

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **033666**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.11.14**

**(21)** Номер заявки  
**201590690**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.10.01**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 14/01** (2006.01)  
**G01N 33/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

---

**(54) АМИЛОИДСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 61/708,709; 61/730,316; 61/801,349;  
61/828,105

**(32)** 2012.10.02; 2012.11.27; 2013.03.15;  
2013.05.28

**(33)** US

**(43)** 2016.04.29

**(86)** PCT/US2013/062862

**(87)** WO 2014/055515 2014.04.10

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОКЛАРА БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Кришнан Раджараман, Фишер Ричард**  
**(US)**

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

**(56)** WO-A1-2006083795  
WO-A2-2004018685  
US-A1-2009105090  
KATHER ET AL.: "A Stable Disulfide-free Gene-3-protein of Phage fd Generated by In vitro Evolution", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 354, no. 3, 2 December 2005 (2005-12-02), pages 666-678, XP005165892, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2005.09.086 see claims  
WO-A1-2009143465

---

**(57)** Изобретение относится к амилоидсвязывающим белкам, их содержащей фармацевтической композиции и их применению для снижения количества амилоида, подавления образования амилоида, подавления агрегации амилоида или удаления и/или предотвращения образования токсичных амилоидных олигомеров и лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком. Также изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим заявленные белки; вектору, содержащему нуклеотидную последовательность; клетке, содержащей вектор; и способу получения заявленных белков. Изобретение также относится к способу снижения агрегатов амилоида или белка тау с помощью заявленных белков.

---

**B1**

**033666**

**033666**

**B1**

Данное изобретение относится к белкам слияния, содержащим амилоидсвязывающий фрагмент белка g3p нитевидного бактериофага или мутантные или вариантыные формы такого амилоидсвязывающего фрагмента. В объем изобретения входят также молекулы и конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие указанные белки слияния, клетки, трансформированные такими молекулами нуклеиновых кислот, и способы рекомбинантного получения указанных белков слияния. Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим раскрытые в данном документе белки слияния, и к применению таких составов в терапевтических и профилактических целях для снижения амилоидной нагрузки, связанной с такими заболеваниями, как системный и периферический амилоидозы, нейродегенеративные заболевания, включая нейродегенеративные таупатии, и трансмиссивные губчатые энцефалопатии (прион-ассоциированные заболевания). Также в объем изобретения входит применение указанных составов для предотвращения накопления амилоидной нагрузки, связанной с указанными заболеваниями, и применение указанных составов в качестве диагностических средств для выявления амилоида и, следовательно, диагностирования этих заболеваний.

Нитевидный бактериофаг M13 и родственные ему нитевидные фаги продемонстрировали свою полезность в животных моделях нарушения сворачивания белков и, следовательно, представляют собой перспективную терапевтическую группу в случае нарушений сворачивания белков. См. публикацию патента США US 2011/0142803, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки. В частности, было обнаружено, что нитевидный бактериофаг обладает способностью опосредовать выведение амилоида, который успел накопиться в головном мозге. См., например, WO 2006083795 и WO 2010060073, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Фаг M13, представитель семейства фагов Ff, содержит зрелый белок g3p, состоящий из 406 аминокислот. В GenBank Ref Seq NP\_510891.1 представлена стандартная последовательность, которая содержит аминотерминальную сигнальную последовательность из 18 остатков. Варианты, которые имеют аминокислотные отличия по сравнению с опубликованными последовательностями, широко распространены. Нитевидный фаг из I-семейства содержит g3p, отличающийся от такового у представителей семейства Ff, но даже в рамках нескольких семейств g3p остается высококонсервативным. Stassen et al., *J. Mol. Evol.* (1992) 34:141-52.

Известна кристаллическая структура g3p. Lubkowski et al., *Structure* (1998) 7(6) 711-722. Белок содержит 3 складчатых домена, разделенных гибкими богатыми глицином линкерными последовательностями. В нем присутствуют два аминотерминальных домена, N1 и N2, содержащих 262 аминокислоты, которые взаимодействуют с образованием комплекса N1-N2. Карбокситерминальный (КТ, также называемый N3) домен содержит 146 аминокислот и служит для закоривания g3p в фаговой частице путем гидрофобных взаимодействий с g8p. Marvin, *Current Opin. in Structural Biology* (1998) 8:150-158. Находящаяся в открытом доступе ленточная структура, полученная при помощи N1-N2-доменного белка слияния 2g3p в Holliger, *J. Mol. Biol.* (1999) 288(4):649-57, представлена на фиг. 1.

В отличие от большинства белков для достижения своей природной биологической активности белку g3p необходимо разворачивание доменов N1 и N2 из латентной "закрытой" формы. Eckert & Schmid, *J. Mol. Biol.* (2007) 373:452-461. На начальном этапе инфицирования N2 связывает бактериальную F-фимбрию при помощи остатков на внешнем крае N2. Deng & Perham, 2002. Это начальное связывание N2 "раскрывает" g3p посредством "раскрытия" комплекса N1-N2, что позволяет N1 затем связывать корецептор TolA. В N1-N2 фрагменте g3p тепловой переход к начальному этапу раскрытия, на котором происходит разворачивание N2, происходит при температуре плавления ( $T_{пл}$ ), составляющей 48,1°C. Часть этого процесса заключается в изомеризации пептидной связи Gln212-Pro213. Преобразование Pro213 в раскрытом состоянии соответствует транс-конформации. N1 остается в стабильно свернутом состоянии до второго этапа, который происходит при  $T_{пл}$  в 60,2°C. Обзор представлен в Eckert & Schmid, 2007.

Мутации во фрагменте N1-N2 использовали для изучения стабильности и инфекционности различных мутантов. Eckert & Schmid, 2007. Один вариант, обозначенный "3A", приводил к ослаблению связывания фимбриии и снижению стабильности домена N2. В случае этой мутации  $T_{пл}$  снижалась до 42,6°C. 3A несет следующие мутации: W181A, F190A и F194A. Другой мутант по N2, G153D, приводил к дестабилизации N2, снижая  $T_{пл}$  до 44,4°C. Мутант Q129H приводил к стабилизации N2, повышая  $T_{пл}$  до 51,4°C. Вариант IY содержит мутации T101I и D209Y в шарнирной области и повышает стабильность фрагмента N1-N2 ( $T_{пл} = 56,5^\circ\text{C}$ ). IYH содержит мутации T101I, Q129H и D209Y ( $T_{пл} = 60,1^\circ\text{C}$ ). IYH содержит мутации T13I, T101I, Q129H и D209Y ( $T_{пл} = 61,8^\circ\text{C}$ ). Обе мутации - Q129Y и T13I - являются стабилизирующими, а введение этих мутаций дополнительно повышает температуру плавления  $T_{пл}$ . Инфекционность фага изменяется обратно пропорционально силе взаимодействия между доменами g3p. Eckert & Schmid, 2007. Удаление домена N2 (фаг fd( $\Delta$ N2)) увеличивает инфекционность путем снятия блокирующего воздействия домена N2 на N1-связывание TolA. Id.

Недавно было обнаружено, что g3p опосредует также связывание нитевидного фага с амилоидом путем, аналогичным процессу инфицирования фагом бактерий. В WO 2013/082114 описывается, что фаг g3p непосредственно связывает амилоидные волокна и что опосредованная фагом дезагрегация зависит от этого начального этапа связывания. Подтверждение того, что g3p отвечает за опосредованное ните-

видным фагом связывание амилоида, обеспечивает основу для разработки новых классов терапевтических и диагностических средств. В настоящем изобретении предложены такие терапевтические и диагностические составы, а также способы их применения для выявления, диагностирования, лечения, предотвращения или отсрочки начала заболеваний и нарушений, связанных с агрегацией амилоида.

Дополнительные цели и преимущества данного изобретения изложены в нижеприведенном описании и станут очевидными, исходя из описания, или они могут быть выявлены при практической реализации данного изобретения. Цели и преимущества данного изобретения могут быть реализованы и достигнуты посредством элементов и комбинаций, четко прописанных в прилагаемой формуле изобретения. Следует понимать, что вышеприведенное общее описание и нижеприведенное подробное описание приведены лишь в иллюстративных и пояснительных целях и не ограничивают заявляемого изобретения.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 иллюстрирует лентночную структуру доменов N1 и N2 g3p и шарнирную область.

Фиг. 2A-2C иллюстрируют выравнивание g3p из различных источников. Фиг. 2A представляет собой выравнивание g3p фага M13 (SEQ ID NO: 1), fd (SEQ ID NO: 2) и f1 (SEQ ID NO: 3), включая консенсусную последовательность (SEQ ID NO: 4). Фиг. 2B иллюстрирует выравнивание g3p фага I2-2 (SEQ ID NO: 5) и Ike (SEQ ID NO: 6), а также консенсусную последовательность между I2-2 и Ike (SEQ ID NO: 7). Фиг. 2C иллюстрирует аминокислотную последовательность g3p фага If (SEQ ID NO: 8).

Фиг. 3A и 3B иллюстрируют исследования по связыванию фага методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Связывание с A $\beta$ -волоками сравнивали со связыванием с A $\beta$ -мономерами, используя поток в 10<sup>14</sup> фагов/мл через биосенсорный чип. На фиг. 3B приведены K<sub>a</sub>, K<sub>d</sub> и K<sub>D</sub>, рассчитанные по данным ППР, проиллюстрированным на фиг. 3A.

Фиг. 4A и 4B иллюстрируют исследования по связыванию. Фиг. 4A иллюстрирует результаты прямого анализа связывания для двух дозировок фагов (10<sup>11</sup>/мл и 10<sup>12</sup>/мл) с возрастающим молярным количеством fA $\beta$ 42. На Фиг. 4B проиллюстрировано исследование конкурентного связывания и предложен альтернативный способ определения K<sub>D</sub> для связывания M13. Применяли конструкцию 1.

Фиг. 5 иллюстрирует результаты конкурентного связывания с применением температурно-денатурированной (квадраты - 90°C на протяжении 10 мин) и нативной конформации (круги) M13 (конструкция 1) в анализе конкурентного связывания амилоидных волокон.

Фиг. 6 иллюстрирует анализ флуоресценции тιοфлавина Т (ThT) с применением fA $\beta$ 42, инкубированного в присутствии или отсутствие 2 концентраций фага M13 (конструкция 1).

Фиг. 7A и 7B иллюстрируют влияние изменения индивидуальных параметров в анализе дезагрегации ThT. На фиг. 7A приведены процентные значения дезагрегации в присутствии двух концентраций соли (0,15 и 1,5 М). На фиг. 7B приведены процентные значения для оставшегося fA $\beta$  при двух температурах (4 и 37°C). Применяли конструкцию 1.

Фиг. 8A и 8B иллюстрируют исследования связывания M13-амилоид с применением fA $\beta$ 42. На фиг. 8A представлено связывание M13 при применении инкубационных температур от 18 до 58°C на протяжении 3 ч. Фиг. 8B иллюстрирует кинетику связывания в случае инкубации при 37 и при 50°C.

Фиг. 9A-9C иллюстрируют влияние протеолитического удаления g3p на взаимодействие фага-амилоид. Для отщепления g3p от фага M13 (M13 $\Delta$ g3p) использовали протеазу Arg C. На фиг. 9A представлены результаты исследования конкурентного связывания A $\beta$  с применением фага M13 $\Delta$ g3p в сравнении с нативным (обработанным аналогично фагу, обработанному ArgC, но без обработки протеазой) фагом. Фиг. 9B иллюстрирует влияние обработки Arg C на инфекционность фага M13 $\Delta$ g3p в сравнении с нативным фагом. На фиг. 9C приведено сравнение обработанного Arg C фага с нативным фагом в ходе анализа дезагрегации.

На фиг. 10A и 10B представлены результаты анализа конкурентного связывания с применением фрагмента N1-N2 g3p, который в данном документе называется рекомбинантным растворимым N1N2 (rs-g3p (N1N2); "конструкция 3"), M13 $\Delta$ g3p (обработанного Arg C) и M13 в качестве конкурентов меченого M13 по связыванию с fA $\beta$ 42. Фиг. 10B иллюстрирует повторение конкурентного анализа.

На Фиг. 11 представлены данные по конкурентному связыванию для фагов fd, ПНУ, AAA и M13. Фаги fd, AAA и ПНУ преактивировали при 50°C на протяжении 1,5 ч, затем проводили сравнение активированных и неактивированных Fd, AAA и ПНУ в отношении их способности конкурировать с меченым M13 за связывание с A $\beta$  во время 45-минутной инкубации при 37°C.

На фиг. 12A представлено схематическое изображение rs-g3p (N1N2) (конструкция 3). На фиг. 12B представлен ионообменный профиль для rs-g3p (N1N2). Фиг. 12C иллюстрирует результаты гель-фильтрационного анализа с применением сефакрила S-300 и rs-g3p (N1N2). Фиг. 12D иллюстрирует вес-терн-блоттинг rs-g3p (N1N2) совместно с контрольными образцами g3p и g8p. Фаги M13 проводят через полосы 1 и 2 в качестве положительного контроля и детектируют при помощи поликлонального антитела к M13, которое позволяет детектировать как g8p, так и g3p. Очищенный rs-g3p проводят через полосы 3 и 4 и детектируют при помощи того же самого поликлонального антитела к M13.

На фиг. 13 представлены данные ППР по rs-g3p (N1N2) (конструкция 3). rs-g3p (N1N2) эффективно связывает fA $\beta$ 42 с K<sub>D</sub>, составляющей около 160 нМ, но не связывает мономеры.

На фиг. 14 представлен анализ флуоресценции ThT, который применяли для определения количества амилоида, присутствующего в заданном образце. 10 мкМ мономеров A $\beta$ 42 инкубировали в присутствии или отсутствие 5 концентраций rs-g3p (N1N2) (конструкция 3) при 37°C на протяжении 3 дней. Количество волокон, образованных к концу 3 дня, определяли, проводя количественный анализ флуоресценции связанного ThT. Значение IC<sub>50</sub> составляло приблизительно 20 нМ, что свидетельствует о том, что rs-g3p (N1N2) эффективно подавляет образование волокон A $\beta$ 42. Также данные фигуры свидетельствуют о том, что связывание является дозозависимым. Повторные эксперименты показали значение IC<sub>50</sub> между 20 и 100 нМ.

Фиг. 15А иллюстрирует полученные методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) результаты инкубации fA $\beta$ 42 в присутствии или отсутствие rs-g3p (N1N2) (конструкция 3). Фиг. 15В иллюстрирует результаты анализа флуоресценции ThT с применением A $\beta$ 42 и 2 мкМ rs-g3p (N1N2) (конструкция 3), инкубированных при 37°C на протяжении 7 дней. rs-g3p (N1N2) блокирует образование fA $\beta$ 42.

Фиг. 16 демонстрирует, что rs-g3p (N1N2) (конструкция 3) эффективно подавляет образование  $\alpha$ -синуклеиновых волокон. 25 мкМ  $\alpha$ -синуклеина получали путем перемешивания при 300 об/мин на протяжении 4 дней при 37°C (см. колонку 1). Вторая колонка на графике представляет мономеры  $\alpha$ -синуклеина плюс  $1 \times 10^{-13}$  пентамерного фага M13, перемешиваемые при 37°C на протяжении 3 дней. Результаты, представленные колонкой 2, свидетельствуют о том, что пентамерный M13 блокирует сборку волокон  $\alpha$ -синуклеина. Третья колонка на графике представляет мономеры  $\alpha$ -синуклеина + 83 нМ мономеров rsg3p. Результаты, представленные колонкой 3, свидетельствуют о том, что мономеры менее эффективно подавляют образование волокон  $\alpha$ -синуклеина по сравнению с пентамерным M13. Колонка 4 представляет отрицательный контроль, демонстрирующий мономеры  $\alpha$ -синуклеина в нулевой момент времени. Колонка 5 представляет мономеры g3p в отсутствие волокон  $\alpha$ -синуклеина для того, чтобы определить, связывается ли g3p с рТАА и блокирует ли связывание красителя с волокнами. Результаты, представленные колонкой 5, свидетельствуют о том, что g3p не связывается с рТАА.

На фиг. 17 представлены данные по конкурентному связыванию для rs-g3p (N1N2) (конструкция 3), M13 (конструкция 2), белка слияния rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 4) и отрицательного контроля IgG4-Fc.

На фиг. 18 представлены данные по конкурентному связыванию, в которых сравниваются M13 (конструкция 2; квадраты), rs-g3p (N1N2) (конструкция 3; треугольники), белок слияния rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 4; перевернутые треугольники) и рекомбинантный IgG4-Fc в качестве отрицательного контроля (ромбы).

Фиг. 19 иллюстрирует метод ловушки на фильтре, в котором сравниваются пять концентраций волокон A $\beta$ 42 плюс или минус две концентрации M13 (конструкция 2), 800 нМ rs-g3p (N1N2) (конструкция 3) и три концентрации белка слияния rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 4).

На фиг. 20 представлены данные по конкурентному связыванию для rs-g3p (N1N2) (конструкция 3; "мономер") и стрептаведин-конъюгированного rs-g3p (N1N2) ("SA[g3pN1N2]<sub>n=2-4</sub>"; "SA-g3p"; "тетрамер"). rs-g3p (N1N2) и SA-g3p сравнивали в отношении их способности конкурировать с меченым M13 за связывание с A $\beta$  во время трехчасовой инкубации при 37°C.

Фиг. 21 иллюстрирует метод ловушки на фильтре, в котором сравниваются пять концентраций fA $\beta$ 42 плюс или минус две концентрации rs-g3p (N1N2) (конструкция 3; "мономер") и две концентрации SA-g3p ("тетрамер").

На фиг. 22А и 22В представлены ПЭМ-изображения fA $\beta$ 42 в нулевой момент времени (фиг. 22А) и через три дня после инкубации с SA-g3p (фиг. 22В).

Фиг. 23 иллюстрирует аминокислотную последовательность одной конструкции rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc "конструкции 4" (SEQ ID NO: 9). N1N2 область "конструкции 4" получена из N1N2 области "конструкции 1" (SEQ ID NO: 10).

Фиг. 24 иллюстрирует аминокислотную последовательность другой конструкции rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc "конструкции 5" (SEQ ID NO: 11). N1N2 область "конструкции 5" получена из N1N2 области "конструкции 2" (SEQ ID NO: 12).

Фиг. 25 иллюстрирует аминокислотную последовательность одной конструкции rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc "конструкции 6" (SEQ ID NO: 13). N1N2 область "конструкции 6" получена из N1N2 области "конструкции 2".

Фиг. 26 иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности N2 от fd (SEQ ID NO: 14), f1 (SEQ ID NO: 15), M13 (SEQ ID NO: 16), lke (SEQ ID NO: 17), I2-2 (SEQ ID NO: 18) и If1 (SEQ ID NO: 19). Звездочкой \* помечены позиции, которые содержат один полностью консервативный остаток. Двоеточие ":" указывает на консервативность между группами с максимально сходными свойствами, для которых значение по матрице Gonnet PAM 250 составляет более чем 0,5. Точка "." указывает на консервативность между группами с минимально сходными свойствами, для которых значение по матрице Gonnet PAM 250 составляет 0,5 или менее.

На фиг. 27А представлено схематическое изображение конструкции 3. Фиг. 27В иллюстрирует по-

следовательность ДНК g3p-фрагмента конструкции 3 (SEQ ID NO: 23). Фиг. 27С иллюстрирует аминокислотную последовательность g3p-фрагмента конструкции 3 (SEQ ID NO: 24).

Фиг. 28 иллюстрирует результаты эксперимента, в котором исследовали два белка слияния rs-g3p (N1N2)-IgG в отношении их способности снижать количество амилоида  $\beta$  в трансгенной мышечной модели болезни Альцгеймера. rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) существенно снижают уровень амилоида  $\beta$  в гиппокампе мышечей с болезнью Альцгеймера.

Фиг. 29 иллюстрирует результаты эксперимента, в котором исследовали два белка слияния rs-g3p (N1N2)-IgG в отношении их способности снижать количество амилоида  $\beta$  в трансгенной мышечной модели болезни Альцгеймера. rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) были способны существенно снижать уровень амилоида  $\beta$  в коре головного мозга мышечей с болезнью Альцгеймера.

Фиг. 30А и 30В иллюстрируют подавление сборки A $\beta$ 42 со стороны rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6). На фиг. 30А показан "нативный" арагозный гель, полученный без ДСН. Затем образцы проводили в ТЭА буфере без ДСН и не нагревали. Результаты свидетельствуют о том, что конструкция 6 способна подавлять сборку fA $\beta$ 42. Фиг. 30В иллюстрирует анализ флуоресценции ThТ, который применяли для определения количества амилоида, присутствующего в заданном образце. 10 мкМ мономеров A $\beta$ 42 инкубировали в присутствии или отсутствии 2 концентраций rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) при 37°C на протяжении 1 дня. Количество волокон, образованных к концу 1 дня, определяли, проводя количественный анализ флуоресценции связанного ThТ. rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) эффективно подавляет образование волокон A $\beta$ 42. Также данные фигуры свидетельствуют о том, что подавление образования волокон конструкцией 6 является дозозависимым.

На фиг. 31А, 31В, 31С и 31D представлены репрезентативные данные по круговому дихроизму, показывающие, что сборка A $\beta$ 42 подавляется rs-g3p (N1N2) (конструкцией 3). Круговой дихроизм позволяет определить содержание оцениваемых  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складчатостей волокон A $\beta$ . Фиг. 31А иллюстрирует зависимость эллиптичности от длины волны для A $\beta$ 42 при T = 0, T = 24 ч и T = 48 ч. Фиг. 31В иллюстрирует зависимость эллиптичности от длины волны для A $\beta$ 42 плюс конструкция 3 при T = 0, T = 24 ч и T = 48 ч. Фиг. 31С иллюстрирует репрезентативный анализ ThТ, в котором количество волокон, образованных между 24 и 48 ч, определяли при помощи количественного анализа флуоресценции связанного ThТ. Конструкция 3 эффективно подавляет образование волокон A $\beta$ 42. Фиг. 31D иллюстрирует зависимость эллиптичности от длины волны для конструкции 3 при T = 0, T = 24 ч и T = 48 ч. Вместе эти данные подтверждают способность конструкции 3 подавлять сборку A $\beta$ 42.

На фиг. 32 представлены репрезентативные данные, показывающие, что M13 (конструкция 2) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) блокируют олигомер-индуцированную токсичность клеток N2a. См., например, Stine et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(13): 11612-11622 и Stine et al. (2011) Erik D. Roberson (ed.) Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia, Methods in Molecular Biology, vol. 670: 13-32. Клетки N2a дифференцировали при помощи сывороточного голодания на протяжении 48 ч перед обработкой. Олигомеры A $\beta$ 42 (2 мкМ) преинкубировали с конструкцией 2 и конструкцией 6 при 37°C на протяжении 3 ч перед добавлением к клетками N2a. Комплексы, соответствующие нулевому моменту времени ("ТО") не преинкубировали. Через 24 часа инкубации исследовали выделение аденилаткиназы ("АК"). Выделение АК в среду свидетельствует о смерти/лизисе клеток. Олигомеры A $\beta$ 42 были получены согласно описанию в Stine et al., 2011. Результаты свидетельствуют о том, что M13 и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc являются эффективными ингибиторами токсичных олигомеров.

Фиг. 33 иллюстрирует метод ловушки на фильтре, в котором сравниваются шесть концентраций волокон A $\beta$ 42 плюс или минус  $1 \times 10^{12}$ /мл M13 (конструкция 2); 80 и 800 нМ конструкции rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5); и 80 и 800 нМ rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6). Волокна A $\beta$ 42 инкубировали с Конструкциями 2, 5 и 6 при 37°C на протяжении 3 дней с последующей задержкой на фильтре. Фильтр проверяли при помощи mAb 6E10 (1:15000), которое распознает волокна A $\beta$ 42, захваченные фильтром. 800 нМ Конструкции 5 или Конструкции 6 соответствуют  $5 \times 10^{14}$ /мл конструкции 2 по молярной концентрации молекул. Результаты свидетельствуют о том, что конструкции 2, 5 и 6 эффективно дезагрегируют волокна  $\beta$ -амилоида.

На фиг. 34А и 34В представлены репрезентативные методы анализа, применяемые для определения количества M13 (конструкция 2), связанного с fA $\beta$ 42 после 3 ч преинкубации с ftau. 5 мкМ мономеров A $\beta$ 42, связанных с конструкцией 2, инкубировали в присутствии или отсутствии 4 концентраций ftau при 37°C на протяжении 3 ч. Так как fA $\beta$ :M13-Alexa488 осаждается, а ftau:M13-Alexa488 не осаждается, зафиксированное снижение флуоресценции осажденного материала свидетельствует о том, что ftau конкурирует за связывание fA $\beta$ . В данном случае количество M13-fA $\beta$ , образованного по истечению 3 ч, определяли, проводя количественный анализ флуоресценции Alexa488 в реакции конкурентного связывания при осаждении. Результаты свидетельствуют о том, что ftau способен конкурировать с M13-Alexa488 (конструкция 2) за связывание fA $\beta$ 42.

Фиг. 35 иллюстрирует результаты одного репрезентативного ППР-анализа, в котором исследовали

способность rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 4) связываться с ftau. Результаты свидетельствуют о том, что конструкция 4 эффективно связывает ftau.

Фиг. 36А и 36В иллюстрируют способность rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) дезагрегировать ftau. Волокна тау готовили путем разведения 40 мкМ содержащей повторы области связывания микротрубочек (MTBR) тау в 50 мМ супероксиддисмутазы (Sod). Различные концентрации конструкции 6 и полученного ftau инкубировали в ацетатном буфере при pH 7,0, 37°C на протяжении 72 ч. Флуоресценцию ThT записывали для 5-кратного избытка ThT. На фиг. 36А представлены результаты репрезентативного анализа ThT, демонстрирующие способность конструкции 6 дезагрегировать ftau. Фиг. 36В иллюстрирует другой репрезентативный эксперимент, подтверждающий способность конструкции 6 дезагрегировать тау. Фиг. 36А и 36В также иллюстрируют то, что дезагрегация ftau конструкцией 6 является дозозависимой.

На фиг. 37А, 37В, 37С и 37D представлены репрезентативные эксперименты, демонстрирующие подавление агрегации A $\beta$  со стороны rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) и rs-g3p (N1N2) (конструкция 3) в течение времени. A $\beta$ 42 растворяли в ДМСО и разводили в ФСБ, содержащем NaN<sub>3</sub>. A $\beta$ 42 агрегировали при 37°C плюс или минус различные концентрации конструкции 3 и конструкции 6. Агрегацию A $\beta$ 42 определяли по ThT флуоресценции. Фиг. 37А иллюстрирует ДСН-ПААГ образцов. Фиг. 37В иллюстрирует результаты одного репрезентативного эксперимента. Фиг. 37С иллюстрирует результаты другого репрезентативного эксперимента. На фиг. 37D эти результаты обобщены.

На фиг. 38А и 38В представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) блокировать преобразование PrP в PrP-Sc. Конструкцию 6 и клеточные лизаты IgG подвергали ультрацентрифугированию для того, чтобы отделить растворимые (супернатант) и нерастворимые (осадок) компоненты PrP. Компоненты PrP визуализировали биохимическим путем с моноклональным антителом к PrP (6D11). В присутствии IgG происходит разделение PrP на растворимую и нерастворимую фракции. В присутствии конструкции 6 наблюдается ограниченное количество нерастворимого PrP. Данные приведены для n = 4.

На фиг. 39А и 39В представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) снижать накопление и агрегацию PrP<sup>Sc</sup> в клеточной культуре, моделирующей прионное заболевание. Фиг. 39А иллюстрирует биохимически разделенные нерасщепленные и ПК-расщепленные клеточные лизаты N2a22L<sup>Sc</sup> после обработки конструкцией 6 и IgG. Существенное снижение уровней PrP<sup>Sc</sup> четко наблюдается в клетках, обработанных возрастающими концентрациями конструкции 6. Приблизительно 50% снижения уровней PrP<sup>Sc</sup> достигали обработкой ~0,08 мкг/мл конструкции 6. Обработка 10 мкг/мл конструкции 6 приводит к снижению уровней PrP<sup>Sc</sup> до 5,725%, p<0,0001. Никаких видимых изменений уровней PrP<sup>Sc</sup> не наблюдали для клеток N2A22L<sup>Sc</sup>, обработанных 1 мкг/мл мышинового IgG. Для получения фиг. 39В рентгеновские снимки были последовательно оцифрованы и нормированы относительно результата для обработанных IgG клеток N2a22L<sup>Sc</sup> из того же пассажа, который полагали равным 100%. Данные по измерению плотности по ПК-расщепленным блотам затем анализировали в сравнении с аналогично блотированными нерасщепленными лизатами и выражали в виде процентного изменения PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>C</sup>. Данные приведены для n = 4.

На фиг. 40 представлены результаты эксперимента, в котором исследовали два белка слияния rs-g3p (N1N2)-IgG в отношении их влияния на уровни синаптофизина в гиппокампе в трансгенной мышинной модели болезни Альцгеймера после обработки rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6). Обе конструкции существенно повышали уровень синаптофизина в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера.

На фиг. 41 представлены результаты эксперимента, в котором исследовали два белка слияния rs-g3p (N1N2)-IgG в отношении их влияния на уровни Iba-1 в гиппокампе в трансгенной мышинной модели болезни Альцгеймера после обработки rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6). Обе конструкции существенно повышали уровень Iba-1 в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера.

На фиг. 42 представлены результаты эксперимента, в котором исследовали два белка слияния rs-g3p (N1N2)-IgG в отношении их влияния на уровни ГФКБ в гиппокампе в трансгенной мышинной модели болезни Альцгеймера после обработки rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6). Ни одна из конструкций не приводила к существенному изменению уровня ГФКБ в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера.

На фиг. 43 представлены результаты эксперимента по связыванию, проводимого для сравнения rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5) и rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6). Конструкции эффективно связываются с fA $\beta$  с одинаковыми значениями K<sub>D</sub> (~11).

Фиг. 44А и 44В иллюстрируют способность rs-g3p (N1N2) (конструкция 3) блокировать сборку тау. На фиг. 44А 1 мкМ тау инкубировали отдельно или совместно инкубировали с 1 мкМ конструкции 3 и анализировали при помощи ПЭМ через 5 дней. Конструкция 3 блокирует сборку тау. Фиг. 44В иллюстрирует результаты анализа флуоресценции ThT с применением ftau, инкубированного в присутствии или отсутствие 3 концентраций rs-g3p (N1N2) (конструкция 3). Конструкция 3 дозозависимо блокирует сборку

ку тау.

Фиг. 45 иллюстрирует схему эксперимента для анализа взаимодействия между fA $\beta$ 42 и gs-g3p (N1N2) (конструкция 3).

Фиг. 46 иллюстрирует результаты ЯМР-исследования для анализа взаимодействия между fA $\beta$ 42 и gs-g3p (N1N2) (конструкция 3). H обозначает водород, а D обозначает дейтерий. Водороды волокон A $\beta$  со временем заменяются дейтерием, а на скорость этого процесса влияет связывание конструкции 3 с волокнами. Результаты свидетельствуют о наличии взаимодействия между конструкцией 3 и fA $\beta$ 42 в остатках 17-22 и 33-40 fA $\beta$ 42.

Фиг. 47A, 47B, 47C и 47D иллюстрируют репрезентативные ПЭМ-фотографии дезагрегации конструкцией 3 сформированного fA $\beta$ 42 после инкубации на протяжении 744 ч. Фиг. 47A иллюстрирует один fA $\beta$ 42. Фиг. 47B иллюстрирует fA $\beta$ 42 плюс конструкция 3. Фиг. 47C иллюстрирует один fA $\beta$ 42 при большем увеличении по сравнению с фиг. 47A. Фиг. 47D иллюстрирует fA $\beta$ 42 плюс конструкция 3 при большем увеличении по сравнению с фиг. 47B.

Фиг. 48 иллюстрирует результаты репрезентативного ППП-анализа, демонстрирующие, что gs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) эффективно связывает ftau.

Фиг. 49A иллюстрирует результаты репрезентативного ThT-анализа, демонстрирующие способность конструкции 6 дезагрегировать ftau. Фиг. 49B иллюстрирует графическое представление эксперимента с фиг. 49A. Фиг. 49A и 49B также иллюстрируют, что дезагрегация ftau конструкцией 6 является дозозависимой.

На фиг. 50A представлено ППП-исследование связывания gs-g3p (If1-N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 8) с фибриллами A $\beta$ . Результаты демонстрируют, что конструкция 8 прочно связывает фибриллы A $\beta$  ( $K_D$  ~36 нМ). Фрагмент N1N2 g3p (не связанный с Fc-доменом) демонстрировал более слабое связывание ( $K_D$  ~36 нМ). На фиг. 50B представлены результаты анализа конкурентного связывания, демонстрирующие способность gs-g3p (If1-N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 8) связываться с fA $\beta$ 1-42. Фрагмент N1N2 g3p (не связанный с Fc-доменом) демонстрировал более слабое связывание.

Фиг. 51 иллюстрирует аминокислотное сравнение между If1 g3p (SEQ ID NO: 29) и fd g3p (SEQ ID NO: 30). Аминокислоты, являющиеся идентичными для If1 и fd в домене N1 g3p, затенены. Домен N1 выделен рамкой.

На фиг. 52A и 52B представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность gs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) существенно снижать отложение A $\beta$  и тау-волокон после прямой инъекции в головной мозг в *in vivo* модели болезни Альцгеймера. На фиг. 52A уровень A $\beta$  существенно снижен у мышей, которые получали конструкцию 6 по сравнению с контролем. На фиг. 52B уровень тау существенно снижен у мышей, которые получали конструкцию 6 по сравнению с контролем.

На фиг. 53A и 53B представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность gs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) оказывать лечебный эффект при БА в большей степени при систематическом введении, чем при прямой инъекции в головной мозг. Фиг. 53A и 53B иллюстрируют, что мыши с БА, которые получали конструкцию 6, обладают сниженной гиперактивностью по сравнению с мышами, которым вводили контрольный препарат.

На фиг. 54 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность gs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) оказывать лечебный эффект при БА в большей степени при систематическом введении, чем при прямой инъекции в головной мозг. Согласно фиг. 54 вращение у мышей с БА наблюдается реже в случае мышей, получавших конструкцию 6, по сравнению с контролем.

На фиг. 55 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность gs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) оказывать лечебный эффект при БА в большей степени при систематическом введении, чем при прямой инъекции в головной мозг. Согласно фиг. 55 прыжки в углу у мышей с БА наблюдаются реже в случае мышей, получавших конструкцию 6, по сравнению с контролем.

На фиг. 56 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие способность gs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) оказывать лечебный эффект при БА в большей степени при систематическом введении, чем при прямой инъекции в головной мозг. Согласно фиг. 56 мыши с БА, получавшие конструкцию 6, демонстрировали существенно больше спонтанных альтернатив при вхождении в рукава Y-образного лабиринта по сравнению с мышами, получавшими контрольный ФСБ.

#### Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO:	Конструкция
1	M13 g3p
2	fd g3p
3	fl g3p
4	консенсусная последовательность SEQ ID NO:1, 2 и 3
5	I2-2 g3p
6	Ike g3p
7	консенсусная последовательность SEQ ID NO: 5 и 6

8	If1 g3p
9	Аминокислоты Конструкции 4
10	ДНК Конструкции 1
11	Аминокислоты Конструкции 5
12	ДНК Конструкции 2
13	Аминокислоты Конструкции 6
14	fd N2
15	f1 N2
16	M13 N2
17	Ike N2
18	I2-2 N2
19	If1 N2
20	Аминокислоты Конструкции 3
21	GxFxGxF
22	KL VFF
23	Последовательность ДНК g3p-фрагмента Конструкции 3
24	Аминокислотная последовательность g3p-фрагмента Конструкции 3
25	His His His His His His
26	ДНК Конструкции 4
27	ДНК Конструкции 5
28	ДНК Конструкции 6
29	If1 g3p (Фиг. 51)
30	fd g3p (Фиг. 51)
31	Аминокислоты конструкции gs-g3p(If1-N1N2)-hIgG1-Fc "Конструкция 8"
32	ДНК конструкции gs-g3p(If1-N1N2)-hIgG1-Fc "Конструкция 8"
33	прямой праймер: AAAAAAGGGAATTCGATGGCTGAAACTGTTGAAAGTTG
34	обратный праймер: AAAAAACCATGGCACCGGAACAGAGCCAC

#### Описание вариантов реализации изобретения

В данном изобретении предложены белки слияния, которые содержат амилоидсвязывающий фрагмент g3p или его мутантную или вариантную форму. В отдельных вариантах реализации изобретения белки слияния согласно изобретению дополнительно содержат Fc-фрагмент константной области иммуноглобулина. В одном аспекте этих вариантов реализации изобретения белки слияния являются растворимыми. В другом аспекте этих вариантов реализации изобретения белки слияния снижают количество амилоида путем, например, дезагрегации и/или предотвращения или подавления агрегации амилоида (например, образования амилоидных бляшек). Белки слияния согласно изобретению связываются с амилоидом. В некоторых вариантах реализации изобретения белки слияния согласно изобретению устраняют и/или подавляют образование токсичных олигомеров.

В изобретении предложены фармацевтические составы из белков слияния согласно изобретению, а также их применение для связывания и снижения количества амилоида. Снижение количества амилоида включает в себя, например, дезагрегацию амилоида, предотвращение и/или подавление агрегации амилоида и устранение и/или подавление образования токсичных олигомеров. Также в объем изобретения входит применение составов для выявления отложений амилоида и диагностирования заболеваний и нарушений, которые характеризуются образованием амилоида.

#### Определения.

Термин "g3p", употребляемый сам по себе или в выражениях, таких как "полученный из g3p", относится к любому белку g3p нитевидного фага дикого типа или рекомбинантному (включая фрагменты, варианты и мутанты g3p). Данный термин не должен расцениваться как ограниченный g3p, полученным от любого конкретного нитевидного бактериофага. Например, термин "g3p" включает SEQ ID NO: 1 и родственные белки, проиллюстрированные на фиг. 2.

Термин "домен" обозначает область полипептида (включая белки), имеющую некоторый отличительный физический признак или функцию, включая, например, независимо свернутую структуру, состоящую из одного участка полипептидной цепи. Домен может содержать последовательность с отличительным физическим признаком полипептида или он может содержать фрагмент с отличительным физическим признаком, который сохраняет свои связывающие свойства (т.е. он может связываться со вторым доменом). Домен может быть ассоциирован с другим доменом. Другими словами, первый домен может естественным путем связываться со вторым доменом. Например, домен N2 g3p связывает F-фимбрии, а домен N1 g3p связывает ToIA.

Употребляемые в данном документе термины "амилоид", "амилоидные фибриллы" и "амилоидные волокна" представляют собой типовые термины для обозначения третичной структуры, которая образуется в результате агрегации любых нескольких различных белков и состоит из упорядоченно расположенных  $\beta$ -складчатых слоев, перпендикулярных к оси волокна. Sunde et al., J. Mol. Biol. (1997) 273:729-39. Одним из иллюстративных амилоидов является агрегат амилоида- $\beta$ , образующийся при болезни Аль-

цгеймера, который состоит из  $\beta$ -амилоидного пептида "A $\beta$ ", представляющего собой внутренние фрагменты из 39-43 аминокислот, отщепляемые от человеческого белка-предшественника амилоида (hAPP). Существуют короткие формы, такие как A $\beta$ 40, и длинные формы, такие как более фибриллогенная изоформа A $\beta$ -A $\beta$ 42. Другие иллюстративные амилоидные белки включают неправильно свернутый  $\alpha$ -синуклеин (связанный с болезнью Паркинсона), хантингтин (связанный с болезнью Хантингтона), тау (связанный с болезнью Альцгеймера) и аномальную конформацию прионного белка PrP<sup>Sc</sup>. Дополнительные примеры приведены в тексте описания и известны специалистам в данной области техники (см., например, Aguzzi (2010) и Eichner and Radford, *Mol. Cell.* (2011) 43:8-18). Таким образом, за исключением тех случаев, когда белок или пептид определен, применение терминов "амилоид", "амилоидные фибриллы" и "амилоидные волокна" не должно расцениваться как ограниченное любым конкретным белком или заболеванием.

Термин "амилоидсвязывающий фрагмент g3p" относится к фрагменту g3p, который обеспечивает возможность связывания с амилоидом. Термин "амилоидсвязывающий фрагмент g3p" также относится к мутантным и вариантным формам g3p, включая N-, C- или N- и C-терминальное усечение g3p, которое обеспечивает возможность связывания с амилоидом.

Термин " $\beta$ -амилоидный пептид" является синонимом терминам " $\beta$ -амилоидный пептид", "A $\beta$ P", "A $\beta$ A" и "A $\beta$ ". Все эти термины относятся к амилоидобразующему пептиду, происходящему из человеческого белка-предшественника амилоида (hAPP).

Белки слияния согласно изобретению или составы, содержащие эти белки слияния, описываемые как "дезагрегирующие" или "опосредующие дезагрегацию", снижают количество уже образованных агрегатов. Дезагрегацию можно оценить методом ловушки на фильтре. Wanker et al., *Methods Enzymol* (1999) 309:375-86. Метод ловушки на фильтре описан в данном документе и может быть применен как для выявления агрегатов, так и для мониторинга дезагрегации, опосредованной составами согласно изобретению. Дезагрегацию определяют по снижению удержания амилоида на фильтре, что проявляется в снижении окрашивания, при повышении концентрации вещества, вызывающего дезагрегацию.

В данном документе белок слияния или состав, который "снижает количество амилоида" или "снижает амилоидную нагрузку" выполняет одну из следующих функций: подавляет образование амилоида, приводит к дезагрегации амилоида, способствует выведению амилоида, подавляет агрегацию амилоида, блокирует и/или предотвращает образование токсичных амилоидных олигомеров и/или способствует выведению токсичных амилоидных олигомеров.

Любой из продуктов или составов согласно изобретению, описываемый как "защищающий нейроны от вредного действия амилоида", предотвращает накопление нового амилоида и/или предотвращает образование токсичных амилоидных олигомеров. Продукты или составы согласно изобретению, описываемые как "защищающие нейроны от вредного действия амилоида", можно принимать в профилактических целях. Защищает ли продукт или состав нейроны от вредного действия амилоида, можно определить при помощи анализа цитотоксичности нейрональной клеточной культуры, описанного в данном документе.

Употребляемые в данном документе термины "белок PrP", "PrP" и "прион" относятся к полипептидам, которые способны в соответствующих условиях индуцировать образование агрегатов, обуславливающих заболевания, связанные с неправильным сворачиванием белков. Например, нормальный клеточный прионный белок (PrP<sup>C</sup>) преобразуется в таких условиях в соответствующую скрепи-изоформу (PrP<sup>Sc</sup>), которая обуславливает заболевания, такие как, без ограничений, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭКРС) или синдром коровьего бешенства, губчатая энцефалопатия кошачьих, куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера (ГШШ) и фатальная семейная бессонница (ФСБ).

Термин "вариант" ("вариантная форма"), употребляемый в данном документе в сочетании с белком слияния или амилоидсвязывающим фрагментом g3p-части белка слияния, относится к соответствующей аминокислотной последовательности, которая содержит, по меньшей мере, аминокислотное отличие (замену, вставку или делецию) по сравнению со стандартным веществом. В определенных вариантах реализации изобретения "вариант" характеризуется высокой степенью гомологии аминокислотной последовательности и/или содержит консервативные аминокислотные замены, делеции и/или вставки по сравнению со стандартной последовательностью. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант содержит не более 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотного отличия по сравнению со стандартной последовательностью. "Консервативная замена" относится к такому замещению первой аминокислоты второй аминокислотой, которое не приводит к существенному изменению химических, физических и/или функциональных свойств белка, полипептида или аминокислотной последовательности, например, как в случае белка g3p или амилоидсвязывающего фрагмента g3p (например, белок g3p или амилоидсвязывающий фрагмент сохраняет те же самые заряд, структуру, полярность, гидрофобность/гидрофильность и/или сохраняет функции, такие как способность распознавать, связывать и/или снижать количество амилоида). Такие консервативные аминокислотные модификации основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например их гидрофобности, гидрофиль-

ности, заряда, размера и тому подобного. Иллюстративные консервативные замены, в которых учитываются различные вышеприведенные характеристики, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; а также валин, лейцин и изолейцин. Термины "вариант g3p" или "вариант амилоидсвязывающего фрагмента g3p" также включают полипептиды, обладающие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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% идентичности в аминокислотной последовательности с g3p дикого типа или его соответствующим фрагментом.

Термин "мутант" ("мутантная форма") относится к белку слияния или к амилоидсвязывающему фрагменту g3p белка слияния, в который была введена мутация в одной или более аминокислотах с целью модуляции его терапевтического или диагностического действия. В определенных вариантах реализации изобретения мутант содержит замену, делецию и/или вставку в аминокислоте, в отношении которой известно, что она взаимодействует с амилоидом. В других вариантах реализации изобретения мутант содержит замену, делецию и/или вставку в аминокислоте, которая является консервативной аминокислотой, присутствующей в g3p дикого типа или его амилоидсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах реализации изобретения мутант содержит не более 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотного отличия по сравнению со стандартной последовательностью. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные замены являются консервативными заменами. Термины "вариант" и "мутант" употребляются в данном документе взаимозаменяемо, однако "вариант", как правило, имеет нерекомбинантную природу, в то время как "мутант", как правило, является рекомбинантным. Термины "мутант g3p" или "мутант амилоидсвязывающего фрагмента g3p" также включают полипептиды, обладающие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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% идентичности в аминокислотной последовательности с g3p дикого типа или его соответствующим фрагментом.

"Белок слияния" представляет собой белок неестественного происхождения, содержащий по меньшей мере два полипептидных домена. Белки слияния согласно изобретению содержат амилоидсвязывающий фрагмент g3p, связанный, слитый или конъюгированный со вторым белком или полипептидом. В конкретных вариантах реализации изобретения белки слияния содержат амилоидсвязывающий фрагмент g3p и Fc-фрагмент иммуноглобулина.

Термины "активное соединение", "активное вещество" и "активный ингредиент" взаимозаменяемо употребляются в данном документе для обозначения части белка слияния, которая обуславливает биологическую активность белка слияния. g3p часть белков слияния согласно изобретению является "активным соединением", "активным веществом" или "активным ингредиентом". Аналогично, g3p часть белков слияния согласно изобретению является биологически активной или терапевтически эффективной частью. g3p часть белка слияния согласно настоящему изобретению не используют для того, чтобы она способствовала сворачиванию белка партнера по слиянию, который впоследствии действует как терапевтическое вещество, не связанное с g3p, как описано в WO 2004/018685. Аналогично, белки слияния согласно изобретению не используют для фагового дисплея, как описано в US 2009/105090.

Термин "иммуногенный" употребляется в данном документе для обозначения способности состава вызывать иммунный ответ у млекопитающих, к которым был применен данный состав.

Упомянутая в данном документе "конструкция 1" получена из M13 дикого типа (см. файл Genbank: NC\_003287.2, версия GI:56718463. По сравнению с M13 дикого типа в конструкции 1 Ser378(AGC) заменен на Gly(GGC), а Ile87 (ATT) заменен на Asn(AAC)). Таким образом, в то время как в M13 дикого типа в номере 2710 нуклеиновой кислоты находится "G", в конструкции 1 в этой позиции находится "A". Аналогично, в M13 дикого типа в номере 4479 нуклеиновой кислоты находится "A", в конструкции 1 в этой позиции находится "T". И наконец, в M13 дикого типа в номере 4480 нуклеиновой кислоты находится "C", в то время как в конструкции 1 в этой позиции находится "T". Конструкция 1 содержит нуклеиновые кислоты из SEQ ID NO: 10.

"Конструкция 2" представляет собой изолят M13 дикого типа (GenBank JX412914.1).

Конструкция 2 содержит нуклеиновые кислоты из SEQ ID NO: 12.

"Конструкция 3" представляет собой рекомбинантный растворимый фрагмент g3p, содержащий домены N1 и N2 g3p (rs-g3p(N1N2)), содержащие аминокислоты из SEQ ID NO: 20.

"Конструкция 4" представляет собой белок слияния из рекомбинантного растворимого фрагмента g3p и IgG4 Fc (rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc), содержащий аминокислоты из SEQ ID NO: 9. N1N2 область "конструкции 4" получена из N1N2 области "конструкции 1". Нуклеотидная последовательность, кодирующая "конструкцию 4", приведена в SEQ ID NO: 26.

Первая 21 аминокислота, приведенная в SEQ ID NO: 9, представляет сигнальную последовательность, которая отщепляется между аминокислотами 20 и 21 во время процесса рекомбинации. Метионин в аминокислоте 21 в SEQ ID NO: 9 является артефактом клонирования (кодируемым сайтом множественного клонирования, используемым для сшивания сигнальной последовательности с последовательностью N1-N2) и тоже иногда отщепляется во время рекомбинации. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 9 соответствует N-терминальной аминокислоте g3p, выделенного из фага M13. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 9 тоже иногда отщепляется во время рекомбинации. С-терминальный лизин в аминокислоте 506 в SEQ ID NO: 9 тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации в эукариотических клетках. Продукты, содержащие одну или более из определенных выше N- и С-терминальных делеций, являются частью настоящего изобретения.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p, описываемый как "конструкция 4", представляет собой "зрелую форму конструкции 4" и содержит аминокислоты 21-506 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-506 из SEQ ID NO: 9 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 4 с удаленным Met"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-506 из SEQ ID NO: 9 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 4 с удаленными Met и Ala"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 21-505 из SEQ ID NO: 9 ("С-терминальная зрелая форма конструкции 4 с удаленным Lys"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-505 из SEQ ID NO: 9 ("N-терминальная с удаленным Met, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 4"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-505 из SEQ ID NO: 9 ("N-терминальная с удаленными Met и Ala, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 4").

Аналогично, нуклеиновые кислоты, кодирующие полноразмерную, N-, С- и N- и С-терминальные усеченные формы конструкции 4, как описано в данном документе, входят в объем изобретения. В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, содержит нуклеотиды из SEQ ID NO: 26. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, представляет собой часть SEQ ID NO: 26, которая кодирует часть g3p или часть g3p-Ig, за исключением нуклеотидов, кодирующих сигнальную последовательность (т.е. за исключением нуклеотидов, кодирующих аминокислоты 1-20, 1-22 или 1-23 из SEQ ID NO: 9).

"Конструкция 5" представляет собой белок слияния из рекомбинантного растворимого фрагмента g3p и IgG4 Fc (rs-g3p (N1N2)-hIgG4-Fc), содержащий аминокислоты из SEQ ID NO: 11. N1N2 область "конструкции 5" получена из N1N2 области "конструкции 2". Нуклеотидная последовательность, кодирующая "конструкцию 5", приведена в SEQ ID NO: 27.

Первая 21 аминокислота, приведенная в SEQ ID NO: 11, представляет сигнальную последовательность, которая отщепляется между аминокислотами 20 и 21 во время процесса рекомбинации. Метионин в аминокислоте 21 в SEQ ID NO: 11 является артефактом клонирования (кодируемым сайтом множественного клонирования, используемым для сшивания сигнальной последовательности с последовательностью N1-N2) и тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 11 соответствует N-терминальной аминокислоте g3p, выделенного из фага M13. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 11 тоже иногда отщепляется во время рекомбинации. С-терминальный лизин в аминокислоте 506 в SEQ ID NO: 11 тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. Продукты, содержащие одну или более из определенных выше N- и С-терминальных делеций, являются частью настоящего изобретения.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, описываемый как "конструкция 5", представляет собой "зрелую форму конструкции 5" и содержит аминокислоты 21-506 из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-506 из SEQ ID NO: 11 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 5 с удаленным Met"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-506 из SEQ ID NO: 11 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 5 с удаленными Met и Ala"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 21-505 из SEQ ID NO: 11 ("С-терминальная зрелая форма конструкции 5 с удаленным Lys"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-505 из SEQ ID NO: 11 ("N-терминальная с удаленным Met, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 5"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-505 из SEQ ID NO: 11 ("N-терминальная с удаленными Met и Ala, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 5").

Аналогично, нуклеиновые кислоты, кодирующие полноразмерную, N-, С- и N- и С-терминальные усеченные формы конструкции 5, как описано в данном документе, входят в объем изобретения. В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, содержит нуклеотиды из SEQ ID NO: 27. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, представляет собой часть SEQ ID NO: 27, которая кодирует часть g3p или часть g3p-Ig, за исключением нуклеотидов, кодирующих сигнальную последовательность (т.е. за исключением нуклеотидов, кодирующих аминокислоты 1-20, 1-22 или 1-23 из SEQ ID NO: 11).

"Конструкция 6" представляет собой белок слияния из рекомбинантного растворимого фрагмента g3p и IgG1 Fc (rs-g3p (N1N2)-hIgG1-Fc), содержащий аминокислоты из SEQ ID NO: 13. N1N2 область "конструкции 6" получена из N1N2 области "конструкции 2". Нуклеотидная последовательность, кодирующая "конструкцию 6", приведена в SEQ ID NO: 28.

Первая 21 аминокислота, приведенная в SEQ ID NO: 13, представляет сигнальную последовательность, которая отщепляется между аминокислотами 20 и 21 во время процесса рекомбинации. Метионин в аминокислоте 21 в SEQ ID NO: 13 является артефактом клонирования (кодируемым сайтом множественного клонирования, используемым для сшивания сигнальной последовательности с последовательностью N1-N2) и тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 13 соответствует N-терминальной аминокислоте g3p, выделенного из фага M13. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 13 тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. С-терминальный лизин в аминокислоте 509 в SEQ ID NO: 13 тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. В процессе рекомбинантного получения антител и ассоциированных белков слияния довольно часто проводят удаление С-терминального лизина (J. Lou et al., *Biotechnol Bioeng* 2012 Sep;109(9):2306-15). Продукты, содержащие одну или более из определенных выше N- и С-терминальных делеций, являются частью настоящего изобретения.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p, описываемый как "конструкция 6", представляет собой "зрелую форму конструкции 6" и содержит аминокислоты 21-509 из SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-509 из SEQ ID NO: 13 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 6 с удаленным Met"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-509 из SEQ ID NO: 13 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 6 с удаленными Met и Ala"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 21-508 из SEQ ID NO: 13 ("С-терминальная зрелая форма конструкции 6 с удаленным Lys"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-508 из SEQ ID NO: 13 ("N-терминальная с удаленным Met, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 6"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-508 из SEQ ID NO: 13 ("N-терминальная с удаленными Met и Ala, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 6").

Аналогично, нуклеиновые кислоты, кодирующие полноразмерную, N-, С- и N- и С-терминальные усеченные формы конструкции 6, как описано в данном документе, входят в объем изобретения. В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, содержит нуклеотиды из SEQ ID NO: 28. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, представляет собой часть SEQ ID NO: 28, которая кодирует часть g3p или часть g3p-Ig, за исключением нуклеотидов, кодирующих сигнальную последовательность (т.е. за исключением нуклеотидов, кодирующих аминокислоты 1-20, 1-22 или 1-23 из SEQ ID NO: 13).

"Конструкция 8" представляет собой белок слияния из рекомбинантного растворимого фрагмента g3p и IgG1 Fc (rs-g3p(Ifl N1N2)-hIgG1-Fc), содержащий аминокислоты из SEQ ID NO: 31. g3p области "конструкции 8" получены из Ifl. Нуклеотидная последовательность, кодирующая "конструкцию 8", приведена в SEQ ID NO: 32.

SEQ ID NO: 31 приведена ниже и содержит аминокислоты конструкции 8. Домен g3p N1 получен из Ifl за исключением того, что конкретный фаг Ifl содержит замену цистеина (C) на триптофан (W), на что указывает выделение цветом/рамка ниже по тексту, и, как показано ниже, первая 21 аминокислота соответствует секреторной последовательности IL2, которая является частью pFUSE Ig-слитого вектора от InvivoGen. Следующая группа аминокислот выделена жирным текстом и подчеркиванием и соответствует домену g3p N1 из Ifl. Следует отметить, что аминокислотная замена C→W выделена цветом и рамкой. Следующая группа аминокислот, выделенная подчеркиванием, представляет линкерную последовательность, которая находится между доменами N1 и N2 g3p Ifl. Домен g3p N2 из Ifl выделен курсивом. За доменом g3p N2 следует вторая линкерная последовательность, которая в Ifl соединяет домены N2 и N3 (выделена курсивом и подчеркиванием). И наконец, выделенные жирным текстом, курсивом и подчеркиванием аминокислоты представляют последовательности IgG1-Fc из вектора pFUSE.

MYRMQLLSICIALSLALVTNS MATTDAECLSKPAFDGTL SNVW  
KEGDSRYANFENCIYELSGIGIGYDNDTS WNGHWTPVRAAD  
GSGNGGDDNSSGGGSNGDSGNNSTPDTVTPGQTVNLPSDLSTL  
SIPANVVKSDSIGSQFSLYTNASCTMCSGYL SNNADSIANITET  
VKADYNQPD MWFEQTDSDGNHVKILQNSYKAVSYNVE SKQSDVN  
NPTYINYSYSVNVKQVSYDTSNVCIMNWETFQNKCDASRAVLITD  
TVTPSYSRNITIQSNINYOGSNGSGGSGGSGGSGGSG AMVRSDKTHTC  
PPCAPPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDV SHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGOPREPOVYTLPPS  
REEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSV MHEALHNHYTOK  
SLSLSPGK (SEQ ID NO:31 (Аминокислоты Конструкции 8))

Первая 21 аминокислота, приведенная в SEQ ID NO: 31, представляет сигнальную последовательность, которая отщепляется между аминокислотами 20 и 21 во время процесса рекомбинации. Метионин в аминокислоте 21 в SEQ ID NO: 31 является артефактом клонирования (кодируемым сайтом множественного клонирования, используемым для сшивания сигнальной последовательности с последовательностью N1-N2) и тоже иногда отщепляется во время рекомбинации. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 31 соответствует N-терминальной аминокислоте g3p, выделенного из фага M13. Аланин в аминокислоте 22 в SEQ ID NO: 31 тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. С-терминальный лизин в аминокислоте 528 в SEQ ID NO: 31 тоже иногда отщепляется во время процесса рекомбинации. В процессе рекомбинантного получения антител и ассоциированных белков слияния довольно часто проводят удаление С-терминального лизина (J. Lou et al., Biotechnol Bioeng 2012 Sep;109(9):2306-15). Продукты, содержащие одну или более из определенных выше N- и С-терминальных делеций, являются частью настоящего изобретения.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p, описываемый как "конструкция 8", представляет собой "зрелую форму конструкции 8" и содержит аминокислоты 21-528 из SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-528 из SEQ ID NO: 31 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 8 с удаленным Met"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-528 из SEQ ID NO: 31 ("N-терминальная зрелая форма конструкции 8 с удаленными Met и Ala"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 21-527 из SEQ ID NO: 31 ("С-терминальная зрелая форма конструкции 8 с удаленным Lys"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 22-527 из SEQ ID NO: 31 ("N-терминальная с удаленным Met, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 8"). В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит аминокислоты 23-527 из SEQ ID NO: 31 ("N-терминальная с удаленными Met и Ala, С-терминальная с удаленным Lys зрелая форма конструкции 8"). Нуклеотидная последовательность, кодирующая "конструкцию 8", приведена в SEQ ID NO: 32.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие полноразмерную, N-, С- и N- и С-терминальные усеченные формы конструкции 8, как описано в данном документе, входят в объем изобретения. В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, содержит нуклеотиды из SEQ ID NO: 32. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p, представляет собой часть SEQ ID NO: 32, которая кодирует часть g3p или часть g3p-Ig, за исключением нуклеотидов, кодирующих сигнальную последовательность (т.е. за исключением нуклеотидов, кодирующих аминокислоты 1-20, 1-22 или 1-23 из SEQ ID NO: 31).

Конструкции 4, 5, 6 и 8, а также их мутантные и вариантные формы, являются иллюстративными белками слияния g3p согласно изобретению.

#### **Белки слияния g3p**

Белки слияния g3p согласно изобретению содержат амилоидсвязывающий фрагмент g3p, который является активным веществом, активным ингредиентом, активным соединением, биологически активной частью, терапевтически эффективной частью и/или фармацевтически эффективной частью каждого продукта слияния. Белки слияния, содержащие мутант, вариант или фрагмент g3p, входят в объем данного изобретения. В одном аспекте белок слияния g3p содержит фрагмент g3p, который связывается с амилоидом. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p согласно изобретению содержит домен N1N2 g3p или его мутант, вариант или фрагмент, при этом амилоидсвязывающий фрагмент g3p связан, слит, конъюгирован, соединен или ассоциирован по меньшей мере с одним отличным от g3p белком. В конкретных вариантах реализации изобретения отличный от g3p белок является Fc-фрагментом иммуноглобулина. g3p часть белка слияния не используют для того, чтобы она способствовала сворачиванию белка терапевтически функционального партнера по слиянию, как описано в WO 2004/018685, или для фагового дисплея, как описано в US 2009/105090.

В других аспектах белок слияния содержит полипептид g3p, который связывается с амилоидом и

содержит домен N2 g3p или его мутант, вариант или фрагмент, при этом амилоидсвязывающий фрагмент g3p связан, слит, конъюгирован, соединен или ассоциирован по меньшей мере с одним отличным от g3p белком. В конкретных вариантах реализации изобретения отличный от g3p белок является Fc-фрагментом иммуноглобулина. В других аспектах белок слияния содержит полипептид g3p, который связывается с амилоидом и содержит домен N1N2 g3p, при этом домен N2 g3p содержит мутант, вариант или фрагмент N2 g3p, который стабилизирует домен N1 g3p или иным образом располагает домен N1 g3p в такой конформации, которая способствует связыванию g3p.

g3p-часть белка слияния связана, слита, конъюгирована, соединена или ассоциирована по меньшей мере с одним дополнительным белком или белковым доменом, с которым она обычно не ассоциируется. В определенных вариантах реализации изобретения отличная от g3p часть белка слияния g3p согласно изобретению содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина. В одном варианте реализации изобретения белок слияния представляет собой белок слияния g3p, который содержит амилоидсвязывающий фрагмент g3p, связанный со вторым доменом, содержащим Fc-фрагмент иммуноглобулина. В другом варианте реализации изобретения белок слияния состоит из амилоидсвязывающего фрагмента белка g3p, связанного с Fc-фрагментом иммуноглобулина. Как отмечалось, некоторые белки слияния согласно изобретению содержат мутированный или вариантный амилоидсвязывающий фрагмент g3p, такой как мутированный или вариантный домен N1N2 или N2, который связывает амилоидные волокна. Таким образом, белки слияния, содержащие такие мутированные или вариантыные формы, также являются частью данного изобретения.

Амилоидсвязывающий фрагмент g3p и полипептид, являющийся партнером по слиянию, могут быть частью непрерывной аминокислотной последовательности, в которой полипептид, являющийся партнером по слиянию, связан прямо или посредством короткого пептидного линкера с N-концом или C-концом g3p или полипептидом амилоидсвязывающего фрагмента. В таких случаях амилоидсвязывающий фрагмент g3p и полипептид, являющийся партнером по слиянию, могут транслироваться в один полипептид с кодирующей последовательности, которая кодирует и амилоидсвязывающий фрагмент g3p, и полипептид, являющийся партнером по слиянию.

А. G3p-части белков слияния g3p.

G3p содержит два аминокислотных терминальных домена - N1 и N2, которые взаимодействуют с образованием комплекса N1-N2, и один карбокситерминальный домен - N3 (также называемый "СТ"). Шарнирная область создает возможность открытия и закрытия между N1 и N2. Иногда шарнирную область считают частью N2, однако в других источниках ее рассматривают как отдельный элемент. N1 и N2 также соединены посредством гибкой богатой лейцином линкерной последовательности. В N1 присутствуют два дисульфидных мостика между Cys7 и Cys36 и между Cys46 и Cys53. Один дисульфидный мостик присутствует в N2 между Cys188 и Cys201. В карбокситерминальном домене присутствует дисульфидный мостик между Cys354 и Cys371. Marvin, 1998. В g3p нет междоменных дисульфидных мостиков.

Примеры амилоидсвязывающих фрагментов g3p включают домен N2 как с шарнирной областью, так и без шарнирной области; а также домены N1-N2, с или без промежуточной линкерной последовательности и с или без шарнирной области. В любом из вышеприведенных примеров фрагменты N2 или N1N2 могут представлять собой N2 или N1N2, которые можно обнаружить у нитевидного бактериофага дикого типа или рекомбинантные N2 или N1N2. В любом из вышеприведенных примеров фрагменты N2 или N1N2 могут представлять собой мутантные или вариантыные формы последовательности нитевидного бактериофага дикого типа.

Первичная структурная последовательность N2 от fd, f1, M13, Ike, I2-2 и If1 проиллюстрирована на фиг. 26. Аминокислоты fd приведены в SEQ ID NO: 14; f1 - в SEQ ID NO: 15; M13 - в SEQ ID NO: 16; Ike - в SEQ ID NO: 17; I2-2 - в SEQ ID NO: 18 и If1 - в SEQ ID NO: 19. Используя в качестве руководства указанную фигуру и последовательность, один вариант реализации изобретения включает в себя белок слияния g3p, содержащий полипептид g3p, который связывается с амилоидом и содержит домен N2 g3p или фрагмент домена N2 g3p. В некоторых аспектах домен N2 g3p стабилизирует амилоидсвязывающие части g3p в составе. Любой белок слияния g3p, содержащий домены N2 g3p, включает мутанты, варианты и фрагменты N2 g3p. Фрагмент N2 g3p представляет собой любой полноразмерный домен N2 g3p, содержащий по меньшей мере одно усечение в одном или в обоих из N- или C-концов. Примерами полипептидов N2 g3p являются аминокислоты из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 или 19, а также их фрагменты, варианты и мутанты.

Первичная структурная последовательность fd, f1 и M13 проиллюстрирована на фиг. 2А, а Ike, I2-2 и If1 - на фиг. 2В. Используя в качестве руководства указанную последовательность, один вариант реализации изобретения включает в себя белок слияния, содержащий полипептид g3p, который связывается с амилоидом и содержит домен N1N2 g3p или фрагмент домена N1N2 g3p. Белок слияния g3p, содержащий домены N1N2 g3p, включает мутанты, варианты и фрагменты N1N2 g3p. Фрагмент N1N2 g3p представляет собой любой полноразмерный N1N2 g3p, содержащий по меньшей мере одно усечение в одном или в обоих из N- или C-концов. Примерами полипептидов N1N2 g3p являются аминокислоты из любой из SEQ ID NO: 1-9, 11, 13, 20, 24 и 29-31, их фрагменты, варианты и мутанты.

В. Отличные от g3p части белков слияния g3p.

Белки слияния согласно данному изобретению могут содержать Fc-фрагмент константной области иммуноглобулина в качестве второго домена. Белки слияния, состоящие из константных областей иммуноглобулина, связанных с представляющим интерес белком или его фрагментом, были описаны (см., например, патенты США №№ 5480981 и 5808029; Gascoigne et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936; Capon et al. 1989, Nature 337:525; Traunecker et al. 1989, Nature 339:68; Zettmeissl et al. 1990, DNA Cell Biol. USA 9:347; Byrn et al. 1990, Nature 344:667; Watson et al. 1990, J. Cell. Biol. 110:2221; Watson et al. 1991, Nature 349:164; Aruffo et al. 1990, Cell 61:1303; Linsley et al. 1991, J. Exp. Med. 173:721; Linsley et al. 1991, J. Exp. Med. 174:561; Stamenkovic et al., 1991, Cell 66:1133; Ashkenazi et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Lesslauer et al. 1991, Em. J. Immunol. 27:2883; Peppel et al. 1991, J. Exp. Med. 174:1483; Bennett et al. 1991, J. Biol. Chem. 266:23060; Kurschner et al. 1992, J. Biol. Chem. 267:9354; Chalupny et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10360; Ridgway and Gorman, 1991, J. Cell. Biol. 115, Abstract No. 1448; Zheng et al. 1995, J. Immun. 154:5590). Эти молекулы обычно обладают как биологической активностью, ассоциируемой с представляющей интерес связанной молекулой, так и эффекторной функцией, или некоторыми другими необходимыми характеристиками, ассоциируемыми с константной областью иммуноглобулина (например, биологической стабильностью, клеточной секрецией).

Экспрессионные кассеты Fc можно приобрести на коммерческом основании. Fc-фрагмент может состоять из доменов CH2 и CH3 иммуноглобулина и шарнирной области иммуноглобулина. Fc-фрагмент может представлять собой Fc-фрагмент IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном конкретном варианте реализации изобретения часть константной области иммуноглобулина представляет собой Fc-фрагмент IgG1. В другом варианте реализации изобретения часть константной области иммуноглобулина представляет собой Fc-фрагмент IgG4. В другом варианте реализации изобретения часть константной области иммуноглобулина представляет собой Fc-фрагмент IgM.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения рекомбинантный растворимый амилоидсвязывающий фрагмент g3p слит с Fc-доменом иммуноглобулина при помощи стандартных методов молекулярной биологии. Рекомбинантный растворимый амилоидсвязывающий фрагмент g3p может быть мутированным или вариантным. Например, амилоидсвязывающий фрагмент g3p, такой как домен N1N2 или домен N2, можно клонировать в IgGFc-слитый экспрессионный вектор. Иллюстративные IgGFc-слитые векторы включают, например, один из векторов rFUSE-Fc, предоставляемых InvivoGen. В некоторых вариантах реализации изобретения полученный в результате бивалентный белок слияния (например, g3p(N1N2)-IgGFc или g3p(N2)-IgGFc) будет обладать более высокой авидностью к амилоиду, чем рекомбинантный растворимый g3p, вследствие своей бивалентности.

В других вариантах реализации изобретения белок слияния содержит по меньшей мере два амилоидсвязывающих фрагмента g3p. В других вариантах реализации изобретения белок слияния содержит три или более амилоидсвязывающих фрагмента g3p. В других вариантах реализации изобретения белок слияния содержит пять амилоидсвязывающих фрагментов g3p. Такие димерные и мультимерные белки слияния обеспечивают более высокоавидное взаимодействие, так как они содержат более одного амилоидсвязывающего фрагмента g3p.

В определенных вариантах реализации изобретения белок слияния содержит альбумин. См., например, патент США № 6686179.

С. Иллюстративные белки слияния g3p согласно изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния содержит амилоидсвязывающий фрагмент g3p и второй домен, содержащий отличный от g3p белок, такой как, например, Fc-фрагмент иммуноглобулина. Первый домен, содержащий амилоидсвязывающий фрагмент g3p, является активным ингредиентом и обеспечивает терапевтическую биологическую активность белка слияния. В некоторых аспектах g3p-часть белка слияния содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична g3p-части SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31 или любых из описанных в данном документе N, C или N и C-терминальных усеченный SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В одном аспекте этого варианта реализации изобретения g3p-часть белка слияния содержит аминокислотную последовательность, которая идентична g3p-части SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В других вариантах реализации g3p-часть может быть мутантом, вариантом или фрагментом по сравнению с любой g3p-частью, приведенной в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:31, и способна связываться с амилоидом. В другом аспекте белок слияния выбран из аминокислот 21-506 из SEQ ID NO: 9, аминокислот 22-506 из SEQ ID NO: 9, аминокислот 23-506 из SEQ ID NO: 9, аминокислот 21-505 из SEQ ID NO: 9, аминокислот 22-505 из SEQ ID NO: 9, аминокислот 23-505 из SEQ ID NO: 9, аминокислот 21-506 из SEQ ID NO: 11, аминокислот 22-506 из SEQ ID NO: 11, аминокислот 23-506 из SEQ ID NO: 11, аминокислот 21-505 из SEQ ID NO: 11, аминокислот 22-505 из SEQ ID NO: 11, аминокислот 23-505 из SEQ ID NO: 11, аминокислот 21-509 из SEQ ID NO: 13, аминокислот 22-509 из SEQ ID NO: 13, аминокислот 23-509 из SEQ ID NO: 13, аминокислот 21-508 из SEQ ID NO: 13, аминокислот 22-508 из SEQ ID NO: 13, аминокислот 23-508 из SEQ ID NO: 13, аминокислот 21-528 из SEQ ID NO: 31, аминокислот 22-528 из SEQ ID NO: 31, аминокислот 23-528 из SEQ ID NO: 31, аминокислот 21-527 из SEQ ID

NO: 31, аминокислот 22-527 из SEQ ID NO: 31 или аминокислот 23-527 из SEQ ID NO: 31, или является мутантом или вариантом любого из этих белков слияния.

В другом аспекте g3p-часть белка слияния представляет собой мутантную форму g3p, которая содержит аминокислотную последовательность, которая содержит от 1 до 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей g3p-частью любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31, при этом белок слияния является менее иммуногенным для человека, чем его немодифицированный аналог. В некоторых аспектах этих вариантов реализации изобретения белок слияния содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей g3p-частью любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В других аспектах белок слияния содержит от 1 до 5 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей g3p-частью любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В других аспектах аминокислотные замены присутствуют в g3p-части белка слияния (например, аминокислоты от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 9, аминокислоты от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 11, аминокислоты от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 13 или аминокислоты от 21, 22 или 23 до 296 из SEQ ID NO: 31).

В других вариантах реализации изобретения менее иммуногенный белок слияния представляет собой вариант аминокислот от 21, 22 или 23 до 505 или 506 из SEQ ID NO: 9, аминокислот от 21, 22 или 23 до 505 или 506 из SEQ ID NO: 11, аминокислот от 21, 22 или 23 до 508 или 509 из SEQ ID NO: 13 или аминокислот от 21, 22 или 23 до 527 или 528 из SEQ ID NO: 31, при этом вариант отличается от приведенной аминокислотной последовательности только тем, что содержит от 1 до 20 аминокислотных замен в области аминокислот от 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 9, аминокислот от 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 11, аминокислот от 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 13 или аминокислот от 22 или 23 до 296 из SEQ ID NO: 31 соответственно. В некоторых аспектах этих вариантов реализации изобретения белок слияния содержит от 1 до 10 аминокислотных замен. В других аспектах белок слияния содержит от 1 до 5 аминокислотных замен.

Упомянутые выше менее иммуногенные белки слияния можно определить при помощи хорошо известных деиммунизационных способов. Как правило, проводят скрининг g3p-частей белков слияния для определения того, где они содержат эпитопы Т-клеток. Такие потенциальные эпитопы Т-клеток обычно определяют как любую последовательность аминокислотных остатков, обладающую способностью связывать молекулы МНС класса II. В других вариантах реализации изобретения проводят скрининг всего белка слияния на предмет эпитопов Т-клеток.

В данной области техники были предложены способы, позволяющие определять эпитопы Т-клеток при помощи компьютерного сканирования на предмет распознаваемых мотивов последовательностей в экспериментально определенных эпитопах Т-клеток, или в другом варианте, применения компьютерных технологий для прогнозирования пептидов, связывающих МНС класса II, и, в частности, DR-связывающих пептидов. Например, в WO 98/52976 и WO 00/34317 предложены методы компьютерной обработки для определения полипептидных последовательностей, которые потенциально могут связывать подгруппу DR-аллотипов МНС класса II человека. В WO 08/044032 предложен метод скрининга первичной аминокислотной последовательности по базе данных известных эпитопов Т-клеток для определения эпитопов Т-клеток в этой последовательности.

В другом варианте пептидные части белка, подлежащего деиммунизации (например, g3p-части SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13), можно синтезировать и исследовать методом компьютерного моделирования или клеточного анализа *in vivo* для того, чтобы определить, связываются ли они с молекулами МНС (см., например, патент США 7208147).

После определения эпитопов Т-клеток для снижения иммуногенности проводят целесообразную аминокислотную замену в пределах первичной последовательности g3p-части белка слияния согласно изобретению. Затем проводят повторный скрининг этих спрогнозированных деиммунизированных мутантов g3p-части SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 31 на предмет активности и иммуногенности для определения тех, которые сохраняют активность, но обладают пониженной иммуногенностью или не иммуногенны вообще по сравнению с g3p-частью любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13. Как правило, это требует проведения замены от 1 до около 20 аминокислот.

Во всех случаях амилоидсвязывающий фрагмент g3p в слитом белке согласно изобретению включает мутантные и варианты формы.

В общем случае белки слияния связываются с амилоидом, по меньшей мере, с той же эффективностью, что и соответствующий несвязанный амилоидсвязывающий фрагмент g3p. При применении белки слияния являются, по меньшей мере, в той же степени эффективными в опосредовании дезагрегации амилоида, способствовании выведению амилоида, подавлении агрегации амилоида и/или удалении или предотвращении образования токсичных олигомеров, что и соответствующий несвязанный амилоидсвязывающий фрагмент g3p. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния связывает амилоид и является, по меньшей мере, в той же степени эффективным в опосредовании дезагрегации амилоида, способствовании выведению амилоида, подавлении агрегации амилоида и/или удалении или предотвращении образования токсичных олигомеров, что и рекомбинантный растворимый g3p, содержащий

SEQ ID NO: 1. В других вариантах реализации изобретения белок слияния связывает амилоид и является, по меньшей мере, в той же степени эффективным в опосредовании дезагрегации амилоида, способствовании выведению амилоида, подавлении агрегации амилоида и/или удалении или предотвращении образования токсичных олигомеров, что и фаг M13. В других вариантах реализации изобретения белок слияния связывает амилоид и является более эффективным в опосредовании дезагрегации амилоида, способствовании выведению амилоида, подавлении агрегации амилоида и/или удалении или предотвращении образования токсичных олигомеров, чем фаг M13. В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния связывает амилоид и является, по меньшей мере, в той же степени эффективным в снижении количества амилоида при заболеваниях, связанных с неправильным сворачиванием белков, что и фаг M13. В других вариантах реализации изобретения белок слияния связывает амилоид и является более эффективным в снижении количества амилоида при заболеваниях, связанных с неправильным сворачиванием белков, чем фаг M13. В других вариантах реализации изобретения белок слияния связывает амилоид и является, по меньшей мере, в той же степени эффективным в предотвращении образования амилоида, что и фаг M13.

Белки слияния можно синтезировать при помощи хорошо известных в данной области техники способов. Например, белки слияния согласно изобретению можно синтезировать в клетках рекомбинантным путем (см., например, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. и Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). В другом варианте белки слияния согласно изобретению можно синтезировать при помощи известных способов синтеза, таких как твердофазный синтез. Способы синтеза хорошо известны в данной области техники (см., например, Merrifield, 1973, *Chemical Polypeptides*, (Katsoyannis and Panayotis eds.) pp. 335-61; Merrifield 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Davis et al. 1985, *Biochem. Intl.* 10:394; Finn et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:257; Патент США № 3941763). В другом варианте конечная конструкция может обладать фактически такой же функцией, что и полученный рекомбинантным путем белок слияния, но при этом быть полученной нереконбинантным путем, таким как химическое лигирование. Компоненты белков слияния можно получить при помощи той же самой общей методологии, описанной для экспрессии g3p и мутаций g3p.

D. Нуклеиновые кислоты, кодирующие белки слияния g3p.

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложена нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния согласно изобретению, содержащий амилоидсвязывающий фрагмент g3p, при этом g3p-часть белка слияния содержит мутантную или вариантную форму амилоидсвязывающего фрагмента g3p, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична g3p-части SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В одном аспекте этих вариантов реализации изобретения нуклеотидная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 32 (фактически нуклеотидные последовательности, которые кодируют SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 31 соответственно) или вырожденной по отношению к ним нуклеиновой кислоты, которая кодирует тот же самый полипептид, что и любая из вышеприведенных. В другом аспекте этих вариантов реализации изобретения нуклеотидная последовательность выбрана из g3p-Ig-кодирующей части SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 32 (т.е. нуклеотидных последовательностей, кодирующих любые из аминокислот от 21, 22 или 23 до 505 или 506 из SEQ ID NO: 9, аминокислот от 21, 22 или 23 до 505 или 506 из SEQ ID NO: 11, аминокислот от 21, 22 или 23 до 508 или 509 из SEQ ID NO: 13 или аминокислот от 21, 22 или 23 до 527 или 528 из SEQ ID NO: 31), слитой в 5'-конце и в рамке с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует сигнальную последовательность, или вырожденной по отношению к ним нуклеиновой кислоты, которая кодирует тот же самый полипептид, что и любая из вышеприведенных. В некоторых вариантах реализации изобретения сигнальная последовательность принадлежит млекопитающему.

В другом аспекте этих вариантов реализации изобретения нуклеотидная последовательность выбрана из g3p-кодирующей части SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 32 (т.е. нуклеотидных последовательностей, кодирующих любые из аминокислот от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 9, аминокислот от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 11, аминокислот от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 13 или аминокислот от 21, 22 или 23 до 296 из SEQ ID NO: 31), слитой в 5'-конце и в рамке с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует сигнальную последовательность, или вырожденной по отношению к ним нуклеиновой кислоты, которая кодирует тот же самый полипептид, что и любая из вышеприведенных. В некоторых вариантах реализации изобретения сигнальная последовательность принадлежит млекопитающему.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок слияния g3p содержит SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 32, при этом нуклеиновые кислоты, кодирующие сигнальную последовательность (т.е. аминокислоты 1-20, 1-21 или 1-22 любой из SEQ ID NO: 9, 11, 13 или 31), исключены. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, которая кодирует белок слияния g3p, но не содержит нуклеотидов, кодирующих сигнальную

последовательность, выбрана из i) нуклеотидов от 61, 64 или 67 до 1521 любой из SEQ ID NO: 26 или 27; ii) нуклеотидов от 61, 64 или 67 до 1527 из SEQ ID NO: 28; и iii) нуклеотидов от 61, 64 или 67 до 1587 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность кодирует домен N1N2 g3p или его мутант, вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложена нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния, содержащий аминокислотную последовательность, которая содержит от 1 до 20 аминокислотных замен по сравнению с g3p-частью любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31, при этом белок слияния является менее иммуногенным для человека, чем g3p-часть любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В одном аспекте этих вариантов реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок слияния, который содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с g3p-частью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31. В других аспектах этих вариантов реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид, при этом все аминокислотные замены присутствуют в g3p-части белка слияния (например, аминокислоты от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 9, аминокислоты от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 11, аминокислоты от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 13 или аминокислоты от 21, 22 или 23 до 296 из SEQ ID NO: 31 или их мутанты, варианты или фрагменты).

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложена нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния, который является вариантом любой из аминокислот от 21, 22 или 23 до 505 или 506 из SEQ ID NO: 9, аминокислот от 21, 22 или 23 до 505 или 506 из SEQ ID NO: 11, аминокислот от 21, 22 или 23 до 508 или 509 из SEQ ID NO: 13 или аминокислот от 21, 22 или 23 до 527 или 528 из SEQ ID NO: 31, а также менее иммуногенным, чем SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 31, при этом вариант отличается от соответствующей ему аминокислотной последовательности только по содержанию от 1 до 20 аминокислотных замен в области g3p (т.е. аминокислот от 21, 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 9, аминокислот от 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 11, аминокислот от 22 или 23 до 238 из SEQ ID NO: 13 или аминокислот от 22 или 23 до 296 из SEQ ID NO: 31 соответственно). В некоторых аспектах этих вариантов реализации изобретения нуклеотидная последовательность кодирует белок слияния, содержащий от 1 до 10 таких аминокислотных замен. В других аспектах нуклеотидная последовательность кодирует белок слияния, содержащий от 1 до 5 таких аминокислотных замен.

Е. Мутантные белки слияния g3p.

В другом аспекте изобретение относится к белкам слияния, содержащим мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3p. Белки слияния, содержащие мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3p, можно получить или выбрать на основании свойств, которые обеспечивают терапевтическую эффективность фармацевтических составов, описанных в этой заявке. Например, амилоидсвязывающие фрагменты g3p могут быть мутированы рекомбинантным путем или выбраны другим образом так, чтобы обладать одним или более из следующих свойств по сравнению с g3p M13: повышенной аффинностью связывания амилоида, сниженным значением  $T_{пл}$  для шарнирной области, повышенной авидностью (авидность отличается от аффинности тем, что авидность используют для описания всего возможного связывания амилоида в случае, когда g3p содержит более одного амилоидсвязывающего сайта), повышенной способностью дезагрегировать амилоидные агрегаты или повышенной способностью предотвращать агрегацию амилоидных фибрилл. В другом варианте или в дополнение мутантные амилоидные фрагменты g3p могут обладать другими полезными свойствами, описанными в другом месте данного документа.

Мутантные амилоидные фрагменты g3p можно получить при помощи мутагенеза фагов или рекомбинантных методов, таких как основанный на ПЦР сайт-направленный мутагенез или случайный мутагенез.

Амилоидсвязывающие фрагменты g3p, например домены N1N2 или домены N2, также можно подвергать мутагенезу с применением рекомбинантных методов и включать в белки слияния согласно изобретению. Например, описанный в данном документе вектор, несущий g3p или его амилоидсвязывающий фрагмент (например, N1N2 или N2), может быть мутирован при помощи основанного на ПЦР способа мутагенеза. Затем происходит экспрессия кодируемого мутированного белка, а связывание амилоида и аффинность мутантов оценивают, как описано.

Мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3p также можно получить из мутантного g3p. Например, путем мутирования g3p и/или селекции мутированного g3p с необходимыми свойствами и получения из него необходимого амилоидсвязывающего фрагмента, например, при помощи протеолиза и последующей очистки.

В некоторых вариантах реализации белок слияния g3p согласно изобретению содержит мутантный амилоидсвязывающий фрагмент g3p, который связывает амилоид с аффинностью, которая по меньшей мере в 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 или даже 1000 раз превышает связывание соответствующего немутированного фрагмента g3p из M13 или соответствующего немутированного белка слияния g3p. В других вариантах реализации изобретения белок слияния, содержащий мутантный амилоид-

связывающий фрагмент g3r сохраняет свойство связывания амилоида, которое по силе соответствует по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% связывания соответствующего немутированного фрагмента g3r из M13 или соответствующего немутированного белка слияния g3r. В некоторых вариантах реализации изобретения мутантный амилоидсвязывающий фрагмент g3r, который демонстрирует более низкую амилоидсвязывающую аффинность, чем соответствующая немутированная форма, обладает другим необходимым биологическим (например, большей способностью дезагрегировать амилоид; большей способностью предотвращать агрегацию амилоидных фибрилл) или фармацевтическим (например, большей метаболической стабильностью, подходящим фармакокинетическим профилем, большей растворимостью) свойством, которое является улучшенным по сравнению с соответствующей немутированной формой. Связывание амилоида можно оценить методом поверхностного плазмонного резонанса или в конкурентном ELISA-анализе, как описано в примерах.

В некоторых вариантах реализации изобретения варианты и/или мутанты амилоидных фрагментов g3r можно определить при помощи скрининга библиотек ДНК, используя гибридизацию с g3r M13 для того, чтобы выбрать родственные ДНК, которые гибридизируются с g3r M13 в условиях высокой жесткости или умеренной жесткости.

В некоторых вариантах реализации белок слияния g3r согласно изобретению, содержащий мутированный амилоидный фрагмент g3r, получен рекомбинантным путем и содержит амилоидсвязывающий фрагмент g3r, который отличается от немутированного полипептида g3r по меньшей мере в одном аминокислотном остатке, но при этом связывает амилоид. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуальные точечные мутации задают путем выделения аминокислоты немутированного g3r в конкретном остатке полипептида g3r и замещения аминокислоты в этом остатке. Например, "F194A" означает, что фенилаланин в позиции 194 зрелой последовательности M13 (SEQ ID NO: 1) был замещен аланином. В других вариантах реализации изобретения мутированный g3r описывают, определяя процент аминокислотного сходства с конкретной аминокислотной последовательностью с оговоркой, что мутированный g3r связывает амилоидные фибриллы. В этих вариантах реализации мутированная g3r-часть белка слияния согласно изобретению обладает по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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% или по меньшей мере 99% идентичности относительно полной длины соответствующей части SEQ ID NO: 1. В этих вариантах реализации изобретения, включающих мутированный амилоидсвязывающий фрагмент g3r, мутированный амилоидсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, 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% или по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности относительно полной длины соответствующего фрагмента SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31.

На практике определить, является ли любой конкретный полипептид по меньшей мере на 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным другой последовательности, обычно можно при помощи известных компьютерных программ, таких как программа Bestfit. При применении Bestfit или другой программы по выравниванию последовательностей для определения, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной стандартной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры, конечно, устанавливают таким образом, чтобы рассчитать процент идентичности относительно полной длины части стандартной аминокислотной последовательности, которая гомологична запрашиваемой последовательности.

В некоторых вариантах реализации различных аспектов мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3r-части белков слияния g3r согласно изобретению не содержат мутаций в аминокислотном остатке, который является консервативным в соответствующей части g3r семейства Ff, I-семейства или обоих, Ff и I-семейств. В других вариантах реализации изобретения мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3r содержат в основном мутации в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатках, которые являются консервативными в соответствующей части g3r семейства Ff, I-семейства или обоих, Ff и I-семейств. В других вариантах реализации изобретения мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3r содержат в основном мутации в 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатках, которые не являются консервативными в соответствующей части g3r семейства Ff, I-семейства или обоих, Ff и I-семейств. В другом варианте реализации изобретения мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3r содержат в основном мутации в 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатках, которые не являются консервативными между соответствующей частью одного или более из I22, Ike и If1. В других вариантах реализации изобретения мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3r содержат в основном мутации в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатках, которые не являются консервативными в соответствующей части g3r семейства Ff, I-семейства или обоих, Ff и I-семейств. В некоторых вариантах реализации изобретения не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций находятся в пределах домена N1. В некоторых вариантах реализации изобретения не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10

мутаций находятся в пределах домена N2. В некоторых вариантах реализации изобретения не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций находятся в пределах домена N2 и не находятся в шарнирной области.

Сайт-направленный мутагенез может быть нацелен на остатки, которые, как известно, являются важными для стабильности g3p, домена N1N2 или N2. Например, ранее было показано, что мутации, связанные с замещением аланином в D94 и T95; E115; N122; L125; E126 и E127; E127 и E128; Q129; Q145; T154 и T156; Q157; T159 и D160; K163 и T164; Y166; и E196 и D197, существенно не влияют на связывание фага с F-фимбриями, Deng & Perham, 2002. Соответственно, эти позиции являются толерантными в отношении мутации, а мутации в одной или более из этих позиций могут как усиливать, так и не оказывать влияния на амилоидсвязывающую способность белков слияния g3p согласно изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения включает белок слияния g3p, содержащий амилоидсвязывающий фрагмент g3p, мутированный в одной или более позициях из D94, T95, E115, N122, L125, E126, E127, E128, Q129, Q145, T154, T156, Q157, T159, D160, K163, T164, Y166, E196 или D197 (относительно SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения мутация в одной или более позициях из D94, T95, E115, N122, L125, E126, E127, E128, Q129, Q145, T154, T156, Q157, T159, D160, K163, T164, Y166, E196 или D197 не обязательно является замещением на аланин.

Ранее было показано, что мутации, связанные с замещением аланином в F194; F190 и H191; K184, R186 и D187; R142 и R144, снижают связывание с F-фимбриями, Deng & Perham, 2002. Таким образом, в некоторых вариантах реализации мутацию в g3p-части белка слияния согласно изобретению выбирают из мутации, которая не затрагивает один или более из следующих остатков: R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 или F194 (нумерация относительно SEQ ID NO: 1). При этом замещение R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 или F194 отличным от аланина остатком может повысить связывание амилоида. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения мутация является неаланиновой мутацией в одной или более позициях из R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 или F194. В другом варианте реализации изобретения мутация является неаланиновой мутацией в F194. В другом варианте реализации изобретения мутация является неаланиновой мутацией в F190 и H191. В другом варианте реализации изобретения мутация является неаланиновой мутацией в K184, R186 и D187. В другом варианте реализации изобретения мутация является неаланиновой мутацией в W181. В другом варианте реализации изобретения мутация является неаланиновой мутацией в R142 и R144. В определенных вариантах реализации изобретения мутация не является исключительно одной, некоторыми или всеми из T131, T101I, Q129H, G153D, W181A, F190A, F194A и D209Y.

В некоторых вариантах реализации мутация в g3p-части белка слияния согласно изобретению проведена в одном или более остатках, расположенных на поверхности домена N2, который представляет собой часть g3p, которая связывает F-фимбрию. В одном варианте реализации изобретения мутация проведена в одном или более остатках, расположенных на внешней стороне домена N2. В других вариантах реализации изобретения мутация проведена в одном или более остатках, расположенных на поверхности домена N1, который представляет собой часть g3p, которая связывает To1A. В одном варианте реализации мутация в g3p-части белка слияния согласно изобретению проведена в одном или более остатках, расположенных на внешней стороне домена N1. В другом варианте реализации изобретения мутация проведена в одном или более доступных для растворителя остатках g3p. В другом варианте реализации изобретения мутация(и) приводят к сдвигу цис/транс-равновесия в Pro213 до более чем 50, 60, 70, 80, 90 или 95% транс. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3p содержит мутированный g3p с цис/транс-равновесием в Pro213, которое по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 90 или по меньшей мере на 95% состоит из транс.

В некоторых вариантах реализации амилоидсвязывающий фрагмент g3p в g3p-части белка слияния согласно изобретению не содержит мутаций в структурно консервативных остатках. Примеры структурно консервативных остатков включают остатки, которые, несмотря на потенциальные вставки в последовательность, задействованы в обеспечении доменной структуры представителей семейств Ff и I.

В некоторых вариантах реализации при любой мутации, введенной в g3p-часть белка слияния согласно изобретению, сохраняется свойство связывания амилоида. В других вариантах реализации изобретения мутация не включает замещение остатка пролина.

В некоторых вариантах реализации при любой мутации, введенной в g3p-часть белка слияния согласно изобретению, сохраняется свойство связывания амилоида, а мутация не включает замещение остатка цистеина. В некоторых вариантах реализации изобретения при мутации сохраняются все, по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или все четыре дисульфидных мостика в пределах g3p. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения при любой мутации сохраняются два дисульфидных мостика в N1 между Cys7 и Cys36 и между Cys46 и Cys53. В другом варианте реализации изобретения любой мутации сохраняется любой, но не оба дисульфидных мостика в N1 между Cys7 и Cys36 и между Cys46 и Cys53. В одном варианте реализации изобретения сохраняется дисульфидный мостик между Cys188 и Cys201. В некоторых вариантах реализации изобретения сохраняется каждый из дисульфидных мостиков Cys7 и Cys36, Cys46 и Cys53 и Cys188 и Cys201. В одном варианте

реализации изобретения при мутации сохраняется дисульфидный мостик между Cys354 и Cys371. В некоторых вариантах реализации изобретения при мутации сохраняются дисульфидные мостики между Cys7 и Cys36, Cys46 и Cys53, Cys188 и Cys201 и Cys354 и Cys371.

В некоторых вариантах реализации при любой мутации, введенной в g3p-часть белка слияния согласно изобретению, сохраняется свойство связывания амилоида и снижается температура плавления ( $T_{пл}$ ) N1N2.  $T_{пл}$  можно определить при помощи любого метода, описанного в примерах. Ожидается, что мутанты, которые снижают  $T_{пл}$  N1N2, должны проявлять лучшее связывание с A $\beta$ , в большей степени подавлять сборку A $\beta$  и быть, по меньшей мере, настолько же эффективными при анализе дезагрегации, как и g3p M13. Соответственно, ожидается, что такие белки слияния, содержащие подобные мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3p, будут, по меньшей мере, настолько же эффективными в терапевтическом смысле, что и соответствующие последовательности M13, белки слияния, содержащие немутированные амилоидсвязывающие фрагменты g3p и интактный M13, соответственно, при лечении одного или более заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков.

Белки слияния, содержащие мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3p, можно сконструировать так, чтобы они содержали нацеленную последовательность. Такие нацеленные последовательности можно вставлять в области гибких линкеров между N1N2 или между N2 и другим доменом в слитом белке N2. Нацеленные последовательности ядерной локализации (NLS) могут быть целесообразными при болезни Хантингтона. Нацеливание на эндосому может быть целесообразным при болезни Паркинсона.

Вдобавок к нацеливанию на определенные области клетки, нацеленные последовательности можно применять для нацеливания на различные виды амилоида. Нуклеирующие последовательности могут повышать аффинность и направлять мутантный белок к конкретному амилоиду. Другие мутантные амилоидсвязывающие фрагменты g3p в белках слияния g3p согласно изобретению можно получить таким образом, чтобы они содержали пептидные последовательности, являющиеся настолько гидрофобными, что они осаждаются сами по себе. Например, множественные последовательности AVVAI можно добавлять в g3p и/или их амилоидсвязывающие фрагменты (например, N2 и N1N2) и/или их белки слияния для получения химерных белков, которые содержат усиленные последовательности множественного связывания. Некоторые примеры пептидов, которые связывают амилоид и могут быть включены в мутантный или химерный амилоидсвязывающий фрагмент g3p, и белки слияния, содержащие эти мутантные или химерные амилоидсвязывающие фрагменты g3p, представляют собой пептидные ингибиторы на основе каркаса GxFxGxF (SEQ ID NO: 21), описанного в Sato, *Biochemistry* (2006) 45:5503-16, и пептида KLVFF (SEQ ID NO: 22), описанного в Tjernberg et al., *J. Biol. Chem.* (1996) 271:8545-48. Известны и другие нацеленные компоненты, которые также можно применять в настоящем изобретении. См., например, Sciarretta et al., *Methods in Enzymology* (2006) 413:273-312. Термины "вариант" и "мутант" употребляются в данном документе взаимозаменяемо, однако "вариант", как правило, имеет нерекомбинантную природу, в то время как "мутант", как правило, является рекомбинантным.

Рекомбинантные методы.

В общем случае ДНК, кодирующую белок слияния g3p (а также его мутантные и вариантыные формы), получают при помощи стандартных методов рекомбинантных ДНК, которые могут включать клонирование гена g3p, прямой ДНК-синтез, или при помощи выделения соответствующей ДНК из библиотеки, используя в качестве зонда, например, последовательность M13. (См., например, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. и Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).

Для рекомбинантного получения нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния g3p согласно изобретению или его амилоидсвязывающий фрагмент, вносят в определенный экспрессионный вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции внесенной кодирующей последовательности, или, в случае РНК-вирусного вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции. Кодированную нуклеиновую кислоту вносят в вектор в подходящую рамку считывания.

Соответственно, в изобретении предложены векторы, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют раскрытые в данном документе белки слияния g3p, включая их мутантные и вариантыные формы. Также предложены векторы, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют g3p или g3p-слитую молекулу. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, ДНК векторы, фаговые векторы, вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.д.

Иллюстративные типы клеток для рекомбинантной экспрессии включают клетки насекомых, включая бакуловирусную систему; клетки грибов, включая клетки *Pichia*, *Saccharomyces* и *Aspergillus*; клетки бактерий, включая клетки *E. coli*; линии животных клеток, включая NSO, CHO, HEK293, COS, HeLa или любую другую стабильную линию животных клеток; и трансгенных животных, например коз.

В некоторых вариантах реализации изобретения выбирают вектор, оптимизированный для экспрессии полипептидов в клетках CHO или клетках, производных от CHO. Примеры таких векторов описаны, например, в Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* (2004) 20:880-889.

В некоторых вариантах реализации изобретения вектор выбирают для *in vivo* экспрессии g3p, его амилоидсвязывающего фрагмента и/или молекул слияния g3p в животных, включая человека. В некоторых таких вариантах реализации изобретения экспрессия полипептида находится под управлением промотора, который функционирует тканеспецифичным образом.

Экспрессионные векторы трансфицируют или котрансфицируют в подходящую клетку-мишень, которая будет экспрессировать полипептиды.

Неограничивающие примеры способов трансфекции описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты можно временно или стабильно трансфицировать в необходимые клетки-хозяева в соответствии с известными в данной области техниками способами. Для экспрессии описанных в данном документе белков можно использовать множество систем хозяин-экспрессионный вектор, включая как прокариотические, так и эукариотические клетки. Они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*), трансформированные экспрессионными векторами, несущими рекомбинантную бактериофаговую ДНК или плазмидную ДНК и содержащими подходящую кодирующую последовательность; дрожжи или нитевидные грибы, трансформированные дрожжевыми или грибными экспрессионными векторами, содержащими подходящую кодирующую последовательность; системами клеток насекомых, инфицированными рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусными), содержащими подходящую кодирующую последовательность; системами клеток растений, инфицированными рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вируса мозаики цветной капусты или вируса табачной мозаики) или трансформированными рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмидными), содержащими подходящую кодирующую последовательность; или системами клеток животных, включая клетки млекопитающих (например, клетки CHO, Cos, HeLa или HEK-293). Также белки можно получать рекомбинантным путем в раске. См., например, патент США 8022270.

Применяемые для трансформации векторы обычно содержат селективируемый маркер, используемый для идентификации трансформантов. В бактериальных системах это может быть ген устойчивости к антибиотикам, таким как ампициллин или канамицин. Селективируемые маркеры для применения в культивируемых клетках млекопитающих включают гены, которые придают устойчивость к лекарственным препаратам, таким как неомицин, гигромицин и метотрексат. Селективируемый маркер может быть амплифицируемым селективируемым маркером. Одним из амплифицируемых селективируемых маркеров является ген DHFR. Другим амплифицируемым селективируемым маркером является кДНК DHFRr (Simonsen and Levinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, (1983) 80:2495). Обзор селективируемых маркеров приведен у Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA), а выбор селективируемых маркеров не затруднит специалистов в данной области техники.

Экспрессионные элементы экспрессионных систем отличаются по силе и специфичности. В зависимости от применяемой системы хозяин/вектор в экспрессионном векторе можно использовать любое количество подходящих транскрипционных и трансляционных элементов, включая конститутивные и индуцибельные промоторы. Например, при клонировании в бактериальных системах можно применять индуцибельные промоторы, такие как pL бактериофага  $\lambda$ , p<sub>lac</sub>, p<sub>trp</sub>, p<sub>tac</sub> (p<sub>trp</sub>-lac гибридный промотор) и тому подобные; при клонировании в системах клеток насекомых можно применять такие промоторы, как бакуловирусный полиэдрический промотор; при клонировании в системах клеток растений можно применять промоторы, полученные из генома растительных клеток (например, промоторы теплового шока; промотор для малой субъединицы RUBISCO; промотор связывающего хлорофилл a/b белка) или из растительных вирусов (например, 35S-РНК промотор ВМЦК; промотор белка оболочки ВТМ); при клонировании в системах клеток млекопитающих можно применять промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотиионеина) или из вирусов млекопитающих (например, аденовирусный поздний промотор; промотор вируса осповакцины 7,5 К); при генерации клеточных линий, которые содержат множественные копии продукта экспрессии, можно применять векторы на основе SV40-, BPV- и EBV вместе с соответствующим селективируемым маркером.

В случаях применения растительных экспрессионных векторов экспрессия последовательностей, кодирующих линейные или нециклические формы продукта экспрессии согласно изобретению, может управляться любым количеством промоторов. Например, можно применять вирусные промоторы, такие как 35S-РНК и 19S-РНК промоторы ВМЦК (Brisson et al., *Nature* (1984) 310:511-514) промотор белка оболочки ВТМ (Takamatsu et al., *EMBO J.* (1987) 6:307-311); в другом варианте можно применять растительные промоторы, такие как промотор для малой субъединицы RUBISCO (Coruzzi et al., *EMBO J.* (1984) 3:1671-1680; Broglie et al., *Science* (1984) 224:838-843) или промоторы теплового шока, например, hsp17,5-Е или hsp17,3-В соевых бобов (Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:559-565). Эти конструкции можно вносить в растительные клетки при помощи Ti-плазмид, Ri-плазмид, растительных вирусных векторов, прямой трансформации ДНК, микроинъекции, электропорации и т.д. Обзор таких методов можно посмотреть, например, в Weissbach & Weissbach 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; и Grierson & Corey 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

В одной экспрессионной системе насекомых, которую можно применять для получения белков согласно изобретению, вирус ядерного полигидроза *Autographa californica* (AcNPV) используют в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодировующую последовательность можно клонировать во второстепенные области (например, полиэдрический ген) вируса и поместить под управление промотора AcNPV (например, полиэдрического промотора). Успешная вставка кодирующей последовательности приведет к инактивации полиэдрического гена и получению невкрапленного рекомбинантного вируса (т.е. вируса, в котором отсутствует белковая оболочка, кодируемая полиэдрическим геном). Затем эти рекомбинантные вирусы применяют для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется вставленный ген (см., например, Smith et al., *J. Virol.* (1983) 46:584; патент США № 4215051). Дополнительные примеры подобной экспрессионной системы можно найти в Ausubel et al., eds. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

В клетках-хозяевах млекопитающих можно применять большое количество экспрессионных систем на основе вирусов. В случаях применения в качестве экспрессионного вектора аденовируса, кодирующую последовательность можно лигировать с комплексом управления транскрипцией/трансляцией, например, поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Затем этот слитый ген можно вставить в геном аденовируса путем *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка во второстепенную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению жизнеспособного рекомбинантного вируса, который способен экспрессировать пептиды в инфицированных хозяевах (см., например, Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:3655). В альтернативном варианте можно применять промотор вируса осповакцины 7,5 K (см., например, Mackett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:7415; Mackett et al., *J. Virol.* (1984) 49:857; Panicali et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:4927). Другие вирусные экспрессионные системы включают аденоассоциированные вирусы и лентивирусы.

Клетки-хозяева, содержащие ДНК-конструкции, выращивают в подходящей питательной среде. Употребляемый в данном документе термин "подходящая питательная среда" означает среду, содержащую питательные вещества, необходимые для роста клеток. Полученный рекомбинантным путем белок согласно изобретению можно выделить из культуральной среды при помощи стандартных в данной области техники методов.

Методы *in vitro* анализа.

В некоторых вариантах реализации изобретения дезагрегацию амилоида можно отслеживать при помощи анализа флуоресценции тиофлавина Т (ThT).

В некоторых вариантах реализации изобретения дезагрегацию исследуют, отслеживая степень растворимости детергента в присутствии или отсутствие белка слияния или состава согласно изобретению. Например, агрегированный  $\alpha$ -синуклеин можно обработать составом согласно изобретению. Белок слияния или состав, которые дезагрегируют агрегированный  $\alpha$ -синуклеин приведет к более быстрому растворению волокон  $\alpha$ -синуклеина в таких детергентах как ДСН по сравнению с необработанными волокнами. Это преобразование амилоидных волокон в растворимые формы можно отслеживать, вводя при агрегации некоторое количество меченых (например, Су5) мономеров  $\alpha$ -синуклеина.

В некоторых вариантах реализации изобретения предотвращение образования токсичных амилоидных олигомеров исследуют методом анализа цитотоксичности культуры нейронных клеток. В данном методе дифференцированные клетки нейробластомы N2a или эквивалентные им клетки инкубируют совместно с олигомерами A $\beta$ 42. Олигомеры связывают мембраны и приводят к нарушению структуры мембраны и высвобождению цитозольных ферментов в среду. Продолжительная инкубация с высокими концентрациями олигомеров приведет к гибели клеток. Когда перед инкубацией с клетками олигомеры предварительно обрабатывают фагом или g3r, олигомеры являясь, по меньшей мере, менее токсичными, а иногда и нетоксичными. Этот нейтрализующий эффект можно количественно оценить, определяя высвобождение аденилаткиназы - одного из иллюстративных цитозольных ферментов, высвобождаемых нейронными клетками после нарушения структуры мембраны.

В некоторых вариантах реализации белок слияния g3r или состав согласно изобретению подавляет преобразование растворимого прионного белка в устойчивый к протеинкиназе К конформер согласно данным анализа неправильного сворачивания белков при циклической амплификации (PMCA). Wang et al., *Science*, (2010) 327:1132-35. В данном методе анализа рекомбинантный PrP смешивают с липидом POPG и РНК в присутствии или отсутствие белка слияния или состава согласно изобретению. Затем материал подвергают множественным (например, 48) циклам 30-секундной сонификации с последующей 29,5-минутной инкубацией. Затем фракцию реакционной смеси используют для посева в следующую пробирку с субстратом и повторяют цикл. Каждый раз определяют наличие устойчивого к протеинкиназе К материала, который свидетельствует о наличии инфекционной формы PrP. Снижение количества устойчивого к протеинкиназе К материала в присутствии состава согласно изобретению свидетельствует о том, что белок слияния или состав подавляет образование устойчивого к ПК конформера.

Как отмечалось выше, амилоидные формы определенных прионных белков, таких как дрожжевой

прионный белок NM, также можно детектировать методом ловушки на фильтре. Соответственно, в зависимости от прионного белка в некоторых вариантах реализации белок слияния или состав согласно изобретению для дезагрегации агрегатов прионных белков можно исследовать методом ловушки на фильтре.

Функциональные методы *in vivo* анализа.

Вдобавок к таким показателям, как повышенная аффинность связывания амилоида или сниженная  $T_{пл}$ , которые можно определить методами *in vitro* анализа, белки слияния или составы согласно изобретению также могут снижать количество амилоида в одном или нескольких методах *in vivo* анализа. Один метод для определения снижения количества амилоида *in vivo* основан на применении позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) с визуализирующим веществом флорбетапиром (F18-AV-45, Eli Lilly) до и после обработки для сравнения количества и/или распределения  $\beta$ -амилоида. Конечно, в случае определения дополнительных биомаркеров их также можно применять для оценки снижения количества амилоида.

В другом методе определение того, снижает ли белок слияния g3r или состав согласно изобретению количество амилоида *in vivo*, используют мышиную модель hAPP. Rockenstein, J. *Neurosci Res.* (2001) 66(4):573-82. Эти мыши вырабатывают высокие уровни  $\beta$ -амилоида в раннем возрасте (3-4 месяца). Способность белка слияния или состава согласно изобретению снизить количество амилоида можно определить, проводя мышам инъекции состава согласно изобретению, и затем сравнивая уровни амилоида у этих мышей и контрольных мышей, которым не проводили инъекции. Также можно проводить инъекцию белка слияния или состава согласно изобретению только в одно полушарие hAPP мыши, что позволяет сравнить уровни амилоида между полушариями одной и той же мыши, в которые проводили и не проводили инъекцию.

В другом примере белок слияния или состав согласно изобретению исследуют в трансгенной мышиную модели болезни Альцгеймера (TgAD), описанной в US 2011/0142803, Hsiao et al., *Science* (1996) 274:99-102 или Duyckaerts et al., *Acta Neuropathol* (2008) 115:5-38. Вкратце, испытания проводят на мышах дикого типа и трансгенных мышах. Для того чтобы оценить действие белка слияния или состава согласно изобретению в качестве дезагрегирующего вещества, трансгенным мышам проводят внутривенную инъекцию состава или вводят его систематически (Taconic, APPSWE(2576), возраст - 10 месяцев). Например, при внутривенной инъекции составы, содержащие белки слияния согласно изобретению, можно вводить в одно полушарие, в то время как в противоположную сторону в качестве контроля вводят фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Затем обработанных мышей умерщвляют в разные временные точки, а срезы головного мозга после фиксации на протяжении ночи в параформальдегиде (4%) делают при помощи микротомы. Для оценки амилоидной нагрузки проводят окрашивание тиофлавином S (ThS). Срезы окрашивают гематоксилином Майера для гашения ядерной аутофлуоресценции, а после этого на протяжении 3 мин отмывают раствором ThS (1%). Дифференциацию проводят, применяя на протяжении 20 мин 1% уксусную кислоту, а после отмывки препараты высушивают и закрепляют в заливочной среде, предупреждающей обесцвечивание. Амилоидную нагрузку рассчитывают при помощи программы LEICA Qwin. В другом варианте амилоидную нагрузку можно оценить при помощи антиамилоидного антитела.

Также можно оценить биораспределение радиоактивно (например,  $I^{125}$ ) или флуоресцентно меченых белков слияния или составов или немеченых белков слияния или составов для того, чтобы показать, что белок слияния или состав согласно изобретению связывает амилоид *in vivo*. Например, можно радиоактивно или флуоресцентно пометить белок слияния. Мышей штамма BALB/c делят на группы. Затем каждой мыши более часа интраназально вводят белок слияния. Первую группу мышей умерщвляют через час после проведения перфузии 4% параформальдегида в полость сердца. Вторую группу умерщвляют через 3 ч после обработки, а последнюю группу - через 24 ч. После перфузии головной мозг, а также периферические органы удаляют и определяют содержание меченого вещества. В другом варианте связывание немеченых белков слияния или составов можно оценить, применяя схожие методы, но с использованием совместного окрашивания срезов головного мозга красителем, который распознает амилоид, и красителем, который распознает состав или фаг.

Для демонстрации того, что белок слияния или состав согласно изобретению снижает количество амилоида, можно применять другие трансгенные модели заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков. Неограничивающие примеры включают "D-линию"  $\alpha$ -синуклеиновых мышей (модель болезни Паркинсона, Masliah et al., *Science* (2000) 287:1265-1269); Tg2576 мышей (модель болезни Альцгеймера, Hsiao et al., *Science* (1996) 274:99-102 и Duyckaerts et al., *Acta Neuropathol* (2008) 115:5-38 at 9); различных мышей Jax® для исследования болезни Паркинсона (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME); а также мышинные и крысиные модели, предоставляемые JSW Lifescience, включая те, которые моделируют болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона.

Фармацевтические составы.

В другом аспекте в изобретении предложены фармацевтически приемлемые составы, содержащие любой из вышеописанных белков слияния g3r, включая белки слияния SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11,

SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31, а также их фрагменты, мутанты и варианты. В частности, фармацевтические составы согласно изобретению могут содержать аминокислоты 21-506 из SEQ ID NO: 9, аминокислоты 22-506 из SEQ ID NO: 9, аминокислоты 23-506 из SEQ ID NO: 9, аминокислоты 21-505 из SEQ ID NO: 9, аминокислоты 22-505 из SEQ ID NO: 9 или аминокислоты 23-505 из SEQ ID NO: 9 или мутантные или варианты формы этих последовательностей, как описано выше. В других вариантах реализации фармацевтические составы согласно изобретению могут содержать аминокислоты 21-506 из SEQ ID NO: 11, аминокислоты 22-506 из SEQ ID NO: 11, аминокислоты 23-506 из SEQ ID NO: 11, аминокислоты 21-505 из SEQ ID NO: 11, аминокислоты 22-505 из SEQ ID NO: 11 или аминокислоты 23-505 из SEQ ID NO: 11; аминокислоты 21-508 из SEQ ID NO: 13, аминокислоты 22-508 из SEQ ID NO: 13, аминокислоты 23-508 из SEQ ID NO: 13, аминокислоты 21-507 из SEQ ID NO: 13, аминокислоты 22-507 из SEQ ID NO: 13 или аминокислоты 23-507 из SEQ ID NO: 13; или аминокислоты 21-528 из SEQ ID NO: 31, аминокислоты 22-528 из SEQ ID NO: 31, аминокислоты 23-528 из SEQ ID NO: 31, аминокислоты 21-527 из SEQ ID NO: 31, аминокислоты 22-527 из SEQ ID NO: 31 или аминокислоты 23-527 из SEQ ID NO: 31 или мутантные или варианты формы этих последовательностей, как описано выше.

Термин "фармацевтический состав" относится к терапевтически эффективному количеству описанного в данном документе белка слияния g3r с физиологически приемлемым носителем и/или вспомогательным веществом, при этом g3r-часть белка слияния обеспечивает терапевтическое действие белка слияния. Фармацевтический состав не вызывает значительного раздражения в организме. Фразы "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые можно употреблять взаимозаменяемо, относятся к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения в организме и не подавляет биологическую активность и свойства вводимого состава.

Термин "вспомогательное вещество" относится к нейтральному веществу, добавляемому в фармацевтический состав для дополнительного облегчения введения активного ингредиента. Примеры, без ограничений, включают, например, соляной раствор, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и виды крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные жиры, полиэтиленгликоли и поверхностно-активные вещества, включая, например, полисорбат 20.

Фармацевтические составы для применения в соответствии с настоящим изобретением можно изготовить традиционным способом, используя один или более физиологически приемлемых носителей, содержащих вспомогательные вещества и компоненты, которые способствуют введению активных ингредиентов g3r в составы, которые можно применять фармацевтически. Точный состав препарата зависит от выбранного способа введения и от природы доставляемого состава.

Подходящие способы введения фармацевтических составов согласно изобретению могут, например, включать трансмукозальную, в особенности, трансназальную доставку; парентеральную доставку, включая внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные, интратекальные, интравентрикулярные, внутривенные, внутрибрюшинные, интраназальные или интраокулярные инъекции; пероральную или ректальную доставку.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтический состав вводят в большей степени локально, чем систематически, например, путем инъекции фармацевтического состава непосредственно в головной мозг пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения способ проведения инъекции представляет собой любой способ, который не затрагивает гематоэнцефалический барьер, например, путем интрамедуллярной, интратекальной или интравентрикулярной инъекции.

Для проведения инъекции активные ингредиенты согласно изобретению можно растворять в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический соляной буфер. Для трансмукозального введения в составе препарата используются пенетранты, подходящие для проникновения через барьер. Такие пенетранты общеизвестны в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации фармацевтический состав согласно изобретению вводят путем интраназального введения. Сообщалось, что интраназальная доставка делает возможным прямое попадание вирусов и макромолекул в спинно-мозговую жидкость (СМЖ) или ЦНС. Mathison et al., 1998; Chou et al., 1997; Draghiaetal., 1995.

Для введения интраназальным способом составы удобно доставлять в форме аэрозольного спрея, находящегося в упаковке под высоким давлением, или распылителя с применением подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана или двуокиси углерода. В случае находящегося под высоким давлением аэрозоля единичная доза может определяться при помощи дозирующей насадки для доставки дозированного количества вещества. Капсулы и картриджи, например, желатина, для применения в дозаторе можно изготовить с содержанием порошковой смеси соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Различные белки слияния, описанные в данном тексте в качестве компонентов фармацевтических составов, также можно доставлять в головной мозг, используя обонятельные рецепторные нейроны как точку доставки. Например, аденовирусный вектор, содержащий ген, кодирующий любой из этих белков, можно доставлять посредством обонятельных рецепторных нейронов. Draghia et al., 1995.

Описанные в данном документе составы можно изготавливать для парентерального введения, на-

пример, при помощи болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Фармацевтические составы для парентерального введения включают водные растворы составов в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных ингредиентов можно изготавливать в виде масляных или водных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбитол или декстран. Необязательно, суспензия может содержать подходящие стабилизаторы или вещества (например, поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат (Твин 20)), которые повышают растворимость активных ингредиентов, чтобы получить возможность изготовления высококонцентрированных растворов. Вещества на белковой основе, такие как, например, альбумин, можно применять для предотвращения адсорбции M13 на поверхности средства доставки (т.е. пакета для внутривенного вливания, катетера, иглы и т.д.).

Для перорального введения составы можно изготавливать, просто смешивая активные соединения с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области техники.

Препараты могут находиться в виде единичной лекарственной формы, например во флаконах, ампулах, или в многодозовом контейнере, необязательно, с добавлением консерванта. Составы могут представлять собой суспензии, растворы и эмульсии в масляных или водных средах и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. Единичные лекарственные формы могут находиться в жидком или твердом состоянии. Единичные лекарственные формы можно сразу вводить пациенту без изменения или можно разбавлять или восстанавливать перед введением. В определенных вариантах реализации изобретения единичную лекарственную форму можно вводить в болюсной форме, например в виде единичной инъекции, единичной пероральной дозы, включая пероральную дозу, которая включает прием нескольких таблеток, капсул, пилюль и т.д. В альтернативных вариантах реализации изобретения единичную лекарственную форму можно вводить в продолжение некоторого периода времени, например, посредством инфузии или через имплантированный насос, такой как ИЦВ насос. В последнем варианте реализации изобретения единичной лекарственной формой может быть инфузионный пакет или резервуар насоса, предварительно наполненный белком слияния. В другом варианте инфузионный пакет или резервуар насоса можно подготовить прямо перед введением пациенту, смешав единичную дозу белка слияния с раствором из инфузионного пакета или резервуара насоса.

Другой аспект реализации изобретения включает способы получения фармацевтического состава согласно изобретению. Способы изготовления лекарственных препаратов можно найти, например, в самом позднем издании "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., которое в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтические составы, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, включают составы, в которых содержится такое количество активных ингредиентов гЗр, которого достаточно для достижения поставленной цели. Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению содержат белки слияния гЗр, при этом гЗр-часть белка слияния присутствует в них в количестве, достаточном для снижения количества амилоида, подавления образования амилоида, подавления агрегации амилоида или удаления и/или предотвращения образования токсичных олигомеров в организме нуждающегося в лечении пациента. Состав не содержит бактериофагов.

Определение терапевтически или диагностически эффективного количества соответствует сфере деятельности специалистов в данной области техники, в особенности в свете приведенного в данном документе подробного раскрытия изобретения.

Величину дозы и интервал можно подбирать индивидуально, чтобы обеспечить такие уровни среды для фагового дисплея в головном мозге, которых достаточно для лечения или диагностирования конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния головного мозга (и которые соответствуют минимальной эффективной концентрации, МЭК). Для каждого препарата МЭК будет отличаться, но ее можно оценить по *in vitro* данным. Дозы, необходимые для достижения МЭК, будут зависеть от индивидуальных характеристик.

Интервалы между дозированием также можно определить при помощи величины МЭК. Препараты необходимо вводить в режиме дозирования, при котором уровни в головном мозге поддерживаются на уровне МЭК на протяжении 10-90% времени, предпочтительно между 30-90% и наиболее предпочтительно 50-90%.

В зависимости от тяжести и реактивности патологического состояния, лечение которого проводят, дозирование может представлять собой единичное или множественное введение с курсом лечения, длящимся от нескольких дней до нескольких недель, или до проявления лечебного эффекта. или до достижения облегчения патологического состояния.

Количество вводимого состава, конечно, будет зависеть от субъекта, лечение или диагностирование которого проводят, степени поражения, решения лечащего врача и т.д.

Составы согласно настоящему изобретению, содержащие белки слияния гЗр или их мутантные или вариантные формы, описанные в данном документе, могут, при необходимости, находиться в упаковке

или дозировочном устройстве, таком как соответствующий стандартам FDA набор, который может содержать одну или более единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, включать металлическую или пластиковую фольгу, например, как в случае блистерной упаковки. К упаковке или дозировочному устройству могут прилагаться инструкции по применению. К упаковке или дозировочному устройству также может прилагаться информация, указанная на контейнере, в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение и продажу лекарственных средств, подтверждающая выданную соответствующим органом лицензию на указанные составы или применение их в отношении людей или животных. Такая информация, например, может находиться на этикетке, утвержденной Управлением США по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств для отпускаемых по рецепту лекарственных препаратов, или на утвержденном листке-вкладыше. Составы, содержащие препарат согласно изобретению, находящийся в совместимом фармацевтическом носителе, также могут быть изготовлены, помещены в соответствующий контейнер и снабжены этикеткой для лечения указанного патологического состояния, как более подробно описано выше.

Следует понимать, что как вышеприведенное, так и нижеприведенное описание являются только иллюстративными и описательными и не ограничивают заявляемое изобретение.

Терапевтическое применение.

Другой аспект изобретения относится к применению любого из белков слияния g3p или составов согласно изобретению для лечения или предотвращения заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков, включая, но не ограничиваясь этим, заболевания, связанные с fA $\beta$ 42, fasyn, fNM или ftau.

Другой аспект изобретения относится к применению любого из белков слияния g3p или составов согласно изобретению для снижения количества амилоида, подавления образования амилоида, подавления агрегации амилоида и/или удаления и/или предотвращения образования токсичных олигомеров в организме нуждающегося в лечении пациента.

В контексте лечения и/или предотвращения термины "пациент", "субъект" и "реципиент" употребляются взаимозаменяемо и включают людей, а также других млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения пациент является человеком, позитивным в отношении биомаркера, связанного с заболеванием, связанным с неправильным сворачиванием белков. В одном варианте реализации изобретения у пациента наблюдаются отложения  $\beta$ -амилоида, детектируемые при помощи ПЭТ-визуализации с флорбетапиром.

Термин "лечение" означает снижение, замедление или обращение прогрессирования заболевания у пациента, проявляющего один или более клинических симптомов заболевания. Также "лечение" означает снижение, замедление или обращение симптомов заболевания у пациента, проявляющего один или более клинических симптомов заболевания. В одном варианте реализации изобретения у пациента наблюдаются отложения  $\beta$ -амилоида, детектируемые при помощи ПЭТ-визуализации с флорбетапиром, а при лечении количество отложений  $\beta$ -амилоида снижается. В одном варианте реализации изобретения у пациента наблюдаются отложения  $\beta$ -амилоида, детектируемые при помощи g3p-составов согласно настоящему изобретению, а при лечении количество отложений  $\beta$ -амилоида снижается или сохраняется. В другом варианте реализации изобретения у пациента наблюдаются отложения любого типа амилоида, детектируемые при помощи ПЭТ-визуализации, а при лечении у этого пациента улучшается когнитивная функция. Улучшение когнитивной функции можно оценить по методу и тестам, описанным в McKhann et al., *Alzheimer's & Dementia* (2011) May;7(3):263-9.

"Профилактика" отличается от лечения и относится к введению состава человеку до появления любых клинических симптомов. В данном документе применение белка слияния g3p или состава согласно изобретению "в профилактических целях" является синонимом применению белка слияния g3p или состава согласно изобретению "в целях предотвращения". Профилактика с применением любых белков слияния или составов согласно изобретению входит в объем данного изобретения. Профилактику можно применять для людей, для которых существует повышенный риск появления заболевания, или для которых развитие заболевания неизбежно только на основе одного или более генетических признаков. Многие генетические признаки были определены для различных заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков. Например, люди, имеющие одну или более мутаций из Шведской мутации, Индианской мутации или Лондонской мутации в человеческом белке-предшественнике амилоида (hAPP), находятся в зоне повышенного риска раннего развития болезни Альцгеймера и, таким образом, являются кандидатами для профилактики. Аналогично, у людей с тринуклеотидными CAG-повторами в гене хантингтина, в частности у тех, которые имеют 36 или более повторов, в конечном итоге разовьется болезнь Хантингтона, и, таким образом, они являются кандидатами для профилактики.

Термин "неправильное сворачивание белков" относится к заболеваниям, которые характеризуются образованием амилоидного белка в процессе агрегации белка (амилоидобразующего пептида), такого как, без ограничений,  $\beta$ -амилоид, сывороточный амилоид А, цистатин С, легкая цепь IgG каппа или прионный белок. Заболевания, которые, как известно, связаны с неправильным сворачиванием и/или агрега-

цией амилоидного белка, включают болезнь Альцгеймера, которая включает болезнь Альцгеймера с ранним началом, болезнь Альцгеймера с поздним началом и предсимптоматическую болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, САА-амилоидоз, цистатин С, наследственный исландский синдром, старческую немощь, множественную миелому, прионные заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера (ГШШ), фатальную семейную бессонницу (ФСБ), скрепи, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (ГЭКРС), амиотрофический боковой склероз (АБС), спинально-церебеллярную атаксию (СЦА1), (СЦА3), (СЦА6), (СЦА7), болезнь Хантингтона, дентаторубро-паллидолюисову атрофию, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, наследственную церебральную амилоидную ангиопатию, семейный амилоидоз, лобно-височную деменцию, британскую/датскую деменцию и семейную энцефалопатию. Белки слияния g3r и составы согласно изобретению можно применять для лечения заболеваний, связанных с "неправильным сворачиванием белков".

Многие из этих заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием и/или агрегацией амилоидных белков, поражают центральную нервную систему (ЦНС). Некоторыми примерами заболеваний, возникающих в ЦНС, являются болезнь Паркинсона; болезнь Альцгеймера; лобно-височная деменция (ЛВД), включая тех пациентов, у которых проявляются следующие клинические синдромы: поведенческий вариант ЛВД (пвЛВД), прогрессирующая неплавная афазия (ПНПА) и семантическая деменция (СД); лобно-височная лобарная дегенерация (ЛВЛД); и болезнь Хантингтона. Белки слияния g3r или составы согласно изобретению можно применять для лечения заболеваний, которые характеризуются неправильным сворачиванием и/или агрегацией амилоидных белков, происходящими в центральной нервной системе (ЦНС).

Неправильное сворачивание и/или агрегация амилоидных белков также может происходить за пределами ЦНС. Амилоидоз А (АА) (в случае которого белком-предшественником является сывороточный острофазный аполипопротеин, САА) и множественная миелома (белками-предшественниками являются легкая и/или тяжелая цепи иммуноглобулина) представляют собой два широкоизвестных заболевания, связанных с неправильным сворачиванием и/или агрегацией белков, происходящими за пределами ЦНС. Другие примеры включают заболевания, связанные с амилоидом, образуемым  $\beta_2$ -микроглобулином, транстиретином (семейная амилоидотическая полинейропатия [САП], семейная амилоидная кардиомиопатия [САК] и старческий системный амилоидоз [ССА]), (апо)сывороточным АА, аполипопротеинами AI, AN и AIV, гельзолином (финская форма семейной амилоидотической полинейропатии), лизозимом, фибриногеном, цистатином С (церебральная амилоидная ангиопатия, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом, исландский тип), (про)кальцитонином, островковым амилоидным полипептидом (ОАПП амилоидоз), атриальным натрийуретическим пептидом, пролактином, инсулином, лактагедрином, кератоэпителином, лактоферрином, одонтогенным амелобласт-ассоциированным белком и семеновелином I. Белок слияния g3r или составы согласно изобретению можно применять для лечения заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием и/или агрегацией белков, происходящими за пределами ЦНС.

Нейродегенеративные заболевания также могут быть связаны с патологическими изменениями тау. (Обобщено в Lee et al. (2001 J. Annu. Rev. Neurosci. 24:1121-159). Тау-белки представляют собой ассоциированные с микротрубочками белки, экспрессируемые в аксонах нейронов как центральной, так и периферической нервной системы. Нейродегенеративные таупатии (иногда называемые просто таупатиями) входят в объем изобретения, и их можно лечить при помощи описанных в данном документе белков слияния g3r и составов. Примеры таупатии включают болезнь Альцгеймера, комплекс боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм-деменция, аргирофильную гранулярную деменцию, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, диффузные нейрофибрилярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височные деменции, включая лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибрилярными клубками, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с прионными белками, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит и клубочковую деменцию. Некоторые из этих заболеваний также могут быть связаны с отложениями фибриллярных пептидов амилоида  $\beta$ . Например, при болезни Альцгеймера наблюдаются как отложения амилоида  $\beta$ , так и патологические изменения тау. Аналогично, при прион-опосредованных заболеваниях, таких как болезнь Крейтцфельда-Якоба, церебральная амилоидная ангиопатия, связанная с прионными белками, и синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, также могут наблюдаться патологические изменения тау. Таким образом, определение заболевания как "таупатии" не стоит интерпретировать, как исключяющее заболевание, соответствующее другим классификациям или группировкам нейродегенеративных заболеваний, которые приведены исключительно для удобства. Белок слияния g3r или составы согласно изобретению можно применять для лечения нейродегенеративных заболеваний, а также заболеваний, связанных с патологическими изменениями тау.

В одном варианте реализации изобретения описанный в данном документе белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе снижения количества амилоида в организме пациента, проявляющего симптомы, связанные с наличием амилоида, или который является позитивным в отношении биомаркера, ассоциированного с заболеванием, связанным с неправильным сворачиванием белков, таким как флорбетапир (AV-45, Eli Lilly). В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения описанный в данном документе белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе поддержания уровня амилоида в организме пациента, проявляющего симптомы, связанные с наличием амилоида, или который является позитивным в отношении биомаркера, ассоциированного с заболеванием, связанным с неправильным сворачиванием белков, таким как флорбетапир (AV-45, Eli Lilly). Пациенту вводят эффективное количество белка слияния g3p, фармацевтического состава или препарата, как описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе дезагрегации амилоида в организме пациента, включающем введение пациенту, в организме которого присутствует амилоид, эффективного количества белка слияния g3p, фармацевтического состава или препарата, как описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе инициации дезагрегации отложений  $\beta$ -амилоида в головном мозге, включающем инъектирование непосредственно в мозг нуждающегося в лечении пациента эффективного количества фармацевтического состава, как описано в данном документе, тем самым иницируя уменьшение отложений  $\beta$ -амилоида в мозге.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе снижения образования амилоида в головном мозге. Снижение образования амилоида в головном мозге может предотвращать, лечить или уменьшать симптомы или тяжесть заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков, или нейродегенеративного заболевания. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе стимуляции выведения амилоида в головном мозге. Стимуляция выведения амилоида может предотвращать, лечить или уменьшать симптомы или тяжесть заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков, или нейродегенеративного заболевания. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе подавления агрегации амилоида в головном мозге. Подавление агрегации амилоида в головном мозге может предотвращать, лечить или уменьшать симптомы или тяжесть заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков, или нейродегенеративного заболевания. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе выведения токсических амилоидных олигомеров в головном мозге. Выведение токсических амилоидных олигомеров в головном мозге может предотвращать, лечить или уменьшать симптомы или тяжесть заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков, или нейродегенеративного заболевания. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препарат предназначен для применения в способе предотвращения образования токсических амилоидных олигомеров в головном мозге. Предотвращение образования токсических олигомеров в головном мозге может предотвращать, лечить или уменьшать симптомы или тяжесть заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков, или нейродегенеративного заболевания. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интратекальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3p, фармацевтический состав или препа-

рат согласно изобретению предназначен для применения в способе защиты нейронов от повреждения амилоидом. Защита нейронов от повреждения амилоидом может предотвращать, лечить или уменьшать симптомы или тяжесть заболевания, связанного с неправильным сворачиванием белков, или нейродегенеративного заболевания. В одном варианте реализации изобретения способ введения выбран из интра-текальной инъекции, прямой интравентрикулярной инъекции, интрапаренхиматозной инъекции или интраназальной доставки. В одном варианте реализации изобретения белок слияния g3r, фармацевтический состав или препарат согласно изобретению, предназначенный для применения в способе защиты нейронов от повреждения амилоидом, применяют профилактически.

В некоторых вариантах реализации изобретения пациент является позитивным в отношении биомаркера, ассоциированного с заболеванием, связанным с неправильным сворачиванием и/или агрегацией белков. В одном варианте реализации изобретения биомаркером является флорбетапир (AV-45, Eli Lilly).

В некоторых вариантах реализации изобретения у пациента проявляются симптомы нейродегенеративного заболевания, которое связано с присутствием амилоида. В различных вариантах реализации изобретения амилоид представляет собой любое вещество из fA $\beta$ 42, fA $\beta$ yn, fNM или ftau.

В определенных вариантах реализации изобретения нейродегенеративным заболеванием является болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона. В одном варианте реализации изобретения нейродегенеративным заболеванием является болезнь Альцгеймера. В одном варианте реализации изобретения нейродегенеративным заболеванием является болезнь Альцгеймера, а у пациента наблюдается наличие  $\beta$ -амилоида, определяемое при помощи визуализирующего вещества флорбетапира (AV-45, Eli Lilly).

В некоторых вариантах реализации изобретения у пациента проявляются симптомы прионопосредованного заболевания.

В определенных вариантах реализации изобретения прион-опосредованное заболевание выбрано из болезни Крейтцфельда-Якоба, куру, фатальной семейной бессонницы или синдрома Герстманна-Штраусслера-Шейнкера.

В некоторых вариантах реализации изобретения у пациента проявляются симптомы нейродегенеративной таупатии, отличной от болезни Альцгеймера. В определенных вариантах реализации изобретения заболевание, лечение которого проводят, выбрано из аргирофильной гранулярной деменции, кортикобазальной дегенерации, деменции боксеров, диффузных нейрофибрилярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, лобно-височных деменции, включая лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезни Галлервордена-Шпатца, миотонической дистрофии, болезни Ниманна-Пика типа C, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибрилярными клубками, болезни Пика, постэнцефалитического паркинсонизма, прогрессирующего субкортикального глиоза, прогрессирующего надъядерного паралича, подострого склерозирующего панэнцефалита и клубочковой деменции.

#### Диагностирование.

В другом аспекте изобретения описанные в данном документе белки слияния g3r и составы используют *in vitro* и/или *in vivo* в диагностических применениях, связанных с различными описанными в данном документе заболеваниями. Например, связывание белка слияния g3r или состава согласно изобретению при их применении в качестве визуализирующего вещества *in vivo* или *in vitro* может являться частью диагностирования одного из описанных заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков.

Диагностические вещества, также называемые в данном документе диагностическими составами, входят в объем изобретения и могут содержать любой из вышеописанных белков слияния или составов согласно изобретению. Диагностическое вещество может дополнительно содержать детектируемую метку или может детектироваться каким-либо другим способом *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок слияния g3r согласно изобретению или состав, содержащий белок слияния, применяют в качестве амилоид-визуализирующего вещества. Визуализирующее вещество может выявлять амилоид и диагностировать заболевание, связанное с амилоидом. Так как белки слияния и составы согласно изобретению связывают амилоид вне зависимости от типа волокон, их преимущество состоит в том, что они могут визуализировать любой амилоидный агрегат (A $\beta$ , tau,  $\alpha$ -синуклеин и т.д.) и все это при помощи одного визуализирующего вещества. В настоящее время не существует приемлемых визуализирующих веществ/способов выявления агрегатов tau или  $\alpha$ -синуклеина в ЦНС. И хотя существуют визуализирующие вещества для  $\beta$ -амилоида, все еще существует потребность в дополнительных веществах, которые могут обеспечить улучшенную корреляцию между когнитивной функцией и результатами визуализации, и/или которые помогают лучше прогнозировать, состояние каких пациентов будет ухудшаться, а каких оставаться стабильным. Обзор можно найти у Resnick & Sojkova, *Alzheimer's Res Ther.* (2011) 3(1):3.

Диагностические белки слияния g3r и составы согласно изобретению можно применять в качестве визуализирующих веществ в комбинации с визуализирующим веществом, специфическим в отношении  $\beta$ -амилоида, таким как, например, F18-AV-45, Eli Lilly. Так как на данный момент не существует извест-

ных визуализирующих веществ для отличных от  $\beta$ -амилоидных агрегатов, применение диагностического состава согласно изобретению совместно с  $\beta$ -амилоидспецифическим визуализирующим веществом приведет к выявлению отличных от  $\beta$ -амилоидных агрегатов на основании дифференциальной детекции. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения диагностический белок слияния g3r и состав согласно изобретению применяют в качестве визуализирующего вещества в комбинации с визуализирующим веществом для  $\beta$ -амилоида для выявления отличных от  $\beta$ -амилоидных агрегатов.

В другом варианте реализации изобретения диагностический состав согласно изобретению применяют в качестве визуализирующего вещества для выявления  $\beta$ -амилоида в ЦНС, включая головной мозг.

Для диагностического состава согласно изобретению в общем случае требуется, чтобы при применении его в качестве визуализирующего вещества амилоидсвязывающий слитый белковый компонент был присоединен к одной или более детектируемым меткам. К амилоидсвязывающему компоненту диагностического состава можно присоединять различные метки при помощи стандартных способов мечения белков. Примеры меток включают флуоресцентные метки и радиоактивные метки. Существует широкий диапазон радиоактивных меток, которые можно применять, включая, но не ограничиваясь этим,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  и  $^{123}\text{I}$ . Эти и другие радиоизотопы можно присоединять к белку, применяя хорошо известные химические методы. В одном варианте реализации изобретения метку детектируют методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ). При этом для детекции радиоиндикатора также можно применять любой другой подходящий метод детекции радиоизотопов.

Диагностические составы согласно изобретению можно применять теми же способами, которые описаны для терапевтических составов. В одном варианте реализации изобретения в качестве способа введения диагностического состава применяют интратекальное введение. В другом варианте реализации изобретения в качестве способа введения диагностического состава применяют внутривенное введение.

#### Примеры

Хотя демонстрируемая терапевтическая эффективность нитевидных фагов в качестве связывающих и антиагрегационных веществ не зависит от какого-либо конкретного механизма действия, понимание этого механизма создаст возможность получения фагов, обладающих большей терапевтической эффективностью. Кроме того, он служит базисом для получения дополнительных антиагрегационных веществ.

Как отмечалось ранее, было показано, что M13 связывает и дезагрегирует по меньшей мере четыре типа амилоидных волокон: волокна 1-42 амилоида- $\beta$  (fA $\beta$ 42), волокна  $\alpha$ -синуклеина (f $\alpha$ syn), волокна дрожжевого приона NM (fNM) и волокна тау (f $\tau$ au). Четыре белка, которые образуют данные амилоидные волокна, имеют неродственную первичную аминокислотную последовательность, но все четыре являются неправильно свернутыми в каноническую амилоидную форму. Eichner & Radford, 2011. Способность M13 связывать и опосредовать дезагрегацию каждого из этих белков свидетельствует о том, что M13 распознает структурный мотив, такой как кросс- $\beta$ -складчатая конформация, или конформационный элемент, такой как гидрофобные канавки, оба из которых являются определяющими характеристиками всех амилоидных волокон.

Но дезагрегация амилоида не является общим свойством для всех фагов. Например, структурно определенный икосаэдрический фаг T7 не опосредует дезагрегацию fA $\beta$ 42 даже в случае, когда T7 инкубируют вместе с fA $\beta$ 42 на протяжении 3 дней при 37°C. Бактериофаг T7 не проявляет никакой диссоциирующей активности даже при концентрациях, при которых M13 диссоциирует более 70% совместно инкубируемых амилоидных волокон. В противоположность ему бактериофаг fd, который в сравнении с M13 несет отрицательно заряженную аминокислоту в своем g8r (и, следовательно, исходя из числа копий g8r, содержит на 2800 отрицательных зарядов/фаг больше, чем M13), связывал и дезагрегировал fA $\beta$ 42 так же, как и M13. Эти первичные исследования вместе с открытием, что дезагрегацию амилоида также могут опосредовать вирус табачной мозаики (VTM), или E. coli и хвостовые трубочки T4, которые все имеют спиральную цилиндрическую форму и содержат повторяющиеся единицы (см. US 2011/0182948), позволяют предположить, что именно форма фага может являться определяющей в отношении активности, связанной с диссоциацией амилоидных волокон.

С другой стороны, нижеприведенные примеры описывают альтернативный (хотя не взаимоисключающий) механизм указанных связывающих и антиагрегационных свойств нитевидных фагов. На основании этих примеров и вытекающего из них механизма действия предложены белки слияния g3r, характеризующиеся улучшенным связыванием с амилоидом.

Пример 1. Фаг M13 связывает предпочтительно фибриллы A $\beta$ .

Связывание M13 с фибриллами A $\beta$  и мономерами A $\beta$  определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Фаг M13 связывает предпочтительно фибриллы A $\beta$ ; но не связывает мономеры A $\beta$ . Результаты исследований методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием потока в  $10^{14}$  фагов/мл через биосенсорный чип с иммобилизованным fA $\beta$  представлены на фиг. 3. Фиг. 3 демонстрирует, что  $K_D$  связывания M13 составляет около 4 нМ, что сравнимо со связыванием моноклональным антителом. Такое высокоаффинное взаимодействие свидетельствует о том, что между фагом и амилоидным волокном происходит процесс специфического связывания.

Пример 2. Связывание M13 с фибриллами A $\beta$  является дозозависимым.

Связывание M13 с fA $\beta$ 42 также является дозозависимым. На фиг. 4А проводили сравнение связывания двух дозировок фагов с возрастающим молярным содержанием fA $\beta$ 42. В данном анализе связывания M13-амилоидное волокно M13-Alexa488 смешивали с A $\beta$  (fA $\beta$ ) на протяжении 2-3 ч, чтобы произошло образование комплексов, затем комплексы осаждали центрифугированием при 7500 об/мин на протяжении 10 мин. Флуоресценция полученного осадка была пропорциональна количеству M13, связанного с амилоидом. Этот анализ обеспечивает как количественное определение связывания фага с fA $\beta$ , так и систему для оценки способности других веществ конкурировать с фагом за связывание. Фиг. 4В демонстрирует, что  $K_D$  для конкурентного связывания M13 имеет аналогичное значение, что и величина, полученная при оценке связывания методом поверхностного плазмонного резонанса.

Пример 3. Для связывания M13 с фибриллами A $\beta$  необходима нативная конформация.

Когда фаг M13 нагревают при 90°C на протяжении 10 мин, он практически теряет свою способность конкурировать за связывание. Фиг. 5 иллюстрирует результаты конкурентного связывания, полученные при анализе конкурентного связывания амилоидных волокон с применением термически обработанных (квадраты) и сохраняющих нативную конформацию (круги) M13.

Пример 4. Температура коррелирует с взаимодействием M13-амилоид.

M13 эффективно дезагрегирует амилоидные волокна. Фиг. 6 иллюстрирует анализ флуоресценции тиофлавина Т (ThT) с применением fA $\beta$  в присутствии M13 дезагрегатов fA $\beta$ 42.

На фиг. 7А показано, что изменение концентрации соли в анализе флуоресценции ThT в 10 раз (от 0,15 до 1,5М) приводит всего лишь к 2-3-кратной разнице в процентном содержании дезагрегированного fA $\beta$ . Это свидетельствует о том, что гидрофобное взаимодействие является причиной большей части наблюдаемой дезагрегации.

В противоположность относительно слабому влиянию концентрации соли на фиг. 7В показано, что изменение температуры от 4 до 37°C приводит к 8-10-кратной разнице в дезагрегации.

Эти результаты свидетельствуют о том, что в данном анализе дезагрегирующее действие M13 зависит от белка, который более активен при высокой температуре и относительно нечувствителен к действию соли, что предполагает наличие гидрофобного взаимодействия g3p фага, подходящего под это описание. Его домены N1 и N2 связаны гибким богатым глицином линкером, который "раскрывается" после связывания N2 с бактериальной F-фимбрией. Тогда N1 становится доступным для связывания бактериального корцептора, что является частью процесса инфицирования. Ожидается, что повышение температуры в ходе анализа дезагрегации "открывает" домены N1 и N2 g3p.

В то время как инактивация M13 при высокой температуре (90°C, 10 мин, см. фиг. 5) приводит к отсутствию связывания, повышение температуры инкубации в анализе связывания M13-амилоид оказывает положительный эффект на связывание. Фиг. 8А иллюстрирует, что повышение температуры от 18 до 58°C приводит к постепенному улучшению связывания вплоть до  $T_{пл}$ , соответствующей разворачиванию шарнирной области и составляющей около 50°C, после чего связывание начинает снижаться. Эта оптимальная температура связывания соответствует температуре разворачивания N1-N2 (так называемой температуре плавления или  $T_{пл}$ ) в g3p, которая составляет 48,1°C. Повышение температуры инкубации до 50°C в сравнении с 37°C также приводит к более быстрому связыванию M13 с fA $\beta$ 42 (фиг. 8В).

Пример 5. Для взаимодействия M13- $\beta$ -амилоид необходим g3p.

Для исследования того, необходим ли g3p для взаимодействия M13- $\beta$ -амилоид, g3p удаляли из фага путем протеолитической обработки ArgC (M13 $\Delta$ g3p), а фаг M13 $\Delta$ g3p сравнивали с повторно свернутым фагом на предмет связывания A $\beta$ . Обработка ArgC протеазой *Vacillus* избирательно удаляет субъединицы g3p из фага. Результаты представлены на фиг. 9А. Согласно анализу конкурентного связывания повторно свернутый M13 все еще конкурирует с M13 дикого типа, хотя на сниженном уровне. При этом даже 15-кратнопревышающее количество M13 $\Delta$ g3p если демонстрировало, то слабую конкуренцию M13 дикого типа. Эта неспособность конкурировать с M13 дикого типа согласуется с потерей инфекционности фага M13 $\Delta$ g3p (фиг. 9В). Обработка ArgC также приводила к потере дезагрегирующей активности (фиг. 9С).

Если g3p опосредует связывание путем, аналогичным его роли при инфицировании, тогда домены N1 и N2, которые важны для инфицирования, также должны конкурировать с M13 за связывание. Для того чтобы это проверить, получали рекомбинантную растворимую форму N1N2 ("rs-g3p(N1N2)"; "конструкция 3") и исследовали ее в конкурентном анализе. Как показано на фиг. 10А и 10В, M13 конкурирует с меченым M13 за связывание с fA $\beta$ 42, а M13 $\Delta$ g3p - нет. В противоположность этому rs-g3p(N1N2) был способен конкурировать с M13, что свидетельствует о том, что наличия доменов N1 и N2 g3p достаточно для связывания  $\beta$ -амилоида. Схожие результаты были получены при повторе конкурентного анализа (фиг. 10В).

Пример 6. Мутации, приводящие к разворачиванию шарнирной области g3p, меняют связывание амилоида.

Мутации, которые оказывают влияние на способность шарнирной области между доменами N1 и N2 g3p раскрываться, также должны оказывать влияние на способность фага, несущего эти мутации,

конкурировать с M13 дикого типа за связывание A $\beta$ . В Eckert & Schmid, 2007 описано несколько вариантов фагов, которые применяли для проверки данной гипотезы. Вариант "AAA" (также известный как "3A") ослабляет связывание фимбрий и снижает стабильность домена N2. AAA несет следующие мутации в g3p: W181A, F190A и F194A. ПНУ содержит мутации T131, T101I, Q129H и D209Y, которые стабилизируют домен N2 и повышают T<sub>пл</sub>.

Проводили оценку конкурентного связывания для фага fd, который содержит такую же аминокислотную последовательность, что и g3p M13 в доменах N1 и N2 (фиг. 2); ПНУ, который характеризуется более высокой T<sub>пл</sub> шарнирной области, чем M13, и AAA. Фаги fd, AAA и ПНУ предварительно активировали при 50°C на протяжении 1,5 ч, затем активированные и неактивированные Fd, AAA и ПНУ сравнивали на предмет их способности конкурировать с меченым M13. Результаты представлены на фиг. 11. fd дикого типа был более конкурентоспособен при тепловой активации. В противоположность ему на ПНУ, который характеризуется более высоким значением T<sub>пл</sub> шарнирной области, нагревание оказывало слабый эффект. AAA, который характеризуется более низкой стабильностью домена N2 по сравнению с M13, был более конкурентоспособным с или без предварительной тепловой обработки.

Эти данные подтверждают вывод о том, что взаимодействие M13 с  $\beta$ -амилоидом происходит через механизм, сходный с тем, посредством которого M13 инфицирует бактерии. Во-первых, они свидетельствуют о том, что гидрофобное взаимодействие является важным для взаимодействия M13- $\beta$ -амилоид. Во-вторых, температурная зависимость связывающей и дезагрегирующей активности M13 связана с T<sub>пл</sub> разворачивания N1-N2 шарнирной области. В-третьих, избирательный протеолиз g3p приводит к прекращению взаимодействия M13- $\beta$ -амилоид.

Пример 7. Фрагмент g3p избирательно и эффективно связывает амилоид, но не мономеры.

Чтобы оценить, сохраняет ли фрагмент g3p способность связываться с амилоидом, получили фрагмент g3p, содержащий N1 и N2, и оценивали его способность связывать фибриллы A $\beta$  и мономеры A $\beta$  методом поверхностного плазмонного резонанса (НПР). Результаты свидетельствуют о том, что gs-g3p(N1N2) связывает предпочтительно фибриллы A $\beta$ ; он не связывает мономеры A $\beta$ . Результаты исследований методом поверхностного плазмонного резонанса с применением 4 мкМ gs-g3p(N1N2) проиллюстрированы на фиг. 13, на которой также показано, что K<sub>D</sub> связывания gs-g3p(N1N2) составляет около 160 нМ. Это высокоаффинное взаимодействие свидетельствует о том, что между gs-g3p(N1N2) и амилоидными волокнами происходит процесс специфического связывания.

Методом ППР оценивали дополнительные конструкции. В нижеприведенной таблице приведены обобщающие результаты.

Анализируемые вещества	ka (1/M·с)	kd (1/с)	K <sub>D</sub>
<b>Конструкция 1</b> M13	2,6e3	9,2e-6	3,59 нМ
<b>Конструкция 3</b> gs-G3P(N1N2), 25°C	1,5e3	2,4e-4	0,15 мкМ
<b>Конструкция 3</b> gs-G3P(N1N2), предварительный нагрев при 37°C	4,1e3	2e-4	0,05 мкМ
<b>Конструкция 4</b> белок слияния gs-g3p (N1N2)-hIgG4Fc, 25°C	1,75e4	1,28e-4	7,32 нМ
<b>Конструкция 5</b> белок слияния gs-g3p (N1N2)-hIgG4Fc, 25°C	1,52e4	1,66e-4	10,9 нМ
<b>Конструкция 6</b> белок слияния N1N2- IgG1Fc, 25°C	1,71e4	1,58e-4	9,2 нМ

Пример 8. Фрагмент g3p эффективно блокирует способность волокон A $\beta$ 42 к сборке.

Чтобы определить, может ли фрагмент g3p блокировать сборку амилоидных волокон, методом анализа флуоресценции ThT исследовали gs-g3p(N1N2) на предмет его способности предотвращать сборку фибрилл fA $\beta$ 42. Результаты свидетельствуют о том, что gs-g3p(N1N2) эффективно блокирует сборку A $\beta$ 42. Фиг. 14А иллюстрирует результаты данного эксперимента, показывающие, что gs-g3p(N1N2) предотвращает сборку A $\beta$ 42 в волокна, причем указанное предотвращение является дозозависимым. На фиг. 14В приведено значение IC<sub>50</sub>, составляющее приблизительно 20 нМ.

В отдельном эксперименте A $\beta$ 42 инкубировали с или без gs-g3p(N1N2) при концентрации в 2 мкМ на протяжении 7 дней при 37°C, а сохранность волокон A $\beta$ 42 оценивали методом просвечивающей электронной микроскопии. Фиг. 15А иллюстрирует результаты данного эксперимента, показывающие, что gs-g3p(N1N2) блокирует способность A $\beta$ 42 к сборке в амилоидные волокна. На фиг. 15В представлены ре-

зультаты ThT-анализа для тех же самых образцов.

Пример 9. rs-g3p(N1N2) блокирует сборку  $\alpha$ -синуклеина, ftau и A $\beta$ , а белок слияния g3p-Ig блокирует сборку и подавляет агрегацию A $\beta$ .

Чтобы определить, может ли g3p блокировать сборку волокон  $\alpha$ -синуклеина, а также определить, играет ли в данном случае роль валентность (т.е. количество копий g3p), проводили анализ, в котором исследовали способность пентамерного g3p (5 копий g3p) и мономерного g3p (одна копия g3p) блокировать активность  $\alpha$ -синуклеина. Результаты показывают, что g3p блокирует сборку волокон  $\alpha$ -синуклеина, а пентамерный g3p более эффективен в данном случае, чем мономерный g3p. См. фиг. 16.

Также оценивали способность rs-g3p(N1N2) (конструкция 3) и репрезентативного белка слияния g3p rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) подавлять сборку A $\beta$ 42. Как показано на фиг. 30 и 31, конструкция 3 и конструкция 6 способны подавлять сборку fA $\beta$ 42, причем указанное подавление является дозозависимым. Как показано на фиг. 37, конструкция 3 и конструкция 6 способны подавлять агрегацию fA $\beta$ 42.

Также оценивали способность rs-g3p(N1N2) (конструкция 3) подавлять сборку ftau. Как показано на фиг. 44A и 44B, конструкция 3 способна подавлять сборку ftau, причем указанное подавление является дозозависимым.

Пример 10. Белок слияния g3p связывает и дезагрегирует A $\beta$ .

Чтобы оценить, играет ли валентность g3p роль в эффективности связывания g3p с амилоидом, получали белок слияния Ig, который является бивалентным в отношении rs-g3p(N1N2) ("продукт слияния rs-g3p(N1N2)-Ig"), и сравнивали его с пентавалентным M13 на предмет способности связываться с волокнами A $\beta$ . Как проиллюстрировано на фиг. 17, продукт слияния rs-g3p(N1N2)-Ig связывается с A $\beta$  с той же аффинностью, что и M13, и более эффективно, чем один rs-g3p(N1N2), что свидетельствует о том, что валентность g3p может быть важным фактором. Аналогичные результаты получали при повторении конкурентного анализа (фиг. 18). На фиг. 18 квадратами представлена конструкция 2 (M13); треугольниками представлена конструкция 3 (rs-g3p(N1N2)); перевернутыми треугольниками представлена конструкция 4 (продукт слияния rs-g3p(N1N2)-Ig); а ромбами представлен отрицательный контроль r-IgG4 Fc.

Чтобы подтвердить, что белки слияния g3p согласно изобретению не связываются неспецифическим образом с неамилоидными белками и полимерами, такими как, например, гидрофобные белки и белковые полимеры, исследовали связывание конструкции 6 (50 нМ или 200 нМ) с неамилоидными белками/полимерами казеином (гидрофобный), желатином (полимер), эластином (коллагеновый полимер) и бычьим сывороточным альбумином (гидрофобный сывороточный белок). Волокна A $\beta$ 42 служили положительным контролем. Применяли формат ELISA, в котором по 100 нг каждого из исследуемых белков иммобилизовали на микротитровальных лунках с высокой адсорбцией (проводили исследования двух типов) с последующей инкубацией с конструкцией 6 или неродственным антителом IgG1 в качестве отрицательного контроля (200 нМ) на протяжении 1 ч при 37°C. Детекцию связанной конструкции 6 или отрицательного контроля IgG1 проводили после этапов блокирования и отмытки, применяя античеловеческое-Fc антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (ПХ). Количественную оценку проводили по поглощению на 405 нм после добавления ПХ-проявителя. Результаты показывают, что конструкция 6 связывает предпочтительно амилоидные волокна по сравнению с неамилоидными белковыми полимерами или гидрофобными белками. Связывание конструкции 6 с неамилоидными белками было сравнимо со связыванием неродственного антитела hIgG1, служившего отрицательным контролем.

Чтобы определить, играет ли валентность роль также и в дезагрегации, бивалентный продукт слияния rs-g3p(N1N2)-Ig (конструкция 4) сравнивали с пентавалентным M13 методом ловушки на фильтре (фиг. 19). Результаты свидетельствуют о том, что как бивалентный продукт слияния rs-g3p(N1N2)-Ig, так и пентавалентный M13 эффективно дезагрегируют волокна  $\beta$ -амилоида. Также показано, что валентность может быть важным фактором для эффективности дезагрегации, о чем свидетельствует способность 1,7 нМ пентавалентного M13 снижать количество агрегатов на уровне, близком к уровню 40 нМ продукта слияния rs-g3p(N1N2)-Ig (фиг. 19).

Аналогичным методом ловушки на фильтре оценивали способность  $1 \times 10^{12}$ /мл M13 (конструкция 2); 80 нМ и 800 нМ rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 5); и 80 нМ и 800 нМ rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) дезагрегировать волокна A $\beta$ 42. Конструкции 2, 5 и 6 эффективно дезагрегируют волокна  $\beta$ -амилоида (фиг. 33). Таким образом, белки слияния g3p можно применять в терапевтических или профилактических целях для лечения любого заболевания или нарушения, связанного с присутствием амилоида.

Пример 11. Тетрамерный белок стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] связывает и дезагрегирует fA $\beta$ .

Чтобы дополнительно оценить роль валентности в способности g3p связывать и дезагрегировать амилоид, получали тетрамерный конъюгированный со стрептавидином g3p(N1N2) путем смешивания rs-g3p(N1N2) с биотин-Lys-НТУ в присутствии NiSO<sub>4</sub>. Избыток лиганда удаляли при помощи 3 кДа НОММ мембраны. Добавляли стрептавидин, а избыток rs-g3p(N1N2)-биотин удаляли при помощи 100 кДа НОММ мембраны. Полученная в результате конструкция g3p, стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)], содержит четыре компонента rs-g3p(N1N2). Стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] сравнивали с rs-g3p(N1N2)

(конструкция 3) методом анализа связывания (фиг. 20). Тетрамерный стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] связывался с fA $\beta$  более эффективно, чем мономерный rs-g3p(N1N2), что дополнительно свидетельствует о том, что валентность является важным фактором для эффективности связывания (фиг. 20). Однако даже мономерный rs-g3p(N1N2) связывается с fA $\beta$  на терапевтически приемлемом уровне.

Чтобы определить, играет ли валентность роль также и в дезагрегации, мономерный rs-g3p(N1N2) сравнивали с тетрамерным стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] методом ловушки на фильтре (фиг. 21). Результаты свидетельствуют о том, что как мономерный rs-g3p(N1N2), так и тетрамерный стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] эффективно дезагрегируют волокна fA $\beta$ . Также показано, что валентность может быть важным фактором для эффективности дезагрегации, о чем свидетельствует повышенная способность 360 нМ тетрамерного стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] нейтрализовать до 200 нг агрегатов fA $\beta$  по сравнению со сниженной дезагрегацией A $\beta$  2,5 мкМ мономерным rs-g3p(N1N2) (фиг. 21, ряд 2 по сравнению с рядом 4, например).

Дезагрегацию A $\beta$ , осуществляемую стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)], также оценивали методом ПЭМ. Стрептавидин-[биотин-g3p(N1N2)] полностью дезагрегирует fA $\beta$ 42 после трех дней инкубации (фиг. 22).

Пример 12. Белки слияния g3p-Ig существенно снижают преобладающие A $\beta$ -бляшки в мышинной модели болезни Альцгеймера.

Используя хорошо известную мышиную модель болезни Альцгеймера (Hsiao et al., *Science* (1996) 274:99-102; Duyckaerts et al., *Acta Neuropathol* (2008) 115:5-38), самцов мышей штамма Tg2576 состарили до возраста, составляющего более 500 дней, проводили билатеральную инъекцию (2 мкл/инъекцию) в гиппокамп двух различных препаратов продуктов слияния N1N2-Ig (конструкции 5 в дозировке 7,8 мкг/инъекцию и конструкции 6 в дозировке 8,2 мкг/инъекцию) или солевого раствора в качестве отрицательного контроля и умерщвляли на 7 день. Ткань головного мозга собирали, делали срезы и окрашивали для проведения количественного анализа нагрузки бляшками при помощи моноклонального антитела к амилоиду- $\beta$  (82E1; cat. # MBS490005-IJ10323 от MyBioSource). Как показано на фиг. 28, оба белка слияния N1N2-Ig существенно снижали нагрузку бляшками в гиппокампе по сравнению с мышами, которых обрабатывали солевым раствором. Как показано на фиг. 29, оба белка слияния N1N2-Ig существенно снижали нагрузку бляшками в коре головного мозга по сравнению с мышами, которых обрабатывали солевым раствором.

В гиппокампе мышей штамма Tg2576 после обработки конструкциями 5 и 6 измеряли уровень синаптофизина - компонента нейронов в синапсах. Применяли антитело к синаптофизину SY38 (Millipore). Известно, что уровень синаптофизина коррелирует с синаптической плотностью и, таким образом, повышенная экспрессия свидетельствует о восстановлении от предшествующего повреждения бляшками. См. DaRocha-Souto et al. (2011) *J. Neuropathol Exp Neurol* 70(5):360-376. Как показано на фиг. 40, оба белка слияния N1N2-IgG существенно повышали уровень синаптофизина в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера. Результаты свидетельствуют о том, что вдобавок к снижению количества бляшек, лечение мышей с болезнью Альцгеймера белками слияния N1N2-Ig имеет дополнительные физиологические преимущества.

Аналогично, уровень Iba-1, маркера активации микроглии, которая считается необходимой для выведения бляшек (см., например, Wilcock et al. (2004) *J. Neurosci.* 24(27):6144-6151), определяли в гиппокампе мышей штамма Tg2576 после обработки конструкциями 5 и 6 с применением антитела к Iba-1. Как показано на фиг. 41, оба белка слияния N1N2-IgG существенно повышали уровень Iba-1 в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера при исследовании через 7 дней/недель после обработки. Эти результаты являются подтверждением того, что лечение болезни Альцгеймера белками слияния N1N2-Ig приводит к выведению бляшек.

Уровни глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ), маркера активации астроцитов и воспаления головного мозга, определяли в гиппокампе мышей штамма Tg2576 после обработки конструкциями 5 и 6 с применением антитела к ГФКБ (Millipore # AB5804). Известно, что при повреждении головного мозга повышается уровень ГФКБ. См., например, DaRocha-Souto et al. (2011) *J. Neuropathol Exp Neurol.* 70(5):360-376 at page 374. Таким образом, ГФКБ можно применять как маркер после любого конкретного вида лечения, чтобы оценить, приводит ли лечение к повышению уровня ГФКБ, что свидетельствует о том, что данное лечение может повредить мозг. Как показано на фиг. 42, ни один из белков слияния N1N2-IgG существенно не повышал уровень ГФКБ в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера, что позволяет предположить, что обработка мышей с болезнью Альцгеймера белками слияния N1N2-Ig не приводит к повреждению гиппокампа. Таким образом, белки слияния g3p можно применять в терапевтических или профилактических целях для лечения болезни Альцгеймера.

Пример 13. Белки слияния g3p-Ig блокируют индуцированную олигомерами A $\beta$  цитотоксичность.

Олигомеры A $\beta$  приводят к высвобождению некоторых токсичных ферментов в нейронах. Фермент можно проанализировать, чтобы определить, какой компонент может подавлять индуцированную олигомерами A $\beta$  цитотоксичность. На фиг. 32 представлены репрезентативные данные, показывающие, что M13 (конструкция 2) и rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) блокируют олигомер-индуцированную

токсичность по отношению к клеткам N2a. Следовательно, белки слияния g3p-Ig являются эффективными ингибиторами индуцированной олигомерами A $\beta$  цитотоксичности.

Пример 14. Белки слияния g3p-Ig связывают и дезагрегируют тау и снижают количество A $\beta$ -бляшек и p-тау у состаренных 3xTg мышей и состаренных тау-трансгенных мышей.

Чтобы оценить, связывается ли белок слияния g3p-Ig с тау, получали белок слияния фрагмент g3p-Ig, содержащий N1 и N2, и оценивали его способность связывать ftau методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Фиг. 35 иллюстрирует результаты одного репрезентативного ППР-анализа, показывающие, что rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (конструкция 4) эффективно связывает ftau. Фиг. 48 иллюстрирует результаты другого репрезентативного ППР-анализа, показывающие, что rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) эффективно связывает ftau.

Чтобы исследовать, может ли белок слияния g3p-Ig дезагрегировать тау, белок слияния фрагмент g3p-Ig, содержащий N1 и N2, исследовали методом анализа флуоресценции ThT на предмет его способности разлагать предварительно образованный ftau. Результаты свидетельствуют о том, что белок слияния g3p-Ig эффективно дезагрегирует ftau. См., фиг. 36A, 36B, 49A и 49B.

Чтобы исследовать, является ли белок слияния g3p-Ig эффективным *in vivo*, 19-20-месячным самцам и самкам мышей штамма 3xTg, который является известной моделью болезни Альцгеймера (см. Sterniczuk et al., 2010 Brain Res 1348:139; Sterniczuk et al., 2010 Brain Res 1348:149), делали прямую инъекцию rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) или контрольного раствора в область гиппокампа в мозге. Через 7 дней после инъекции собирали ткань головного мозга. Срезы подвергали иммуоокрашиванию для выявления бляшек A $\beta$  с применением моноклонального антитела к амилоиду- $\beta$  (82E1; cat. # MBS490005-IJ10323 от MyBioSource) или p-тау с применением антитела к PHF1 (см. Kosik et al., 1986, Proc Natl Acad Sci USA 83(11): 4044; PHF = спаренные спиральные филаменты (от англ. "paired helical filaments")). Спаренные спиральные филаменты представляют собой одно из семейств тау-содержащих волокон, которые собираются в крупные цитоплазматические агрегаты, известные как нейрофибрилярные клубки, и являются маркерами тау. Результаты показывают, что конструкция 6 существенно снижает уровень бляшек A $\beta$  в гиппокампе обработанных мышей по сравнению с контрольными животными (см., фиг. 52A). Также результаты показывают, что конструкция 6 существенно снижает уровень тау в гиппокампе обработанных мышей по сравнению с контрольными животными (см. фиг. 52B). Применяли односторонний критерий Даннетта (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Чтобы оценить способность белков слияния g3p согласно изобретению снижать количество тау в различных *in vivo* моделях, исследовали состаренных тау(P301L)-трансгенных мышей. Тау(P301L)-мышь сверхэкспрессирует тау и является известной моделью для изучения болезни Альцгеймера. Смотрите, Lewis J et al. (2000) Nat Genet 25:402-405. Состаренные P301L-мышь демонстрировали значительно пониженную активность, что относится к фенотипу, связанному с тау-патологией. Проводили непрерывную инфузию Конструкции 6 (при около 2 мг/кг) в позвоночник тау(P301L)-мышей (N=7) при помощи имплантированных интратекальных насосов на протяжении 14 дней. Через 14 дней проводили исследования двигательной активности мышей (расстояние, проходимое за 10 мин) слепым методом. Мыши, обработанные конструкцией 6, в отличие от мышей, обработанных ФСБ, демонстрировали значительно более высокую двигательную активность. Конструкция 6 не оказывала влияния на мышей дикого типа (N=10). Таким образом, белки слияния g3p согласно изобретению можно применять в терапевтических и/или профилактических целях при любом заболевании или нарушении, связанном с присутствием тау.

Пример 15. Белки слияния g3p-Ig подавляют накопление, агрегацию PrP<sup>Sc</sup> и образование PrP<sup>Sc</sup> в клеточной культуре, моделирующей прионное заболевание (N2a22L<sup>Sc</sup>).

Прионные заболевания характеризуются преобразованием нормального клеточного прионного белка (PrP<sup>C</sup>) в устойчивую к протеазам патологическую форму PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> отличается от PrP<sup>C</sup> на основании устойчивости к протеазам: протеаза частично расщепляет PrP<sup>Sc</sup> с образованием устойчивого к протеазам C-терминального корового фрагмента (PrPres), который характеризуется негликозилированной формой с молекулярной массой в 19-21 кДа. Подавление, инверсия и снижение количества PrP<sup>Sc</sup> представляют собой перспективный терапевтический подход к лечению некоторых дегенеративных заболеваний.

Чтобы определить, препятствует ли белок слияния g3p-Ig, содержащий N1 и N2, образованию патологических прионных конформеров (PrP<sup>Sc</sup>) в *in vitro* моделях прионного заболевания, и подтвердить наличие дезагрегации или изменения растворимости PrP в клетках N2a22L<sup>Sc</sup> в присутствии или отсутствии белка слияния g3p-Ig, клетки культивировали на протяжении 24 ч в отсутствие или присутствии 1 мкг/мл конструкции 6 или IgG и собирали в лизисный буфер. 100 мкг из всего белка подвергали ультрацентрифугированию при 4°C на протяжении 90 мин при 55000 об/мин в TLA 100.1 роторе в ультрацентрифуге Beckman Optima TL. 25 мкл образцов растворимого осадка и супернатанта подвергали ДСН-ПААГ и последующему анализу с применением анти-PrP антитела 6D11 mAb. Повышенная нерастворимость детергента предшествует приобретению PrP<sup>Sc</sup> или мутантными PrP устойчивости к протеиназе К (ПК), следовательно, была оценена способность белка слияния g3p-Ig изменять растворимость PrP. Клетки, обработанные конструкцией 6, демонстрировали значительно сниженные количества агрегированного/нерастворимого PrP по сравнению с клетками N2a22L<sup>Sc</sup>, обработанными IgG (см. фиг. 38A и 38B).

Для фиг. 38А и 38В клетки N2a22L<sup>Sc</sup> получали так, как описано ранее (Pankiewicz et al., Eur. J. Neurosci. (2006) 23:2635-2647). Вкратце, головной мозг неизлечимо больных мышей штамма CD-1, инфицированных адаптированным к мышинному организму прионным штаммом 22L, гомогенизировали сонификацией (10% мас./об.) в холодном фосфатно-солевом буфере и 5% декстрозы в стерильных условиях. Для инфицирования мозговой гомогенат дополнительно разводили до 2% в Opti-MEM и добавляли в субконфлюэнтные шестилуночные планшеты (Corning, Acton, MA, USA), 1 мл на 10-см<sup>2</sup> лунку. Через 5 ч добавляли 1 мл нормального MEM и инкубировали клетки в присутствии инфекционного мозгового гомогената на протяжении дополнительных 12 ч. Клетки отмывали и добавляли стандартную питательную среду MEM. Клетки выращивали до появления непрерывного слоя, а затем разводили 1:2 и перемещали в 25-см<sup>2</sup> колбы (Corning). Клетки, выращенные в одной из колб, разводили 1:2 каждые четыре дня, чтобы это привело к образованию последующих пассажей, в то время как клетки, выращенные в другой колбе, собирали и гомогенизировали для того, чтобы исследовать уровень PrP<sup>Sc</sup>. Согласно результатам предварительных исследований присутствие полученного из инокулята PrP<sup>Sc</sup> детектируется только в первом и втором пассажах, поэтому для всех последующих исследований использовали клетки 4 (P4). Клетки лизировали в гомогенизирующем буфере, состоящем из (50 мМ Трис-HCl, pH 7,4; 150 мМ NaCl, 1 мМ этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТК), 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мМ NaF, 2,5 мМ Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 мМ β-глицерофосфата, 1% NP-40, 0,25% дезоксихолата натрия, 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ), 1 мМ лейпептина, 1 мМ пепстатина А, 1 мМ) или без ФМСФ для расщепления ПК, на протяжении 5 мин при 4°C, а нерастворимые материалы удаляли центрифугированием при 10000g на протяжении 10 мин при 4°C. Для фракционирования клеток 100 мкг белка центрифугировали при 55000 об/мин на протяжении 90 мин, после чего осадок восстанавливали в исходном объеме. 20% осадка и супернатанта перерастворяли и проводили биохимический анализ.

Чтобы узнать, меняют ли белки слияния g3p-Ig дозозависимым образом процесс размножения PrP<sup>Sc</sup> путем дезагрегации или изменения его физико-химических свойств, клетки N2a22L<sup>Sc</sup> культивировали на протяжении 24 ч в отсутствие или присутствии возрастающих концентраций конструкции 6 или IgG и собирали в лизисный буфер. Аликвоты лизированных клеток с или без обработки ПК подвергали ДСН-ПААГ и последующему анализу с применением анти-PrP антител 6D11 и 6H4 mAb. Оценивали иммунореактивность PrP в биохимически разрешенном ПК-расщепленном и нерасщепленном лизате, полученном из клеток, обработанных контрольным IgG и конструкцией 6. Обработка включала: N2a22L<sup>Sc</sup> + 10 мкг/мл, 3 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,333 мкг/мл, 0,111 мкг/мл, 0,037 мкг/мл, 0,012 мкг/мл и 0,004 мкг/мл конструкции 6 или N2a22L<sup>Sc</sup> + 1 мкг/мл mIgG.

Результаты указывают на существенное дозозависимое снижение количества PrP<sup>Sc</sup> в присутствии конструкции 6, при этом в присутствии 0,08 мкг/мл конструкции 6 наблюдали на 50% меньшее образование PrP<sup>Sc</sup> по сравнению с 1 мкг/мл IgG (см. фиг. 39А и 39В). Повторные эксперименты подтверждали данные результаты.

Чтобы оценить устойчивый к протеинкиназе К (ПК) конформер PrP, аликвоты лизированных клеток обрабатывали 1:50 раствором ПК (1 мкг/мкг) при 37°C на протяжении 30 мин в соответствии с известными методами (Perrier et al., J. Neurochem (2004) 84:454-463, Pankiewicz et al., Eur. J. Neurosci (2006) 23:2635-2647). После инкубации расщепление останавливали, добавляя ФМСФ до 4 мМ.

Концентрации белка определяли при помощи белкового ВСА-анализа (Pierce). Образцы разводили в буфере (250 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 10% ДСН, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 50% глицерола, 0,02% кумасси голубого G250) и кипятили на протяжении 5 мин. Обработанные образцы подвергали ДСН-ПААГ в восстановительных условиях.

Для получения характеристик образцов применяли моноклональные анти-PrP антитела 6D11 (см. Sadowski et al. (2009) Neurobiol Dis. 34(2): 267-278) и 6H4 (см. Cordes et al. (2008) J. Immunol. Methods 337:106-120), а также антиактин. Комплексы антиген-антитело регистрировали, используя конъюгированный с пероксидазой хрена антимышиный IgG (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), и визуализировали при помощи системы ECL (GE Healthcare UK Limited), следуя инструкциям производителя. Количественное определение белковых полос проводили методом денситометрического анализа пленок (Image J, NIH).

Все результаты, представленные на фиг. 38А и 38В, а также 39А и 39В, демонстрируют способность белка слияния g3p-Ig прямым образом подавлять образование PrP<sup>Sc</sup> in vitro. Таким образом, белки слияния g3p согласно изобретению можно применять в терапевтических и/или профилактических целях при любом заболевании или нарушении, связанном с присутствием прионов.

Пример 16. ЯМР-исследования.

Чтобы оценить остатки fAβ42, которые взаимодействуют с rs-g3p(N1N2) (конструкция 3), анализировали водородно-дейтериевый обмен (H/D) в случае fAβ42 методом <sup>15</sup>N-HSQC ЯМР. См., например, Sanchez et al. (2011) J. Am. Chem. Soc. 133:6505-08. Исследовали водородно-дейтериевый обмен (H/D) амидных водородов скелета, чтобы уточнить скорость диссоциации молекул Aβ из волокон, чтобы определить связывающее вещество, действующее на амилоидные волокна, и чтобы проверить, была ли искажена структура волокон вследствие связывания конструкцией 3.

Получали зрелые амилоидные волокна (fA $\beta$ 42) из одинаково меченых  $^{15}\text{N}$  мономеров A $\beta$  и подвергали их воздействию D $_2$ O на протяжении от 0 до 744 ч (0-31 дней) при 37°C в присутствии и отсутствие конструкции 3. После обработки конструкцией 3 волокна подвергали лиофилизации, а лиофилизированный материал растворяли в растворе диметилсульфоксида/дихлоруксусной кислоты (DMCO/ДХУ). Затем измеряли соотношение между H и D, связанными с каждой аминокислотой, используя  $^{15}\text{N}$ -HSQC ЯМР спектры. Когда происходил дальнейший H/D обмен в растворе DMCO/ДХУ, для каждого времени взаимодействия волокон с D $_2$ O измеряли зависимость соотношения между H и D в растворе DMCO/ДХУ, а данные экстраполировали относительно времени растворения в DMCO/ДХУ. Для ознакомления с методами, см., например, Whittemore et al. (2005) *Biochemistry* 44:4434-41 and Sanchez et al. (2011) *J. Am. Chem. Soc.* 133:6505-08.

Эксперименты по H/D проводили в присутствии и отсутствие конструкции 3 при стехиометрическом соотношении 1:3 для конструкции 3: fA $\beta$ 42 (25:75 мкМ). Для гарантии насыщенного связывания использовали 10-кратное превышение.

Результаты свидетельствуют о том, что H/D обмен не соответствует однофазному процессу, который ранее наблюдали для волокон A $\beta$  и для других амилоидов (Yamaguchi et al. (2004) *J. Mol. Bio* 338:559-571; Sanchez et al., 2011). В отсутствие конструкции 3 обменный профиль показал, что два отрезка последовательности A $\beta$ 1-42, а именно остатки 17-27 и 31-40, были относительно защищены от H/D обмена. Добавление конструкции 3 привело к повышению защиты остатков 17-22 и 33-40. Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что конструкция 3 распознает волокна A $\beta$  через остатки гидрофобной внутренней части. Стоит отметить, что остатки 18, 32, 36 и 41 были исключены из анализа вследствие сигнального перекрытия, а обмен в остатках 2, 7, 8, 14, 30 и 38 произошел еще во время растворения в DMCO/ДХУ, следовательно, влияние на эти остатки не учитывали, а об их вкладе можно судить только по данным для смежных аминокислот.

Результаты также свидетельствуют о том, что защита проявляется главным образом на более медленной стадии обмена, которая сильно подавляется.

Взаимодействие между конструкцией 3 и fA $\beta$ 42 также анализировали методом ПЭМ. Результаты показывают, что инкубация конструкции 3 с предварительно сформированным fA $\beta$ 42 на протяжении 744 ч повышает количество аморфных агрегатов и, таким образом, дезагрегирует предварительно сформированный fA $\beta$ 42. ПЭМ fA $\beta$ 42, образованных при pH 2,0, каждый раз показывала наличие плотных сетей из волокон, а для четкого определения морфологии часто требовалось 10-кратное разведение. Образованные волокна представляли собой четко выраженные индивидуальные волокна с наблюдаемой скрученностью и слабой боковой ассоциацией, аналогичными тем, что ранее наблюдали для A $\beta$ 42 (Olofsson et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:477-83) и скрученного A $\beta$ 40 (Petkova et al. (2005) *Science* 307:262-65). Аморфные агрегаты были относительно редкими, в то время как олигомерные структуры наблюдали на большинстве изображений в виде второстепенных фоновых компонентов. Олигомеры и аморфные агрегаты вместе с небольшими количествами волокон чаще наблюдали на изображениях, полученных для супернатанта, оставшегося после центрифугирования на 190000 RCF $_{\text{MAX}}$ .

ПЭМ образцов, отобранных во время этапов H/D обмена (в буфере с pH 7,4), но не центрифугированных, показала повышенное количество аморфных агрегатов по сравнению с исходным препаратом. Аморфные агрегаты не центрифугировали вместе с fA $\beta$ 42. Через 744 ч нецентрифугированный материал содержал меньшее количество волокон в случае присутствия конструкции 3. Следовательно, через 744 ч конструкция 3 дезагрегирует предварительно сформированный fA $\beta$ 42.

Схема эксперимента приведена на фиг. 45. На фиг. 46 показано графическое представление остатков на fA $\beta$ 42, которые взаимодействуют с конструкцией 3. На фиг. 47 приведена репрезентативная ПЭМ конструкции 3, дезагрегирующей предварительно сформированный fA $\beta$ 42 через 744 ч.

Пример 17. Белок слияния If1 N1N2 эффективно связывается с fA $\beta$ 42.

Фаг If1 и фаг M13 характеризуются приблизительно 30% идентичности в отношении домена N1 g3p, но практически неидентичны в отношении доменов N2. Конструкцию слияния g3p N1N2-IgG-Fc получали таким образом, чтобы область N1N2 g3p принадлежала фагу If1 (конструкция 8; SEQ ID NO: 31 и 32). Конструкцию 8 анализировали методом ППР, чтобы определить аффинность ее связывания с волокнами A $\beta$ . 100 мкМ волокон A $\beta$ 42 (rPeptide A $\beta$ 1-42, сформированного в 10 мМ HCl на протяжении 3 дней) смешивали в соотношении 1:1 с 10 мМ NaAc, pH 5,0 и иммобилизовали на поверхностях СМЗ. Приблизительно 2 мкМ конструкции 3 (неслитый белок N1N2 g3p) и конструкции 8 в подвижном буфере [10 мМ ГЭПЭС, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,005% P20] пропускали вдоль поверхностей биочипа при 5 мкл/мин на протяжении 10-12 мин. Все образцы готовили при 25°C. Результаты приведены на фиг. 50А. Конструкция 8 прочно связывает фибриллы A $\beta$  с K $_D$ , составляющей ~36 нМ. N1N2-фрагмент g3p (не связанный с Fc-доменом) демонстрировал более слабое связывание (K $_D$  ~36 пМ).

Далее проводили еще один анализ связывания амилоидных волокон, чтобы сравнить способность If1 N1N2 g3p и M13 N1N2 g3p связывать fA $\beta$ . В этом анализе M13-Alexa488 смешивали с A $\beta$  (fA $\beta$ ) на протяжении 2-3 ч, чтобы обеспечить образование комплексов, добавляли исследуемые конструкции (If1

N1N2 g3p и M13 N1N2 g3p; обе без Fc-доменов), затем комплексы осаждали центрифугированием при 7500×g на протяжении 10 мин. Флуоресценция в осадке была пропорциональна количеству M13, связанного с амилоидом. Данный анализ обеспечивает как количественную характеристику связывания фага с fAβ, так и систему для оценки способности других веществ конкурировать с фагом за связывание. На фиг. 50B представлены результаты, которые показывают, что If1 N1N2 g3p связывает приблизительно в четыре раза лучше, чем M13 N1N2 g3p.

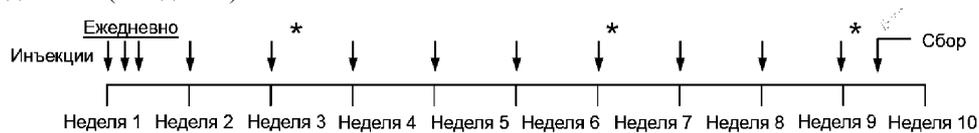
Пример 18. Белки слияния g3p-Ig снижают количество амилоида и улучшают поведение, связанное с болезнью Альцгеймера у состаренных мышей штамма Tg2576 при систематическом введении.

Чтобы определить, эффективны ли белки слияния g3p-Ig для лечения болезни Альцгеймера при систематическом введении, 10 мг/кг rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6) или ФСБ внутрибрюшинно вводили состаренным мышам штамма Tg2576 (вышедшим из репродуктивного возраста самцам-производителям в возрасте от 21 до 23 месяцев). Для всех мышей проводили предварительную анти-CD4 обработку (0,5 мг-IP) для подавления возможного периферического иммунного ответа на систематически вводимый rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (конструкция 6).

На 3 неделю мышей исследовали на предмет миоклонических прыжков в углу, что позволяет оценить функцию гиппокампа, стриатума и участков, вовлеченных в координацию и контроль движений (ствол головного мозга, мозжечок, двигательная зона коры головного мозга). См. Lalonde & Strazielle, 2012, *Neurosci Res*, 74(2):69. Это поведение аналогично миоклонусу, наблюдаемому у пациентов с поздней стадией болезни Альцгеймера. См. Lalonde et al., 2012, *Rev. Neurosci*, 23(4):363. Наблюдения за мышами в новой для них обстановке проводили более 5 мин, при этом наблюдали большое количество приступов непрерывных прыжков и/или попыток вскарабкаться вверх стоя на задних лапах в углу клетки. Результаты свидетельствуют о том, что мыши, которые получали конструкцию 6, демонстрировали значительно меньшее количество приступов миоклонических прыжков в углу по сравнению с мышами, получавшими контрольный ФСБ. См. фиг. 55.

На 6 неделю мышей исследовали на предмет гиперактивности, оценивая общее расстояние пробега, см. фиг. 53А и . 53В, и вращение, см. фиг. 54. В данных методах анализа исследуют улучшение гиперактивности, измеряя общее расстояние, пройденное в новой обстановке. Этот поведенческий анализ моделирует повышенное возбуждение, обычно наблюдаемое у пациентов с БА. См. Mega et al., 1996 *Neurology* 46:130; и King et al., 1999 *Brain Res*, 103:145. Мышей на 10 мин помещали на квадратную площадку площадью 40 см × 40 см и в режиме реального времени подсчитывали спонтанные поступки и движения при помощи системы видеонаблюдения. Результаты свидетельствуют о том, что мыши, которые получали конструкцию 6, демонстрировали значительно сниженную спонтанную локомоторную активность по сравнению с мышами, получавшими контрольный ФСБ. См. фиг. 53А и 53В. Мыши, которые получали конструкцию 6, также демонстрировали сниженное вращение по сравнению с мышами, получавшими контрольный ФСБ, см. фиг. 54.

На 9 неделю мышей исследовали на предмет спонтанных альтернатив при прохождении Y-образного лабиринта, что позволяет оценить кратковременную пространственную память и способность исследовать новую обстановку у грызунов. См. Hughes, 2004 *Neurosci & Biobehav Rev*, 28:497, см. фиг. 56. Мыши с нарушениями кратковременной памяти, такие как животные из мышинной модели Tg2576, демонстрируют меньше спонтанных альтернатив по сравнению с мышами, обладающими нормальной кратковременной памятью. Данный эксперимент симулирует нарушения кратковременной и пространственной памяти, наблюдаемые у пациентов с БА. Мышей помещали в Y-образный лабиринт на 10 мин и следили за заходами в рукава при помощи автоматической видеосистемы слежения. Мыши, получавшие конструкцию 6, демонстрировали существенно больше спонтанных альтернатив при захождении в рукава Y-образного лабиринта по сравнению с мышами, получавшими контрольный ФСБ, что указывает на улучшение памяти. Ниже приведена схема, на которой показаны временные точки, в которые проводили инъекции ФСБ или конструкции 6 (стрелки), а также временные точки, в которые проводили поведенческие исследования (звездочки).



Через 10 недель мышей, обработанных конструкцией 6, и мышей, обработанных ФСБ, умерщвляли и проводили оценку снижения нагрузки Aβ-бляшками путем окрашивания антител к Aβ и путем окрашивания тиофлавином S. Результаты свидетельствуют о том, что систематическое введение белка слияния g3p-Ig существенно снизило нагрузку Aβ-бляшками в гиппокампе мышей с болезнью Альцгеймера.

В отдельном эксперименте конструкцию 6 еженедельно доставляли внутрибрюшинно (в.б.) мышам моделирующей болезнь Альцгеймера штамма Tg2576 в возрасте >19 месяцев на протяжении 10 недель в 3 дозировочных группах (0,2 мг/кг, N=13; 2 мг/кг, N=12; и 20 мг/кг, N=13). Группа, обработанная ФСБ (N=13), служила отрицательным контролем. Исследования спонтанных альтернатив для мышей, обработанных конструкцией 6, показали дозозависимое улучшение пространственной памяти, т.е. группа, по-

лучавшая 20 мг/кг, демонстрировала существенное улучшение. Вместе эти результаты показывают, что у мышей штамма Tg2576 белки слияния g3p-Ig улучшают многие психомоторные фенотипы и когнитивные дефициты, которые аналогичны симптомам, наблюдаемым у пациентов, имеющих от средней до поздней стадии болезни Альцгеймера, а также снижают количество амилоида в головном мозге. Таким образом, систематическое введение белков слияния g3p можно применять в терапевтических и/или профилактических целях для лечения болезни Альцгеймера.

Пример 19. Клонирование, экспрессия и очистка конструкции 6.

оцДНК M13 выделяли при помощи набора реагентов QIAprep Spin M13 kit (Qiagen, Cat#27704). Домен N1-линкер-N2-линкер M13 g3p (g3pN1N2) амплифицировали при помощи ПЦП с прямым праймером (AAAAAAGGGAATTCGATGGCTGAAACTGTTGAAAGTTG; SEQ ID NO: 33) и обратным праймером (AAAAAACCATGGGCACCGGAACCAGAGCCAC; SEQ ID NO: 34). Продукт ПЦП g3pN1N2 (который кодирует аминокислоты 22-277 из SEQ ID NO: 13) и вектор pFUSE-hIgG1-Fc2 (InvivoGen, Cat# pfuse-hglfc2) расщепляли рестрикционными ферментами EcoRI-HF (New England Biolabs, Cat#R3101) и NcoI-HF (New England Biolabs, Cat#R3193). Этот вектор кодирует сигнальную последовательность IL2 (аминокислоты 1-20 из SEQ ID NO: 13), сайт множественного клонирования и человеческий IgG1-Fc2 (аминокислоты 287-509 из SEQ ID NO: 13). Расщепленный вектор дефосфорилировали и лигировали с расщепленной вставкой. Продукт лигирования трансформировали в NEB 5α компетентную E. coli (New England Biolabs, Cat# C2987). Прогнозируемо продукт лигирования кодирует метионин (аминокислоту 21 из SEQ ID NO: 13) между сигнальной последовательностью и первой аминокислотой g3pN1N2 вследствие использования сайта множественного клонирования в векторе pFUSE-hIgG1-Fc2. Для получения плазмид выбирали и выращивали трансформанты из индивидуальных колоний. Плазмиды выделяли и проводили исследования размера вставки путем рестрикционного расщепления и электрофореза в агарозном геле. Кандидатные плазмиды IgG1Fc-g3p(N1N2) подтверждали секвенированием ДНК.

Плазмиды получали при помощи не содержащего эндотоксинов набора реагентов Maxi kit (Qiagen) и стерилизовали фильтрацией. Высокопроизводительную белковую экспрессию осуществляли при помощи экспрессионной системы Expi293™ (Life Technologies, Cat# A14635), как описано ниже.

Клетки Expi293F™ культивировали в соответствии с инструкциями производителя. Трансфекции проводили в шуттель-аппарате в культурах объемом от 30 мл до 0,5 л. Клетки разводили до  $2 \times 10^6$  клеток/мл за день перед проведением трансфекции. Для трансфекции 30 мл клеточной суспензии ( $2,5 \times 10^6$  клеток/мл) 30 мкг плазмидной ДНК разводили в 1,5 мл Opti-MEM, а 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 разводили в 1,5 мл Opti-MEM. Каждую смесь инкубировали на протяжении 5 мин перед добавлением плазмидной ДНК к реагенту ExpiFectamine™ 293 с последующей дополнительной 20-30-минутной инкубацией. Смесь ДНК-реагент ExpiFectamine™ 293 медленно добавляли к клеткам, аккуратно взбалтывая. Клетки инкубировали приблизительно на протяжении 16 ч перед добавлением 150 мкл трансфекционного усилителя I ExpiFectamine™ 293 и 1,5 мл трансфекционного усилителя II ExpiFectamine™ 293. Клетки инкубировали еще 5-6 дней перед сбором среды. Клеточную среду собирали центрифугированием на  $10000 \times g$  на протяжении 30 мин и держали в стерильных условиях при 4°C до очистки.

Очистку экспрессированного белка слияния осуществляли при помощи HiTrap™ rProtein A FF колонок (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Колонки регенерировали элюционным буфером - 0,1М глицин-HCl буфером, pH 3, уравновешенным 20 мМ фосфат-натриевым буфером, pH 7, и добавляли образец в соответствии с инструкциями производителя. После отмывки 20 мМ фосфат-натриевым буфером, pH 7, белок элюировали 0,1М глицин-HCl буфером, pH 3, в колбы, содержащие Трис-буфер, pH 9. Степень очистки белка слияния проверяли в ДСН-ПААГ гелях с последующим окрашиванием кумасси, после чего белок диализировали в ФСБ, pH 7, концентрировали и стерилизовали фильтрацией с применением 30 т спиновых фильтров Amicon® Ultracel (EMD Millipore Corp, Billerica, MA) и спиновых колонок Ultrafree CL соответственно (EMD Millipore Corp, Billerica, MA). Перед применением все белки хранили при 4°C.

Прогнозировалось, что полученный в результате белок слияния будет соответствовать аминокислотам 21-509 из SEQ ID NO: 13. Пептидная последовательность очищенного белка слияния, как оказалось, соответствовала аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 23-508 из SEQ ID NO: 13, что свидетельствует о том, что Met21, Ala22 и Lys509 были удалены клетками Expi293F™ во время рекомбинантного получения. Неизвестно, будет ли иметь место аналогичный процессинг, а если будет, то в какой степени, при рекомбинантном получении в других эукариотических и неэукариотических экспрессионных системах. Считается, что такой процессинг (или его отсутствие) не будет влиять на способность экспрессируемого белка слияния связывать и приводить к дезагрегации амилоида.

Пример 20. Белки слияния g3p-Ig снижают количество амилоида при амиотрофическом боковом склерозе (АБС).

Чтобы определить, применимы ли белки слияния g3p для снижения количества амилоида при амиотрофическом боковом склерозе (АБС), исследовали типовой белок слияния g3p-Ig (конструкция 6) на предмет его способности препятствовать сборке волокон SOD-1, которая непосредственно связана с патологией АБС. Мономеры SOD-1 (апофермент, 3,5 мкМ в ФСБ, 5 мМ ЭДТК, 1 мМ βМЕ) перемешивали

при 100 об/мин на протяжении 24 ч в присутствии или отсутствие конструкции 6 (1,5 мкМ, 0,75 мкМ, 0,15 мкМ). Образование волокон (т.е. агрегацию мономеров в волокна) определяли по флуоресценции тиофлавина Т (ThT). Мономеры SOD-1 образовывали волокна в отсутствие конструкции 6. При этом конструкция 6 подавляла образование волокон SOD-1 с IC<sub>50</sub>, составляющей ~0,75 мкМ. Таким образом, белки слияния g3r-Ig согласно изобретению снижают количество амилоида в модели АБС и, следовательно, их можно применять в терапевтических и/или профилактических целях для лечения АБС.

Пример 21. Белки слияния g3r-Ig снижают количество  $\alpha$ -синуклеина при болезни Паркинсона.

Для исследования эффективности белков слияния g3r согласно изобретению в *in vivo* модели болезни Паркинсона (БП), 8-месячным мышам со сверхэкспрессией человеческого  $\alpha$ -синуклеина (Line 61, E. Masliah, N=9/группу) проводили билатеральные инъекции 2 мкл конструкции 6 (5,3 мг/мл) или ФСБ в хвост. Нетрансгенным мышам (N=5) также проводили инъекции ФСБ в качестве дополнительного контроля. Всех мышей умерщвляли через 14 дней после инъекции, а мозговые ткани брали для нейропатологического и биохимического анализа. Измерения устойчивого к протеинкиназе К  $\alpha$ -синуклеина в гомогенатах стриатума показали, что у мышей, обработанных конструкцией 6, количество агрегатов  $\alpha$ -синуклеина было существенно ниже, а уровни тирозингидроксилазы (фермента синтеза дофамина) существенно выше, что свидетельствует о клиническом улучшении. Таким образом, белки слияния g3r согласно изобретению снижают количество амилоида в модели болезни Паркинсона и, следовательно, их можно применять в терапевтических и/или профилактических целях для лечения болезни Паркинсона.

Пример 22. Белки слияния g3r успешно лечат амилоидоз.

Агрегированный транстретин (ttr) является отличительным признаком амилоидоза. Чтобы подтвердить, что белки слияния g3r согласно изобретению способны лечить амилоидоз, исследовали типовой белок слияния g3r на предмет способности связываться с агрегированным ttr. Ttr, экспрессируемый *E. coli* и очищенный до степени чистоты >90%, агрегировали путем инкубации при 0,2 мг/мл в агрегационном буфере (100 нМ ацетата натрия, 100 мМ KCl, 1 нМ ЭДТК, pH 4,3) при 37°C с или без перемешивания (350 об/мин). Полученные в результате волокна, подтвержденные флуоресценцией ThT и трансмиссионной электронной микроскопией, серийно разводили на нитроцеллюлозной мембране для проведения вестерн-блоттинга. Мембраны инкубировали или с конструкцией 6, типовым белком слияния g3r согласно изобретению (100 нМ), или с антителом к ttr для проведения количественной оценки связывания. Нативный ttr (тетрамеры) и волокна A $\beta$ 42 использовали в качестве контроля. Конструкцию 6 детектировали при помощи HRP-конъюгированного козляного античеловеческого IgG антитела. Результаты показывают, что конструкция 6 количественно связывается с волокнами ttr, полученными с или без перемешивания, но не распознает нативный ttr. Мембрана, обработанная антителом к ttr, служила в качестве контроля связывания и показала, что и агрегированные, и нативные препараты ttr количественно удерживались на мембране, а антитело к ttr не распознавало контрольные волокна A $\beta$ 42. Таким образом, белки слияния g3r, включая конструкцию 6, эффективно связывают агрегированный ttr, который непосредственно связан с патофизиологией амилоидоза, и не связывают нативный ttr, нормальный физиологический тетрамер. Эти данные подтверждают, что белки слияния g3r согласно изобретению связываются с амилоидной конформацией ttr и, следовательно, их можно применять в терапевтических и/или профилактических целях для лечения амилоидоза.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок слияния, который способен связывать амилоид и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

- (a) последовательности аминокислот 21-506 из SEQ ID NO: 9;
- (b) последовательности аминокислот 22-506 из SEQ ID NO: 9;
- (c) последовательности аминокислот 23-506 из SEQ ID NO: 9;
- (d) последовательности аминокислот 21-505 из SEQ ID NO: 9;
- (e) последовательности аминокислот 22-505 из SEQ ID NO: 9;
- (f) последовательности аминокислот 23-506 из SEQ ID NO: 9;
- (g) последовательности аминокислот 21-506 из SEQ ID NO: 11;
- (h) последовательности аминокислот 22-506 из SEQ ID NO: 11;
- (i) последовательности аминокислот 23-506 из SEQ ID NO: 11;
- (j) последовательности аминокислот 21-505 из SEQ ID NO: 11;
- (k) последовательности аминокислот 22-505 из SEQ ID NO: 11;
- (l) последовательности аминокислот 23-505 из SEQ ID NO: 11;
- (m) последовательности аминокислот 21-509 из SEQ ID NO: 13;
- (n) последовательности аминокислот 22-509 из SEQ ID NO: 13;
- (o) последовательности аминокислот 23-509 из SEQ ID NO: 13;
- (p) последовательности аминокислот 21-508 из SEQ ID NO: 13;
- (q) последовательности аминокислот 22-508 из SEQ ID NO: 13;
- (r) последовательности аминокислот 23-508 из SEQ ID NO: 13;

(s) последовательности аминокислот 21-528 из SEQ ID NO: 31;  
(t) последовательности аминокислот 22-528 из SEQ ID NO: 31;  
(u) последовательности аминокислот 23-528 из SEQ ID NO: 31;  
(v) последовательности аминокислот 21-527 из SEQ ID NO: 31;  
(w) последовательности аминокислот 22-527 из SEQ ID NO: 31;  
(x) последовательности аминокислот 23-527 из SEQ ID NO: 31 и  
(y) мутантной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности по любому из (a)-(x).

2. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что мутантная последовательность отличается от последовательности по любому из (a)-(x) пятью или менее аминокислотными заменами.

3. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что содержит последовательность аминокислот 21-509 из SEQ ID NO: 13 или мутантную последовательность, которая отличается от последовательности аминокислот 21-509 из SEQ ID NO: 13 пятью или менее аминокислотными заменами.

4. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что содержит последовательность аминокислот 22-509 из SEQ ID NO: 13 или мутантную последовательность, которая отличается от последовательности аминокислот 22-509 из SEQ ID NO: 13 пятью или менее аминокислотными заменами.

5. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что содержит последовательность аминокислот 23-509 из SEQ ID NO: 13 или мутантную последовательность, которая отличается от последовательности аминокислот 23-509 из SEQ ID NO: 13 пятью или менее аминокислотными заменами.

6. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что содержит последовательность аминокислот 21-508 из SEQ ID NO: 13 или мутантную последовательность, которая отличается от последовательности аминокислот 21-508 из SEQ ID NO: 13 пятью или менее аминокислотными заменами.

7. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что содержит последовательность аминокислот 22-508 из SEQ ID NO: 13 или мутантную последовательность, которая отличается от последовательности аминокислот 22-508 из SEQ ID NO: 13 пятью или менее аминокислотными заменами.

8. Белок слияния по п.1, отличающийся тем, что содержит последовательность аминокислот 23-508 из SEQ ID NO: 13 или мутантную последовательность, которая отличается от последовательности аминокислот 23-508 из SEQ ID NO: 13 пятью или менее аминокислотными заменами.

9. Белок слияния по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что является менее иммуногенным для человека, чем белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 31.

10. Фармацевтическая композиция для снижения количества амилоида, подавления образования амилоида, подавления агрегации амилоида или удаления и/или предотвращения образования токсичных амилоидных олигомеров у пациента, содержащая терапевтически эффективное количество белка слияния по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Применение белка слияния по любому из пп.1-9 для производства лекарственного средства для снижения количества амилоида, подавления образования амилоида, подавления агрегации амилоида или удаления и/или предотвращения образования токсичных амилоидных олигомеров у пациента.

12. Применение по п.11, отличающееся тем, что пациент страдает заболеванием или состоянием, ассоциированным с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, причем заболевание или состояние выбрано из болезни Альцгеймера, в частности болезни Альцгеймера с ранним началом, болезни Альцгеймера с поздним началом или предсимптоматической болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, САА-амилоидоза, заболевания, характеризующегося образованием амилоидного белка агрегацией цистатина С, заболевания, характеризующегося образованием амилоидного белка агрегацией легкой цепи IgG, семейной амилоидотической полинейропатии (САП), в частности финской формы САП (агрегация гельзолина), семейной амилоидной кардиомиопатии (САК), старческого системного амилоидоза (ССА), амилоидоза ОАПП (островкового амилоидного полипептида), наследственного исландского синдрома, множественной миеломы, прионных заболеваний, болезни куру, болезни Крейтцфельдта-Якоба (БКЯ), болезни Герстманна-Штраусслера-Шейнкера (ГШШ), фатальной семейной бессонницы (ФСБ), скрепи, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭКРС), амиотрофического бокового склероза (АБС), спинально-церебеллярной атаксии (СЦА1, СЦА3, СЦА6 или СЦА7), болезни Хантингтона, дентаторубро-паллидолюисовой атрофии, спинальной и бульбарной мышечной атрофии, наследственной церебральной амилоидной ангиопатии, семейного амилоидоза, лобно-височной деменции, британской/датской деменции и семейной энцефалопатии.

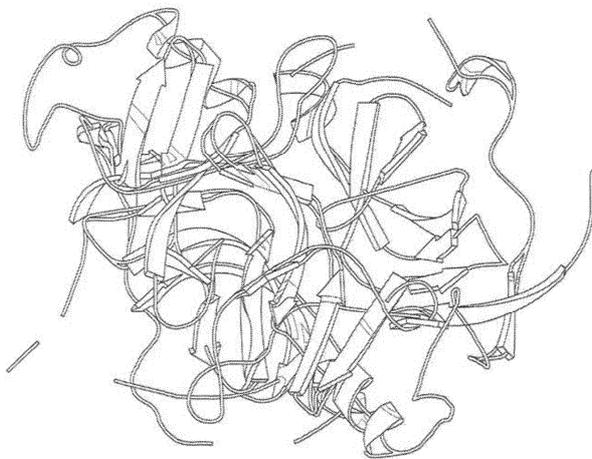
13. Применение по п.11 или 12, отличающееся тем, что пациент является позитивным в отношении флорбетапира, используемого в качестве визуализирующего вещества в позитронно-эмиссионной томографии.

14. Применение по п.12 или 13, отличающееся тем, что заболевание представляет собой болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона.

15. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния по любому из пп.1-9.

16. Нуклеотидная последовательность по п.15, выбранная из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 32.

17. Вектор, содержащий нуклеотидную последовательность по п.15 или 16.
18. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.17.
19. Клетка-хозяин по п.18, выбранная из клетки *Pichia*, клетки *Saccharomyces*, клетки *Aspergillus*, клетки *E. coli*, клетки NSO, клетки CHO, модифицированной клетки CHO, клетки НЕК293, модифицированной клетки НЕК293, клетки COS и клетки HeLa.
20. Клетка-хозяин по п.19, представляющая собой клетку CHO, модифицированную клетку CHO, клетку НЕК293 или модифицированную клетку НЕК293.
21. Клетка-хозяин по п.20, представляющая собой клетку CHO или модифицированную клетку CHO.
22. Способ получения белка слияния по любому из пп.1-9, включающий обеспечение экспрессии нуклеиновой кислоты в векторе по п.17 и выделение полученного белка.
23. Способ снижения агрегатов амилоида или белка тау у пациента, включающий введение эффективного количества белка слияния по любому из пп.1-9.
24. Способ по п.23, отличающийся тем, что пациент проявляет симптомы заболевания, которое ассоциировано с присутствием агрегатов амилоида или белка тау.
25. Способ по п.23 или 24, отличающийся тем, что пациент является позитивным в отношении флорбетапира, используемого в качестве визуализирующего вещества в позитронной эмиссионной томографии.
26. Способ по любому из пп.23-25, отличающийся тем, что пациент страдает заболеванием или состоянием, ассоциированным с неправильно свернутым и/или агрегированным амилоидным белком, причем заболевание или состояние выбрано из болезни Альцгеймера, в частности болезни Альцгеймера с ранним началом, болезни Альцгеймера с поздним началом или предсимптоматической болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, САА-амилоидоза, заболевания, характеризующегося образованием амилоидного белка агрегацией цистатина С, заболевания, характеризующегося образованием амилоидного белка агрегацией легкой цепи IgG, семейной амилоидотической полинейропатии (САП), в частности финской формы САП (агрегации гельзолина), семейной амилоидной кардиомиопатии (САК), старческого системного амилоидоза (ССА), амилоидоза ОАПП (островкового амилоидного полипептида), наследственного исландского синдрома, множественной миеломы, прионных заболеваний, болезни куру, болезни Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), болезни Герстманна-Штраусслера-Шейнкера (ГШШ), фатальной семейной бессонницы (ФСБ), скрепи, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭКРС), амиотрофического бокового склероза (АБС), спинально-цереbellарной атаксии (СЦА1, СЦА3, СЦА6 или СЦА7), болезни Хантингтона, дентаторубро-паллидолюисовой атрофии, спинальной и бульбарной мышечной атрофии, наследственной церебральной амилоидной ангиопатии, семейного амилоидоза, лобно-височной деменции, британской/датской деменции и семейной энцефалопатии.
27. Способ по п.26, отличающийся тем, что заболевание представляет собой болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона.
28. Способ по п.27, отличающийся тем, что заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.
29. Способ по п.26, отличающийся тем, что пациент страдает заболеванием, выбранным из болезни Крейтцфельда-Якоба, болезни куру, фатальной семейной бессонницы и болезни Герстманна-Штраусслера-Шейнкера.



Фиг. 1

```

M13-MKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKKDKTLDRYANYEGCLWNATG 60
Fd----- 60
Fl----- 60
Con MKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKKDKTLDRYANYEGCLWNATG

M13-VVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGSEGGSEGGGKPPPEYGDTPIPGYTY 120
Fd----- 120
Fl----- 120
Con VVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGSEGGSEGGGKPPPEYGDTPIPGYTY

M13-INPLDGTYPGTEQNPNPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQCALTVYTGTVTQGTDPV 180
Fd----- 180
Fl----- 180
Con INPLDGTYPGTEQNPNPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQCALTVYTGTVTQGTDPV

M13-KTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGSSDLQPPVNAAGGGSG 240
Fd----- 240
Fl----- 240
Con KTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGSSDLQPPVNAAGGGSG

M13-GSGGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSGGDFDYKMANANKGAMTENADENALQS 300
Fd----- 300
Fl----- 300
Con GSGGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSGGDFDYKMANANKGAMTENADENALQS

M13-DAKGLDSVATDYGAIDGFIGDVSLANGNATGDFAGSNSQMAQVGDGNSPLMNNFR 360
Fd----- 360
Fl----- 360
Con DAKGLDSVATDYGAIDGFIGDVSLANGNATGDFAGSNSQMAQVGDGNSPLMNNFR

M13-QYLPSPQSVQCRPFVFSAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVSTFANILR 420
Fd-----Y-G----- 420
Fl-----G----- 420
Con QYLPSPQSVQCRPX--YAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVSTFANILR

M13-NKES 424 (SEQ ID NO:1)
Fd----- 424 (SEQ ID NO:2)
Fl----- 424 (SEQ ID NO:3)
Con NKES (SEQ ID NO:4)

```

Фиг. 2А

```

I2-2MKRKIIAISLFLYIPLSNADNWESITKSYTGFAMSKTVESKDDGKTVRKEVITQADLT 60
Ike-----I-----K-P----- 60
Con MKRKIIAISLFLYIPLSNADNWESITKSYTGFAMSKTVESKDDGKTVRKEVITQADLT

I2-2TACNDAKASAQDVFNQMKLTFSGIWPDSQFRLVLTGDTCVYNGSPSEKTESWSIRAQVEGD 120
Ike-----N-I-L-T-N-----G----- 120
Con TACNDAKASAQVFNQKLTXSXWZDSQFRLVLTGDTCVYNGSPSEKTESWSIRAQVEGD

I2-2MORSVPDEEPSEQTPEEICEAKPPIDGVFNVSKGDEGGFYINYNCEYEATGVTVQOND 180
Ike I-----F----- 180
Con XORSVPDEEPSEQTPEEICEAKPPIDGVFNVSKGDEGGFYINYNCEYEATGVTVQOND

I2-2GTVCASSAWKPTGYVPESGESSSSPVKDGDGTGGTGEKSDTGGDTGGGDTGGGDTGGDTG 240
Ike ---S-----P-I----- 240
Con GTVCASSAWKPTGYVPESGESSSSPVKDGDGTGGTGEKSDTGGDTGGGDTGGGDTGGDTG

I2-2GGTGGGDTGGGDTGGGDTGKSLTKEDVTAIHDASPSIGDAVKDSLTEDNDQNDQKRADE 300
Ike --S---S-----V-----Y----- 300
Con GSXGGGSXGGGSGGSGTGSKSLTKEDVTAIHXASPSIGDAVKDSLTEDNDQNDQKRADE

I2-2QSAKASASVSDAISDGMRGVGNFVDDLGGESSQYIGNSEMDLSVSLAKGQLGIDLEGHG 360
Ike -----F-----T-----R----- 360
Con QSAKASASVSDAISDGMRGVGNFVDDXGGESSQYICXGNSEMDLSVSLAKGQLGIDLEGHG

I2-2SAWESFLNDGALRPSIPSGHGCTDFVMFQGSVYQLDIGCDKLGDIKSVLSWVMYCLTFWY 420
Ike -----T-----N---Y-----IE-----NDIKSVLSWVMYCLTFWY 420
Con SAWESFLNDGALRPSIPXGHGCTYFVMXQGSVYQXXIGCDKLDIKSVLSWVMYCLTFWY

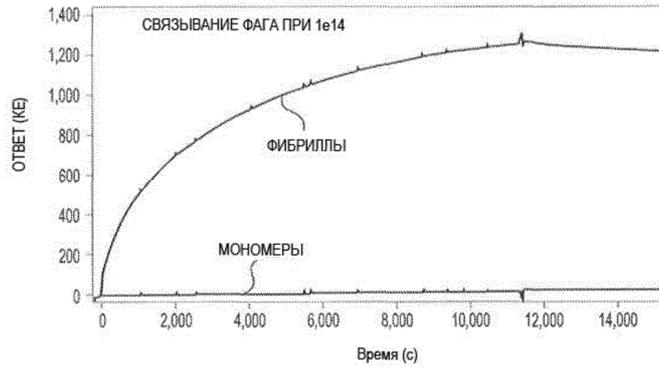
I2-2VFQSATSLLRKGEQ 434 (SEQ ID NO:5)
Ike -----V----- 434 (SEQ ID NO:6)
Con VFQSATSLLRKGEQ (SEQ ID NO:7)

```

Фиг. 2В

MKRIIALFFAPFFTHAITDAECLSKPAFDGTLNWNKEDSRVANFENCIEYELSGIGIG 60  
 YDNDTSCNGHWTPVRAADGSGNGGDDNSSGGGNGDNGNNSPTDVTTPGQTVNLPSDLST 120  
 LSIPANVVKSDSIGSQFSLYTNASCTMCSGYLLSNADSLAIANITETVKADYNQPMWF 180  
 EQTDSGDNHVKILQNSYKAVSYNVESKQSDVNNPTIYINYSYVNVKQVSYDTSNVCIMNW 240  
 ETFQNKCDASRAVLITDVTTPSYSRNITIQSNINIQSGNSGGGGGGSGGNDGGGTGNN 300  
 GNGTGFDFYVKMANANKDALTESFDLSALQADTGASLDGSDVQGLDLSLGFSDSIGGLVG 360  
 NGAISGEFAGSSAAMNAIGEGDKSPLDLSLFLKDLFPALPEFKQCTPFVFPAGKEYE 420  
 FIIECKYIDMFKGIFAFILYFWTFVTVYDSFSGILRKGRG (SEQ ID NO:8) 460

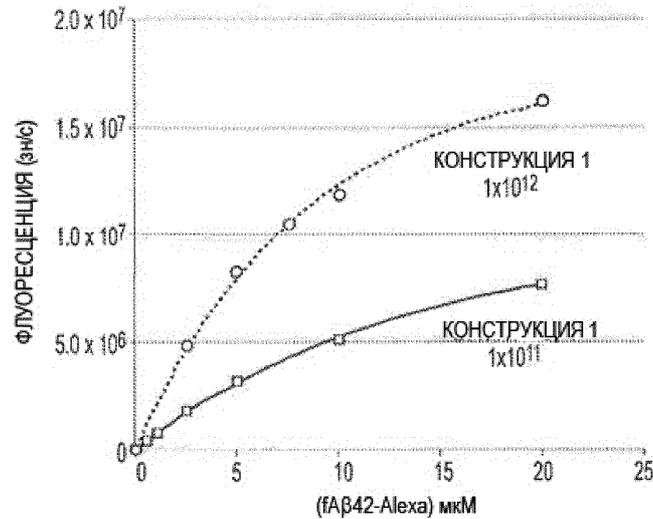
Фиг. 2С



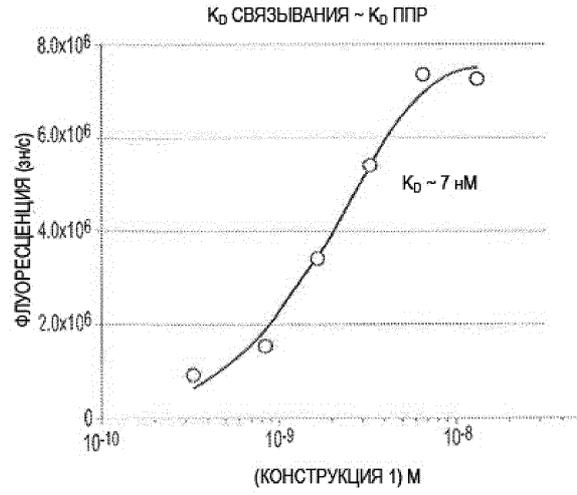
ПАРАМЕТР	ВЕЛИЧИНА
$K_a$	2572 (6)
$K_d$	9,234E-6
$K_D$	3,589 (6) Нм

Фиг. 3

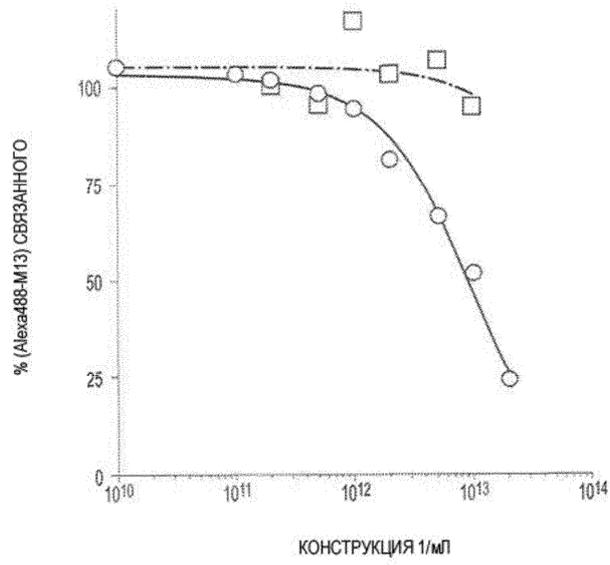
СВЯЗЫВАНИЕ ЗАВИСИТ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ



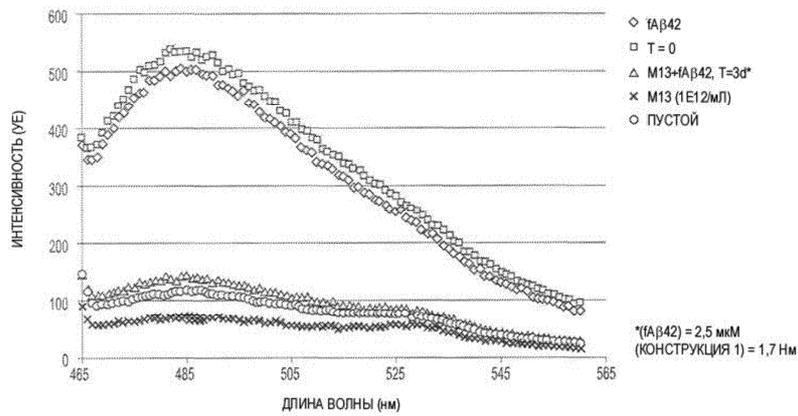
Фиг. 4А



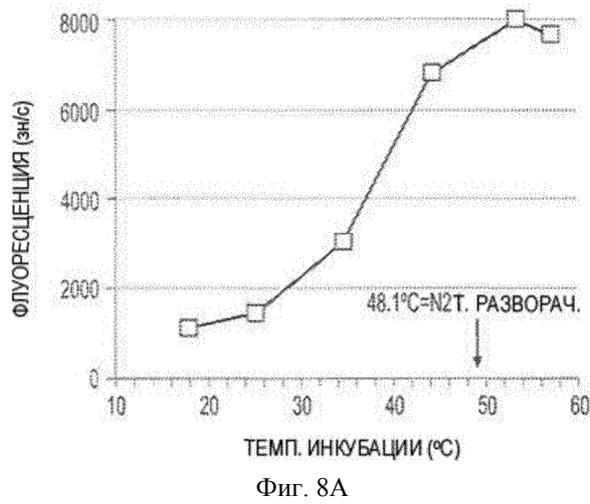
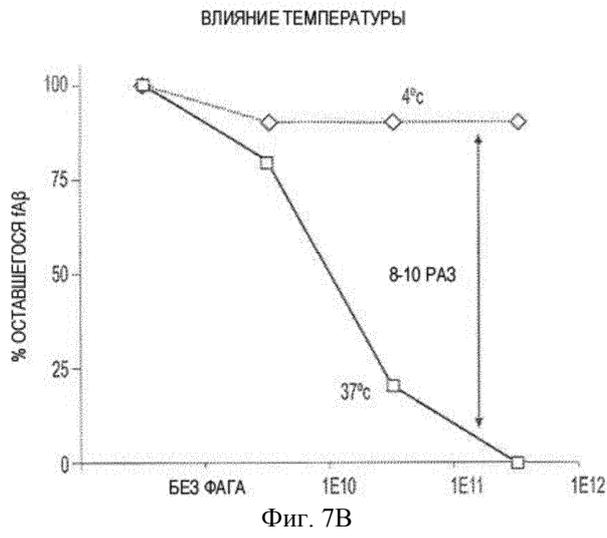
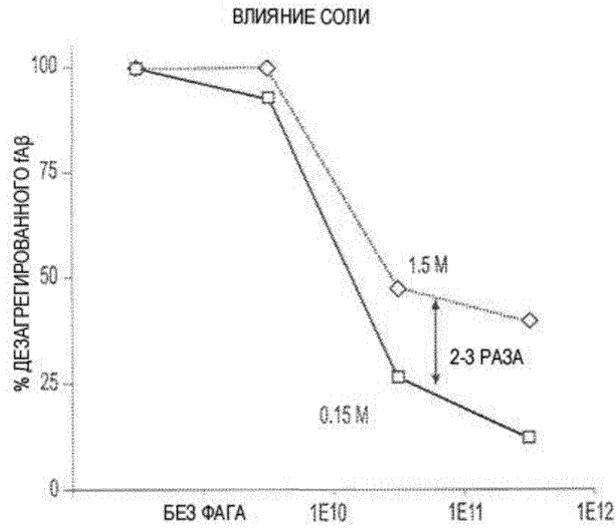
Фиг. 4В

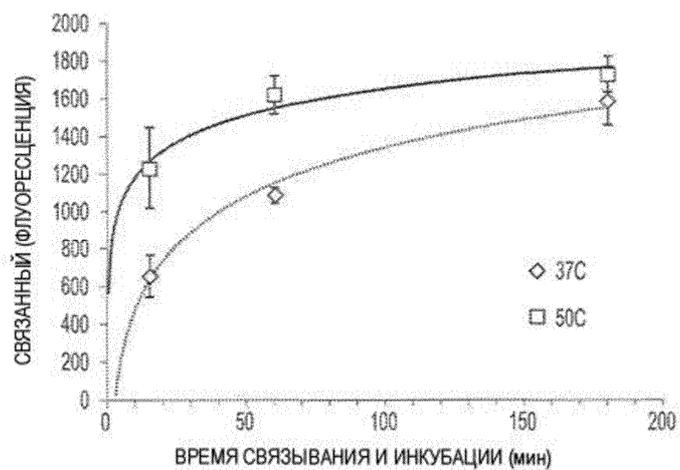


Фиг. 5



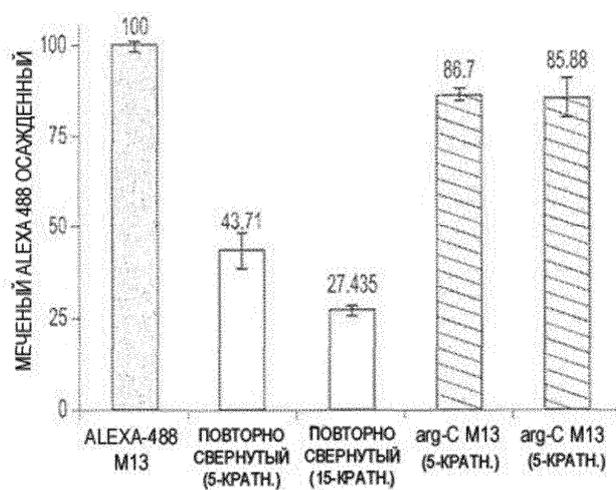
Фиг. 6





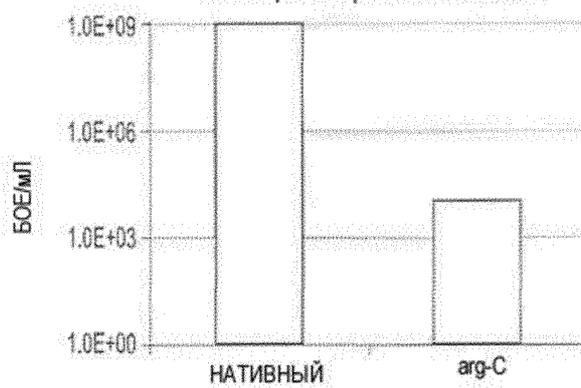
Фиг. 8B

## КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ



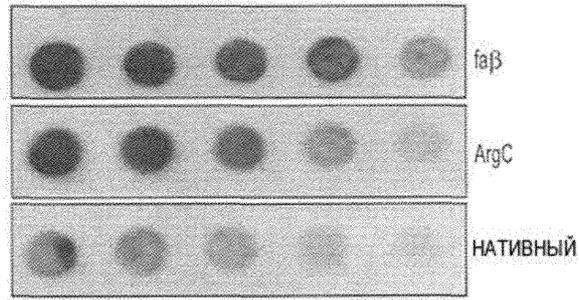
Фиг. 9A

## ИНФИЦИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ

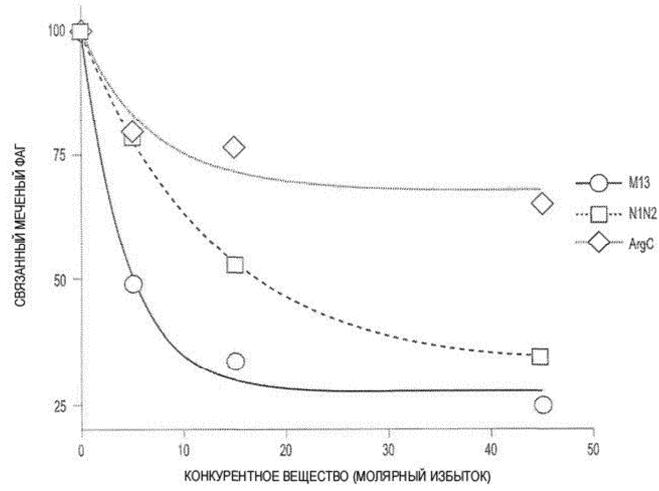


Фиг. 9B

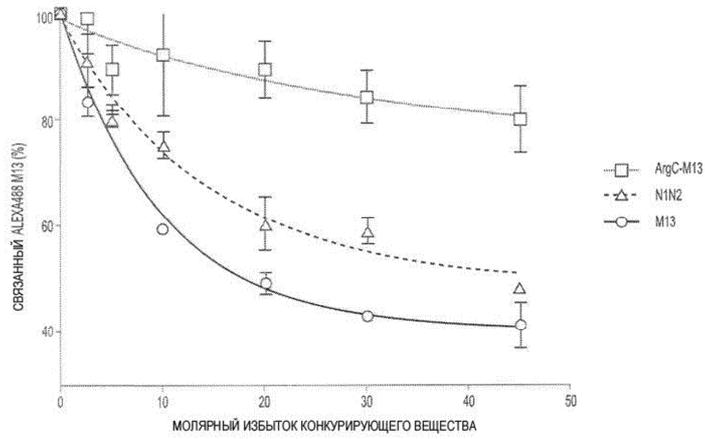
ДЕЗАГРЕГАЦИЯ



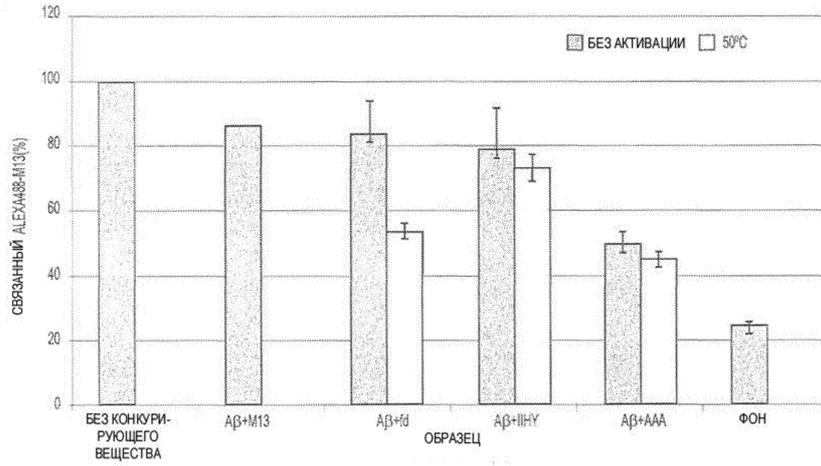
Фиг. 9С



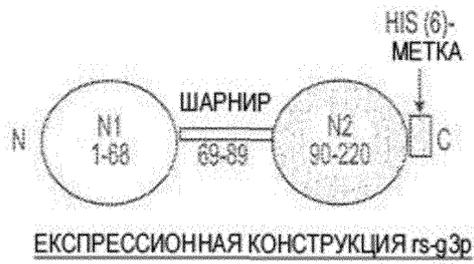
Фиг. 10А



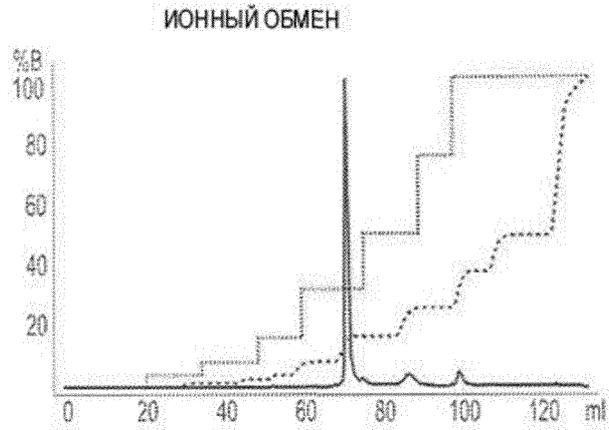
Фиг. 10В



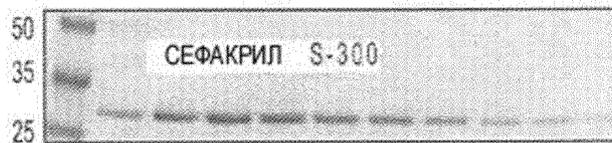
Фиг. 11



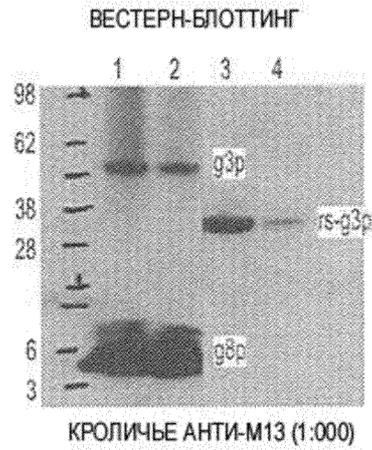
Фиг. 12А



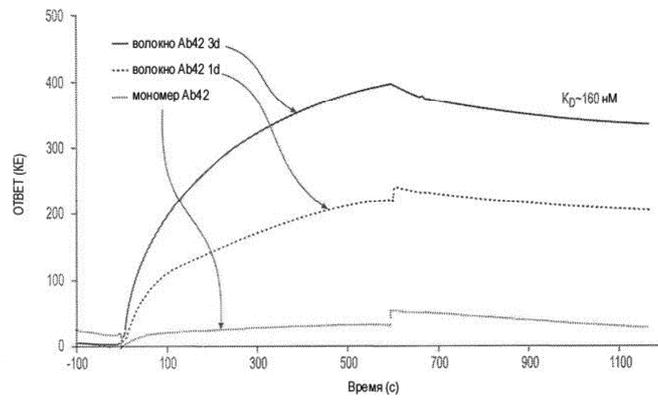
Фиг. 12В



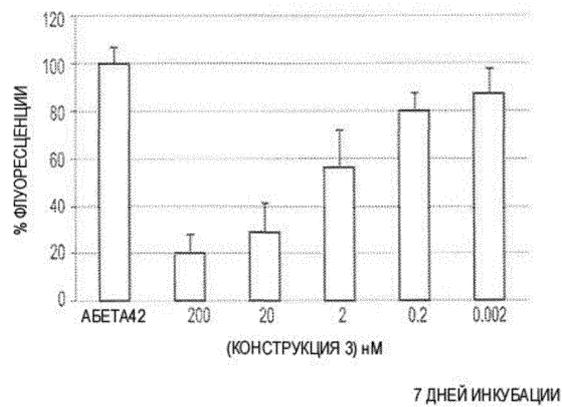
Фиг. 12С



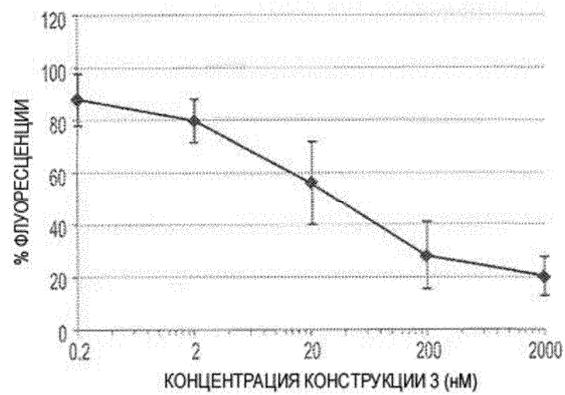
Фиг. 12D



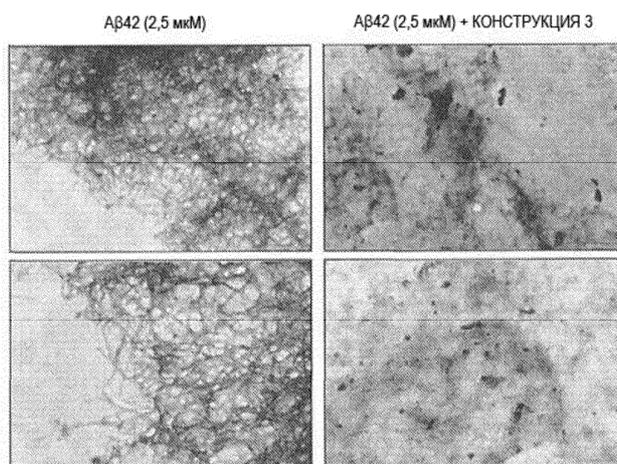
Фиг. 13



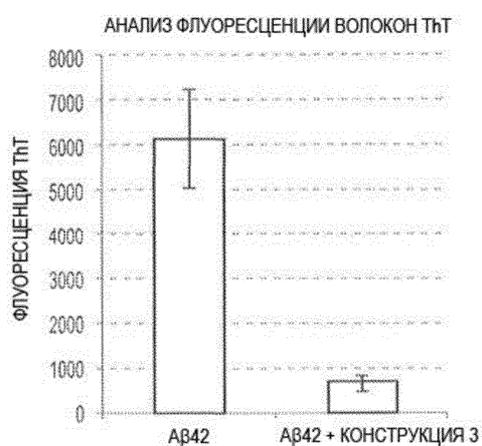
Фиг. 14А



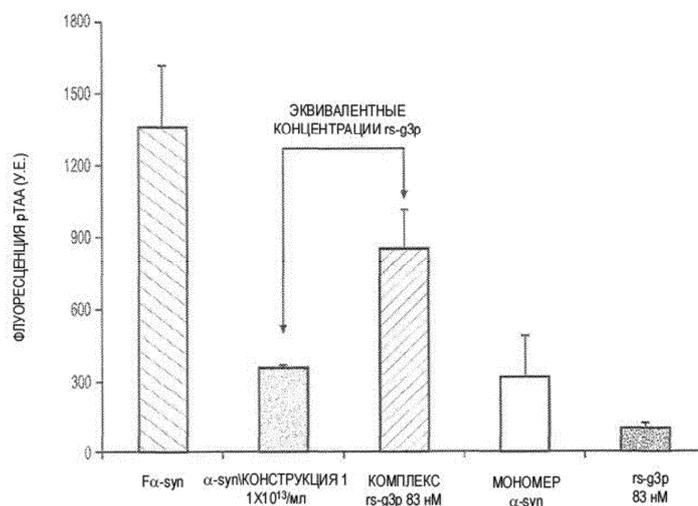
Фиг. 14В



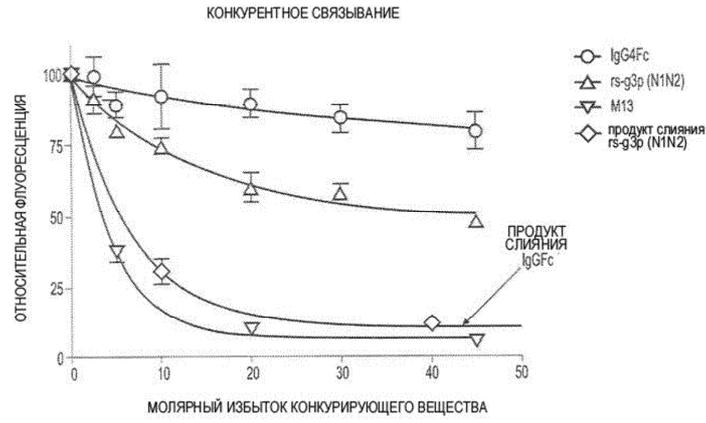
Фиг. 15А



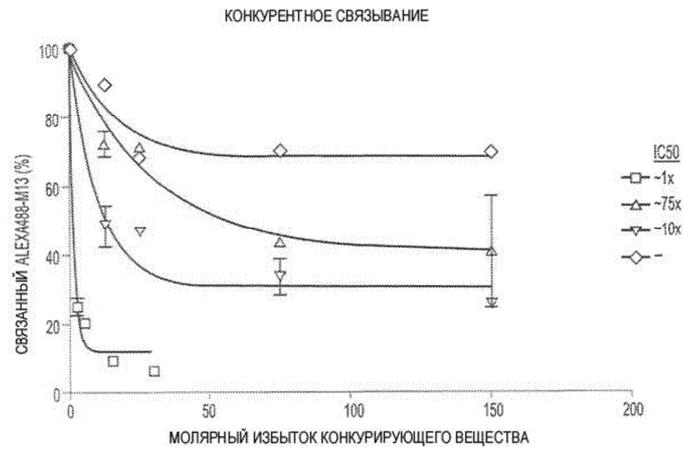
Фиг. 15В



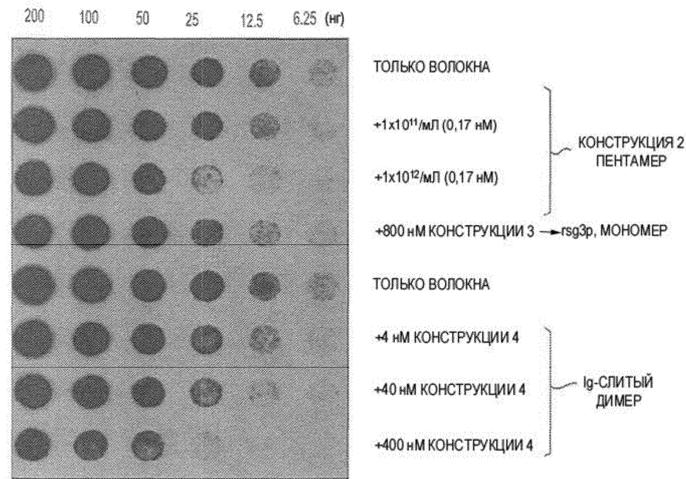
Фиг. 16



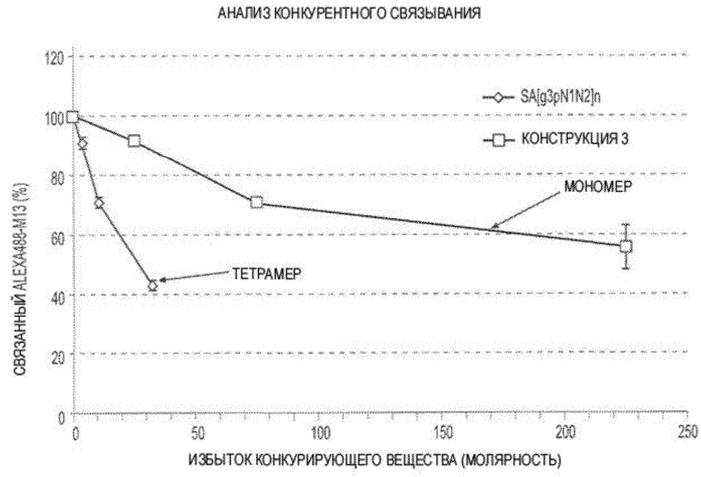
Фиг. 17



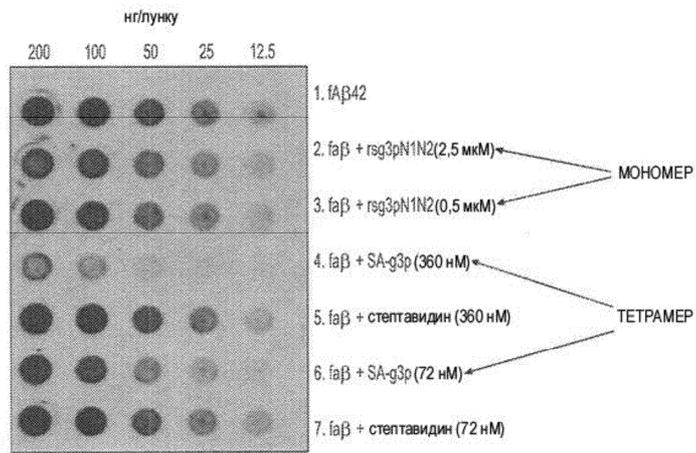
Фиг. 18



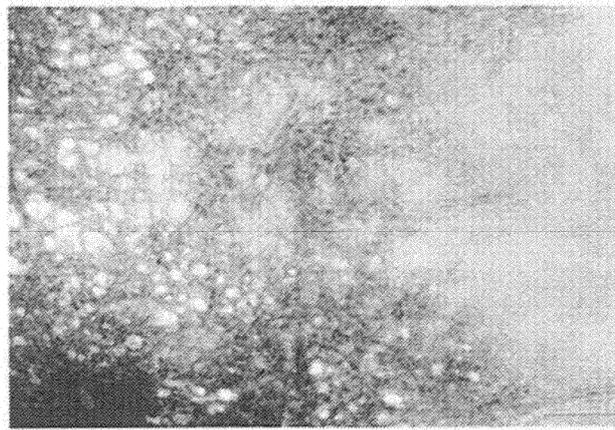
Фиг. 19



Фиг. 20

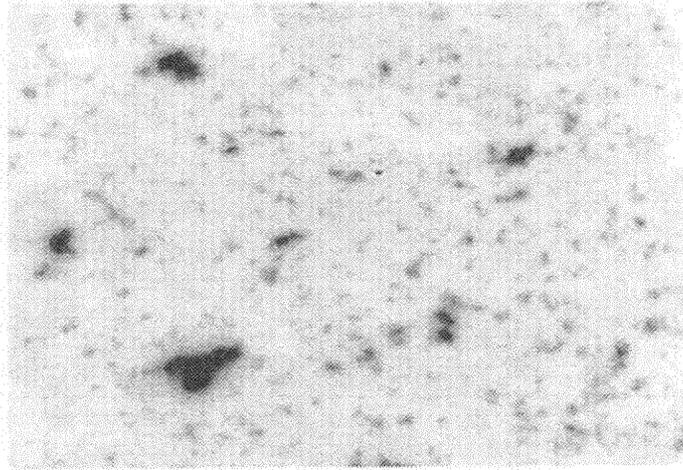


Фиг. 21



t=0

Фиг. 22А



t=3 дня

Фиг. 22В

```

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S M A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K D D K T L
D R Y A N Y E G C L W N A T G V V V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E N E G G G S E G G
G S E G G G S E G G G T K P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y P P G T E Q N P A M P N P
S L E E S Q P L N T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V
S S K A M Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G
G S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G A M V R S D K T H T C
P E C F A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L R Q D W L N G K E Y K C K
V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K
G E Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 9)

```

Фиг. 23

```

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S M A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K D D K T L
D R Y A N Y E G C L W N A T G V V V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E N E G G G S E G G
G S E G G G S E G G G T K P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y P P G T E Q N P A M P N P
S L E E S Q P L N T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V
S S K A M Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G
G S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G A M V R S D K T H T C
P E C F A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L R Q D W L N G K E Y K C K
V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K
G E Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 11)

```

Фиг. 24

```

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S M A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K D D K T L
D R Y A N Y E G C L W N A T G V V V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E N E G G G S E G G
G S E G G G S E G G G T K P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y P P G T E Q N P A M P N P
S L E E S Q P L N T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V
S S K A M Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G
G S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G A M V R S D K T H T C
P E C F A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L R Q D W L N G K E Y K C K
V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K
G E Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 13)

```

Фиг. 25

```

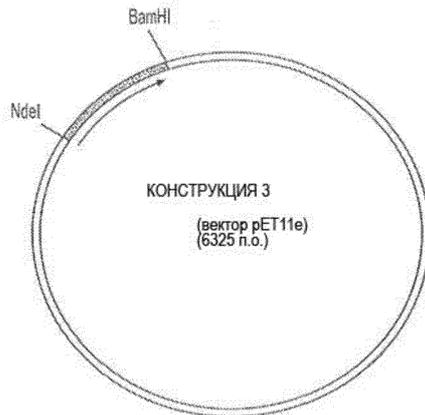
fd      TKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPFGTEQNPNAN
fl      TKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPFGTEQNPNAN
M13    TKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPFGTEQNPNAN
Ike     S-PGEKTESWSIRAQVEGDIQRSVPD--EFPSEQ
I2-2   S-PSEKTESWSIRAQVEGDMQRSVPD--EFPSEQ
If1     STPDTVTPGQTVNLPSDLSTLSIPANVVKSDSIG
        : *                               : . . .

fd      PNPSEEE-----SQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDFVKTY
fl      PNPSEEE-----SQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDFVKTY
M13    PNPSEEE-----SQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDFVKTY
Ike     TPEEICE-----AKPPI DGVFNVFRKDEGGGFYINYNCGEYEATGVTVCCQ
I2-2   TPEEICE-----AKPPI DGVFNVFRKDEGGGFYINYNCGEYEATGVTVCCQ
If1     SQFSLYTNASCIMCSGYLNSNNADSIATANITETVKADYNQPDMMWFQTDSDGNHVKILQ
        . . . : . . . : . . . : . . . : . . .

fd      YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG----FNEDPFVCEYQGQSSDL
fl      YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG----FNEDPFVCEYQGQSSDL
M13    YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG----FNEDPFVCEYQGQSSDL
Ike     NDGTVCCS-----SAWKFTGYVPESEGPSSPL----KDGDTGGTGGGGSDTGG
I2-2   NDGTVCCS-----SAWKFTGYVPESEGPSSPL----KDGDTGGTGGGGSDTGG
If1     NSYKAVSYNVESKQSDVNNPTYINYSYVNVKQVSYDTSNVCI MNWETFQNKCDASRAVL
        . . . : . . . : . . . : . . . : . . .

fd      PQPPVNA (SEQ ID NO:14)
fl      PQPPVNA (SEQ ID NO:15)
M13    PQPPVNA (SEQ ID NO:16)
Ike     DTGGGDT (SEQ ID NO:17)
I2-2   DTGGGDT (SEQ ID NO:18)
If1     ITDVTVP (SEQ ID NO:19)
    
```

Фиг. 26



Фиг. 27А

```

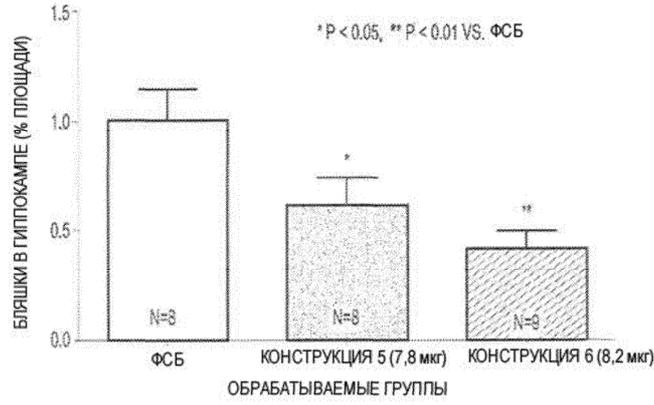
atgCCTGAAACTGTTGAAACTGTTTACGAAAATCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGCTCGGAAAGACGACAA
AACTTTAGATCGTTACGGTAACTATGAGGGCTGTCGTGGAAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTCTACTGGTGACGAAA
CTCAGTGTACGGTACATGGGTTCCATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGGCGGT
TCTGAGGGTGGGCGTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTA
TATCAACCTCTCGACGGCACTTATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGTAACTCCTAATCCTTCTCTGAGGAGT
CTCAGCCTCTTAATCTTTTCATGTTTCAGAAATAAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCA
CTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAACTTATACCAGTACACTCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTT
ACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGGCCTTCCATCTGGCTTAAATCAGGATTTATTTGTTTGTGAATATCAAGGCC
AATCGTCTGACCTGCCCAACCTCTGTCAATGCTCCGTCgggcatcatcatcatctaa(SEQ ID NO: 23)
    
```

Фиг. 27В

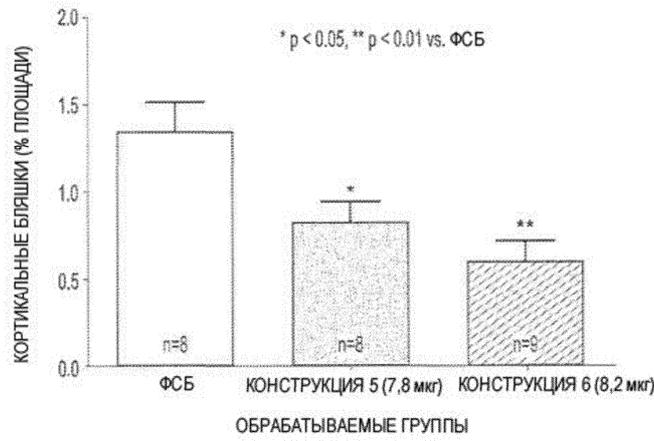
```

M A E T V E S C L A K S H T E N S F T N V W K D D K T L D R Y A N Y E
G C L W N A T G V V V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E N E G
G G S E G G G S E G G G S E G G G G T K P P E Y G D T P I P G Y T Y I N
P L D G T Y P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N T F M F Q N N
R F R N R Q G A L T V Y T G T V T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K
A M Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D L F V C E Y Q G Q S S D
L P Q F P V N A P S G H H H H H H (SEQ ID NO:24)
    
```

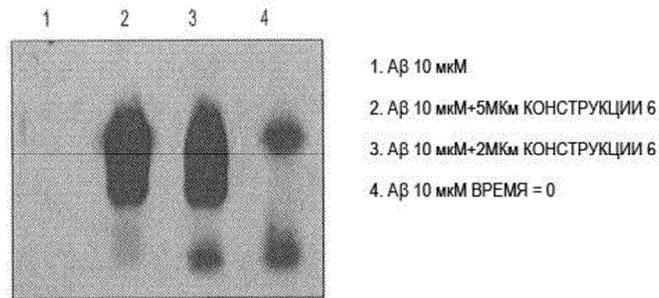
Фиг. 27С



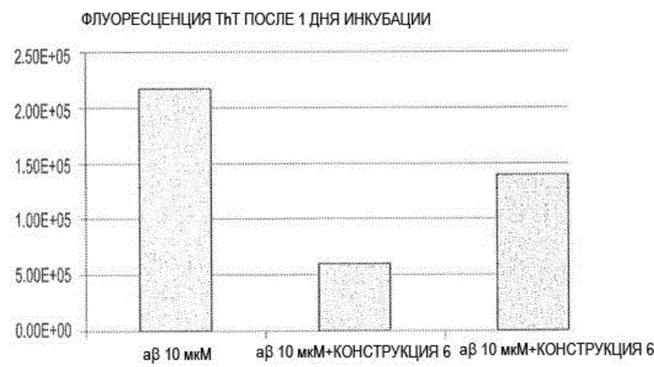
Фиг. 28



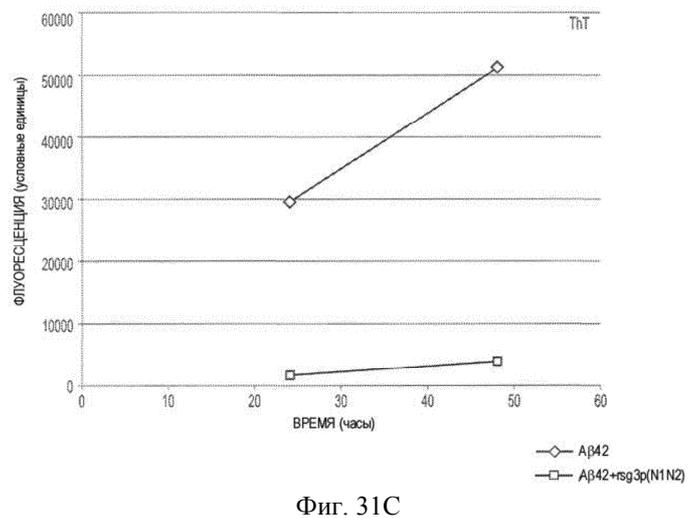
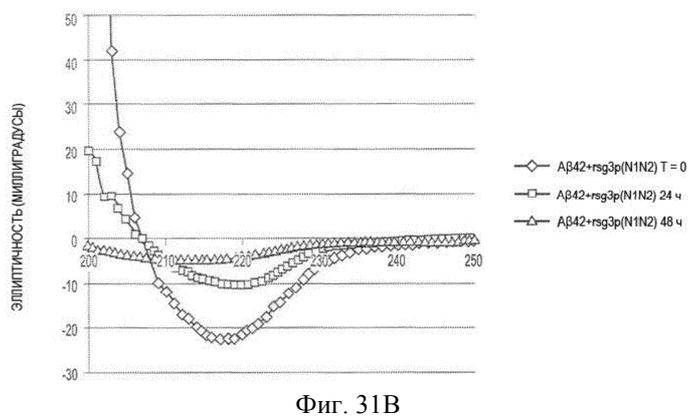
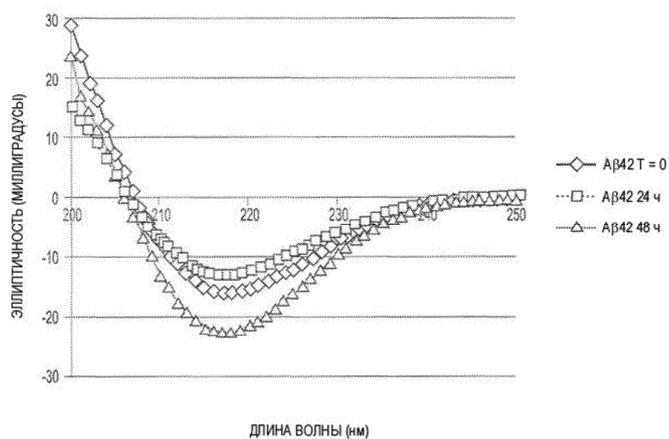
Фиг. 29

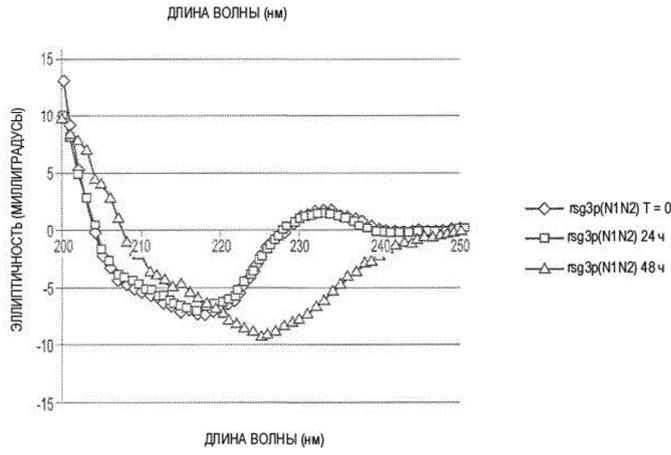


Фиг. 30А

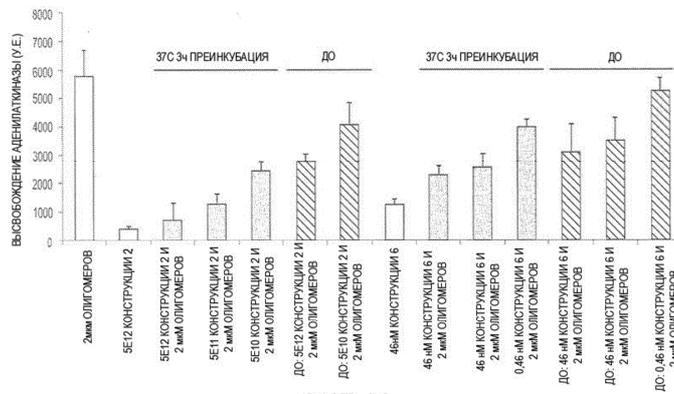


Фиг. 30В

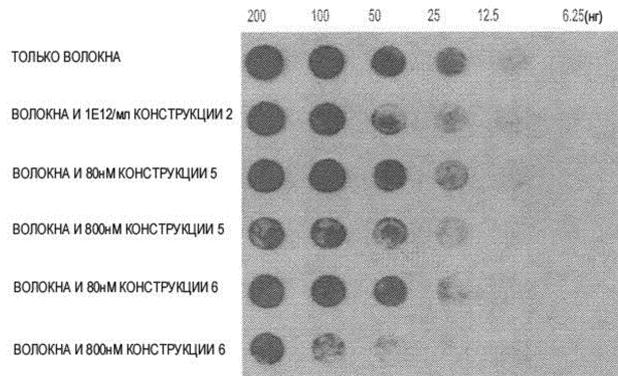




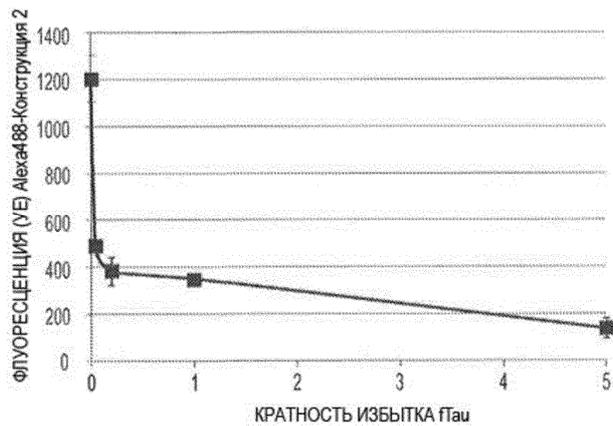
Фиг. 31D



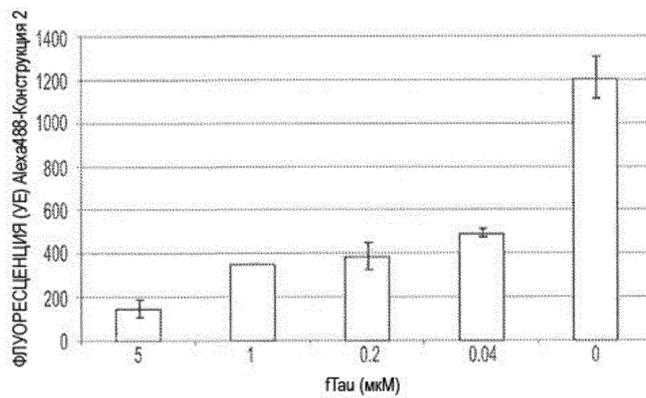
Фиг. 32



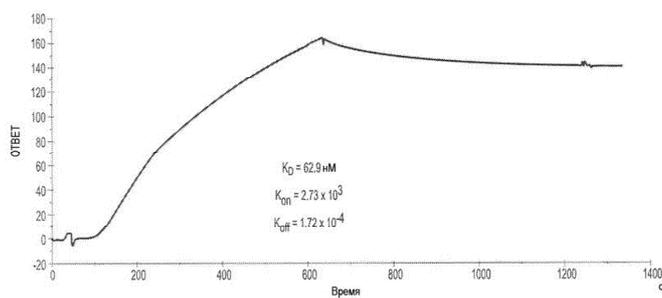
Фиг. 33



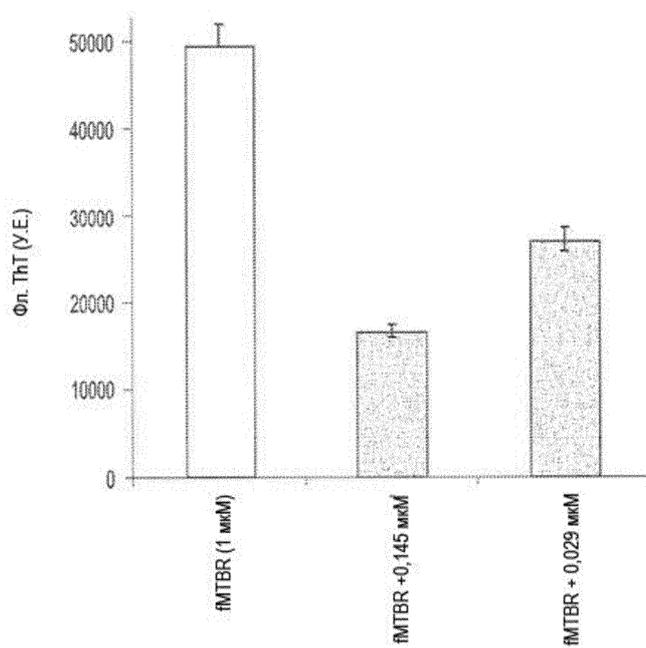
Фиг. 34А



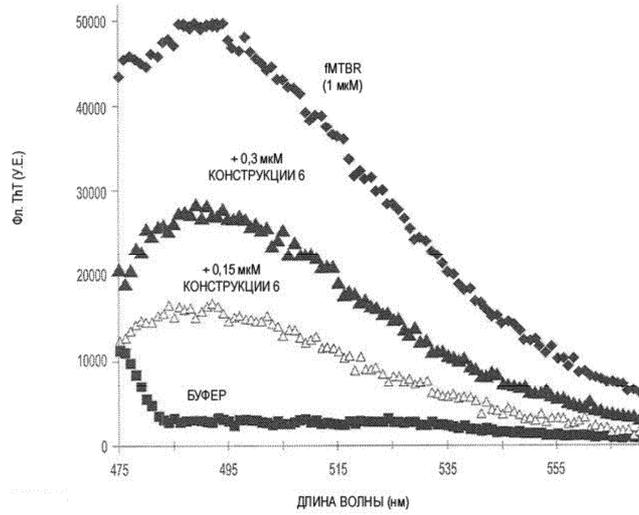
Фиг. 34В



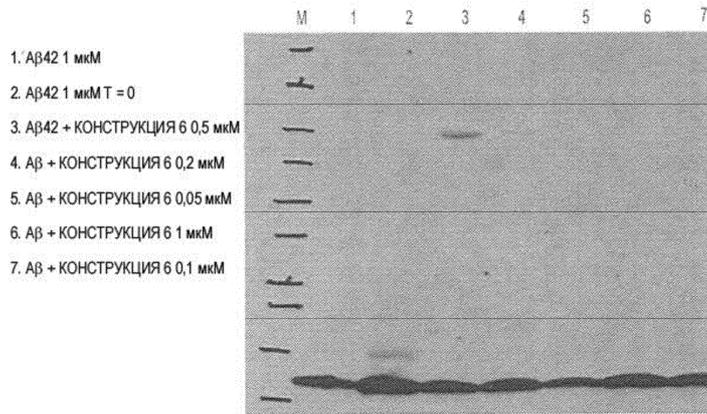
Фиг. 35



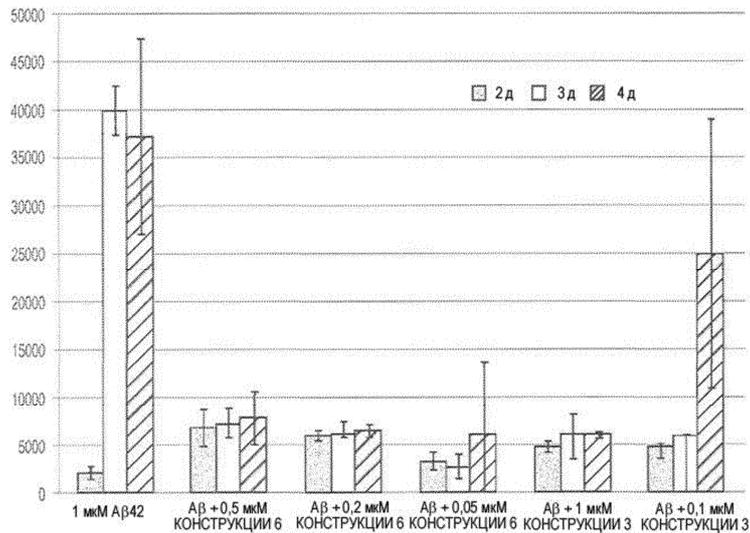
Фиг. 36А



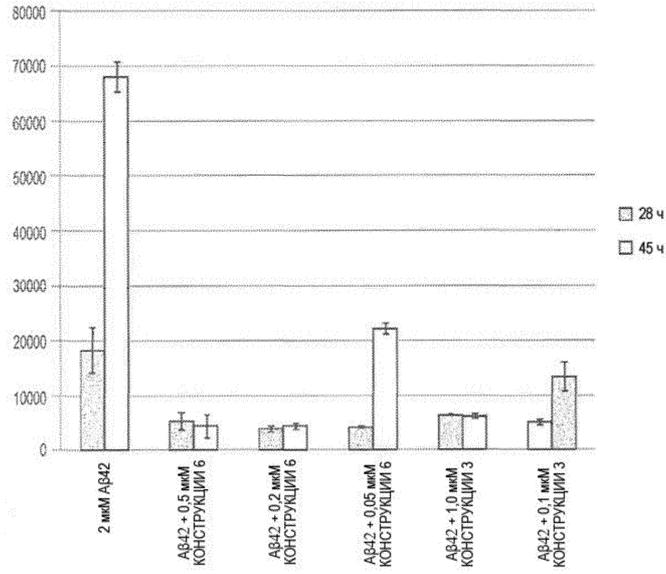
Фиг. 36В



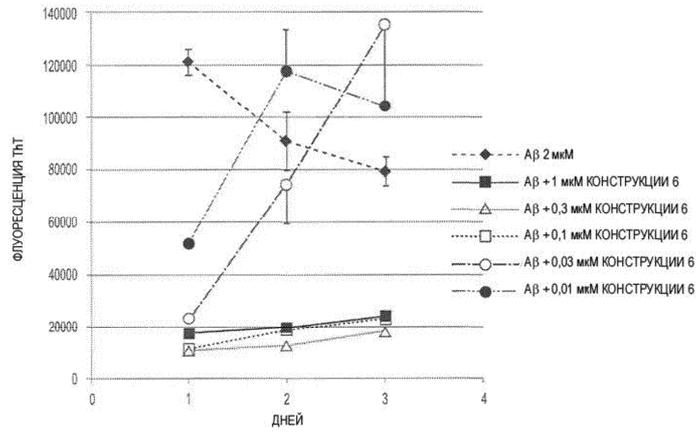
Фиг. 37А



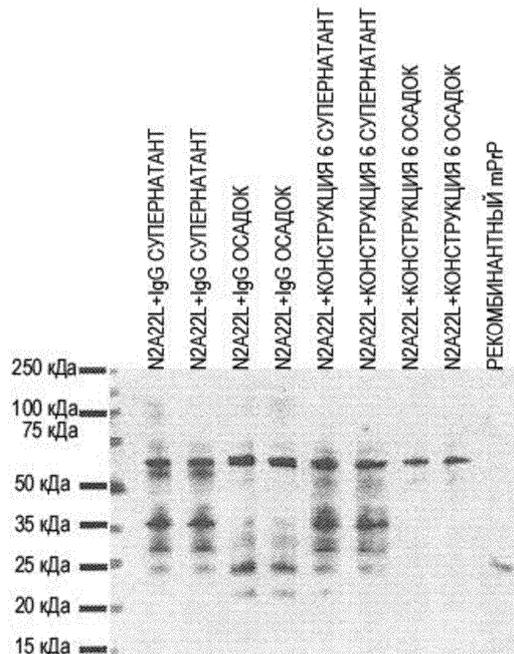
Фиг. 37В



Фиг. 37С

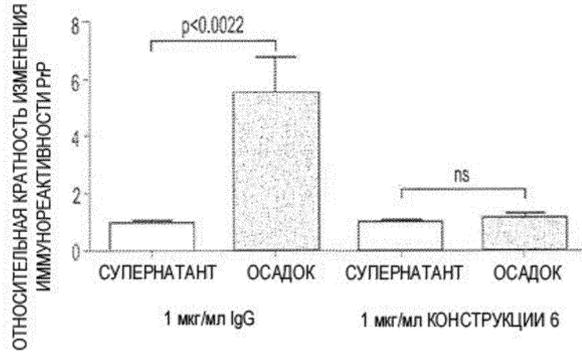


Фиг. 37D

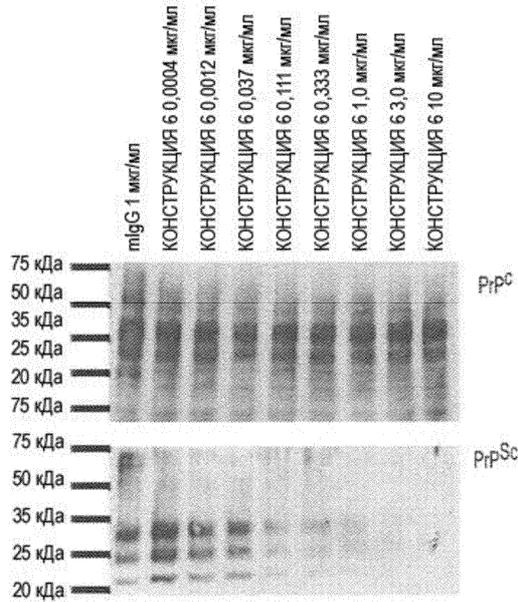


Фиг. 38А

КЛЕТКИ N2A22L<sup>Sc</sup> - СООТНОШЕНИЕ АГРЕГИРОВАННОГО/РАСТВОРИМОГО PrP

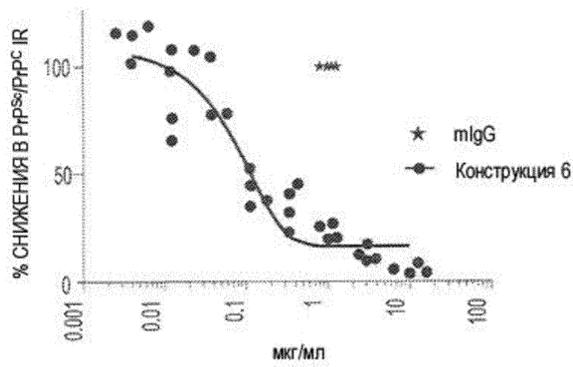


Фиг. 38В

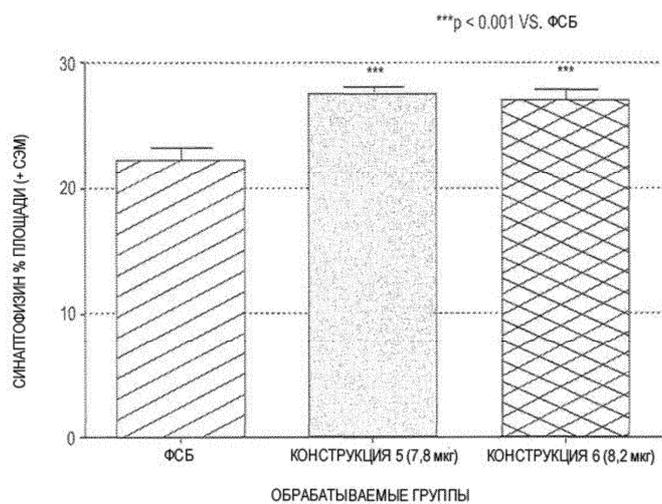


Фиг. 39А

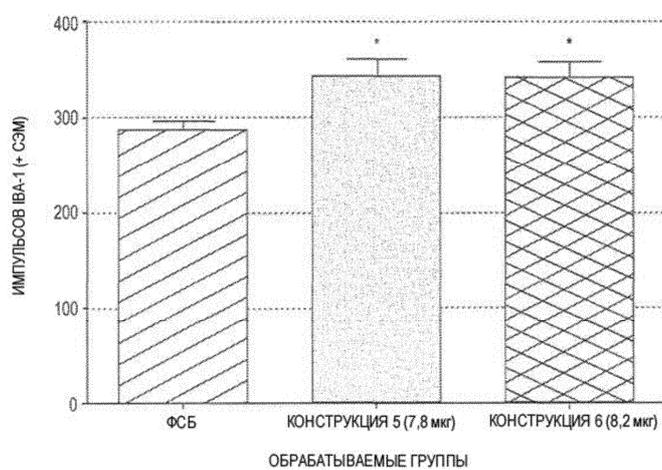
PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>C</sup> В КЛЕТКАХ N2A22L<sup>Sc</sup>



Фиг. 39В

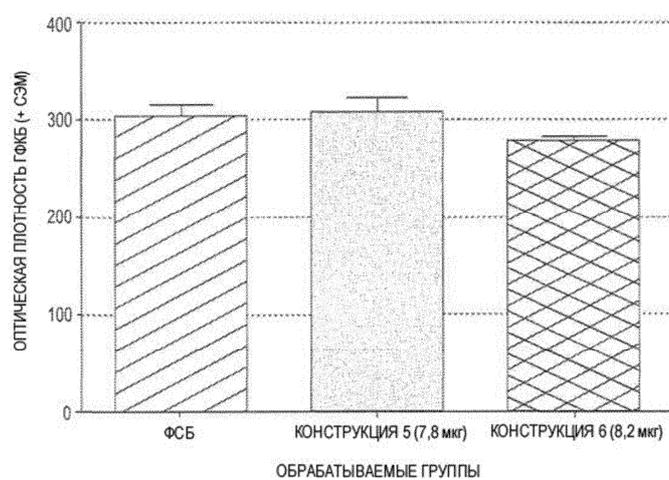


Фиг. 40

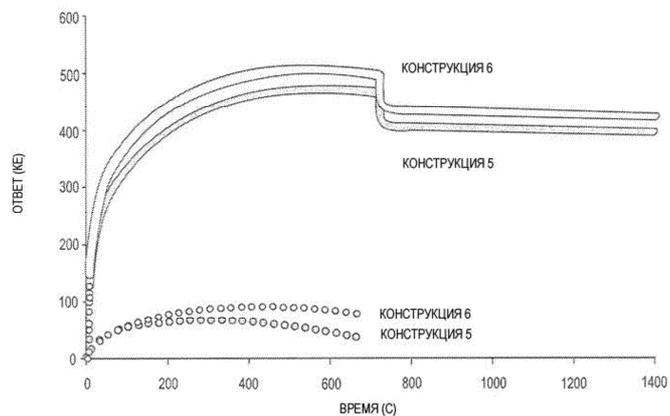


Фиг. 41

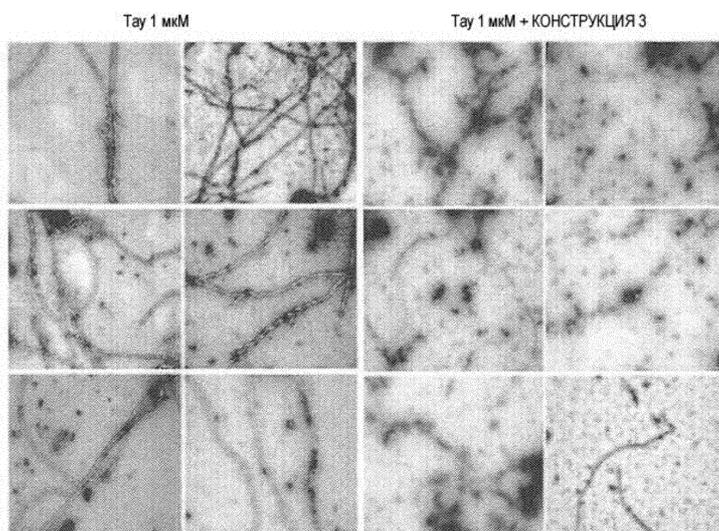
ГФКБ в гиппокампе



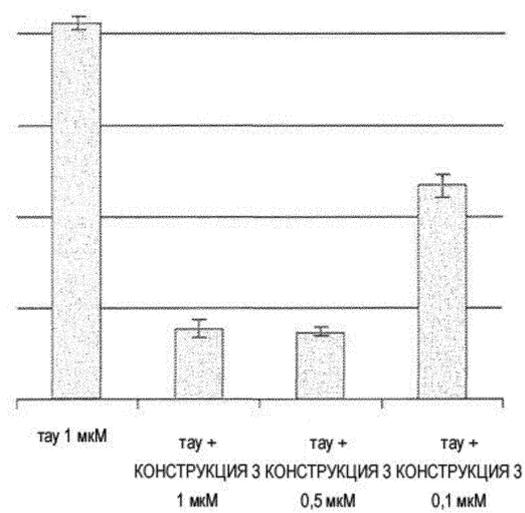
Фиг. 42



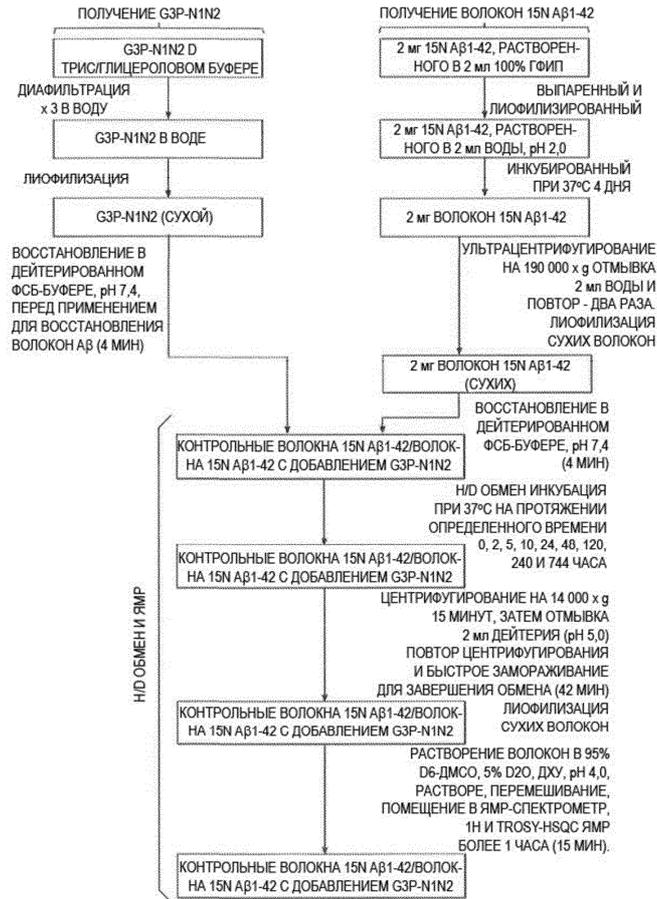
Фиг. 43



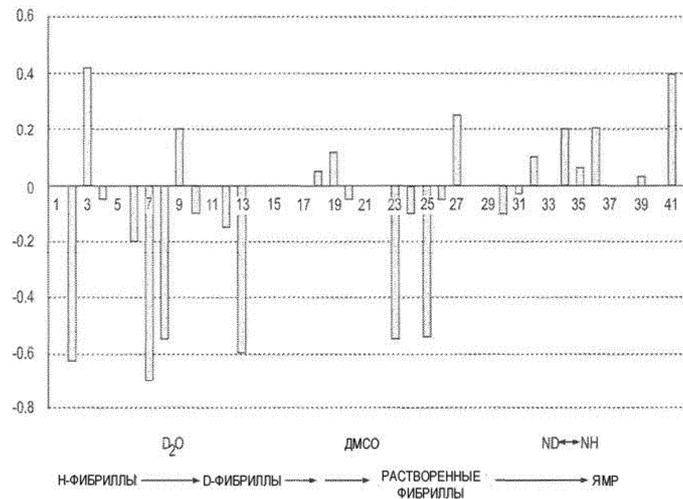
Фиг. 44А



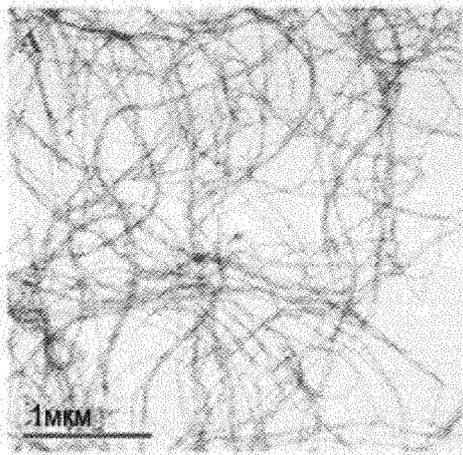
Фиг. 44В



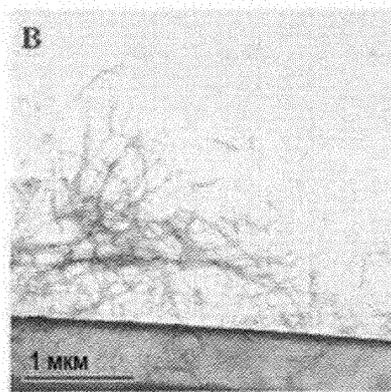
Фиг. 45



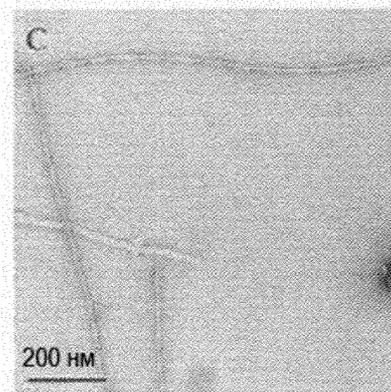
Фиг. 46



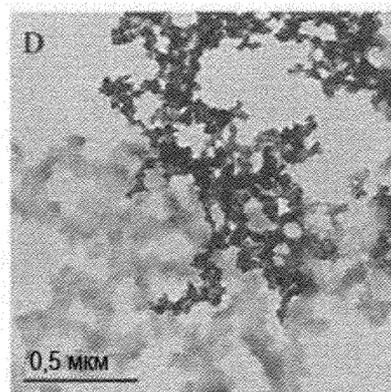
Фиг. 47А



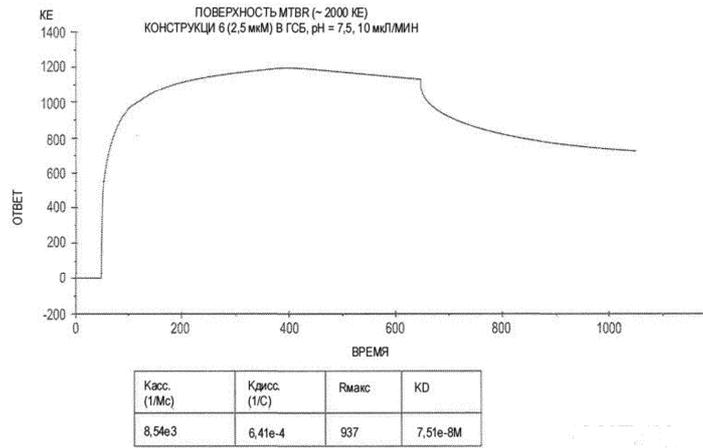
Фиг. 47В



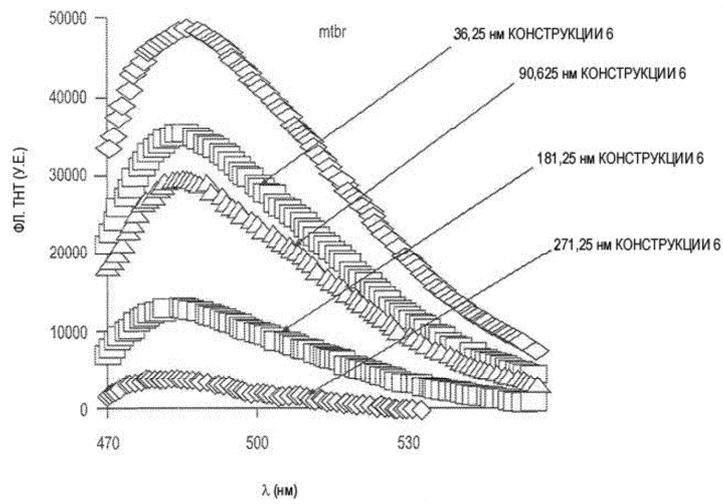
Фиг. 47С



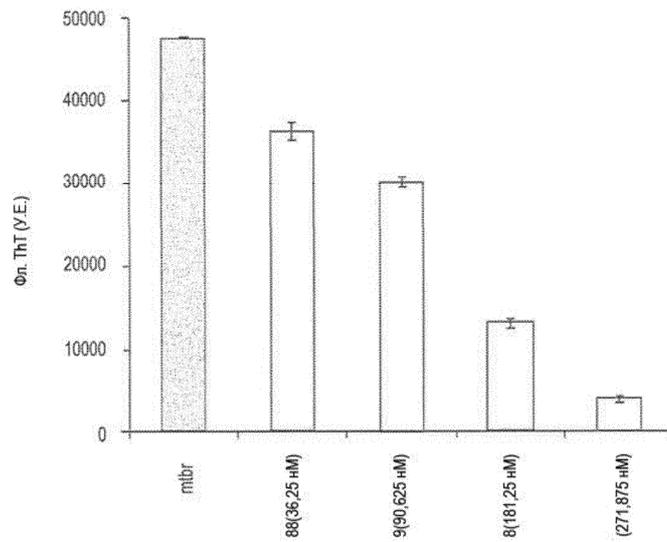
Фиг. 47D



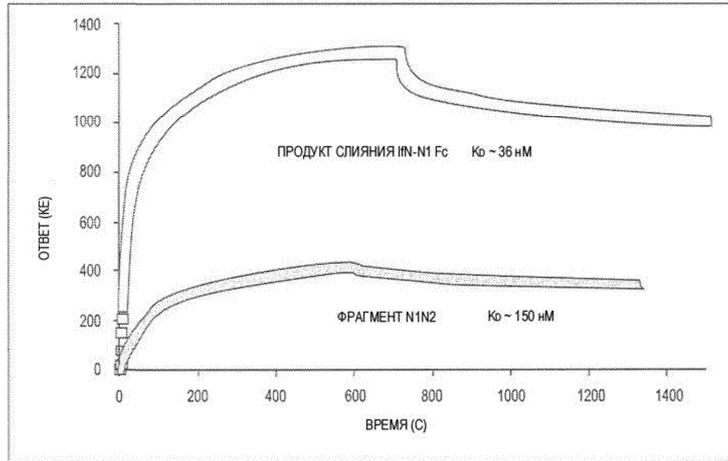
Фиг. 48



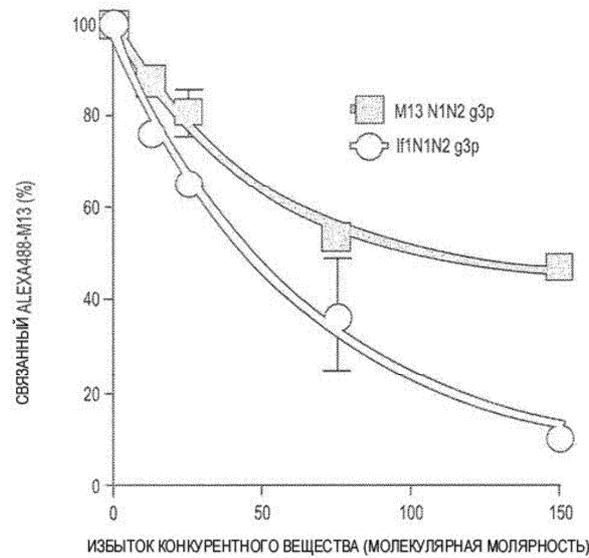
Фиг. 49А



Фиг. 49В



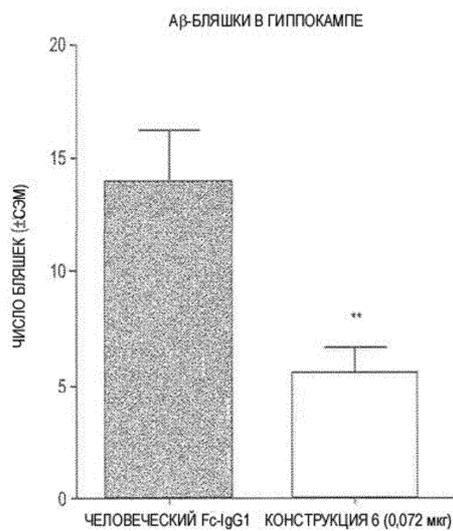
Фиг. 50А



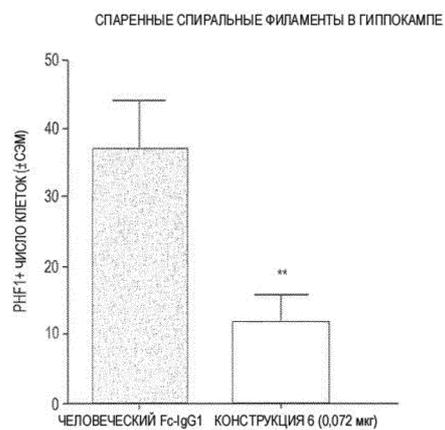
Фиг. 50В

IF1	G3P	ATTDAECLSK	PAFDGTLNV	WKEG-D-SRY	ANFEBCIYEL	SGIGIGYDND	TSCNGHWTPV	58
fd	G3P	AETVESCLAK	PHIENSFTNV	WKDDKTLDRY	ANYEGCLWNA	TGVVVTGDE	TQCYGTWVPI	60
IF1	G3P	RAADGSGNGG	DDNSSGGGSN	GDSGANSTPD	TVTPGQTVNL	PSDLSTLSIP	ANVVKSDSIG	118
fd	G3P	GLAIPENEGG	GSEGGGSEGG	GSEGGGTRPP	EYGDTPIPGY	IYINPLDGTY	PPGTEQNPAN	120
IF1	G3P	SQFSLYTNAS	CTMCSGYLLS	NNADSIAIAN	ITETVKADYN	QPDMMFEQTD	SDGNHVKILQ	178
fd	G3P	PNPSLEESHF	LNTYMFQNNR	FRNRQCALTV	YTGTVTQGTD	PVKTYYYQYTP	VSSKAMYDAY	180
IF1	G3P	NSYKAVSYNV	ESKQSDVNNP	TYINYSYSVN	VKQVSYDTSN	VCIMNWETFQ	NKCDASRAVL	238
fd	G3P	WNGKFRDCAF	HSGFNEDLFV	CEYQGQSSYL	PQPPVNAPS	(SEQ ID NO:29)		
IF1	G3P	ITDTVTPSYS	RNITIQSNIN	YQGSNG	264	(SEQ ID NO:30)		

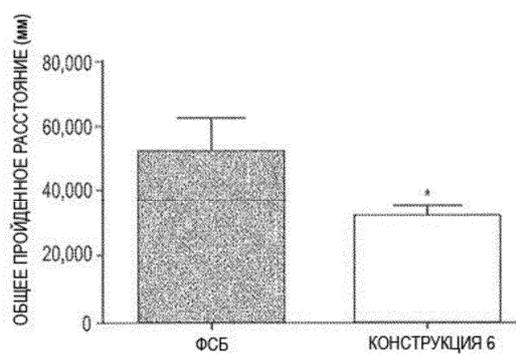
Фиг. 51



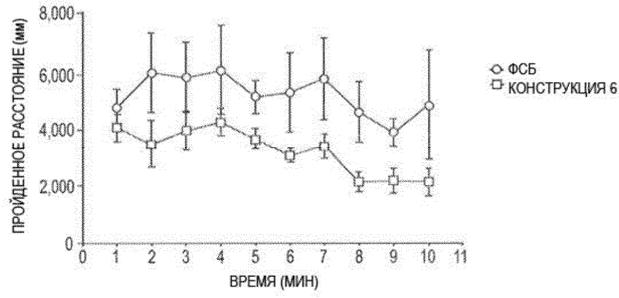
ОБРАБОТКА  
Фиг. 52А



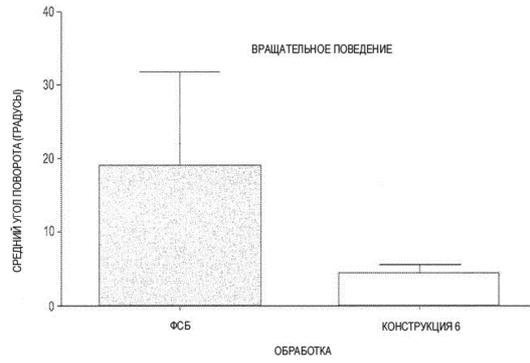
ОБРАБОТКА  
Фиг. 52В



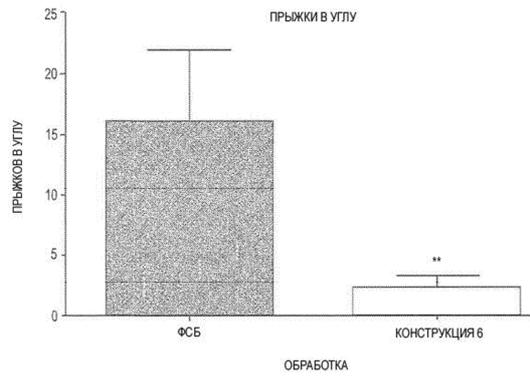
ОБРАБОТКА  
Фиг. 53А



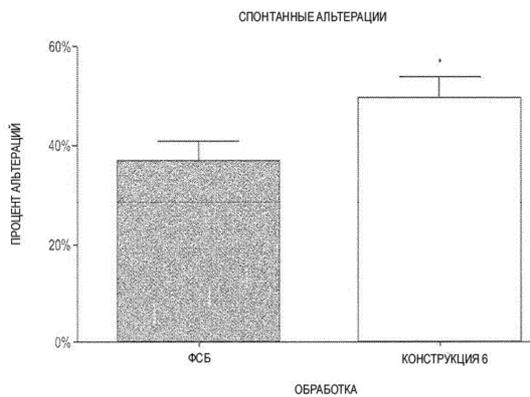
Фиг. 53В



Фиг. 54



Фиг. 55



Фиг. 56

