов, гломерулонефрит, мембранопролиферативный гломерулонефрит, поликистоз почек, гипертоническая нефропатия, нефросклероз, aHUS, повреждение при ишемии-реперфузии или отторжение трансплантированного органа, такого как почка.

По доверенности

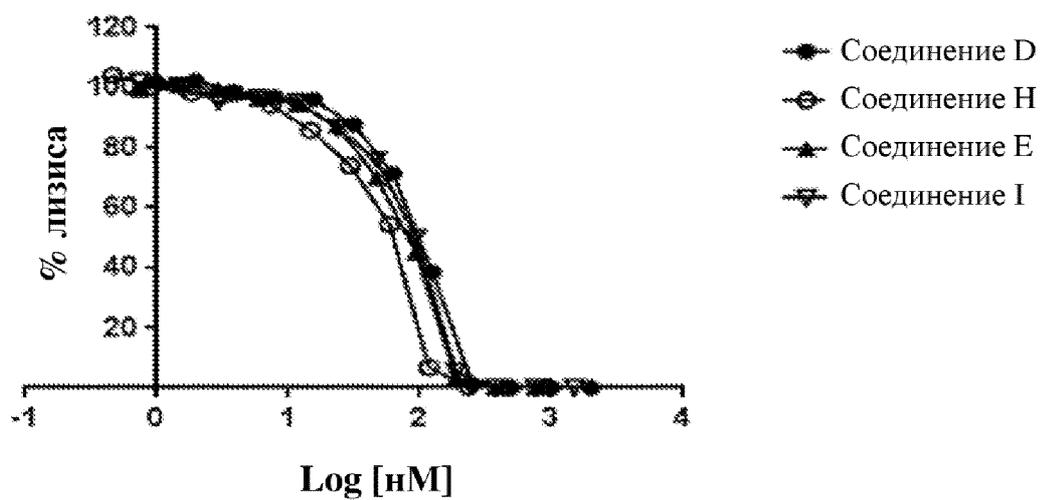
1/23

**Фиг. 1В**

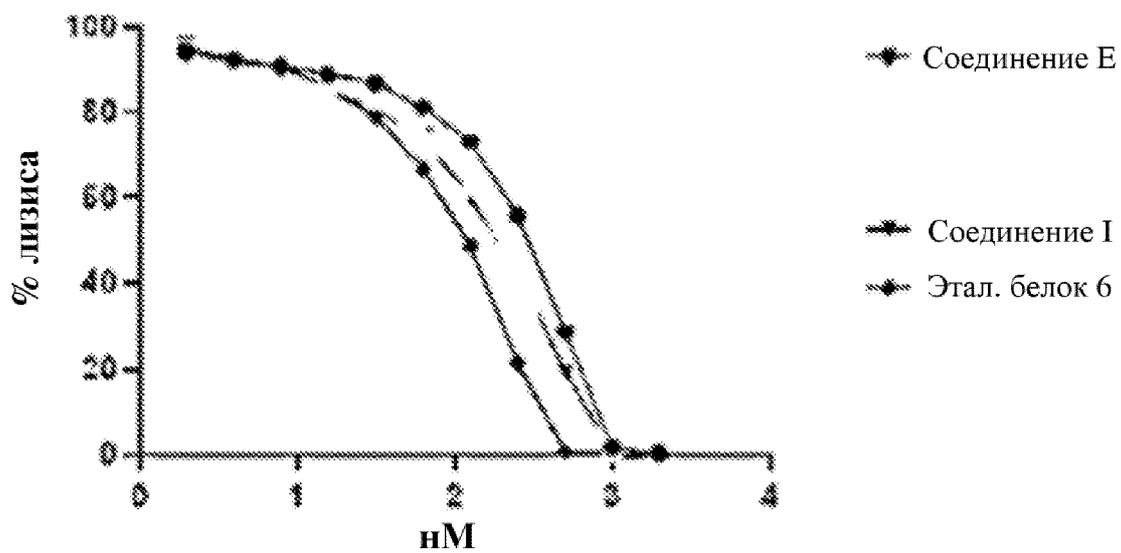
Фиг. 2А



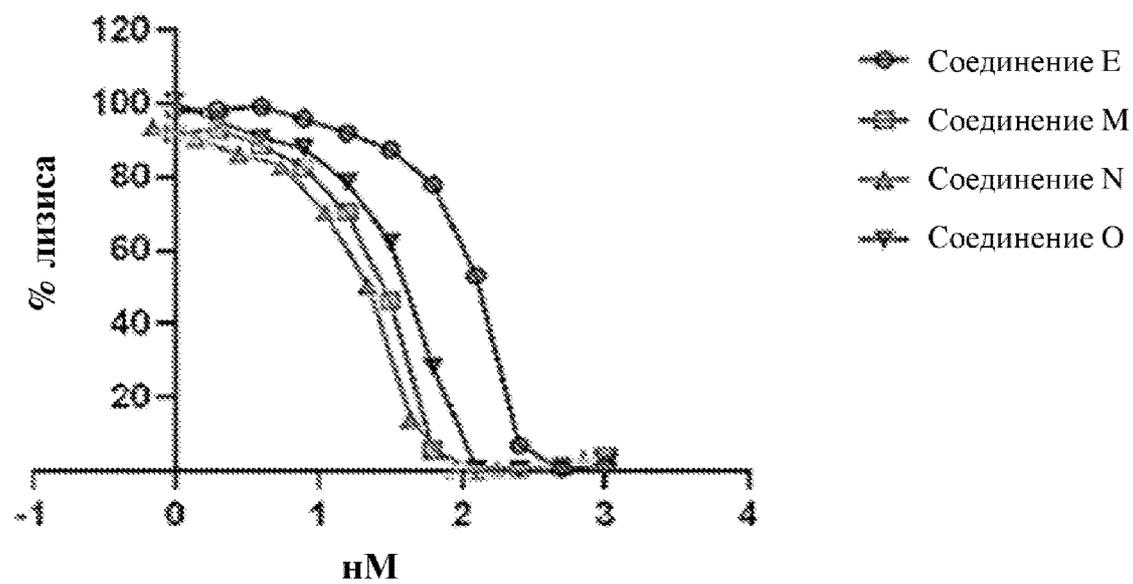
Фиг. 2В



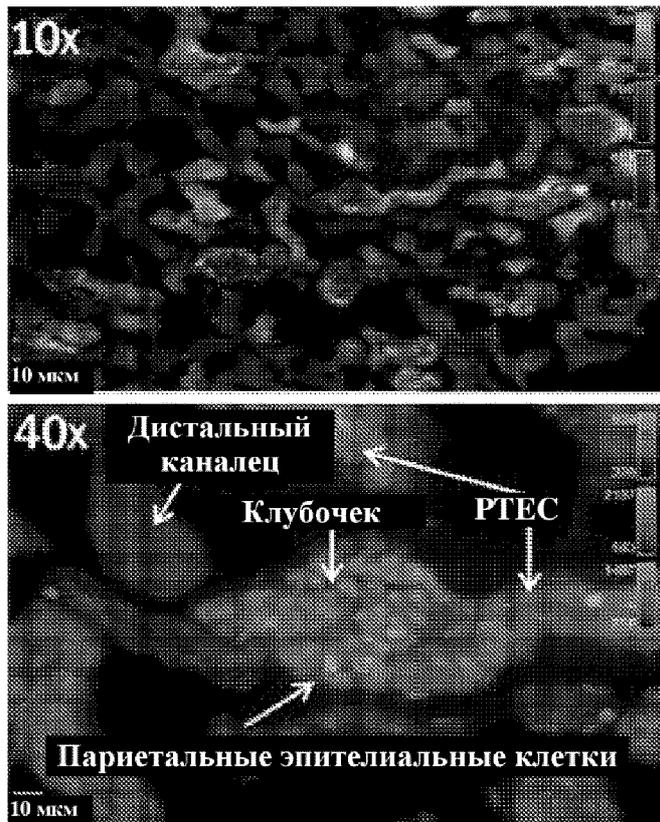
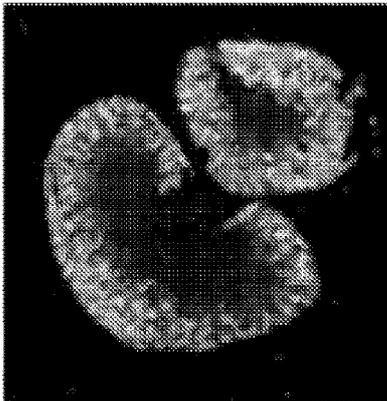
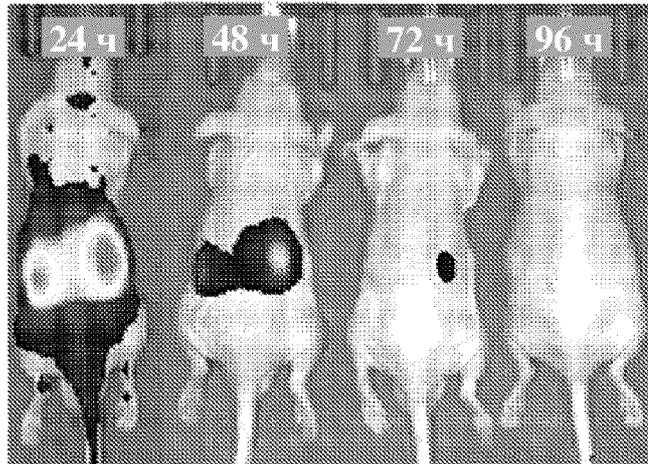
Фиг. 2С



Фиг. 2D

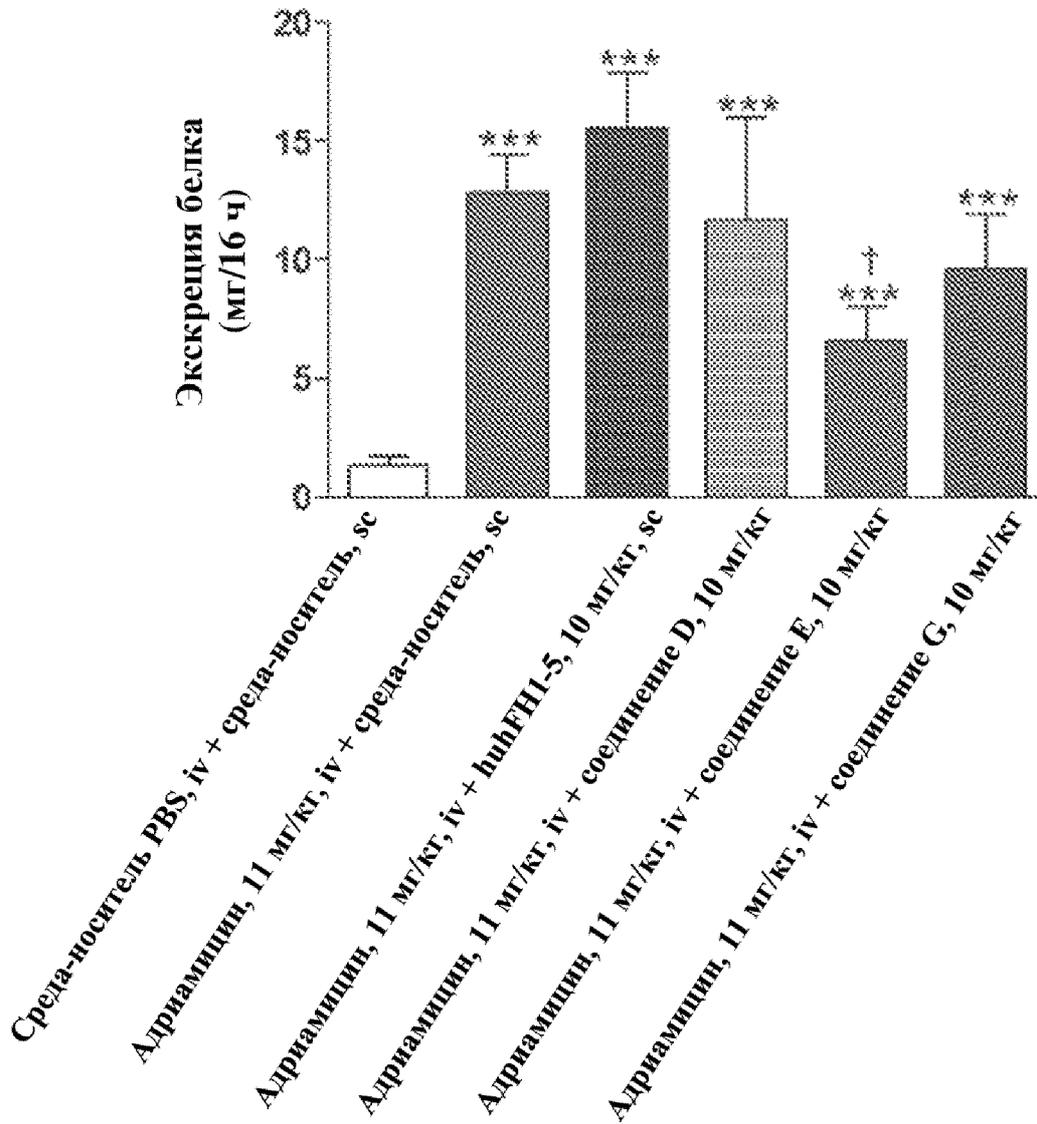


Фиг. 3

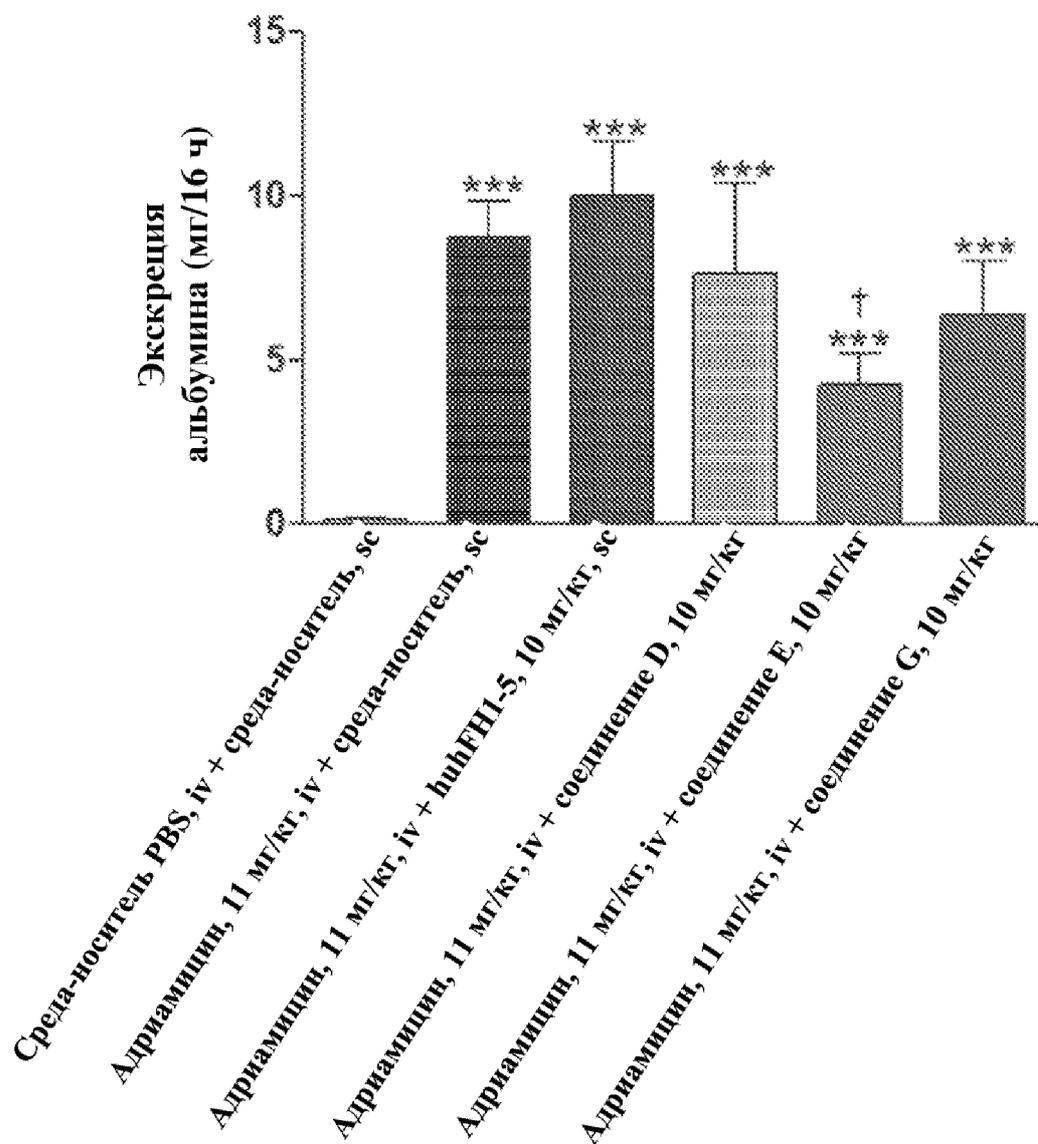


Синий = DAPI (ядра)
Зеленый = AF750-меченный VHH-FH
Красный = автофлуоресценция (для анатомического ориентира)

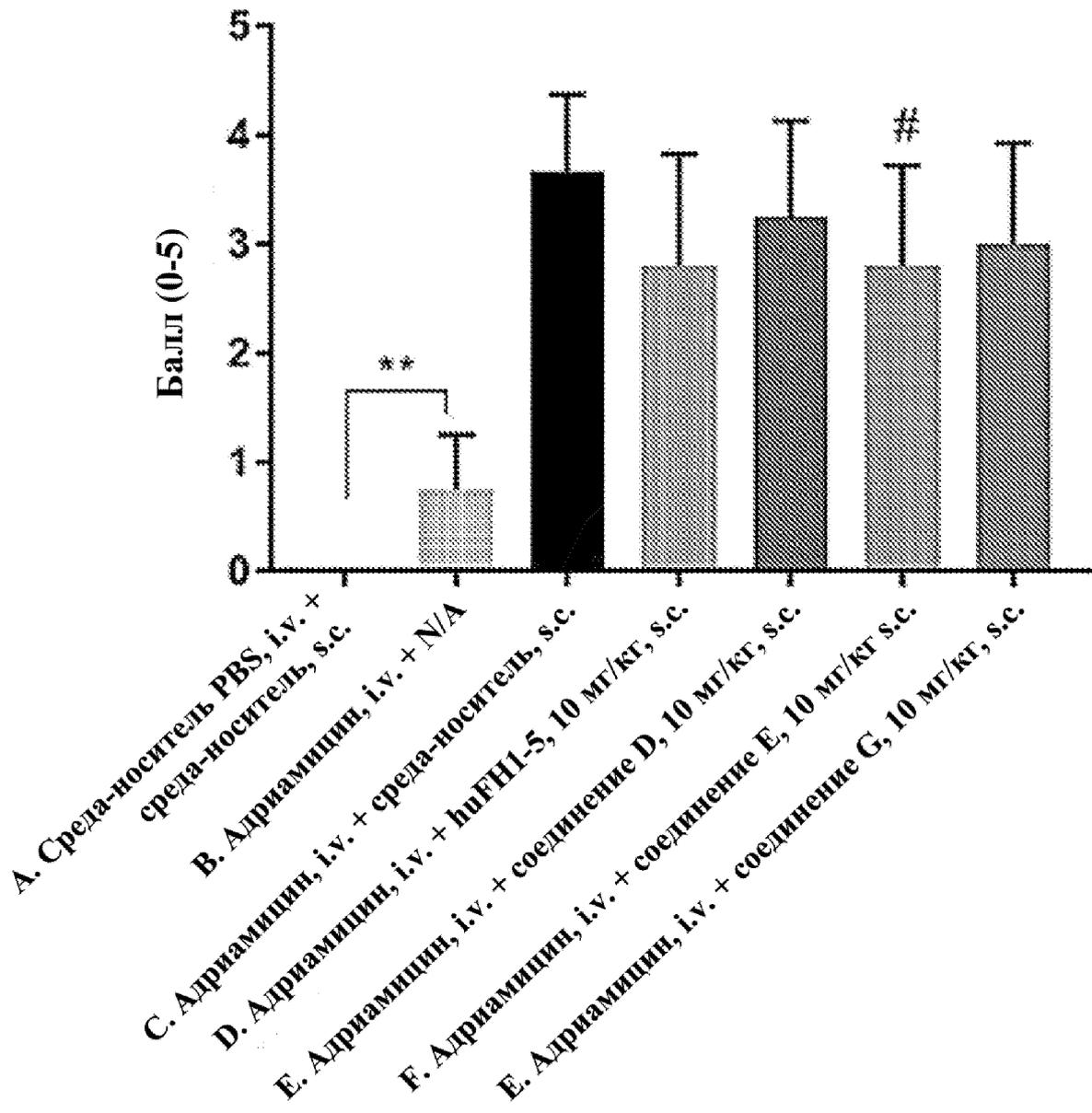
Фиг. 5



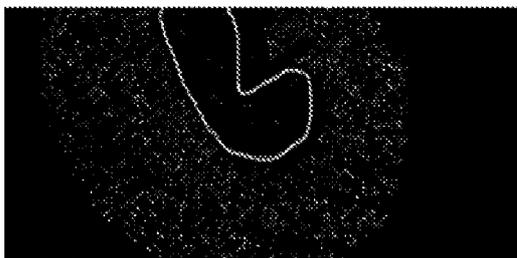
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8А



Среда-носитель – PBS (день 14)

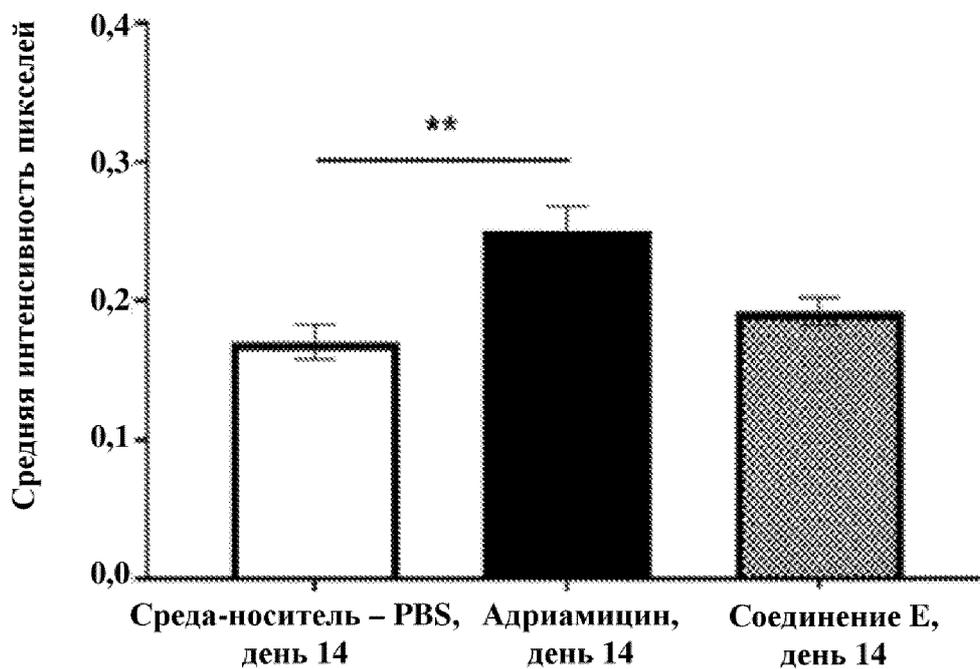


Адриамицин (день 14)

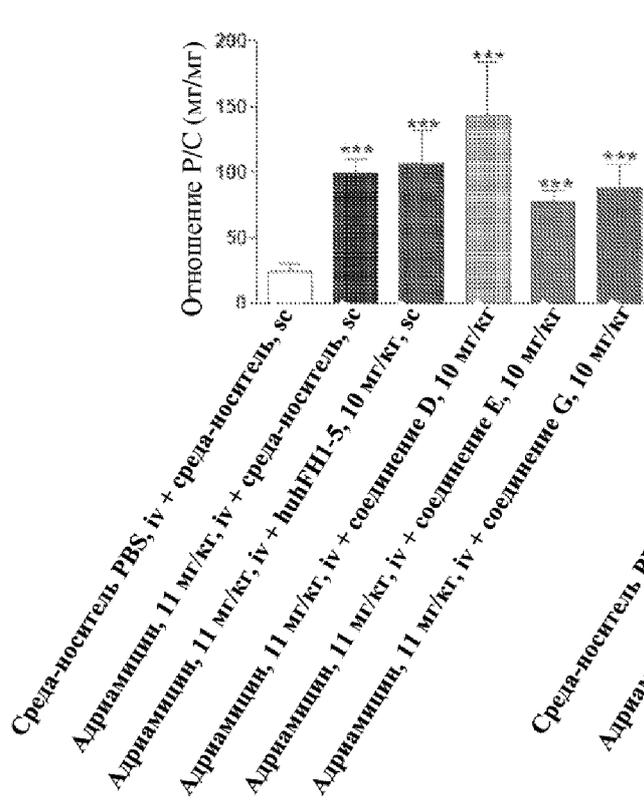


Соединение E (день 14)

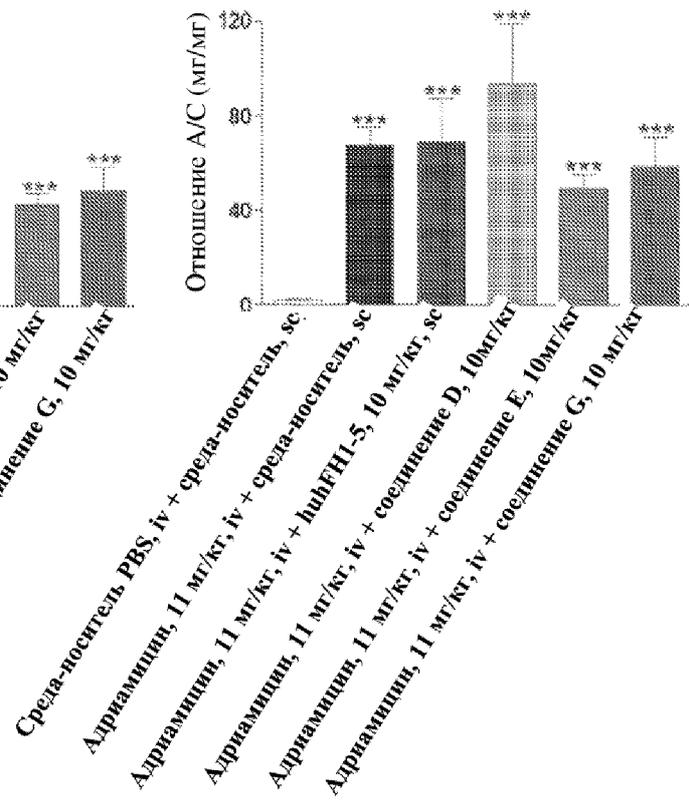
Фиг. 8В



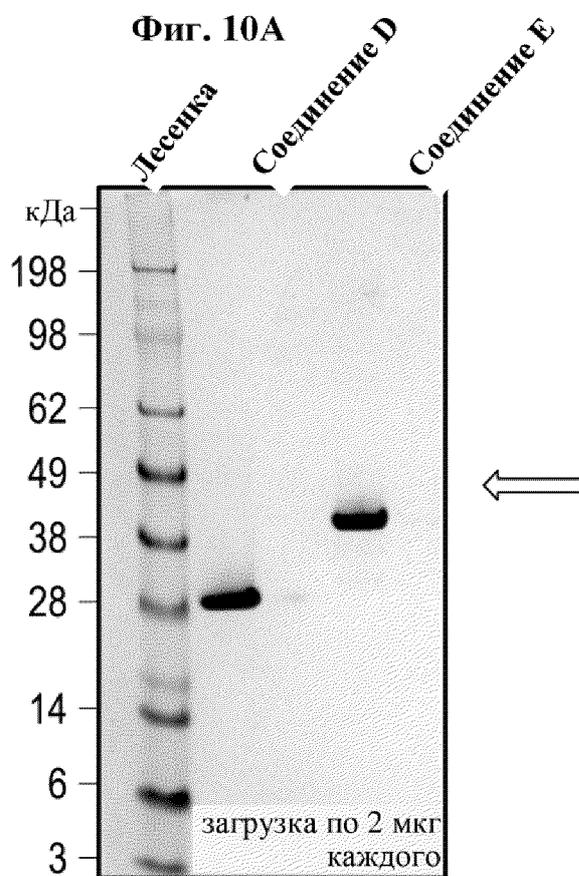
Фиг. 9А



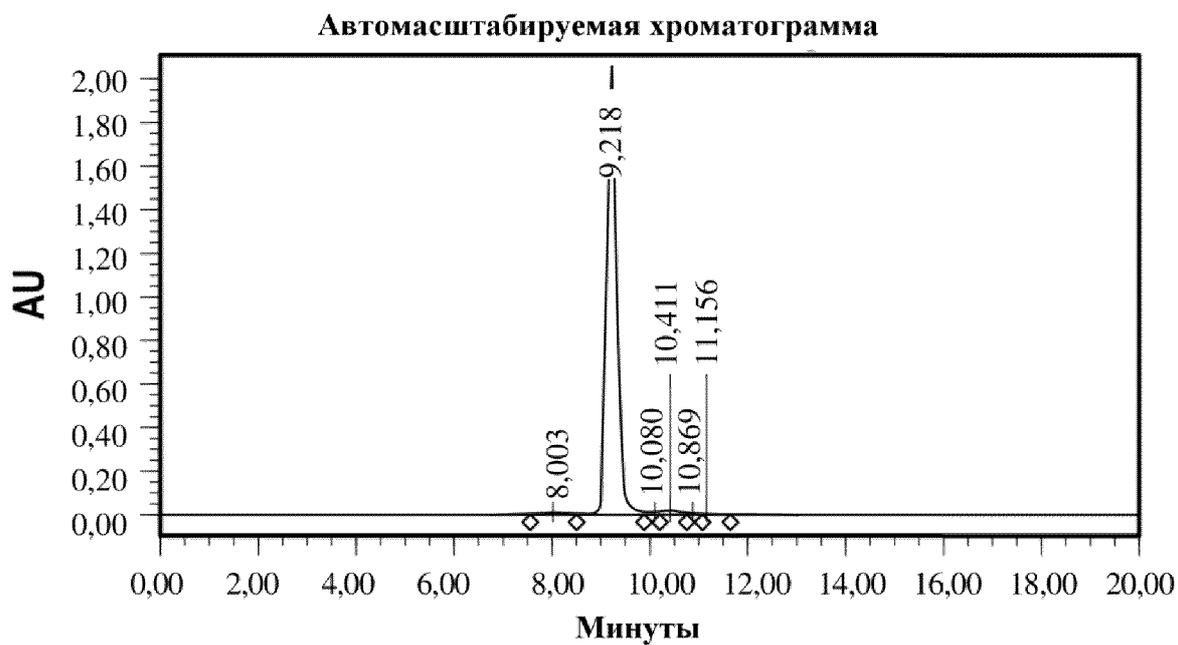
Фиг. 9В



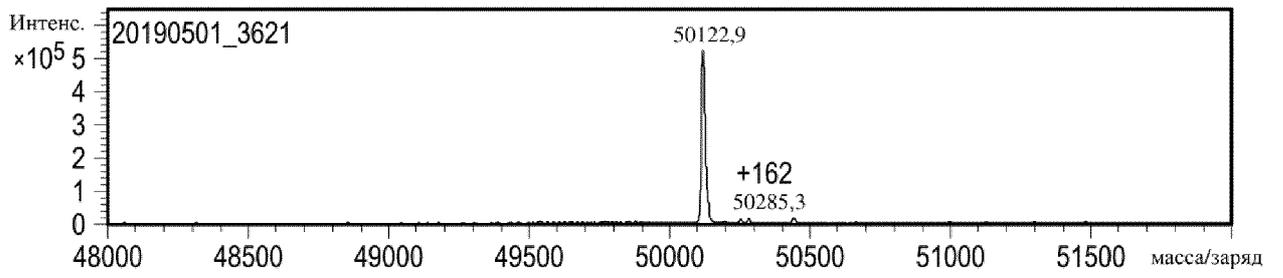
11/23



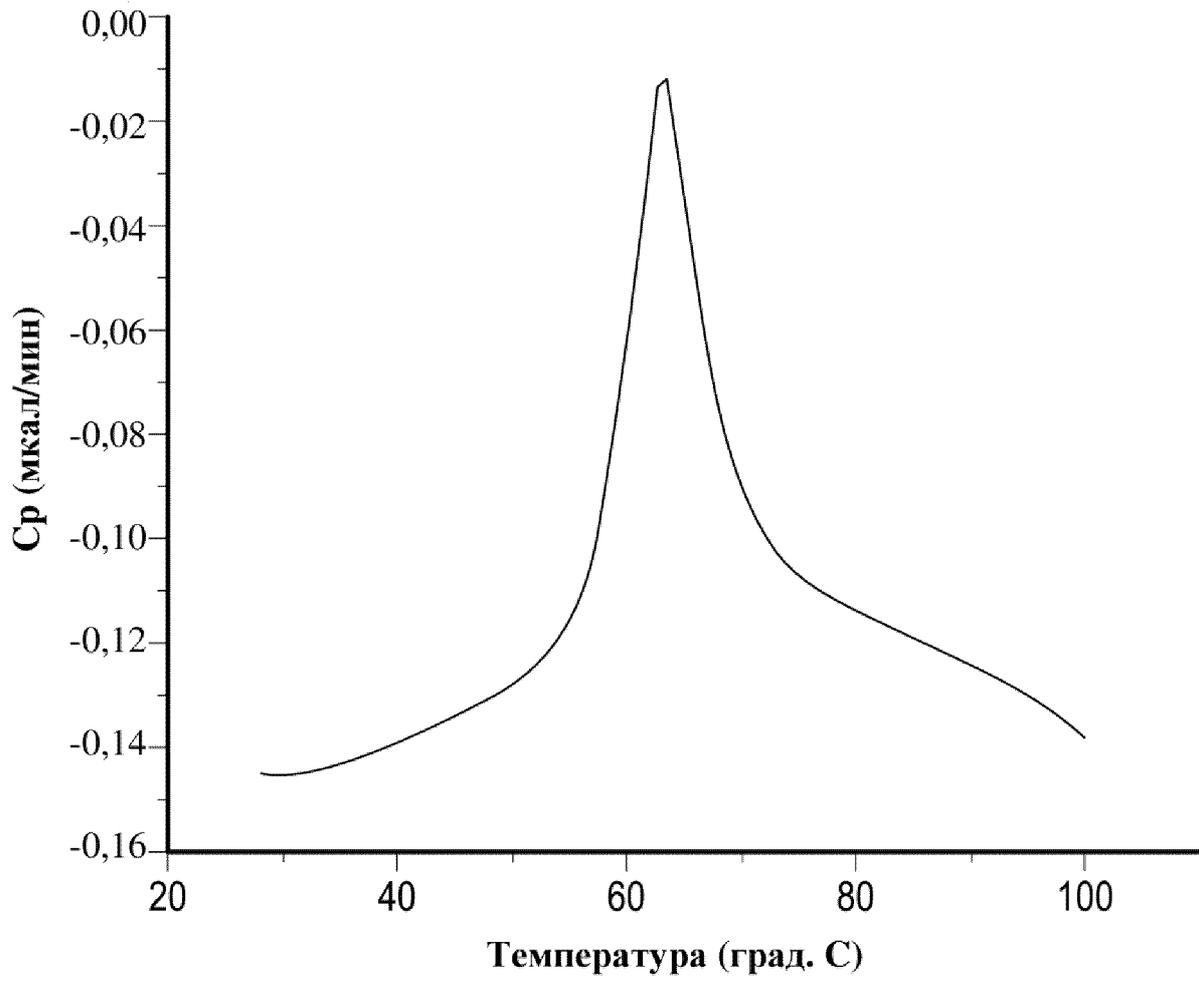
Фиг. 10В



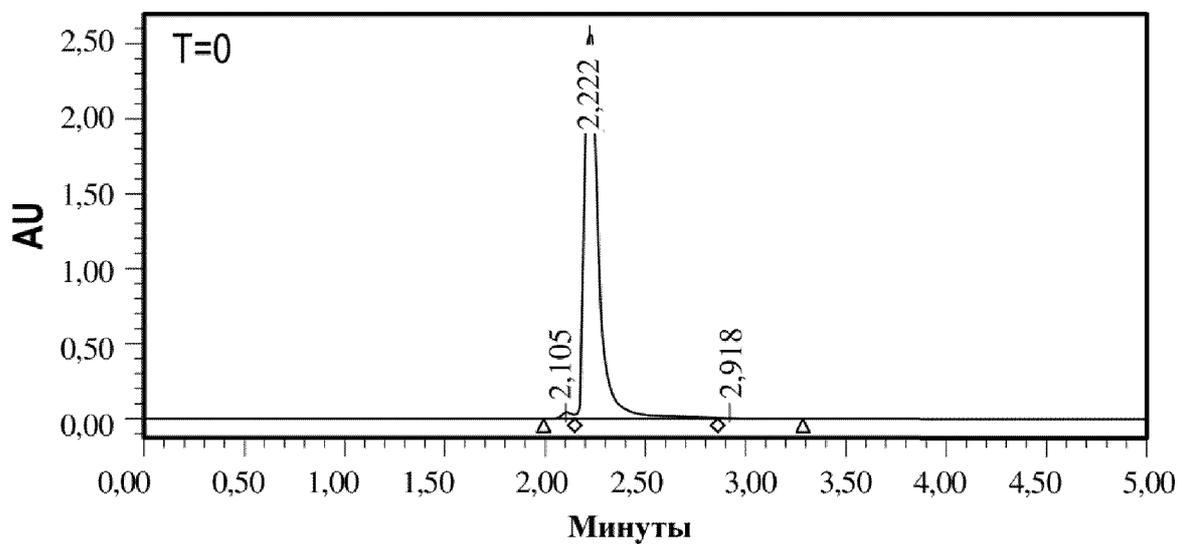
Фиг. 11



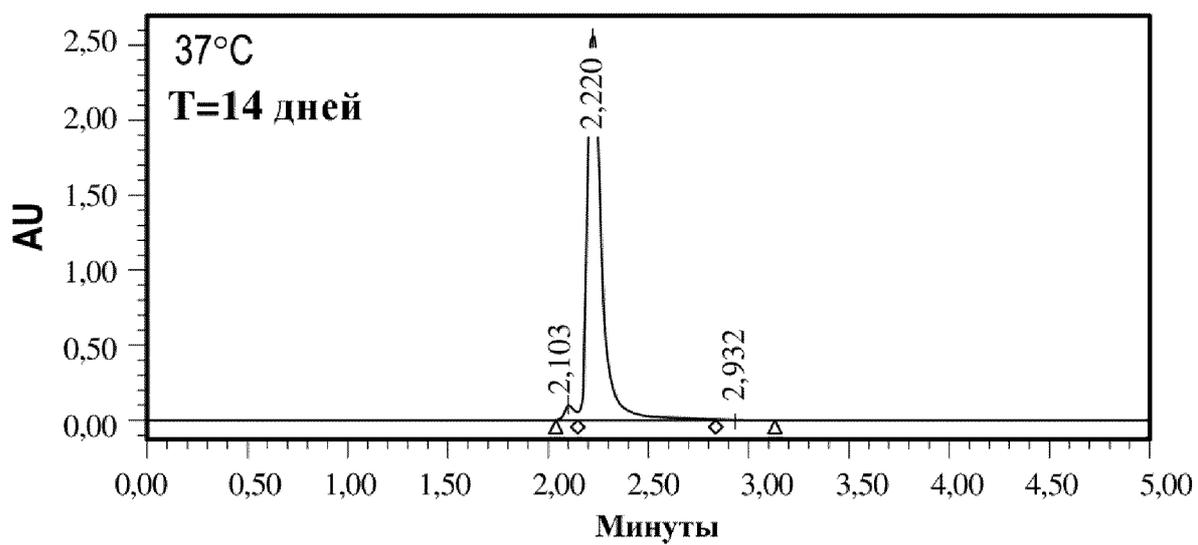
Фиг. 12



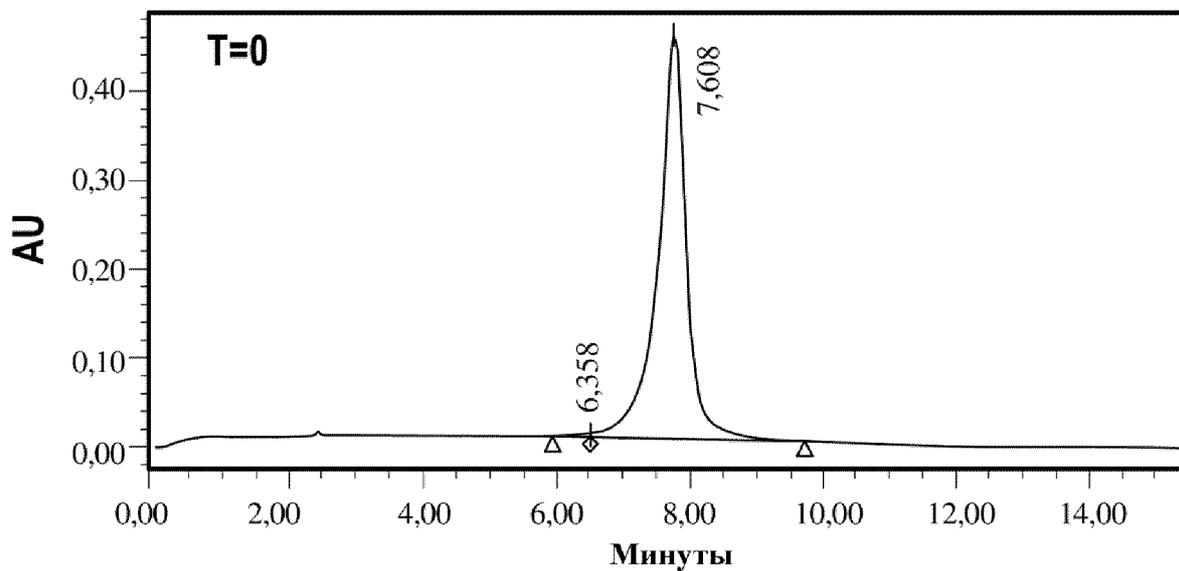
Фиг. 13А



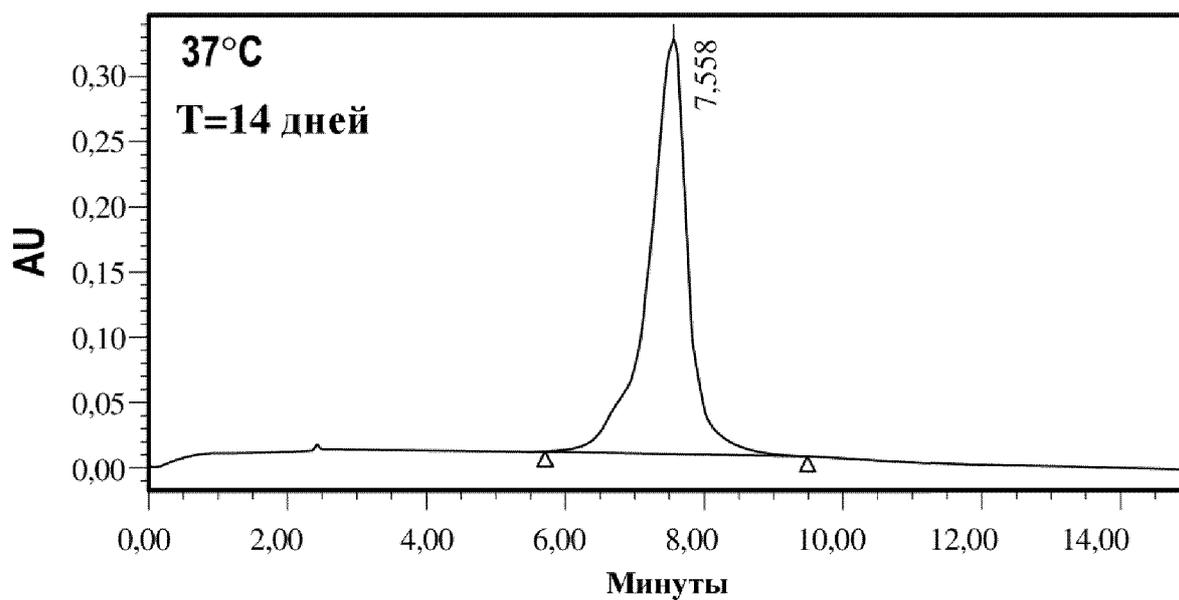
Фиг. 13В



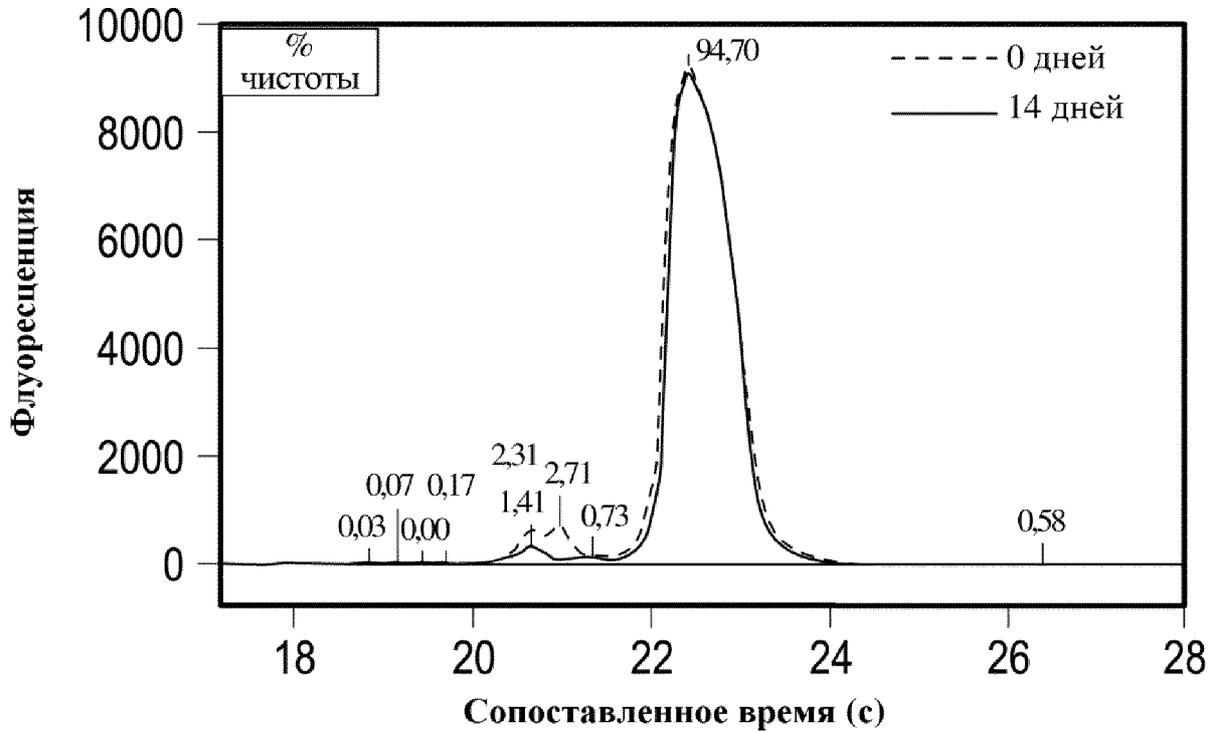
Фиг. 14А



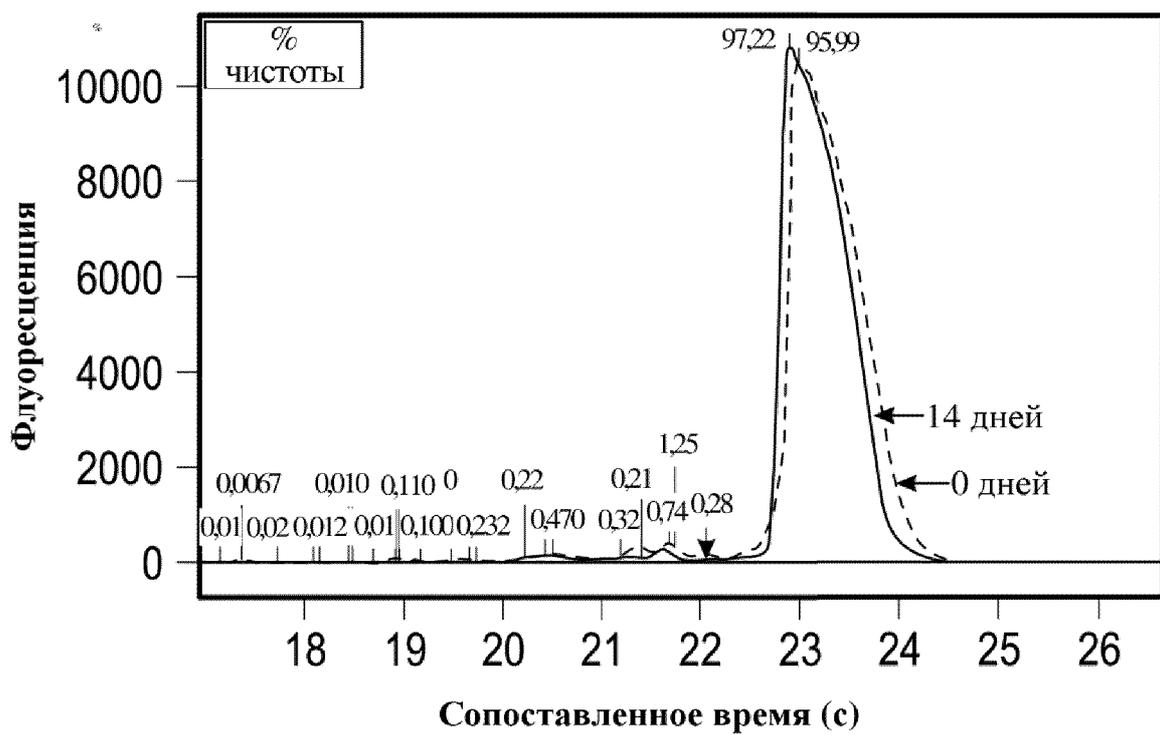
Фиг. 14В



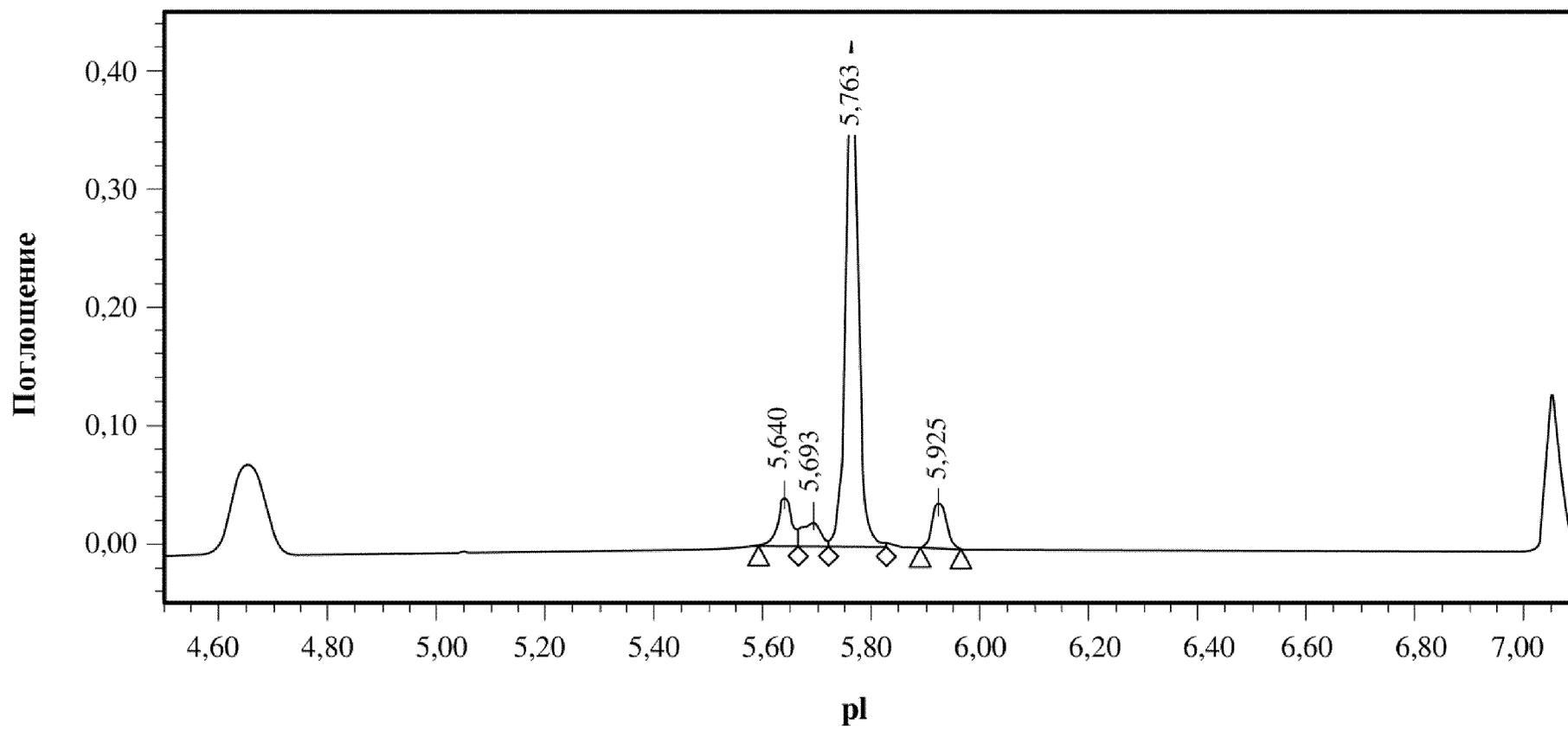
Фиг. 15А



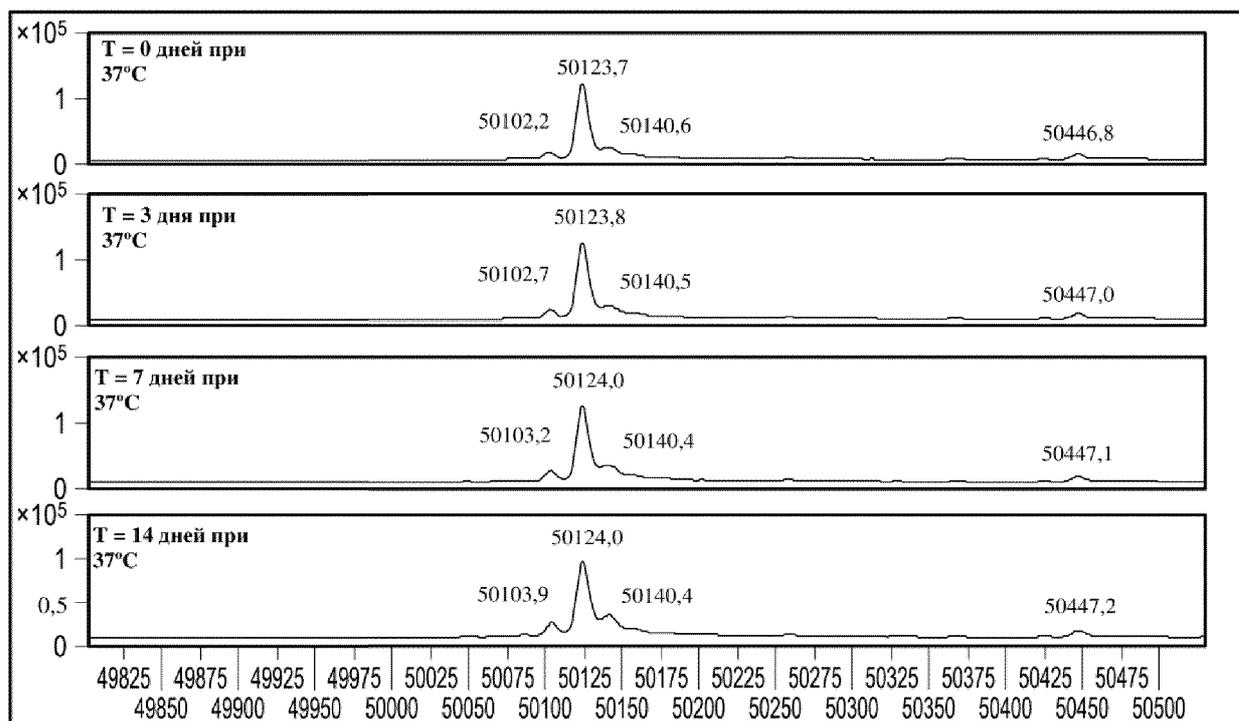
Фиг. 15В



Фиг. 16

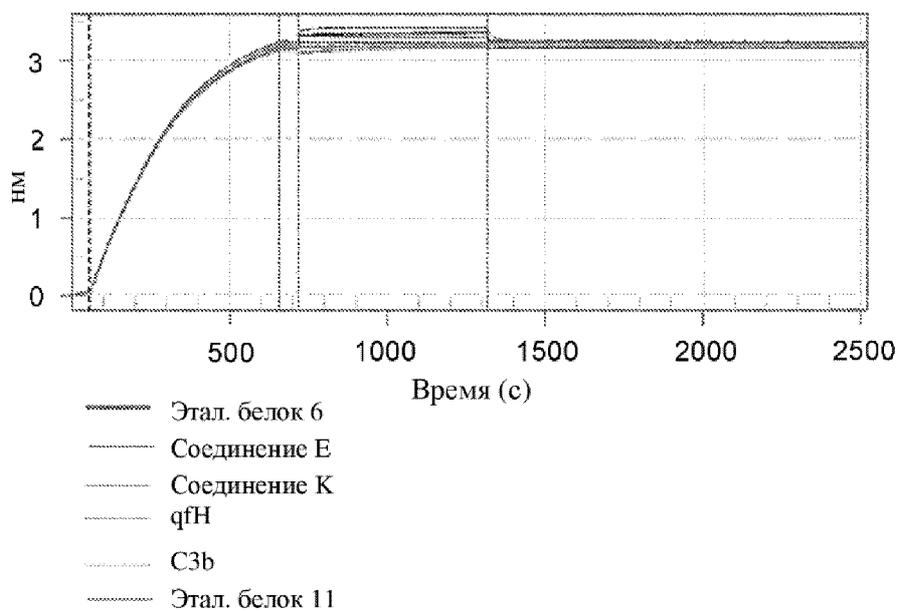


Фиг. 17

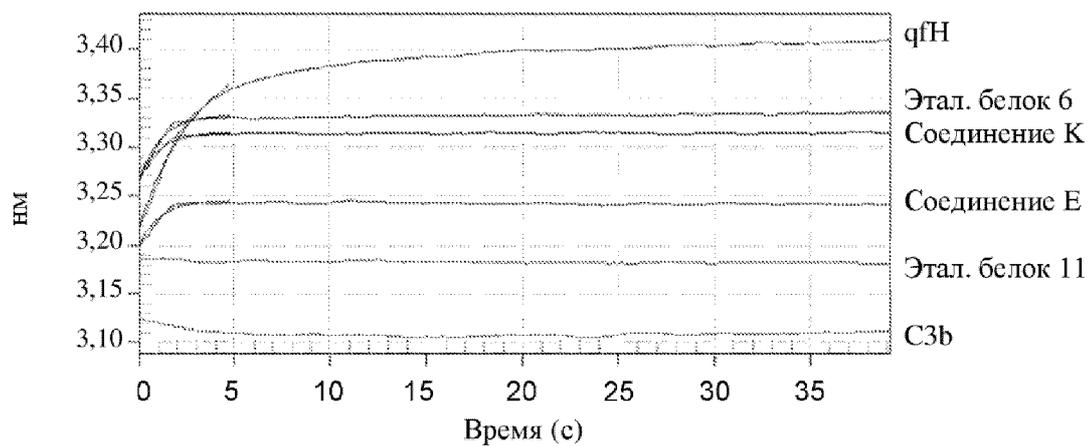


Количество в зависимости от массы после деконволюции (amu)

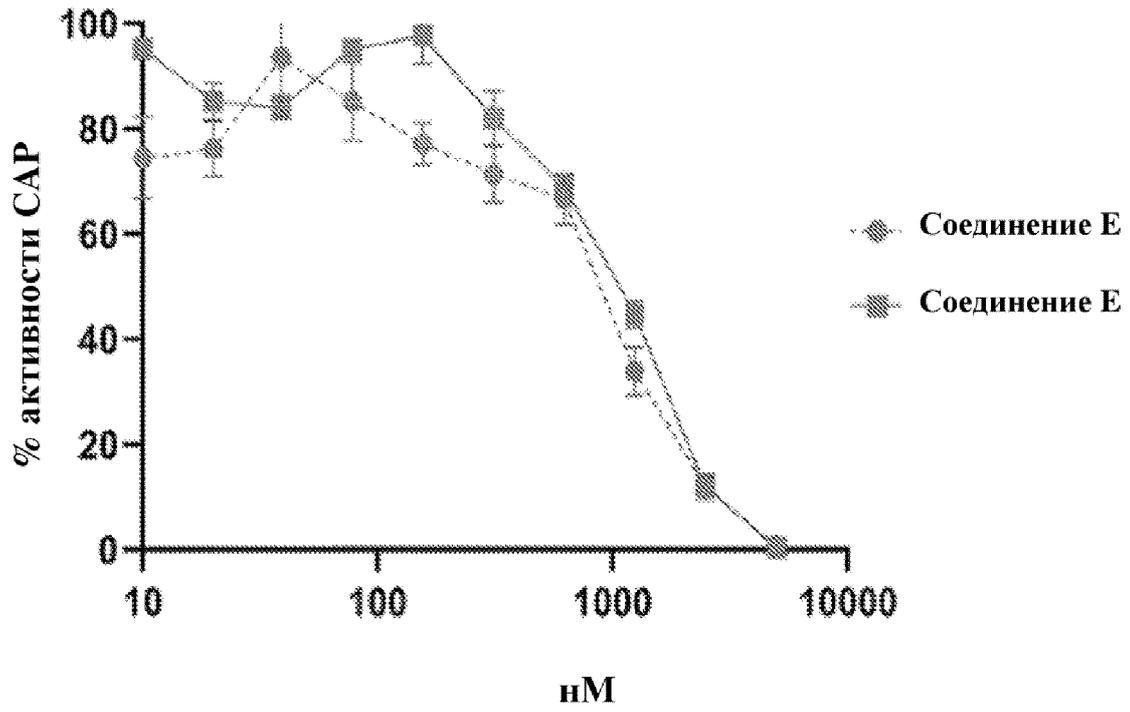
Фиг. 18А



Фиг. 18В

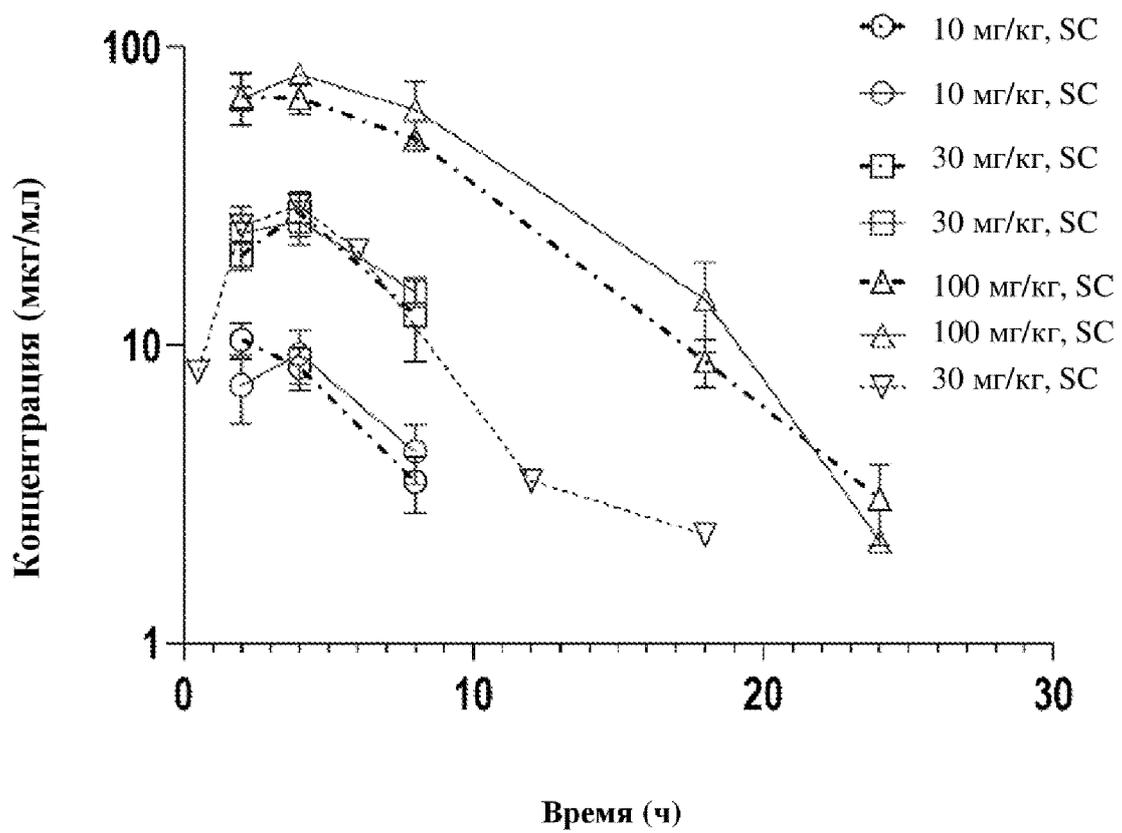


Фиг. 19



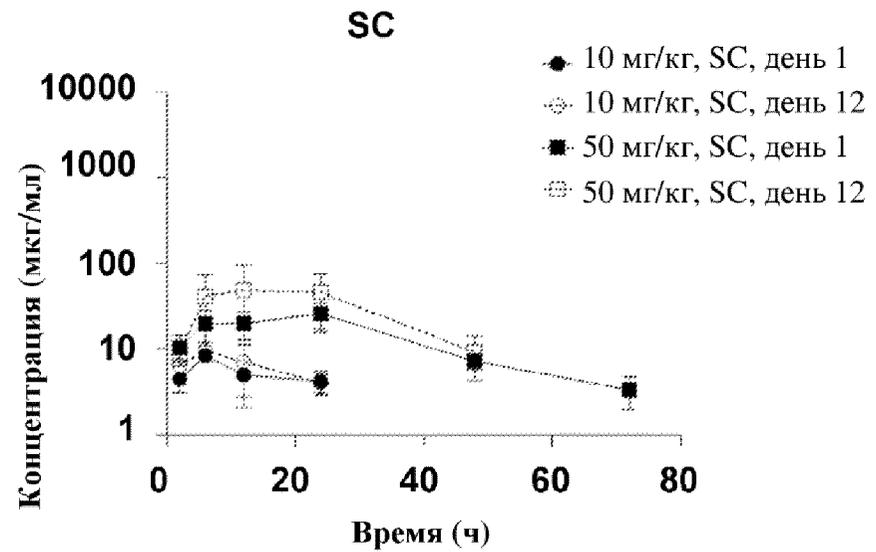
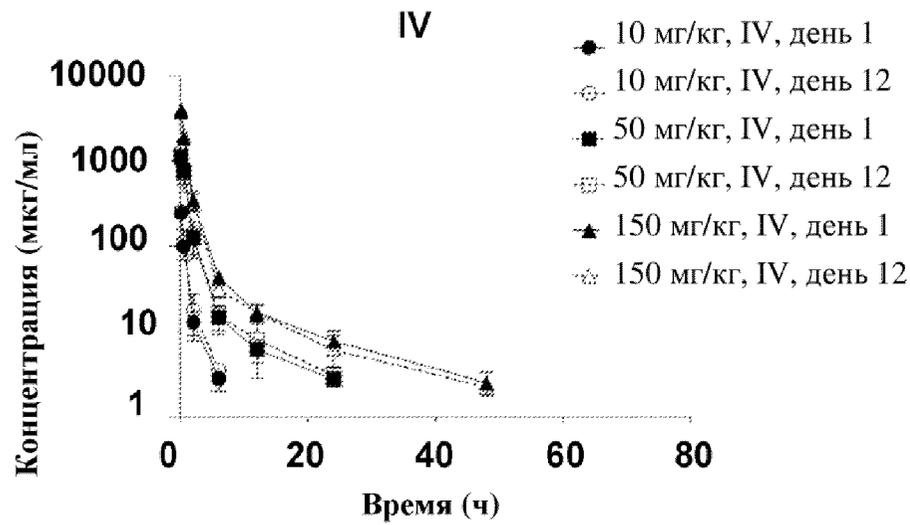
Фиг. 20

Уровни соединения E в сыворотке крови с течением времени



Фиг. 21А

Концентрации соединения Е в сыворотке крови в соответствии с путем введения



Фиг. 21В

Концентрации соединения E в сыворотке крови в соответствии с уровнем дозы

