

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391395 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.12(22) Дата подачи заявки  
2021.10.25(51) Int. Cl. C12N 9/64 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)  
A61K 38/48 (2006.01)  
A61P 7/02 (2006.01)  
C07K 16/40 (2006.01)  
G01N 33/573 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

## (54) ВАРИАНТ ADAMTS13, ИМЕЮЩИЙ ПОВЫШЕННЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ УКЛОНЕНИЯ ИЛИ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ АУТОАНТИТЕЛА

(31) 10-2020-0154710

(32) 2020.11.18

(33) KR

(86) PCT/KR2021/014991

(87) WO 2022/108148 2022.05.27

(71) Заявитель:

ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН (KR)

(72) Изобретатель:

Нам Хюн-Ча, Хван Сун Хо, Кхвак

Хеечхун, Чхон Гахее, Кхим Суён,

Кхим Ю Ёун, Лее Ёнмин, Лее Чхэ

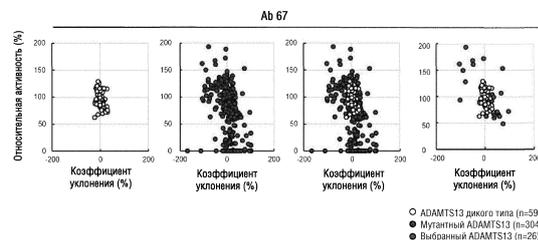
Мок, Схин Сунхе, Кхвон Ёун Ын, Чо

Сынхюн (KR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к мутантному белку ADAMTS13, имеющему улучшенный коэффициент уклонения от аутоантитела, и композиции для профилактики или лечения тромботических заболеваний с его использованием. Благодаря эффективному избеганию характерных аутоантител, которые, как известно, имеют высокую аффинность связывания с главным доменом ADAMTS13, вариант белка ADAMTS13 по настоящему изобретению можно использовать в качестве эффективной терапевтической композиции для различных тромботических заболеваний, таких как ТТР (тромботическая тромбоцитопеническая пурпура) и т.д., при которых наличие таких аутоантител является основным этиологическим фактором, и можно стабильно поддерживать его биологическую активность при введении в организм. Кроме того, благодаря идентификации нового участка, распознаваемого аутоантителом в ADAMTS13, настоящее изобретение можно использовать в скрининге новых вариантов ADAMTS13, имеющих улучшенный коэффициент уклонения от аутоантитела, используя комбинацию различных мутаций в соответствующем участке.



A1

202391395

202391395

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578178EA/025

### **ВАРИАНТ ADAMTS13, ИМЕЮЩИЙ ПОВЫШЕННЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ УКЛОНЕНИЯ ИЛИ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ АУТОАНТИТЕЛА ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к варианту ADAMTS13, имеющему сниженную или высокую ферментативную активность в отношении аутоантитела, и композиции для лечения тромботических заболеваний с их использованием.

#### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) является редким заболеванием крови, принадлежащим к тромботическим микроангиопатиям, при котором тромбы образуются в мелких кровеносных сосудах по всему организму, что приводит к смерти при отсутствии незамедлительного лечения. Известно, что ее часто составляет от 1,5 до 6 случаев на миллион населения в год, и частота высока, в основном, среди взрослых со средним возрастом 40 лет и женщин (Miesbach et al., 2019). Ее патологические характеристики включают снижение тромбоцитов, снижение эритроцитов, повышение гематокрита (HCT) и т.д. и, кроме того, известно, что из-за тромбов возникает дисфункция многих органов, таких как почки, сердце, головной мозг. Ее симптомы включают кровоподтеки, лихорадку, недомогание, диспноэ, спутанность сознания, головную боль и т.д. (Hovinga et al., 2017).

Тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) делят на два типа: врожденную ТТП (сТТП), вызывающую врожденную недостаточность функции ADAMTS13 по причине дисфункции гена, кодирующего ADAMTS13 (дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина типа 1, член 13); и приобретенную ТТП (аТТП), вызванную сниженной активностью ADAMTS13 в результате внешних причин. В основном, если активность ADAMTS13 составляет менее 10% от нормы, диагностируют ТТП. Показано, что аТТП вызывается бактериальной инфекцией, некоторыми лекарственными средствами, аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка, беременностью и т.д., и, как один из основных механизмов патогенеза, описано ингибирование активности ADAMTS13 аутоантителами, распознающими ADAMTS13 (проект GARD, 2018). Фермент ADAMTS13 играет роль в расщеплении крупных мультимеров фактора фон Виллебранда (vWF) на меньшие единицы, при этом антитела, обнаруживаемые у пациентов с аТТП, связываются с ADAMTS13, ингибируют его функцию и предотвращают деградацию vWF, и в конечном итоге это приводит к гиперпродукции тромбов вместе с тромбоцитами, таким образом, приводя к развитию заболевания.

В качестве стандарта лечения пациентов с сТТП используют вспомогательную терапию, при которой недостающий расщепляющий фермент вводят посредством инъекции свежей замороженной плазмы, в то время как в случае пациентов с аТТП целью является облегчение симптомов посредством удаления нейтрализующих антител

посредством замены плазмы (PEX). В случае пациентов с аТТР вводят иммуносупрессоры (преднизолон, кортикостероид и т.д.) в комбинации для усиления эффекта лечения, профилактики рецидивирования, и для снижения продукции нейтрализующих антител можно использовать ритуксимаб, индуцирующий гибель В-клеток. Хотя количество замен плазмы зависит от тяжести заболевания и прогрессирования симптомов, как правило, необходимо несколько замен плазмы для нормализации количества тромбоцитов. Существующие способы лечения имеют ограничения, такие как неудобство повторных замен плазмы и повышенная восприимчивость к инфекциям, являющаяся результатом использования иммуносупрессоров.

Таким образом, для преодоления ограничений общепринятых способов лечения ТТР авторы настоящего изобретения получали рекомбинантный вариант белка ADAMTS13, способный сохранять активность даже в присутствии аутоантитела благодаря эффективному уклонению от связывания с аутоантителами пациента, и с помощью оценки эффективности в модели заболевания ТТР на мышах подтверждено, что рекомбинантный вариант белка ADAMTS13 можно успешно использовать в качестве эффективного лечения заболевания ТТР.

На всем протяжении настоящего описания приведены ссылки на ряд журнальных статей и патентных документов, и их цитирование указано. Описания процитированных журнальных статей и патентных документов включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для более полного описания уровня техники в области, к которой принадлежит настоящее изобретение, и подробностей настоящего изобретения.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **Техническая задача**

Авторы настоящего изобретения приложили большие усилия для разработки эффективного и фундаментального способа лечения различных заболеваний с дисфункцией ADAMTS13, большинство которых принадлежит к неизлечимым редким заболеваниям. В результате обнаружено, что, когда идентифицированы коровые области ADAMTS13, распознаваемые аутоантителами, и некоторые аминокислоты в этих областях заменены, блокируют связывание аутоантител, а активности в отношении деградации vWF и ингибирования тромбоза сохраняются, и, таким образом, их можно использовать в качестве эффективной терапевтической композиции для различных заболеваний, вызванных избыточным образованием тромбов, включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), таким образом, осуществляя настоящее изобретение.

Таким образом, целью настоящего изобретения является предоставление варианта белка ADAMTS13 или его функционального фрагмента.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление композиции для профилактики или лечения тромботического заболевания.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление способа скрининга вариантов белка ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения на аутоантитела против ADAMTS13.

Другие цели и преимущества настоящего изобретения будут более очевидны из следующего подробного описания изобретения, формулы изобретения и чертежей.

#### **Решение задачи**

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к варианту белка ADAMTS13 (дизинтегрин и металлопротеиназы с мотивом тромбоспондина типа 1, члена 13), включающему замены одного или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 85-го, 93-го, 126-го, 135-го, 278-го, 282-го, 308-го, 314-го, 317-го, 334-го, 364-го, 376-го, 413-го, 427-го, 452-го, 465-го, 567-го, 578-го, 585-го, 589-го, 607-го, 608-го, 609-го, 612-го, 618-го, 624-го, 630-го, 635-го, 643-го, 650-го, 651-го, 654-го, 655-го, 656-го, 658-го, 664-го и 672-го остатков SEQ ID NO: 1 или ее функционального фрагмента.

Авторы настоящего изобретения приложили большие усилия для разработки эффективного и фундаментального способа лечения различных заболеваний с дисфункцией ADAMTS13, большинство которых принадлежит к неизлечимым редким заболеваниям. В результате обнаружено, что, когда идентифицированы коровые области, распознаваемые аутоантителом ADAMTS13, и некоторые аминокислоты в этих областях заменены, блокируют связывание аутоантител, а активности в отношении деградации vWF и ингибирования тромбоза сохраняются, и, таким образом, их можно использовать в качестве эффективной терапевтической композиции для различных заболеваний, вызванных избыточным образованием тромбов, включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП).

В рамках изобретения термин "белок" относится к линейной молекуле, образованной в результате взаимного связывания аминокислотных остатков пептидными связями.

В рамках изобретения термин "функциональный фрагмент" относится к аналогу полноразмерного белка, который, являясь фрагментом полноразмерного белка, где некоторые аминокислотные остатки делетированы, сохраняет свою исходную биологическую активность и функцию.

В рамках изобретения SEQ ID NO: 1 является аминокислотной последовательностью белка ADAMTS13, состоящего из 1427 аминокислот. Таким образом, вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по настоящему изобретению может являться полноразмерным (1427 аминокислот) белком ADAMTS13 или вариантом ADAMTS13, в котором указанные выше изменения внесены в его функциональный фрагмент, включающий область от 75-го до 685-го остатка. Некоторые фрагменты, включающие область от 75-го до 685-го остатка, могут представлять собой, например, аминокислоты 1-685 (685 аминокислот) или аминокислоты 75-685 (611 аминокислот).

SEQ ID NO: 1, являющаяся аминокислотной последовательностью, фактически включенной в белок ADAMTS13 и его функциональный фрагмент по настоящему изобретению, также включает аминокислотную последовательность, демонстрирующую значительную идентичность в отношении указанной выше последовательности. Термин "значительная идентичность" относится к аминокислотной последовательности, демонстрирующей гомологию по меньшей мере 70%, в частности, гомологию по меньшей мере 80%, более конкретно - гомологию по меньшей мере 90%, и наиболее конкретно - гомологию по меньшей мере 95% в отношении указанной выше аминокислотной последовательности при анализе с использованием алгоритма, общеупотребительного в этой области, после выравнивания с указанной выше аминокислотной последовательностью насколько это возможно.

В рамках изобретения термин "аутоантитело" относится к антителу, которое, являясь одним из иммуноглобулиновых белков, включающих один или более переменных доменов, связывающихся с эпитопом антигена, таким образом, способно специфически распознавать антиген, продуцируется собственной иммунной системой индивидуума, распознает и направленно воздействует на собственный белок. Наличие аутоантитела вызывает снижение или утрату эндогенной функции или биологической активности белка, специфически распознаваемого соответствующим аутоантителом, и, таким образом, становится причиной различных заболеваний.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения вариант белка ADAMTS13 выбран из группы, состоящей из каждого варианта белка, включающего замены аминокислотных остатков в следующих положениях:

- 85-ый и 317-ый остатки; 612-ый остаток; два или более из 282-го, 465-го и 672-го остатков; 635-ый остаток; 452-ой и 612-ый остатки; два или более из 278-го, 334-го и 427-го остатков; 618-ый остаток; 135-ый остаток; два или более из 126-го, 567-го и 651-го остатков; 413-ый остаток; 334-ый остаток; 314-ый остаток; два или более из 93-го, 364-го и 376-го остатков; 308-ой остаток; 656-ой остаток; 607-ой остаток; 612-ый и 624-ый остатки; 589-ый остаток; 650-ый и 656-ой остатки; 643-ий остаток; 585-ый и 658-ой остатки; два или более из 630-го, 654-го и 664-го остатков; четыре или более из 589-го, 608-го, 609-го, 624-го и 655-го остатков; 578-ой остаток; 585-ый остаток; 314-ый и 635-ый остатки; и 314-ый и 612-ый остатки.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения среди вариантов положений, используемых в настоящем изобретении, 85-ый остаток заменяют Phe, 93-ий остаток - Val, 126-ой остаток - Met, 135-ый остаток - Leu, 278-ой остаток - Leu, 282-ой остаток - Ala, 308-ой остаток - Lys, 314-ый остаток - Thr, 317-ый остаток - His, 334-ый остаток - Thr или Val, 364-ой остаток - Arg, 376-ой остаток - Asp, 413-ый остаток - Asp, 427-ой остаток - Asn, 452-ой остаток - Leu, 465-ый остаток - Asp, 567-ой остаток - Ser, 578-ой остаток - Leu, 585-ый остаток - Asn или Met, 589-ый остаток - Gln, 607-ой остаток - Arg, 608-ой остаток - Met, 609-ый остаток - Leu, 612-ый остаток - Phe или Tyr, 618-ый остаток - Ser, 624-ый остаток - Asp или Cys, 630-ый остаток - Leu, 635-ый остаток - Val, 643-ий

остаток - Phe, 650-ый остаток - His, 651-ый остаток - Asp, 654-ый остаток - Gly, 655-ый остаток - Val, 656-ой остаток - Arg или His, 658-ой остаток - His, 664-ый остаток - Asp, и 672-ой остаток - Val, соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, включающему: (а) описанный выше вариант белка ADAMTS13 по настоящему изобретению или его функциональный фрагмент; и (b) Fc-область иммуноглобулина IgG4, конъюгированную с указанным выше (а).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, когда Fc-область, полученную из иммуноглобулина IgG4, конъюгируют с вариантом белка ADAMTS13 по настоящему изобретению, стабильность *in vivo* значительно повышается при вероятности сохранения активности расщепления эндогенного vWF и активности уклонения от нейтрализующих антител, и, в частности, что значительно улучшена структурная нестабильность, наблюдаемая у фрагментов открытого типа, в которых часть дистального конца удалена.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения Fc-область содержит замены одного или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 22-го, 24-го и 26-го остатков SEQ ID NO: 2. Более конкретно, 22-ой остаток заменен Tug, 24-ый остаток - Thr, и 26-ой остаток - Glu, соответственно.

В рамках изобретения SEQ ID NO: 2 является Fc-областью (217 аминокислот), полученной из иммуноглобулина IgG4. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, когда описанный выше вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент, подвергают слиянию с полученной из иммуноглобулина IgG4 Fc-областью [IgG4 (YTE)], в которой 22-ой, 24-ый и 26-ой остатки заменены Tug, Thr и Glu, соответственно, время полужизни варианта белка ADAMTS13 или его функционального фрагмента в крови максимизировано, и что, таким образом, физиологическую активность после введения можно сохранять в течение длительного периода времени.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения слитый белок по настоящему изобретению дополнительно включает шарнирную область иммуноглобулина IgG1 между описанными выше (а) и (b).

В рамках изобретения шарнирная область, полученная из иммуноглобулина IgG1, может быть представлена SEQ ID NO: 3 (15 аминокислот).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к описанному выше варианту белка ADAMTS13 по настоящему изобретению или его функциональному фрагменту или нуклеотиду, кодирующему описанный выше слитый белок.

В рамках изобретения термин "нуклеотид" имеет значение, в полном объеме включающее молекулы ДНК (гДНК и кДНК) и РНК, и нуклеотиды, являющиеся основными структурными единицами в молекулах нуклеиновой кислоты, включают не только природные нуклеотиды, но также их аналоги, в которых сахар или основание модифицированы. Специалистам в этой области очевидно, что нуклеотидная последовательность, подлежащая экспрессии для лечения, продукции лекарственного средства и т.д., в настоящем изобретении не ограничена нуклеотидной

последовательностью, описанной в сопутствующем списке последовательностей. Некоторые изменения в нуклеотиде не вызывают изменения в белке. Такая нуклеиновая кислота включает все молекулы, имеющие функционально эквивалентный кодон, кодон, кодирующий ту же аминокислоту из-за вырожденности кодонов, и кодон, кодирующий биологически эквивалентную аминокислоту.

Учитывая описанные выше варианты, имеющие биологически эквивалентную активность, нуклеотиды для использования в настоящем изобретении считают включающими последовательности, демонстрирующие значительную идентичность в отношении последовательностей, описанных в списке последовательностей. Термин "значительная идентичность" относится к последовательности, демонстрирующей гомологию по меньшей мере 70%, гомологию по меньшей мере 80%, более конкретно - гомологию по меньшей мере 90%, и наиболее конкретно - гомологию по меньшей мере 95% в отношении последовательности по настоящему изобретению при анализе с использованием алгоритма, общеупотребительного в этой области, после выравнивания с указанной выше аминокислотной последовательностью насколько это возможно. В этой области описаны способы выравнивания для сравнения последовательности. Различные способы и алгоритмы для выравнивания описаны в Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65 (1992) и Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31 (1994). NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990)) доступен в National Center for Biological Information (NCBI), и т.д., и его можно использовать в комбинации с программами для секвенирования, такими как blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx.

Нуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать в форме генной терапии для доставки описанного выше варианта ADAMTS13 по настоящему изобретению в организм индивидуума в форме гена или их можно использовать для продуцирования рекомбинантного белка в фармацевтической форме посредством экспрессии варианта белка ADAMTS13 в клетке-хозяине.

В рамках изобретения термин "экспрессировать" означает позволять индивидууму экспрессировать эндогенный ген или встраивать его с использованием носителя гена так, чтобы повышать природный уровень экспрессии эндогенного гена, таким образом, делая ген реплицируемым в качестве экстрахромосомного фактора, или посредством завершения хромосомной интеграции в клетку индивидуума. Таким образом, термин "экспрессия" является синонимом терминов "трансформация", "трансфекция" и "трансдукция".

В рамках изобретения термин "носитель гена" относится к любым средствам транспорта гена в клетку, и термин "доставка гена" имеет то же значение, что и "трансдукция" гена в клетку. На тканевом уровне термин "доставка гена" имеет то же значение, что и "распространение гена". Таким образом, систему доставки гена по настоящему изобретению можно описать как систему проникновения гена и систему распространения гена.

Систему доставки гена по настоящему изобретению можно включать в форме экспрессирующей кассеты, являющейся полинуклеотидной конструкцией, включающей все элементы, необходимые для самостоятельной экспрессии гена, подлежащего встраиванию. Экспрессирующая кассета, как правило, включает промотор, функционально связанный с геном, сигнал терминации транскрипции, участок связывания рибосомы и сигнал терминации трансляции. Экспрессирующая кассета может находиться в форме экспрессирующего вектора, способного к ауторепликации.

Термин "система доставки гена", используемый в настоящем изобретении, можно использовать в отношении любой системы доставки гена, используемой для общепринятого встраивания генов, и он может включать, в качестве неограничивающих примеров, плазмиды, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), ретровирусы и лентивирусы, вирус простого герпеса, вирус осповакцины, липосомы и нисомы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции для профилактики или лечения тромботического заболевания, включающей в качестве активного ингредиента описанный выше вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по настоящему изобретению, описанный выше слитый белок или кодирующий их нуклеотид.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения тромботического заболевания, включающему введение индивидууму композиции, включающей в качестве активного ингредиента описанный выше вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по настоящему изобретению, описанный выше слитый белок или кодирующий их нуклеотид.

В рамках изобретения термин "тромботическое заболевание" относится к системному заболеванию, при котором кровоток снижен или заблокирован из-за тромба, образовавшегося в результате агрегации тромбоцитов в микроциркуляторном русле кровеносных сосудов, при этом ишемическое повреждение происходит в каждом органе, таком как почка, сердце и головной мозг.

Если ферментативная активность ADAMTS13 ингибирована нейтрализующим антителом, и, таким образом, он не осуществляет правильную деградацию фактора фон Виллебранда (vWF), происходит избыточная агрегация тромбоцитов и гиперпродукция тромбов. Таким образом, вариант белка ADAMTS13 по настоящему изобретению, в котором активность деградации vWF сохранена или улучшена при уклонении от нейтрализующих антител с высокой эффективностью, можно использовать в качестве композиции для эффективной профилактики или лечения различных тромботических заболеваний.

В рамках изобретения термин "профилактика" относится к ингибированию возникновения нарушения или заболевания у индивидуума, у которого никогда не диагностировали нарушение или заболевание, но который, вероятно, имеет нарушение или заболевание.

В рамках изобретения термин "лечение" относится к (a) ингибированию прогрессирующего нарушения, заболевания или симптома; (b) облегчению нарушения, заболевания или симптома; или (c) устранению нарушения, заболевания или симптома. Если композицию по настоящему изобретению вводят индивидууму, она играет роль в специфическом распознавании и деградации vWF, несмотря на наличие нейтрализующего антитела для блокирования избыточного образования тромбов, таким образом, ингибируя, устраняя или облегчая прогрессирующее тромботическое заболевание. Таким образом, композиция по настоящему изобретению как есть может стать композицией для лечения этих заболеваний, или ее можно вводить вместе с другими фармакологическими ингредиентами и использовать в качестве терапевтического адъюванта для указанных выше заболеваний. Таким образом, в рамках изобретения термин "лечение" или "терапевтическое средство" включает значение "вспомогательного лечения" или "терапевтического адъюванта".

В рамках изобретения термин "введение" или "вводить" относится к прямому введению терапевтически эффективного количества композиции по настоящему изобретению индивидууму таким образом, что то же количество образуется в организме индивидуума.

В рамках изобретения термин "терапевтически эффективное количество" относится к содержимому композиции, в которой фармакологический компонент, содержащийся в композиции, является достаточным для обеспечения терапевтического или профилактического эффекта в отношении индивидуума, которому будут вводить фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, и она включает значение "профилактически эффективного количества".

В рамках изобретения термин "индивидуум" включает, в качестве неограничивающих примеров, человека, мышшь, крысу, морскую свинку, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью, обезьяну, шимпанзе, павиана и макака-резуса. В частности, индивидуум по настоящему изобретению является человеком.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения тромботическое заболевание, которое можно подвергать профилактике или лечению с помощью композиции по настоящему изобретению, является тромботической микроангиопатией (ТМА). Более конкретно, тромботическая микроангиопатия (ТМА) является тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП), гемолитической уремическим синдромом (HUS), синдромом HELLP (гемолиз, повышенные ферменты печени и низкое количество тромбоцитов), преэклампсией и серповидно-клеточной анемией, более конкретно - тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП) или серповидно-клеточной анемией, и даже более конкретно - тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП).

Если композицию по настоящему изобретению получают в виде фармацевтической композиции, фармацевтически приемлемые носители, подлежащие включению в нее, являются общепотребительными для составления и включают, в качестве

неограничивающих примеров, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.д. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, в дополнение к указанным выше компонентам, может дополнительно включать смазочное средство, увлажнитель, подсластитель, ароматизатор, эмульгатор, суспендирующее средство, консервант и т.д. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и средства подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить перорально или парентерально, в частности, ее можно вводить парентерально, и более конкретно - ее можно вводить подкожно, трансдермально или внутривенно.

Подходящую дозу фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно прописывать различным образом в зависимости от факторов, таких как способ составления, способ введения, возраст, масса тела, пол, состояние здоровья, питание, время введения, путь введения, скорость экскреции и чувствительность реакции пациента. Предпочтительная доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению находится в диапазоне от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг для взрослых

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получать в стандартной лекарственной форме посредством составления с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или эксципиента способом, который легко может осуществлять специалист в области, к которой принадлежит настоящее изобретение, или ее можно получать посредством включения в многодозовый контейнер. В этом случае, состав может находиться в форме раствора в масляной или водной среде, суспензии, сиропа или эмульсии или форме экстракта, порошка, порошкообразного средства, гранулы, таблетки или капсулы, и может дополнительно включать дисперсант или стабилизатор.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу скрининга вариантов ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител, включающему стадии:

(а) получения варианта ADAMTS13, в котором один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 85-го, 93-го, 126-го, 135-го, 278-го, 282-го, 308-го, 314-го, 317-го, 334-го, 364-го, 376-го, 413-го, 427-го, 452-го, 465-го, 567-го, 578-го, 585-го, 589-го, 607-го, 608-го, 609-го, 612-го, 618-го, 624-го, 630-го, 635-го, 643-го, 650-го, 651-го, 654-го, 655-го, 656-го, 658-го, 664-го и 672-го остатков первой последовательности из списка последовательностей, заменены или deletированы; и

(b) приведения аутоантитела против ADAMTS13 в контакт с вариантом ADAMTS13, полученным на указанной выше стадии (а);

где, если аутоантитело связывается с вариантом ADAMTS13, с аффинностью ниже, чем для ADAMTS13 дикого типа, вариант ADAMTS13 определяют как вариант ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения для аутоантител.

В рамках изобретения авторы настоящего изобретения анализировали библиотеку вариантов приблизительно 800, полученных посредством случайного мутагенеза, на то, могут ли связываться с нейтрализующим ADAMTS13 антителом или нет; в результате, они обнаружили, что положения аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 играют важную роль в связывании с нейтрализующим антителом, и что аффинность к нейтрализующему антителу можно контролировать посредством изменений в этих положениях. Таким образом, различные варианты можно получать с помощью типа изменения и комбинации изменений, встроенных в эти положения остатков, обнаруженные авторами настоящего изобретения, и варианты ферментов ADAMTS13, активность которых не снижается при наличии аутоантител, можно выбирать посредством измерения связывания этих вариантов с аутоантителами.

В рамках изобретения термин "коэффициент уклонения от аутоантитела" относится к значению, выражаемому как процент соотношения вариантов ADAMTS13, несвязывающихся с аутоантителами, по сравнению с ADAMTS13 дикого типа, и высокий коэффициент уклонения от аутоантител означает, что аффинность к аутоантителам является низкой и, таким образом, уникальная биологическая активность ADAMTS13 (например, активность деградации vWF) не ингибируется аутоантителом. Таким образом, термин "вариант ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител" также можно выражать как "вариант ADAMTS13 со сниженной аффинностью к аутоантителам" или "вариант ADAMTS13 со сниженной способностью связываться с аутоантителами".

В рамках изобретения коэффициент уклонения от аутоантител варианта-кандидата можно оценивать посредством измерения связывания между вариантом ADAMTS13, полученным на указанной выше стадии (а), и аутоантителами. Связывание с аутоантителами можно измерять различными способами, и один из них является способом, включающим культивирование антител с антигенами (или клетками, экспрессирующими их), удаление несвязанного антитела (например, промывку) и определение связанных антител с помощью меченых антител, связывающихся с ними. Связывание между антигенами и антителами, как правило, опосредовано определяющими комплементарность областями (CDR) антител и эпитопами антигенов, и, в отличие от случайного и неспецифического присоединения белков, специфическая трехмерная структура антигенов и переменных доменов позволяет этим двум структурам осуществлять точное связывание. Таким образом, если изменения в ключевом участке реакции с аутоантителами, обнаруженными с помощью настоящего изобретения, осуществляют в подходящей комбинации, можно эффективно блокировать связывание аутоантител.

В результате измерения варианта-кандидата, имеющий сниженную аффинность или способность связываться с аутоантителами по сравнению с диким типом, можно определять как варианта ADAMTS13, имеющего улучшенный коэффициент уклонения от аутоантител.

В рамках изобретения термин "снижение аффинности" относится к значительному снижению связывания между вариантом ADAMTS13 и аутоантителом до той степени, что характерную ферментативную активность ADAMTS13 улучшают до измеримого уровня, который также можно описывать как "снижение связывающей способности". В частности, это относится к состоянию, при котором связывание снижено на 20% или более, более конкретно - на 40% или более, и более конкретно - на 60% или более, по сравнению с диким типом.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанную выше стадию (а) осуществляют посредством замены одного или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 85-го, 93-го, 126-го, 135-го, 278-го, 282-го, 308-го, 314-го, 317-го, 334-го, 376-го, 413-го, 427-го, 465-го, 567-го, 578-го, 585-го, 607-го, 609-го, 612-го, 624-го, 630-го, 643-го, 650-го, 654-го, 655-го, 656-го, 658-го и 672-го остатков.

#### **Полезные эффекты изобретения**

Характеристики и преимущества настоящего изобретения можно обобщить следующим образом:

(а) Настоящее изобретение относится к варианту белка ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител и композиции для профилактики или лечения тромботических заболеваний с ее использованием.

(б) Благодаря эффективному уклонению от соответствующих аутоантител, как известно, имеющих высокую аффинность связывания с главным доменом ADAMTS13, вариант белка ADAMTS13 по настоящему изобретению можно использовать в качестве эффективной терапевтической композиции для различных тромботических заболеваний, таких как тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), при которых аутоантитела становятся основным этиологическим фактором, и он может стабильно поддерживать биологическую активность при введении в организм.

(с) Кроме того, т.к. в ADAMTS13 также идентифицирован новый участок, распознаваемый аутоантителами, в настоящем изобретении в соответствующем участке можно использовать комбинацию различных изменений и, таким образом, эффективно использовать их для скрининга новых вариантов ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фиг. 1 показаны диаграммы, на которых показано конструирование библиотеки вариантов ADAMTS13 человека с использованием случайного мутагенеза и результаты подтверждения степени изменения. Фиг. 1а является схемой способа конструирования библиотеки посредством случайного мутагенеза. Случайные изменения вносили в область

MDTCS или домен S с помощью ПЦР сниженной точности (EP-ПЦР), встраивали в акцепторный вектор, клонировали, а затем трансформировали *E. coli* для получения колоний. Из колоний выделяли ДНК и подтверждали мутантные нуклеотидные последовательности с помощью секвенирования по Сэнгеру. На фиг. 1b показаны графики, на которых показаны результаты анализа секвенирования. Подтверждали общую степень изменения и форму изменения в библиотеке, сконструированной посредством таргетинга MDTCS или домена S, соответственно.

На фиг. 2 представлены диаграммы, на которых показаны результаты подтверждения участка связывания каждого домена ADAMTS13, связывающегося с нейтрализующим антителом. На фиг. 2a показана схема шести типов фрагментов ADAMTS13 (или полноразмерного ADAMTS13 дикого типа), в которых комбинируют различные домены, полученных для подтверждения степени экспрессии ADAMTS13 или участка связывания нейтрализующего антитела. На фиг. 2b показаны результаты осуществления вестерн-блоттинга с помощью антитела против V5 после иммунопреципитации посредством смешивания сефарозы с протеином A и каждого нейтрализующего антитела с использованием белков, экспрессируемых с каждым доменом ADAMTS13. "Исходное" означает уровень экспрессии белка для каждого домена. Фиг. 2c является схемой участка связывания нейтрализующего антитела против ADAMTS13, на которой показано, что антитело Ab 4-16 специфически связывается с доменом S, антитело Ab 67 - с доменом D, и антитело Ab 66 - с доменом T2-T8, соответственно.

На фиг. 3 представлены диаграммы, на которых показаны результаты скрининга вариантов, уклоняющихся от антител против ADAMTS13 или имеющих активность, превосходящую ADAMTS13 дикого типа. Коэффициент уклонения и активность ADAMTS13 в отношении Ab антитела 4-16 или антитела Ab 67 измеряли в клонах дикого типа и вариантах ADAMTS13. Относительную активность вычисляли, подтверждая специфические титры клонов дикого типа и вариантов и подставляя их в следующее выражение:  $\text{Относительная активность (\%)} = \frac{\text{специфический титр вариантов}}{\text{специфический титр ADAMTS13 дикого типа}} \times 100$ .

На фиг. 4 показаны результаты, подтверждающие коэффициент уклонения 12 типов полноразмерных вариантов ADAMTS13 для отдельных нейтрализующих антител. Коэффициенты уклонения от антител для 7 типов нейтрализующих антител (Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65 и Ab67) измеряли на 12 типах полноразмерных вариантов ADAMTS13. Коэффициент уклонения от нейтрализующего антитела вычисляли, сравнивая относительный уровень связывания со значением ADAMTS13 WT и подставляя относительный коэффициент уклонения в следующее уравнение с его использованием:  $\text{Коэффициент уклонения (\%)} = (1 - \frac{\text{связывающая способность вариантов}}{\text{связывающая способность ADAMTS13 WT}}) \times 100$ .

На фиг. 5 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от отдельных нейтрализующих антител в среде для культивирования с экспрессией Fc-

присоединенного варианта фрагмента MDTCS. Выбранные 12 типов вариантов подвергали фрагментации MDTCS, а затем Fc-присоединенные варианты комбинировали с выбранными мутантными аминокислотными остатками и измеряли коэффициент уклонения от нейтрализующих антител и относительную активность ADAMTS13 в отношении восьми нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65 и Ab67) с использованием среды для культивирования, в которой экспрессировалось всего 14 типов вариантов, включая варианты DM1 и DM2, имеющие два изменения аминокислот. Коэффициент уклонения (%) =  $(1 - \text{связывающая способность вариантов} / \text{связывающая способность ADAMTS13 WT}) \times 100$ ; относительная активность (%) =  $\text{специфический титр вариантов} / \text{специфический титр ADAMTS13 WT} \times 100$

На фиг. 6 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от смешанных нейтрализующих антител в условиях среды для культивирования с экспрессией Fc-присоединенного варианта фрагмента MDTCS. Девять типов нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66 и Ab67), которые смешивали в равных долях, смешивали в 4 нМ среде для культивирования с экспрессией MDTCS-Fc (т.е. контрольная группа) и 12 типами вариантов-кандидатов и позволяли им реагировать. Затем остаточную активность каждого варианта-кандидата вычисляли посредством подстановки в следующее уравнение: Остаточная активность (%) =  $A \div B \times 100$  (A: активность в условиях смешанных нейтрализующих антител, B: активность в условиях отсутствия обработки нейтрализующими антителами).

На фиг. 7 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от отдельных нейтрализующих антител в условиях среды для культивирования с Fc-присоединенным вариантом фрагмента MDTCS и очищающего раствора. Коэффициент уклонения и относительную активность нейтрализующих антител для восьми типов отдельных нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65 и Ab67) измеряли с использованием среды для культивирования, в которой экспрессировалось 12 типов вариантов (1C03, 2B01, 2B02, 3B05, 4E11, 4H07, 5G08, 7A02, 8D01, 8D05, DM1 и DM2), или очищающего раствора, очищенного с использованием системы Phytip (фиг. 7a и 7b). Концентрацию очищающего раствора подтверждали посредством ELISA Fc. Коэффициент уклонения (%) =  $(1 - \text{связывающая способность вариантов} / \text{связывающая способность MDTCS-Fc}) \times 100$ , относительная активность (%) =  $\text{специфический титр вариантов} / \text{специфический титр MDTCS-Fc} \times 100$ . Синими столбиками указаны очищенные варианты белков и серыми столбиками указаны медианные значения экспрессируемых вариантов белков, соответственно.

На фиг. 8 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от смешанных нейтрализующих антител в условиях среды для культивирования с Fc-присоединенным вариантом фрагмента MDTCS и очищающего раствора. Восемь типов нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65 и Ab67), которые смешивали в равных долях, смешивали в среде для культивирования с экспрессией MDTCS-Fc (т.е. контрольная группа) и 12 типами вариантов-кандидатов или

4 нМ очищающим раствором и позволяли им реагировать. Затем измеряли остаточную активность каждого варианта-кандидата. Остаточную активность вычисляли посредством подстановки в следующее уравнение:  $\text{остаточная активность (\%)} = A \div B \times 100$  (А: активность в условиях смешанных нейтрализующих антител, В: активность в условиях отсутствия обработки нейтрализующими антителами).

На фиг. 9 представлены графики, на которых показаны фармакокинетические результаты Fc-присоединенных вариантов фрагментов MDTCS. После введения MDTCS или Fc (IgG1-YTE)-присоединенного MDTCS и четырех конечных вариантов-кандидатов (1C03, 5C09, 7A02 и DM2) фрагментов белков в хвостовую вену мышей плазму получали каждый час. Белок вводили таким образом, что специфический титр каждого материала может составлять 160 МЕ/кг, и активность материалов, оставшихся в плазме, получаемых каждый час, измеряли с помощью анализа активности.

На фиг. 10 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от отдельных нейтрализующих антител в условиях среды для культивирования с IgG1-YTE-присоединенным вариантом фрагмента MDTCS. Выбранные пять типов вариантов подвергали фрагментации MDTCS и измеряли коэффициент уклонения от нейтрализующих антител и относительную активность восьми типов отдельных нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, и Ab67) с использованием среды для культивирования, в которой экспрессировались IgG1-YTE-присоединенные варианты (фиг. 10а и 10b).  $\text{Коэффициент уклонения (\%)} = (1 - \text{связывающая способность вариантов} / \text{связывающая способность MDTCS-IgG1-YTE}) \times 100$ ;  $\text{Относительная активность (\%)} = \text{специфический титр вариантов} / \text{специфический титр MDTCS-IgG1-YTE} \times 100$ .

На фиг. 11 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от смешанных нейтрализующих антител в условиях среды для культивирования с экспрессией IgG1-YTE-присоединенного варианта фрагмента MDTCS. Девять видов нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66 и Ab67), которые смешивали в равных долях, смешивали в 4 нМ среде для культивирования с экспрессией MDTCS-IgG1-YTE (т.е. контрольная группа) и пятью типами вариантов-кандидатов и позволяли им реагировать. Затем остаточную активность каждого варианта-кандидата вычисляли с помощью следующего уравнения:  $\text{Остаточная активность (\%)} = A \div B \times 100$  (А: активность в условиях смешанных нейтрализующих антител, В: активность в условиях отсутствия обработки нейтрализующими антителами).

На фиг. 12 показаны результаты, подтверждающие способность к уклонению от смешанных нейтрализующих антител в условиях среды для культивирования с IgG1-YTE-присоединенным вариантом фрагмента MDTCS. Девять типов нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66 и Ab67), которые смешивали в равных долях, смешивали в 4 нМ очищающего раствора с MDTCS-IgG1-YTE (т.е. контрольная группа) и пятью типами вариантов-кандидатов и позволяли им реагировать. Затем остаточную активность каждого варианта-кандидата вычисляли с помощью

следующего уравнения: Остаточная активность (%)= $A \div B \times 100$  (A: активность в условиях смешанных нейтрализующих антител, B: активность в условиях отсутствия обработки нейтрализующими антителами).

На фиг. 13 представлена схема, на которой показан способ тестирования коэффициента уклонения от нейтрализующих антител с использованием имитирующей aTTP модели на мышах (фиг. 13a), и диаграмма, на которой показана остаточная активность ADAMTS13 в зависимости от дозы вариантов-кандидатов (фиг. 13b), соответственно.

На фиг. 14 представлена схема, на которой показан способ тестирования на сохранение остаточной активности ADAMTS13 и клинические симптомы в зависимости от концентрации DM2-IgG1-YTE, где показан лучший коэффициент уклонения от нейтрализующих антител с использованием имитирующей aTTP модели на мышах (фиг. 14a), схема, на которой показано улучшение уровней тромбоцитов и ЛДГ и активности ADAMTS13 (фиг. 14b) и результаты наблюдения клинических симптомов (фиг. 14c), соответственно.

На фиг. 15 представлена схема, на которой показан способ тестирования на наличие/отсутствие улучшения гематологических и клинических симптомов и степень восстановления активности ADAMTS13 человека при введении DM2-IgG1-YTE в модели cTTP на мышах (фиг. 15a), и улучшение уровней тромбоцитов и ЛДГ и активности ADAMTS13 и наблюдение результатов восстановления активности ADAMTS13 (фиг. 15b), соответственно.

### **Принцип изобретения**

Далее в настоящем описании настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью примеров. Эти примеры предназначены исключительно для более подробного иллюстрирования настоящего изобретения, и специалистам в этой области очевидно, что объем настоящего изобретения не ограничен этими примерами в соответствии с сущностью настоящего изобретения.

### **ПРИМЕРЫ**

#### **Экспериментальный способ**

*Конструирование библиотеки вариантов ADAMTS13 человека посредством случайного мутагенеза*

Получали экспрессирующий вектор, содержащий ADAMTS13 дикого типа человека, и два вектора для рецепторов для клонирования мутантных областей MDTCS (металлопротеазы, дизинтегрин-подобного, тромбоспондинового повтора типа 1 (TSP1), Cys-богатого и спейсера) или спейсерного (S) домена. ПЦР сниженной точности (набор для случайного мутагенеза GeneMorph II, Agilent Technologies) осуществляли для области MDTCS или домена S ADAMTS13 с использованием олигонуклеотидов из таблицы 1 ниже, и продукт ПЦР для амплифицированного MDTCS или домена S получали посредством элюции после электрофореза в агарозном геле. После лигирования элюированного продукта ПЦР и акцепторных векторов способом клонирования Golden

Gate полученный продукт использовали для трансформации *Escherichia coli* (*E. coli*) для получения библиотеки вариантов, полученной случайным мутагенезом. Плазмидную ДНК, подходящую для трансфекции, выделяли из 384 колоний *E. coli* на библиотеку с использованием набора Plasmid Plus 96 Miniprep (QIAGEN) для получения всего 768 мутантных вариантов ADAMTS13. Тип и положение изменений аминокислот подтверждали с помощью анализа нуклеотидной последовательности соответствующей ДНК.

[Таблица 1]

Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР сниженной точности

Праймер	Последовательность (5'-3')
MDTCS-прямой	CACCGGTCTCNTAGAGCTGCTGGCGGCAT
MDTCS-обратный	GGCTGGTCTCNCCCAAGCCTGCCGAGGCTTA
S-прямой	CACCGGTCTCATAGAAGAGAATACGTGACCTTCCTGAC
S-обратный	GGCTGGTCTCACCCAGTATTCCTCGCCGTATCTTCTGTA

*Транзиторная экспрессия вариантов ADAMTS13 человека*

Для экспрессии белков вариантов ADAMTS13, клетки Expi293F™ (Thermo Fisher, кат. № A14527) получали в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток/мл посредством разведения в среде для экспрессии Expi293. В первой пробирке 2,5 мкг плазмидной ДНК разводили в среде со сниженным содержанием сыворотки Opti-MEM I (Thermo Fisher, кат. № 31985-070) до конечного объема 152,5 мкл, а в другой пробирке смешивали 8 мкл ExpiFectamine 293 и 140 мкл среды со сниженным содержанием сыворотки Opti-MEM I и позволяли отстаиваться в течение 5 минут. 152,5 мкл разведенной плазмидной ДНК добавляли к смешанному раствору во второй пробирке и позволяли отстаиваться в течение 20 минут. 2,5 мл полученных клеток аликвотировали в каждую лунку 24-луночных планшетов с глубокими лунками. Подготовленную заранее смесь ExpiFectamine 293 и плазмидной ДНК добавляли к клеткам и культивировали со встряхиванием при 225 об./мин. в инкубаторе при 37°C и CO<sub>2</sub>. Через 24 часа добавляли 15 мкл усилителя трансфекции ExpiFectamine 1 и 150 мкл усилителя 2 и культивировали в течение 5 дней. На 6-ой день культуру центрифугировали при 300 gcf в течение 5 минут для сбора супернатанта и полученное использовали для анализа для выбора вариантов.

*Конструирование нейтрализующих антител против ADAMTS13 человека и мыши*

Для конструирования нейтрализующих антител против ADAMTS13, связывающихся с разными доменами, 16 типов Fab, имеющих превосходную способность к связыванию с ADAMTS13, подвергали селекции с использованием полноразмерного рекомбинантного ADAMTS13 человека (R&D Systems, кат. № 6156-AD) в качестве антигена и фаговой библиотеки PLATINUM® из комбинаторной библиотеки антител человека (HuCAL, Bio-Rad), и из них шесть типов антител (Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66 и Ab67), связывающихся с каждой из MDTCS-части и С-концевой части, получали в виде полноразмерных антител. Ab3-01, Ab 4-16 и Ab 4-20, который, как известно,

специфически связываются с доменом S в плазме пациента аТТР, также конструировали в виде полноразмерных антител и использовали для селекционного анализа вариантов.

*Измерение уровня экспрессии варианта ADAMTS13 человека*

Для подтверждения уровня экспрессии варианта белка ADAMTS13, присутствующего в среде для культивирования, полученной при транзитной экспрессии, осуществляли ELISA с использованием антитела против ADAMTS13 (антитело Ab 66, GC Green Cross). Распределяли по 100 мкл антитела против ADAMTS13, разведенного до 2 мкг/мл в PBS (Lonza, 17-516Q), на лунку в 96-луночном микропланшете для EIA/RIA с высоким связыванием (Corning, кат. № 3590) и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем микропланшет промывали три раза с использованием промывочный буфер (0,1% об./об. Tween 20 в PBS). Блокирующий буфер (1% масс./об. бычьего сывороточного альбумина в PBS) распределяли в количестве 300 мкл на лунку и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 часов с последующей промывкой три раза промывочным буфером. Рекомбинантный ADAMTS13 человека (R&D Systems, 6156-AD) использовали в качестве стандартного образца и культуру, подлежащую измерению, разводили блокирующим буфером в 16 или 32 раза, распределяли в количестве 100 мкл на лунку и проводили реакцию посредством перемешивания при 500 об./мин. в течение одного часа при комнатной температуре. После промывки три раза, антитело против метки 6X His (Abcam, кат. № Ab1187) разводили в соотношении 1:10000 и распределяли в количестве 100 мкл на лунку с последующей реакцией посредством перемешивания при 500 об./мин. при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки 6 раз добавляли ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) в количестве 100 мкл на лунку и позволяли ему реагировать при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем добавляли стоп-буфер (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) в количестве 100 мкл на лунку и измеряли поглощение при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов. После подстановки измеренного поглощения в кривую ответа стандартного образца и вычисления концентрации калибровали коэффициент разбавления для определения конечной концентрации.

*Измерение уровня экспрессии Fc-слитых фрагментов и вариантов MDTCS*

Антитело козы против Fc IgG человека (Abcam, кат. № A3803), разведенные до 2 мкг/мл с использованием PBS (Lonza, кат. № 17-516Q), добавляли в количестве 100 мкл на лунку в 96-луночный микропланшет для EIA/RIA с высоким связыванием (Corning, кат. № 3590) и позволяли ему реагировать при комнатной температуре в течение двух часов. Затем микропланшет промывали три раза с использованием промывочного буфера (0,1% об./об. Tween 20 в PBS). Блокирующий буфер (1% масс./об. бычьего сывороточного альбумина в PBS) добавляли в количестве 300 мкл на лунку и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение двух часов с последующей промывкой три раза промывочным буфером. В качестве стандартного образца использовали Fc-слитый фрагмент белка MDTCS, концентрация которого подтверждена, и образец, подлежащий измерению, разводили блокирующим буфером для включения в стандартный диапазон.

Затем полученное распределяли в количестве 100 мкл на лунку и проводили реакцию посредством перемешивания при 400 об./мин. при комнатной температуре в течение одного часа. После промывки три раза антитело против IgG человека (Fc-специфическое), конъюгированное с пероксидазой (Sigma-Aldrich, кат. № A0170), разводили в соотношении 1:10000, распределяли в количестве 100 мкл на лунку и проводили реакцию посредством перемешивания при 400 об./мин. при комнатной температуре в течение одного часа. После промывки шесть раз добавляли ТМВ в количестве 100 мкл на лунку и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем добавляли стоп-буфер (0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) в количестве 100 мкл на лунку и измеряли поглощение при 450 нм с помощью спектрофотометра для чтения микропланшетов.

*Измерение активности вариантов ADAMTS13 человека*

Для измерения активности вариантов ADAMTS13 осуществляли эксперимент с использованием руководства к набору для анализа активности ADAMTS13 Technozyme (Technoclone, кат. № 5450701). Субстрат GST-vWF73 добавляли в количестве 100 мкл на лунку, позволяли реагировать при комнатной температуре в течение одного часа, а затем промывали три раза промывочным буфером. В качестве стандартного образца использовали калибратор из набора и в качестве культуры, подлежащей измерению, добавляли стоковый раствор или его 3-кратное разведение в количестве 100 мкл на лунку с использованием термически инактивированной плазмы и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 30 минут. После промывки три раза промывочным буфером добавляли конъюгат в количестве 100 мкл на лунку, позволяли реагировать при комнатной температуре в течение одного часа и снова промывали три раза промывочным буфером. Добавляли цветной реагент ТМВ в количестве 100 мкл на лунку и позволяли реагировать в течение 30 минут, а затем добавляли 100 мкл стоп-буфера для остановки реакции и измеряли поглощение при 450 нм с помощью ридера для ELISA. Для вычисления специфического титра (МЕ/мг) результат экспрессии (мкг/мл) использовали в отношении значения активности (МЕ/мл) и вычисляли относительную активность (%) посредством подстановки в следующее уравнение с использованием специфических титров ADAMTS13 дикого типа (WT) и вариантов:

Относительная активность (%) = специфический титр вариантов / специфический титр ADAMTS13 дикого типа × 100

*Подтверждение коэффициента уклонения от нейтрализующих антител против ADAMTS13 человека*

Для подтверждения способности каждого варианта ADAMTS13 к уклонению от нейтрализующих антител против ADAMTS13 осуществляли ELISA с использованием восьми типов антител против ADAMTS13 (Ab3-01, Ab 4-16, Ab4 -20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65 и Ab 67, GC Green Cross). Антитело против ADAMTS13, разбавленное PBS (Lonza, кат. № 17-516Q) до 1-2 мкг/мл, добавляли в количестве 100 мкл на лунку на 96-луночный микропланшет для EIA/RIA с высоким связыванием (Corning, кат. № 3590) и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение двух часов. Затем микропланшет

промывали три раза промывочным буфером (0,1% Tween 20 в PBS). Добавляли блокирующий буфер (1% BSA в PBS) в количестве 300 мкл на лунку и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение двух часов, а затем промывали три раза промывочным буфером. В качестве стандартного образца использовали рекомбинантный ADAMTS13 человека (R&D systems, кат. № 6156-AD), и культуру, подлежащую измерению, разводили блокирующим буфером до 25-50 нг/мл, добавляли в количестве 100 мкл на лунку и проводили реакцию посредством встряхивания при 500 об./мин. при комнатной температуре в течение одного часа. После промывки три раза антитело против метки 6X His (Abcam, кат. № Ab1187) разводили в соотношении 1:10000, распределяли в количестве 100 мкл на лунку, и проводили реакцию посредством встряхивания при 500 об./мин. при комнатной температуре в течение одного часа. После промывки шесть раз ТМВ распределяли в количестве 100 мкл на лунку и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 10-20 минут. Затем добавляли стоп-буфер (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) в количестве 100 мкл на лунку и измеряли поглощение при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов. Коэффициент уклонения от нейтрализующих антител вычисляли таким образом, что относительный уровень связывания сравнивали со значением для ADAMTS13 дикого типа, а затем относительный коэффициент уклонения подставляли в следующее уравнение:

$$\text{Коэффициент уклонения (\%)} = \frac{\text{1-связывающая способность вариантов}}{\text{связывающая способность ADAMTS13 дикого типа}} \times 100$$

*Конструирование MDTCS и Fc (IgG1-YTE)-конъюгированного MDTCS вариант и продукция белка*

Конструировали экспрессирующий вектор, в котором IgG1-YTE (шарнирная область-Fc) конъюгировали с MDTCS или фрагментом варианта MDTCS, и осуществляли синтез гена (Thermo Fisher Scientific, GeneArt® Gene Synthesis), как показано в таблице 2 ниже. Экспрессирующие векторы конструировали посредством инсерции каждого из синтетических генов в таблице 2 в вектор pMSID2 (сконструированный GC Green Cross). Клетки CHO DG44(S) субкультивировали в соответствии с ожидаемым количеством с использованием среды CDM4CHO (GE, кат. № SH30557,02) при  $3 \times 10^5$  клеток/мл. В день трансфекции собирали  $3 \times 10^7$  живых клеток, суспендировали в OptiPro™ SFM (Gibco, кат. № 12309019), разводили до конечного объема  $1 \times 10^7$  клеток/мл (3 мл), добавляли во встряхиваемую колбу 125 мл и культивировали в инкубаторе со встряхиванием и CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) при 140 об./мин. 30 мкг экспрессирующего вектора смешивали до общего объема 1,5 мл с использованием OptiPro™ SFM (пробирка 1). Смешивали 90 мкл Transporter 5™ PEI (Polyscience, кат. № 26008-5) и 1,410 мкл OptiPro™ SFM (пробирка 2). После добавления полученного ранее содержимого пробирки 2 в пробирку 1 и осторожного смешивания смеси позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 20-30 минут. 3 мл комплекса ДНК:PEI по каплям добавляли к 3 мл полученных ранее клеток CHO DG44(S). Полученное культивировали при 140 об./мин. в инкубаторе со встряхиванием и CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) и через 4 часа добавляли 24 мл среды CDM4CHO к 6

мл комплекса CHO DG44(S)/ДНК:PEI и культивировали в тех же условиях. Через 48 часов инкубации измеряли количество и жизнеспособность клеток и полученный материал добавляли в центрифужную пробирку до объема  $15 \times 10^5$  клеток, центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 5 минут, удаляли супернатант и суспендировали в 30 мл среды CDM4CHO, содержащей 20 нМ MTX, а затем инокулировали во встряхиваемую колбу и культивировали. Субкультивирование осуществляли каждые 3-4 дня до восстановления жизнеспособности клеток до 90% или более. Конечную гиперэкспрессирующую линию клеток культивировали в крупном масштабе и использовали для очистки белка. Для очистки белка MDTCS полученную культуру центрифугировали для удаления клеток, а затем фильтровали с использованием стерильного фильтра, сделанного из ацетата целлюлозы (Sartobran P, 5235307H7-00, Sartorius), после центрифугирования полученного культурального раствора. Отфильтрованную культуру концентрировали, а затем очищали с использованием анионообменной хроматографии (Q Sepharose Fast Flow, GE), хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах (гидроксиапатите, Bio-Rad) и аффинной хроматографии (Blue Sepharose, GE) и фильтровали IgG1-YTE-конъюгированный вариант белка MDTCS таким образом, что культуру гиперэкспрессирующей линии клеток центрифугировали для удаления клеток, а затем очищали с использованием антибактериального фильтра, сделанного из ацетата целлюлозы (Sartobran P, 5235307H7-00, Sartorius). Очистку осуществляли с использованием отфильтрованной культуры с использованием аффинной хроматографии (Protein A, MabSelect SuRe, GE Healthcare) и эксклюзионной хроматографии. Подтверждали, что очищенный белок имел чистоту 95% или более.

[Таблица 2]

Аминокислотная последовательность слитого белка MDTCS-IgG1-YTE

Шарнирная область	IgG1
Fc(CH2-CH3)	IgG4 (YTE)
Аминокислотная последовательность	MHQRHPRARCPPLCVAGILACGFLGCGWGPSHFQQSCLQALE PQAVSSYLSPGAPLKGRRPPSPGFQRQRQRRAAGGILHLELL VAVGPDVFAQHQEDTERYVLTNLNIGAELLRDP SLGAQFRVH LVKMOVILTEPEGAPNITANLTSSLLSVCGWSQTINPEDDTPG HADLVLYITRFDLELPDGNRQVRGVTQLGGACSP TWSCLITED TGFDLGVTIAHEIGHSFGLEHDGAPGSGCGPSGHVMASDGAA PRAGLAWSPCSRRLSLLSAGRARCVDPPRPQPGSAGHPP DAQPGLYYSANEQCRVAFGPKAVACTFAREHLDMCQALSCH TDPLDQSSCSRLLVPLLDGTECGVEKWCSKGRCSRSLVELTPIA AVHGRWSSWGPRSPCSRSCGGGVVTRRRQCNNPRPAFGGRA CVGADLQAEMCNTQACEKTQLEFMSQQCARTDGQPLRSSPG GASFYHWGAAVPHSQGDALCRHMCRAIGESFIMKRGDSFLD

	<p>GTRCMPSPGPREDDGTL<del>SL</del>CVSGSCRTFGCDGRMDSQQVWDRC  QVCGGDNSTCSPRKGSFTAGRAREYVTFLTVTPNLTSVYIANH  RPLFTHLAVRIGGRYVVAGKMSISPNTTYPSSLLEDGRVEYRVA  LTEDRLPRLEEIRIWGPLQEDADIQVYRRYGEEYGNLTRPDITF  TYFQPKPRQAEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD  TLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAK  GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  ALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
--	--

\*Черным цветом выделено: MDTCS/Подчеркнуто: шарнирный домен/курсив: Fc  
*Подтверждение фармакокинетики слитого белка MDTCS-шарнирная область-Fc*

Для сравнения срока действия в крови и фармакокинетических параметров слитого белка MDTCS-IgG1-YTE (шарнирная область-Fc) использовали 44 или 52 мышей C57BL/6 (4 мышей/время забора крови) в каждой группе. После инъекции 160 МЕ/кг MDTCS (контрольная группа) и 3 типов материалов, в которых IgG1-YTE слит с вариантами MDTCS (тестовая группа), в хвостовую вену собирали образцы крови через 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 и 168 часов. Собирали 500 мкл крови из сердца с помощью шприца, содержащего 10% трицитрата натрия (т.е. антикоагулянт), и центрифугировали при 2000×g при 4°C в течение 20 минут для отделения супернатанта и, таким образом, получали плазму. Активность варианта MDTCS-шарнирная область-Fc present в плазме измеряли по руководству к набору для анализа активности ADAMTS13 Technozyme (Technoclone, кат. № 5450701). Кроме того, осуществляли анализ активности для плазмы, полученной из 44 мышей для получения среднего значения (0,0772 МЕ/мл) активности ADAMTS13 мыши в плазме мыши. Вычитая соответствующее значение из измеренного значения активности образца, исследуемого на РК, можно исключать активность ADAMTS13 мыши, свойственной плазме мыши, и получать только результат для активности вводимого материала. Данные анализировали посредством некомпартментного анализа с использованием способа наивного объединения и WINNONLIN.  $t_{1/2}$  означает время полужизни лекарственного средства в крови,  $AUC_{Inf}$  означает площадь под кривой графика активности от времени 0 до бесконечности, и среднее время удержания (MRT) означает среднее время удержания молекулы лекарственного средства в организме.

*Подтверждение участка связывания ADAMTS13 с нейтрализующими антителами*

Последовательности нуклеиновой кислоты шести типов ADAMTS13, в которых полноразмерные домены дикого типа или С-концевые домены последовательно делетированы, клонировали в вектор pcDNA3.1 V5-His B (Invitrogen, кат. № V81020). Сконструированную ДНК подвергали иммунопреципитации посредством добавления

протеин А-сефарозы 4В с использованием культуры, полученной указанным выше способом транзитной экспрессии с последующим вестерн-блоттингом. В частности, 30 нМ трех типов нейтрализующих антител против ADAMTS13 (Ab4-16, Ab66 и Ab67) добавляли к нормальной контрольной плазме (HemosIL, кат. № 00020003110). После совместного добавления 10 мл плазмы, содержащей нейтрализующие антитела, и культуры, содержащей 50 нг каждого фрагмента белка ADAMTS13, к ним добавляли 500 мкл связывающего буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100 и 1% BSA) и позволяли реагировать при 4°С в течение 24 часов. После завершения реакции добавляли 20 мкл смолы протеин А-сефароза 4В (Thermo Fisher Scientific, кат. № 101041) в виде 50% суспензии и позволяли реагировать при 4°С в течение 4 часов. Смолу собирали посредством центрифугирования при 845 gcf в течение 1 минуты, а затем промывали три раза промывочным буфером (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100). Белки, связанные со смолой, элюировали с помощью буфера для образцов с SDS (Novex, кат. № NP0007), содержащего 10% β-меркаптоэтанола, и нагревали при 95°С в течение 5 минут с последующим электрофорезом в ПААГ с SDS и иммуноблоттингом с антителом V5 (Invitrogen, кат. № R960-25).

#### *Оценка вариантов PoC в модели на мышах с имитацией заболевания aTTP*

Модель на мышах с имитацией заболевания aTTP получали посредством введения мышам с КО ADAMTS13 нейтрализующего антитела против ADAMTS13 человека. Мышей с КО ADAMTS13 подготавливали в Macrogen посредством индуцирования крупных делеций и вариантов со сдвигом рамки считывания между экзонами 1 и 6 гена ADAMTS13 с использованием системы CRISPR/Cas9. девять типов нейтрализующих антител против ADAMTS13 (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66 и Ab67), которые смешивали в равных долях, вводили внутривенно мышам с КО ADAMTS13 возрастом 12-25 недель в дозе 0,54 мг/кг. Через 15 минут контрольный материал (MDTCS-Fc) или пять типов вариантов (1C03, 2B02, 5C09, 7A02 и DM2) вводили в дозе 5000 МЕ/кг или 7000 МЕ/кг. Образец крови получали через 6 часов после введения для измерения активности ADAMTS13.

Для подтверждения того, улучшается ли восстановление активности ADAMTS13 и гематологические свойства, показанные в модели aTTP на мышах при введении варианта DM2, девять типов нейтрализующих антител против ADAMTS13 (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66 и Ab67), которые смешивали в равных долях, вводили внутривенно мышам с КО ADAMTS13 возрастом 12-25 недель в дозе 0,54 мг/кг. Через 15 минут контрольный материал (MDTCS-Fc) или вариант DM2 вводили в дозе 5000 МЕ/кг, 7000 МЕ/кг или 14000 МЕ/кг. Через 6 часов После введения 2000 МЕ/кг рекомбинантного vWF человека (VEYVONDI) через 30 минут после введения нейтрализующих антител получали 700 мкл крови и 300 мкл крови добавляли в пробирку с ЭДТА (BD Medical, REF365974), а другие 300 мкл добавляли в пробирку с SST (BD Medical, REF365967), держали при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем центрифугировали при 4°С при 3000 об./мин. в течение 15 минут для отделения сыворотки. Оставшуюся кровь

смешивали с цитратом натрия в соотношении 9:1 (кровь:цитрат натрия), и плазму отделяли и использовали для анализа остаточной активности ADAMTS13 человека в плазме. В то время как цельную кровь в пробирке с ЭДТА подвергали общим анализам крови, таким как подсчет тромбоцитов (PLT) с использованием гемоцитометра (ADVIA 2120i, Siemens), сыворотку, отделенную в пробирку с SST, использовали для измерения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с использованием биохимического анализатора крови (Hitachi, 7180). Для статистического анализа использовали односторонний ANOVA с критерием Тьюки.

#### *Оценка вариантов PoC в модели на мышах с заболеванием сТТР*

Модель на мышах с заболеванием сТТР получали с использованием мышей с КО ADAMTS13. Мышам с КО ADAMTS13 возрастом 12-25 недель вводили внутривенно носитель или вариант DM2 в дозе 20 МЕ/кг, 60 МЕ/кг, 180 МЕ/кг и 360 МЕ/кг, через 15 минут вводили рекомбинантный vWF человека (VEYVONDI) в дозе 2000 МЕ/кг и через 6 часов получали образец крови. В то время как цельную кровь использовали для общих анализов крови, включая измерение уровня тромбоцитов, сыворотку использовали для измерения уровня ЛДГ и плазму использовали для анализа активности ADAMTS13 человека.

#### **Результаты эксперимента**

*Конструирование вариантов ADAMTS13 человека с использованием случайного мутагенеза*

В случае нейтрализующих антител против ADAMTS13, которые имеют пациенты с аТТР, описано, что доля связывания с MDTCS среди различных доменов ADAMTS13 является относительно очень высокой, составляя более 97%, и что домен S является наиболее распространенным участком связывания (Tersteeg et al, 2016; Klaus et al., 2004; Leken et al., 2005). Учитывая указанное выше, каждую библиотеку получали, осуществляя ПЦР сниженной точности таким образом, что могли возникать изменения, нацеленные на MDTCS-часть или домен S (фиг. 1a). В результате получения ДНК 384 вариантов ADAMTS13 из каждой библиотеки и анализа нуклеотидных последовательностей, общая степень изменения в библиотеке MDTCS-части составляла 72,9%, и, в частности, молчащие мутации или не-мутации демонстрировали частоту 23,7%, пустые векторы или плохие последовательности - 3,1%, нонсенс-мутации - 8,9%, мутации со сдвигом рамки считывания - 4,9%, и миссенс-мутации - 59,1% (фиг. 1b). В случае библиотеки с доменом S общая частота мутаций составляла 50,8%, и молчащие мутации или не-мутации - 44,5%, пустые векторы или плохие последовательности - 4,7%, нонсенс-мутации - 2,3%, мутации со сдвигом рамки считывания - 3,1%, и миссенс-мутации - 45,3% (фиг. 1b). Эксперимент по селекции осуществляли с использованием приблизительно 500 вариантов, за исключением вариантов, демонстрировавших молчащие мутации или не-мутации, пустые векторы или плохие последовательности и нонсенс-мутации среди указанных выше мутаций.

*Получение нейтрализующего антитела против ADAMTS13 и подтверждение участка связывания*

Для подтверждения того, что вариант, имеющий мутацию в области MDTCS или домене S, может уклоняться от нейтрализующих антител против ADAMTS13, учитывая антитела, распознающие разные эпитопы ADAMTS13 человека, конструировали Fab с использованием системы HuCAL (Bio-Rad), и выбирали 16 типов, имеющих превосходную способность к связыванию с ADAMTS13 человека. Ab 66 и Ab 67, которые, как подтверждено, специфически связываются с разными доменами среди 16 типов, получали в форме полноразмерного антитела. Т.к. известно, что Ab 4-16 специфически связываются с доменом S в плазме пациента с aTTP, его продуцировали в форме полноразмерного антитела (Casina et al., 2015), и, как показано на фиг. 2с, связывающая область каждого антитела являлась такой, что Ab 4-16 специфически связывается с доменом S, Ab 67 - с областью MDTCS, и Ab 66 - с С-концом (домены TSP-2-TSP-8).

*Определение критериев селекции для вариантов*

Оценку вариантов осуществляли посредством анализа относительных результатов в отношении вариантов с не-мутациями или молчащими мутациями (далее в настоящем описании обозначаемыми как клоны дикого типа), имеющих ту же аминокислотную последовательность, что и ADAMTS13 дикого типа, среди вариантов, сконструированных посредством случайного мутагенеза. Всего 59 клонов дикого типа анализировали на активность и аффинности связывания с Ab 4-16 и Ab 67 и результаты анализа каждого клона дикого типа были указаны относительно результатов конструкции ADAMTS13 дикого типа и показаны на фиг. 3. Как показано на фиг. 3, приведены коэффициенты уклонения и относительная активность в отношении ADAMTS13 дикого типа (59 типов), мутантного ADAMTS13 (304 типа) и выбранных ADAMTS13 (26 типов), содержащих консервативную аминокислотную замену, в отношении антител Ab 4-16 и Ab 67. Клон дикого типа демонстрировал относительное различие в результатах по сравнению с конструкцией ADAMTS13 дикого типа, несмотря на изменение, и из мутантных ADAMTS13 (304 типов) выбирали 26 типов мутантов ADAMTS13, имеющих специфическое значение коэффициента уклонения или значение выше или равное относительной активности, как показано в таблице 3 ниже.

В частности, что касается мутантного ADAMTS13, коэффициент уклонения от Ab 4-16 находился в диапазоне от -29,5% до 33,4%, коэффициент уклонения от Ab 67 находился в диапазоне от -24,4% до 30,5%, и относительная активность, как показано, находилась в диапазоне от 62,7% до 128,9% (таблица 3). В результате использования нормального распределения и правила трех сигм, коэффициент уклонения от Ab 4-16 составлял от -34,1% до 38,5%, коэффициент уклонения от Ab 67 составлял от -38,5% до 42,3%, и относительная активность находилась в диапазоне от 47,0% до 145,2%, и, таким образом, прогнозировали, что почти все клоны WT будут попадать в это распределение. Таким образом, при селекции вариантов использовали следующие критерии селекции: коэффициент уклонения, превышающий 38,5%, для Ab 4-16, коэффициент уклонения,

превышающий 42,3%, для Ab 67, или относительная активность 47,0% или более с учетом максимума из трех сигм.

[Таблица 3]

Диапазон коэффициента уклонения и относительной активности для нейтрализующего антитела Ab4-16 или Ab67

Категория	Коэффициент уклонения для Ab 4-16	Коэффициент уклонения для Ab 67	Относительная активность
Минимум	-29,5%	-24,4%	62,7%
Максимум	33,4%	30,5%	128,9%
Среднее	2,2%	1,9%	96,1%
Стандартное отклонение	12,1%	13,5%	16,4%
Среднее - 3 стандартное отклонение (среднее -3 $\sigma$ )	-34,1%	-38,5%	47,0%
Среднее+3 стандартное отклонение (среднее +3 $\sigma$ )	38,5%	42,3%	145,2%

*Селекция вариантов, уклоняющихся от нейтрализующего антитела против ADAMTS13 и имеющих активность на уровне ADAMTS13 дикого типа или выше*

После трансфекции клеток с использованием клонов WT и вариантов с изменениями аминокислот измеряли количество белков, присутствующих в культуре, и осуществляли анализы аффинности связывания для нейтрализующих антител и активности для 304 вариантов, имеющих уровень экспрессии 50 нг/мл или более. Показано, что варианты, имеющие изменения аминокислот, имеют разные распределения аффинности связывания для нейтрализующих антител или относительной активности по сравнению с клонами WT, и из них в конечном итоге выбирали 26 типов вариантов, удовлетворяющих критериям селекции (фиг. 3а и 3б). Показано, что из 26 вариантов 18 типов вариантов имеют изменения домена S, и в частности, показано, что 13 типов вариантов, имеющих изменения домена S (1C03, 1G07, 2B01, 2B02, 3B05, 3G04, 5C09, 5G08, 6B12, 7A02, 8C04, 8D01 и 8F01) имеют высокий коэффициент уклонения для Ab 4-16, и показано, что 5 типов вариантов (7E01, 7G08, 8C02, 8D01 и 8D05) имеют характеристику высокой относительной активности (таблица 4). Показано, что шесть типов вариантов имеют изменения в домене D, и среди них пять типов (46, 3A06, 4C07, 4E11 и 4H07) демонстрировали характеристику высокого коэффициента уклонения для Ab 67. Кроме того, идентифицировали 6 типов вариантов, имеющих изменение в домене M, 2 типа вариантов, имеющих изменение в домене C, и 2 типа вариантов, имеющих изменение в домене T. Повторную воспроизводимость результатов подтверждали с помощью трех повторных экспериментов для 26 выбранных вариантов, и 12 типов вариантов, которые постоянно сохраняли преимущество по сравнению с клонами WT даже в повторных

тестах, выбирали в качестве объектов тестирования на активность *in vitro*. Из 12 типов вариантов 1C03, 2B01, 2B02, 3B05, 5C09, 5G08, 7A02 и 8D01 выбирали по их превосходному коэффициенту уклонения от антитела Ab4-16 и 4C07, 4E11 и 4H07 выбирали по их превосходному коэффициенту уклонения от антитела Ab67. И наконец, 8D05 выбирали по их превосходной относительной активности.

Для подтверждения способности к уклонению от дополнительных нейтрализующих антител у 12 типов выбранных вариантов авторы настоящего изобретения пытались подтвердить, возможно ли уклонение даже от нейтрализующих антител Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64 и Ab65 в дополнение к антителам Ab4-16 и Ab67, использованным для скрининга. Среди 12 типов вариантов, восемь из девяти типов вариантов с изменениями аминокислот в домене S, за исключением 8D05, 1C03, 2B01, 2B02, 3B05, 5C09, 5G08, 7A02 и 8D01, демонстрировали превосходный коэффициент уклонения от Ab4-16 и Ab4-20, полученных с учетом последовательностей аутоантител против ADAMTS13, которые имеют пациенты с aTTP, и эти варианты также демонстрировали превосходную способность к уклонению от Ab60 и Ab61. И наоборот, в случае вариантов 4C07, 4E11 и 4H07, имеющих изменения аминокислот в домене D, коэффициент уклонения от Ab67 являлся превосходным (фиг. 4, таблица 5).

[Таблица 4]

Селекция 26 типов вариантов с превосходной способностью к уклонению или относительной активностью в отношении нейтрализующих антител Ab4-16 и Ab67

ID варианта	Домен, подвергнутый мутации	Аминокислотные остатки в варианте	Коэффициент уклонения от антитела Ab4-16	Коэффициент уклонения от антитела Ab67	Относительная активность
46	M, D	L85F P317H	46,30%	53,90%	66,80%
1C03	S	S612Y	48,00%	10,40%	104,60%
1G07	M, C,S	V282A A465D D672V	41,40%	57,90%	63,80%
2B01	S	D635V	87,40%	5,40%	62,20%
2B02	C, S	R452I S612Y	69,80%	15,30%	88,80%
3A06	M, D,T	R278I A334T D427N	42,60%	58,50%	62,90%
3B05	S	P618S	66,00%	48,40%	71,20%

3E01	M	T135I	52,30%	36,00%	60,00%
3G04	M, S	V126M A567S E651D	42,00%	29,40%	103,50%
3H12	T	N413D	-69,00%	-104,60%	162,40%
4C07	D	A334V	-6,60%	72,30%	153,10%
4E11	D	A314T	10,30%	96,40%	71,90%
4H03	M, D	F93V K364R E376D	40,30%	37,60%	65,70%
4H07	D	N308K	30,20%	64,60%	106,40%
5C09	S	S612F	60,90%	-10,50%	88,50%
5G08	S	Q656H	41,40%	26,00%	91,90%
6B12	S	G607R	43,90%	-101,60%	93,80%
7A02	S	S612F G624D	57,00%	-80,50%	128,50%
7E01	S	R589Q	-36,60%	-89,70%	149,90%
7G08	S	Q650H Q656R	-25,20%	-47,60%	160,70%
8C02	S	I643F	-19,20%	-50,90%	168,10%
8C04	S	I585N Y658H	51,30%	34,80%	69,00%
8C12	S	V630L D654G E664N	-12,00%	73,20%	48,10%
8D01	S	R589Q K608M M609L G624C I655V	85,10%	-78,30%	193,60%
8D05	S	P578L	-1,20%	-5,70%	172,30%
8F01	S	I585M	45,20%	34,40%	99,40%

[Таблица 5]

Подтверждение способности к уклонению и относительная активность в отношении отдельных нейтрализующих антител у 12 типов выбранных вариантов

ID варианта	Положение изменения	Коэффициент уклонения от нейтрализующих антител (%)							Относительная активность
		Ab4-16	Ab4-20	Ab60	Ab61	Ab64	Ab65	Ab67	
1C03	S612 Y	57,5%	59,4%	97,2%	94,7%	5,2%	-11,0%	15,1%	103,7%
2B01	D635 V	82,9%	88,6%	92,4%	97,4%	96,3%	8,1%	7,9%	66,8%
2B02	R452I S612 Y	65,4%	61,1%	97,3%	95,5%	0,9%	-15,0%	15,1%	112,6%
3B05	P618S	51,3%	-6,5%	24,9%	39,4%	19,4%	-63,8%	37,4%	77,3%
4C07	A334 V	4,2%	-5,0%	-3,3%	-6,9%	-2,2%	-4,7%	78,5%	152,2%
4E11	A314 T	16,6%	-1,3%	2,7%	3,2%	5,4%	-0,8%	98,9%	78,3%
4H07	N308 K	27,9%	1,5%	11,0%	16,4%	17,0%	12,8%	61,3%	94,7%
5C09	S612F	64,6%	54,7%	97,3%	95,2%	7,8%	-1,6%	11,8%	104,8%
5G08	Q656 H	47,0%	7,2%	32,1%	46,2%	27,4%	-51,4%	30,3%	95,9%
7A02	S612F G624 D	57,1%	55,4%	97,6%	95,5%	1,9%	-26,2%	- 12,9%	125,3%
8D01	R589 Q K608 M M609 L G624 C	90,1%	98,5%	95,2%	94,1%	20,0%	-95,9%	7,3%	127,0%

	I655V								
8D05	P578L	-9,3%	-43,1%	3,2%	15,9%	-0,9%	-116,4%	11,5 %	154,7%

Подтверждение способность к уклонению от нейтрализующих антител Fc-присоединенных вариантов фрагмента MDTCS

При структурно-функциональном анализе показано, что среди всего 14 доменов ADAMTS13, домен MDTCS, в котором удаляли домен CUB2 из С-концевого TSP-2, имеет металлопротеазную функцию, схожую ADAMTS13 и, таким образом, способен расщеплять VWF (Shelat et al., 2005). Это позволяет предполагать, что даже всего лишь фрагмент MDTCS вместо полноразмерного ADAMTS13 может функционировать как терапевтическое средство для заболевания ТТР, и он может уклоняться от нейтрализующих антител, присутствующих в плазме пациента, в укороченной форме, связывающейся с С-концевой частью.

Кроме того, авторы настоящего изобретения пытались дополнительно улучшить структурную стабильность фрагмента MDTCS и увеличивать время полужизни посредством присоединения Fc. Выбранные 12 типов вариантов фрагментировали по MDTCS и, таким образом, получали Fc-присоединенные варианты, и дополнительно получали варианты DM1 и DM2, имеющие два изменения аминокислот посредством комбинирования аминокислотных остатков выбранного варианта. Конечные материалы-кандидаты выбирали посредством измерения коэффициента уклонения и относительной активности для отдельных или смешанных нейтрализующих антител с использованием культуры с экспрессией в клетках указанным выше способом и раствора для очистки. В результате измерения коэффициентов уклонения при связывании и относительной активности для восьми типов отдельных нейтрализующих антител с использованием культуры было показано, что 2B01, 3B05, 4H07, 5G08, 8D05 и DM1 уклоняются от всех нейтрализующих антител на схожем уровне (фиг. 5, таблица 6). 1C03, 2B02, 5C09, 7A02, 8D01 и DM2 демонстрировали превосходные коэффициенты уклонения при связывании с 3-01 и Ab60. Показано, что все шесть типов кандидатов имели изменение аминокислоты в домене S и, за исключением 8D01, имели общее изменение 612-ой аминокислоты. В случае 4E11 и DM2, показано, что они обладают исключительными коэффициентами уклонения при связывании с Ab67, и оба имеют изменение в 314-ой аминокислоты домена D. В случае относительной активности DM1 демонстрировал наименьшее значение 57,9%, а 1C03 демонстрировал наибольшее значение 133,1%. Все кандидаты, за исключением указанных выше двух типов, демонстрировали относительную активность 78,2% до 125,1%, что было схожим с контрольной группой MDTCS-Fc (таблица 6). Для подтверждения способности к уклонению вариантов-кандидатов, за исключением 4C07 и 5C09, по сравнению с контрольной группой MDTCS-Fc в условиях, в которых девять типов нейтрализующих антител (Ab3-01, Ab4-16, Ab4-20, Ab60, Ab61, Ab64, Ab65, Ab66, и Ab67) смешивали в одинаковых долях, смешивали 7,5 нМ смешанных нейтрализующих

антител и 4 нМ каждой экспрессирующей вариант культуры и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение одного часа для измерения остаточной активности. Было показано, что MDTCS-Fc сохраняет остаточную активность 3,5%, и подтверждали, что 3B05, 4E11, 4H07, 5G08 и 8D05 имеют остаточную активность от 1,24% до 2,42%, таким образом, демонстрируя остаточную активность ниже MDTCS-Fc (фиг. 6). И наоборот, в случае 1C03, 2B01, 2B02, 7A02, 8D01, DM1 и DM2 остаточная активность сохранялась на уровне от 7,69% до 18,81%, что, таким образом, подтверждало, что способность к уклонению для смешанных нейтрализующих антител являлась исключительной по сравнению с MDTCS-Fc (фиг. 6).

Для подтверждения способности к уклонению от нейтрализующих антител вариантов-кандидатов с использованием очищающего раствора осуществляли очистку белка на 12 типах культур, за исключением 4C07 и 5C09, с использованием системы Rhytip (смола с протеином А). Подтверждали концентрацию очищающего раствора с помощью ELISA для Fc и элюцию целевого белка посредством окрашивания серебром. В результате подтверждения коэффициента уклонения для отдельного нейтрализующего антитела с использованием очищающего раствора, определяли, что большинство вариантов имели схожую тенденцию к результатам, полученным в культуре (фиг. 7). Показано, что варианты 2B01 5G08, 8D05 и DM1 уклоняются от нейтрализующих антител в случае всех восьми типов нейтрализующих антител на 24,6% или более, и 1C03, 2B02, 7A02, 8D01 и DM2 демонстрируют превосходные коэффициенты уклонения при связывании с 3-01 и Ab60, схожие с результатами в культуре. В случае 4E11 и DM2 подтверждали, что они имели превосходные коэффициенты уклонения при связывании с Ab67, те же, что и результаты в культуре. Относительная активность каждого варианта показана на фиг. 7 и в таблице 7. В результате измерения остаточной активности в условиях смешанных нейтрализующих антител подтверждали, что MDTCS-Fc сохранял остаточную активность 3,76%, и, что варианты 3B05, 4E11, 4H07 и 8D05 демонстрировали остаточную активность от 2,05% до 3,50%, что, таким образом, свидетельствует о более высоком ингибировании по сравнению с MDTCS-Fc. И наоборот, в случае 1C03, 2B01, 2B02, 5G08, 7A02, 8D01, DM1 и DM2, подтверждали, что сохранялась остаточная активность от 6,34% до 12,8%, что, таким образом, подтверждает, что в случае смешанных нейтрализующих антител наблюдали превосходную способность к уклонению от нейтрализующих антител по сравнению с MDTCS-Fc (фиг. 8).

Учитывая указанные выше результаты и всесторонне рассматривая относительную активность или коэффициенты уклонения для смешанных нейтрализующих антител, 1C03, 2B02, 7A02, DM2 и 5C09, которые по прогнозам имеют превосходную способность к уклонению от смешанных нейтрализующих антител из-за изменения 612-ой аминокислоты, выбирали в качестве пяти типов кандидатов для дальнейшего исследования.

[Таблица 6]

Подтверждение способности к уклонению от отдельных нейтрализующих антител и относительной активности фрагментов MDTCS, включая 14 вариантов (условия среды для культивирования)

ID варианта	Положение изменения	Коэффициент уклонения от нейтрализующего антитела (%)								Относительная активность
		3-01	4-16	4-20	Ab60	Ab61	Ab64	Ab65	Ab67	
1C03	S612 Y	100,0 %	2,0%	- 11,0 %	91,3%	3,9%	-5,9%	-16,9%	1,1%	133,1 %
2B01	D635 V	25,1%	28,2%	38,1 %	38,4%	36,2 %	26,8%	11,0%	24,9%	78,2%
2B02	R452 I S612 Y	99,0%	1,2%	4,2%	93,5%	2,9%	-2,1%	-12,9%	3,1%	116,5 %
3B05	P618 S	35,3%	18,9%	25,5 %	23,6%	19,1 %	21,3%	17,9%	17,8%	92,7%
4C07	A334 V	-5,9%	- 11,2%	-9,6%	- 11,3%	-3,3%	- 12,4%	-14,6%	14,5%	118,2 %
4E11	A314 T	15,3%	7,3%	11,9 %	8,1%	9,0%	9,7%	8,8%	83,5%	89,7%
4H07	N308 K	36,1%	20,4%	25,8 %	19,5%	22,5 %	25,1%	21,0%	53,8%	93,6%
5C09	S612 F	100,0 %	15,7%	18,7 %	100,0 %	12,4 %	13,0%	0,5%	8,5%	108,2 %
5G08	Q656 H	48,7%	38,3%	41,2 %	44,2%	41,9 %	37,2%	27,8%	47,6%	85,4%
7A02	S612 F G624 D	100,0 %	7,5%	17,4 %	97,5%	11,2 %	7,2%	-7,2%	12,3%	125,1 %
8D01	R589	100,0	38,9%	49,1	71,2%	31,6	36,3%	18,1%	41,8%	78,4%

	Q K608 M M60 9L G64 C I655 V	%		%		%				
8D05	P578 L	39,6%	29,9%	38,3 %	32,6%	32,4 %	32,5%	21,5%	43,7%	82,1%
DM1	A314 T D635 V	52,3%	48,2%	56,9 %	60,6%	54,7 %	51,6%	38,1%	86,8%	57,9%
DM2	A314 T S612 F	100,0 %	12,0%	22,0 %	95,1%	21,6 %	13,0%	7,3%	84,8%	97,7%

[Таблица 7]

Подтверждение способности к уклонению от отдельных нейтрализующих антител и относительной активности фрагментов MDTCS, включая 14 типов вариантов (условия очищающего раствора)

ID варианта	Поло жени е изме нения	Коэффициент уклонения от нейтрализующего антитела (%)								Относ итель ная актив ность
		3-01	4-16	4-20	Ab60	Ab61	Ab64	Ab65	Ab67	
1C03	S612 Y	100,0 %	15,6%	21,1 %	100,0 %	16,3%	7,3%	-7,1%	10,9 %	81,4%
2B01	D635 V	46,0%	37,8%	49,6 %	65,5%	43,7%	49,7 %	28,5 %	28,2 %	56,3%
2B02	R452I	100,0 %	8,4%	15,0 %	100,0 %	10,3%	4,4%	-9,0%	0,2%	91,1%
2B02	S612	100,0	8,4%	15,0	100,0	10,3%	4,4%	-9,0%	0,2%	91,1%

	Y	%		%	%					
3B05	P618 S	25,5%	11,9%	13,3 %	14,9%	10,5%	13,8 %	7,9%	10,2 %	83,7%
4E11	A314 T	19,6%	6,2%	11,5 %	15,7%	1,8%	8,8%	12,6 %	84,4 %	77,5%
4H07	N308 K	32,6%	12,80 %	16,8 %	29,0%	9,4%	16,9 %	17,0 %	47,1 %	77,5%
5G08	Q656 H	89,6%	64,5%	70,2 %	81,9%	57,90 %	68,9 %	59,0 %	37,7 %	18,3%
7A02	S612 F G624 D	100,0 %	10,4%	12,8 %	100,0 %	8,5%	3,4%	-7,3%	14,4 %	97,8%
8D01	R589 Q K608 M M609 L G64C I655 V	100,0 %	29,5%	48,2 %	91,7%	20,5%	17,1 %	14,2 %	31,5 %	65,1%
8D05	P578 L	51,0%	27,4%	35,1 %	49,5%	27,2%	33,8 %	29,9 %	46,0 %	56,3%
DM1	A314 T D635 V	50,2%	34,0%	54,0 %	66,50 %	45,3%	52,9 %	24,6 %	85,1 %	50,3%
DM2	A314 T S612 F	100,0 %	16,2%	24,2 %	100,0 %	24,0%	11,5 %	11,0 %	86,5 %	73,1%

Способность к уклонению от связывания и относительную активность для восьми типов отдельных нейтрализующих антител измеряли в культуре с экспрессией в клетках посредством конструирования ДНК, в которой IgG1-YTE конъюгировали с выбранными в

конечном итоге пятью типами вариантов фрагментов MDTCS. В результате, 1C03, 2B02, 5C09 и 7A02 демонстрировали превосходные коэффициенты уклонения при связывании с Ab3-01 и Ab60 и в случае DM2 подтверждали, что коэффициенты уклонения при связывании с Ab3-01, Ab60 и Ab67 являлись превосходными (фиг. 10). Относительная активность составляла 98,6-127,7%, что схоже с таковой у MDTCS-IgG1-YTE (фиг. 10). Для подтверждения способности к уклонению пяти типов вариантов материалов по сравнению с контрольной группой MDTCS-IgG1-YTE в условиях, когда девять типов нейтрализующих антител смешивали в равных долях, смешанные нейтрализующие антитела (девять типов) и каждую экспрессирующую вариант культуру смешивали, позволяли реагировать при комнатной температуре в течение одного часа и измеряли остаточную активность. В случае MDTCS-IgG1-YTE остаточная активность сохранялась на уровне 5,5%, и в случае пяти типов материалов остаточная активность сохранялась на уровне от 8,18% до 13,42%, что, таким образом, подтверждает, что способность к уклонению в случае нейтрализующих антител являлась превосходной по сравнению с контрольной группой (фиг. 11).

Белок очищали с использованием системы Phytip (смола с протеином A resin) из экспрессирующей культуры, где IgG1-YTE конъюгирован с пятью типами указанных выше вариантов фрагментов MDTCS, и остаточную активность и специфический титр смешанных нейтрализующих антител измеряли в очищающем растворе. Концентрацию соответствующего очищающего раствора подтверждали с помощью ELISA Fc, и элюцию целевого белка подтверждали посредством окрашивания серебром. В результате измерения остаточной активности в условиях смешанных нейтрализующих антител подтверждали, что MDTCS-IgG1-YTE сохранялся на уровне 0,4%, и остаточная активность каждого из 1C03, 2B02, 5C09, 7A02 и DM2 сохранялась на уровне 5,7%, 1,7%, 8,8%, 2,6% и 7,9%, что, таким образом, подтверждает, что способность к уклонению в случае смешанных антител превосходила таковую у MDTCS-IgG1-YTE. В результате измерения специфических титров подтверждали, что четыре типа вариантов, за исключением 7A02 (10288 ME/мг), демонстрировали специфические титры от 19091 ME/мг до 22379 ME/мг, схожие с контрольной группой (18030 ME/мг) (фиг. 12). В результате подтверждали, что IgG1-YTE-конъюгированные материалы пяти вариантов фрагментов имели превосходную способность к уклонению в случае смешанных нейтрализующих антител по сравнению с контрольной группой, и что четыре типа вариантов, за исключением 7A02, имели специфические титры, схожие с контрольной группой.

*Оценка того, повышается ли время полужизни вариантов фрагментов MDTCS при присоединении Fc*

Для определения того, будет ли присоединение Fc к MDTCS (IgG1-YTE) действительно повышать время полужизни, осуществляли фармакокинетический анализ на мышах. С этой целью MDTCS или MDTCS с присоединенным IgG1-YTE и четыре конечных типа кандидатов (1C03, 5C09, 7A02 и DM2) в варианты фрагментов белков

вводили в хвостовую вену мышей, а затем получали плазму для каждого определенного времени. Эти материалы вводили до концентрации 160 МЕ/кг с учетом специфического титра каждого материала и измеряли активность материалов, оставшихся в плазме, полученной для каждого указанного времени, с помощью анализа активности. Полученные результаты обобщали способом наивного объединения и осуществляли фармакокинетический анализ способом некомпартментного анализа. Измеряли время полужизни MDTCS как 2,898 часов, MDTCS-IgG1-YTE - 11,51 часов, и каждый вариант демонстрировал время полужизни от 5,184 до 9,902 часов. С помощью конъюгации IgG1-YTE время полужизни увеличивали в 1,79-3,97 раза по сравнению с контрольным MDTCS. Кроме того, значение среднего времени удержания (MRT), означающее среднее время удержания материала при конъюгации IgG1-YTE, составляло от 7,189 до 11,67 часов, что, таким образом, свидетельствует о повышенном времени удержания по сравнению с 3,743 часами (таблица 8, фиг. 9). В результате подтверждали, что слитый белок IgG1-YTE являлось эффективным при поддержании активности благодаря времени полужизни в крови и среднему сроку действия *in vivo*.

[Таблица 8]

Результаты фармакокинетического анализа

Материал-кандидат	Параметры анализа РК		
	$t_{1/2}$ , терминальное (ч.)	AUC <sub>Inf</sub> (МЕ*ч./мл)	MRT (ч.)
MDTCS	2,898	5,467	3,743
MDTCS-IgG1-YTE	11,51	16,89	11,67
1C03-IgG1-YTE	6,087	12,33	8,695
5C09-IgG1-YTE	5,184	12,06	7,982
7A02-IgG1-YTE	9,902	14,49	10,35
DM2-IgG1-YTE	5,986	11,39	7,189

Как описано выше, авторы настоящего изобретения обнаружили 26 типов новых вариантов, уклоняющихся от нейтрализующих антител против ADAMTS13, связывающихся с областью MDTCS или доменом S, или демонстрирующих активность, равную таковой у ADAMTS13 дикого типа или выше. Из них выбирали 12 типов, имеющих лучшую способность к уклонению или значимо превосходящую сравнительную активность для девяти типов нейтрализующих антител, а затем конструировали фрагменты MDTCS, необходимые для расщепления vWF, в то же время способные эффективно уклоняться от нейтрализующих антител, связывающихся с С-концом, таким образом, идентифицируя варианты со значимо улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител, связывающихся с доменами D, С или S. Варианты по настоящему изобретению можно использовать в качестве эффективного фармакологического ингредиента с улучшенной стабильностью и устойчивостью физиологической активности благодаря повышению времени полужизни в крови посредством конъюгации IgG1-YTE.

*Подтверждение результата для варианта PoC в модели на мышах с имитацией заболевания аТТР*

Для выбора конечных материалов-кандидатов с помощью разработанной модели аТТР на мышах вводили контрольный материал (MDTCS-IgG1-YTE) или выбранные пять вариантов материалов-кандидатов (1C03-IgG1-YTE, 2B02-IgG1-YTE, 5C09-IgG1-YTE, 7A02-IgG1-YTE и DM2-IgG1-YTE) и оценивали коэффициент уклонения от нейтрализующего антитела (фиг. 13a). Из пяти типов вариантов материалов-кандидатов, DM2-IgG1-YTE демонстрировал наибольшую остаточную активность ADAMTS13 человека в обеих дозах 5000 МЕ/кг и 7000 МЕ/кг (фиг. 13b). В конечном итоге выбирали материал DM2-IgG1-YTE, демонстрировавший лучший коэффициент уклонения от нейтрализующих антител, и вводили в различных концентрациях для подтверждения способности сохранять остаточную активность ADAMTS13 человек и степени облегчения клинических симптомов (фиг. 14a); в результате подтверждали, что степень облегчения повышалась с повышением дозы DM2, и наблюдали, что улучшение уровней тромбоцитов и ЛДГ являлось относительно высоким при введении DM2-IgG1-YTE по сравнению с введением MDTCS-IgG1-YTE в группе введения 7000 МЕ/кг (фиг. 14b). В соответствии с улучшением уровней тромбоцитов и ЛДГ, в результате анализа активности ADAMTS13 человека можно наблюдать повышение остаточной активности, пропорциональное вводимой дозе контрольного материала или материала-кандидата (фиг. 14b). В результате наблюдения клинических симптомов подтверждали, что смертность или гематурия, демонстрируемые в модели на мышах с имитацией аТТР, снижались при введении контрольного материала или материала-кандидата. В частности, в случае группы введения DM2-IgG1-YTE не было случаев гибели при любой дозе, и не наблюдали индивидуумов с симптомами гематурии при введении в дозе 7000 МЕ/кг или более (фиг. 14c). При введении в дозе 7000 МЕ/кг средняя остаточная активность составляла 0,32 МЕ/мл DM2-IgG1-YTE, что в 9,6 раз выше 0,03 МЕ/мл в случае MDTCS-IgG1-YTE, и было определено, что различия в наблюдаемых результатах для клинических симптомов являются результатом таких различий в остаточной активности. В результате общего анализа крови, клинического биохимического анализа и наблюдения клинических симптомов подтверждали, что при введениях MDTCS-IgG1-YTE и DM2-IgG1-YTE наблюдают тенденцию к улучшению клинических симптомов аТТР в модели на мышах с имитацией аТТР, и благодаря этому можно подтвердить PoC *in vivo*. В частности, подтверждали, что при введении в дозе 7000 МЕ/кг введение DM2-IgG1-YTE демонстрировало превосходный эффект улучшения по сравнению с введением MDTCS-IgG1-YTE.

*Результат подтверждения варианта PoC в модели заболевания сТТР на мышах*

Наличие улучшения гематологических и клинических симптомов, возникающих при заболевании ТТР, и степень восстановления активности ADAMTS13 человека в модели сТТР на мышах подтверждали с использованием DM2-IgG1-YTE, демонстрировавшего лучший эффект среди пяти типов вариантов-кандидатов в модели на мышах с имитацией аТТР (фиг. 15a). Можно подтвердить, что улучшение уровней

тромбоцитов и ЛДГ, возникающее в зависимости от концентрации в соответствии с повышением дозы DM2-IgG1-YTE, и значимое повышение тромбоцитов наблюдали в группе, которой вводили DM2-IgG1-YTE 180 в дозе 360 МЕ/кг по сравнению с контрольной группой, и, в частности, в случае группы, которой вводили 360 МЕ/кг, наблюдали восстановление, сравнимое с нормальным уровнем (фиг. 15b). В случае уровня ЛДГ, подтверждали, что ЛДГ восстанавливалась до уровня, схожего с таковым в контрольной группе, в группе, которой вводили 180 МЕ/кг (фиг. 15b). В случае активности ADAMTS13, начиная с группы, которой вводили DM2-IgG1-YTE в дозе 60 МЕ/кг, наблюдали среднюю активность 0,1 МЕ/мл или более, и в группе, которой вводили дозу 360 МЕ/кг, измеряли среднюю активность 1,08 МЕ/мл (фиг. 15b). Таким образом, обнаружено, что вариант DM2-IgG1-YTE может эффективно улучшить клинические симптомы и восстановить активность ADAMTS13 у мышей с заболеванием сТТР.

Хотя конкретные части настоящего изобретения подробно описаны выше, эти конкретные описания представляют собой всего лишь предпочтительные варианты осуществления, и специалистам в этой области очевидно, что объем настоящего изобретения не ограничен ими. Таким образом, существенный объем настоящего изобретения будет определен в формуле изобретения и ее эквивалентах.

#### **Ссылки**

1. Miesbach W, Menne J, Bommer M, Schonermarck U, Feldkamp T, Nitschke M, Westhoff TH, Seibert FS, Woitas R, Sousa R, Wolf M, Walzer S, Schwander B. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2019) 14:260. doi: 10.1186/s13023-019-1240-0.
2. Ercig B, Wichapong K, Reutelingsperger CPM, Vanhoorelbeke K, Voorberg J, Nicolaes GAF. *Thromb Haemost.* 2018;118(1):28-41. doi:10.1160/TH17-06-0404
3. Johanna A Kremer Hoving, Paul Coppo, Bernhard Lammle, Joel L Moake, Toshiyuki Miyata, Karen Vanhoorelbeke. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Apr 6; 3:17020. doi: 10.1038/nrdp.2017.20.
4. Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD)-an NCATS Program. 10 October 2018
5. Tersteeg C, Verhenne S, Roose E, et al. *Expert Rev Hematol.* 2016; 9(2): 209-221. doi:10.1586/17474086.2016.1122515
6. Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. *Blood.* 2004; 103(12): 4514-4519. doi:10.1182/blood-2003-12-4165
7. Luken 5 BM, Turenhout EA, Hulstein JJ, Van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. *Thromb Haemost.* 2005; 93(2):267-274. doi:10.1160/TH04-05-0301
8. Veronica C. Casina, Wenbing Hu, Jian-Hua Mao, Rui-Nan Lu, Hayley A. Hanby, Brandy Pickens, Zhong-Yuan Kan, Woon K. Lim, Leland Mayne, Eric M. Ostertag, Stephen Kacir, Don L. Siegel, S. Walter Englander, and X. Long Zheng. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 4; 112(31): 9620-5. doi: 10.1073/pnas.1512561112.
9. Suresh G Shelat, Jihui Ai, and X. Long Zheng. *Semin Thromb Hemost.* 2005 Dec; 31(6):659-72. doi: 10.1055/s-2005-925472.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант белка ADAMTS13 (дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом типа 1, член 13), содержащий замены одного или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 85-го, 93-го, 126-го, 135-го, 278-го, 282-го, 308-го, 314-го, 317-го, 334-го, 364-го, 376-го, 413-го, 427-го, 452-го, 465-го, 567-го, 578-го, 585-го, 589-го, 607-го, 608-го, 609-го, 612-го, 618-го, 624-го, 630-го, 635-го, 643-го, 650-го, 651-го, 654-го, 655-го, 656-го, 658-го, 664-го и 672-го остатков SEQ ID NO: 1, или его функциональный фрагмент.

2. Вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по п.1, где вариант белка ADAMTS13 выбран из группы, состоящей из каждого из вариантов белка, содержащих замены аминокислотных остатков в следующих положениях:

- 85-ый и 317-ый остатки; 612-ый остаток; два или более из 282-го, 465-го и 672-го остатков; 635-ый остаток; 452-ой и 612-ый остатки; два или более из 278-го, 334-го и 427-го остатков; 618-ый остаток; 135-ый остаток; два или более из 126-го, 567-го и 651-ого остатков; 413-ый остаток; 334-ый остаток; 314-ый остаток; два или более из 93-го, 364-го и 376-го остатков; 308-ой остаток; 656-ой остаток; 607-ой остаток; 612-ый и 624-ый остатки; 589-ый остаток; 650-ый и 656-ой остатки; 643-ий остаток; 585-ый и 658-ой остатки; два или более из 630-го, 654-го и 664-го остатков; четыре или более из 589-го, 608-го, 609-го, 624-го и 655-го остатков; 578-ой остаток; 585-ый остаток; 314-ый и 635-ый остатки; и 314-ый и 612-ый остатки.

3. Вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по п.1, где 85-ый остаток заменяют Phe, 93-ый остаток - Val, 126-ой остаток - Met, 135-ый остаток - Ile, 278-ой остаток - Ile, 282-ой остаток - Ala, 308-ой остаток - Lys, 314-ый остаток - Thr, 317-ый остаток - His, 334-ый остаток - Thr или Val, 364-ой остаток - Arg, 376-ой остаток - Asp, 413-ый остаток - Asp, 427-ый остаток - Asn, 452-ой остаток - Ile, 465-ый остаток - Asp, 567-ой остаток - Ser, 578-ой остаток - Leu, 585-ой остаток - Asn или Met, 589-ый остаток - Gln, 607-ой остаток - Arg, 608-ой остаток - Met, 609-ый остаток - Leu, 612-ый остаток - Phe или Tyr, 618-ый остаток - Ser, 624-ый остаток - Asp или Cys, 630-ый остаток - Leu, 635-ый остаток - Val, 643-ий остаток - Phe, 650-ый остаток - His, 651-ый остаток - Asp, 654-ый остаток - Gly, 655-ый остаток - Val, 656-ый остаток - Arg или His, 658-ой остаток - His, 664-ый остаток - Asn и 672-ой остаток - Val, соответственно.

4. Слитый белок, содержащий:

(a) вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-3; и

(b) Fc-область иммуноглобулина IgG4, конъюгированную с указанным выше (a).

5. Слитый белок по п.4, где Fc-область содержит замены одного или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 22-го, 24-го и 26-го остатков SEQ ID NO: 2.

6. Слитый белок по п.5, где 22-ой остаток заменяют Tyr, 24-ый остаток - Thr и 26-ой остаток - Glu, соответственно.

7. Слитый белок по п.5, дополнительно содержащий шарнирную область иммуноглобулина IgG1 между указанными (a) и (b).

8. Нуклеотид, кодирующий вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-3 или слитый белок по любому из пп.4-7.

9. Композиция для профилактики или лечения тромботического заболевания, содержащая вариант белка ADAMTS13 или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-3, или слитый белок по любому из пп.4-7, или нуклеотид по п.8 в качестве активного ингредиента.

10. Композиция по п.9, где тромботическое заболевание является тромботической микроангиопатией (ТМА).

11. Композиция по п.10, где тромботическая микроангиопатия (ТМА) выбрана из группы, состоящей из тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), гемолитического уремического синдрома (HUS), синдрома HELLP (гемолиз, повышенные ферменты печени и низкое количество тромбоцитов), преэклампсии и серповидно-клеточной анемии.

12. Способ скрининга вариантов ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител, включающий следующие стадии:

(a) получение варианта ADAMTS13, в котором один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 85-го, 93-го, 126-го, 135-го, 278-го, 282-го, 308-го, 314-го, 317-го, 334-го, 364-го, 376-го, 413-го, 427-го, 452-го, 465-го, 567-го, 578-го, 585-го, 589-го, 607-го, 608-го, 609-го, 612-го, 618-го, 624-го, 630-го, 635-го, 643-го, 650-го, 651-го, 654-го, 655-го, 656-го, 658-го, 664-го и 672-го остатков SEQ ID NO: 1, заменены или делетированы; и

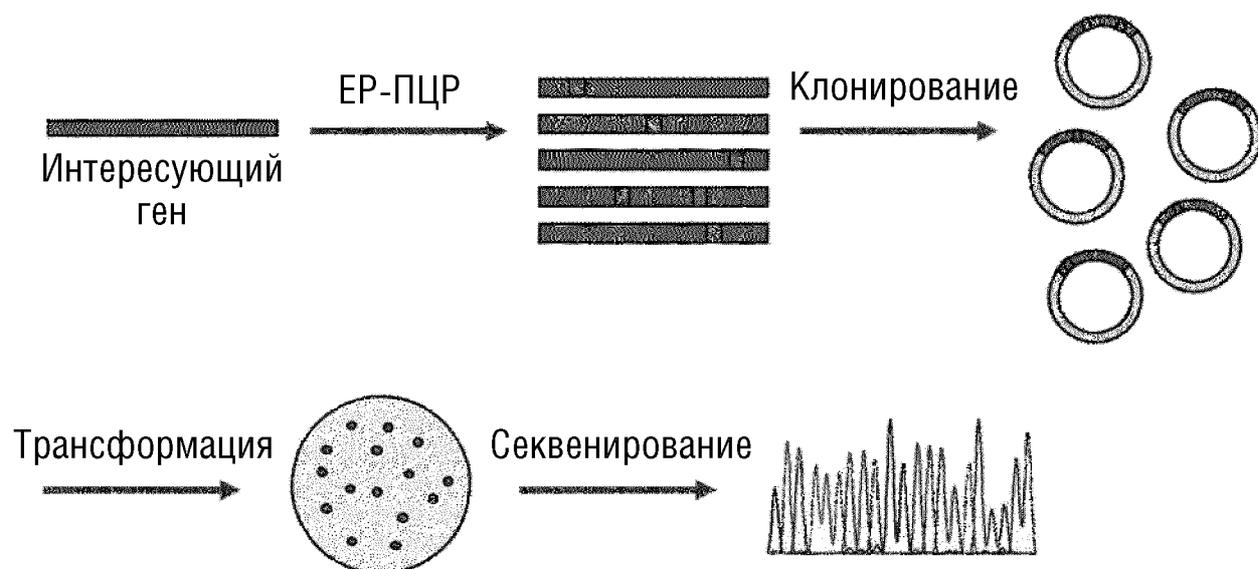
(b) приведение аутоантитела против ADAMTS13 в контакт с вариантом ADAMTS13, полученным на указанной выше стадии (a);

где, если аутоантитело связывается с вариантом ADAMTS13 с аффинностью, ниже чем для ADAMTS13 дикого типа, вариант ADAMTS13 определяют как вариант ADAMTS13 с улучшенным коэффициентом уклонения от аутоантител.

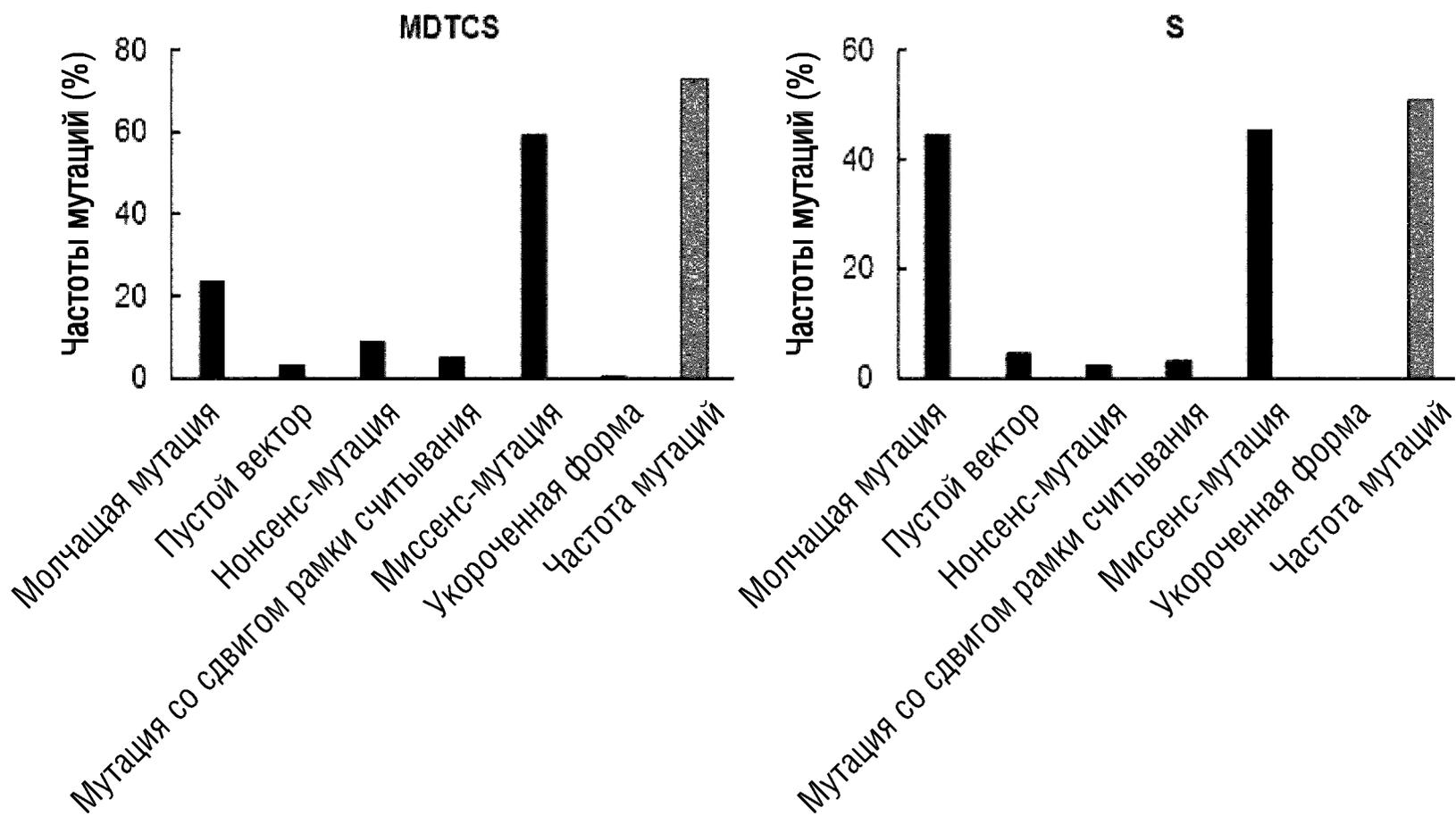
13. Способ по п.12, где указанную выше стадию (a) осуществляют посредством замены одного или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 85-го, 93-го, 126-го, 135-го, 278-го, 282-го, 308-го, 314-го, 317-го, 334-го, 376-го, 413-го, 427-го, 465-го, 567-го, 578-го, 585-го, 607-го, 609-го, 612-го, 624-го, 630-го, 643-го, 650-го, 654-го, 655-го, 656-го, 658-го и 672-го остатков SEQ ID NO: 1.

По доверенности

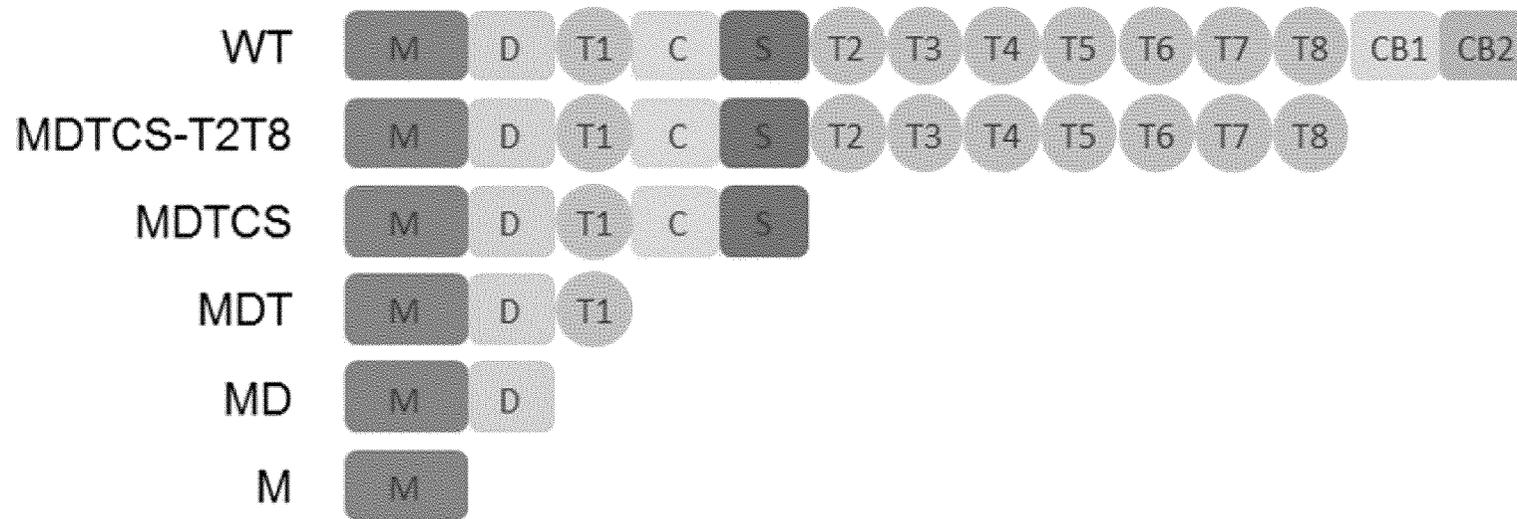
ФИГ.1а



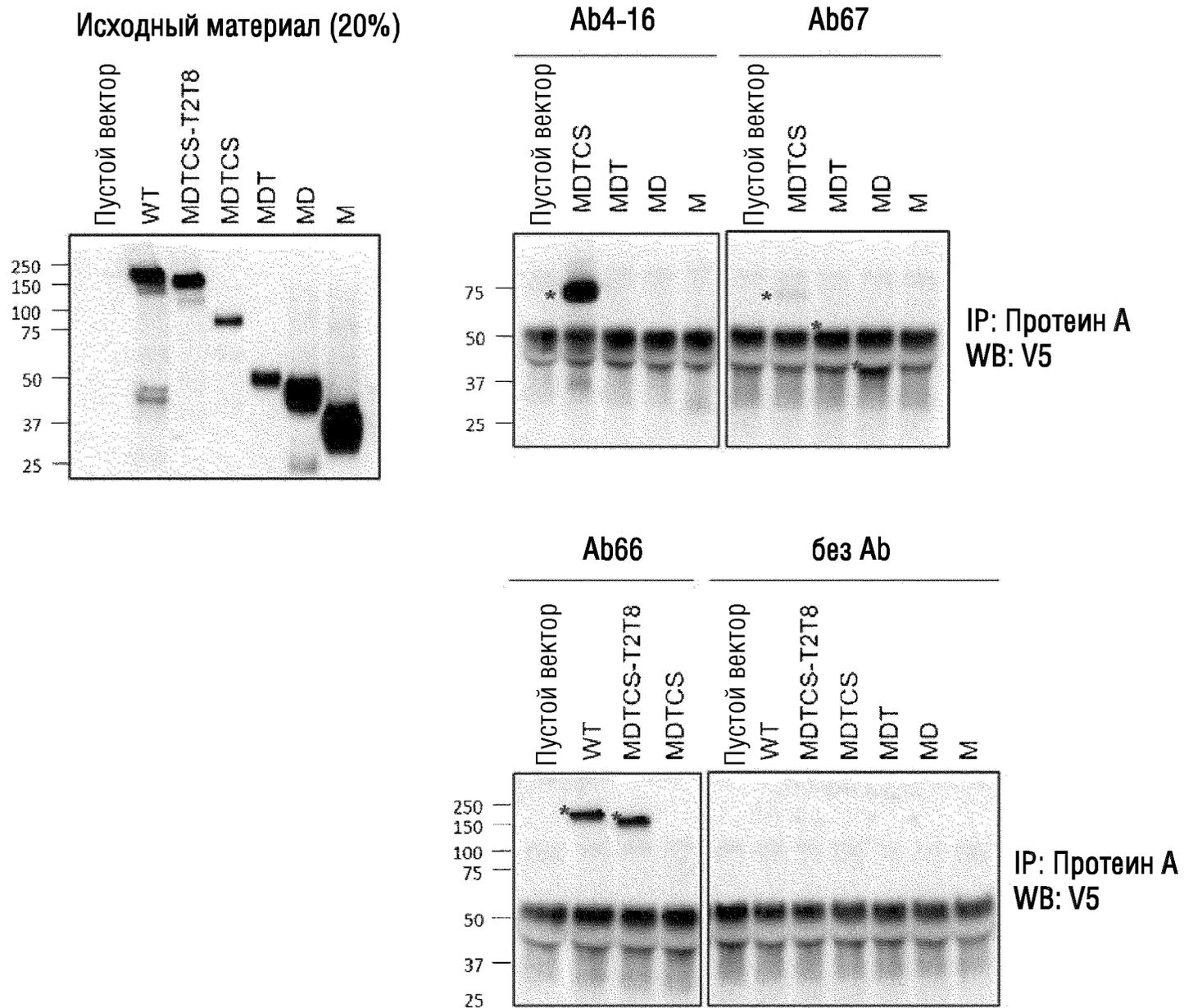
ФИГ.1b



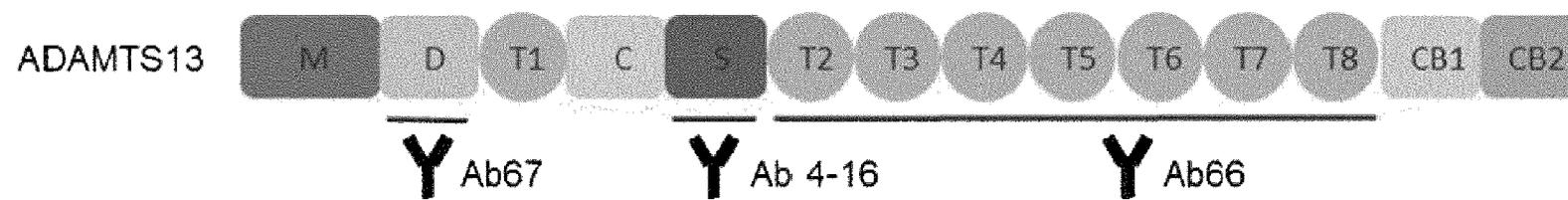
Фиг.2а



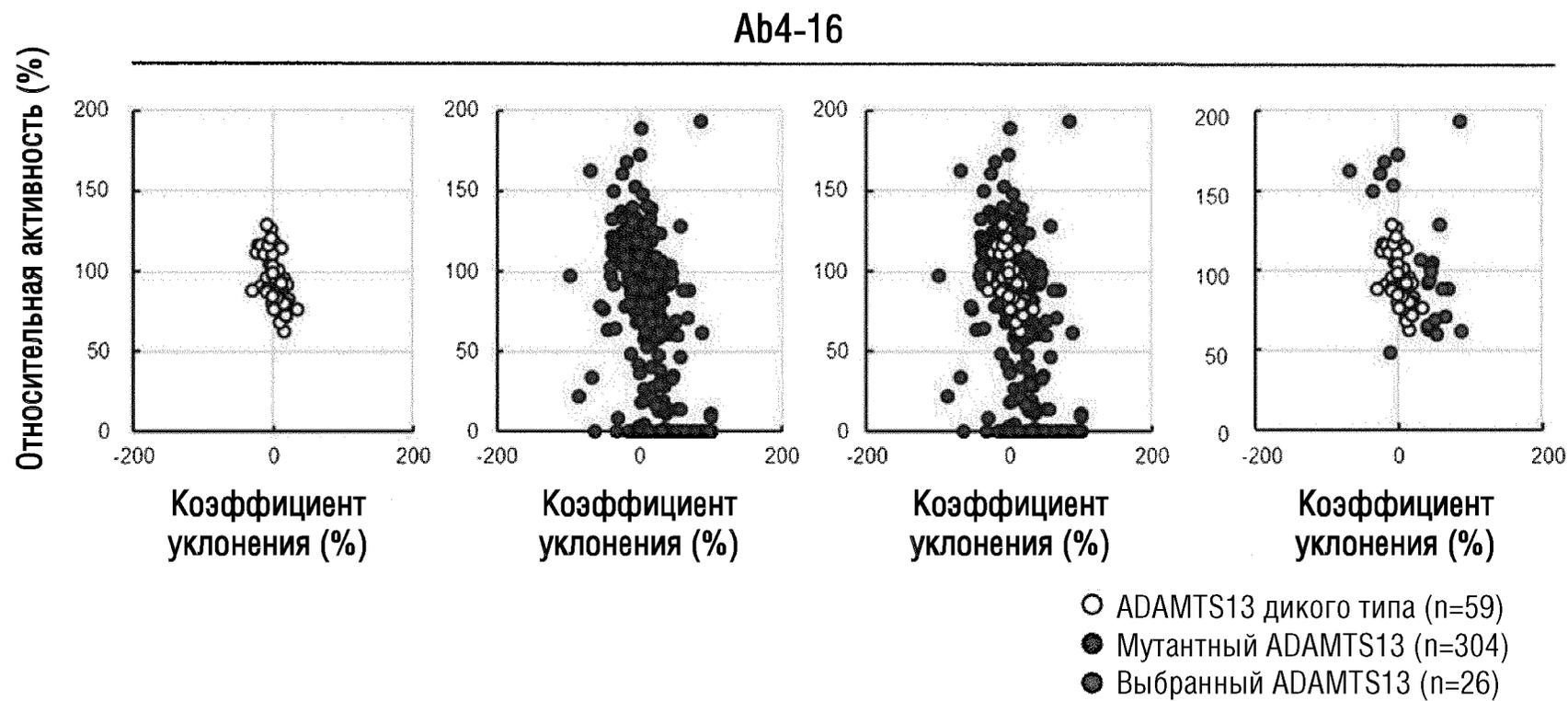
ФИГ.2b



ФИГ.2с

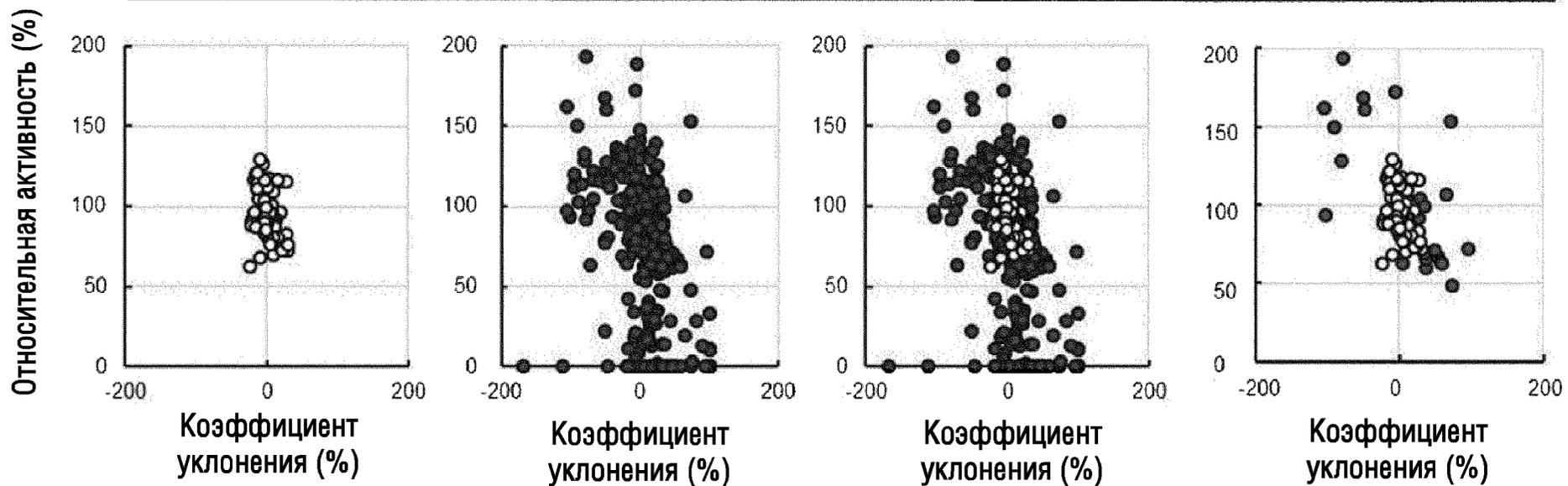


# ФИГ.3а



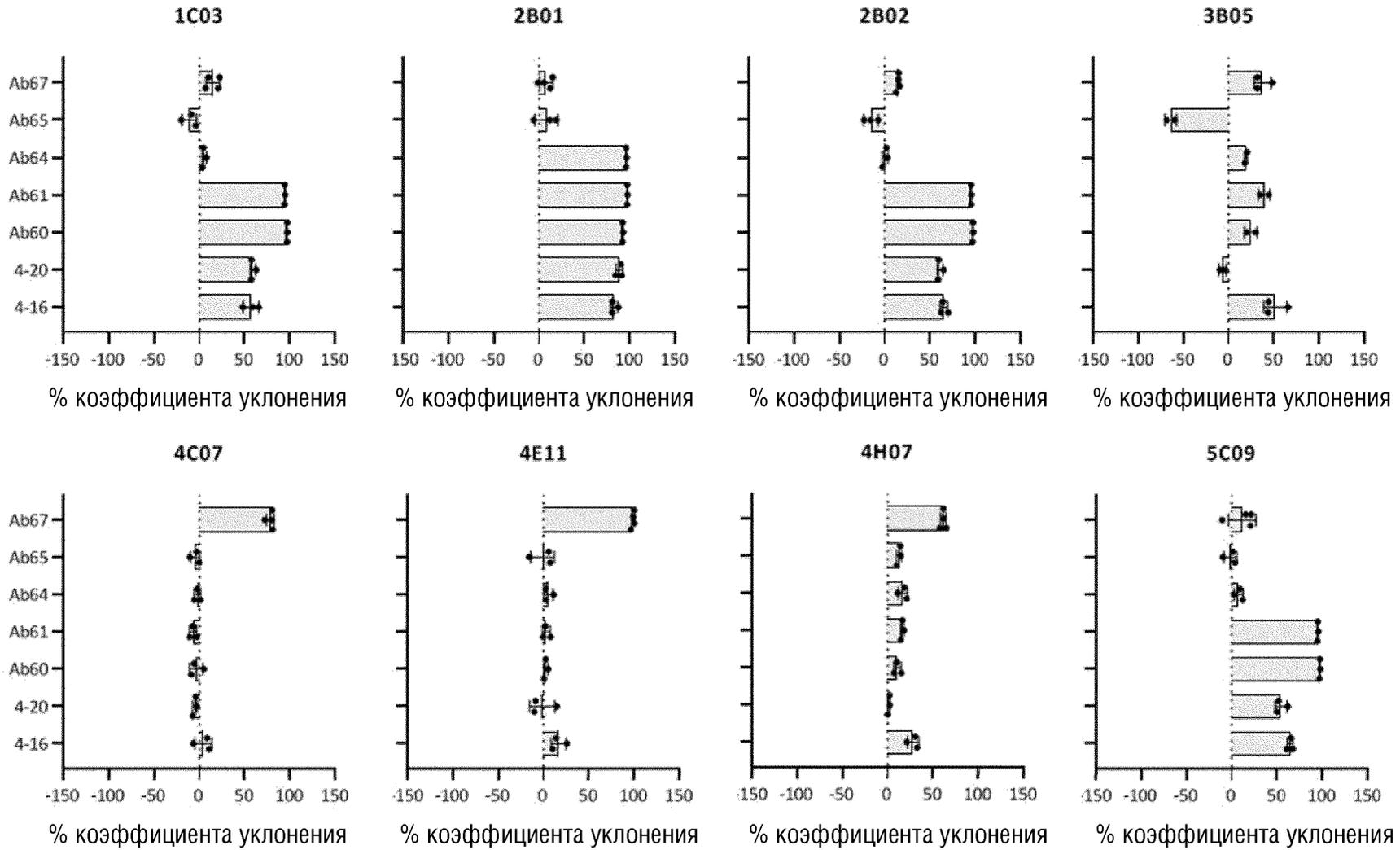
# ФИГ.3b

Ab 67

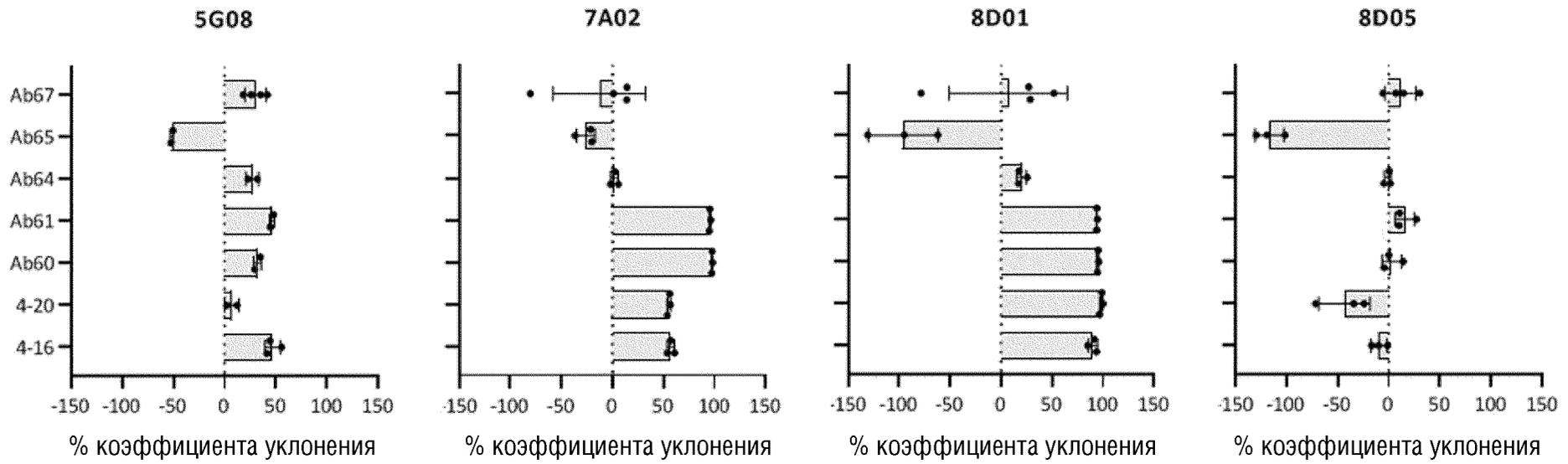


- ADAMTS13 дикого типа (n=59)
- Мутантный ADAMTS13 (n=304)
- Выбранный ADAMTS13 (n=26)

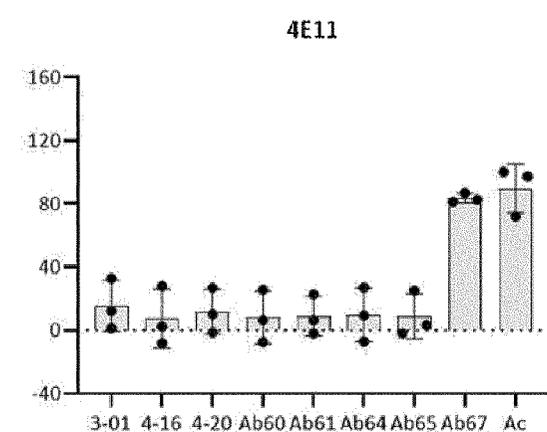
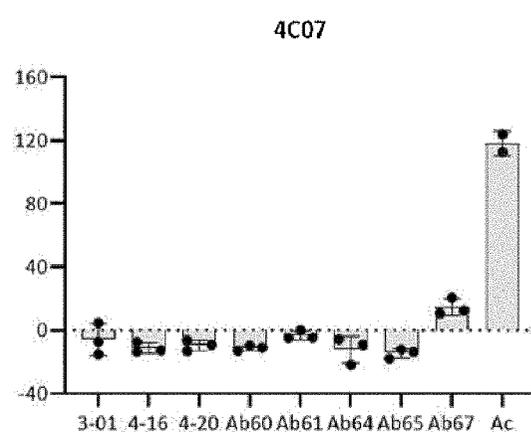
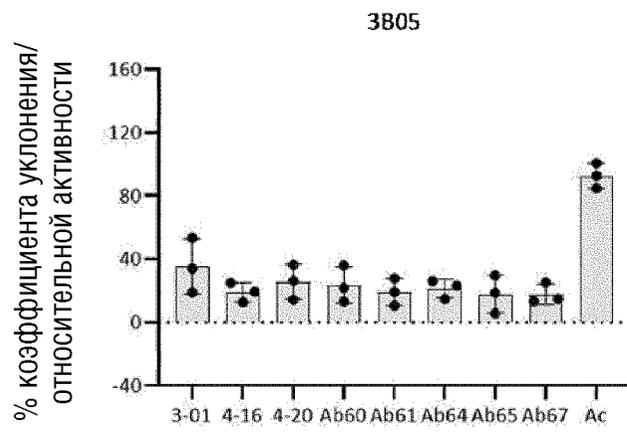
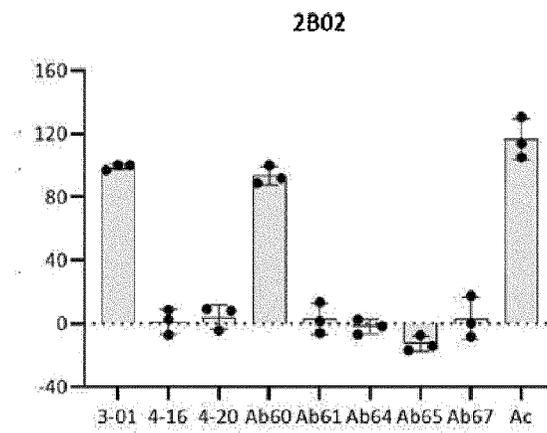
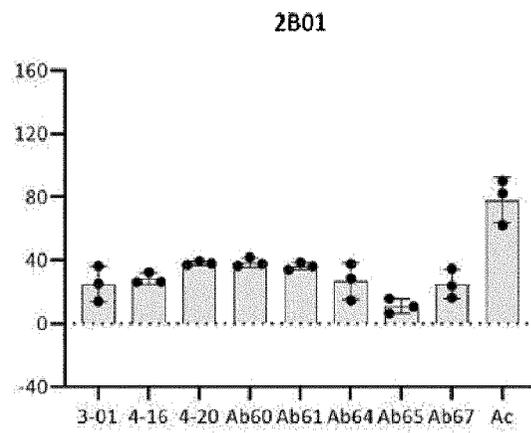
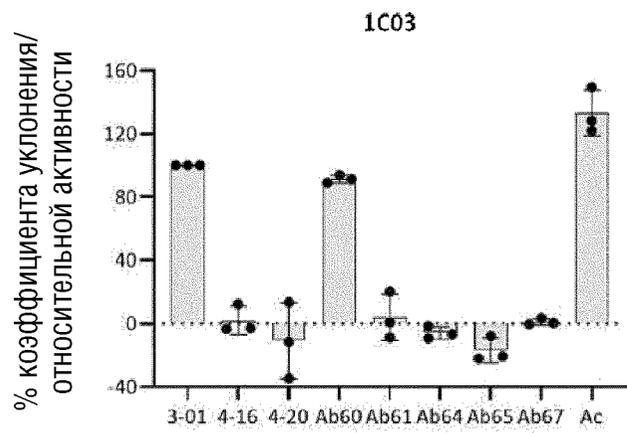
# ФИГ.4а



# ФИГ.4b

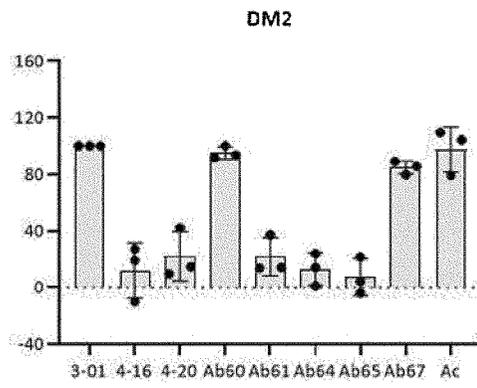
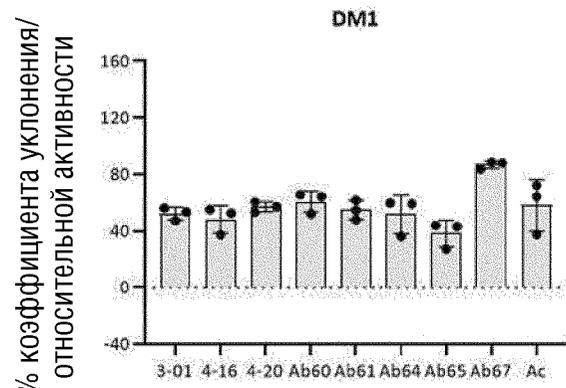
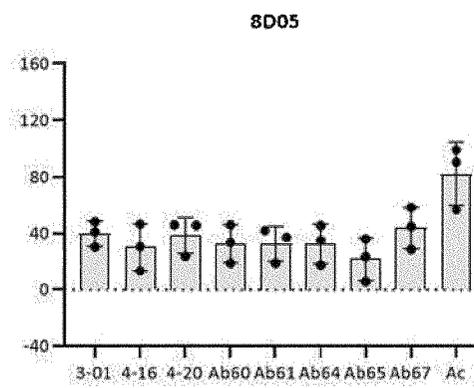
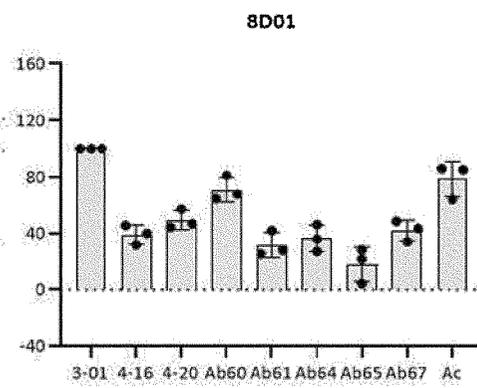
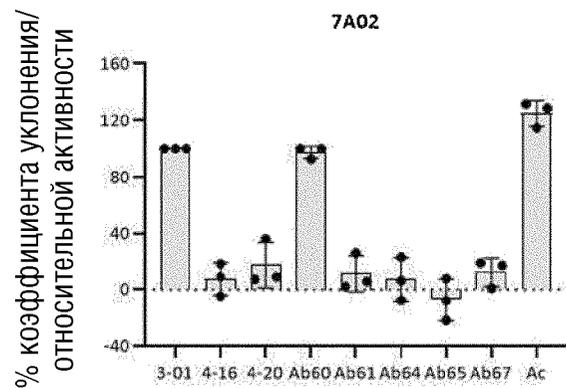
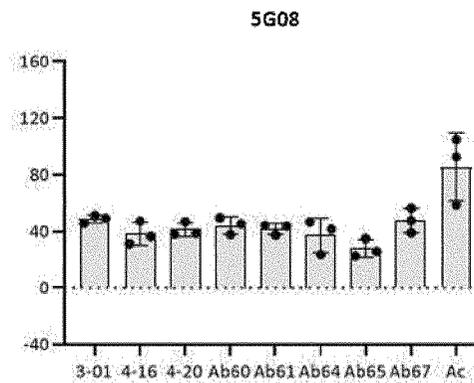
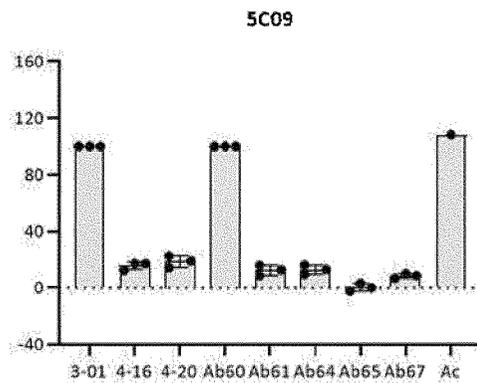
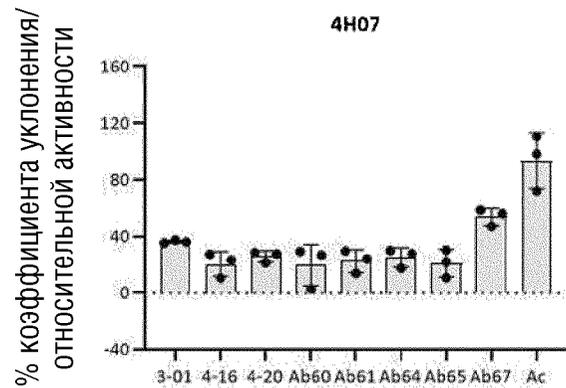


# ФИГ.5а

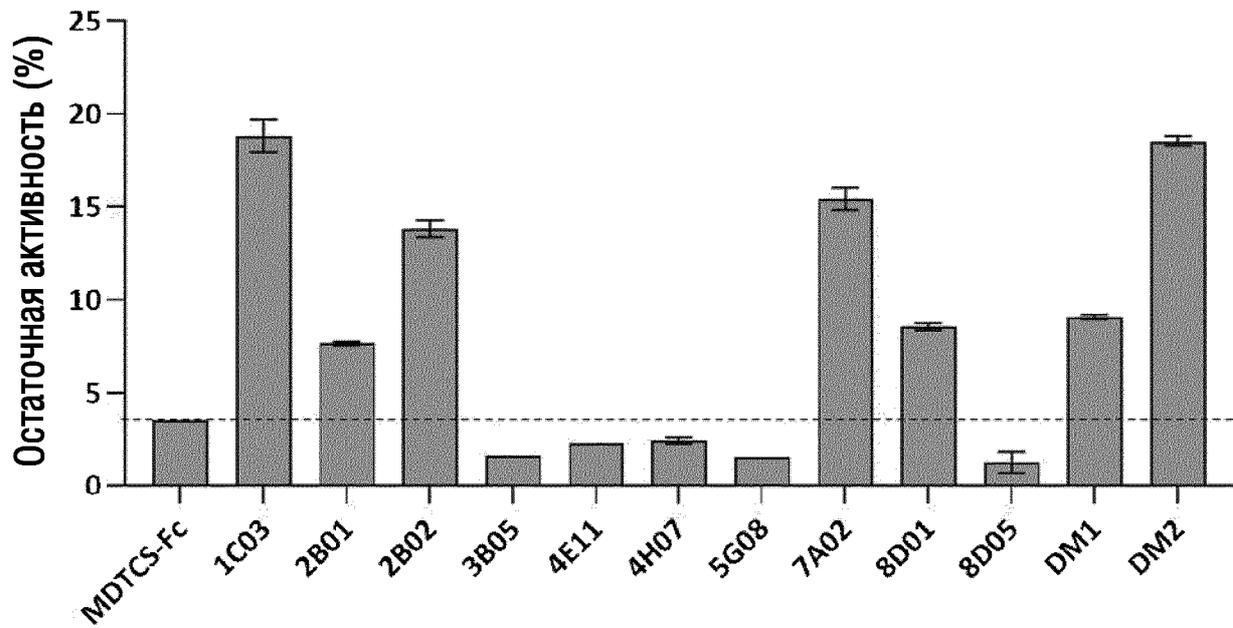


10/27

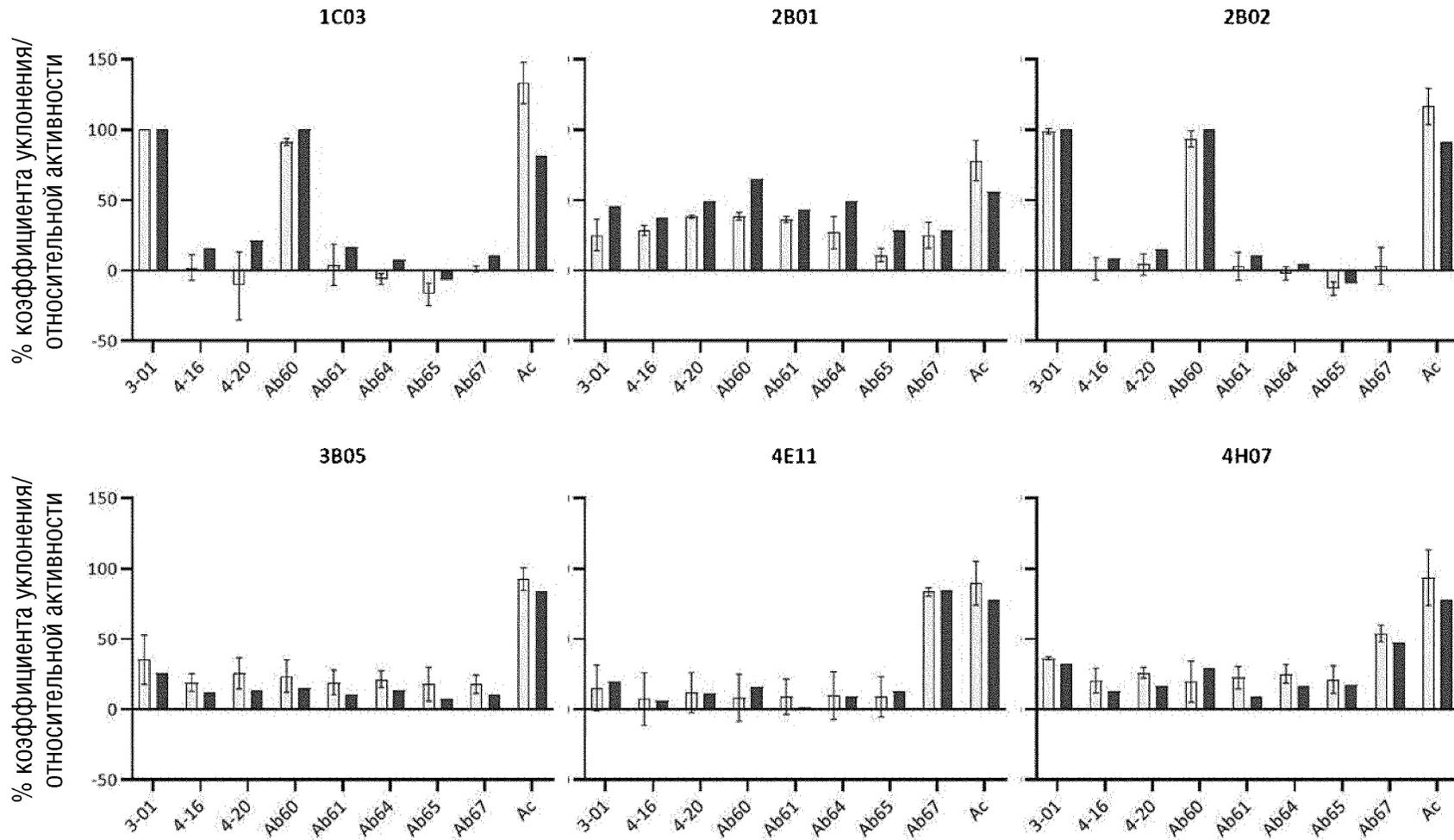
# ФИГ.5b



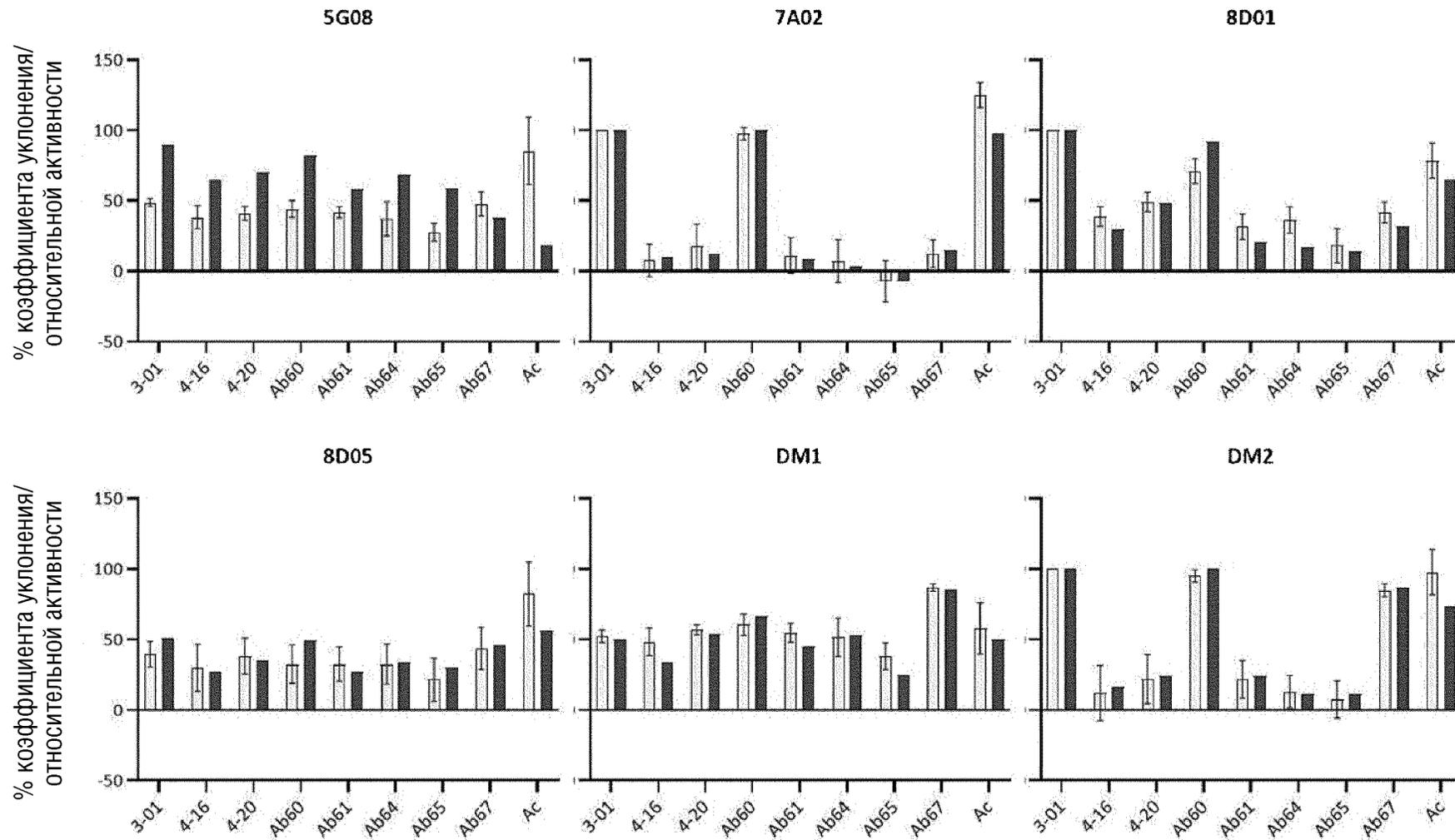
ФИГ.6



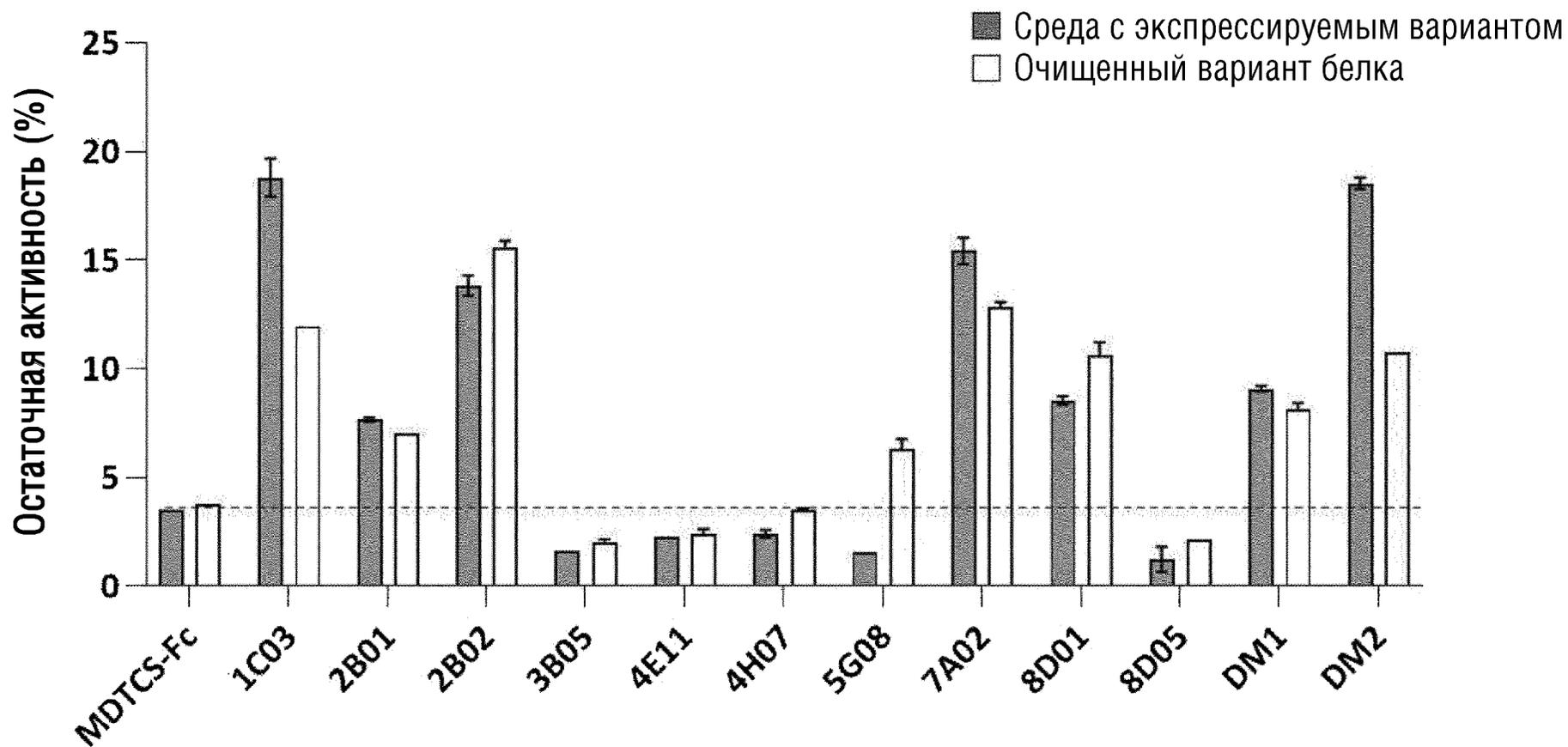
# ФИГ.7а



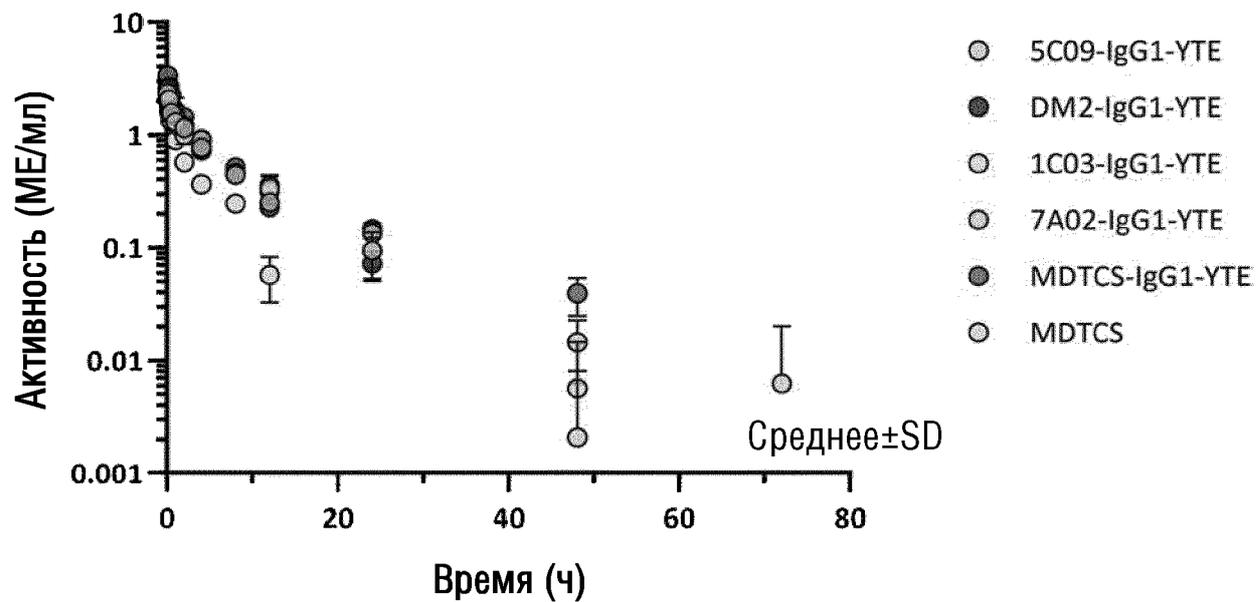
# ФИГ.7b



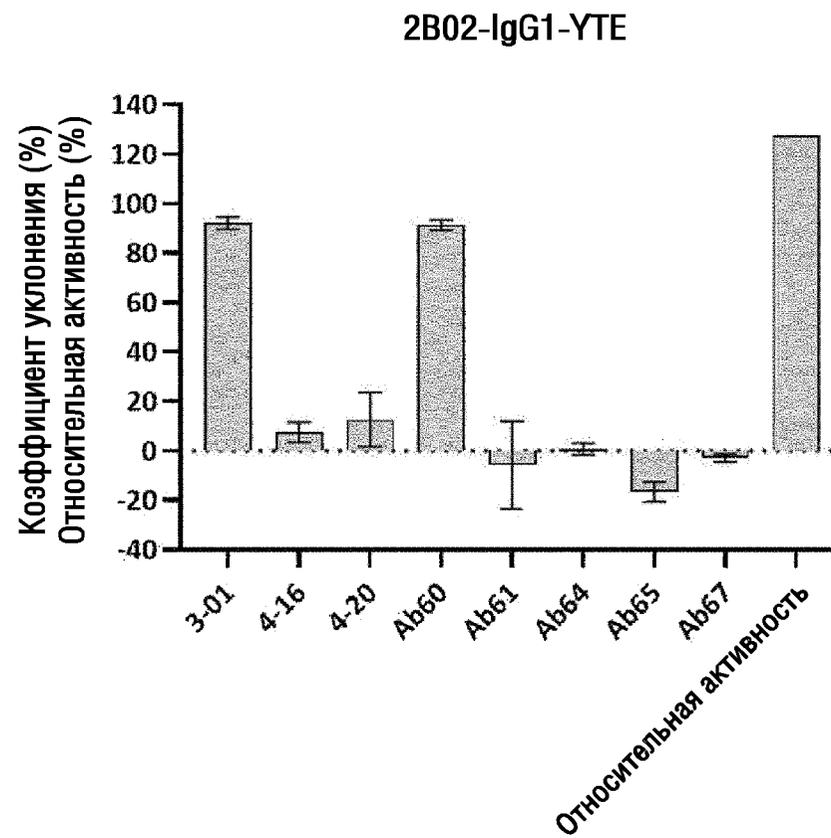
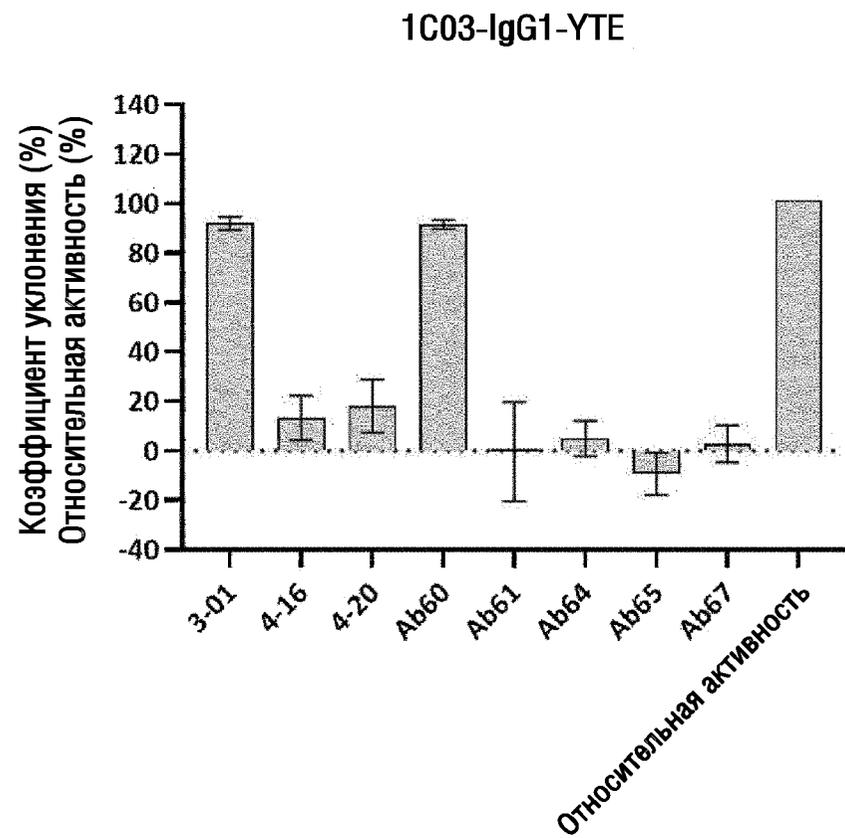
ФИГ.8



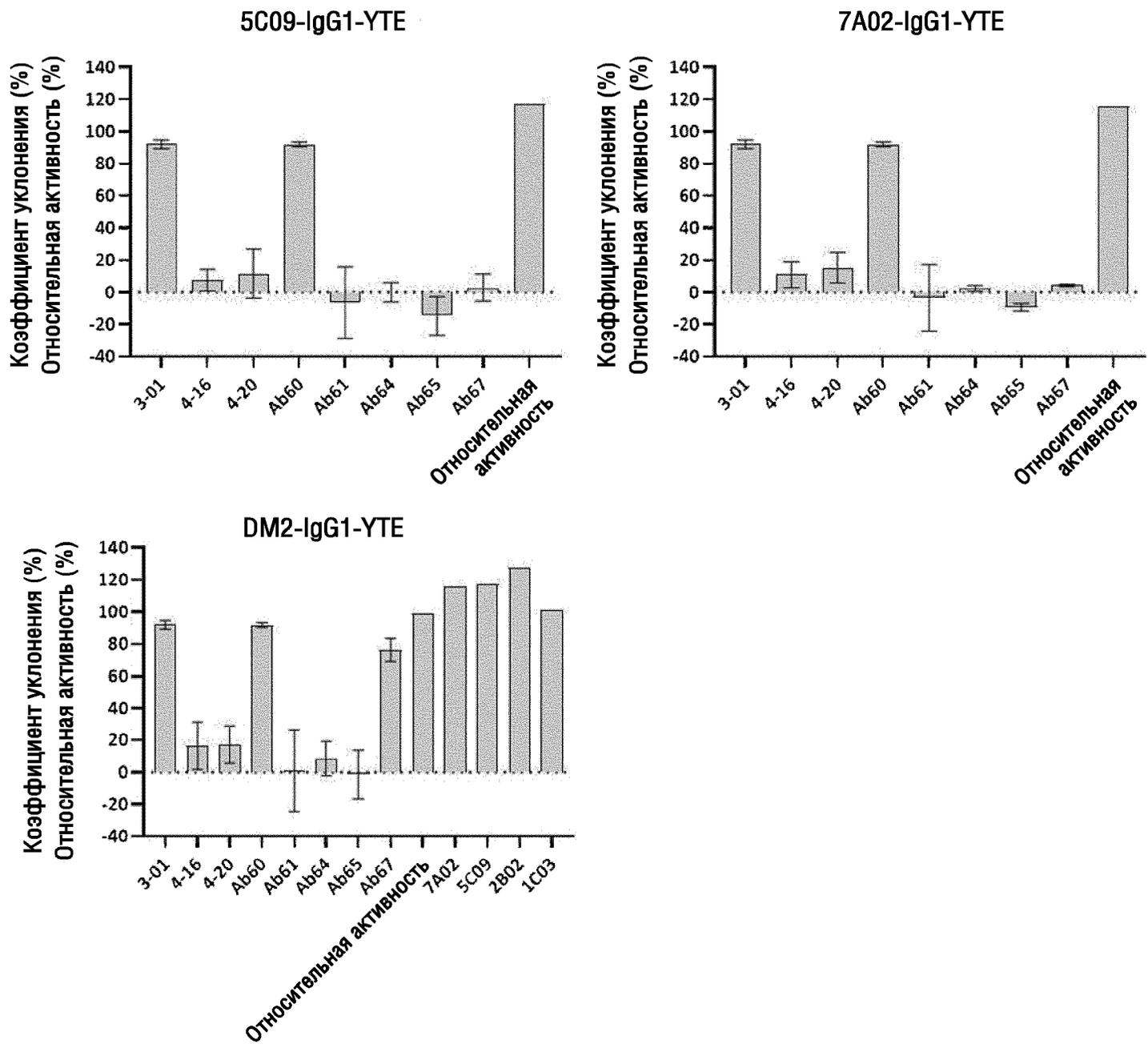
ФИГ.9



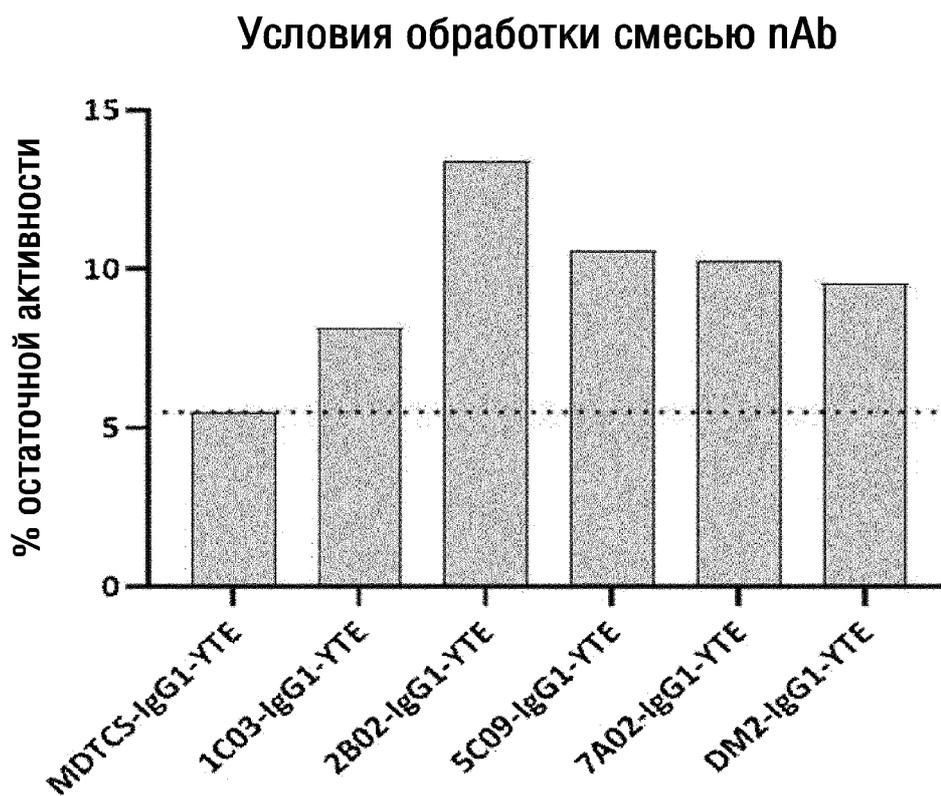
# ФИГ.10а



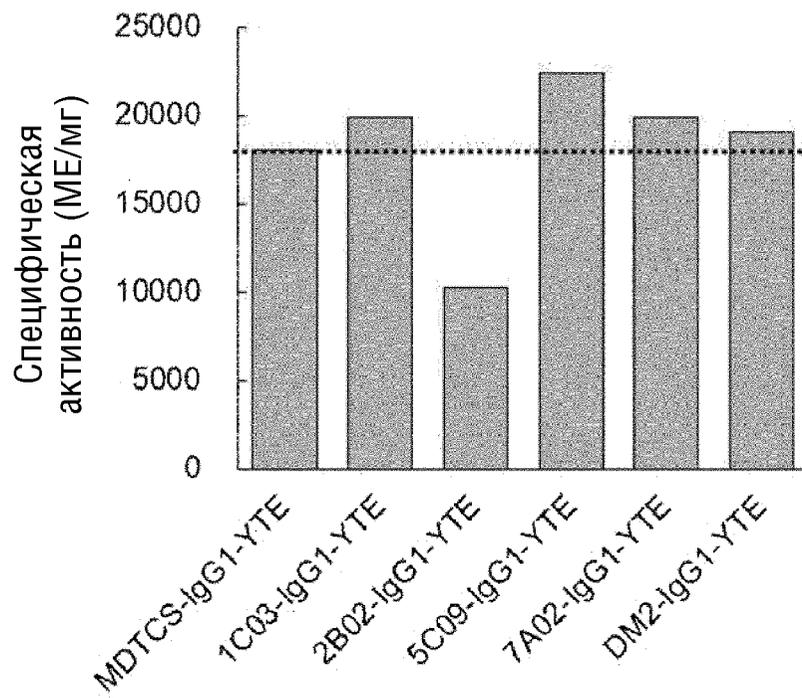
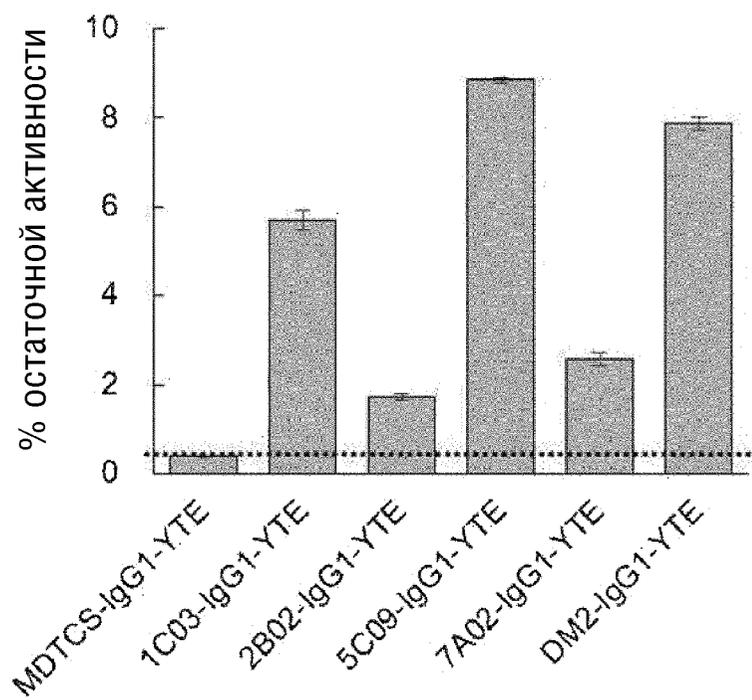
ФИГ.10b



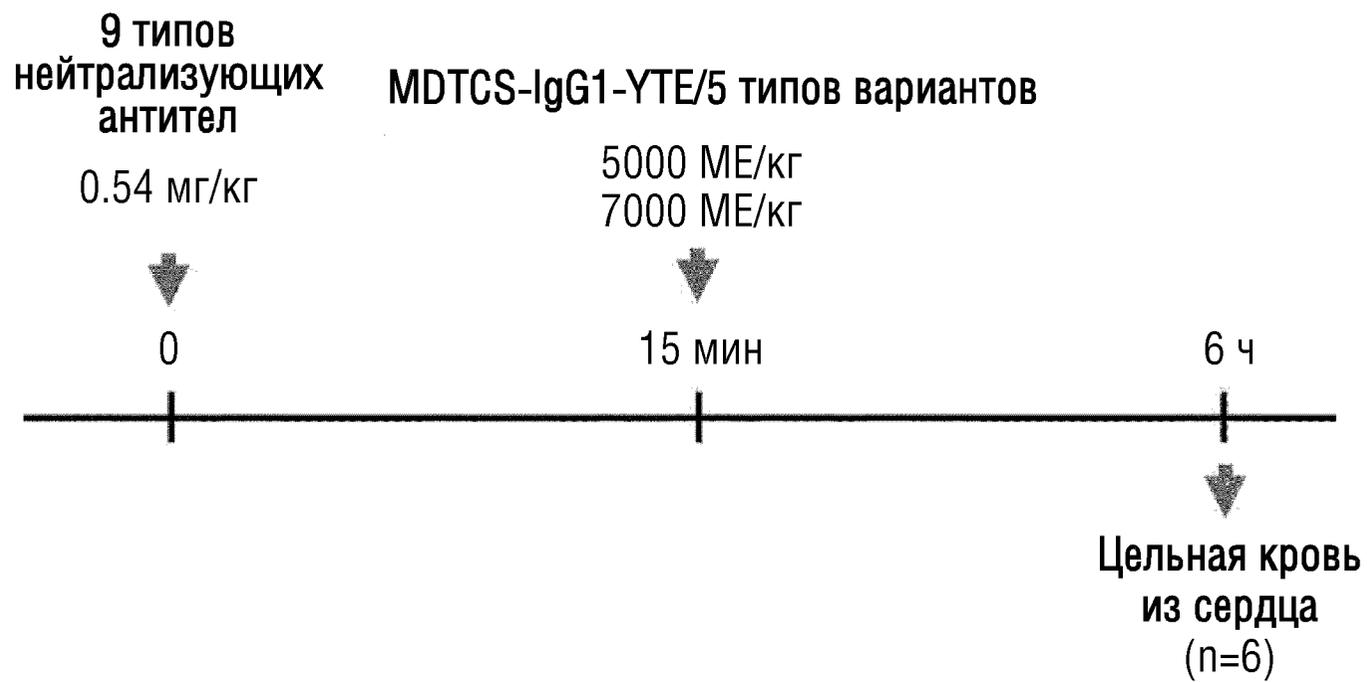
ФИГ.11



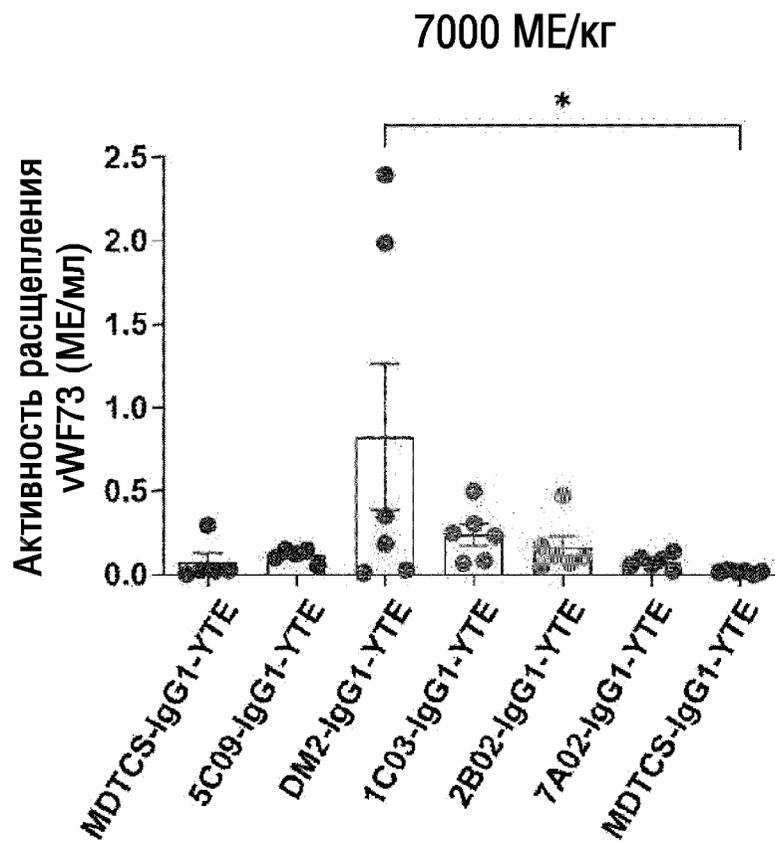
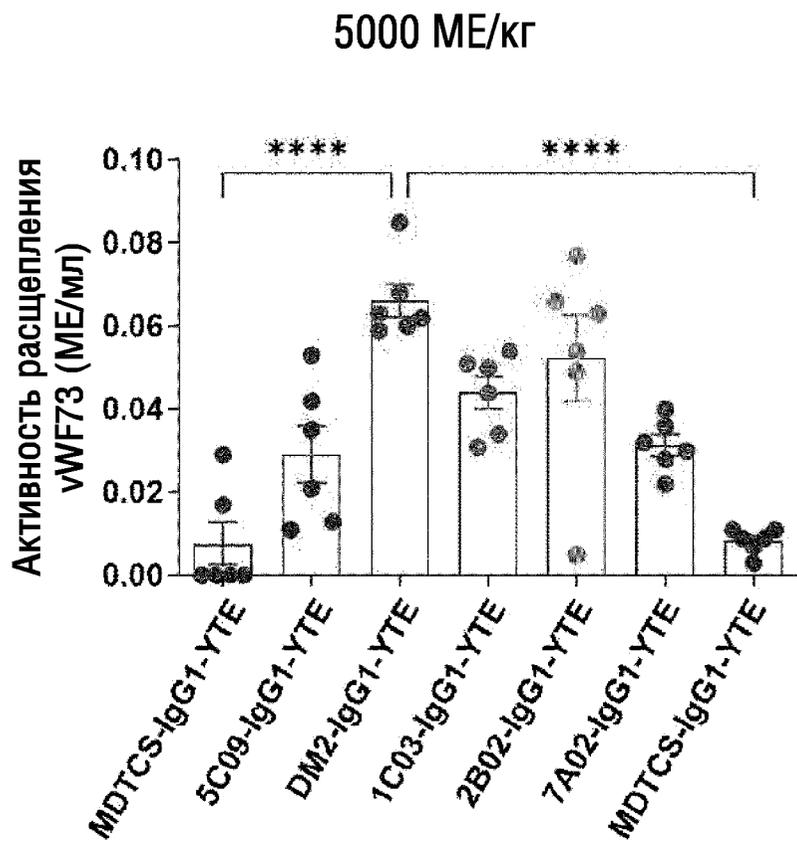
ФИГ.12



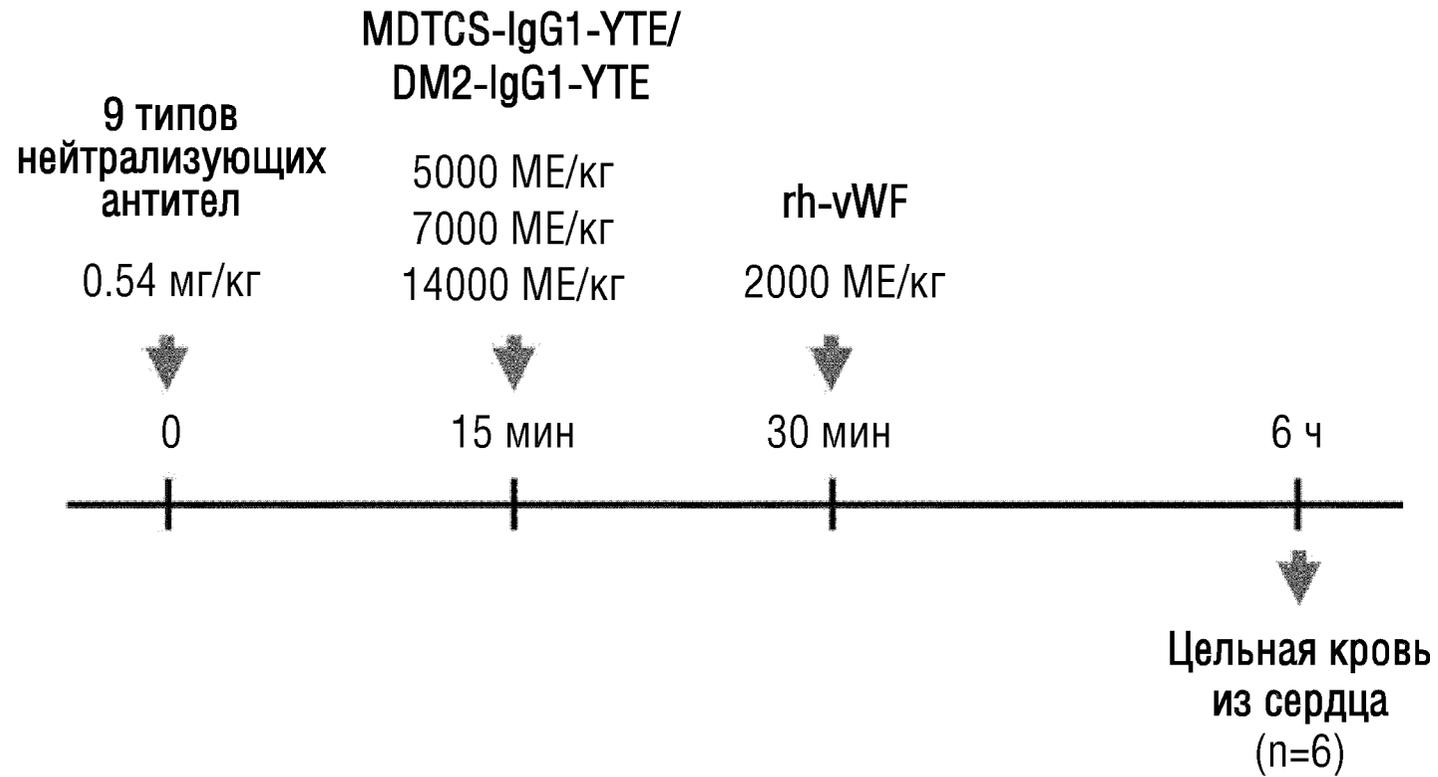
ФИГ.13а



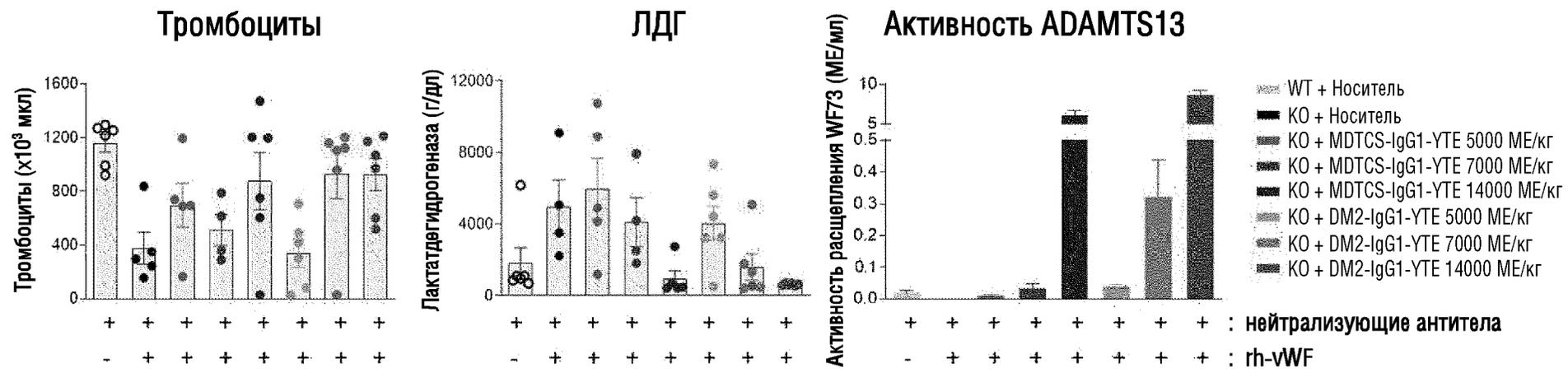
ФИГ.13b



ФИГ.14а

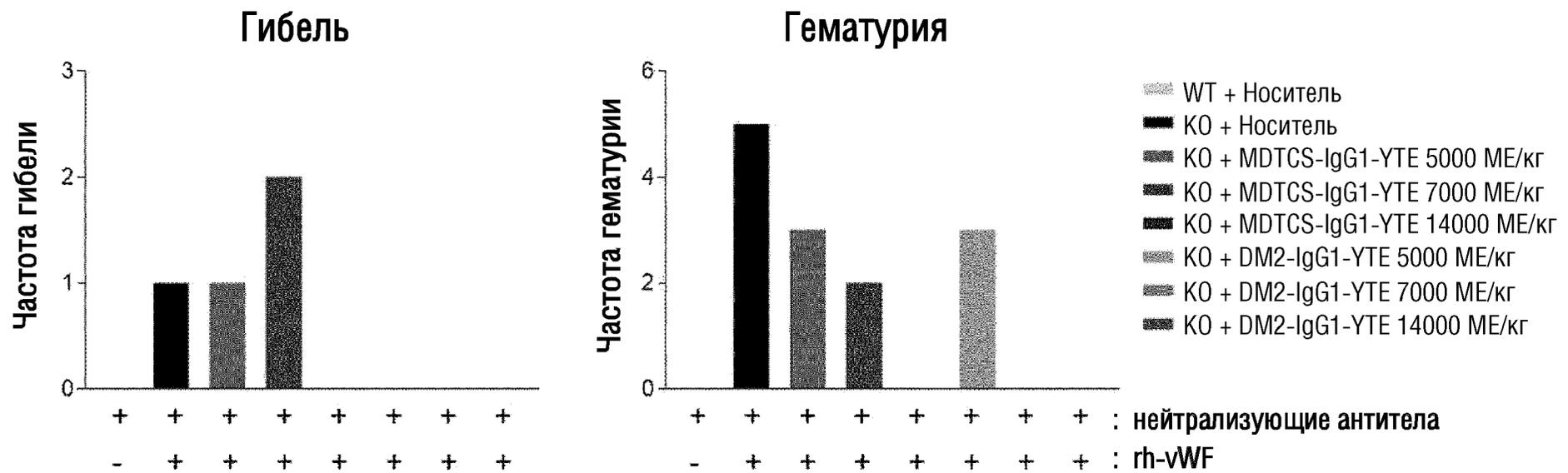


# ФИГ.14b



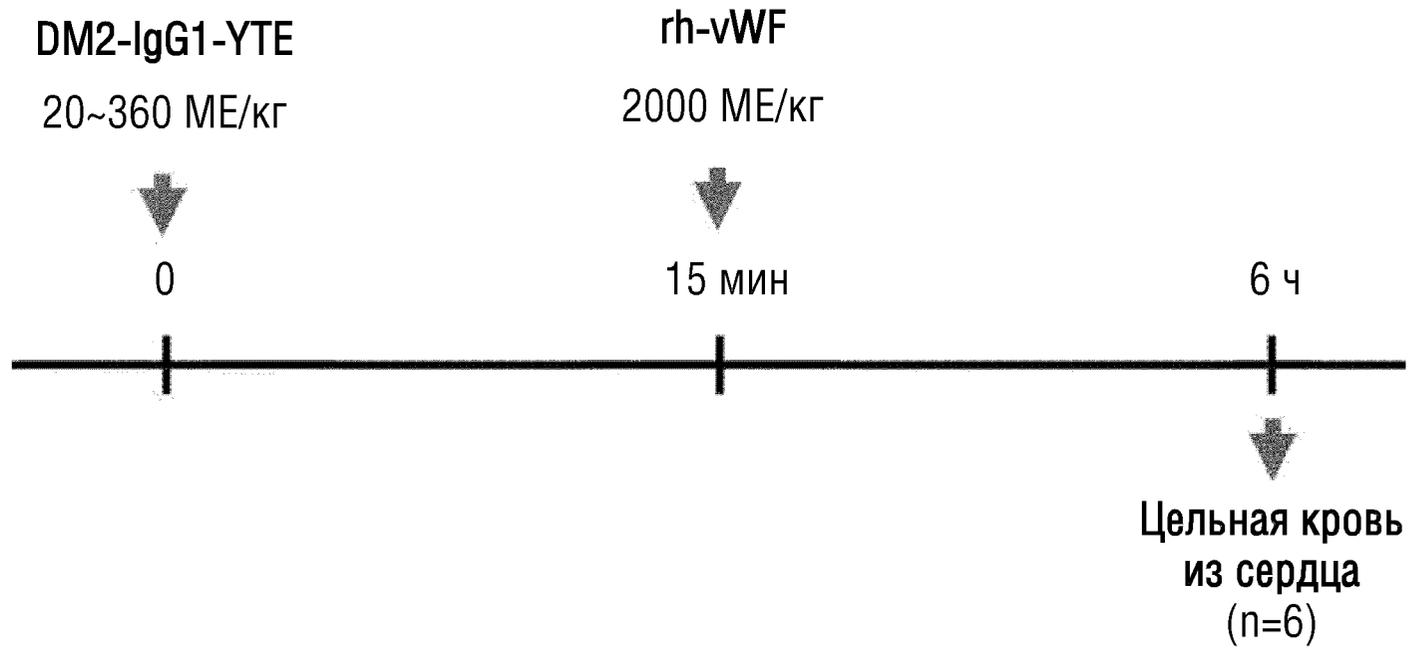
24/27

ФИГ.14с



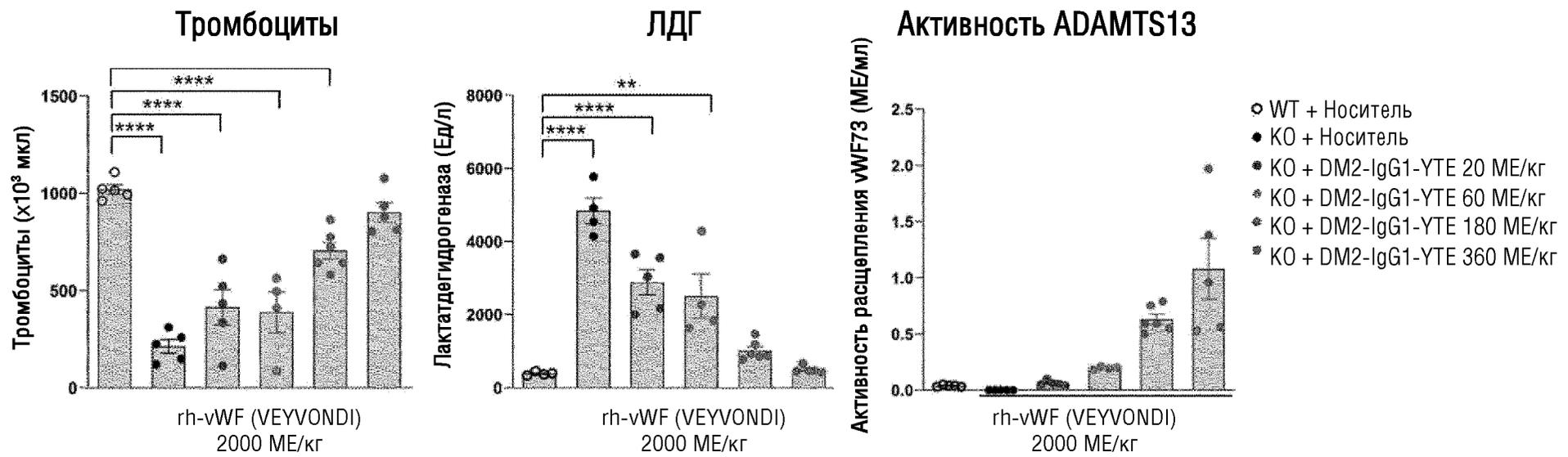
25/27

ФИГ.15а



26/27

# ФИГ.15b



Односторонний анализ ANOVA с критерием Тьюки  
 (\*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001, \*\*\*\*: P<0.0001 по сравнению с контролем)