(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115835880 A
(43)申请公布日 2023.03.21

(21)申请号 202180046183.9
(22)申请日 2021.05.25
(30)优先权数据
20176333.1 2020.05.25 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2021/050325 2021.05.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/242092 EN 2021.12.02
(71)申请人 桑昆专利有限公司
地址 荷兰阿姆斯特丹
(72)发明人 约翰内斯·雅各布斯·福尔贝格
努诺·亚历山大·戈梅斯·格拉察
博阿奇·尔茨格
(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
专利代理师 李海霞
(51)Int.Cl.
A61K 38/48(2006.01)

权利要求书3页 说明书36页 附图15页

(54)发明名称

ADAMTS13蛋白质变体及其用途

(57)摘要

本发明涉及ADAMTS13蛋白质变体，其包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。本发明进一步涉及包含此ADAMTS13变体的组合物、它们的制备方法及其用途，特别是作为抗血栓形成剂的用途，以及用于治疗血栓性疾病、血栓性微血管病、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒综合征(HUS)、缺血性中风、系统性血栓形成、COVID19、抗磷脂综合征、先兆子痫/HELLP综合征、败血症和镰状细胞病中的用途。

CN 115835880 A

1.一种ADAMTS13蛋白质变体,其包含ADAMTS13的残基1至685,并且其中在如图1所示ADAMTS13的包含氨基酸残基S556至A685的间隔区结构域中,与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

2.根据权利要求1所述的ADAMTS13蛋白质变体,其包含ADAMTS13的残基1至1427。

3.根据权利要求1或2所述的ADAMTS13蛋白质变体,其中在如图1所示的ADAMTS13序列的包含残基R568至R670的间隔区结构域的部分中,与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

4.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其在如图1所示的ADAMTS13中选自由残基568、591、608、609、636、637、665、668以及它们的组合所组成的组中的氨基酸残基处包含N-连接的糖基化位点。

5.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其在如图1所示的ADAMTS13中选自由残基608、609、665以及它们的组合所组成的组中的氨基酸残基处包含N-连接的糖基化位点。

6.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其在如图1所示的ADAMTS13的氨基酸残基608处包含N-连接的糖基化位点。

7.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其具有针对血管性血友病因子(VWF)的蛋白水解活性,其为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少10%。

8.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其在选自由R568、L591、V604、V605、A606、G607、K608、M609、R636、L637、P638、R639、Y665、L668以及它们的组合组成的组中的氨基酸残基处包含N-连接的糖基化位点,优选包含选自由R568N、L591N、V604N、V605N、A606N、G607N、K608N、M609N、R636N、L637N、P638N、R639N、Y665N、L668N以及它们的组合组成的组中的突变。

9.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其包含选自由568REY570至568NET570(NGLY1)、591LFT593至591NFT593(NGLY2)、608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)、636RLPR639至636NLSR639(NGLY5)、636RLPL639至636RNAS639(NGLY6)、665YGNL668至665NVTL668(NGLY7)、667NLTRP671至667LNVTA671(NGLY8)以及它们的组合组成的组中的突变。

10.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其包含选自由608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)和665YGNL668至665NVTL668(NGLY7)组成的组中的突变。

11.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其包含突变608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)。

12.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其进一步包含在一个或多个氨基酸残基处的进一步突变。

13.根据权利要求12所述的ADAMTS13蛋白质变体,其中在一个或多个氨基酸残基处的所述突变位于如图1所示ADAMTS13的包含残基S556至A685的间隔区结构域内。

14.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体,其在选自由R568、L591、

F592、R636、L637、L668、L591、F592、R636、L637、R660、Y661、Y665、L668以及它们的组合组成的组中的氨基酸残基处进一步包含突变。

15.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体，其包含选自由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、R660N、Y661F、Y661A、Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中的突变。

16.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体，其包含突变R568A和Y665A或突变L591A、R636A、L637A和L668A。

17.根据前述权利要求中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体，其在添加的所述一个或多个N-连接的糖基化位点处包含N-聚糖和/或其中移位的所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点包含N-连接的聚糖。

18.一种核酸构建体，其包含编码根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体的核酸序列。

19.一种药物组合物，其包含根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体或根据权利要求18所述的核酸构建体以及一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂和/或稀释剂。

20.根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体或根据权利要求18所述的核酸构建体，用于在疗法中使用。

21.根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体或根据权利要求18所述的核酸构建体，用于用作抗血栓形成剂。

22.根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体或根据权利要求18所述的核酸构建体，用于在以异常的血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症的治疗中使用。

23.一种用于治疗以异常的血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症的方法，包括向有此需要的受试者给予治疗有效量的根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体。

24.根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体在制造用于治疗以异常的血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症的药物中的用途。

25.根据权利要求22所述的用于使用的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体、根据权利要求23所述的方法或根据权利要求24所述的用途，其中所述病症是血栓性疾病。

26.根据权利要求25所述的用于使用的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体、方法或用途，其中所述血栓性疾病是血栓性微血管病。

27.根据权利要求25或26所述的用于使用的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体、方法或用途，其中所述血栓性疾病是选自由包括免疫介导的TTP(iTTP)的血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒综合征(HUS)、缺血性中风、系统性血栓形成、COVID19、抗磷脂综合征、先兆子痫/HELLP综合征、败血症和镰状细胞病组成的组中的病症。

28.一种用于生产根据权利要求1-17中任一项所述的ADAMTS13蛋白质变体的方法，其包括将根据权利要求18所述的核酸分子引入到能够进行N-连接的糖基化的宿主细胞中，优选真核宿主细胞，并在允许表达所述ADAMTS13蛋白质变体的条件下培养所述宿主细胞，优选地，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞，优选地选自由CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、

PERC.6细胞和HEK293细胞构成的组。

ADAMTS13蛋白质变体及其用途

[0001] 本发明是在欧盟地平线2020研究和创新计划的支持下根据Marie Skłodowska-Curie拨款协议No 675746(项目概况)做出的。

技术领域

[0002] 本发明涉及治疗领域。更具体地,本发明涉及其中牵涉血管性血友病因子(VWF)的病症的治疗领域。本发明涉及参与维持止血的修饰蛋白酶,具体涉及显示强烈降低的自身抗体结合同时保留活性的修饰蛋白酶及其在治疗疾病中的用途。

背景技术

[0003] 免疫介导的血栓性血小板减少性紫癜(iTTP)是一种罕见但危及生命的自身免疫性疾病,由针对ADAMTS13(一种具有血小板反应蛋白1型基序的去整合素和金属蛋白酶,成员13)的自身抗体的发展引起。ADAMTS13是一种金属蛋白酶,其可蛋白水解地切割血管性血友病因子(VWF)的A2结构域中的Tyr1605-Met1606键。VWF是一种多聚体蛋白,可介导血液中血小板与受损血管的粘附。VWF的多聚体大小与其生物活性成正比,较大的多聚体在促进血小板粘附到受损血管壁方面具有高度活性。在正常个体中,VWF的多聚体大小由VWF裂解蛋白酶ADAMTS13控制。由于iTTP患者中产生的针对ADAMTS13的致病性自身抗体的存在,这些患者的VWF多聚体加工受损。高分子量VWF多聚体在具有针对ADAMTS13的自身抗体的iTTP患者中的持续存在,与微脉管系统中出现危及生命的微脉管血栓形成的过度血栓形成有关。

[0004] 目前对iTTP的管理涉及血浆置换(PEX)和高剂量糖皮质激素的免疫抑制。血浆置换提供了外源性ADAMTS13的来源,由于持续存在靶向ADAMTS13(包括外源性ADAMTS13)的循环致病性抗体,其作用被缩短。除血浆置换外,也将利妥昔单抗(一种B细胞耗竭型抗-CD20治疗性单克隆抗体)用于治疗iTTP。利妥昔单抗也被用于预防iTTP患者中的复发。最近,卡帕珠单抗(一种人源化抗-VWF纳米抗体,可阻断血小板与VWF的结合)已证明可使血小板计数正常化加速1.55倍(Scully et al.,2019)。出血是卡帕珠单抗治疗的副作用(Mazepa et al.,2019)。Mazepa et al证明,出血是卡帕珠单抗疗法的主要副作用,在HERCULES临床试验中发生率为65%(与其相比,安慰剂臂为48%)。包括鼻衄和牙龈出血在内的粘膜皮肤出血是最常见的事件,并且大多数出血为轻度至中度严重程度,无需干预即可自行缓解。三名因卡帕珠单抗而出现严重出血的受试者接受了VWF浓缩物(严重鼻衄)、氨甲环酸(用于牙龈出血)和红细胞输注(用于上消化道出血)。总体而言,大多数与卡帕珠单抗相关的出血无需干预即可消散(尽管可能需要停药),而局部血管收缩剂和抗纤维蛋白溶解剂对其它出血有效,VWF浓缩物仅用于严重、难治性出血的患者。

[0005] 尽管iTTP患者的治疗取得了进展,但目前的治疗方案仍然是次优的。显然需要一种能够快速重新建立ADAMTS13活性的治疗,这将有助于加速iTTP患者中血小板计数的正常化。

[0006] 文献中已有报道自身抗体抗性ADAMTS13变体(Jian et al.,2012)。ADAMTS13的间隔区结构域提供了用于结合致病性自身抗体的主要位点。间隔区结构域内5个残基的保守

突变产生了所谓的功能获得(GoF)变体,据称该变体可抵抗iTTP患者体内产生的致病性自身抗体的结合(Jian et al.,2012)。ADAMTS13的这种GoF变体也在美国专利US 9/546,360中有所描述。然而,后续实验表明,ADAMTS13的这种GoF变体仍然被患者来源的自身抗体靶向并且不能抵抗它们的抑制作用(Graça et al.,2019)。然而,与ADAMTS13的其它结构域结合的致病性自身抗体也有报道。

[0007] 因此,仍然需要ADAMTS13变体,其可以有效地摆脱自身抗体的结合,同时保留ADAMTS13活性。当与目前可用的治疗选项相比时,基于其具有快速纠正iTTP和其它相关疾病患者中的临床症状的潜力,此类ADAMTS13变体可能具有巨大的治疗价值。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供改进的ADAMTS13变体,它们对自身抗体的结合不太敏感,并且保留了蛋白水解活性。

[0009] 因此,本发明提供了一种包含ADAMTS13的残基1至1427的ADAMTS13蛋白质变体或至少含有残基1至685的ADAMTS13的截短形式,并且其中,与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点,和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。优选地,所述一个或多个N-连接的糖基化位点未活加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位至所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541。在另一个优选实施方式中,在所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541处不存在所述N-连接的糖基化位点。在一个优选的实施方式中,所述ADAMTS13蛋白质变体是全长ADAMTS13变体,即包含ADAMTS13的残基1至1427,其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,并且任选地包含如本文所述的附加突变。

[0010] 在进一步的方面,本发明提供了一种核酸构建体,其包含编码根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体的核酸序列。

[0011] 在进一步的方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或根据本发明的核酸构建体以及一种或多种药物上可接受的载体、佐剂、赋形剂和/或稀释剂。

[0012] 在进一步的方面,本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体,其用于在疗法中使用。

[0013] 在进一步的方面,本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体,其用于用作抗血栓形成剂。

[0014] 在进一步的方面,本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述

ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体,其用于治疗以异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症。

[0015] 在进一步的方面,本发明提供了一种治疗以异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症的方法,包含向有此需要的受试者给药治疗有效量的ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体。

[0016] 在进一步的方面,本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体(优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体)在制造药物中的用途,所述药物用于治疗以异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

[0017] 在进一步的方面,本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体,其用于治疗血栓性疾病。

[0018] 在进一步的方面,本发明提供了一种治疗血栓性疾病(获得性或先天性血栓性疾病)的方法,包含向有此需要的受试者给药治疗有效量的ADAMTS13蛋白质变体或或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体。

[0019] 在进一步的方面,本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体(优选根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或核酸构建体)在制造药物中的用途,所述药物用于治疗血栓性疾病(获得性或先天性血栓性疾病),所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

[0020] 在进一步的方面,本发明提供了一种用于生产根据本发明的ADAMTS13蛋白变体的方法,包含:将根据本发明的核酸分子引入能够进行N-连接的糖基化的宿主细胞,优选真核宿主细胞,和在允许表达所述ADAMTS13蛋白质变体的条件下培养所述宿主细胞。

具体实施方式

[0021] 本发明人已经确定了一种用于开发与致病性自身抗体结合减少的ADAMTS13变体的新策略，其基于插入新型共有位点以添加N-聚糖。此类N-聚糖共有位点优选插入在ADAMTS13内的免疫原性区域。如实施例中所示，将氨基酸突变引入野生型ADAMTS13蛋白质中以在不同位置引入N-聚糖位点。进一步证明，这一技术可用于显著减少iTTP患者中产生的致病性ADAMTS13自身抗体的结合。不希望受理论束缚，假设引入的N-聚糖能够屏蔽由自身抗体结合的表位。更具体地说，引入的N-聚糖屏蔽了由靶向ADAMTS13的自身抗体结合的表位，包括下列中的由自身抗体结合的表位：间隔区结构域、TSP-1(1型血小板反应蛋白)重复和CUB(补体成分Clr/Cls、Uegf和骨形态发生蛋白1)、金属蛋白酶结构域、去整合素结构域、富含胱氨酸的结构域和其它结构域以及ADAMTS13其它结构域中为抗-ADAMTS13自身抗体提供结合位点的暴露区域。特别地，可以相信的是，屏蔽ADAMTS13的间隔区结构域中的主要表位会导致与自身抗体的反应性显著降低。间隔区结构域中的这种表位被认为以ADAMTS13序列中的氨基酸残基R568、F592、R660、Y661、Y665为中心。这5个残基的突变可以有效地降低自身抗体与ADAMTS13的结合，但它们通常也会导致活性丧失(Graça et al，2019)。在本发明中，证明可以在经典表位残基(R568、F592、R660、Y661和Y665)内和/或外侧引入N-聚糖，以降低ADAMTS13与自身抗体的反应性，而不丧失蛋白水解活性，即同时保留ADAMTS13的VWF切割活性的至少一部分。抵抗靶向ADAMTS13的自身抗体并且保留VWF与间隔区结构域结合的此类ADAMTS13 N-聚糖变体，对于治疗与异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或血管性血友病因子加工相关的病症而言受到较高关注。

[0022] 因此，在第一方面，本发明提供了一种ADAMTS13蛋白质变体，其包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比，添加了一个或多个N-糖基化位点和/或移位了一个或多个现有的N-糖基化位点，附带条件是所述一个或多个N-连接的糖基化位点未添加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位至所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541。

[0023] 在进一步的方面，本发明提供了在疗法中使用的一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体，所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

[0024] 在进一步的方面，本发明提供了用于用作抗血栓形成剂的一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体，所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

[0025] 在进一步的方面，本发明提供了在治疗以异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症中使用的一种ADAMTS13蛋白质变体或一种包含编码所述ADAMTS13变体的核酸序列的核酸构建体，所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

[0026] 如本文所用，术语“蛋白质”是指包含通过肽键连接的氨基酸的化合物。由基因编码的蛋白质不限于由基因编码的氨基酸序列，还可以包括蛋白质的翻译后修饰。

[0027] 如本文所用,术语“ADAMTS13”和“ADAMTS13蛋白质”是指由ADAMTS13基因编码的蛋白质。ADAMTS13是金属蛋白酶基因家族ADAM(一种去整合素和金属蛋白酶)的成员,该家族由具有不同功能的膜锚定蛋白酶组成。ADAMTS家族成员的进一步特征是在C-末端存在一个或多个血小板反应蛋白1-样(TSP1)结构域,并且在ADAM金属蛋白酶中不存在EGF重复、跨膜结构域和细胞质尾区。ADAMTS13是唯一拥有两个C-末端CUB结构域(用于补体C1r/C1s蛋白酶、海胆和骨形态发生蛋白)的ADAMTS成员并且具有VWF(血管性血友病因子)裂解蛋白酶活性(Kelwick et al,2015)。术语“野生型ADAMTS13”和“野生型ADAMTS13蛋白质”是指天然存在的人类ADAMTS13。图1提供了全长野生型ADAMTS13的氨基酸序列。

[0028] 如本文所用,术语“ADAMTS13蛋白质变体”是指ADAMTS13的变体,其氨基酸序列不同于野生型ADAMTS13的氨基酸序列,因为其具有至少一个在野生型ADAMTS13中不存在的N-糖基化位点。此外,根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体至少包含ADAMTS13氨基酸序列的氨基酸1至685,如图1所示。由如图1所示氨基酸1至685组成的缩短的ADAMTS13蛋白质已被证明具有针对VWF的蛋白水解活性(Tao et al.2005)。在另一个优选的实施方式中,根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体是全长ADAMTS13蛋白质变体,这意味着它含有具有ADAMTS13残基1至1427的完整氨基酸序列,如图1所示,其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,和任选地如本文所述的附加突变。

[0029] 在本文定义的氨基酸序列或蛋白质变体中,氨基酸由单字母或三字母符号表示。这些单字母和三字母符号是本领域技术人员熟知的并且具有下列含义:A(Ala)是丙氨酸,C(Cys)是半胱氨酸,D(Asp)是天冬氨酸,E(Glu)是谷氨酸,F(Phe)是苯丙氨酸,G(Gly)是甘氨酸,H(His)是组氨酸,I(Ile)是异亮氨酸,K(Lys)是赖氨酸,L(Leu)是亮氨酸,M(Met)是蛋氨酸,N(Asn)是天冬酰胺,P(Pro)是脯氨酸,Q(Gln)是谷氨酰胺,R(Arg)是精氨酸,S(Ser)是丝氨酸,T(Thr)是苏氨酸,V(Val)是缬氨酸,W(Trp)是色氨酸,Y(Tyr)是酪氨酸。

[0030] 本文所指氨基酸残基的所有位置指的是图1所示野生型ADAMTS13序列中氨基酸残基的编号。

[0031] 突变(特别是一个氨基酸被另一个氨基酸取代)在本文中以本领域标准的方式指示,即通过指示存在于野生型ADAMTS13序列中的氨基酸、氨基酸在该序列中的位置以及在该位置引入的氨基酸。例如。“R568K”指示位置568处的精氨酸被赖氨酸取代。“568REY570至568NET570”指示位置568-570处的序列精氨酸-谷氨酸-酪氨酸被序列天冬酰胺-谷氨酸-苏氨酸取代。

[0032] “N-连接的糖基化”是指寡糖部分与氮原子的附接,通常是天冬酰胺残基的N4。术语“N-连接的糖基化位点”和“N糖基化位点”可互换使用,并且指的是ADAMTS13蛋白质变体中可发生N-连接的糖基化的位点。此类位点具有氨基酸序列NXT或NXS,其中X是除P之外的任何氨基酸。N-连接的糖基化是一种翻译后修饰,并且蛋白质的N-连接的聚糖可以调节蛋白质的折叠、细胞附着和/或功能。N-连接的聚糖可以具有甘露糖、N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖、岩藻糖和唾液酸残基的不同组合。已在ADAMTS13上鉴定出多种N-连接的聚糖(Verbij et al.2016),连接到天冬酰胺残基142、146、552、579、614、667、707、828、1235和1354(参见图2),以及数种其它类型的糖基化,包括O-糖基化以及S-和C-甘露糖基化。图2还显示了ADAMTS13中鉴定出的N-聚糖的最常见结构和其它结构。

[0033] De Groot et al.已经描述了在全长ADAMTS13的富半胱氨酸的结构域中的残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541处引入N-连接的糖基化位点。进行了在该结构域中插入此类位点以及序列交换和单点突变,以研究ADAMTS13的富含半胱氨酸的结构域在结合VWF结合和蛋白水解中的功能作用。

[0034] 在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中,与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。这意味着N糖基化位点(NXT或NXS,其中X是除P之外的任何氨基酸)存在于野生型ADAMTS13中不存在的氨基酸残基处。这可以通过添加一个或多个附加N-连接的糖基化位点、移位一个或多个N-连接的糖基化位点或它们的组合来实现。优选添加和/或移位一至五个N-连接的糖基化位点,更优选一至三个,更优选一或两个。

[0035] 在进一步优选的实施方式中,在根据本发明引入或移位的N-连接的糖基化位点NXS或NXT附近在ADAMTS13序列中存在的脯氨酸(P)被另一种氨基酸替换,作为优选的例子,被丙氨酸替换。在此位置替换脯氨酸有助于将N-聚糖附接到N-连接的糖基化位点。如本文所用,在附近是指N-连接的糖基化位点之前或之后的1或2个氨基酸。优选地,紧接在N-连接的糖基化位点之后的脯氨酸被另一种氨基酸替换,作为优选的例子,被丙氨酸替换。

[0036] 添加N-连接的糖基化位点是指在本发明的ADAMTS13蛋白变体中引入野生型ADAMTS13中不存在的N-连接的糖基化位点,而没有去除野生型ADAMTS13中存在的任何天然存在的N-连接的糖基化位点。与野生型ADAMTS13相比,可通过在氨基酸序列中引入一个或多个突变来实现N-连接的糖基化位点的添加,从而引入N-连接的糖基化位点。此类突变可以是一个或多个氨基酸残基被其它氨基酸残基取代、插入一个或多个氨基酸残基、或缺失一个或多个氨基酸残基、或它们的组合,以这种方式,使得在ADAMTS13序列中引入在野生型ADAMTS13中不存在的N-连接的糖基化位点。在一个优选的实施方式中,通过一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基取代来添加N-连接的糖基化位点。特别地,任何氨基酸都可以被取代为天冬酰胺残基以引入天冬酰胺作为本文定义的N-连接的糖基化位点NXS或NXT中的第一个残基,脯氨酸可以取代为任何其它氨基酸以去除潜在的脯氨酸作为如本文定义的N-连接的糖基化位点NXS或NXT中的第二个残基,除了丝氨酸和苏氨酸之外的任何氨基酸可以被取代为丝氨酸或苏氨酸以引入丝氨酸或苏氨酸作为如本文定义的N-连接的糖基化位点NXS或NXT中的第三个残基,或它们的组合。在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13变体中可以引入NXS和NXT位点,但在与NXS相比时,NXT似乎产生了更有效的N-聚糖添加。例如,在本文实施例中描述的ADAMTS13变体NGLY3中,通过用天冬酰胺取代位置608处的赖氨酸(K608N),在氨基酸残基608-610处添加N-连接的糖基化位点(NMS)。作为另一个例子,在本文实施例中描述的ADAMTS13变体NGLY4中,通过用天冬酰胺取代位置609处的蛋氨酸并且用苏氨酸取代位置611处的异亮氨酸(609MSI611至609NST611),在氨基酸残基609-611处添加了N-连接的糖基化位点(NST)。本领域技术人员完全能够在ADAMTS13序列中设计适当的突变以添加一个或多个N-连接的糖基化位点。

[0037] 移位N-连接的糖基化位点是指存在于野生型ADAMTS13中特定氨基酸残基处的N-连接的糖基化位点(特别是包含在氨基酸位置142、146、552、579、614、667、707、828、1235或1354处的天冬酰胺残基)被移动到ADAMTS13氨基酸序列中的其它氨基酸残基处。即其中N-连接的糖基化位点已移位的ADAMTS13蛋白质变体中N-连接的糖基化位点的总数,与野生型

ADAMTS13中N-连接的糖基化位点的数量相同。优选地,N-连接的糖基化位点移位1至10个氨基酸残基。与野生型ADAMTS13序列中N-连接的糖基化位点的位置相比,移位可以在下游或上游。更优选地,与野生型ADAMTS13序列中N-连接的糖基化位点的位置相比,无论是上游还是下游,N-连接的糖基化位点移位1至7个氨基酸,更优选1至5个氨基酸,更优选1至4个氨基酸,更优选1至3个氨基酸,例如移位1、2或3个氨基酸残基。在优选的实施方式中,N-连接的糖基化位点移位1或2个氨基酸残基,最优选一个氨基酸残基。与野生型ADAMTS13相比,可以通过在氨基酸序列中引入一个或多个突变使得N-连接的糖基化位点发生移位,从而实现移位N-连接的糖基化位点。此类突变可以是一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基取代、插入一个或多个氨基酸残基、或缺失一个或多个氨基酸残基、或它们的组合,方式是使得与野生型ADAMTS13序列中N-连接的糖基化位点的位置相比,N-连接的糖基化位点发生了移位。在优选的实施方式中,通过用另一个氨基酸残基取代一个或多个氨基酸残基来移位N-连接的糖基化位点。特别地,可以用天冬酰胺残基取代任何氨基酸以引入天冬酰胺作为本文定义的N-连接的糖基化位点NXS或NXT中的第一个残基,可以用任何其它氨基酸取代脯氨酸以去除潜在的脯氨酸作为本文定义的N-连接的糖基化位点NXS或NXT中的第二个残基,可以用丝氨酸或苏氨酸取代除了丝氨酸和苏氨酸之外的任何氨基酸以引入丝氨酸或苏氨酸作为本文定义的N-连接的糖基化位点NXS或NXT中的第三个残基,或它们的组合。替代地或此外,天冬酰胺可以被任何其它氨基酸取代以去除野生型ADAMTS13中存在的N-连接的糖基化位点。例如,在本文实施例中描述的ADAMTS13变体NGLY8中,通过将位置667的天冬酰胺取代为亮氨酸、将位置668的亮氨酸取代为天冬酰胺、将位置669的苏氨酸取代为缬氨酸并且将位置670的精氨酸取代为苏氨酸(667NLTR670至667LNVT670),将N-连接的糖基化位点从氨基酸残基667-669移位至氨基酸残基668-670。此外,通过丙氨酸替换位置671的脯氨酸,显著增加了N-聚糖附着的可能性(667NLTRP671至667LNVTA671)。本领域技术人员完全能够在ADAMTS13序列中设计适当的突变以移位一个或多个N-连接的糖基化位点。

[0038] 在一个优选的实施方式中,与野生型ADAMTS13相比,根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中添加了一个或多个N-连接的糖基化位点,和/或在从下列选择的结构域中移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点:金属蛋白酶结构域、去整合素样结构域、TSP 1型1结构域、TSP(血小板反应蛋白)1型2结构域、TSP 1型3结构域、TSP 1型4结构域、TSP 1型5结构域、TSP 1型6结构域、TSP 1型7结构域、TSP 1型8结构域、富含半胱氨酸的结构域、间隔区结构域、CUB(补体成分C1r/C1s、Uegf和骨形态发生蛋白1)1结构域、CUB2结构域、两个所述结构域之间的区域及它们的组合及它们的组合,更优选从下列中选择的结构域:金属蛋白酶结构域、去整合素样结构域、TSP 1型1结构域、TSP 1型2结构域、TSP 1型3结构域、TSP 1型4结构域、TSP 1型5结构域、TSP 1型6结构域、TSP 1型7结构域、TSP 1型8结构域、间隔区结构域、CUB1结构域、CUB2结构域、两个所述结构域之间的区域及它们的组合及它们的组合。每个结构域的氨基酸残基示于表5的第一列中,其中编号是指图1所示野生型ADAMTS13序列中氨基酸残基的编号。“两个所述结构域之间的区域”是指两个相邻结构域之间的区域,优选在金属蛋白酶结构域和去整合素样结构域之间,在去整合素样结构域和TSP 1型1结构域之间,在TSP 1型2和TSP 1型3结构域之间,在TSP 1型3和TSP 1型4结构域之间,在TSP 1型4和TSP 1型5结构域之间,在TSP 1型7和TSP 1型8结构域之间以及在TSP 1型8和CUB1结构域之间。

[0039] 在本发明提供的ADAMTS13蛋白质变体中,所述一个或多个N-连接的糖基化位点未添加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位至所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541。优选地,所述一个或多个N-连接的糖基化位点未添加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位至所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基440-553或464-539。更优选地,所述一个或多个N-连接的糖基化位点未添加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位在由ADAMTS13的氨基酸残基440-556组成的富含半胱氨酸的结构域中。

[0040] 在进一步优选的实施方式中,与野生型ADAMTS13相比,通过在如图1所示包含ADAMTS13序列的残基S556至A685的间隔区结构域中和/或表5所示的任何氨基酸序列中引入N-糖基化位点(NXT或NXS,其中X为除了P的任何氨基酸)、或通过将N-糖基化位点移位至表5所示的任何氨基酸序列中,根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体添加了或移位了一个或多个N-连接的糖基化位点。在由本发明提供的ADAMTS13蛋白质变体中,所述一个或多个N-连接的糖基化位点未添加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位至所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541。

[0041] 在一个优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中添加或移位一个或多个N-连接的糖基化位点,在如图1所示ADAMTS13序列的金属蛋白酶结构域(优选包含残基L80至P226)中添加所述一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。在金属蛋白酶结构域中添加或移位所述一个或多个N-连接的糖基化位点,优选在表5中用No.1-9指示的结构域中移位所述一个或多个N-连接的糖基化位点。

[0042] 在一个优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中添加或移位一个或多个N-连接的糖基化位点,在如图1所示ADAMTS13序列的CUB结构域(优选包含残基C1192至T1427)中添加所述一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。在CUB结构域中添加或移位所述一个或多个N-连接的糖基化位点,优选在表5中用No.59-89指示的结构域中移位所述一个或多个N-连接的糖基化位点。

[0043] 在一个优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中添加或移位一个或多个N-连接的糖基化位点,在如图1所示ADAMTS13序列的TSP1-2-8结构域(优选包含残基P682至P1131)中添加所述一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。优选在TSP1-2-8结构域中添加或移位所述一个或多个N-连接的糖基化位点,优选在表5中用No 32-56指示的结构域中移位所述一个或多个N-连接的糖基化位点。

[0044] 在进一步优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中添加或移位一个或多个N-连接的糖基化位点,在如图1所示ADAMTS13序列的包含残基S556至A685的间隔区结构域中添加所述一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。间隔区结构域的长度为130个氨基酸,并且已知介导ADAMTS13蛋白酶活性所需的多个关键相互作用。已经进一步表明,ADAMTS13的截短变体(包含直到并包括间隔区结构的氨基酸,即氨基酸1-685)显示蛋白水解活性(例如Xiao

et al.2011和De Maeyer et al.2010)。因此,根据本发明的优选的ADAMTS13蛋白质变体至少包含ADAMTS13的残基1至685,其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N糖基化位点和/或移位了一个或多个现有的N-糖基化位点,并且进一步引入了如本文所述的任选突变。间隔区结构域含有表面暴露的残基,这些残基形成被抗-ADAMTS13自身抗体识别的主要表位。这些残基也称为外位点(外结合位点,exosite)-3结构域。该结构域含有氨基酸残基R568、F592、R660、Y661和Y665。R660、Y661和Y665的丙氨酸突变会损害VWF对ADAMTS13的识别(Pos et al.2010;Pos et al.2011)。然而,外位点-3残基的保守氨基酸取代已显示产生ADAMTS13的功能获得变体(Jian et al.2012)。最初人们认为,这种变体也对自身抗体具有抗性,但后续实验表明它仍然被患者来源的自身抗体靶向(Graça et al.,2019)。不希望受理论的束缚,可以相信的是,附接到间隔区结构域中的天冬酰胺残基的N-聚糖能够屏蔽外位点-3结构域,从而减少或阻止自身抗体与该位点的结合。

[0045] 在一个特别优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中,在ADAMTS13序列的包含残基S556至A685的间隔区结构域中添加一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点,如图1所示。

[0046] 进一步优选的是,如图1所示,在ADAMTS13序列的包含残基R568至R670的间隔区结构域的一部分中添加所述一个或多个N-连接的糖基化位点和/或移位所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。

[0047] 在进一步优选的实施方式中,根据本发明的或根据本发明使用的的ADAMTS13蛋白质变体具有针对血管性血友病因子(VWF)的蛋白水解活性,其为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少10%。已将临床重要水平的截止值设定为至少10%(例如Hie et al.2014)。如本文所用,"针对VWF的蛋白水解活性"是指ADAMTS13或ADAMTS13蛋白质变体切割VWF的能力。如本文所用,"x%野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性"是指与重组野生型ADAMTS13相比,在相同条件下,针对VWF的蛋白水解活性的x%。即,在相同的条件下,包括使用相同的测定法、相同的时间量、使用相同浓度的蛋白质等进行确定,将根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体针对VWF的蛋白水解活性与重组野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性进行比较。本领域技术人员完全能够评估在相同条件下野生型ADAMTS13以及根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体的蛋白水解活性,以便能够比较这种活性。例如,可以使用如本文实施例所述的测定法,用FRETS-VWF73(如Kokame et al.2005所述)和VWF多聚体测定法(如Graça et al.2019所述)确定针对VWF的蛋白水解活性。例如,可以使用通常可用的FRETS-VWF73底物(AnaSpec,Fremont,Ca,USA),例如根据实施例2中所述的FRETS-VWF73底物测定协议,测量针对VWF的蛋白水解活性。

[0048] 优选地,根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体具有针对VWF的蛋白水解活性,其为野生型重组ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少20%,更优选至少30%,更优选至少40%,更优选至少50%,更优选至少60%。在特别优选的实施方式中,根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体具有针对VWF的蛋白水解活性,其为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少70%。根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体还可以具有高于野生型ADAMTS13的蛋白水解活性,即具有的针对VWF的蛋白水解活性高于野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的100%。

[0049] 在进一步优选的实施方式中，与野生型ADAMTS13相比，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体具有减少的自身抗体结合。如本文所用的“具有减少的自身抗体结合”是指与野生型ADAMTS13相比，对ADAMTS13具有特异性的自身抗体的结合显示出对本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体的结合减少。如本文所用的“减少”优选是指所述结合减少了至少10％，优选至少15％，更优选至少20％，更优选至少25％，更优选至少50％，更优选至少75％，更优选至少80％，更优选至少85％，更优选至少90％，最优选至少95％。因此，“与野生型ADAMTS13相比，自身抗体的结合减少”优选是指例如如下文详述的，通过根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体与iTTP患者血清的反应性证明的自身抗体的结合，与野生型ADAMTS13蛋白质的结合相比，减少了至少10％，更优选至少15％、20％、25％、50％、75％、80％、85％、90％或95％。所述自身抗体优选但不限于结合位于外位点-3结构域中的表位(更优选包含残基F592、R568、R660、Y661和/或Y665的表位)的自身抗体。优选地，自身抗体是存在于患有免疫介导的血栓性血小板减少性紫癜(iTTP)的患者血清中的自身抗体。iTTP患者血清中自身抗体的结合减少可以例如通过在本文实施例中描述的测定中测量ADAMTS13蛋白质变体与iTTP患者的血清或(多种)血清的反应性来确定。简言之，可通过将ADAMTS13直接固定在表面上或通过固定针对ADAMTS13的单克隆或多克隆抗体(或V5-标签或His-标签或任何其它标签)间接固定，来检测自身抗体与ADAMTS13的结合。随后，将固定化的ADAMTS13与源自患者的生物流体(优选血浆或血清)一起温育，从而允许抗-ADAMTS13免疫球蛋白与固定化的ADAMTS13结合。随后，可以采用特异性识别人免疫球蛋白的偶联或标记的抗体，检测与ADAMTS13具有反应性的所结合的患者源性免疫球蛋白。在实施例3中给出了此类测定的一个例子。文献中广泛描述了检测来自患者和正常个体的生物流体中抗原-特异性抗体的其它方法，并且可用于检测针对ADAMTS13的抗体(例如Burbelo PD和O'Hanlon TP,2014)。因为iTTP患者血清中的自身抗体是异质的，所以优选在多个iTTP患者的血清中测定自身抗体与本发明ADAMTS13蛋白变体的结合，例如在至少5名不同iTTP患者的血清或血浆样品中。

[0050] 在进一步优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体，在位于ADAMTS13上的自身抗体结合位点附近包含的或有助于所述自身抗体结合位点的氨基酸残基处，包含至少一个N-连接的糖基化位点。即，与野生型ADAMTS13相比，在位于ADAMTS13上的自身抗体结合位点附近包含的或有助于所述自身抗体结合位点的氨基酸残基处，添加了和/或移位了所述一个或多个N-连接的糖基化位点。更优选地，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体在从由R568、L591、V604、V605、A606、G607、K608、M609、R636、L637、P638、R639、Y665、L668以及其组合组成的组中选择的氨基酸残基处包含N-连接的糖基化位点。更优选地，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体在从由R568N、L591N、V604N、V605N、A606N、G607N、K608N、M609N、R636N、L637N、P638N、R639N、Y665N、L668N及其组合组成的组中选择的氨基酸残基突变处包含N-聚糖。即通过引入选自这些组的突变，与野生型ADAMTS13相比，添加了一个或多个N-连接的糖基化位点。

[0051] 更优选地，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体在从如图1所示的568、591、608、609、636、637、665、668及它们的组合中选择的氨基酸位置处包含N-连接的糖基化位点，更优选在从如图1所示的591、608、609、636、665、668以及它们的组合中选择的氨基酸位置处，更优选在从如图1所示的608、609、665以及它们的组合中选择的氨基酸位

置处。

[0052] 在一个实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含从由568REY570至568NET570(NGLY1)、591LFT593至591NFT593(NGLY2)、608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)、636RLPR639至636NLSR639(NGLY5)、636RLPR639至636RNAS639(NGLY6)、665YGNL668至665NVTL668(NGLY7)、667NLTRP671至667LNVTA671(NGLY8)以及它们的组合组成的组中选择的突变。即，通过引入从该组中选择的突变，与野生型ADAMTS13相比，添加和/或移位了所述一个或多个N-连接的糖基化位点。括号之间的指示，诸如“NGLY1”、“NGLY2”等，指的是表1和表3中指示的变体。指示“N-glyx”和“NGLYx”在本文中可互换使用，例如“N-gly1”和“NGLY1”或“N-gly2”和“NGLY2”等。

[0053] 在进一步优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含从由591LFT593至591NFT593(NGLY2)、608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)、665YGNL668至665NVTL668(NGLY7)和667NLTRP671至667LNVTA671(NGLY8)组成的组中选择的突变，更优选包含从由608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)和665YGNL668至665NVTL668(NGLY7)组成的组中选择的突变，最优选包含突变608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)。即，通过引入从该组中选择的突变，与野生型ADAMTS13相比，添加和/或移位了所述一个或多个N-连接的糖基化位点。如本文的实施例所示，这些变体已显示特别强烈地减少了iTTP患者血清中存在的自身抗体的结合，但保持了针对VWF的蛋白水解活性。

[0054] 除了所述一个或多个添加的和/或移位的N-连接的糖基化位点，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体还可以包含在一个或多个氨基酸残基处的进一步突变，优选所述一个或多个突变不在蛋白质变体中引入糖基化位点。与野生型ADAMTS13蛋白质的氨基酸序列相比，所述一个或多个突变优选是蛋白质变体的氨基酸序列中的一个或多个突变。例如，可以引入进一步减少自身抗体与ADAMTS13蛋白质变体结合的一个或多个突变，导致针对VWF的蛋白水解活性增加的一个或多个突变，和/或增加ADAMTS13蛋白质变体稳定性的一个或多个突变。

[0055] 所述突变可以是一种氨基酸被另一种氨基酸取代、插入一个或多个氨基酸或缺失一个或多个氨基酸。优选地，此类进一步的一个或多个突变是一个或多个氨基酸被另一氨基酸取代。可以在整个蛋白质变体序列中引入所述突变。在一个优选的实施方式中，在自身抗体靶向的ADAMTS13的不同结构域内的位点中引入一个或多个突变，优选取代。在一个更优选的实施方式中，在包含如图1所示残基S556至A685的间隔区结构域中的一个或多个氨基酸残基处引入突变，优选取代。更优选地，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体在从由R568、L591、F592、R636、L637、L668、L591、F592、R636、L637、R660、Y661、Y665、L668以及它们的组合组成的组中选择的氨基酸残基处包含突变，优选取代。例如，在根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体中，突变了在已知获得功能突变体(即R568、F592、R660、Y661和Y665)中突变的一个或多个氨基酸，诸如R660、Y661和Y665，或R568、F592、R660和Y661，或R568、F592、R660、Y661和Y665。

[0056] 在一个优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含从由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、

R660N、Y661F、Y661A、Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中选择的突变。如本文实施例中所示，以及例如Jian et al.2012、Pos et al.2010和Graça et al.2019中所示，此类突变体保留或增加ADAMTS13的蛋白水解活性。

[0057] 在一个优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含突变R568A和Y665A。

[0058] 在一个优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含突变L591A、R636A、L637A和L668A。

[0059] 在一个优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含突变R568A和Y665A或突变L591A、R636A、L637A和L668A。

[0060] 在进一步优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含突变R660K、R660A或R660N；Y661F、Y661A或Y661N；以及Y665F、Y665A或Y665N。

[0061] 在进一步优选的实施方式中，根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体包含突变R568K、R568A或R568N；F592Y、F592A或F592N；R660K、R660A或R660N；以及Y661F、Y661A或Y661N。

[0062] 在进一步优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体包含突变R568K、R568A或R568N；F592Y、F592A或F592N；R660K、R660A或R660N；Y661F、Y661A或Y661N；以及Y665F、Y665A或Y665N。

[0063] 在一个优选实施方式中，在如图1所示ADAMTS13序列的氨基酸残基608处包含N-糖基化位点的根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体，优选包含序列607GNMSI611的ADAMTS13蛋白质变体，进一步包含所述进一步突变的一个或多个。

[0064] 在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中引入的突变，包括为与野生型ADAMTS13相比添加和/或移位一个或多个N-连接的糖基化位点而制成的突变以及如本文所述的任何进一步突变，优选地产生包含与野生型ADAMTS13中相应氨基酸序列的序列具有至少90％同一性的氨基酸序列的ADAMTS13蛋白质变体。术语“％序列同一性”在本文中定义为，在比对氨基酸序列与参考氨基酸序列或目的氨基酸序列并且任选地引入间隙(如果必要)以实现最大的百分比序列同一性之后，氨基酸序列中与参考氨基酸序列或目的氨基酸序列中的氨基酸相同的氨基酸的百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域众所周知的。本领域技术人员理解，将一个氨基酸序列中的连续氨基酸残基与另一氨基酸序列中的连续氨基酸残基进行比较。序列同一性是在ADAMTS13蛋白质变体的全序列和野生型ADAMTS13的相应序列上计算的。即，由ADAMTS13的残基1-685组成的ADAMTS13蛋白质变体优选地具有与野生型ADAMTS13的残基1-685的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列；全长ADAMTS13蛋白质变体优选地具有与野生型ADAMTS13的全长氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列；由ADAMTS13的残基1-900组成的ADAMTS13蛋白质变体优选地具有与野生型ADAMTS13的残基1-900的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列等。所述序列同一性为优选至少90％，更优选至少95％，更优选至少96％，更优选至少97％，更优选至少98％。

[0065] 本发明进一步提供了一种根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体，其在添加的所述一个或多个N-连接的糖基化位点处包含N-连接的聚糖，和/或其中在移位的所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点处包含N-连接的聚糖。所述蛋白质变体优选地具有针对血管性血友病因子(VWF)的蛋白水解活性，其为野生型ADAMTS13蛋白质针对

VWF的蛋白水解活性的至少10％，更优选为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少20％，更优选至少30％，更优选至少40％，更优选至少50％。如本文所用，术语“N-连接的聚糖”是指在N-糖基化位点处通过氮键与蛋白质或蛋白质变体连接的碳水化合物部分。存在多种N-连接的聚糖，并且N-连接的聚糖可以是可以附接到如本文定义的N-连接的糖基化位点的任何聚糖。本领域技术人员熟知可以附接到N-连接的糖基化位点的聚糖。图2显示了N-连接的聚糖的合适的常见结构和其它结构。在优选的实施方式中，N-连接的聚糖是选自图2所示的N-连接的聚糖的N-连接的聚糖。可以通过本领域已知的方法实现如本文所述的N-连接的聚糖与ADAMTS13蛋白质变体的附接，包括在合适的宿主细胞中重组产生蛋白质变体，其能够产生含有N-连接的聚糖的糖蛋白。合适的宿主细胞包括真核宿主细胞，特别是哺乳动物细胞，诸如CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、PERC.6细胞或HEK293细胞。替代地，糖基化模式的体外修饰是可能的。

[0066] 在另一个优选的实施方式中，根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体具有针对血管性血友病因子(VWF)的蛋白水解活性，其为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少10％。在进一步优选的实施方式中，所述变体是全长ADAMTS13变体，即具有图1所示的氨基酸1-1427。优选地，所述ADAMTS13蛋白质变体在添加的所述一个或多个N-连接的糖基化位点处包含N-连接的聚糖和/或移位的所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点包含N-连接的聚糖，并且具有针对血管性血友病因子(VWF)的蛋白水解活性，其为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少10％。在进一步优选的实施方式中，所述变体在包含残基S556至A685的间隔区结构域中的一个或多个氨基酸残基处包含进一步的突变，更优选在从由R568、L591、F592、R636、L637、L668、L591、F592、R636、L637、R660、Y661、Y665、L668以及它们的组合组成的组中选择的氨基酸残基处的突变，甚至更优选从由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、R660N、Y661F、Y661A、Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中选择的突变。

[0067] 在另一个优选的实施方式中，在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中，在包含残基S556至A685的间隔区结构域中，与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点，并且所述ADAMTS13蛋白质变体具有针对血管性血友病因子(VWF)的蛋白水解活性，其为野生型ADAMTS13蛋白质针对VWF的蛋白水解活性的至少10％。优选地，所述ADAMTS13蛋白质变体在添加的所述一个或多个N-连接的糖基化位点处包含N-连接的聚糖，和/或移位的所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点包含N-连接的聚糖。在进一步优选的实施方式中，所述变体是全长ADAMTS13变体，即具有图1所示的氨基酸1-1427。在进一步优选的实施方式中，所述变体在包含残基S556至A685的间隔区结构域中的一个或多个氨基酸残基处包含进一步的突变，更优选从由R568、L591、F592、R636、L637、L668、L591、F592、R636、L637、R660、Y661、Y665、L668以及它们的组合组成的组中选择的氨基酸残基处的突变，甚至更优选从由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、R660N、Y661F、Y661A、Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中选择的突变。

[0068] 在另一个优选的实施方式中，在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白

质变体中,通过引入从由568REY570至568NET570(NGLY1)、591LFT593至591NFT593(NGLY2)、608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)、636RLPR639至636NLSR639(NGLY5)、636RLPL639至636RNAS639(NGLY6)、665YGNL668至665NVTL668(NGLY7)、667NLTRP671至667LNVTA671(NGLY8)以及它们的组合组成的组中选择的突变,更优选从由591LFT593至591NFT593(NGLY2)、608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)、636RLPR639至636NLSR639(NGLY5)组成的组中选择的突变,与野生型ADAMTS13相比,添加了一个或多个N-连接的糖基化位点。优选地,所述ADAMTS13蛋白质变体在添加的所述一个或多个N-连接的糖基化位点包含N-连接的聚糖和/或移位的所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点包含N-连接的聚糖。在进一步优选的实施方式中,所述变体是全长ADAMTS13变体,即具有图1所示的氨基酸1-1427。在进一步优选的实施方式中,所述在包含残基S556至A685的间隔区结构域中的一个或多个氨基酸残基处包含进一步的突变,更优选在从由R568、L591、F592、R636、L637、L668、L591、F592、R636、L637、R660、Y661、Y665、L668以及它们的组合组成的组中选择的氨基酸残基处的突变,甚至更优选从由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、R660N、Y661F、Y661A、Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中选择的突变。

[0069] 在另一个优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中,通过在表5所示的任一氨基酸序列中引入N-糖基化位点(NXT或NXS,其中X为除了P的任何氨基酸)或通过将N-糖基化位点移位至表5所示的任一氨基酸序列中,与野生型ADAMTS13相比,添加或移位了所述一个或多个N-连接的糖基化位点,附带条件是所述一个或多个N-连接的糖基化位点未添加至并且所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点未移位至所述ADAMTS13蛋白质变体的氨基酸残基464-466、469-471、476-478、493-495、511-513和539-541。优选地,所述ADAMTS13蛋白质变体在添加的所述一个或多个N-连接的糖基化位点处包含N-连接的聚糖和/或移位的所述一个或多个现有的N-连接的糖基化位点包含N-连接的聚糖。在进一步优选的实施方式中,所述变体是全长ADAMTS13变体,即具有图1所示的氨基酸1-1427。在进一步优选的实施方式中,所述变体在ADAMTS13的一个或多个氨基酸残基中包含进一步的突变。在进一步优选的实施方式中,所述变体在包含残基S556至A685的间隔区结构域中的一个或多个氨基酸残基处包含进一步的突变,更优选在从由R568、L591、F592、R636、L637、L668、L591、F592、R636、L637、R660、Y661、Y665、L668以及它们的组合组成的组中选择的氨基酸残基处的突变,甚至更优选从由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、R660N、Y661F、Y661A、Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中选择的突变。

[0070] 在另一个优选的实施方式中,在根据本发明的或根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体中,通过引入从由591LFT593至591NFT593(NGLY2)、608KMSI611至608NMSI611(NGLY3)、608KMSI611至608KNST611(NGLY4)和636RLPR639至636NLSR639(NGLY5)组成的组中选择的突变,与野生型ADAMTS13相比,添加了N-连接的糖基化位点,并且所述ADAMTS13蛋白质变体在添加的所述N-连接的糖基化位点处包含N-连接的聚糖,所述变体进一步包含从由R568K、R568A、R568N、L591A、F592Y、F592A、F592N、R636A、L637A、R660K、R660A、R660N、Y661F、Y661A,Y661N、Y665F、Y665A、Y665N、L668A以及它们的组合组成的组中选择的突变,优选地进一步包含突变R568K、R568A或R568N;F592Y、F592A或F592N;R660K、R660A或R660N;

Y661F、Y661A或Y661N;以及Y665F、Y665A或Y665N。

[0071] 特别优选的ADAMTS13蛋白质变体是本文中所述指示为NGLY1、NGLY2、NGLY3、NGLY4、NGLY5、NGLY6、NGLY7、NGLY8、NGLY3+NGLY7、NGLY+NGLY8、NGLY3+L591A/R636A/L637A/L668A、NGLY3+R568A/Y665A和NGLY3+R568A/Y665A+L591A/R636A/L637A/L668A的变体,更优选本文中描述指示为NGLY2、NGLY3、NGLY4、NGLY5、NGLY7、NGLY8、NGLY3+NGLY7、NGLY+NGLY8、NGLY3+L591A/R636A/L637A/L668A和NGLY3+R568A/Y665A的变体。

[0072] 本发明还提供了一种编码根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体的核酸。进一步提供了一种包含编码根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体的核酸序列的核酸构建体。根据本发明的核酸序列和构建体都可用于治疗性应用以及制备根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体。

[0073] 如本文所用,术语“核酸”是指DNA和RNA,包括mRNA或cDNA,以及其合成变体。核酸可以是重组或合成核酸。

[0074] 根据本发明的核酸构建体优选存在于载体中,例如表达载体。表达载体可以是病毒或非病毒载体。合适表达载体的非限制性实例包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关、单纯疱疹和慢病毒载体、非病毒载体和工程化载体。非病毒表达载体包括裸DNA以及包装在合成或工程化组合物(例如脂质体、聚合物、纳米颗粒和分子偶联物)中的核酸。产生此类非病毒表达载体的方法是本领域众所周知的。表达载体优选包含强启动子/增强子,例如CMV或SV40启动子,最佳翻译起始序列,例如核糖体结合位点和起始密码子,和/或转录终止序列,包括当蛋白质在真核细胞中表达时的多聚(A)信号。本领域技术人员将理解,待使用的表达载体取决于用于表达根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体(优选含有N-连接的聚糖的蛋白质变体)的宿主细胞。表达载体优选适合于在真核宿主细胞(更优选哺乳动物宿主细胞,更优选CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、PERC.6细胞和/或HEK293细胞)中表达本发明的核酸分子。

[0075] 作为替代,根据本发明使用的核酸序列可以通过基因编辑技术提供给受试者,包括CRISPR/Cas、锌指核酸酶和转录激活因子样效应核酸酶-TALEN,以便将受体转基因插入具有或不具有外源启动子的特定基因座。优选的基因组基因座包括AAVS1基因座和PD-1基因座,如技术人员所知。

[0076] 还提供了一种药物组合物,其包含根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体和一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂和/或稀释剂。“药学上可接受的”是指辅助剂、载体、稀释剂或赋形剂必须与配方的其它成分相容并且对其接受者无害(例如无毒)。通常,可以使用不干扰活性化合物功能的任何药学上合适的添加剂。根据本发明的药物组合物优选适合人类使用。

[0077] 合适载体的实例包括溶液、乳糖、淀粉、纤维素衍生物等,或其混合物。在优选实施方式中,所述合适载体是溶液,例如盐水。为了制作剂量单位,例如片剂,预期了使用常规添加剂,如填料、着色剂、聚合物粘合剂等。可掺入片剂、胶囊等的赋形剂的实例如下:粘合剂,例如黄芪胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂如微晶纤维素;崩解剂,如玉米淀粉、预糊化淀粉、海藻酸等;润滑剂,如硬脂酸镁;甜味剂,如蔗糖、乳糖或糖精。

[0078] 根据本发明的药物组合物优选适合于或适用于肠胃外给药。所述给药优选是静脉内、动脉内、皮下和/或肌肉内给药。可以通过注射或输注给药。注射用组合物(例如静脉内)给药可以是例如在无菌水溶液(例如等渗水性缓冲液)、油性溶液、分散液、乳液和/或悬浮液,优选水溶液中包含本发明的ADAMTS13蛋白质变体的溶液。注射用(例如静脉内)组合物

可包括例如增溶剂、稳定剂和/或局部麻醉剂以减轻注射或输注部位的疼痛。

[0079] 本领域技术人员有能力确定合适的给药方案,即剂量和给药间隔,这取决于待治疗的病情和期望的效果(例如短期效果或长期治疗)。这些化合物及其组合物的确切剂量和方案将进一步取决于ADAMTS13蛋白质变体的生物活性、受试者的年龄、体重和性别、被施用药物的个体受试者的需要、痛苦或需要的程度以及从业医师的判断。例如,合适剂量的一个例子是剂量范围为0.1mg至15g,诸如1至10g本发明的ADAMTS13蛋白质变体。

[0080] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种药物试剂盒或部件试剂盒,其包含装有本发明的一种或多种药物组合物的一个或多个容器。与此类容器相关联的可以是各种书面材料,例如使用说明,或由管理药品生产、使用或销售的政府机构规定形式的商品描述,该商品描述反映了机构批准人类或兽医给药的制造、使用或销售。优选地,药物试剂盒或部件试剂盒包含使用说明。

[0081] 根据本发明使用的ADAMTS13蛋白质变体可以通过多种途径向受试者给药。例如,蛋白质变体可以通过任何合适的胃肠外或非胃肠外途径给药,包括例如局部(例如乳膏、软膏、滴眼剂)或经鼻(例如溶液、悬浮液)。肠胃外给药可包括例如关节内、肌肉内、静脉内、心室内、动脉内、鞘内、皮下或腹膜内给药。静脉内和皮下给药可能是最有利的。此外,蛋白质变体可以在医院通过输注或通过保健专业人员注射而向受试者给药。

[0082] 根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体可以通过本领域公知且可用的方法来制备。例如,本领域技术人员将理解如何产生编码根据本发明蛋白质变体的氨基酸序列的DNA序列以及如何使用通常已知的重组DNA技术制备和分离具有所述DNA序列的核酸分子。可以对核酸分子的序列进行密码子优化以在合适的宿主细胞中表达。

[0083] 优选使用本领域技术人员已知的重组DNA技术将核酸分子引入如上文所述的表达载体中。本发明上下文中的表达载体指导根据本发明的蛋白质变体在本文所述的合适宿主细胞中的表达。作为替代,可以使用本文所述的合适的基因编辑技术将核酸分子插入宿主细胞的基因组中。所述插入优选地位于确保本发明的核酸分子在宿主细胞中表达的基因座或区域内。

[0084] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指能够表达异源蛋白质、多肽或肽的任何细胞。在一个优选的实施方式中,宿主细胞能够将N-连接的聚糖连接到蛋白质、肽或多肽上。在进一步优选的实施方式中,宿主细胞是真核宿主细胞,更优选哺乳动物细胞,更优选地选自CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、PERC.6细胞和HEK293细胞。合适的转染技术是本领域已知的,例如从Green&Sambrook.,2012.“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,4th Edition,CSHL Press;Cold Spring Harbor Protocols,www.cshprotocols.cshlp.org)已知。

[0085] 本文所述的ADAMTS13蛋白变体具有VWF蛋白水解活性,因此特别地有用于治疗以异常VWF活性和/或VWF加工为特征的病症和/或血栓性疾病。

[0086] 因此,本发明提供了用于在疗法中使用的一种ADAMTS13蛋白质变体或编码此类ADAMTS13蛋白质变体的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685,并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。还提供了用于用作抗血栓形成剂的此类ADAMTS13蛋白质变体或编码此类ADAMTS13蛋白质变体的核酸构建体。如本文所用,术语“抗血栓形成剂”是指防止血凝块形成、减少或减缓血凝块形成和/或抵消现有血

凝块的化合物。

[0087] 本发明还提供了用于在治疗以异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症中使用的一种ADAMTS13蛋白质变体或编码此ADAMTS13蛋白质变体的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685,并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。还提供了一种用于治疗以异常血管性血友病因子(VWF)活性和/或VWF加工为特征的病症的方法,包含向有此需要的受试者给药ADAMTS13蛋白质变体或编码此ADAMTS13蛋白质变体的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685,并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。如本文所用,术语“血管性血友病因子”或“VWF”是指介导血小板粘附和聚集的血浆糖蛋白。VWF由内皮细胞和巨核细胞合成的长多聚体,分子量高达大于20,000kDa。大多数循环VWF由内皮细胞合成。大多数分泌的VWF由促血栓形成的超大型VWF(ULVWF)多聚体组成。如上文所述,VWF的促血栓形成活性在正常止血期间通过ADAMTS13的有限切割进行调节。如本文所用,“异常VWF活性”是指VWF活性,特别是VWF的促血栓形成活性,偏离健康受试者的VWF活性,优选与健康受试者中的VWF活性相比增加。特别是偏差或增加,使得其导致其对健康产生不利影响,即导致疾病或疾病。如本文所用,“异常VWF加工”是指VWF的加工,特别是VWF的切割,特别是VWF多聚体的切割,偏离健康受试者中的VWF加工,特别是与健康受试者中的VWF加工相比减少。如本领域技术人员所理解的,ADAMTS13蛋白质变体可用于纠正受试者中的ADAMTS13缺陷。因此,原则上,可以用本文所述的ADAMTS13蛋白质变体治疗其中VWF活性或加工异常的任何病症。如本文所用,术语“ADAMTS13缺陷”是指ADAMTS13没有像在健康受试者中那样表现出其止血作用(通过切割控制VWF多聚体尺寸)。这可能是由于低ADAMTS13蛋白质水平、其底物VWF过量或存在针对ADAMTS13的自身抗体引起的。优选地,ADAMTS13缺陷是由受试者中自身抗体的存在引起的。

[0088] 在一个优选的实施方式中,提供了用于在治疗血栓性疾病(获得性或先天性血栓性疾病)中使用的一种ADAMTS13蛋白质变体或编码此ADATMS13蛋白质变体的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685,并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。还提供了一种用于治疗血栓性疾病(获得性或先天性血栓性疾病)的方法,包含向有此需要的受试者给药ADAMTS13蛋白质变体或编码此ADAMTS13蛋白质变体的核酸构建体,所述ADAMTS13蛋白质变体包含ADAMTS13的残基1至685,并且其中与野生型ADAMTS13相比添加了一个或多个N-连接的糖基化位点和/或与野生型ADAMTS13相比移位了一个或多个现有的N-连接的糖基化位点。因为此ADAMTS13蛋白质变体能够切割并因此降低VWF的活性,因此降低了VWF的促血栓形成活性。

[0089] 在进一步优选的实施方式中,该病症是血栓性微血管病。更优选地,所述病症选自血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒综合征(HUS)、缺血性中风、系统性血栓形成、COVID19、抗磷脂综合征、先兆子痫/HELLP综合征、败血症和镰状细胞病。

[0090] ADAMTS13已知具有全身性抗血栓形成作用,例如Chauhan et al.(2006)所述,显示了Adamts13$^{-/-}$小鼠中的自发血栓形成,并且得出结论,ADAMTS13具有强大的天然抗血栓

形成活性，并且重组ADAMTS13可用作抗血栓形成剂。因此，本文所述的ADAMTS13蛋白质变体可以有利地用于治疗系统性血栓形成。

[0091] 血栓性微血管病包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。TTP包括免疫介导的TTP(iTTP)和先天性TTP(cTTP)。在优选的实施方式中，血栓性微血管病为TTP。在进一步优选的实施方式中，TTP为iTTP。在iTTP和先天性TTP中，均强烈地降低了ADAMTS13水平。重组野生型ADAMTS13目前正在临床试验中用于治疗cTTP和iTTP(Scully et al,2019;临床试验标识符:NCT03922308)。因此，根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体可用于治疗iTTP和先天性TTP。iTTP患者体内存在的自身抗体限制了使用存在于人类血浆中或在真核表达系统中作为野生型重组ADAMTS13蛋白质产生的野生型ADAMTS13治疗的有效性。自身抗体抗性ADAMTS13变体允许立即恢复功能性ADAMTS13水平，从而减轻患有iTTP以及其它血栓形成性病症的患者中观察到的严重血栓形成并发症。

[0092] HUS的特征是溶血性贫血、血小板减少、系统性血栓性微血管病(TMA)和肾衰竭。HUS患者可见部分ADAMTS13缺陷。因此，本文所述的ADAMTS13蛋白质变体可以有利地用于治疗HUS，特别是与部分ADAMTS13缺陷相关的HUS。

[0093] 血栓形成是急性缺血性卒中(AIS)的主要潜在机制。多项研究发现，患有缺血性中风的患者中的ADAMTS13水平显著降低，而患有急性中风的患者中的ADAMTS13水平最低。正如Chen et al.(2019)在综述中所详述的那样，现有证据表明，ADAMTS13与缺血性中风的发生、发展和预后密切相关，保护大脑免受缺血再灌注损伤。VWF:ADAMTS13比例与中风的风险有很强的相关性。ADAMTS13的活性和水平对缺血性中风的发生和预后有很好的预测价值。此外，ADAMTS13治疗AIS的动物研究也取得了显著进展:在中风发作7天后向野生型小鼠注射重组ADAMTS13增加了新生血管的形成和血管修复，并且显著地改善中风后14天预后。结论是ADAMTS13有望成为一种新的缺血性中风治疗剂。因此，本文所述的ADAMTS13蛋白质变体可有利地用于治疗缺血性中风。

[0094] 败血症是一种观察到凝血病的疾病，并且血栓性微血管病可能是其中的一个组成部分。败血症中的血栓性微血管病与低水平的ADAMTS-13相关。Ramsi和Al Ali(2018)描述了一个与败血症相关的血小板减少相关多器官功能衰竭(TAMOF)病例，其通过恢复ADAMTS13活性的血浆置换得到了显著改善，病理过程和器官衰竭停止。因此，本文所述的ADAMTS13蛋白质变体可有利地用于治疗败血症，特别是患有败血症的受试者的血栓性微血管病。

[0095] 在镰状细胞病中，已发现低的ADAMTS13/VWF比例，并且在发展为急性胸部综合征的患者中ADAMTS13活性更低，表明了ADAMTS-13水平的定量降低，并且给药重组ADAMTS-13可能具有有益效果(Sins et al.2017)。因此，这表明根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体可以有利地用于治疗镰状细胞病。

[0096] 影响肺和全身脉管系统的血栓形成在由严重急性呼吸综合征-冠状病毒-2(SARS-CoV-2)感染引起的严重的COVID19(2019冠状病毒病)期间很常见，Turecek et al.(2020)证明，显著增加的血浆VWF水平伴随着VWF调节蛋白酶ADAMTS13的部分减少。用重组ADAMTS13(rADAMTS13)温育来自重症COVID-19患者的血浆样品，以时间和浓度依赖性方式大幅降低了异常高的VWF活性、降低了总体多聚体尺寸并耗尽了UHMW VWF多聚体，并且表明rADAMTS13可能在帮助恢复COVID-19患者中的止血平衡方面具有治疗作用。因此，这表明根

据本发明的ADAMTS13蛋白质变体可以有利地用于治疗COVID-19和/或SARS-CoV-2感染。

[0097] 抗磷脂综合征和先兆子痫(PEcl)已经与降低的ADAMTS13水平有关,并且已与较高的ADAMTS13抗体以及较低的ADAMTS13活性和活性:抗原比率有关(Bitsatze et al.2021)。此外,在HELLP综合征中可见血小板减少症和微血管病性溶血性贫血(TMA)。此外,Austin et al.(2008)证明,ADAMTS13自身抗体和ADAMTS13功能障碍可发生在抗磷脂综合征中。因此,这表明根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体可以有利地用于治疗抗磷脂综合征和先兆子痫/HELLP综合征,特别是与ADAMTS13功能障碍相关的抗磷脂综合征和先兆子痫/HELLP综合征。

[0098] 如本文所用,术语“受试者”是指根据本发明的ADAMTS13蛋白质变体或编码核酸的接受者,并且包括人类和动物。受试者优选是哺乳动物,更优选是人类。

[0099] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指给药的ADAMTS13蛋白质变体的量足以在一定程度上缓解所治疗的疾病或病症的一种或多种症状。这可以是症状的减少或减轻、疾病或病情的原因的减少或减轻、或任何其它期望的治疗效果。

[0100] 如本文所用,术语“治疗”是指抑制病症,即停止或减少其发展或者疾病或病情的至少一种临床症状,和/或缓解疾病或病情的症状。

[0101] 出于清楚和简要描述的目的,特征在本文中可被描述为本发明的相同或不同方面或实施方式的一部分。本领域技术人员将理解的是,本发明的范围可包括具有本文描述的所有或一些特征的组合作为相同或不同实施方式的一部分的实施方式。

[0102] 将在以下非限制性实施例中更详细地解释本发明。

附图说明

[0103] 图1:ADAMTS13的氨基酸序列;UniProt登录号Q76LX8。

[0104] 图2:在ADAMTS13鉴定的N-连接的聚糖(来源于Verbij et al.2016)。■:GlcNAc;●:甘露糖;○:半乳糖;▲:岩藻糖;◆:唾液酸。

[0105] 图3:显示在间隔区结构域内包含R568、F592、R660、Y661和Y665的残基ADAMTS13外位点-3的ADAMTS13模型。还展示了外位点-3周围的残基L591、R636、L637、K608和M609。

[0106] 图4:通过FRETS-VWF73测定确定的ADAMTS13变体相对于野生型ADAMTS13的活性。

[0107] 图5:在VWF多聚体测定中,野生型ADAMTS13和ADAMTS13变体切割VWF的能力。

[0108] 图6:显示野生型ADATMS13和ADAMTS13变体针对TTP患者自身抗体的反应性的热图。

[0109] 图7:使用FRETS-VWF73测量的,ADAMTS13变体在TTP患者血清存在下的活性。

[0110] 图8:在流动条件下WT-和NGLY3 ADAMTS13的蛋白水解活性。在两个时间点之间手动测量VWF串的长度,并计算其长度的减少。结果表示为与WT-ADAMTS13(左)相比的相对活性,并基于每个变体的VWF串尺寸的减少(右)。在这一测定中,WT-ADAMTS13和NGLY3变体均展示出具有活性。

[0111] 图9A:在所谓的涡流测定(Zhang et al.,2007)中测量,在湍流下ADAMTS13变体针对VWF多聚体的蛋白水解活性。通过高分子量多聚体的降解评估野生型ADAMTS13和ADAMTS13变体对VWF的加工。泳道1、11:仅VWF;泳道2、12:野生型ADAMTS13+EDTA;泳道3、13:野生型ADAMTS13;泳道4:MDCTS结构域ADAMTS13+EDTA;泳道5:MDCTS野生型;泳道6:MDCTS

5xAla+EDTA;泳道7:MDTCS 5xAla;泳道8:ADAMTS13 5xAla+EDTA;泳道9:ADAMTS13 5xAla;泳道10、20:ExpiCHO上清液(无ADAMTS13);泳道14:NGLY3+EDTA;泳道15:NGLY3;泳道16:ADAMTS13 Multi-Ala+EDTA;泳道17:ADAMTS13Multi-Ala;泳道18:NGLY3+MultiAla+EDTA;泳道19:NGLY3+Multi-Ala。MDCTS:截短的ADAMTS13变体(残基1-685)。5xAla对应于R568A/F592A/R660A/Y661A/Y665A。MultiAla对应于L591A/R636A/L637A/L668A。

[0112] 图9B:在所谓的涡流测定(Zhang et al.,2007)中测量,在湍流下ADAMTS13变体针对VWF多聚体的蛋白水解活性。通过高分子量多聚体的降解评估野生型ADAMTS13和ADAMTS13变体对VWF的加工。泳道1、11:仅VWF;泳道2、12:野生型ADAMTS13+EDTA;泳道3、13:野生型ADAMTS13;泳道4:ADAMTS13+AA+EDTA;泳道5:ADAMTS13+AA;泳道6:NGLY3+AA+EDTA;泳道7:NGLY3+AA;泳道8:NGLY7+EDTA;泳道9:NGLY7;泳道10、20:ExpiCHO上清液(无ADAMTS13);泳道14:NGLY3+NGLY7+EDTA;泳道15:NGLY3+NGLY7;泳道16:NGLY8+EDTA;泳道17:NGLY8;泳道18:NGLY3+NGLY8+EDTA;泳道19:NGLY3+NGLY8。AA对应于R568A/Y665A。

[0113] 图10:在10μl患者血清或血浆存在下以FRETS-VWF73作为底物测量的NGLY3变体相对于野生型ADAMTS13(WT)的相对活性。对于四名患者(TTP-007、TTP-041、TTP-042和TTP-076),还评估了添加20μl的情形。将在没有患者血清或血浆的情况下获得的野生型ADAMTS13的活性设定为100%。黑色条显示野生型ADAMTS13在不同患者血浆和血清存在下的反应性;灰色条显示NGLY3变体在患者血浆和血清存在下的活性。

[0114] 图11:在高滴度抑制剂患者中观察到的NGLY3自身抗体抗性。该图选择了抑制野生型ADAMTS13至少50%的患者血清和血浆的子集。描绘了在10μl患者血清或血浆存在下以FRETS-VWF73作为底物测量的NGLY3变体相对于野生型ADAMTS13(WT)的相对活性。将在没有患者血清或血浆的情况下获得的野生型ADAMTS13的活性设定为100%。黑条显示野生型ADAMTS13在不同患者血浆和血清存在下的反应性;灰色条显示NGLY3变体在患者血浆和血清存在下的活性。星号指示与野生型ADAMTS13相比,NGLY3的活性至少高5倍的患者样品。

[0115] 图12:在源自两名高滴度抑制剂患者的血浆中观察到的NGLY3、NGLY7、NGLY3+NGLY6、NGLY8、NGLY3+8的自身抗体抗性。该图选择了抑制野生型ADAMTS13至少95%的两名患者血浆。描绘了在10μl患者血清或血浆存在下以FRETS-VWF73作为底物测量的NGLY3、NGLY7、NGLY3+NGLY7、NGLY8、NGLY3+8变体相对于野生型ADAMTS13(WT)的相对活性。将在没有患者血清或血浆的情况下获得的野生型ADAMTS13的活性设定为100%。

[0116] 图13:在10μl患者血清或血浆存在下以FRETS-VWF73作为底物测量的NGLY3+NGLY7变体相对于野生型ADAMTS13(WT)的相对活性。总计分析了23个患者的样品。将在没有患者血清或血浆的情况下获得的野生型ADAMTS13的活性设定为100%。黑条显示野生型ADAMTS13在不同患者血浆和血清存在下的反应性;灰色条显示NGLY3+NGLY7变体在患者血浆和血清存在下的活性。

[0117] 图14:在具有强效抑制剂的患者样品中观察到的NGLY3、NGLY3+Multi-Ala、NGLY3+AA的自身抗体抗性。描绘了在10μl患者血清或血浆存在下以FRETS-VWF73作为底物测量的NGLY3、NGLY3+Multi-Ala、NGLY3-AA变体相对于野生型ADAMTS13(WT)的相对活性。将在没有患者血清或血浆的情况下获得的野生型ADAMTS13的活性设定为100%。NGLY3+MultiAla对应于NGLY3组合L591A/R636A/L637A/L668A;NGLY3+AA对应于NGLY3组合R568A/Y665A。

[0118] 图15:基于质谱的N-聚糖修饰的ADAMTS13的鉴定。

[0119] 实施例

[0120] 实施例1.ADAMTS13的N-聚糖变体的设计。

[0121] 将在患有免疫TTP(iTTP)的患者中产生的自身抗体频繁地引导至由残基R568、F592、R660、Y661和Y665组成的间隔区结构域中的免疫显性区域(参见图3)。在先前的研究中,我们创建了大量ADAMTS13变体,包括保守(Y↔F)、半保守(Y/F↔L)、非保守(Y/F→N;未添加推定的N-糖基化位点)或丙氨酸(Y/F/R→A)取代。还包括先前的获得功能变体,其中将F568、R592、R660、Y661和Y665全部替换为保守残基(RFRYY→KYKFF)(Graça et al.,2019)。测试了由此产生的一组变体与18名iTTP患者血清中存在的自身抗体的反应性。我们的结果表明,间隔区结构域内的非保守或丙氨酸突变导致自身抗体的结合大大减少,而与非保守变体相比时,自身抗体与包含半保守和保守突变的ADAMTS13间隔区结构域变体的结合受到的影响不那么强烈(Graça et al.,2019)。残基R568、F592、R660、Y661和Y665对于ADAMTS13的最佳VWF切割活性至关重要(Pos et al.,2010;Jian et al.,2012)。与这些数据一致,我们观察到非保守或丙氨酸取代导致活性丧失,而保守和半保守取代倾向于保留更多残留或甚至正常活性。总的来说,我们的结果表明对患者自身抗体结合的抗性和蛋白水解活性之间存在"权衡"。该研究的结果表明,通过系统性替代残基R568、F592、R660、Y661和Y665的组合(特别是对于残基F592、R660和Y661),设计保留了显著蛋白水解活性的自身抗体抗性ADAMTS13变体是不可行的(Graça et al.,2019)。因此,我们采用了一种创新方法,其中残基R568、F592、R660、Y661和Y665本身没有改变,从而允许未折叠的VWF A2结构域与ADAMTS13间隔区结构域中的该区域结合(Pos et al.,2010;Crawley et al.,2011;Ercig et al.,2018a)。基于当前可用的数据,我们构建了一个模型,其显示未折叠的A2结构域的残基E1660-R1668与在间隔区结构域内包含R568、F592、R660、Y661和Y665的ADAMTS13外位点-3的结合(图3)。基于该模型,我们选择了间隔区结构域内ADAMTS13外位点-3内部或周围的许多残基,通过选择性地在间隔区结构域内引入N-聚糖附接的共有位点(NXS或NXT)来插入附加的N-聚糖。基于图3中所示的模型,将N-聚糖插入氨基酸位置568(NGLY1)、591(NGLY2)、608(NGLY3)、609(NGLY4)、636(NGLY5)和637(NGLY6)。表1中列出了在这些位点引入N-聚糖所需的氨基酸取代。

[0122] 表1:实施例1中产生的全长ADAMTS13 NGLY变体的列表。

[0123]

突变	原始序列	突变的序列
NGLY1	567A**REY**V571	567A**NET**V571
NGLY2	590P**LFT**H594	590P**NFT**H594
NGLY3	607G**KMS**I611	607G**NMS**I611
NGLY4	608K**MSI**S612	608K**NST**S612
NGLY5	635D**RLP**R639	635D**NLS**R639
NGLY6	636R**LPR**L640	636R**NAS**L640

[0124] 实施例2:N-聚糖变体的表达和功能表征。

[0125] 采用QMCF技术(描述于欧洲专利EP1851319B1中;www.icosagen.com)在CHO细胞中表达表1所述的N-聚糖变体。将全长野生型ADAMTS13(1427个氨基酸)和含有取代R568A/F592A/R660A/Y661A/Y665A的全长ADAMTS13变体(命名为ADAMTS13-AAAAA)用作对照。将在间隔区结构域外截短的野生型ADAMTS13变体(氨基酸序列1-685)用作附加对照;这个ADAMTS13变体被指定为MDTCS。还提供了附加MDCTS变体用作我们研究的对照,其中存在取代R568A/F592A/R660/Y661A/Y665A;该变体被指定为MDTCS-AAAAA。这些构建体之前已有描述,并且都被克隆到质粒表达载体pQMCF3中(Icosagen Cell Factory OÜ)(Graça et al.,2019)。所有cDNA都含有羧基末端V5表位,其后是6xHis-标签(Graça et al.,2019)。

[0126] 如下构建NGLY变体:Genewiz(Leipzig,Germany)设计和订购了编码其中引入了NGLY取代的残基M509至W688(540bp)的合成DNA片段。合成片段的侧翼为在片段5'端的XmaI位点和在3'端的HindIII。XmaI位点是野生型ADAMTS13 cDNA序列的天然位点。通过在编码Q684(CAG至CAA)和A685(GCC至GCT)的核苷酸序列中进行沉默突变引入HindIII位点,导致从5'-CAGGCCT-3'整体变为5'-CAAGCTT-3'。质粒pUC57_mut1.1是定制的并且通过Genewiz(Leipzig,Germany)获得。在该质粒中,克隆了一个更大的ADAMTS13片段,编码F494至C908(1245bp)并且侧翼为天然位点在5'的PagI和在3'的Esp3I。在pUC57_mut1.1中,通过编码L621的核苷酸序列的沉默突变(CTG至CTC)引入附加的人工XhoI位点,导致从5'-CTGGAG-3'整体变为5'CTCGAG-3'(Graça et al,2019)。首先将编码NGLY1至NGLY6的合成DNA片段(540bp)用于替换pUC57_mut1.1中的相应XmaI-HindIII片段,它们被单独嵌入其中以创建pUC57_NGLY1-6。然后,每个pUC57_NGLY中由天然PagI-Esp3I侧翼的较大1245bp片段用于替换pQMCF3中ADAMTS13的相应野生型片段。随后如先前的描述(Graça et al.,2019),在CHO细胞中表达所得的pQMCF3_ADAMTS13-NGLY1-6变体。转染后10-12天收集上清液,通过离心澄清并储存在-30℃下直至进一步使用。

[0127] 使用先前建立的测定法(Alwan et al.,2017;Graça et al.,2019),通过ELISA量化培养上清液中存在的ADAMTS13水平。针对不同蛋白质测得的ADAMTS13抗原水平范围为约1.0-2.5μg/ml(见表2)并且类似于培养上清液中野生型ADAMTS13的水平。与之前的发现一

致,MDCTS和MDCTS-AAAAA以更高的水平表达(表2)。这些数据表明,由转染的CHO细胞分泌的ADAMTS13-NGLY1-6的水平类似于野生型ADAMTS13。

[0128] 表2-ADAMTS13 NGLY变体和对照的抗原水平

[0129]

变体	抗原水平(μg/mL)
全长ADAMTS13野生型	1.44
全长AAAAA	1.22
MDTCS(野生型)	12.94
MDTCS-AAAAA	10.78
NGLY1	1.83
NGLY2	2.36
NGLY3	2.33
NGLY4	2.21
NGLY5	2.31
NGLY6	1.88

[0130] 我们还测试了不同ADAMTS13-NGLY变体处理指定为FRETS-VWF73的小荧光底物的能力,FRETS-VWF73是VWF A2结构域的最小肽代表,包含Tyr1605-Met1606可断裂键并用于ADAMTS13活性评估(Kokame et al.,2005)。将含有浓度为1.05nM(0.2μg/ml)的ADAMTS13 NGLY变体的稀释培养物上清液用于这些测定。首先在活性缓冲液中稀释ADAMTS13,在100μl体积稀释至2.10nM,该活性缓冲液由20mM HEPES、20mM Bis-Tris、20mM Tris-HCl、25mM $CaCl_2$(pH 6.0)组成并且补充有0.005% Tween20。然后,加入FRETS-VWF73底物(100μl,4μM),进一步稀释ADAMTS13至1.05nM,反应开始。并行的,使用在0.13125-2.10nM浓度范围内稀释的野生型ADAMTS13,以类似的方式绘制校准曲线。对活性水平进行插值(内推),并与最终浓度为1.05nM(设置为100%)的野生型ADAMTS13的活性水平进行比较。该分析的结果如图4所示。在与野生型ADAMTS13相比时,NGLY6显示活性降低。在与野生型ADAMTS13相比时,NGLY5的活性略有降低。在与野生型ADAMTS13相比时,NGLY1、2、3和4的能力相似或更高(图4)。

[0131] 随后,我们基本上如先前所述(Graça et al.,2019),在更具生理性的VWF多聚体测定中测试了ADAMTS13-NGLY1-6变体的活性。在活化缓冲液中在37℃下以0.2μg的浓度将ADAMTS13变体温育30分钟,所述活化缓冲液由20mM Bis-Tris、20mM Tris-HCl、20mM HEPES、25mM $CaCl_2$(pH 7.5)、0.005% Tween20组成并补充有2%牛血清白蛋白组分V(Merck)(ADAMTS13=3.8nM)。并行的,将在HEK293细胞中产生的人类重组VWF以80nM的最终浓度与3M尿素在37℃下温育30分钟。然后将变性的重组VWF多聚体以1比1的比例添加到含有ADAMTS13的混合物中(最终ADAMTS13=1.9nM;最终VWF=40nM)。通过凝胶顶部高分子量(HMW)多聚体的消失和通过凝胶下部较高强度条带看到的切割产物的积累以及卫星条带的出现,在这些条件下切割VWF的能力被可视化。在0分钟和30分钟以及24小时,用4x上样缓冲液(组成:尿素9.6M,4%SDS m/v,Tris-碱0.035M,EDTA 25mM,溴酚蓝7.5μM,无pH调整)收集和淬灭样品,以评估不同ADAMTS13-NGLY1-6变体处理VWF的能力。结果如图5所示。在这些实验条件下,观察到NGLY2和NGLY5的VWF加工活性降低。NGLY3和NGLY4的VWF加工活性与野生型ADAMTS13的加工活性相似(图5)。

[0132] 总体而言，这些结果表明，NGLY2、3、4和5在多聚体和FRETSVWF73测定中均显示出活性。

[0133] 实施例3.来自TPP患者的致病性自身抗体与ADAMTS13 NGLY变体的结合。

[0134] iTTP患者的样品集合中存在的自身抗体的结合。使用先前开发的ELISA来评估一组13个iTTP患者样品的结合(Paul Coppo教授和Agnès Veyradier教授友情提供(Centre de Reference des Microangiopathies Thrombotiques-CNR-MAT,AP-HP,法国巴黎))。先前已经公开了用于评估患者源性自身抗体的协议(Graça et al.,2019)。用100μl浓度为1μg/ml的单克隆抗体3H9(Prof Vanhoorelbeke教授友情提供,KU Leuven,Belgium)包被平板过夜。然后用补充有2％ BSA的磷酸盐缓冲盐水(PBS)封闭平板。然后将板与1.05nmol/孔ADAMTS13(全长ADAMTS13为200ng/孔且MDTCS变体为78.75ng/孔)一起温育。随后，测试100μl每个患者样品的不同稀释液与每个ADAMTS13变体的反应性。接下来，温育100μl针对人类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的单克隆抗体库，每种与辣根过氧化物酶结合并按1:10 000稀释(Sanquin,荷兰)，基本上如先前所述(Graça et al.,2019)温育以评估患者IgG与固定化的ADAMTS13变体的结合。用于不同患者样品的稀释范围从30x至400x，取决于患者样品中存在的抗-ADAMTS13抗体的数量和亲和力。调整患者样品的稀释度以满足在450nm下的最佳目标光密度(使用540nm作为参考)为1.6。为了校正潜在的测定批间变异，如先前所述在所有实验中包括人类单克隆抗-ADAMTS13抗体II-1的稀释曲线用于数据插值(Graça et al.,2019)。将每个患者样品中自身抗体与ADAMTS13 NGLY变体的反应性与观察到的与野生型ADAMTS13的反应性进行比较。患者自身抗体的结合表示为患者自身抗体与野生型ADAMTS13结合的百分比。该分析的结果如图6所示。参考设置为100％的与野生型ADAMTS13的反应性，将患者样品中存在的自身抗体的反应性表示为热图。我们还确定了不同患者样品与截短的MDTCS变体的反应性。与野生型ADAMTS13相比，在13个样品中的3个(TTP-049、TTP-080和TTP-085)观察到较低的信号。这些数据表明，这些样品中还存在针对近端TSP2-8和CUB1/2结构域的抗体。如绿色代码所示，观察到与ADAMTS13-AAAAA的反应性大大降低。13个患者样品中有10个中存在的自身抗体不与ADAMTS13-AAAAA结合。对于TTP-049、TTP-080和TTP-085，仍然观察到与ADAMTS13-AAAAA的残留结合。13名患者中有9名，患者样品中自身抗体对MDTCS-AAAAA的反应性大幅降低。在4个患者样品(TTP-017、TTP-042、TTP-079和TTP-080)中，仍然观察到与MDTCS的残留结合(图6;泳道MDTCS AAAAA)。总的来说，这些发现表明，在本项研究中包括的大多数患者样品中，自身抗体靶向间隔区结构域内由R568、F592、R660、Y661和Y665组成的免疫显性表位的残基。随后，我们解决了我们的患者抗体组中存在的自身抗体与ADAMTS13 NGLY1-6的反应性(图6)。观察到NGLY1、NGLY2和NGLY5的结合略有减少。观察到NGLY4和NGLY6的结合更明显的减少。有趣的是，13名患者中有11名，自身抗体与NGLY3的结合显著减少。患者样品TTP-079和TTP-085中存在的自身抗体仍然与NLGY3反应强烈;这最可能是由于在ADAMTS13的间隔区结构域外存在自身抗体结合。大多数源自患者的自身抗体与NGLY3缺乏反应性表明，在氨基酸位置608处引入N-连接的聚糖会消除自身抗体与ADAMTS13间隔区结构域中免疫显性B细胞表位的结合。

[0135] 实施例4:在来自iTTP患者的致病性自身抗体存在下，ADAMTS13的N-聚糖变体保留了活性。

[0136] 在实施例2中，我们证明了NGLY2、NGLY3、NGLY4和NGLY5能够蛋白水解处理VWF多聚体以及小肽底物FRETS-VWF73。在实施例3中，我们证明了iTTP患者样品中存在的致病性自身抗体对NGLY3的识别不佳。这促使我们评估NGLY3在iTTP患者的血浆样品存在下是否仍然能够处理FRETS-VWF73。为了测试这一点，我们基于图7中显示的数据选择了两个患者样品：样品TTP-008，其显示与NGLY3的反应有限；和样品TTP-085，其仍然显示出与NGLY3的98％反应性(可能是由于针对ADAMTS13的羧基末端TSP2-8和/或CUB1/2结构域的自身抗体)。为了测试NGLY3在这些自身抗体存在下是否保留活性，我们使用FRETS-VWF73测定如实施例2中所述评估了活性，并且在添加FRETS-VWF73底物之前，在10μl患者样品或PBS存在下在37℃下将每种ADAMTS13变体(2.10nM)温育30分钟。最终体积为210μl，其中10μl属于添加的患者血浆或PBS(用于对照)。将在没有患者样品的情况下温育的野生型ADAMTS13 1.05nM的活性水平设定为100％。这些实验的结果如图7所示。将野生型ADAMTS13与样品TTP-008一起温育导致活性降低～50％。将野生型ADAMTS13与样品TTP-085一起温育导致活性降低～75％。这些结果表明，样品TTP-008和TTP-085中存在的自身抗体可以抑制ADAMTS13的加工活性。接下来，我们评估了这些样品是否也能抑制NGLY3变体的活性。对于两者，与TTP-008和TTP-085一起温育导致活性从125％下降到～75％(图7)。

[0137] 我们进一步分析了NGLY3在不同流速或剪切率测定中处理VWF的能力。首先，我们评估了NGLY3在内皮细胞表面上在流动下处理VWF串的能力。在接种前，使内皮细胞在包被有1％明胶的Ibidiμ-Slide VI通道中生长。接种HUVEC(Promocell，第3代)，每个通道50,000个细胞。用具有补充混合物(2％v/v)(Promocell)和青霉素/链霉素(1％v/v)(Sigma)的EGM-18培养基(Promocell)，每天更新两次通道培养基。在汇合的第四天进行测量。使用2mL/min的流速进行流动实验，这对应于约2.5达因/cm^2的剪切应力。测量前，使用补充有0.2％ BSA的M199培养基(Gibco)使细胞饥饿5分钟。随后，在补充有0.2％ BSA的M199培养基中，用100μM组胺刺激细胞10分钟。接下来，使用标有AlexaFluor-488的抗-VWF多克隆抗体(DAKO)，以1:2000的稀释度对VWF串染色5分钟。在补充有0.2％ BSA的M199培养基中，将ADAMTS13变体稀释至终浓度0.1μg/mL。使含有ADAMTS13的培养基流过细胞10分钟，在此期间，使用Zeiss Axio Observer Z1显微镜以10秒间隔对3个不同位置进行成像。使用ImageJ分析每个位置的第一张和最后一张图像。手动测量每个VWF串的长度，并使用ADAMTS13温育前后总长度之间的差异来确定蛋白质的活性。对于对照，我们使用与不产生任何ADAMTS13的ExpiCHO细胞接触的培养基(图8)。

[0138] 我们还采用所谓的涡流测定(Zhang et al.,2007)确定了在湍流下NGLY3处理VWF多聚体的能力。在反应缓冲液中，在3000rpm的湍流下将40nM VWF与1.0ug/ml recADAMTS13一起温育30分钟，导致样品中高分子量多聚体损失(图9A:泳道3、13)，所述反应缓冲液由25mM $CaCl_2$、20mM Bis-Tris、20mM HEPES、20mM Tris-HCl、Tween20 0.005％v/v，pH 7.5组成(最终反应体积＝200μL)。添加50mM EDTA防止了野生型ADAMTS13对高分子量多聚体的切割(图9A;泳道2、128)。我们随后使用这种基于涡流的测定法测试了在湍流下NGLY3处理VWF多聚体的能力。类似于野生型ADAMTS13，NGLY3能够在湍流下有效地处理VWF多聚体(图9A:泳道15)。添加50mM EDTA后，NGLY3对VWF多聚体的处理受损，与野生型ADAMTS13类似(图9A:泳道14)。总的来说，这些结果表明，NGLY3在不同条件下切割VWF底物的能力与野生型ADAMTS13的能力相同。

[0139] 这些结果表明,在针对ADAMTS13的自身抗体存在下,NGLY3变体保留了显著的蛋白水解活性。

[0140] 接下来,我们针对28名患者的血浆的扩展组测试了NGLY3变体(图10)。总体而言,在所分析的28个患者样品中的18个中,NGLY3变体更为活跃。在有限数量的含有低滴度抑制剂的患者样品中,在与野生型ADAMTS13相比时,NGLY3的活性似乎略高。在8个患者样品中,观察到的NGLY3抑制水平与野生型ADAMTS13观察到的抑制水平相似。在这些患者样品中的2个中,存在有利于NGLY3的微小但明显显著的差异。重要的是,当与野生型ADAMTS13相比时,NGLY3变体总是更有效或同样有效。

[0141] 我们对含有高滴度抑制剂的血浆样品进行了亚组分析。高滴度抑制剂被定义为对野生型ADAMTS13产生至少50%抑制的抑制剂水平(图11)。与野生型ADAMTS13相比,在17名患者中选择了13名中,NGLY3变体更优异。与野生型ADAMTS13相比,NGLY3变体在4名患者中的效果相似。值得注意的是,在17名患者中的7名中,在与野生型ADAMTS13相比时,NGLY3变体的效率似乎高出5倍(图11;用星号指示样品)。

[0142] 这些观察结果表明,当与野生型ADAMTS13的给药(重组形式,或纯化形式的或作为通过血浆交换给药的血浆源性ADAMTS13)相比时,“聚糖屏蔽的”ADAMTS13变体的治疗性给药可以包含用于治疗iTTP患者的更有效的治疗选项。

[0143] 实施例5:N-聚糖变体扩展组的自身抗体抗性。

[0144] 从图6中显示的热图可以明显看出,在实施例3中,NGLY3与患者自身抗体的反应较少。此外,如图7和实施例4所示,NGLY3在自身抗体存在下保留了蛋白水解活性。在本实施例中,我们展示了附加的NGLY变体,其中插入在N667处的天然N-聚糖移位至Y665(产生NGLY7)或L668(产生NGLY8)。一种或多种N-聚糖变体的组合可能更有效。因此,我们设计了NGLY3和NGLY7的组合以及NGLY3和NGLY8的组合(见表3)。以与实施例1中概述的类似方式构建这些变体。

[0145] N-聚糖屏蔽的ADAMTS13变体含有至少一个新引入或移位的N-聚糖,其也可以与减少致病性自身抗体结合的单个氨基酸取代相结合。因此,我们的目标是制得NGLY3与丙氨酸突变(主要在外位点-3之外)和外位点-3附近的其它NGLY修饰的附加组合(表3)。由于该区域内缺乏其它潜在的N-糖基化序列子(序列段),我们正在寻求将ADAMTS13 1-2残基的间隔区结构域中天然存在的N-聚糖向任一方向(N-或C-末端)移位的策略,即N667处存在的聚糖。

[0146] 表3.具有附加突变的ADAMTS13 NGLY3变体

[0147]

突变	原始序列	突变的序列
NGLY3	607GKMSI611	607GNMSI611
NGLY7 (聚糖从 N667 移位至 Y665)	664EYGNLT669	664ENVTLT669
NGLY8 (聚糖从 N667 移位至 L668)	667NLTRP671	667LNVTA671
NGLY3 + NGLY7	607GKMSI611 / 664EYGNLT669	607GNMSI611 / 664ENVTLT669
NGLY3 + NGLY8	607GKMSI611 /667NLTRP671	607GNMSI611 / 667LNVTA671
NGLY3 加 L591A/R636A/L637A/ L668A	607GKMSI611 加 L591、R636、L637、L668	607GNMSI611加 591A、636A、637A、668A
NGLY3 + R568A/Y665A	607GKMSI611 加 R568、Y665	607GNMSI611 加 568A、 665A
NGLY3 + R568A/Y665A + L591A/R636A/L637A/ L668A	607GKMSI611 R568、L591、 R636、L637、Y665、L668	607GNMSI611 加 568A、 591A、636A、637A、 665A、668A

[0148] 这些变体如实施例1所示设计。Genewiz(Leipzig,德国)设计和定购了编码残基M509至W688(540bp)的合成DNA片段,其中引入了新型NGLY变体。合成片段的侧翼为在片段5'端的XmaI位点和在3'端的HindIII位点。首先将合成的DNA克隆到质粒pUC57_mut1.1的XmaI-HindIII位点(见实施例I),嵌入在由PagI-Esp3I侧翼的较大片段中。然后使用该较大的片段代替pcDNA3.1ADAMTS13中存在的野生型ADAMTS13中的相应片段。

[0149] 根据制造商(Thermo Fisher Scientific)的说明,在Expi-CHO细胞中表达所得的NGLY-变体。转染4天后收集上清液,通过离心澄清,补充10mM苯甲脒并储存在-30℃下直至进一步使用。

[0150] 使用先前建立的测定(Alwan et al.,2017;GraÇa et al.,2019),通过ELISA定量培养上清液中存在的ADAMTS13水平。ADAMTS13抗原水平为1.43至5.27μg/ml(见表4)。

[0151] 随后,我们采用FRETS-VWF73荧光底物,测量了新型NGLY变体的活性(表4)。当与野生型相比时,NGLY7的活性为125%,当与野生型ADAMTS13相比时,NGLY8的活性为75%;当与野生型相比时,NGLY3加NGLY7的活性为125%;当与野生型ADAMTS13相比时,NGLY3加NGLY8的活性为75%。当与野生型相比时,R568A/Y665A的活性为120%;当与野生型相比时,L591A/R636A/L637A/L668A的活性为90%。当与野生型相比时,NGLY3加R568A/Y665A的活性为120%,当与野生型ADAMTS13相比时,NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A的活性为95%,当与野生型ADAMTS13相比时,NGLY3加R568A/Y665A加L591A/R636A/L637A/L668A的活性为40%。

[0152] 总的来说,这些结果表明,NGLY3和NGLY7的组合、NGLY3和NGLY8的组合以及NGLY7和NGLY8的组合保留了转化FRETS-VWF73底物的能力。NGLY3与R568A/Y665A和/或L591A/R636A/L637A/L668A的组合也保留了它们转化FRETS-VWF73底物的能力。

[0153] 我们还使用涡流测定法评估了新变体在剪切应力下处理VWF多聚体的能力。在这些条件下,NGLY3完全活跃;NGLY7也明显能够处理大VWF多聚体(图9B)。与NGLY3和NGLY7相比,NGLY8显示出处理VWF多聚体的能力降低(图9B)。NGLY3/NGLY8的组合也表现出在这些实验条件下处理VWF多聚体的能力降低,而NGLY3/NGLY7的组合保留了针对多聚VWF的蛋白水解活性(图9B)。采用这些条件,NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A的组合以及NGLY3加R568A/Y665A的组合有效地处理了VWF多聚体(图9A)。与这些观察结果一致,当与野生型ADAMTS13相比时,R568A/Y665A和L591A/R636A/L637A/L668A变体的蛋白水解活性也降低(图9A)。

[0154] 我们还采用变性条件评估了新变体处理VWF多聚体的能力。在这些条件下,NGLY3完全活跃,而NGLY7和NGLY8也显示出降低的活性(表4)。NGLY3/NGLY7的组合以及NGLY3/NGLY8的组合也显示在这些实验条件下处理VWF多聚体的能力降低。采用这些特定条件,NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A的组合以及NGLY3加R568A/Y665A的组合在处理VWF多聚体时的效率也较低(表4)。

[0155] 表4-ADAMTS13 NGLY变体和对照的抗原水平和活性

[0156]

变体	抗原水平(μg/ml)	活性水平(相对于野生型ADAMTS13的%)VWFFRETS73	在变性条件下处理VWF多聚体的能力
全长ADAMTS13野生型	5.27	100	++++++
NGLY3	4.60	125	++++++

[0157]

NGLY7	3.45	125	+++++
NGLY8	1.43	76	++
NGLY3加NGLY7	4.26	135	+++++
NGLY3加NGLY8	2.49	120	++
NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A	4.42	95	++
NGLY3加R568A/Y665A	4.36	120	++
NGLY3加R568A/Y665A加L591A/R636A/L637A/L668A	2.32	40	未测试
L591A/R636A/L637A/L668A	4.77	90	++
R568A/Y665A	3.78	120	++

[0158] 接下来,我们评估了新设计的ADAMTS13变体是否能够中和产生或源自免疫TTP患者的致病性自身抗体。

[0159] 首先,我们在两个具有高滴度抑制剂的患者样品上,评估了NGLY7、NGLY8以及NGLY3加NGLY7的组合和NGLY3加NGLY8的组合(图12)的抗体抗性特性。NGLY7和NGLY8被患者自身抗体抑制,其方式与患者血浆中存在的自身抗体对野生型ADAMTS13观察到的抑制方式类似。与野生型ADAMTS13相比,NGLY3仅在有限程度上受到抑制。与单独的NGLY3相比,NGLY3和NGLY7的组合更具自身抗体抗性。与NGLY3本身相比,NGLY3和NGLY8的组合同样具有抗性。随后,我们在23个患者样品上测试了NGLY3和NGLY7的组合(图13)。NGLY3和NGLY7的组合在大量患者样品中显示出自身抗体抗性(图13)。

[0160] 随后,我们测试了NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A的组合和NGLY3加R568A/

Y665A的组合在患者样品中的自身抗体抗性效率。与野生型ADAMTS13相比，在8个样品中的8个中，NGLY3加R568A/Y665A保留了略多的活性(图14)。与单独的NGLY3相比，NGLY3加R568A/Y665A的活性水平略高，表明了在ADAMTS13中包含附加Ala-取代具有附加益处。还评估了NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A的组合的自身抗体抗性。与野生型ADAMTS13相比，在测试的8个患者样品中的8个中，NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A保留了显著更高的活性(图14)。NGLY3加L591A/R636A/L637A/L668A在患者血浆或血清存在下的活性水平与NGLY3相似。这些发现表明，通过丙氨酸替代这些特定氨基酸对自身抗体抗性的影响有限。

[0161] 实施例6.ADAMTS13的进一步N-聚糖变体。

[0162] 前面的实施例集中在间隔区结构域，其含有用于在免疫TTP患者中产生的致病性自身抗体的一个主要结合位点。众所周知，自身抗体还可以靶向ADAMTS13上的其它结构域(Klaus et al.,2004;Thomas et al.,2015;Pos et al.,2011)。类似于实施例1-4中描述的方法，可以设计N-聚糖屏蔽的ADAMTS13变体，其防止靶向金属蛋白酶、去整合素结构域、TSP-1重复、富含Cys的结构域、间隔区结构域中R568、F592、R660、Y661和R665外部的表位、TSP2-8重复CUB1/2结构域5中存在的抗体结合位点的自身抗体的结合。此外，NGLY3和/或其它N-聚糖屏蔽的ADAMTS13变体可以与上述结构域中的单个或多个氨基酸取代组合，从而导致减少自身抗体结合，同时保留至少部分蛋白水解活性。

[0163] 使用ADAMTS13的3D结构来选择ADAMTS13的表面残基，从而选择潜在的N-糖基化位点。将ADAMTS13晶体结构(PDB:6qig)用于下列结构域:金属蛋白酶、去整合素样结构域、血小板反应蛋白1型重复1(TSP1-1)、富含半胱氨酸的结构域和间隔区结构域。如先前所述(Ercig et al.,2018b)，从TSP1-2到CUB2结构域的同源建模构建结构的其余部分。使用SwissPDB Viewer来研究ADAMTS13的3D结构，从而手动选择表面残基。

[0164] 表5:ADAMTS13上允许插入或移位N-聚糖以防止致病性自身抗体结合的暴露区域。粗体残基是ADAMTS13的(部分)天然糖基化位点。已显示粗体和下划线残基含有O-聚糖。以粗体和斜体表示的残基被Ser(S)残基的O-岩藻糖基化或Trp(W)残基的C-甘露糖基化修饰。

[0165]

编号	结构域	氨基酸序列	残基的编号(如图1所示)
1	金属蛋白酶(80-286)	DVFQAHQEDTER	91-102
2	金属蛋白酶(80-286)	ELLRDPSLGAQFR	113-125
3	金属蛋白酶(80-286)	KMVILTEPEGAPNITANLTSSLL	130-152
4	金属蛋白酶(80-286)	QTINPEDDTDP	159-169
5	金属蛋白酶(80-286)	RFDLELPDGNRQ	180-191
6	金属蛋白酶(80-286)	QLGGACSPTW	197-206
7	金属蛋白酶(80-286)	EHDGAPGSGCGPS	233-245
8	金属蛋白酶(80-286)	SDGAAPRAGL	251-260
9	金属蛋白酶(80-286)/去整合素样结构域(287-383)	PCSRRQLLSLLSAGRARCVWDPPRPQPGSAGHPPDAQ	264-300
10	去整合素样结构域(287-383)	RVAFGPKAVACTFAREHLDMCQ	312-333
11	去整合素样结构域(287-383)	TDPLDQSSCSRLL	339-351
12	去整合素样结构域(287-383)	DGTECGVEK	356-364
13	去整合素样结构域(287-383) / 去整合素样结构域和TSP 1型1之间的区域 (383-394) / TSP 1型1 (394-439)	KGRCRSLVELTPIAAVHGRWSSWGPRSPCSRS	368-399
14	TSP 1型1 (384-439)	RRRQ	407-410
15	TSP 1型1 (384-439)	GGRACVGADLQAE	419-431
16	TSP 1型1 (384-439) / 富含半胱氨酸的 (440-556)	NTQACEKTQLE	434-444
17	富含半胱氨酸的(440-556)	QQCARTDGQPLRSSPGGA	448-465
18	富含半胱氨酸的(440-556)	FYHWGAAVPHSQGDALCR	467-484
19	富含半胱氨酸的(440-556)	RAIGESFIMKRGDSFL	488-502

[0166]

20	富含半胱氨酸的(440-556)	SGPRE	511-515
21	富含半胱氨酸的(440-556)	SGSCR	524-528
22	富含半胱氨酸的(440-556)	DGRMDSQQVWDR	533-544
23	富含半胱氨酸的(440-556) / 间隔区(556-685)	VCGGD**NST**CSPRKGSFTAGRARE	547-569
24	间隔区(556-685)	TFLTVTP**N**	572-579
25	间隔区(556-685)	YIANHRPLF	584-592
26	间隔区(556-685)	GGRYVVAGKMSISP**N**	600-614
27	间隔区(556-685)	YPSLLED	617-623
28	间隔区(556-685)	RVALTEDRLPR	629-639
29	间隔区(556-685)	RIWGPLQED	644-652
30	间隔区(556-685)	RRYGEEYG**NLT**R	659-670
31	间隔区(556-685)	TFTYFQPK	674-681
32	TSP 1型2 (682-730)	PRQAWVWAAVRGPCS	682-696
33	TSP 1型2 (682-730) / TSP 1型2和TSP 1型3之间的区域(730-742)	AGLRWV**NYS**CLDQARKELVE	701-720
34	TSP 1型2 (682-730) / TSP 1型2和TSP 1型3之间的区域(730-742)	QGSQQPPAWPEACVLEP	725-741
35	TSP 1型3 (742-805)	PPYWAVGDFGPCSA***S***CG	743-759
36	TSP 1型3 (742-805)	LRERPVRCVEAQGSLL	762-777
37	TSP 1型3 (742-805) / TSP 1型3和TSP 1型4之间的区域(806-807)	PPARCRAGAQQPAVALETCNPQPCPAR	781-807
38	TSP 1型4 (808-859)	WEVSEPSSCTSAGGAGL	808-824
39	TSP 1型4 (808-859)	**NET**CVP	828-833
40	TSP 1型4 (808-859)	LEAPVTEGPGSVDEK	838-852
41	TSP 1型4 (808-859) / TSP 1型4和TSP 1型5之间的区域(859-896)	APEPCVGM**S**CPPG	855-867
42	TSP 1型4和TSP 1型5之间的区域(859-896)	LDATSAGEKAP	871-881
43	TSP 1型4 和TSP 1型5之间的区域(859-896) / TSP 1型5(896-950)	SP***W***GSIRTGAQAAHVW	882-897
44	TSP 1型5 (896-950)	V***S***CGR	906-910
45	TSP 1型5 (896-950)	ELRFLCMDSALRVPVQEELCGL	915-936
46	TSP 1型5 (896-950 / TSP type1 6(951-1011)	KPGSRRECPARWQYKLAACSV***S***CGR	939-968
47	TSP 1型6 (951-1011)	RRILYCARAHGED	972-984
48	TSP 1型6 (951-1011)	EEILLDTQCQGLPRPEPQEAC**S**LEP	987-1011
49	TSP 1型7 (1012-1068)	CPPR***W***	1012-1016
50	TSP 1型7 (1012-1068)	PCSA***S***CGLGTAR	1023-1034
51	TSP 1型7 (1012-1068)	VQLDQGQDVEVDEAA	1040-1054
52	TSP 1型7 (1012-1068) / TSP 1	LVRPEASVPCLIAD	1058-1071

[0167]

	型7和TSP 1型8之间的区域(1069-1071)		
53	TSP 1型8 (1071-1131)	RWHVGTWMECSV*S*CGD	1075-1090
54	TSP 1型8 (1071-1131)	T	1098
55	TSP 1型8 (1071-1131)	AQAPVPADFCQHLP	1104-1117
56	TSP 1型8 (1071-1131) / TSP 1型8和CUB1结构域之间的区域(1132-1191)	RGCWAGPCVGQGTPSLVPHEEAAAPGR	1123-1149
57	TSP 1型8和CUB1结构域之间的区域(1132-1191)	PAGASLEW	1154-1161
58	TSP 1型8和CUB1结构域之间的区域(1132-1191)	RGLLFSPAPQPRRLLPGPQENS	1165-1186
59	CUB1 (1192-1298)	CGRQHLEPTGT	1192-1202
60	CUB1 (1192-1298)	DMRGPGQAD	1204-1212
61	CUB1 (1192-1298)	GRPLGE	1218-1223
62	CUB1 (1192-1298)	PGQAD	1208-1212
63	CUB1 (1192-1298)	PLG	1220-1222
64	CUB1 (1192-1298)	R	1228
65	CUB1 (1192-1298)	SSL**NCS**AGDMLLLWGRL	12332-1248
66	CUB1 (1192-1298)	**NCS**AGDMLL	1235-1243
67	CUB1 (1192-1298)	WGRLTWRKMCRKLLDM	1245-1260
68	CUB1 (1192-1298)	WRKMCRKLLDM	1250-1260
69	CUB1 (1192-1298)	TFSSKTNT	1261-1268
70	CUB1 (1192-1298)	KTNT	1265-1268
71	CUB1 (1192-1298)	RQRSGRPGGGV	1272-1282
72	CUB1 (1192-1298)	RCGRPG	1274-1279
73	CUB1 (1192-1298)	RYGSQLAPETFYRE	1285-1298
74	CUB1 (1192-1298)	QLAPETFYRE	1289-1298
75	CUB2 (1299-1427)	DMQLFGPWG	1300-1308
76	CUB2 (1299-1427)	DMQLFGPWGEIVSPSLSPATSNA	1300-1322
77	CUB2 (1299-1427)	SPSLSPATSNAGG	1312-1324
78	CUB2 (1299-1427)	RLFINVAPHARI	1326-1337
79	CUB2 (1299-1427)	APHAR	1332-1336
80	CUB2 (1299-1427)	LA	1342-1343
81	CUB2 (1299-1427)	TNMGAGTEGANASYIL	1344-1359
82	CUB2 (1299-1427)	AGTEGA**N**	1348-1354
83	CUB2 (1299-1427)	IRDTHSLRT	1360-1368
84	CUB2 (1299-1427)	RDTHSLRTTAF	1361-1371
85	CUB2 (1299-1427)	QQVLYWESESSQ	1374-1385
86	CUB2 (1299-1427)	WESESSQAE	1379-1387
87	CUB2 (1299-1427)	EFSEGFLKAQAS	1389-1400
88	CUB2 (1299-1427)	SEGFLKAQASLRGQY	1391-1405
89	CUB2 (1299-1427)	LQSWVPEMQDPQSWKGKEGT	1408-1427

[0168] 实施例7.基于质谱的N-聚糖修饰的ADAMTS13的鉴定。

[0169] 在本实施例中,我们采用质谱法为ADAMTS13中新工程化的共有位点的成功N-糖基化提供原理证明。我们为此分析选择了NGLY3变体。如前面实施例中所述,NGLY3中的K608被N608替换,从而引入了用于添加N-聚糖的共有位点(参见图15)。我们还包括一个变体,其中K608被丙氨酸替换(K608A)。这不会引入N-糖基化的共有位点(图15)。如前面的实施例所

述，在CHO细胞中表达NGLY3、K608A和野生型ADAMTS13。使用与磁性Dynabeads偶联的小鼠抗-V5抗体通过免疫沉淀纯化这三种ADAMTS13变体中的每一种。在质谱分析之前，使这些突变体经受PNGaseF消化(或不，作为对照)，然后在珠子上进行胰蛋白酶消化。如果N-聚糖附接到该残基，则PNGaseF处理会导致天冬酰胺脱酰胺基化。对于质谱分析之前ADAMTS13的胰蛋白酶消化，我们使用在赖氨酸和精氨酸后切割的胰蛋白酶。

[0170] 首先，我们分析了在对野生型ADAMTS13进行质谱分析后检索到了哪些肽序列。胰蛋白酶消化的纯化野生型ADAMTS13的总体覆盖率为66％。图15中仅显示了对应于氨基酸序列599-629的肽。在野生型ADAMTS13的胰蛋白酶消化后，鉴定出对应于I599-K608的肽(肽1)。未鉴定包括M609至R629的肽(肽2)，因为N614处存在异质聚糖妨碍了该肽的基于质量的鉴定。随后，我们用PGNaseF处理野生型ADAMTS13。PNGaseF处理去除了N-聚糖，并且附加地导致天冬酰胺脱酰胺基化，导致质量增加1道尔顿。对PGNaseF处理的ADAMTS13的分析允许鉴别肽I599-K608以及肽M609-R629。由于N614的脱酰胺基化，肽M609-R629的质量增加了1道尔顿。这些观察结果表明，肽M609-R629含有插入在位置N614的N-聚糖(图15中由方框所示)。这与先前在N614处鉴定的N-聚糖一致(参见图2)。

[0171] 接下来，我们以类似的方式分析了NGLY3。在胰蛋白酶消化后，没有回收对应于区域I599-R629的肽。这一观察表明，在NGLY3的这一部分中可能存在一个或多个N-聚糖。在用PGNaseF处理后，鉴定出一种肽Y603-R629(肽3:图15)；发现N608和N614是脱酰胺基化的，这与在N608和N614处存在的N-聚糖一致。由于NGLY3中的K608被N取代，该变体不能再被胰蛋白酶在氨基酸位置608处切割(图15中由方框指示)。综合这些结果表明，由于N608替换了K608，在氨基酸位置608处已成功引入N-聚糖。

[0172] 作为附加对照，我们分析了其中K608在该位置被丙氨酸替换的ADAMTS13变体。在没有PGNaseF处理的情况下，未观察到对应于该区域的胰蛋白酶切割肽的鉴定，这与该区域中存在N-连接的聚糖一致。在用PGNaseF消化后，鉴定出单个Y603-R629肽，其在位置614处含有脱酰胺基化的N(图15中由方框指示)。该分析表明，A608不包含附接到A608的N-连接的聚糖；对于该变体，仅鉴定到通常存在于N614处的N-聚糖。

[0173] 总的来说，本提案中概述的方法表明，在NGLY3的氨基酸位置608处引入用于添加N-聚糖的共有位点会导致在该位置附接N-聚糖。类似地，使用本实施例中概述的协议可以成功地确定NGLY1、2、4、5、6、7、8和其它聚糖修饰的ADAMTS13变体(包括实施例7中列出的那些变体)中存在的其它N-连接的聚糖。

[0174] 参考文献

[0175] • Austin SK,Starke RD,Lawrie AS,Cohen H,Machin SJ,Mackie IJ.The VWF/ADAMTS13 axis in the antiphospholipid syndrome:ADAMTS13 antibodies and ADAMTS13 dysfunction.Br J Haematol.2008 May;141(4):536-44.doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07074.x.

[0176] • Bitsadze V,Bouvier S,Khizroeva J,Cochery-NouvellonÉ,MercierÉ,Perez-Martin A,Makatsariya A,Gris JC.Early ADAMTS13 testing associates with pre-eclampsia occurrence in antiphospholipid syndrome.Thromb Res.2021Apr 27;203:101-109.doi:10.1016/j.thromres.2021.04.021.

[0177] • Burbelo PD1,O'Hanlon TP.New autoantibody detection technologies

yield novel insights into autoimmune disease.Curr Opin Rheumatol.2014 Nov;26(6):717-23.

[0178] • Casina VC,Hu W,Mao J-H,et al.High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome.Proc.Natl.Acad.Sci.2015;112(31):9620-9625.

[0179] • Chauhan AK,Motto DG,Lamb CB,Bergmeier W,Dockal M,Plaimauer B,Scheiflinger F,Ginsburg D,Wagner DD.Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13.J Exp Med.2006Mar 20;203(3):767-76.doi:10.1084/jem.20051732.

[0180] • Chen X,Cheng X,Zhang S,Wu D.ADAMTS13:An Emerging Target in Stroke Therapy.Front Neurol.2019Jul 17;10:772.doi:10.3389/fneur.2019.00772.

[0181] • Crawley JT,de Groot R,Xiang Y,Luken BM,Lane DA.Unraveling the scissile bond:how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor.Blood.2011Sep 22;118(12):3212-21.

[0182] • De Groot R,Lane DA,Crawley JTB.The Role of the ADAMTS13 Cysteine-Rich Domain in VWF Binding and Proteolysis.Blood 2015;125(12):1968-75.

[0183] • Ercig B,Wichapong K,Reutelingsperger CPM,Vanhoorelbeke K,Voorberg J,Nicolaes GAF.Insights into 3D Structure of ADAMTS13:A Stepping Stone towards Novel Therapeutic Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.Thromb Haemost.2018a Jan;118(1):28-41.

[0184] • Ercig B,Wichapong K,Reutelingsperger CPM,Vanhoorelbeke K,Voorberg J,Nicolaes GAF.Insights into 3D Structure of ADAMTS13:A Stepping Stone towards Novel Therapeutic Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.Thromb Haemost.2018Jan;118(1):28-41.

[0185] • Graça AG N,Ercig B,Velasquez Pereira LC,et al.Modifying ADAMTS13 to modulate binding of pathogenic autoantibodies of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.2019;Haematologica.2019Nov 21.pii:haematol.2019.226068.doi:10.3324/haematol.2019.226068.[印刷前电子公布]

[0186] • Hie M1,Gay J,Galicier L,ProvôtF,Presne C,Poullin P,Bonmarchand G,Wynckel A,Benhamou Y,Vanhille P,Servais A,Bordessoule D,Coindre JP,Hamidou M,Vernant JP,Veyradier A,Coppo P.Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.Blood.2014Jul 10;124(2):204-10.

[0187] • Jian C,Xiao J,Gong L,et al.Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.Blood.2012;119(16):3836-3843.

[0188] • Kelwick R,Desanlis I,Wheeler GN,Edwards DR.The ADAMTS(A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs)family.Genome Biol.2015May 30;16:113.

[0189] • Klaus C,Plaimauer B,Studt JD,Dorner F,Lämmle B,Mannucci PM,

Scheiflinger F.Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.Blood.2004Jun 15;103(12):4514-9.

[0190] •Kokame K,Nobe Y,Kokubo Y,Okayama A,Miyata T.FRETS-VWF73,a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay.Br J Haematol.2005Apr;129(1):93-100.

[0191] •Leem J,Dunbar J,Georges G,Shi J,Deane CM.ABodyBuilder:Automated antibody structure prediction with data-driven accuracy estimation.MAbs.2016;8(7):1259-1268.

[0192] •Levi M,Scully M,Singer M.The role of ADAMTS-13in the coagulopathy of sepsis.J Thromb Haemost.2018Apr;16(4):646-651.doi:10.1111/jth.13953.

[0193] •De Maeyer B,De Meyer SF,Feys HB,Pareyn I,Vandeputte N,Deckmyn H,Vanhoorelbeke K.The distal carboxyterminal domains of murine ADAMTS13 influence proteolysis of platelet-decorated VWF strings in vivo.J Thromb Haemost.2010Oct;8(10):2305-12.

[0194] •Mazepa MA,Masias C,Chaturvedi S.How targeted therapy disrupts the treatment paradigm for acquired TTP:the risks,benefits,and unknowns.Blood.2019 Aug 1;134(5):415-420.

[0195] •Miller BR,McGee TD,Swails JM,et al.MMPBSA.py:An efficient program for end-state free energy calculations.J.Chem.Theory Comput.2012;8(9):3314-3321.

[0196] •Pos W,Luken BM,Kremer Hovinga JA,et al.VH1-69 germline encoded antibodies directed towards ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.J.Thromb.Haemost.2009;7(3):421-428.

[0197] •Pos W,Crawley JTB,Fijnheer R,et al.An autoantibody epitope comprising residues R660,Y661,and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF.Blood.2010;115(8):1640-1649.

[0198] •Pos W,Sorvillo N,Fijnheer R,et al.Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-Adamts13 antibodies in the spacer domain.Haematologica.2011;96(11):1670-1677.

[0199] •Ramsi M,Al Ali AS.Thrombocytopenia-associated multiple-organ failure(TAMOF):recognition and management.BMJ Case Rep.2018 Aug 27;2018:bcr2018225594.doi:10.1136/bcr-2018-225594.

[0200] ●Scully M,Knöbl P,Kentouche K,Rice L,Windyga J,Schneppenheim R,Kremer Hovinga JA,Kajiwara M,Fujimura Y,Maggiore C,Doralt J,Hibbard C,Martell L,Ewenstein B.Recombinant ADAMTS-13:first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura.Blood.2017 Nov 9;130(19):2055-2063.

[0201] ●Scully M,Cataland SR,Peyvandi F,Coppo P,Knöbl P,Kremer Hovinga JA,Metjian A,de la Rubia J,Pavenski K,Callewaert F,Biswas D,De Winter H,Zeldin

RK;HERCULES Investigators.Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.N Engl J Med.2019 Jan 24;380(4):335-346.

[0202] ●Sins JWR,Schimmel M,Luken BM,Nur E,Zeerleder SS,van Tuijn CFJ,Brandjes DPM,Kopatz WF,Urbanus RT,Meijers JCM,Biemond BJ,Fijnvandraat K.Dynamics of von Willebrand factor reactivity in sickle cell disease during vaso-occlusive crisis and steady state.J Thromb Haemost.2017 Jul;15(7):1392-1402.doi:10.1111/jth.13728.

[0203] •Tao Z,Wang Y,Choi H,Bernardo A,Nishio K,Sadler JE,López JA,Dong JF.Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow.Blood 2005;106(01):141-143

[0204] •Thomas MR,de Groot R,Scully MA,Crawley JT.Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.EBioMedicine.2015 Jun 11;2(8):942-52.

[0205] •Turecek PL,Peck RC,Rangarajan S,Reilly-Stitt C,Laffan MA,Kazmi R,James I,Dushianthan A,Schrenk G,Gritsch H,Ewenstein BM,Mellgard B,Erdlenbruch W,Jain N,Binder NB,Mumford AD.Recombinant ADAMTS13 reduces abnormally up-regulated von Willebrand factor in plasma from patients with severe COVID-19.Thromb Res.2021 May;201:100-112.doi:10.1016/j.thromres.2021.02.012.

[0206] ●Xiao J,Jin SY,Xue J,Sorvillo N,Voorberg J,Zheng XL.Essential domains of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats-13 metalloprotease required for modulation of arterial thrombosis.Arterioscler Thromb Vasc Biol.2011 Oct;31(10):2261-9.。

```
1    mhqrhprarc pplcvagila cgfllgcwgp shfqqsclqa lepqavssyl spgaplkgrp
61   pspgfqrqrq rqrraaggil hlellvavgp dvfqahqedt eryvltnlni gaellrdpsl
121  gaqfrvhlvk mviltepega pnitanltss llsvcgwsqt inpeddtdpg hadlvlyitr
181  fdlelpdgnr qvrgvtqlgg acsptwscli tedtgfdlgv tiaheighsf glehdgapgs
241  gcgpsghvma sdgaapragl awspcsrrql lsllsagrar cvwdpprpqp gsaghppdaq
301  pglyysaneq crvafgpkav actfarehld mcqalschtd pldqsscsrl lvplldgtec
361  gvekwcskgr crslveltpi aavhgrwssw gprspcsrsc gggvvtrrrq cnnprpafgg
421  racvgadlqa emcntqacek tqlefmsqqc artdgqplrs spggasfyhw gaavphsqgd
481  alcrhmcrai gesfimkrgd sfldgtrcmp sgpredgtls lcvsgscrtf gcdgrmdsqq
541  vwdrcqvcgg dnstcsprkg sftagrarey vtfltvtpnl tsvyianhrp lfthlavrig
601  gryvvagkms ispnttypsl ledgrveyrv altedrlprl eeiriwgplq edadiqvyrr
661  ygeeygnltr pditftyfqp kprqawvwaa vrgpcsvscg aglrwvnysc ldqarkelve
721  tvqcqgsqqp pawpeacvle pcppywavgd fgpcsascgg glrerpvrcv eaqgsllktl
781  pparcragaq qpavaletcn pqpcparwev sepssctsag gaglalenet cvpgadglea
841  pvtegpgsvd eklpapepcv gmscppgwgh ldatsageka pspwgsirtg aqaahvwtpa
901  agscsvscgr glmelrflcm dsalrvpvqe elcglaskpg srrevcqavp cparwqykla
961  acsvscgrgv vrrilycara hgeddgeeil ldtqcqglpr pepqeacsle pcpprwkvms
1021 lgpcsascgl gtarrsvacv qldqgqdvev deaacaalvr peasvpclia dctyrwhvgt
1081 wmecsvscgd giqrrrdtcl gpqaqapvpa dfcqhlpkpv tvrgcwagpc vgqgtpslvp
1141 heeaaapgrt tatpagasle wsqargllfs papqprrllp gpqensvqss acgrqhlept
1201 gtidmrgpgq adcavaigrp lgevvtlrvl esslncsagd mlllwgrltw rkmcrklldm
1261 tfssktntlv vrqrcgrpgg gvllrygsql apetfyrecd mqlfgpwgei vspslspats
1321 naggcrlfin vaphariaih alatnmgagt eganasyili rdthslrtta fhgqqvlywe
1381 sessqaemef segflkaqas lrgqywtlqs wvpemqdpqs wkgkegt
```

图1

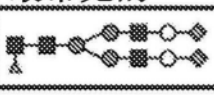
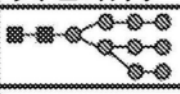
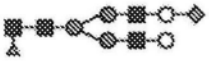
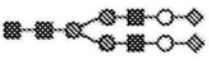
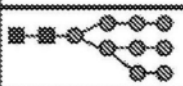
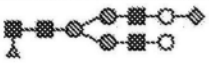
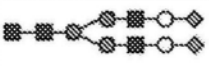
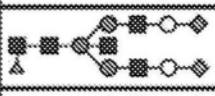
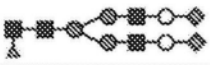
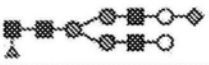
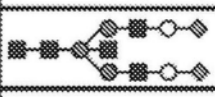
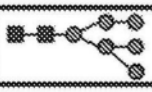
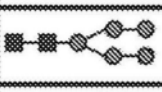
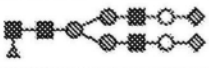
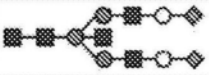
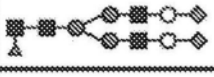
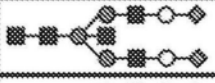
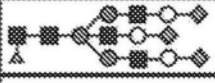
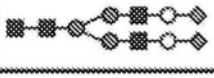
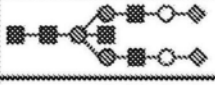
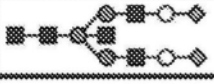
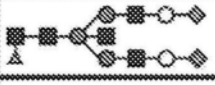
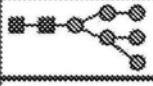
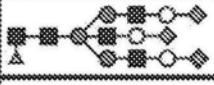
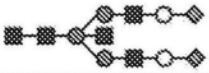
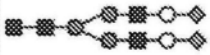
聚糖位置	鉴定的结构			
	最常见的	其它结构		
N142				
N146				
N552				
N579				
N614				
N667				
N707				
N828				
N1235				
N1354				

图2

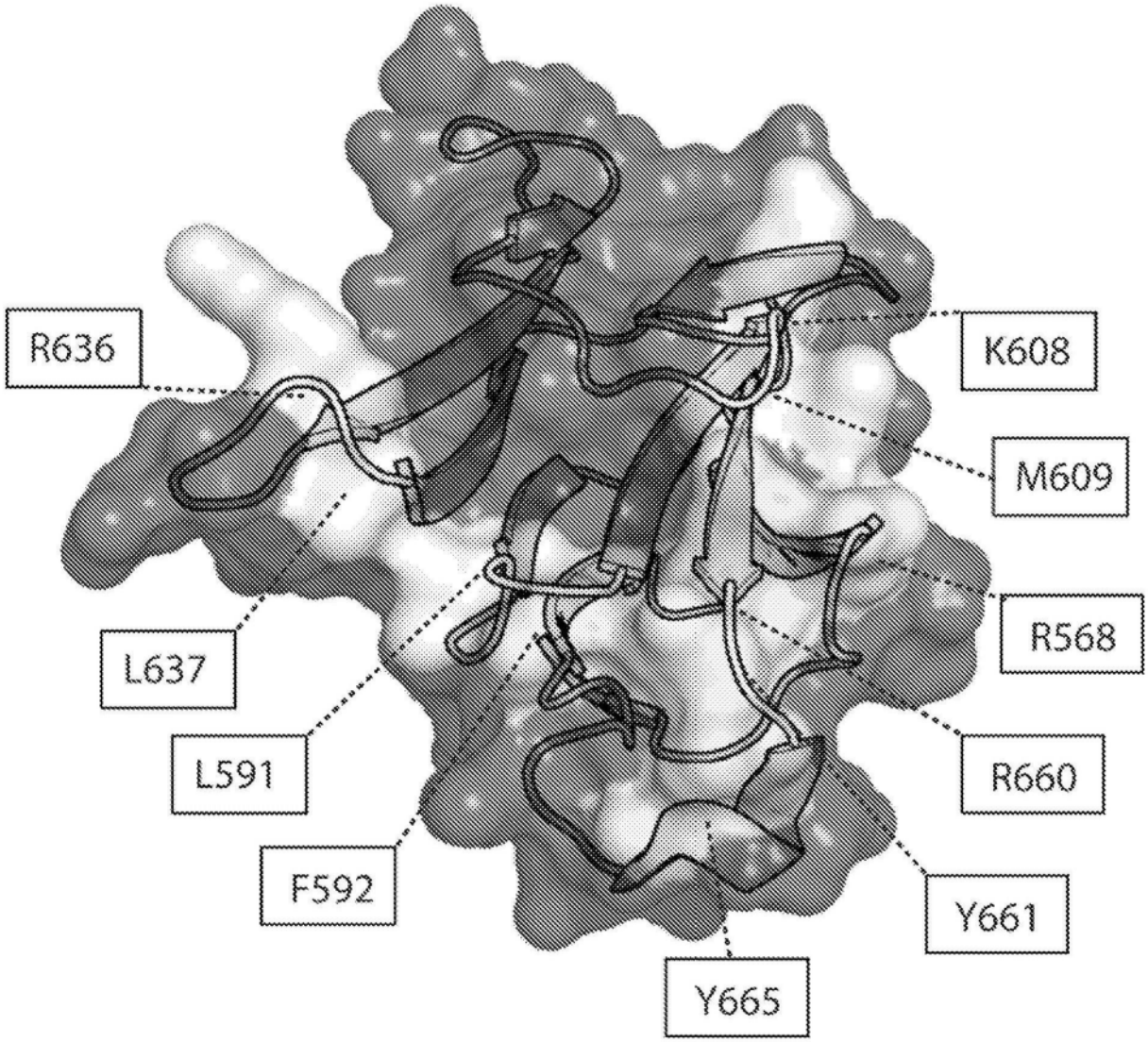
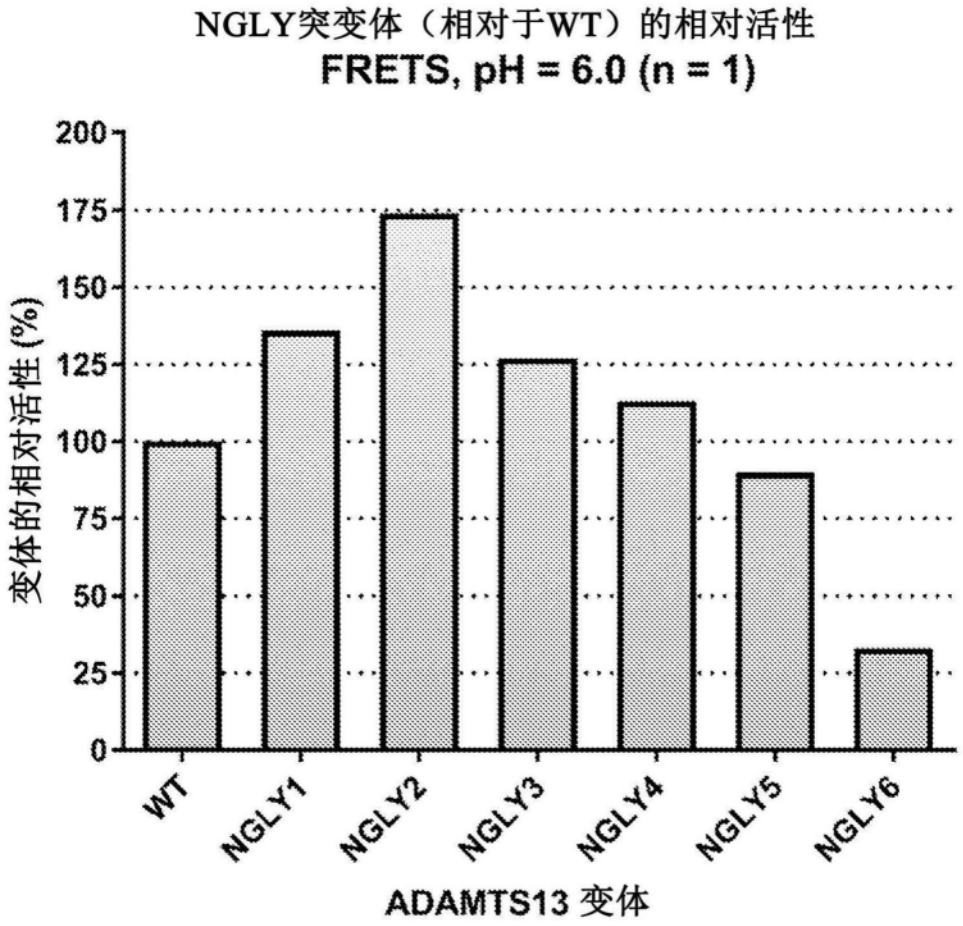


图3



原始表位	新表位	变体
$_{568}$REY$_{570}$	$_{568}$NET$_{570}$	NGLY1
$_{591}$LFT$_{593}$	$_{591}$NFT$_{593}$	NGLY2
$_{608}$KMSI$_{611}$	$_{608}$NMSI$_{611}$	NGLY3
$_{608}$KMSI$_{611}$	$_{608}$KNST$_{611}$	NGLY4
$_{636}$RLPR$_{639}$	$_{636}$NLSR$_{639}$	NGLY5
$_{636}$RLPR$_{639}$	$_{636}$RNAS$_{639}$	NGLY6

图4

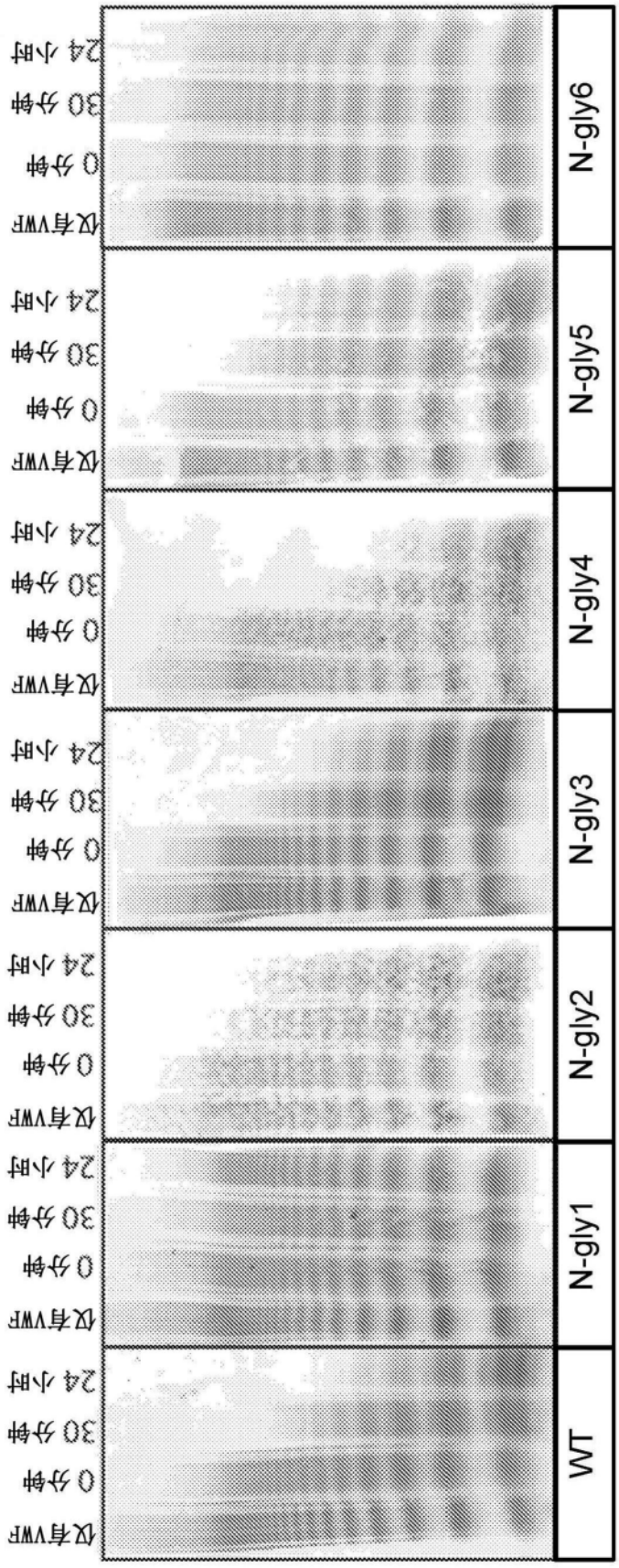


图5

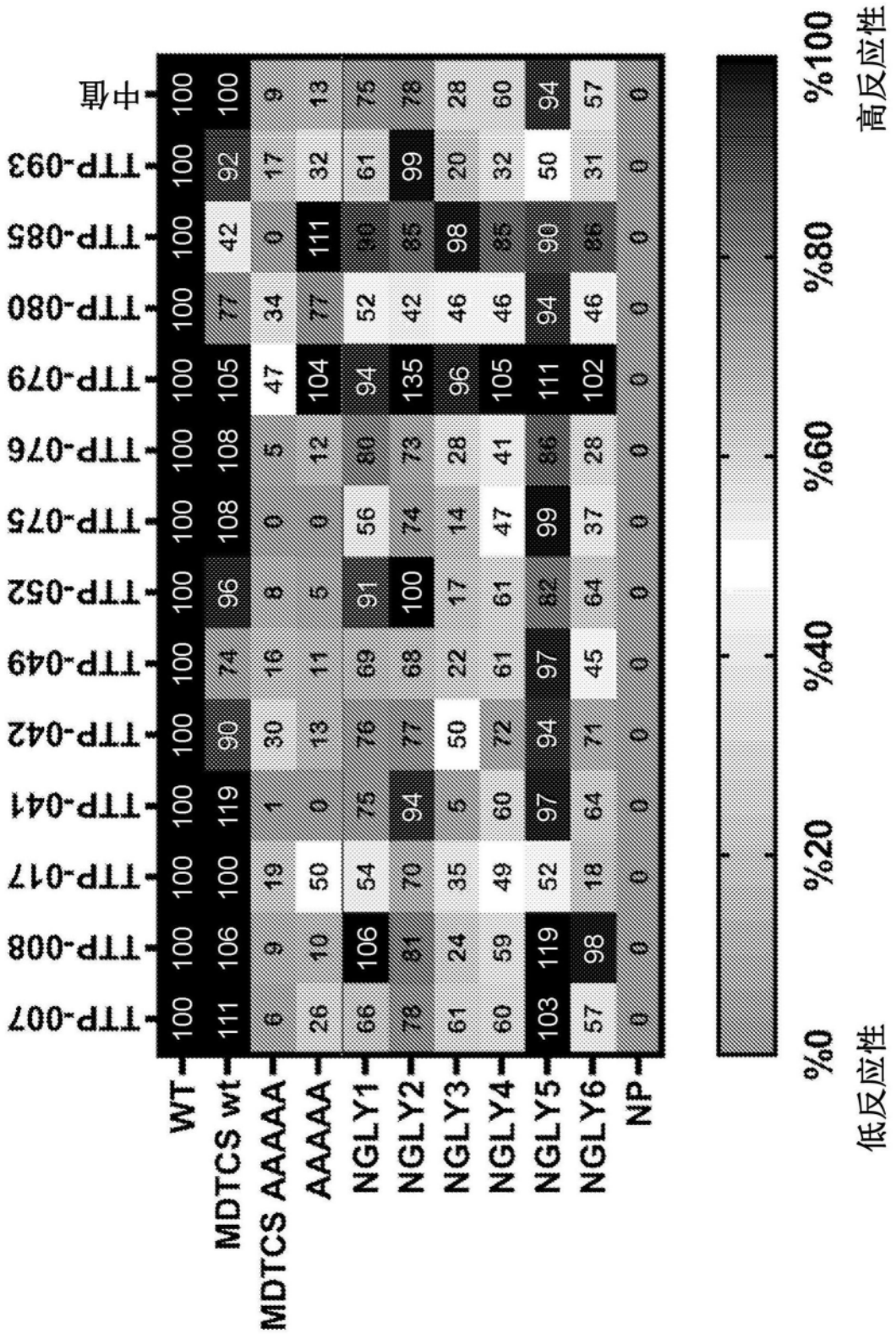

TTP-007
TTP-008
TTP-017
TTP-041
TTP-042
TTP-049
TTP-052
TTP-075
TTP-076
TTP-079
TTP-080
TTP-085
TTP-093
中值
WT
MDTCS wt
MDTCS AAAAA
AAAAA
NGLY1
NGLY2
NGLY3
NGLY4
NGLY5
NGLY6
NP
%0
%20
%40
%60
%80
%100
低反应性
高反应性

图6

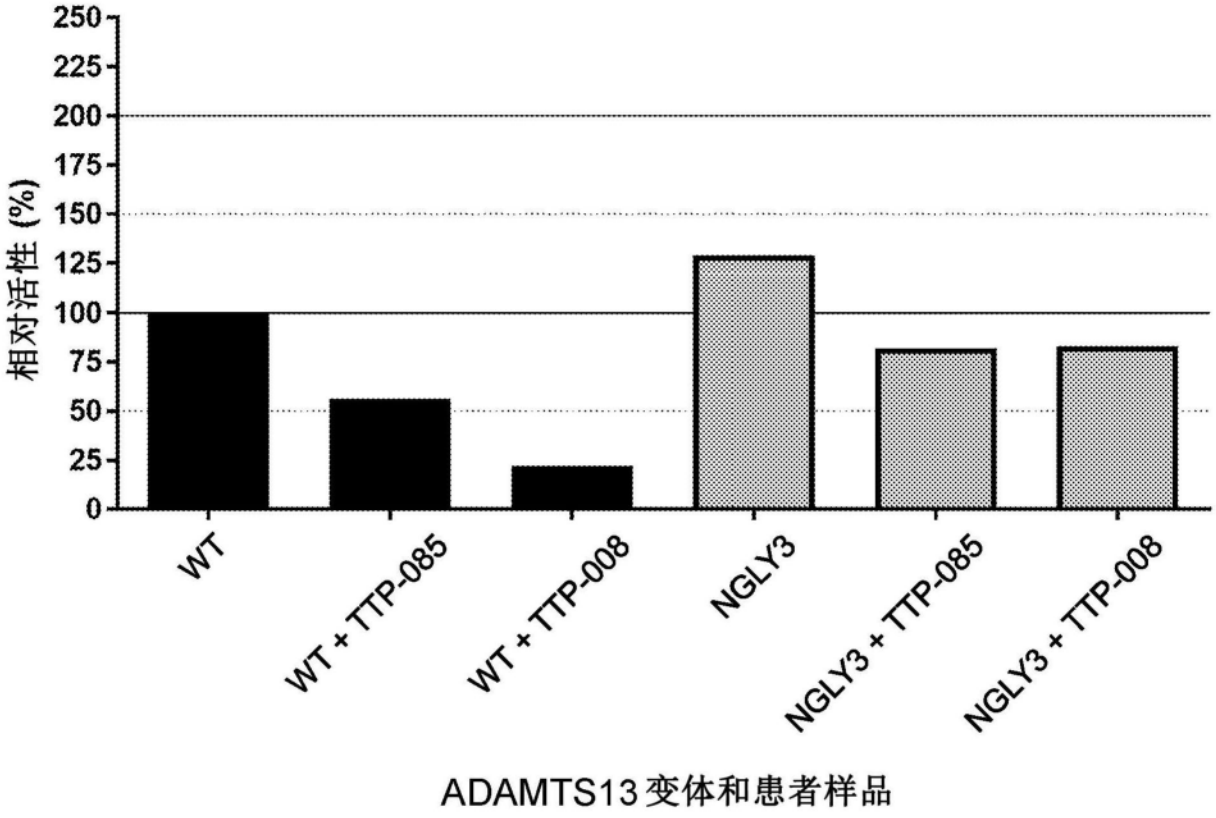

250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
相对活性 (%)
WT
WT + TTP-085
WT + TTP-008
NGLY3
NGLY3 + TTP-085
NGLY3 + TTP-008
ADAMTS13 变体和患者样品

图7

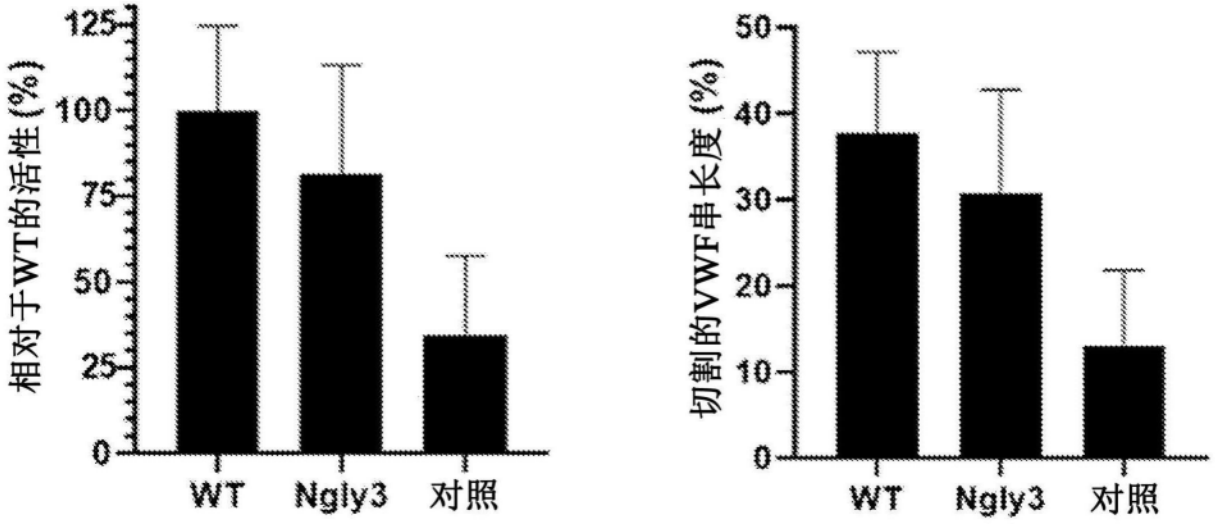

125
100
75
50
25
0
相对于WT的活性 (%)
WT
Ngly3
对照
50
40
30
20
10
0
切割的VWF串长度 (%)
WT
Ngly3
对照

图8

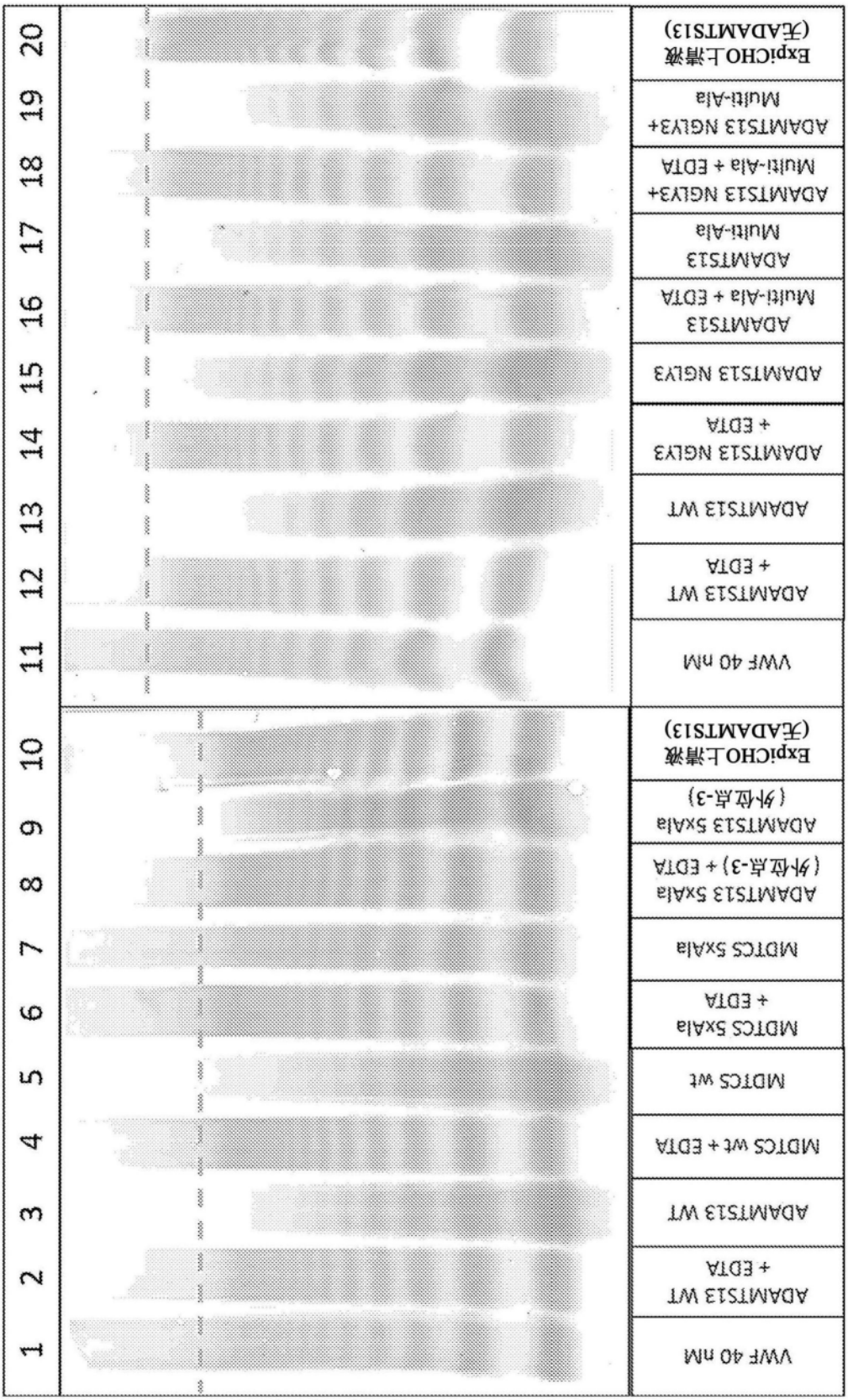

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
VWF 40 nM
ADAMTS13 WT + EDTA
ADAMTS13 WT
MDTCS wt + EDTA
MDTCS wt
MDTCS 5xAla + EDTA
MDTCS 5xAla
ADAMTS13 5xAla (外位点-3) + EDTA
ADAMTS13 5xAla (外位点-3)
ExpiCHO上清液 (无ADAMTS13)
VWF 40 nM
ADAMTS13 WT + EDTA
ADAMTS13 WT
ADAMTS13 NGLY3 + EDTA
ADAMTS13 NGLY3
ADAMTS13 Multi-Ala + EDTA
ADAMTS13 Multi-Ala
ADAMTS13 NGLY3+ Multi-Ala + EDTA
ADAMTS13 NGLY3+ Multi-Ala
ExpiCHO上清液 (无ADAMTS13)

图9A

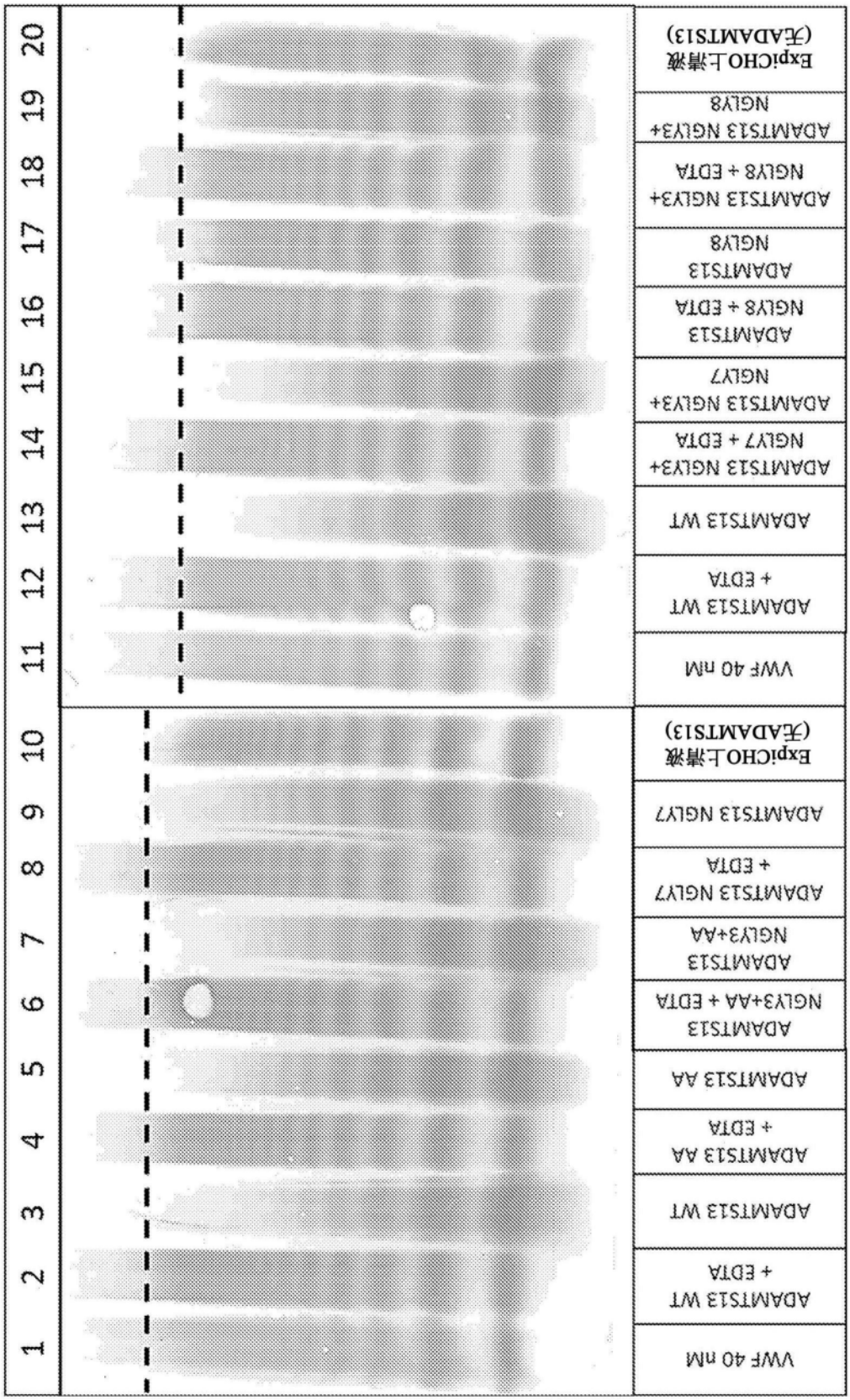

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
VWF 40 nM
ADAMTS13 WT + EDTA
ADAMTS13 WT
ADAMTS13 AA + EDTA
ADAMTS13 AA
ADAMTS13 NGLY3+AA + EDTA
ADAMTS13 NGLY3+AA
ADAMTS13 NGLY7 + EDTA
ADAMTS13 NGLY7
ExpiCHO上清液 (无ADAMTS13)
VWF 40 nM
ADAMTS13 WT + EDTA
ADAMTS13 WT
ADAMTS13 NGLY3+ NGLY7 + EDTA
ADAMTS13 NGLY3+ NGLY7
ADAMTS13 NGLY8 + EDTA
ADAMTS13 NGLY8
ADAMTS13 NGLY3+ NGLY8 + EDTA
ADAMTS13 NGLY3+ NGLY8
ExpiCHO上清液 (无ADAMTS13)

图9B

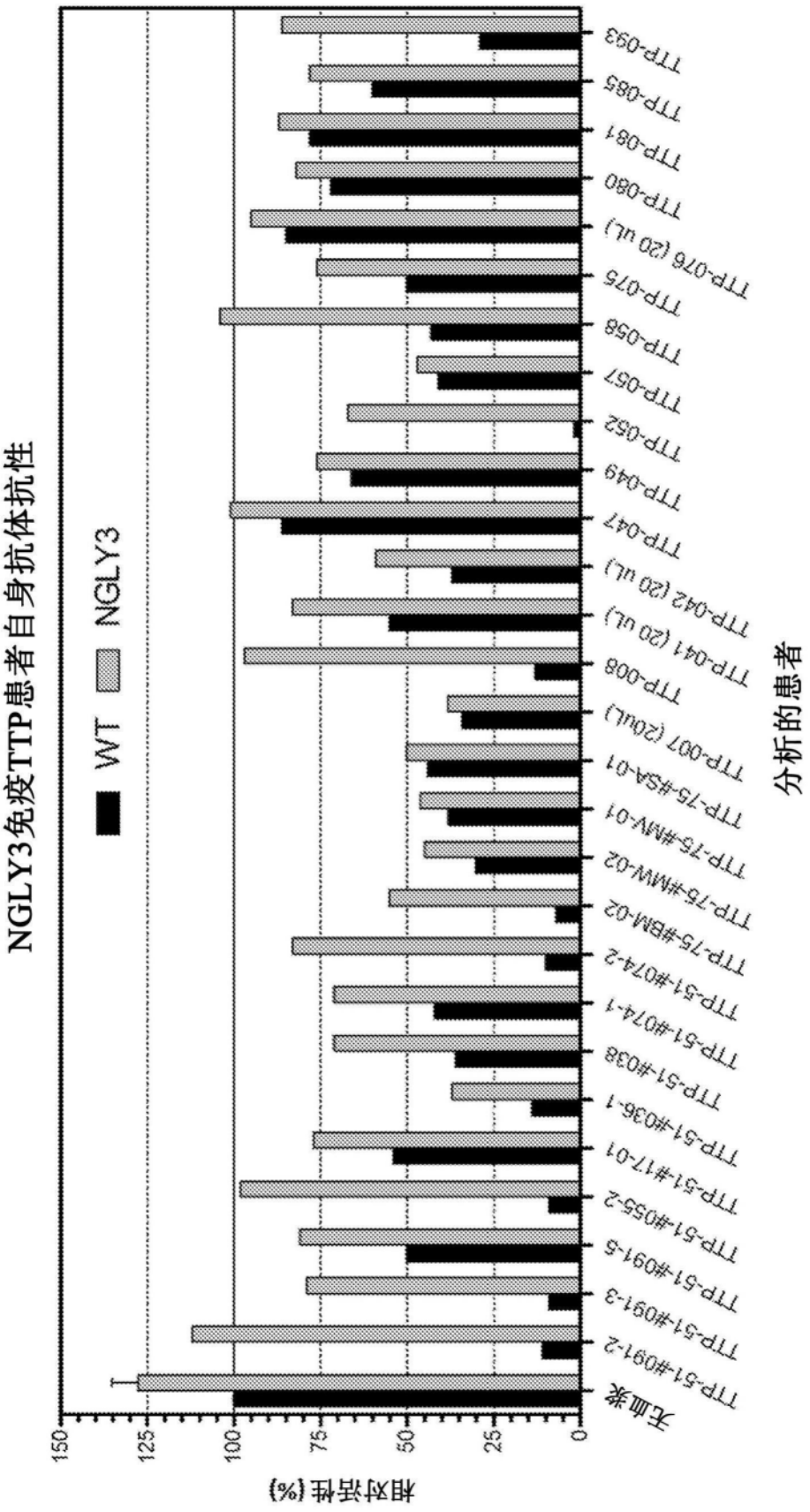

NGLY3免疫TTP患者自身抗体抗性
WT
NGLY3
相对活性(%)
150
125
100
75
50
25
0
无血浆
TTP-51-#091-2
TTP-51-#091-3
TTP-51-#091-5
TTP-51-#055-2
TTP-51-#17-01
TTP-51-#036-1
TTP-51-#038
TTP-51-#074-1
TTP-51-#074-2
TTP-75-#BM-02
TTP-75-#MW-02
TTP-75-#MV-01
TTP-75-#SA-01
TTP-007 (20uL)
TTP-008
TTP-041 (20 uL)
TTP-042 (20 uL)
TTP-047
TTP-049
TTP-052
TTP-057
TTP-058
TTP-075
TTP-076 (20 uL)
TTP-080
TTP-081
TTP-085
TTP-093
分析的患者

图10

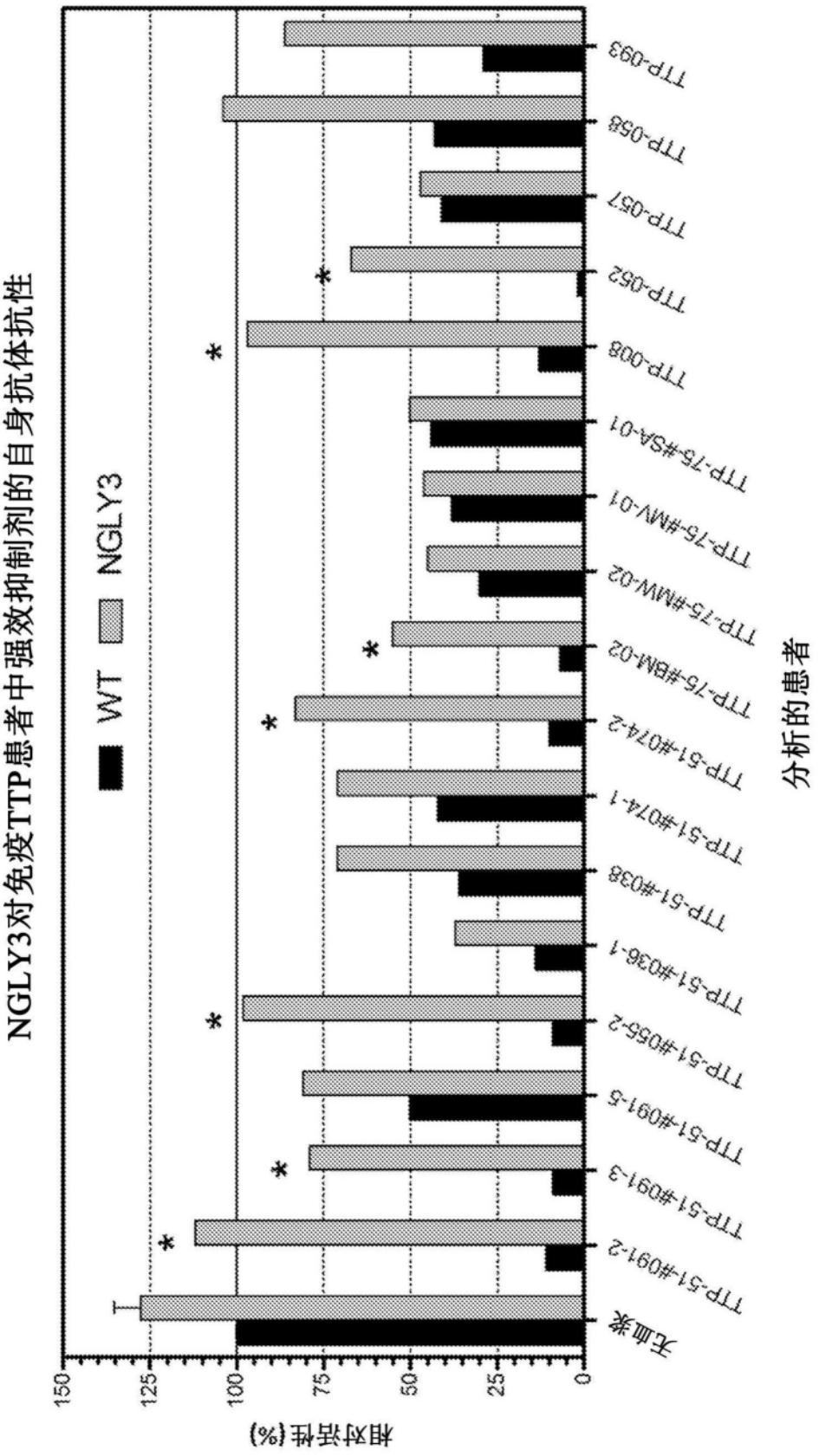

NGLY3对免疫TTP患者中强效抑制剂的自身抗体抗性
WT
NGLY3
相对活性(%)
150
125
100
75
50
25
0
分析的患者
无血浆
TTP-51-#091-2
TTP-51-#091-3
TTP-51-#091-5
TTP-51-#055-2
TTP-51-#036-1
TTP-51-#038
TTP-51-#074-1
TTP-51-#074-2
TTP-75-#BM-02
TTP-75-#MV-02
TTP-75-#MV-01
TTP-75-#SA-01
TTP-008
TTP-052
TTP-057
TTP-058
TTP-093

图11

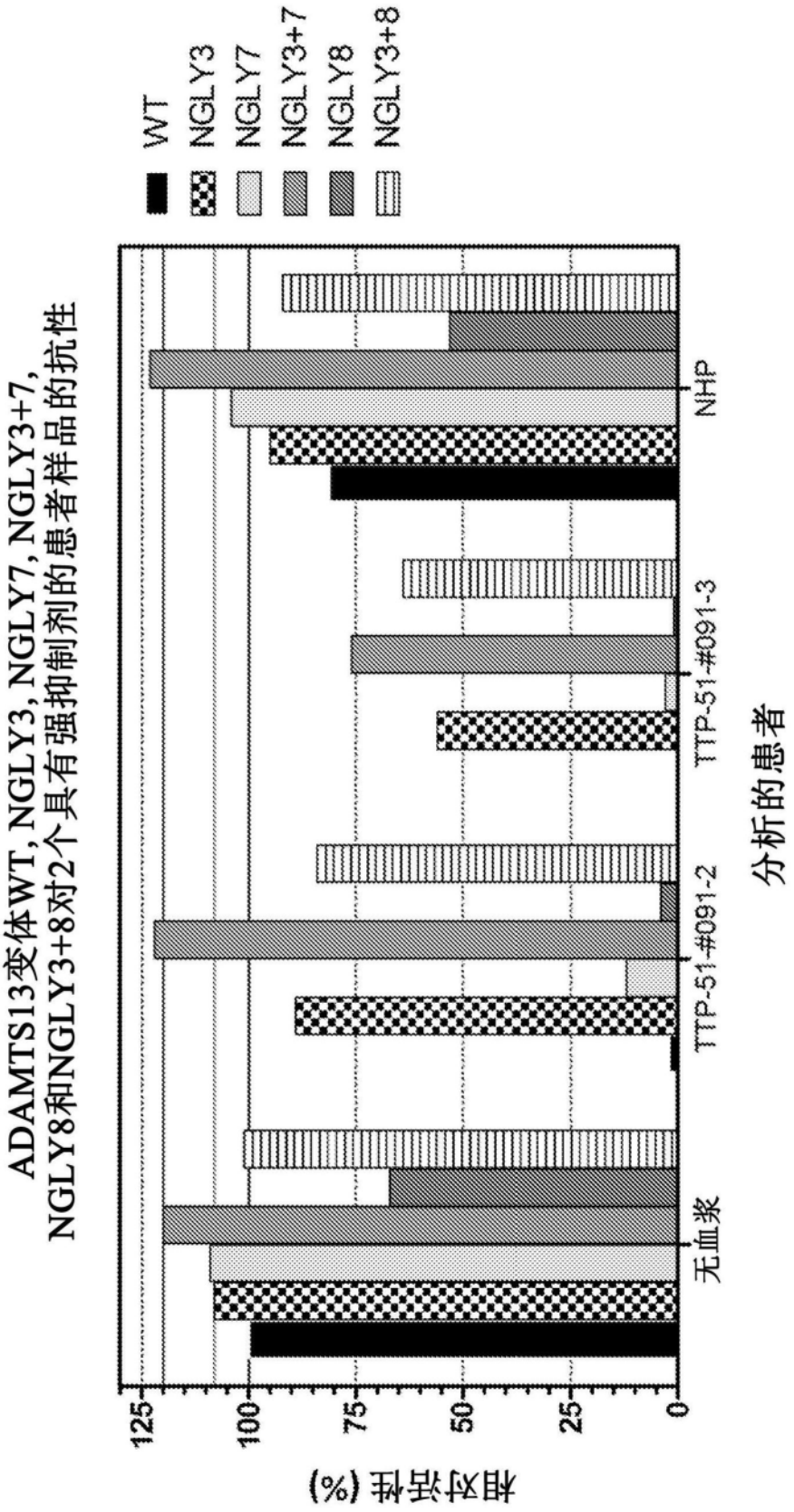

ADAMTS13变体WT, NGLY3, NGLY7, NGLY3+7,
NGLY8和NGLY3+8对2个具有强抑制剂的患者样品的抗性
WT
NGLY3
NGLY7
NGLY3+7
NGLY8
NGLY3+8
相对活性 (%)
125
100
75
50
25
0
无血浆
TTP-51-#091-2
TTP-51-#091-3
NHP
分析的患者

图12

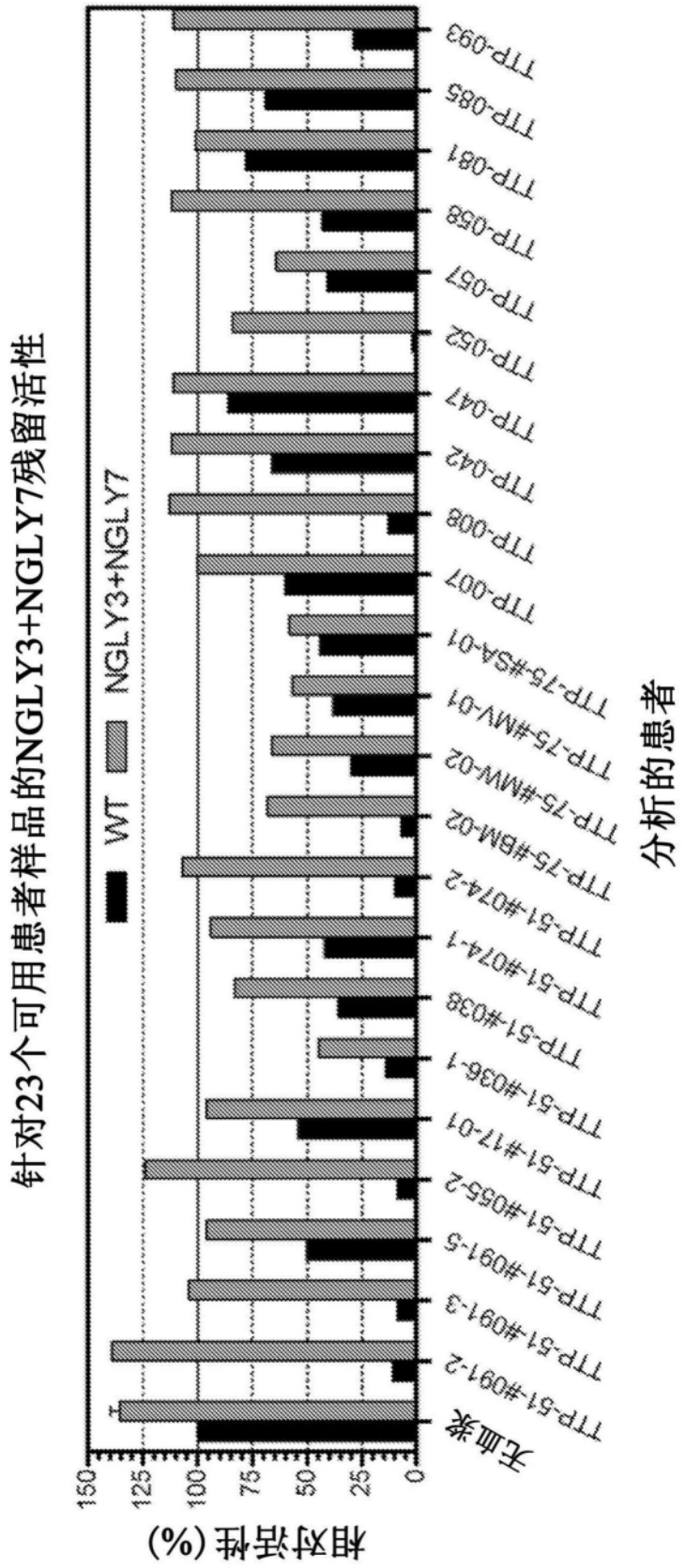

针对23个可用患者样品的NGLY3+NGLY7残留活性
WT
NGLY3+NGLY7
相对活性(%)
150
125
100
75
50
25
0
无血浆
TTP-51-#091-2
TTP-51-#091-3
TTP-51-#091-5
TTP-51-#055-2
TTP-51-#17-01
TTP-51-#036-1
TTP-51-#038
TTP-51-#074-1
TTP-51-#074-2
TTP-75-#BM-02
TTP-75-#MW-02
TTP-75-#MV-01
TTP-75-#SA-01
TTP-007
TTP-008
TTP-042
TTP-047
TTP-052
TTP-057
TTP-058
TTP-081
TTP-085
TTP-093
分析的患者

图13

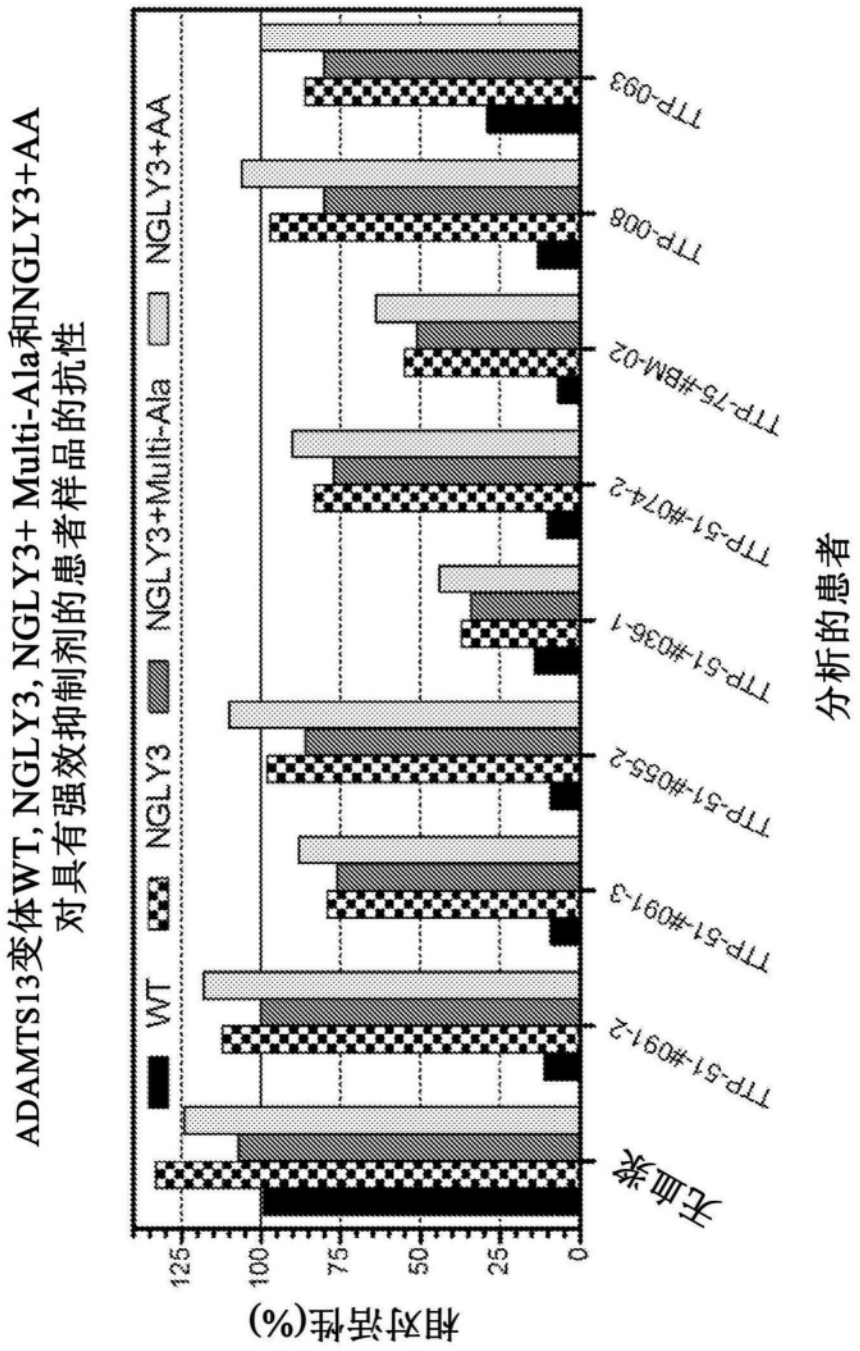
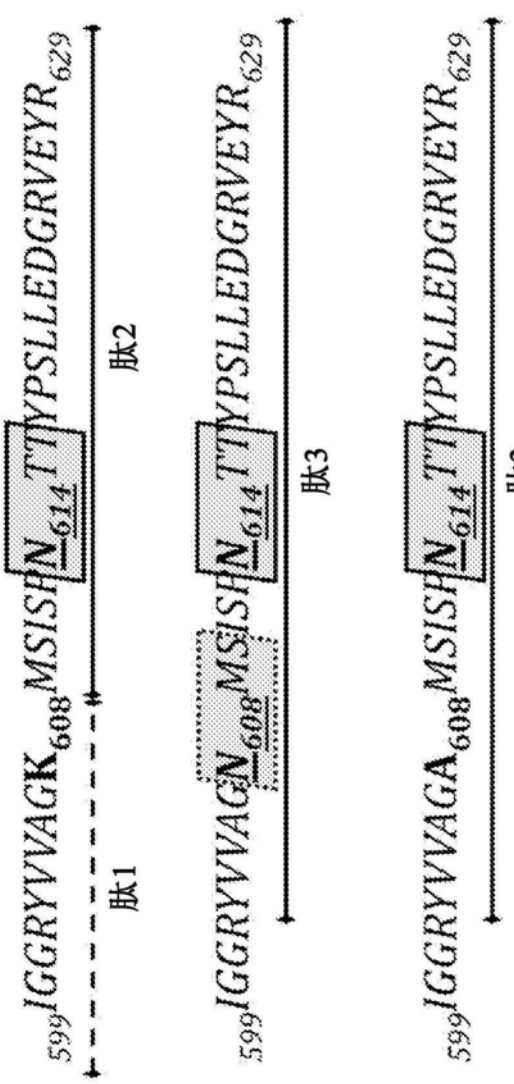

ADAMTS13变体WT, NGLY3, NGLY3+ Multi-Ala和NGLY3+AA
对具有强效抑制剂的患者样品的抗性
WT
NGLY3
NGLY3+Multi-Ala
NGLY3+AA
相对活性(%)
125
100
75
50
25
0
无血浆
TTP-51-#091-2
TTP-51-#091-3
TTP-51-#055-2
TTP-51-#036-1
TTP-51-#074-2
TTP-75-#BM-02
TTP-008
TTP-093
分析的患者

图14



样品	PNGaseF	覆盖	脱酰胺基化	序列残基
WT (K608)	-	肽1	-	599-608
	+	肽2	N614	609-629
NGLY3 (K608N)	-	-	-	-
	+	肽3	N608 – N614	603-629
突变体 (K608A)	-	-	-	-
	+	肽3	N614	603-629

图15