

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 034050

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.12.23

(51) Int. Cl. C07K 14/81 (2006.01)

(21) Номер заявки

201691235

(22) Дата подачи заявки

2014.12.15

---

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СЕРПИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ  
СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ

---

(31) 1322091.8

(56) WO-A2-2008045148

(32) 2013.12.13

WO-A2-2006090282

(33) GB

PLOTNICK M.I. ET AL.: "The Effects of Reactive Site Location on the Inhibitory Properties of the Serpin alpha 1-Antichymotrypsin", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 33, 7 June 2002 (2002-06-07), pages 29927-29935, XP055172584, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M202374200 page 29929, left-hand column, paragraph 3; table 1

(43) 2016.12.30

MARC L. FILION ET AL.: "Full or Partial Substitution of the Reactive Center Loop of [alpha]-1-Proteinase Inhibitor by that of Heparin Cofactor II: P1 Arg Is Required for Maximal Thrombin Inhibition", BIOCHEMISTRY, vol. 43, no. 46, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 14864-14872, XP055172656, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi048833f table 1

(86) PCT/EP2014/077783

HWANG ET AL.: "Multiple domains of endopain 2A for serpin cross-class inhibition of papain", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 461, no. 2, 5 May 2007 (2007-05-05), pages 219-224, XP022065136, ISSN: 0003-9861, DOI:10.1016/J.ABB.2007.02.036 figure 2 page 222, right-hand column, paragraph 3 - page 223, left-hand column, paragraph 1

(87) WO 2015/086854 2015.06.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

КЕМБРИДЖ ЭНТЕРПРАЙЗ  
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Хантингтон Джеймс Эндрю,  
Полдердейк Стефани, Баглин Тревор  
(GB)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.  
(RU)

(57) Изобретение относится к молекулам-прокоагулянтам серпина, сконструированным посредством модификации остатков Р4, Р2, Р1 и/или Р1' петли реактивного центра (RCL) для получения повышенной специфичности к протеазам-антикоагулянтам. Данные молекулы модифицированного серпина могут быть полезны в терапии, например, в качестве прокоагулянтов для лечения кровотечения.

B1

034050

034050 B1

### **Область техники**

Данное изобретение относится к модифицированным молекулам серпинов с измененной специфичностью, в частности молекулам серпинов, модифицированных для повышенной специфичности в отношении протеаз-антикоагулянтов, таких как активированный протеин С (APC).

### **Предшествующий уровень техники**

Гемофилии представляют собой нарушения свертываемости крови, вызванные дефицитом циркулирующего fVIII плазмы (гемофилия А, НА) или fIX (гемофилия В, НВ) (описанные в Bolton-Maggs&Pasi, 2003). Это снижает активность внутренней теназы (Xase) и таким образом количества тромбина, образующегося при повреждении ткани. Это приводит к неконтролируемому кровотечению после повреждения, а также спонтанному кровоизлиянию в суставы и мягкие ткани.

Гемофилия встречается приблизительно у 1 из 5000 человек. 170000 пациентов, идентифицированных в глобальном обзоре Всемирной федерации гемофилии, являются недооценкой бремени глобального здравоохранения (Всемирная федерация гемофилии, 2011). Стоимость лечения очень высока и лечение является частым и продолжается в течение всей жизни.

Стандартное лечение гемофилии включает замещение нарушенного фактора коагуляции при помощи либо рекомбинантного фактора, либо факторов, полученных из плазмы (описаны в Mannucci, 2003; 2008). Однако у значительной части пациентов, получающих такое лечение, будет происходить выработка ингибиторных антител к дополнительному фактору коагуляции, приводя к неэффективности лечения (описано в Brettler, 1996). Ингибиторы вырабатываются у 30% пациентов с гемофилией, получивших лечение (описано в Teitel&Sholzberg, 2013), однако глобальная оценка является низкой из-за высокой смертности пациентов с ингибиторами, не получавших лечение, и низкой распространенности ингибиторов во многих странах, в которых недоступна заместительная терапия фактора VIII. Другим недостатком традиционных терапий является их дороговизна, а также короткий период полужизни введенного фактора коагуляции, что делает необходимым частое лечение (описано в Lee et al., 2006).

В случае, когда у пациентов вырабатываются ингибиторные антитела, для лечения случаев кровотечения применяют агенты обходного действия (описаны в (Negrier et al., 2006)). Агенты обходного действия уменьшают кровотечение, не дополняя напрямую нарушенный фактор коагуляции; они "обходят" активность теназного комплекса. Примеры существующих агентов обходного действия включают рекомбинантный fVIIa и FEIBA (фактор VIII обходного действия), концентрат протромбинового комплекса. Данное заместительное лечение является очень дорогим (Bohn et al., 2004; DiMinno et al., 2010; Gringeri et al., 2003; Escobar, 2010) и его необходимо назначать даже чаще, чем традиционные терапии и в высоких дозах из-за короткого периода полужизни обоих продуктов (описано в Hayashi et al., 2007). Кроме того, реакция пациента оказалась вариабельной и непредсказуемой (описано в Bernthorp, 2009).

Кроме того, короткий период полужизни концентратов факторов делает стандартную заместительную терапию гемофилии субоптимальной. Это, в частности, проявляется при гемофилии А, поскольку фактор VIII обладает периодом полужизни менее 12 ч. Поэтому несмотря на доступность лечения как гемофилии А, так и В, частоты кровотечения при гемофилии А выше, и более распространенной является хроническая гемофильная артропатия. Это может быть связано с коротким периодом полужизни фактора VIII и, следовательно, сложностью поддержания гемостатического уровня фактора VIII (Escobar and Sallah, 2013). Согласно национальному обзору лечения годовая частота кровотечения у пациентов с тяжелой гемофилией А без ингибиторов составила 14 по сравнению с 9 у пациентов с гемофилией В (Nagel, et al., 2011). Необходимость скелетно-мышечной хирургии была в 3 раза выше у пациентов с гемофилией А. Tagariello et al. обнаружили, что пациентам с гемофилией А замена сустава требуется в три раза чаще, чем пациентам с гемофилией В (Tagariello, et al., 2009). Lowe et al. обнаружили, что госпитализация требуется в три раза чаще пациентам с гемофилией А по сравнению с пациентами с гемофилией В (Lowe and Ludlam 2008).

Существующее лечение нарушений свертываемости крови, таких как гемофилия, таким образом, обладает рядом недостатков.

### **Краткое описание изобретения**

Авторы настоящего изобретения убедились, что специфичность молекул серпина может быть изменена за счет модификации остатков в петле реакционного центра (RCL), и идентифицировали модифицированные молекулы серпина с повышенной специфичностью к протеазам-антикоагулянтам. Данные модифицированные молекулы серпина могут быть полезны для терапии, например для лечения кровотечений.

Аспект изобретения предлагает модифицированный серпин, имеющий мутации в одном или более остатков P4, P2, P1 и P1' в его петле реакционного центра (RCL).

Другой аспект изобретения предлагает модифицированный серпин, имеющий мутации в одном или обоих остатках P1' и P2 и необязательно остатках P4 и/или P1 в его петле реакционного центра (RCL).

Мутации могут повышать ингибирование активированного протеина С по сравнению с ингибированием тромбина.

Мутации также могут повышать ингибирование активированного протеина С по сравнению с ингибированием других протеаз-антикоагулянтов, таких как fVIIa, fIXa, fXa и fXIa.

Другие аспекты изобретения связаны с применением модифицированных серпинов, как описано в данном документе, для лечения кровотечения, например кровотечения у пациентов с наследственными нарушениями свертываемости крови и приобретенного кровотечения, включая травму, операцию и пациентов, получающих антикоагулянтную терапию.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 изображен каскад коагуляции и регуляторная роль серпинов в данном каскаде.

На фиг. 2 показаны результаты исследования протромбинового времени (PT) для определения эффекта ингибитора протеина С (PCI) с N-терминальным укорочением 21 остатка (N-терминальный остаток представляет собой A22 последовательности дикого типа, когда остаток 1 пропептида принимают за остаток 1 зрелого белка), и обладающего остатками К в позициях P2 и P1' в RCL (A22 P2KP1'K PCI), на коагуляцию по пути тканевого фактора (внешний). Нормальную объединенную плазму из трех отдельных плазм инкубировали или без PCI (черный столбец, -) или с 5 мкМ A22 PCI дикого типа (WT) (серый столбец, WT) или 5 мкМ A22 P2KP1'K PCI (белый столбец, P2KP1'K). Коагуляцию инициировали добавлением реагента РТ для инициации коагуляции по внешнему пути и измеряли время до образования сгустка. Исследование проводили в трех повторностях, планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Плазму, разведенную в два раза, использовали для повышения чувствительности исследования ингибиторов коагуляции. A22 P2KP1'K PCI не оказывает эффекта на коагуляцию в данном исследовании протромбинового времени (PT). Данный результат означает, что отсутствует существенное ингибирование тканевого фактора (TF):fVIIa, тромбина и других протеаз-прокоагулянтов посредством A22 P2KP1'K PCI.

На фиг. 3 изображены результаты исследования активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT) для определения эффекта A22 P2KP1'K PCI на коагуляцию по контактному пути активации (внутренний). На фиг. 3А показана нормальная объединенная плазма из трех отдельных плазм, инкубированных или без PCI (черный столбец, -) или с 5 мкМ A22 PCI дикого типа (WT) (серый столбец, WT) или с A22 P2KP1'K PCI (белый столбец, P2KP1'K). Реагент aPTT добавляли и образцы инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Затем коагуляцию инициировали посредством добавления CaCl<sub>2</sub> для запуска коагуляции по внутреннему пути и измеряли время до образования сгустка. Столбцы показывают среднее по меньшей мере трех измерений, планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Исследование останавливали при 300 с. На 300 с образцы не образовывали сгустка в течение времени эксперимента и были отмечены звездочкой. На фиг. 3В отражены данные А без образцов A22 WT PCI для демонстрации небольшого эффекта на время коагуляции.

На фиг. 4 показаны результаты исследования протромбинового времени (PT), определяющие эффект полноразмерного (FL) мутанта  $\alpha_1$ -антитрипсина Питтсбург (Pitts) (M358R = P1R), который дополнительно содержит мутации C232S и P357K (P2) и S359K (P1'K) мутации в RCL (FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K) на коагуляцию по пути тканевого фактора (внешнему). Нормальную объединенную плазму из трех отдельных плазм инкубировали или в отсутствии  $\alpha_1$ AT (-, черный столбец) или с 5 мкМ FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S (Pitts, серый столбец) или с 5 мкМ FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (P2KP1'K, белый столбец). Коагуляцию инициировали добавлением реагента РТ и измеряли время до образования сгустка. Столбцы показывают среднее по меньшей мере трех измерений, планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Плазму, разбавленную в два раза, использовали для повышения чувствительности исследования ингибиторов коагуляции. FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K в отличие от FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S не продлевает PT. Это свидетельствует об отсутствии существенного ингибирующего эффекта в отношении любых протеаз-прокоагулянтов, включая TF:fVIIa, тромбин или fXa.

На фиг. 5 показаны результаты исследования активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT) для определения влияния FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K на коагуляцию по контактному пути активации (внутреннему). На фиг. 5А изображена нормальная объединенная плазма из трех отдельных плазм, инкубированных или без  $\alpha_1$ AT (черный столбец) или с повышающимися концентрациями FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S (серые столбцы) или FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (белые столбцы). Добавляли реагент aPTT и образцы инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Затем коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и измеряли время до образования сгустка. Столбцы изображают среднее по меньшей мере трех измерений, планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Исследование останавливали на 300 с. Образцы на 300 с не образовывали сгусток в течение времени эксперимента и были отмечены звездочками. На фиг. 5В показаны данные А без образцов FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S для демонстрации небольшого влияния на время коагуляции за счет FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K. Однако данный эффект не увеличивается дозозависимо.

На фиг. 6 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S ингибирует образование тромбина в нормальной плазме человека (NP). На фиг. А-С показаны репрезентативные кривые образования тромбина для реакций, содержащих повышающиеся концентрации FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S (A) без тромбомодулина (TM), в присутствии (B) 1,25 нМ тромбомодулина (TM), в присутствии (C) 10 нМ тромбомодулина (TM). Кривые показывают среднее 2 повторностей. Все исследования проводили в нормальной объединенной плазме человека (NP) от George King Biomedical. Коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и

TF/фосфолипид (реагент В с низкой конц. TF и фосфолипидов #5006210, Technoclone GmbH) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина, при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone). На фиг. 6D показаны средние эндогенные тромбиновые потенциалы (ETP), отражающие общее количество тромбина, образовавшегося в ходе реакций. Столбцы показывают среднее двух независимых экспериментов, выполненных в двух повторностях. Планки погрешности показывают стандартное отклонение. Использованный тромбомодулин (TM) рекомбинантно получен из клеток HEK-EBNA и состоит из внеклеточного домена TM.

На фиг. 7 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K сохраняет антикоагуляционный эффект TM в нормальной плазме человека (NP). На фиг. 7A-C показаны репрезентативные кривые образования тромбина для реакций, содержащих повышающиеся концентрации FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (A) без TM, в присутствии (B) 1,25 нМ TM, в присутствии (C) 10 нМ TM. Кривые показывают среднее двух повторностей. Все исследования проводили в нормальной объединенной плазме человека (NP) от George King Biomedical. Коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и TF/фосфолипида (реагент В с низкой конц. TF и фосфолипидов #5006210 Technoclone GmbH) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone GmbH). На фиг. 7D показаны средние эндогенные потенциалы тромбина (ETP), представляющие общее количество тромбина, образовавшегося в ходе реакций. Столбцы отображают среднее трех независимых экспериментов, выполненных в двух повторностях. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 8 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S блокирует образование тромбина в плазме человека с гемофилией А (HA, fVIII-дефицит), и плазме человека с гемофилией В (HB, fIX-дефицит). Графики изображают средние ETP из экспериментов по образованию тромбина с повышающимися концентрациями FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S или в (A) fVIII-дефицитной плазме (менее чем 1% fVIII активности) или (B) fIX-дефицитной плазме (менее чем 1% fIX активности) с указанными количествами добавленного тромбомодулина (TM). Все плазмы были получены от George King Biomedical. Реакции инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и TF/фосфолипида (реагент В с низкой конц. TF и фосфолипидов #5006210 Technoclone GmbH) с 1:4,000 конечным разведением Dade Innovin (Siemens) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина посредством калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone). Средние ETP показаны по меньшей мере из двух независимых экспериментов, выполненных в двух повторностях. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 9 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K сохраняет влияние TM на плазму человека с HA (fVIII-дефицитная плазма). На фиг. 9A-C показаны репрезентативные кривые образования тромбина для реакций, содержащих повышающиеся концентрации FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (A) без TM, в присутствии (B) 1,25 нМ TM, в присутствии (C) 5 нМ TM. Кривые показывают среднее двух повторностей. Все исследования проводили в fVIII-дефицитной плазме (менее чем 1% fVIII активность) от George King Biomedical. Коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и TF/фосфолипида (RB низкий TF и фосфолипид реагент #5006210, Technoclone GmbH) и 1:4,000 Dade Innovin (Siemens) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone). На фиг. 9D показаны средние ETP (эндогенные потенциалы тромбина), представляющие общее количество тромбина, образованного в ходе реакции. Столбцы показывают среднее двух независимых экспериментов, выполненных в двух повторностях. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 10 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K сохраняет влияние TM на плазму человека с HB (fIX-дефицитная плазма). (A-C) Репрезентативные кривые образования тромбина показаны для реакций, содержащих повышающиеся концентрации FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (A) без TM, (B) в присутствии 1,25 нМ TM, (C) в присутствии 5 нМ TM. Кривые показывают среднее двух повторностей. Все исследования проводили в fIX-дефицитной плазме (менее чем 1% fIX активности) от George King Biomedical. Коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и TF/фосфолипида (реагент В с низкой конц. TF и фосфолипидов #5006210, Technoclone GmbH) и 1:4,000 Dade Innovin (Siemens) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone). На фиг. 10D показаны средние ETP (эндогенные потенциалы

тромбина), представляющие общее количество тромбина, образовавшегося в ходе реакций. Столбцы показывают среднее по меньшей мере двух независимых экспериментов, выполненных в двух повторностях.

На фиг. 11 показан эффект FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S и FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K в плазме мыши с НВ. На фиг. 11A-D показаны репрезентативные кривые образования тромбина для реакций, содержащих повышающиеся концентрации (A-B) FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S или (C-D) FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (A и C) без ТМ, (B и D) в присутствии 750 нМ растворимого ТМ человека. Все исследования проводили в плазме мыши с НВ, собранной во время хвостового кровотечения в цитрат, центрифужированной для удаления эритроцитов и замороженной при -80°C. Коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub>, TF/фосфолипида (реагент B с низкой конц. TF и фосфолипидов, Technoclone) и 1:12,000 Dade Innovin (Siemens) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone). На фиг. 11E показаны средние ЕТР (эндогенные потенциалы тромбина), представляющие общее количество тромбина, образовавшегося в ходе реакций. Столбцы показывают среднее четырех независимых экспериментов. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Все исследования проводили при 33°C.

На фиг. 12 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K снижает кровотечение у мышей с НВ в исследовании с отрезанием хвоста. Результаты отрезания хвоста показывают общую потерю крови в течение 10 мин периода сбора после надреза хвоста 3 мм в диаметре для мышей WT или НВ. Мышам инъектировали PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S или FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K в указанных дозах при общем объеме инъекции составлял 200 мкл. Растворы белков доводили до 200 мкл фосфатно-солевым буферным раствором. Объем кровопотери определяли за счет сбора крови из хвоста в 14 мл физиологического раствора. Собранные кровь центрифугировали и эритроциты лизировали с последующим измерением абсорбции при 575 нм. Стандартную кривую строили посредством определения абсорбции при 575 нм после лизиса эритроцитов при помощи известных объемов собранной крови.

Затем вычисляли потерю крови в экспериментальных образцах исходя из данного стандарта. Каждая показанная точка отражает данные по одной мыши и горизонтальные линии показывают среднее по всем животным группам. Значения Р вычисляли при помощи критерия Стьюдента для одной выборки. Круги обозначают мышей WT, которым инъектировали PBS, квадраты обозначают мышей НВ, которым инъектировали PBS, треугольники обозначают мышей НВ, которым инъектировали 7,5 мг/кг FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S, перевернутые треугольники обозначают мышей НВ, которым инъектировали 7,5 мг/кг FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K, и ромбы обозначают мышей НВ, которым инъектировали 15 мг/кг FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K.

На фиг. 13 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K повышает стабильное образование сгустка у мышей НВ в модели лазерного повреждения артериолы кремастера. Мышам НВ вводили флуоресцентно-меченное антитело к  $\alpha$ -фибрину и флуоресцентно-меченное антитело для мечения тромбоцитов через катетер в яремной вене. Контроли показывают базовый уровень образования сгустка после травмы у мышей, которым вводили только антитела, m обозначает число мышей по условиям, n обозначает число повреждений, нанесенных для такого условия. Светло-серый обозначает отсутствие сгустка, темно серый обозначает наличие сгустка только из тромбоцитов и черный обозначает сгустки, содержащие тромбоциты и фибрин.

На фиг. 14 показано, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K стабильно повышает образование сгустка у мышей НВ в модели лазерного повреждения артериолы кремастера. На фиг. 14 приведены репрезентативные начальные данные результатов, приведенных на фиг. 13. Флуоресценцию вычисляли в течение времени для всех повреждений для каждого состояния. Графики отображают среднее значение всех повреждений в указанном состоянии. Число мышей и общее число повреждений было следующим: контроль: 5 мышей, 8 повреждений; FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S при 7,5 мг/кг: 1 мышь, 7 повреждений; FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K при 7,5 мг/кг: 4 мыши, 18 повреждений; FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K при 15 мг/кг: 3 мыши, 20 повреждений.

На фиг. 15 показано ингибирование тромбина и fXa мутантами  $\alpha_1$ AT специфичными к APC больше, чем к тромбину, которые повторно скринировали в отношении ингибирования fXa. Полученные четыре мутанта, которые должны были обладать уменьшенным ингибированием fXa, затем тестировали в отношении ингибирования (A) тромбина и (B) fXa, для определения успешности скрининга в получении APC-специфичных мутантов, которые не ингибируют тромбин или fXa. 1 мкМ серпина инкубировали с 12,5 нМ протеазы в течение различных периодов времени. В указанные временные точки реакцию останавливали добавлением избытка хромогенного субстрата (S2238 для тромбина, S2222 для fXa). Остаточную ферментативную активность делили на изначальную ферментативную активность и натуральный логарифм данного значения наносили на график в зависимости от времени. Наклон данных зависимостей представляет собой наблюдаемую константу скорости, k<sub>obs</sub>. Для получения значения константы скорости

второго порядка  $k_2$ ,  $k_{obs}$  делили на концентрацию серпина. Выбранные значения приведены на фигуре для иллюстрации наиболее высокого ингибиования тромбина и fXa, а также значения для единственного мутанта, который, по существу, не ингибирал fXa (P2RPI'Q). Показанные мутанты все имеют мутацию Pitts (M358R, P1R).

#### **Подробное описание изобретения**

Данное изобретение относится к модификации серпинов с целью повышения их специфичности к APC по сравнению с другими протеазами коагуляции. Модифицированные варианты серпинов, специфичные к APC, могут быть полезны, например, в качестве проокоагулянтов.

Учитывая их специфичность к APC, модифицированные серпины, описанные в данном документе, как ожидается, имеют несколько или не имеют побочных эффектов и являются специфичными для путей, которые активируются при травме. Это позволяет применять модифицированные серпины в терапевтических и профилактических целях, а также в чрезвычайных ситуациях, т.е. при травме. Дозирование модифицированных серпинов является предсказуемым, поскольку они представляют собой суицидные ингибиторы, что означает, что одна молекула серпина может ингибировать не более одной молекулы протеазы. Кроме того, поскольку эффективные естественные механизмы выведения являются более специфичными к комплексам серпин-протеаза по сравнению только с серпином, периоды полужизни в плазме модифицированных серпинов вероятно превышают таковые существующих агентов обходного действия. Например, период полужизни модифицированного серпина, как описано в данном документе, может составлять приблизительно 5 дней.

Протеин С (Gene ID 5624) представляет собой витамин K-зависимый гликопротеин плазмы, который расщепляется до его активированной формы (активированный протеин С, APC) комплексом тромбин-тромбомодулин. Протеин С человека имеет референсную аминокислотную последовательность NP\_000303.1 GI:4506115 и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000312.3 GI:270483720. APC представляет собой протеазу-антикоагулянта, которая протеолитически расщепляет fVa и fVIIIa (фиг. 1), таким образом снижая образование тромбина.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, может иметь одну или более мутаций в его петле реактивного центра (RCL). Например, модифицированный серпин может иметь одну, две, три, четыре или более четырех мутаций в его RCL. Остатки по одной, двум, трем или всем четырем позициям P4, P2, P1 и P1' могут быть мутированы. Например, остатки в одной или обеих позициях P1' и P2 и возможно P1 и/или P4 могут быть мутированы.

Остатки RCL пронумерованы в данном документе согласно номенклатуре Шехтера-Бергера для субстратов и ингибиторов сериновых протеаз (Schechter & Berger, 1967). Данная стандартная номенклатура позволяет легко идентифицировать остаток в конкретных позициях в RCL, таких как P1', P1, P2 и/или P4, в любой последовательности серпина.

Предпочтительно одна или более мутаций являются единственными мутациями в RCL модифицированного серпина. Например, RCL может состоять из последовательности RCL серпина дикого типа с мутациями в одной или более позициях P1' и P2 и необязательно P1 и/или P4.

RCL модифицированного серпина может иметь мутации в позициях P1' и P2; мутации в позициях P1', P2 и P1; мутации в позициях P1', P2 и P4 или мутации в позициях P1', P2, P1 и P4; мутацию в позиции P1'; мутации в позициях P1' и P1; мутации в позициях P1' и P4 или мутации в позициях P1', P1 и P4; мутацию в позиции P2; мутации в позициях P2 и P1; мутации в позициях P2 и P4, мутации в позициях P2, P1 и P4, мутацию в позиции P1, мутацию в позиции P4; или мутации в позициях P1 и P4. Остатки в других позициях в RCL могут представлять собой немутированные остатки дикого типа.

Предпочтительно остатки в позиции P1'; позициях P1' и P2; позициях P1', P1 и P2; позициях P2 и P1; позициях P1 и P1'; позициях P1', P2 и P4 или позициях P1', P1, P2 и P4 RCL мутированы. В некоторых предпочтительных воплощениях остатки в позициях P1', P1 и P2 мутированы.

Петля реактивного центра (RCL) серпина обычно составляет приблизительно 20 остатков в длину и содержит неустойчивую связь P1-P1', которая расщепляется целевой протеазой. RCL простирается от цепи 5  $\beta$ -складчатого слоя А до цепи 1  $\beta$ -складчатого слоя С серпина. Остатки P17 Glu, P15 Gly и P14 Thr сохранены в серпинах. Например, RCL серпина может содержать консенсусную последовательность P17 E, P16 E/K/R, P15 G, P14 T/S, P12-P9 (A/G/S)<sub>4</sub> (Hopkins et al., 1993; Irving et al., 2000). RCL начинается на остатке P17 и обычно заканчивается на остатке P3'. RCL могут быть удлиненными в некоторых серпинах, таких как PCI, за счет дополнительных остатков с P' стороны. Например, RCL  $\alpha_1$ -антитрипсина состоит из остатков P17-P3' и RCL PCI состоит из остатков P17-P6'. Примеры серпинов с остатками P1', P1, P2 и P4 приведены в SEQ ID NO: 1-11 ниже. Остатки, которые составляют последовательности зрелого серпина, также указаны.

Остатки в других позициях RCL в серпине могут быть немодифицированы, т.е. они могут представлять собой нативные остатки последовательности серпина дикого типа. Модифицированный серпин таким образом может содержать RCL, имеющую последовательность дикого типа, несущую мутации в позициях P1, P1', P2 и/или P4, как описано выше.

Одна или более мутаций в петле реактивного центра (RCL) модифицированного серпина может со-

держать или состоять из мутации в позиции P1'. Предпочтительно мутация представляет собой замену. Нативный остаток P1' в RCL серпина дикого типа может быть замещен ненативным остатком в модифицированном серпине. Например, нативный остаток S в позиции P1' в последовательности дикого типа  $\alpha_1$ AT или PCI может быть замещен остатком отличным от S в модифицированном серпине.

Нативный остаток P1' в RCL серпина дикого типа может быть замещен большим полярным остатком, таким как Q, N, Y; большим гидрофобным остатком, таким как I, M и V; положительно заряженным остатком, таким как R, H или K; или другим остатком, таким как C, A, S и E.

В некоторых предпочтительных воплощениях остаток P1' может быть модифицирован до большого полярного остатка, такого как Q, N, Y; большого гидрофобного остатка, такого как V; или положительно заряженного остатка, такого как R, H или K; более предпочтительно положительно заряженного или большого полярного остатка, такого как H, K, R или Q; наиболее предпочтительно K.

В других воплощениях остаток P1' может быть немодифицирован в модифицированном серпине. Например, остаток в позиции P1' в RCL модифицированного серпина может представлять собой остаток P1' в последовательности серпина дикого типа.

Одна или более мутаций в петле реактивного центра (RCL) модифицированного серпина может содержать или состоять из мутации по остатку P2. Предпочтительно мутация представляет собой замену. Например, нативный остаток P2 в RCL серпина дикого типа может быть замещен ненативным остатком в модифицированном серпине.

Нативный остаток P2 в RCL серпина дикого типа может быть замещен большим полярным остатком, таким как D, Q, N, Y, большим гидрофобным остатком, таким как W, L, I, V и F, положительно заряженным остатком, таким как R, H или K, или другим остатком, таким как C, A, T, S или P.

В некоторых воплощениях остаток P2 в модифицированном серпине может отличаться от P.

В некоторых предпочтительных воплощениях остаток P2 может быть модифицирован до большого полярного остатка, такого как Q, N, Y, большого гидрофобного остатка, такого как W, или положительно заряженного остатка, такого как R, H или K, наиболее предпочтительно положительного остатка, такого как H, K или R, предпочтительно K.

В некоторых воплощениях остаток P2 может быть немодифицированным в модифицированном серпине. Например, остаток в позиции P2 в RCL модифицированного серпина может представлять собой остаток, который представлен в остатке P2 в последовательности серпина дикого типа.

Одна или более мутаций RCL модифицированного серпина может содержать или состоять из замен по остаткам P1' и/или P2, т.е. остатки, расположенные в позициях P1' и/или P2 в RCL последовательности серпина дикого типа, могут быть замещены другими остатками в модифицированном серпине.

В предпочтительных воплощениях модифицированный серпин имеет мутации в обеих позициях P2 и P1' RCL.

Подходящие остатки в позициях P2 и P1' модифицированного серпина описаны выше.

В некоторых модифицированных серпинах, описанных в данном документе, по меньшей мере один из остатков P1' и P2 может быть положительно заряженным остатком, таким как R, H или K, или большим полярным остатком, таким как D, Y, Q или N; большим гидрофобным остатком, таким как W, L, F, V, M или I; или другим остатком, таким как L, C, A, E, T, S или P. Предпочтительно по меньшей мере один из остатков P1' и P2 является положительно заряженным остатком, таким как R, H или K; большим полярным остатком, таким как Y, Q или N; или большим гидрофобным остатком, таким как W, L, F, V или I.

Примеры остатков P2 и P1' соответственно в модифицированном серпине, как описано в данном документе, включают KK, FK, RK, VK, LK, QK, CK, PK, FR, HR, IR, SR, TR, VR, YR, AR, PR, RS, KS, QV, RV, RI, RH, KH, TH, RC, RA, LY, QY, TY, DM, TM, WN, RN, HN, TN, KN, NN, PE, RQ, KQ и TQ.

В некоторых предпочтительных воплощениях оба остатка P1' и P2 могут быть модифицированы до положительно заряженных остатков, таких как K, H или R, наиболее предпочтительно K.

В некоторых воплощениях остатки P2 и P1' соответственно в модифицированном серпине, как описано в данном документе, могут отличаться от PN, FS, QS, AS, TS, HS, TA, PT, CC, PS, PT, PM, PH, PA или PC. Например, остатки P2 и P1' могут отличаться от PN, FS, QS, AS, TS, HS, TA, PT, CC или PC в PCI скаффолде или отличаться от PS, PT, PM, PH или PA в  $\alpha_1$ AT скаффолде.

В некоторых воплощениях остаток P1 может быть немодифицированным в модифицированном серпине. Например, остаток в позиции P1 в RCL модифицированного серпина может быть остатком, который представлен в остатке P1 последовательности серпина дикого типа. Например, остаток P1 в модифицированном PCI может быть остатком R.

В других воплощениях остаток P1 может быть мутирован в модифицированном серпине. Например, одна или более мутаций в петле реактивного центра (RCL) модифицированного серпина дополнительно содержит мутацию остатка P1. Предпочтительно мутация представляет собой замену. Нативный остаток P1 в RCL серпина дикого типа может быть замещен ненативным остатком в модифицированном серпине.

В некоторых воплощениях остаток P1 может быть мутирован или модифицирован до положительно заряженного остатка, такого как H, K или R, предпочтительно R.

Предпочтительно нативный остаток, который не является положительно заряженным в позиции P1 серпина дикого типа, может быть замещен на положительно заряженный остаток в модифицированном серпине. Например, M в позиции P1  $\alpha_1$ AT дикого типа может быть замещен на положительно заряженный остаток, такой как R, в модифицированном  $\alpha_1$ AT. Вариант  $\alpha_1$ AT Питтсбург (Pitts) несет мутацию в остатке 358, который замещает остаток M в позиции P1 остатком R.

В некоторых воплощениях остаток P4 может быть немодифицированным в модифицированном серпине. Например, остаток в позиции P4 в RCL модифицированного серпина может представлять собой остаток, который представлен в остатке P4 в последовательности серпина дикого типа. Например, остаток P4 в PCI скаффолде может представлять собой F и остаток P4 в  $\alpha_1$ AT скаффолде может представлять собой A.

В других воплощениях остаток P4 может быть мутирован в модифицированном серпине. Например, одна или более мутаций в петле реактивного центра (RCL) модифицированного серпина дополнительно содержит мутацию в остатке P4.

Предпочтительно мутация представляет собой замену. Остаток в остатке P4 в RCL серпина дикого типа может быть замещен другим остатком в модифицированном серпине. Например, остаток P4 в модифицированном PCI может быть мутирован или модифицирован до остатка отличного от F, и остаток P4 в модифицированном  $\alpha_1$ AT может быть мутирован или модифицирован до остатка отличного от A.

Приемлемые остатки в позиции P4 RCL модифицированного серпина включают S, R, V, C, W, K, G, L, H, F, T, Q и A.

В примерах модифицированных серпинов-прокоагулянтов, как описано в данном документе,

(1) остаток P4 представляет собой Q, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой N;

(2) остаток P4 представляет собой K, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой H;

(3) остаток P4 представляет собой S, остаток P2 представляет собой L, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;

(4) остаток P4 представляет собой H, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой V;

(5) остаток P4 представляет собой F, остаток P2 представляет собой K, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;

(6) остаток P4 представляет собой F, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;

(7) остаток P4 представляет собой F, остаток P2 представляет собой V, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;

(8) остаток P4 представляет собой C, остаток P2 представляет собой L, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;

(9) остаток P4 представляет собой F, остаток P2 представляет собой F, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой R;

(10) остаток P4 представляет собой S, остаток P2 представляет собой H, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой R;

(11) остаток P4 представляет собой G, остаток P2 представляет собой I, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой R;

(12) остаток P4 представляет собой R, остаток P2 представляет собой Q, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой V;

(13) остаток P4 представляет собой T, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой V;

(14) остаток P4 представляет собой R, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой I;

(15) остаток P4 представляет собой V, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой I;

(16) остаток P4 представляет собой L, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой I;

(17) остаток P4 представляет собой T, остаток P2 представляет собой L, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой Y;

(18) остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой Q, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой Y;

(19) остаток P4 представляет собой K, остаток P2 представляет собой D, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой M;

(20) остаток P4 представляет собой W, остаток P2 представляет собой W, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой N;

(21) остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K, остаток P1 представляет



прокоагулянте, как описано в данном документе, могут отличаться от HPN, DKN, HPE, FFS, LQS, HAS, YTS, AHS, ATA, LPT, ACC, APT, APA, APM, APH, APS и VPC соответственно. Например, модифицированный PCI может иметь остатки отличные от HPN, DKN, HPE, FFS, LQS, HAS, YTS, AHS, ATA, LPT, ACC и VPC в позициях P4, P2 и P1', и модифицированный  $\alpha_1$ AT может иметь остатки отличные от APT, APA, APM или APH в позициях P4, P2 и P1'. В некоторых воплощениях комбинация остатков в позициях P4, P2 и P1' в модифицированном серпине-прокоагулянте, как описано в данном документе, может быть неестественного происхождения, т.е. комбинация остатков в позициях P4, P2 и P1' не обнаружена в родительском серпине дикого типа (т.е. немодифицированном) или в других серпинах дикого типа.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, может содержать последовательность серпина дикого типа (т.е. немодифицированную), предпочтительно зрелого серпина дикого типа, с одной или более мутациями в его RCL, как описано выше, и необязательно одну или более дополнительных мутаций вне RCL.

Последовательности серпинов дикого типа хорошо известны в области техники и могут включать SEQ ID NO: 1-11, как изложено в данном документе. Последовательности серпинов дикого типа могут включать последовательность зрелых белков дикого типа.

Зрелая последовательность ингибитора протеина C (PCI), включающая его пропептид, соответствует остаткам 20-406 SEQ ID NO: 1. Зрелый  $\alpha_1$ -антихимотрипсин соответствует остаткам 26- 423 SEQ ID NO: 2. Зрелая последовательность ингибитора C1-эстеразы соответствует остаткам 23-500 SEQ ID NO: 3. Зрелая последовательность  $\alpha_2$ -антiplазмина соответствует остаткам 28-491 SEQ ID NO: 4. Зрелая последовательность антитромбина (АТIII) соответствует остаткам 33-464 SEQ ID NO: 5. Зрелая последовательность гепаринового кофактора II соответствует остаткам 20-499 SEQ ID NO: 6. Зрелая последовательность  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ AT) соответствует остаткам 25-418 SEQ ID NO: 7. Зрелая последовательность каллистатина соответствует остаткам 21-427 SEQ ID NO: 8. Зрелая последовательность ингибитора активатора плазминогена соответствует остаткам 24-402 SEQ ID NO: 9. Зрелая последовательность протеин Z-зависимого ингибитора соответствует остаткам 22-444 SEQ ID NO: 10. Зрелая последовательность изоформы протеазы нексин 1 соответствует остаткам 20-398 SEQ ID NO: 11.

В отличие от мутаций остатков RCL, как описано выше, модифицированный серпин может иметь 50 или менее аминокислотных остатков, измененных относительно аминокислотной последовательности серпина дикого типа (например, последовательность зрелого серпина одной из SEQ ID NO: 1-11, предпочтительно SEQ ID NO: 1 или 7), предпочтительно 45 или менее, 40 или менее, 30 или менее, 20 или менее, 15 или менее, 10 или менее, 5 или менее или 3 или менее. Например, модифицированный серпин может содержать последовательность серпина дикого типа с 50 или менее, 45 или менее, 40 или менее, 30 или менее, 20 или менее, 15 или менее, 10 или менее, 5 или менее или 3 или менее аминокислотными остатками, мутированными или измененными, в дополнение к одному, двум, трем или четырем аминокислотным остаткам в RCL серпина, которые мутированы или изменены, как описано выше (т.е. остатки в позициях P1' и/или P2 и необязательно P1 и/или P4).

Аминокислотный остаток в аминокислотной последовательности дикого типа может быть изменен или мутирован посредством включения, удаления или замены, предпочтительно замены на различные аминокислотные остатки. Такие изменения могут быть вызваны одним или более добавлением, включением, удалением или заменой одного или более нуклеотидов в кодирующей нуклеиновой кислоте.

Например, модифицированный серпин может содержать аминокислотную последовательность остатков 25-418 SEQ ID NO: 12, имеющую 50 или менее мутаций, где упомянутые мутации присутствуют в позициях, отличных от P4, P2, P1 и P1', т.е. остаток P4 в RCL модифицированного серпина представляет собой А, остаток P2 представляет собой К, остаток P1 представляет собой Р и остаток P1' представляет собой К.

Остаток P4 в модифицированном серпине SEQ ID NO: 12 расположен в позиции 379 (355 зрелого белка), остаток P2 расположен в позиции 381 (357 зрелого белка), остаток P1 расположен в позиции 382 (358 зрелого белка), и остаток P1' расположен в позиции 383 (359 зрелого белка).

Модифицированный серпин может обладать по меньшей мере 50% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью дикого типа серпина дикого типа, например зрелая последовательность серпина любой из SEQ ID NO: 1-11, предпочтительно SEQ ID NO: 1 или 7, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Например, модифицированный серпин может содержать аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 50% идентичностью последовательности с остатками 25-418 SEQ ID NO: 12, где остаток P4 в RCL модифицированного серпина представляет собой А, остаток P2 представляет собой К, P1 представляет собой Р и остаток P1' представляет собой К.

Идентичность последовательности обычно определяют согласно алгоритму GAP (Wisconsin GCG package, Accelrys Inc, San Diego USA). GAP использует алгоритм Нидельмана и Вюнша для сравнения двух полных последовательностей, которые максимизируют число совпадений и минимизируют число

пропусков. В целом, применяют параметры по умолчанию, со штрафом за пропуск в последовательности = 12 и штрафом за расширение пропуска = 4.

Применение GAP может быть предпочтительным, но могут быть применены другие алгоритмы, например BLAST (в которых используется способ Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (в которых используется способ Пирсона и Липмана (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), или алгоритм Смита-Ватермана (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), или программа TBLASTN, Altschul et al. (1990) supra, обычно с применением параметров по умолчанию. В частности, может быть применен алгоритм psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). Идентичность и сходство последовательностей могут быть определены при помощи программного обеспечения Genomequest™ (Gene-IT, Worcester MA USA).

Сравнения последовательностей предпочтительно проводят в отношении всей длины последовательности, описанной в данном документе.

Предпочтительно модифицированный серпин-проокоагулянт, как описано в данном документе, содержит консенсус RCL P17 E, P16 S/E/K/R, P15 G, P14 T/S, P12-P9 (A/G/S)<sub>4</sub>.

Модифицированный серпин может дополнительно содержать один или более остатков, которые сохранены в последовательностях серпина дикого типа. Например, модифицированный серпин может содержать несколько или все из следующих остатков (пронумерованных согласно их положению в  $\alpha_1$ AT):

33F, 49N,

53S, 54P, 56S, 61L, 67G, 72T, 80L, 130F, 147F, 157I, 158N, 161V, 165T, 167G, 169I, 180T, 184L, 186N, 190F, 191K, 192G, 194W, 198F, 203T, 208F, 218V, 220M, 221M,

277Y, 254L, 255P, 289P, 290K, 299L, 303L, 307G, 312F, 316A, 327L, 334H, 342E,

344G, 347A, 369P, 370F, 383L, 384F, 386G и 391P (Irving et al 2008).

Соответствующие сохраненные остатки в других последовательностях серпина могут быть легко определены при помощи анализа стандартного секвенирования. Мутации или вариации вне RCL модифицированного серпина могут включать замещение одного или более остатков Cys в модифицированном серпине, такого как остаток C232 (нумерация согласно зрелой последовательности)  $\alpha_1$ AT, для предупреждения образования дисульфидного мостика или других модификаций; удаление или замену остатков на N-конце последовательности дикого типа, например, для содействия экспрессии; мутацию или модификацию остатков в гепаринсвязывающих сайтах модифицированных серпинов (т.е. спираль D или спираль H) с целью изменения гепаринсвязывающей активности модифицированного серпина.

В некоторых воплощениях модифицированный серпин может быть N-терминально укорочен относительно серпина дикого типа. Например, модифицированный серпин может быть укорочен на 10-30 остатков на N-конце, предпочтительно приблизительно на 20 остатков.

Один или более остатков в модифицированном серпине могут быть ненатуральными аминокислотами, модифицированными аминокислотами или D-аминокислотами. Применение таких аминокислот хорошо известно специалистам в области техники.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, может демонстрировать вторичную структуру серпина дикого типа, например модифицированный серпин может демонстрировать структуру, содержащую 3  $\beta$ -складчатых слоя, 8-9  $\alpha$ -спиралей и гибкую RCL, состоящую из приблизительно 20 остатков.

В некоторых предпочтительных воплощениях модифицированный серпин может состоять из аминокислотной последовательности серпина дикого типа с одной или более мутациями в петле реактивного центра (RCL), как описано в данном документе.

Предпочтительно модифицированный серпин является неиммуногенным для человека. Например, серпин дикого типа может представлять собой серпин человека, предпочтительно серпин плазмы человека.

Серпин дикого типа может представлять собой  $\alpha_1$ -антихимотрипсин (SERPINA3),  $\alpha_2$ -антiplазмин (SERPINF2) антитромбин (ATIII) (SERPINC1), гепариновый кофактор II (HCII) (SERPIND1), ингибитор протеина C (PCI) (SERPINA5),  $\alpha_1$ -антитрипсин ( $\alpha_1$ AT) (SERPINA1), каллистатин (SERPINA4), ингибитор активатора плазминогена 1 (SERPINE1), ингибитор C1-эстеразы (SERPING1), протеазу нексин 1 (SERPINE2) или протеин Z-зависимый ингибитор (SERPINA10) (Whisstock et al., JBC. 285 32 24307-24312, Rau et al., Journal of Thrombosis and Hemostasis, 5 (Suppl. 1): 102-115, Huntington, Journal of Thrombosis and Hemostasis, 9 (Suppl. 1): 26-34).

Предпочтительно серпин дикого типа представляет собой ATIII, HCII, PCI или  $\alpha_1$ AT, наиболее предпочтительно PCI или  $\alpha_1$ AT (Huntington et al., Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 113-121; Li et al., JBC.283 51 36039-36045; and Li et al., PNAS 2008 105 4661-4666).

$\alpha_1$ -Антихимотрипсин (SERPINA3; Gene ID 12) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_001076.2 GI:50659080 (SEQ ID NO: 2) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_001085.4 GI:73858562.

Ингибитор C1-эстеразы (SERPING1; Gene ID 710) может обладать референсной аминокислотной

последовательностью NP\_000053.2 GI:73858568 (SEQ ID NO: 3) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000062.2 GI:73858567.

$\alpha_2$ -Антиплазмин (SERPINF2 Gene ID 5345) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_000925.2 GI:115583663 (SEQ ID NO: 4) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_001165920.1 GI:260064047.

Антитромбин (ATIII) (SERPINC1 Gene ID 462) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_000479.1 GI:4502261 (SEQ ID NO: 5) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000488.3 GI:254588059.

Гепариновый кофактор II (HCII) (SERPIND1 Gene ID3053) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_000176.2 GI:73858566 (SEQ ID NO: 6) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000185.3 GI:73858565.

Ингибитор протеина C (PCI) (SERPINA5 Gene ID 5104) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_000615.3 GI:194018472 и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000624.5 GI:401782581. В некоторых предпочтительных воплощениях ингибитор протеина C (PCI) может представлять собой аллельный вариант, получившийся в результате замены в SNP (однокулеотидный полиморфизм) rs6115, VAR\_013081 (вариант S45N, пронумерованный согласно зрелому белку, включающему пропептид) и имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. Остатки 1-19 SEQ ID NO: 1 соответствуют сигнальной последовательности. В плазме PCI может существовать в полноразмерной форме, которая включает пропептид из остатков 20-25 SEQ ID NO: 1 (т.е. остатки 20-406 SEQ ID NO: 1) или N-терминально расщепленную форму, которая утратила пропептид (т.е. остатки 26-406 SEQ ID NO: 1).

$\alpha_1$ -Антитрипсин ( $\alpha_1$ AT) (SERPINA1 Gene ID 5265) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_000286.3 GI:50363217(SEQ ID NO: 7) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000295.4 GI:189163524.

Каллистатин (SERPINA4 Gene ID 5267) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_006206.2 GI:21361302(SEQ ID NO: 8) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_006215.2 GI:21361301.

Ингибитор активатора плазминогена 1 (SERPINE1 Gene ID 5054) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_000593.1 GI:10835159 (SEQ ID NO: 9) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_000602.4 GI:383286745.

Протеин Z-зависимый ингибитор (PZI) (SerpineA10; Gene ID 51156) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_057270.1 GI:7705879 (SEQ ID NO: 10) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_016186.2 GI:154759289.

Протеаза нексин 1 (PN1) (SerpineE2; Gene ID 5270) может обладать референсной аминокислотной последовательностью NP\_001130000.1 GI:24307907, NP\_001130002.1 GI:211904152 или NP\_006207.1 GI:211904156 (SEQ ID NO: 11) и может кодироваться референсной нуклеотидной последовательностью NM\_001136528.1 GI:211904151, NM\_001136530.1 GI:211904155 или NM\_006216.3 GI:211904150.

Остатки P1', P1, P2 и P4, которые могут быть мутированы, как описано выше, отмечены жирным в SEQ ID NOS: 1-11.

Одна или более мутаций в RCL изменяют специфичность модифицированного серпина относительно немодифицированного серпина дикого типа. Модифицированный серпин проявляет повышенную селективность в отношении протеаз-антикоагулянтов больше чем в отношении протеаз-прокоагулянтов по сравнению с серпином дикого типа.

Предпочтительно одна или более мутаций в RCL повышают ингибирование APC модифицированным серпином по сравнению с ингибированием других протеаз коагуляции, в частности одной или более протеаз-прокоагулянтов из тромбина, fXa, fVIIa, fIXa и fXIa.

Например, одна или более мутаций в RCL модифицированного серпина могут повышать ингибирование APC модифицированным серпином по сравнению с ингибированием тромбина. Селективное ингибирование APC в отношении тромбина может быть повышено в присутствии или отсутствие гепарина.

Кроме того, одна или более мутаций в RCL модифицированного серпина могут повышать ингибирование APC модифицированным серпином относительно ингибирования 1, 2, 3 или всех 4 протеаз-прокоагулянтов fXa, fVIIa, fIXa и fXIa.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, проявляет более сильное ингибирование APC относительно тромбина и других протеаз-прокоагулянтов, чем немодифицированный серпин дикого типа.

Модифицированный серпин может проявлять более сильное ингибирование APC по сравнению с ингибированием тромбина. Например, ингибирование APC модифицированным серпином может быть по меньшей мере в 5 раз сильнее, по меньшей мере в 10 раз сильнее, по меньшей мере в 100 раз сильнее или по меньшей мере в 1000 раз сильнее, чем ингибирование тромбина модифицированным серпином. В некоторых воплощениях модифицированный серпин может ингибировать APC с константой скорости второго порядка ( $k_2$ ), которая по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по

меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем константа скорости второго порядка для ингибиования тромбина. Предпочтительно стехиометрия ингибиования модифицированного серпина для APC составляет 1.

Предпочтительно модифицированный серпин, как описано в данном документе, может связывать и ингибировать APC, но не проявляет связывания или ингибиования или практически не проявляет связывания или ингибиования тромбина.

Одна или более мутаций в RCL также могут усиливать ингибиование APC относительно ингибиования 1, 2, 3 или всех 4 fVIIa, fIXa, fXa и fXIa. Ингибиование APC относительно fVIIa, fIXa, fXa и/или fXIa может быть повышенено в присутствии или отсутствие гепарина.

Например, модифицированный серпин может проявлять более сильное ингибиование APC относительно 1, 2, 3 или всех 4 из fVIIa, fIXa, fXa и fXIa, чем серпин дикого типа.

Модифицированный серпин может ингибировать APC сильнее, чем он ингибирует fVIIa. Например, ингибиование APC модифицированным серпином может быть по меньшей мере в 2 раза сильнее, по меньшей мере в 10 раз сильнее, по меньшей мере в 100 раз сильнее или по меньшей мере в 1000 раз сильнее, чем ингибиование fVIIa модифицированным серпином. Модифицированный серпин ингибирует APC с константой скорости второго порядка ( $k_2$ ), которая по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз большей, чем константа скорости второго порядка для ингибиования fVIIa.

Модифицированный серпин может ингибировать APC сильнее, чем он ингибирует fIXa. Например, ингибиование APC модифицированным серпином может быть по меньшей мере в два раза сильнее, по меньшей мере в 10 раз сильнее, по меньшей мере в 100 раз сильнее или по меньшей мере в 1000 раз сильнее, чем ингибиование fIXa модифицированным серпином. Модифицированный серпин ингибирует APC с константой скорости второго порядка ( $k_2$ ), которая по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше, по меньшей мере в 1000 раз больше, чем константа скорости второго порядка для ингибиования fIXa.

Модифицированный серпин может ингибировать APC сильнее, чем он ингибирует fXa. Например, ингибиование APC модифицированным серпином может быть по меньшей мере в 1,5 раза сильнее, по меньшей мере в 2 раза сильнее, по меньшей мере в 10 раз сильнее, по меньшей мере в 100 раз сильнее или по меньшей мере в 1000 раз сильнее, чем ингибиование fXa модифицированным серпином. Модифицированный серпин ингибирует APC с константой скорости второго порядка ( $k_2$ ), которая по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем константа скорости второго порядка для ингибиования fXa.

Модифицированный серпин может ингибировать APC сильнее, чем он ингибирует fXIa. Например, ингибиование APC модифицированным серпином может быть по меньшей мере в 2 раза сильнее, по меньшей мере в 10 раз сильнее, по меньшей мере в 100 раз сильнее или по меньшей мере в 1000 раз сильнее, чем ингибиование fXIa модифицированным серпином. Модифицированный серпин ингибирует APC с константой связывания второго порядка ( $k_2$ ), которая по меньшей мере в два раза больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем константа связывания второго порядка для ингибиования fXIa.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, может быть частью слитого белка, который содержит одну или более гетерологичные аминокислотные последовательности дополнительно к последовательности модифицированного серпина. Например, слитый белок, содержащий модифицированный серпин, может дополнительно содержать один или более дополнительных доменов, которые улучшают устойчивость, фармакокинетические свойства, специфичность, аффинность, очистку и продуцирование модифицированного серпина.

Приемлемые дополнительные домены включают Fc домены иммуноглобулина. Fc домены иммуноглобулина хорошо известны в области техники и включают Fc домен IgG1 человека. Fc домен иммуноглобулина человека может быть расположен на N- или C-конце модифицированного серпина.

Модифицированные серпины, как описано в данном документе, могут быть получены при помощи синтетических и рекомбинантных способов, стандартных в области техники.

В некоторых воплощениях модифицированный серпин может быть получен в виде слитого белка, дополнительно содержащего аффинную метку, которая может, например, быть полезной при очистке. Аффинная метка является гетерологичной пептидной последовательностью, которая формирует один член специфичной пары связывания. Полипептиды, содержащие метку, могут быть очищены посредством связывания другого члена специфичной пары связывания с полипептидом, например, в колонке для аффинной хроматографии. Например, последовательность метки может формировать эпигоп, который связывается молекулой антитела.

Приемлемые аффинные метки включают, например, глутатион-S-трансферазу (GST), домен, связывающий мальтозу (MBD), MRGS(H)<sub>6</sub>, DYKDDDDK (FLAG<sup>TM</sup>), T7-, S- (KETAAAKFERQHMDS), поли-Arg (R<sub>5-6</sub>), поли-His (H<sub>2-10</sub>), поли-Cys (C<sub>4</sub>) поли-Phe (F<sub>11</sub>), поли-Asp (D<sub>5-16</sub>), SUMO метку (экспрессионная система Invitrogen Champion pET SUMO), Strept-метку II (WSHPQFEK), c-мус (EQKLISEEDL), метку

Influenza-HA (Murray, P.J. et al. (1995) Anal Biochem 229, 170-9), метку Glu-Glu-Phe (Stammers, D.K. et al. (1991) FEBS Lett 283, 298-302). Tag 100 (Qiagen; 12 аа метку, полученную из митоген-активированной протеинкиназы (MAP) 2 млекопитающего), Cruz tag 09™ (MKAЕFRRQESDR, Santa Cruz Biotechnology Inc.) и Cruz tag 22™ (MRDALDRLDRLA, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Известные последовательности меток приведены в Терре (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 523-533. В предпочтительных воплощениях может быть использована метка поли-His, такая как (H)<sub>6</sub>, метка His-SUMO (экспрессионная система Invitrogen Champion pET SUMO) или MRGS(H)<sub>6</sub>.

Последовательность аффинной метки может быть отделена от модифицированного серпина после очистки, например, при помощи сайт-специфичных протеаз.

В некоторых воплощениях модифицированный серпин может быть соединен с соответствующим сигнальным лидирующим пептидом для направления секреции слитого полипептида из клетки в культуральную среду. Диапазон приемлемых сигнальных лидирующих пептидов известен в области техники. Сигнальный лидирующий пептид может представлять собой сигнальную последовательность серпина или может быть гетерологичен модифицированному серпину, т.е. он может представлять собой сигнальную последовательность не серпина. Например, могут быть применены сигнальная последовательность α-фактора или сигнальная последовательность BiP. Предпочтительно сигнальный пептид удаляют посттрансляционным процессингом после экспрессии полипептида.

Модифицированные серпины, как описано в данном документе, могут быть выделены, т.е. очищены от примесей, таких как немодифицированные серпины и другие полипептиды и/или компоненты сыворотки.

Модифицированные серпины, как описано в данном документе, могут ингибировать одну или более активностей активированного протеина C (APC). Например, модифицированные серпины, как описано в данном документе, могут ингибировать протеолитическое расщепление одного или более субстратов APC, такого как fVa или fVIIIa. Например, связывание модифицированного серпина с APC может приводить по меньшей мере к 5-кратному, по меньшей мере 10-кратному или по меньшей мере 15-кратному снижению протеолитического расщепления fVa, fVIIIa и/или другого субстрата APC. В некоторых воплощениях связывание APC модифицированным серпином может приводить к недetectируемому расщеплению субстрата fVa или fVIIIa APC.

Способы измерения активности APC, например, посредством измерения протеолитического расщепления субстратов APC *in vitro* являются стандартными в области техники и описаны в данном документе. Исследования, пригодные для применения с целью определения активности APC, включают стандартные кинетические исследования, например для измерения констант скоростей, и исследования коагуляции, включающие исследования образования тромбина (TGA).

Способы измерения активности протеаз-прокоагулянтов, например, посредством измерения протеолитического расщепления хромогенных субстратов *in vitro* являются стандартными в области техники и описаны в данном документе. Исследования, пригодные для применения с целью определения протеазной активности, включают стандартные кинетические исследования, например для измерения констант скорости, и исследования коагуляции, включающие исследования образования тромбина (TGA), исследования протромбинового времени (PT) и исследования активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT).

В некоторых воплощениях модифицированные серпины, как описано в данном документе, могут быть дополнительно модифицированы посредством химической модификации, например посредством пегилирования или посредством включения в липосому, для улучшения их фармацевтических свойств, например увеличением периода полужизни *in vivo*.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, может быть прикреплен к одному или более полиэтиленгликолю (ПЭГ) или другим группам для увеличения периода полужизни *in vivo* модифицированного серпина (Cantin et al., 2002, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 27; 659-665). Например, модифицированный серпин может быть монопегилированным или полипегилированным (например, с 2-6 ПЭГ группами). Приемлемые способы пегилирования хорошо известны в области техники.

Влияние модифицированного серпина на коагуляцию и кровотечение может быть определено. Пригодные способы являются стандартными в области техники. Например, влияние модифицированного серпина на образование тромбина может быть определено при помощи исследования образования тромбина (TGA) или исследования активированного частичного тромбопластинового времени или исследование протромбинового времени, описанного в данном документе. Приемлемые модели *in vivo* включают модели лазерного повреждения артериолы кремастера, модели повреждения сонной артерии FeCl<sub>3</sub> и исследования с отрезанием хвоста, как описано в данном документе. Другие приемлемые модели коагуляции хорошо известны в области техники.

Другие аспекты изобретения предлагают нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный серпин, как описано выше, и вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту.

Могут быть выбраны или сконструированы приемлемые вектора, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, фрагменты терминатора,

последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности при необходимости. Предпочтительно вектор содержит соответствующие регуляторные последовательности для управления экспрессией нуклеиновой кислоты в клетках млекопитающих. Вектор также может содержать последовательности, такие как точки начала репликации, промоторные участки и селектируемые маркеры, которые делают возможной их селекцию, экспрессию и репликацию в бактериальных хозяевах, таких как *E. coli*.

Вектора могут представлять собой плазмиды, вирусы, например фаги, или фагмиды при необходимости. Более подробно см., например, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3<sup>rd</sup> edition, Russell et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Многие известные способы и протоколы манипуляции с нуклеиновой кислотой, например получение конструктов нуклеиновых кислот, мутагенез, секвенирование, введение ДНК в клетки и генная экспрессия, подробно описаны в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. John Wiley & Sons, 1992.

Нуклеиновая кислота или вектор, как описано в данном документе, могут быть введены в клетку-хозяин.

Другой аспект изобретения предлагает рекомбинантную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор, который экспрессирует полипептид, содержащий или состоящий из модифицированного серпина, как описано выше.

Диапазон клеток-хозяев, приемлемый для продуцирования рекомбинантных модифицированных серпинов, хорошо известен в области техники. Приемлемые клетки-хозяева могут включать клетки прокариот, в частности бактерий, таких как *Escherichia coli* и *Lactococcus lactis*, и эукариотические клетки, включающие клетки млекопитающих, такие как СНО и СНО-производные клеточные линии (Lec cells), HeLa, COS, HEK293 и HEK-EBNA клетки, клетки амфибий, такие как ооциты Хенорус, клетки насекомых, таких как *Trichoplusia ni*, Sf9 и Sf21 и клетки дрожжей, таких как *Pichia pastoris*.

Способы введения нуклеиновой кислоты в клетки хорошо известны в области техники, и может быть применен любой подходящий способ в соответствии с конкретными обстоятельствами. Для эукариотических клеток подходящие способы могут включать трансфекцию с фосфатом кальция, диэтиламинотиодекстраном, электропорацию, трансфекцию, опосредованную липосомами, и трансдуцию при помощи ретровируса и другого вируса, например аденоовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса или вируса осповакцины. Для бактериальных клеток подходящие способы могут включать трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофага.

Маркерные гены, такие как гены резистентности или чувствительности к антибиотику, могут быть применены при идентификации клонов, содержащих нужную нуклеиновую кислоту, как хорошо известно в области техники.

Введенная нуклеиновая кислота может локализоваться в экстрахромосомном векторе в клетке или может быть интегрирована в геном клетки-хозяина. Интеграция может быть обеспечена за счет включения последовательностей нуклеиновой кислоты или вектора, которые обеспечивают рекомбинацию, в геном в соответствии со стандартными способами.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный серпин, как описано в данном документе, может содержаться в векторе, пригодном для введения индивидууму, например для применения в качестве генной терапии. Подходящие вектора включают ретровирусные вектора, лентивирусные вектора, аденоассоциированные вирусные вектора.

За введением следует экспрессия нуклеиновой кислоты для продуцирования кодируемого модифицированного серпина. В некоторых воплощениях клетки-хозяина (которые могут включать действительно трансформированные клетки, хотя более вероятно, что клетки будут являться потомками трансформированных клеток) могут быть культивированы *in vitro* в условиях для экспрессии нуклеиновой кислоты, так, что будет продуцироваться кодируемый полипептид серпина. При использовании индуцируемого промотора экспрессия может требовать активации индуцируемого промотора.

Экспрессированный полипептид, содержащий или состоящий из модифицированного серпина, может быть выделен и/или очищен после продуцирования. Это достигается при помощи любого стандартного способа, известного в области техники. Способы очистки рекомбинантных полипептидов хорошо известны в области техники и включают, например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), жидкостную хроматографию быстрого разрешения (ЖХБР) или аффинную хроматографию. В некоторых воплощениях очистку выполняют при помощи аффинной метки на полипептиде, как описано выше.

Другой аспект изобретения предлагает способ получения модифицированного серпина, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный серпин, как описано выше, в клетке-хозяине и необязательно выделение и/или очистку таким образом полученного модифицированного серпина.

Полипептиды, содержащие или состоящие из модифицированного серпина, полученные как описано, могут быть дополнительно изучены, например могут быть определены фармакологические свойства и/или активность. Способы и средства белкового анализа хорошо известны в области техники.

Модифицированный серпин, как описано в данном документе, нуклеиновая кислота, кодирующая

модифицированный серпин, или рекомбинантная клетка, экспрессирующая модифицированный серпин, могут быть полезны при терапии. Например, модифицированный серпин, как описано в данном документе, нуклеиновая кислота, кодирующую модифицированный серпин, могут быть введены индивидууму для лечения кровотечения.

Хотя модифицированный серпин может быть введен отдельно, модифицированные серпины обычно вводят в форме фармацевтической композиции, которая может содержать по меньшей мере один дополнительный компонент помимо модифицированного серпина, например нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный серпин, или рекомбинантную клетку, экспрессирующую модифицированный серпин. Таким образом, фармацевтические композиции могут дополнительно к модифицированному серпину, нуклеиновой кислоте или клетке содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в области техники. Термин "фармацевтически приемлемый" в контексте настоящего документа относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского суждения подходят для контакта с тканями субъекта (например, человека), не вызывая излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, которые соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, вспомогательное вещество и т.д. также должен быть "приемлемым" в отношении совместимости с другими ингредиентами препарата. Конкретная природа носителя и другого материала зависит от пути введения, который может представлять собой болюсный, инфузионный, инъекционный или любой другой приемлемый путь, как обсуждается ниже.

В некоторых воплощениях модифицированные серпины, нуклеиновые кислоты или клетки могут находиться в лиофилизированной форме для разведения перед введением. Например, лиофилизированные серпины могут быть разведены в стерильной воде и смешаны с физиологическим раствором перед введением индивидууму.

Для парентерального, например подкожного или внутривенного введения, например посредством инъекции, фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный серпин, нуклеиновую кислоту или клетку, может быть в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным и обладает приемлемым pH, изотоничностью и устойчивостью. Специалисты в области техники легко могут получить приемлемые растворы с применением, например, изотонических носителей, таких как инъекция хлорида натрия, инъекция Рингера, инъекции раствора Рингера с лактатом. При необходимости могут быть использованы консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки, включая буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как октадецил-диметил-бензил аммония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабены; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3'-пентанол; и метакрезол); полипептиды низкой молекулярной массы; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильтные полимеры, такие как поливинил-пирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрину; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминететрауксусная кислота (ЭДТА); сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковый комплекс); и/или ионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Приемлемые носители, вспомогательные вещества и т.д. могут быть найдены в стандартных фармацевтических текстах, например Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

Фармацевтические композиции и препараты могут быть удобно представлены в виде лекарственных форм и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Такие способы включают стадию приведения в контакт модифицированного серпина с носителем, который включает один или более вспомогательных ингредиентов. В целом, композиции получают посредством равномерного и неразрывного связывания активного соединения с жидкими носителями или мелкодисперсными твердыми носителями или обоими с последующим формированием продукта при необходимости.

Предпочтительно модифицированные серпины, нуклеиновые кислоты или клетки, как описано в данном документе, получают в виде фармацевтической композиции для внутривенного или подкожного введения.

Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный серпин, нуклеиновую кислоту или клетку, может быть введена отдельно или в сочетании с другими средствами лечения, одновременно или последовательно в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

Модифицированный серпин, нуклеиновая кислота или клетка, как описано в данном документе, могут быть применены в способе лечения организма человека или животного, включая терапевтическое и профилактическое или превентивное лечение (например, лечение до наступления состояния у индиви-

дуума для снижения риска состояния, возникающего у индивидуума; задержки его наступления; или уменьшения его тяжести после наступления). Способ лечения может содержать введение модифицированного серпина индивидууму, нуждающемуся в этом.

Подходящий для лечения индивидуум, как описано выше, может являться млекопитающим, таким как грызун (например морская свинка, хомяк, крыса, мышь), представителем мышиных (например, мышь), псовых (например, собака), кошачьих (например, кошка), лошадиных (например, лошадь), приматом, обезьяноподобных (например, обезьяна или человекообразная обезьяна), обезьян (например, игрунка, бабуин), человекообразных обезьян (например, горилла, шимпанзе, орангутанг, гиббон) или человеком.

В некоторых предпочтительных воплощениях индивидуум представляет собой человека. В других предпочтительных воплощениях млекопитающие, не являющиеся человеком, в частности млекопитающие, которых обычно используют в качестве моделей для демонстрации терапевтической эффективности у людей (например, мышиные, приматы, свиньи, псовые или кролики) могут быть использованы. Ингибирование APC человека и мыши модифицированными серпинами без ингибирования тромбина человека или мыши показано ниже.

Введение обычно производится в "терапевтически эффективном количестве" или "профилактически эффективном количестве", этого достаточно для пользы пациента. Такая польза может представлять собой, по меньшей мере, улучшение по меньшей мере одного из симптомов. Фактическое вводимое количество, скорость и временная динамика введения будут зависеть от природы и тяжести того, что подлежит лечению, конкретного млекопитающего, подлежащего лечению, клинического состояния отдельного пациента, причины нарушения, места доставки композиции, способа введения, планирования введения и других факторов, известных практикующим врачам.

Композиция может быть введена отдельно или в сочетании с другими средствами лечения, одновременно или последовательно в зависимости от обстоятельств индивидуума, подлежащего лечению.

Назначение лечения, например решения по дозировке и т.д., находятся под ответственностью врачей общей практики и других врачей и может зависеть от тяжести симптомов и/или прогресса заболевания, подлежащего лечению. Соответствующие дозы терапевтических полипептидов хорошо известны в области техники (Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Могут быть применены конкретные дозировки, которые могут быть указаны в данном документе или в Настольном справочнике врача (2003) в зависимости от типа вводимого лекарственного препарата. Терапевтически эффективное количество или приемлемая доза модифицированного серпина могут быть определены посредством сравнения его активности *in vitro* и *in vivo* у животной модели. Способы экстраполяции эффективных доз у мышей и других исследуемых организмов на людей известны. Точная доза будет зависеть от числа факторов, включая то, необходим ли модифицированный серpin для профилактики или для лечения, размер и расположение области, подлежащей лечению, точную природу модифицированного серпина и природу любой детектируемой метки или другой молекулы, прикрепленной к модифицированному серпину.

Обычная доза модифицированного серпина будет находиться в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг, например от 1 до 80 мг/кг. Например, доза в диапазоне от 100 мкг до 1 г может использоваться системно и от 1 мкг до 1 мг для местного применения. Может быть введена начальная более высокая ударная доза с последующими одной или несколькими более низкими дозами. Это однократная доза для лечения взрослого пациента, которая может быть пропорционально изменена для детей и младенцев, а также изменена для других форм модифицированного серпина пропорционально молекулярной массе. Лечение может повторяться ежедневно, дважды в неделю, еженедельно или ежемесячно по решению врача. Курс лечения для индивидуума может зависеть от фармакокинетических и фармакодинамических свойств композиции модифицированного серпина, пути введения и природы состояния, подлежащего лечению.

Лечение может быть периодическим, и период между введениями может составлять приблизительно одну неделю или более, например приблизительно две недели или более, приблизительно три недели или более, приблизительно четыре недели или более, приблизительно пять недель или более, приблизительно шесть недель или более. Например, лечение может проводиться каждые две-четыре недели или каждые четыре-восемь недель. Лечение может проводиться до и/или после операции и/или может вводиться или применяться непосредственно в анатомическом участке травмы, хирургического лечения или инвазивной процедуры. Приемлемые препараты и пути введения описаны выше.

В некоторых воплощениях модифицированные серпины, как описано в данном документе, могут вводиться в качестве подкожной инъекции. Подкожные инъекции могут вводиться при помощи автоматического шприца, например, в течение долгого срока профилактики/лечения.

В некоторых предпочтительных воплощениях терапевтический эффект модифицированного серпина может сохраняться в течение нескольких периодов полужизни в зависимости от дозы.

Модифицированные серпины, описанные в данном документе, ингибируют APC без ингибирования или практически без ингибирования факторов-прокоагулянтов, таких как тромбин, и могут быть полезны при лечении кровотечения и нарушений свертываемости крови; в частности нарушений, вызванных пониженным образованием тромбина или повышенной активностью APC антикоагулянтного пути.

Гемостаз является нормальной реакцией коагуляции на травму, т.е. предотвращение кровотечения или кровоизлияния, например, из поврежденных кровеносных сосудов. Гемостаз останавливает кровотечение и кровоизлияние из кровеносных сосудов тела. Модифицированные серпины могут обеспечить гемостаз, т.е. они могут обеспечить или усилить остановку кровотечения или кровоизлияния из кровеносных сосудов тела, например, у индивидуумов с нарушением свертываемости крови или травмой.

Аспекты изобретения предлагают модифицированный серпин, как описано в данном документе, для применения в способе лечения организма человека или животного; модифицированный серпин, как описано в данном документе, для применения в способе лечения кровотечения или обеспечения гемостаза; применение модифицированного серпина, как описано в данном документе, для изготовления лекарственного средства для лечения кровотечения или обеспечения гемостаза; и способ лечения кровотечения или обеспечения гемостаза, содержащий введение модифицированного серпина, как описано в данном документе, индивидууму, нуждающемуся в этом.

Кровотечение может включать кровотечение или кровоизлияние из кровеносных сосудов тела.

Индивидуумы, подходящие для лечения модифицированным серпином, как описано в данном документе, могут страдать нарушением свертываемости крови.

Нарушения свертываемости крови могут быть обусловлены или ассоциированы с пониженным образованием тромбина или повышенной активностью АРС антикоагулянтного пути.

Нарушения свертываемости крови могут включать любое наследственное или приобретенное нарушение свертываемости крови, при котором понижено образование тромбина, понижено образование фибринового сгустка или понижена стабильность сгустка. Например, нарушения свертываемости крови могут включать врожденные дефициты факторов VII, VIII, X, IX, XI и XIII; комбинированный дефицит V и VIII; дефицит протромбина; дефицит фибринина и редкие дефициты других факторов коагуляции; гемофилии A, B и C; повышенное кровотечение, ассоциированное с гиперфибринолизисом; повышенное кровотечение вследствие пониженного содержания тромбоцитов или пониженной функции тромбоцитов и болезнь фон Виллебранда.

Приобретенные нарушения свертываемости крови могут включать "коагулопатию разведения", ассоциируемую с большой кровопотерей, кровотечение в результате травмы и операции и эффекты антикоагулянтной терапии.

В некоторых воплощениях индивидуум может быть резистентен к экзогенным факторам коагуляции, таким как экзогенные fVIII или fIX. Например, экзогенные fVIII или fIX могут вызывать иммунную реакцию у индивидуума, например выработку ингибиторных аллоантител.

Индивидуум, подходящий для лечения модифицированным серпином, как описано в данном документе, может иметь приобретенное нарушение свертываемости крови, такое как кровотечение, связанное с травмой, операцией или антикоагулянтной терапией.

Например, индивидуум, подходящий для лечения модифицированным серпином, как описано в данном документе, может иметь травму или возможно перенес или переносит операцию или антикоагулянтную терапию. Подходящие индивидуумы могут страдать кровотечением или иметь риск кровотечения из одного или более кровеносных сосудов тела.

В некоторых воплощениях модифицированный серпин, как описано в данном документе, может быть полезен при предупреждении или лечении i) кровотечения у пациентов с аллоантителами к фактору коагуляции; ii) кровотечения у пациентов с высоким риском развития ингибитора, например, для предотвращения развития аллоантител; iii) кровотечения у пациентов с дефицитом фактора VIII в отсутствие ингибиторов; iv) кровотечения у пациентов с врожденными нарушениями свертываемости крови, например врожденными нарушениями свертываемости крови, для которых в настоящее время не существует рекомбинантной оптимальной заместительной терапии, такими как сильный дефицит фактора VII, дефицит фактора XI, комбинированный дефицит VIII и V, дефицит фактора X и дефицит фактора V; v) кровотечения у пациентов с гемофилией, например пациентов, для которых заместительная терапия не подходит или является недоступной; или vi) приобретенного кровотечения, включая кровотечение, связанное с травмой, операцией и антикоагулянтной терапией.

Другие аспекты изобретения предлагают применение модифицированного серпина, как описано в данном документе, в качестве прокоагулянта и применение модифицированного серпина для ингибирования АРС при лечении кровотечения.

Различные дополнительные аспекты и воплощения настоящего изобретения станут ясны специалистам в области техники в свете настоящего описания.

Другие аспекты и воплощения изобретения предлагают аспекты и воплощения, описанные выше термином "содержащий", который замещен термином "состоящий из", и аспекты и воплощения, описанные выше термином "содержащий", который замещен термином "в основном состоящий из".

Следует понимать, что заявка раскрывает все комбинации любого из упомянутых выше аспектов и воплощений, описанных выше, если контекст не требует иного. Аналогично, заявка раскрывает все комбинации предпочтительных и/или необязательных признаков либо самих по себе, либо в сочетании с любыми другими аспектами, если контекст не требует иного.

Модификации вышеупомянутых воплощений, дополнительные воплощения и их модификации ста-

нут ясны специалистам в области техники при прочтении данного описания, и как таковые они находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Все документы и записи базы данных последовательностей, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

"И/или" при употреблении в данном документе следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух конкретных признаков или компонентов в сочетании или отсутствие другого. Например, "А и/или В" должны быть рассмотрены как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый был упомянут отдельно в данном документе.

Определенные аспекты и воплощения изобретения сейчас будут проиллюстрированы на примере и со ссылкой на фигуры, описанные выше, и таблицы, описанные ниже.

Табл. 1 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования тромбина и APC посредством A22 PCI (N-терминально укороченный PCI, начиная с Ala22, нумерация согласно зрелой белковой последовательности, включающей пропептид), FL  $\alpha_1$ AT Pitts (полноразмерный  $\alpha_1$ AT с мутацией P1R Питтсбург (Pitts)) и их вариантами. Стандартные ошибки показаны. \*Константу скорости ингибиования тромбина посредством варианта P2KP1' PCI оценивают как после начального ингибиования, реакции очевидно не достигают полного ингибиования, возможно из-за движения серпина вниз по субстратному пути или диссоциации ковалентного ингибиторного комплекса серпин:протеаза.

Табл. 2 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования тромбина и APC посредством PCI и вариантов в присутствии гепарина. Стандартные ошибки показаны. \*Константу скорости ингибиования тромбина посредством варианта P2KP1'K PCI оценивают исходя из начального наклона графика остаточной активности тромбина в зависимости от времени. Полное ингибиование не достигается, возможно, из-за движения серпина вниз по субстратному пути или диссоциации ковалентного ингибиторного комплекса серпин:протеаза.

Табл. 3 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования fXa посредством  $\alpha_1$ AT Pitts и PCI и их вариантов. Стандартные ошибки показаны.

Табл. 4 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования fXIa посредством PCI и варианта PCI P2KP1'K. Ингибиование APC показано для сравнения (исходя из табл. 1). Стандартные ошибки показаны.

Табл. 5 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования тромбина и APC посредством вариантов PCI, образованных при помощи нацеленного случайного мутагенеза. Стандартные ошибки показаны. Константы для WT и P2KP1' PCI показаны для сравнения. \*Константу скорости ингибиования тромбина посредством варианта P2KP1' PCI оценивают как после начального ингибиования, реакции очевидно не достигают полного ингибиования, возможно из-за движения серпина вниз по субстратному пути или диссоциации ковалентного ингибиторного комплекса серпин:протеаза.

Табл. 6 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования FXIa посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S и его варианта P2KP1'K. Ингибиование APC показано для сравнения (исходя из табл. 1). Показаны стандартные ошибки.

Табл. 7 показывает фракцию последовательностей RCL вариантов PCI, определенных посредством нацеленного случайного мутагенеза как более специфичные в отношении ингибиования APC, чем в отношении ингибиования тромбина. Показаны последовательности из начального эксперимента, в котором оценивали 88 мутантов. Остатки P4, P2 и P1', которые варьировали в этом эксперименте, выделены жирным. Последовательности WT PCI и P2KP1'K PCI показаны для сравнения.

Табл. 8 показывает фракцию последовательностей RCL вариантов PCI, определенных посредством нацеленного случайного мутагенеза как более специфичные в отношении ингибиования APC, чем в отношении ингибиования тромбина. Показаны последовательности из более крупного эксперимента, в котором оценивали 460 мутантов. Остатки P4, P2 и P1', которые варьировали в данном эксперименте, выделены жирным. Последовательности WT PCI и P2KP1'K PCI приведены для сравнения.

Табл. 9 показывает фракцию последовательностей RCL вариантов  $\alpha_1$ AT, определенных посредством нацеленного случайного мутагенеза как более специфичные в отношении ингибиования APC, чем в отношении ингибиования тромбина. Последовательности показаны в сравнении как с WT  $\alpha_1$ AT, так и с  $\alpha_1$ AT Pitts. Остатки P2 и P1' показаны жирным, остатки P1 подчеркнуты. Префиксы показывают библиотеку происхождения для конкретного мутанта, где мутанты, отмеченные P2.nr., происходят из библиотеки варианта P2, P1'.nr. происходят из библиотеки варианта P1' и мутанты, обозначенные 1-5.nr. происходят из значений 1-5 библиотеки варианта P2P1'.

Табл. 10 показывает константы скорости второго порядка ингибиования тромбина и APC посредством набора вариантов  $\alpha_1$ AT, определенных посредством нацеленного случайного мутагенеза как более специфичные к APC, чем к тромбину. Приведены стандартные ошибки. Константы скорости второго порядка для ингибиования тромбина и APC посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K и FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S приведены для сравнения.

Табл. 11 показывает результаты РТ и аPTT анализов для исследования ингибиования протеаз-прокоагулянтов вариантами случайного мутагенеза по FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S окружению. РТ анализы про-

водили при помощи 1/4 разбавленной плазмы для повышения чувствительности анализа и выполняли в трех повторностях, за исключением реакций, показанных для FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2RP1'С, которые проводили в двух повторностях. Показанная ошибка представляет собой стандартное отклонение. аPTT анализы представляли собой единичные эксперименты, ошибка не показана. Как для РТ, так и аPTT в качестве контроля применяли только буфер, где вместо белка к плазме добавляли буфер (трисбуферизированный раствор). Повышения в РТ или аPTT в отношении контроля являются показателем ингибиования протеаз-прокоагулянтов. Как для РТ, так и для аPTT анализов концентрация мутантов серпина составила 5 мкМ. Для сравнения мутанты P2K и P1'К показаны как среднее трех повторностей. Как видно из констант скорости ингибиования в табл. 1 и 3, данные мутанты проявляют более высокую специфичность к APC, чем к тромбину, но при этом существенно ингибируют fXa. Они, следовательно, являются хорошим сравнением ингибиования протеаз-прокоагулянтов отличных от тромбина. НО означает не определено.

Табл. 12 показывает константы скорости второго порядка для ингибиования fXa посредством вариантов  $\alpha_1$ AT, полученных нацеленным случайным мутагенезом. Мутанты, исследованные в данном документе, показали более высокую специфичность к APC, чем к тромбину, существенное ингибиование APC и отсутствие пролонгации РТ. Также большинство показало лишь незначительную пролонгацию аPTT. В связи с данными свойствами они были выбраны для дальнейшего анализа. Для сравнения ингибиование fXa посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S и FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'К также показано (исходя из табл. 3).

Табл. 13 показывает краткое описание характеристик еще двух мутантов  $\alpha_1$ AT, обнаруженных за счет комбинирования информации рационального и случайного мутагенеза. FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S и FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'К C232S показаны для сравнения (данные из табл. 1 и фиг. 5). аPTT для P2RP1'Q и P2KP1'Q представляют собой среднее четырех отдельных измерений, показанная ошибка представляет собой стандартное отклонение. Значение, полученное для плазмы с буфером, показано в скобках, также в качестве ошибки приведено стандартное отклонение. аPTT, показанные для Pitts и P2KP1'К, являются результатом по меньшей мере трех отдельных измерений, показанная ошибка представляет собой стандартное отклонение. Значение, приведенное в скобках, представляет собой значение, полученное для плазмы с буфером, показанное со стандартным отклонением в качестве ошибки. Все аPTT получали при помощи конечной концентрации серпина 5 мкМ. FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S в данной концентрации приводил к неспособности плазмы образовывать сгусток. Показанное значение 300 с означает окончание анализа. Константы скорости второго порядка для ингибиования тромбина, APC и fXa посредством вариантов показаны со стандартной ошибкой.

### Эксперименты

Каскад коагуляции и регуляторная роль серпинов в данном каскаде приведены на фиг. 1. Два пути приводят к активации каскада коагуляции: внешний путь (или путь тканевого фактора) и внутренний путь (контактный путь активации). Основным физиологическим путем активации считается внешний путь. В данном пути тканевый фактор (TF) экспонирован на поверхности поврежденного кровеносного сосуда. Затем TF может связывать fVIIa и fVII. TF:fVIIa активирует fVII, а также TF:fVII, спонтанно активируя до TF:fVIIa. TF:fVIIa активирует FX до fXa, что приводит к активированию протромбина до тромбина (Пла); центральной протеазы каскада коагуляции. Тромбин активирует тромбоциты посредством расщепления активируемых протеазами рецепторов (PAR) и расщепляет фибриноген до фибрина. Фибрин перекрестно свит посредством fXIIIa, который как таковой активируется тромбином с образованием стабильного фибринового сгустка. Кроме того, тромбин активирует механизм положительной обратной связи для того, чтобы потенцировать свое собственное образование. Он активирует превращение fVIII в fVIIa и fV в fVa. fVIIa связывается с fXa с образованием внутреннего теназного (Xase) комплекса. Внутренняя теназа активирует больше fX. Данный fXa может связываться с fVa с образованием протромбиназы. Протромбиназа активирует превращение протромбина в тромбин и ответственна за большую часть тромбина, образованного после инициации коагуляции. В дополнение к механизму положительной обратной связи, тромбин также может останавливать свою собственную активацию по механизму отрицательной обратной связи. Когда он связывается со своим кофактором-тромбомодулином (TM), комплекс тромбин:TM может активировать протеин С (PC) до активированного протеина С (APC). APC расщепляет и дезактивирует как fVIIa, так и fVa, эффективно останавливая образование тромбина. Серпины являются важными ингибиторами каскада коагуляции. Ингибирующие действия серпинов ингибитора протеина С (PCI), антиромбина (ATIII), гепаринового кофактора II (НСП) и  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ AT) приведены на фиг. 1.

Далее описано превращение серпинов в специфичные ингибиторы APC для применения в качестве агентов-прокоагулянтов (лечение, профилактика, обходное действие или синергизм) при лечении нарушений свертываемости крови, таких как гемофилия. Описанные в данном документе модификации как для PCI, так и для  $\alpha_1$ AT указывают на верность этого принципа, что небольшие изменения в данных белках могут быть использованы для создания специфичных ингибиторов APC.

PCI был впервые описан в качестве физиологического ингибитора APC и поэтому выступает в ка-

честве начальной точки для данных исследований (Suzuki et al., 1983; 1984). Однако PCI не избирателен и также ингибитирует тромбин, тромбин:TM, fXIIa, fXa и TF:fVIIa (Elisen et al., 1998; Mosnier et al., 2001; Suzuki et al., 1984; Fortenberry et al., 2011; Meijers et al., 1988). Как следствие, PCI может действовать в качестве про- и антикоагулянта. Его активность регулируется за счет связывания с гликозаминогликанами, такими как гепарин и гепаринсульфаты (Pratt & Church, 1992; Pratt et al., 1992; Li & Huntington, 2008). Общее представление роли PCI в каскаде коагуляции см. на фиг. 1.

$\alpha_1$ AT представляет собой естественный ингибитор нейтрофил-эластазы (Kalsheker, 1989). В отличие от других серпинов в каскаде коагуляции, которые содержат или Arg или Leu в P1,  $\alpha_1$ AT вместо этого содержит Met. Это делает его очень слабым ингибитором протеаз коагуляции. Тем не менее, учитывая высокую концентрацию  $\alpha_1$ AT в плазме он, вероятно, ингибитирует APC до физиологически значимой степени (Heeb & Griffin, 1988). Мутагенез по остатку P1 продемонстрировал, что применение Arg или Leu в P1 существенно улучшает ингибирование протеаз коагуляции посредством  $\alpha_1$ AT (Heeb et al., 1990). Примером этого служит вариант  $\alpha_1$ AT Питтсбург (M358R (P1R); Pitts), который вызывает тяжелые нарушения свертываемости крови (Owen et al., 1983).

Для разработки серпинов более специфичных в отношении ингибирования APC, чем протеазы-прокоагулянтов, PCI и  $\alpha_1$ AT Питтсбург (P1R,  $\alpha_1$ AT Pitts) использовали в качестве матричных скффолдов серпина. Все белки, использованные в данном исследовании, были получены из культур *Escherichia coli* (Rosetta2(DE3)pLysS, Novagen) при помощи экспрессионного вектора pETSUMO (Invitrogen) и очищены при помощи комбинации Ni-хроматографии, анионо-обменной хроматографии и, в случае PCI, гепарин-аффинной хроматографии. Метку SUMO затем расщепляли SUMO протеазой и удаляли посредством tandemной Ni-анионо-обменной хроматографии для  $\alpha_1$ AT Питтсбург (Pitts, P1R) и tandemной анионо-обменной-гепарин хроматографии для PCI. Конструкт PCI является N-терминально укороченным, начиная с Ala22 (A22, нумерация согласно зрелой белковой последовательности, начиная с пропептида). Конструкт  $\alpha_1$ AT Pitts (P1R) является полноразмерным (FL) и имеет дополнительную мутацию C232S, исключающую образование межмолекулярной дисульфидной связи и другие модификации в ходе экспрессии и очистки (Yamasaki et al., 2011). Из-за используемого экспрессионного вектора конструкт  $\alpha_1$ AT Pitts имеет Ser (S) в качестве своего первого остатка вместо Glu (E). Мутации C232S и E1S предположительно не изменяют активность  $\alpha_1$ AT.

Остатки Lys вводили в различных позициях в RCL PCI и  $\alpha_1$ AT Питтсбург и полученные мутанты исследовали в отношении ингибирования тромбина и APC. На начальных этапах данного исследования ингибиторы не скринировали или исследовали в отношении их ингибирования других протеаз коагуляции исходя из того, что как только ингибирование тромбина блокировалось в пользу ингибирования APC, ингибитор потенциально мог быть дополнительно модифицирован, если он обладал существенной остаточной ингибирующей активностью по отношению к другим протеазам коагуляции. Остатки RCL пронумерованы согласно номенклатуре Шехтера-Бергерса для серпинов (Schechter & Berger, 1967).

Константы скорости ингибирования тромбина и APC измеряли в условиях псевдо-1-порядка при помощи избытка серпина относительно протеазы (табл. 1). Серпин и протеазу инкубировали вместе в течение различных периодов времени и остаточную активность определяли посредством добавления избытка хромогенного субстрата для протеазы (S2238 для тромбина и S2366 для APC). Затем остаточную активность протеазы измеряли посредством абсорбции при 405 нм. Графики остаточной активности протеазы относительно времени давали наблюдаемую константу скорости  $k_{obs}$ . Константа скорости второго порядка  $k_2$  представляет собой наклон графика  $k_{obs}$  в зависимости от концентрации серпина (рассчитано при помощи линейной регрессионной модели). Стандартные ошибки наклона показаны.

Мутации по лизину, введенные в P2 и P1', были высоко эффективны в повышении специфичности PCI и  $\alpha_1$ AT к APC по сравнению с тромбином для всех вариантов, показанных в табл. 1. Обычно ингибирование тромбина было существенно понижено во всех случаях. Ингибирование APC также было снижено для всех мутантов, но приблизительно до той же степени. Оба серпина изначально ингибировали тромбин лучше, чем APC. Это было изменено для всех исследованных мутантов.

PCI в отличие от  $\alpha_1$ AT связывает гепарин, и это связывание в значительной мере усиливает ингибирование тромбина и APC (Pratt & Church, 1992). Поэтому авторы данного изобретения исследовали ингибирование тромбина и APC посредством P1'K и P2KP1'K PCI мутантов в присутствии гепарина для того, чтобы увидеть, будет ли сохраняться изменение в специфичности, как в табл. 1.

Константы скорости измеряли в условиях псевдо-1-порядка при помощи избытка PCI относительно протеазы. PCI преинкубировали с эквимолярной концентрацией нефракционированного гепарина в течение 30 мин перед экспериментом. PCI:гепарин и протеазу инкубировали вместе в течение различных периодов времени и остаточную активность после определенных временных точек определяли посредством добавления избытка хромогенного субстрата для протеазы в смеси с полибреном для связывания гепарина. Графики остаточной активности протеазы во времени давали наблюдаемую константу скорости  $k_{obs}$ . Константа скорости второго порядка  $k_2$  представляет собой наклон графика  $k_{obs}$  относительно концентрации серпина (рассчитано при помощи линейной регрессионной модели). Показаны стандартные ошибки графика. Значение, рассчитанное для ингибирования тромбина посредством P2KP1'K PCI,

оценивали исходя из начального наклона графика остаточной активности тромбина в зависимости от времени, так как график подтверждал, что полное ингибиование не достигалось. Это может быть обусловлено субстратным путем или диссоциацией комплекса. Константы скорости второго порядка показаны в табл. 2. Что касается ингибиования в отсутствии гепарина, мутанты P1'K и P2KP1'K PCI, в отличие от белка WT, были более специфичны к APC, чем к тромбину (табл. 2).

Данные эксперименты показали, что введение только одной или двух модификаций в RCL серпина было достаточным для прекращения или существенного снижения ингибиования тромбина как в присутствии, так и в отсутствие кофакторов. Ингибиование APC было уменьшено, но все еще оставалось существенным, в частности для вариантов  $\alpha_1$ AT и вариантов PCI в присутствии гепарина. Однако специфичность PCI и  $\alpha_1$ AT Pitts не ограничена тромбином и APC. Оба данных серпина также ингибируют fXa, другую протеазу-прокоагулянт. Для того чтобы не ингибировать коагуляцию, варианты авторов изобретения должны быть более специфичны к APC, чем к fXa. Поэтому авторы изобретения также определяли константы скорости ингибиования PCI и  $\alpha_1$ AT и их вариантов для fXa (табл. 3). Константы скорости измеряли в условиях псевдо-1-порядка, используя избыток серпина относительно протеазы. Серпин и протеазу инкубировали вместе в течение различных периодов времени и остаточную активность определяли посредством добавления излишка хромогенного субстрата (S2222) для протеазы. Графики остаточной активности протеазы относительно времени давали наблюдаемую константу скорости  $k_{obs}$ .

Константа скорости второго порядка  $k_2$  представляет собой наклон графика  $k_{obs}$  в зависимости от концентрации серпина (рассчитано при помощи линейной регрессионной модели). Стандартные ошибки наклона показаны (табл. 3).

Как показано ранее для тромбина, WT PCI ингибировал fXa лучше, чем APC.  $\alpha_1$ AT Pitts ингибирал APC лучше, чем fXa, но ингибиование fXa все еще было существенным. Ингибиование fXa все еще было значительным для P1'K PCI, P2K  $\alpha_1$ AT Pitts и P1'K  $\alpha_1$ AT Pitts (табл. 3). Варианты P2KP1'K  $\alpha_1$ AT Pitts и PCI оба были более специфичны к APC, чем к fXa, с отсутствием или несущественным ингибиением fXa и поэтому были рассмотрены в качестве ведущих кандидатов. Вариант P1'K PCI также представляет интерес, поскольку его ингибиование fXa является очень низким в отсутствие гепарина. Присутствие гепарина существенно увеличивает скорость ингибиования APC, что потенциально может сдвигать соотношение специфичности в пользу APC.

В первую очередь будут обсуждаться ведущие соединения PCI, а затем ведущее соединение  $\alpha_1$ AT.

Для исследования свойств A22 P2KP1'K PCI в более сложной системе плазмы и для исключения любых отрицательных эффектов на протеазы-прокоагулянты проводили анализ протромбинового времени (PT). Данный анализ измеряет время до образования сгустка в плазме после инициации коагуляции по внешнему пути. A22 WT PCI показал небольшое увеличение времени коагуляции, при этом P2KP1'K показал меньшее увеличение в соответствии с пониженной ингибиторной активностью в отношении протеаз-прокоагулянтов (фиг. 2).

Кроме того, авторы исследования хотели исключить любое воздействие мутанта PCI на контактный путь активации коагуляции. С этой целью измеряли константы скорости ингибиования для ингибиования fXIa и проводили aPTT анализ. Данное исследование аналогично PT анализу за исключением того, что оно измеряет коагуляцию, инициированную по внутреннему пути.

Константы скорости ингибиования второго порядка для ингибиования fXIa посредством PCI и варианта P2KP1'K измеряли в условиях псевдо-1-порядка при помощи избытка серпина относительно протеазы. Серпин и протеазу инкубировали вместе в течение различных периодов времени и остаточную активность определяли посредством добавления избытка хромогенного субстрата для протеазы (S2366). Графики остаточной активности протеазы относительно времени давали наблюдаемую константу скорости  $k_{obs}$ . Константа скорости второго порядка  $k_2$  представляет собой наклон графика  $k_{obs}$  в зависимости от концентрации серпина (рассчитано при помощи линейной регрессионной модели). Стандартные ошибки наклона приведены. Ингибиование fXIa посредством A22 P2KP1'K PCI не проходило до завершения в ходе эксперимента, вероятно из-за расщепления серпина протеазой. По сравнению с WT мутант P2KP1'K показал намного более пониженное ингибиование в отношении fXIa и более высокую специфичность к APC, чем к fXIa (табл. 4).

aPTT анализ показал, что WT PCI являлся сильным ингибитором контактного пути активации, вероятно из-за ингибиования fXIa или fXIIa (фиг. 3). Мутант P2KP1'K показал небольшое повышение в aPTT. Однако поскольку контактный путь активации в первую очередь активирует коагуляцию через активацию fXa, ингибиование контактной активации в незначительной степени вероятно будет несущественным при гемофилиях, поскольку при данных состояниях наблюдается либо дефицит основной мишени контактной активации (fIX) либо ее кофактора (fVIII).

В связи с этим результаты, представленные в данном документе, к настоящему времени показывают, что как A22 P1'K PCI, так и A22 P2KP1'K PCI являются перспективными и APC-специфичными ведущими соединениями для разработки агентов обходного действия для лечения гемофилии.

Для получения дополнительных мутантов PCI с большей специфичностью к APC, чем к тромбину,

применили стратегию нацеленного случайного мутагенеза на PCI скаффолде. Целевыми остатками были P4, P2 и P1'. Случайный подход основан на выборе ингибиции APC и направлен против ингибиции тромбина за счет исследования ингибиторной активности бактериальных лизатов после экспрессии PCI в 96-луночном формате.

Исследование калибровали при помощи мутанта PCI, полученного в результате рационального мутагенеза в сочетании с исследованием специфичности, описанным ранее; A22 P2KP1'K PCI. WT PCI применяли в качестве дополнительного контроля. Отрицательный отбор против ингибиции тромбина осуществляли за счет инкубации бактериальных лизатов в течение такого периода времени, что A22 WT PCI показал полное ингибирование и период инкубации, длиющийся до данной временной точки, также был направлен против незначительного ингибирования. Положительный отбор ингибиции APC калибровали так, что и WT и P2KP1'K PCI попадали в промежуточный диапазон APC ингибиторной активности, поэтому авторы изобретения могли определить повышение, а также снижение ингибиции.

При начальном анализе 88 вариантов скринировали в отношении ингибиторной активности к тромбину и APC. Культуры выращивали, индуцировали и белок экспрессировали в 96-луночных планшетах. Клетки лизировали добавлением лизисного буфера и лизаты анализировали в отношении ингибиторной активности к тромбину и APC за счет инкубирования лизатов с протеазой в течение 1 ч для тромбина и 30 мин для APC. Затем остаточную активность протеазы определяли при помощи добавления хромогенного субстрата к протеазе. A22 WT PCI и A22 P2KP1'K PCI использовали в качестве контролей. Любой лизат с более высокой и эквивалентной остаточной активностью тромбина и более низкой или эквивалентной остаточной активностью APC по сравнению с P2KP1'K PCI рассматривали в качестве перспективного APC-специфичного кандидата. Данные последовательности показаны в табл. 7. P4, P2 и P1' позиции выделены жирным.

Мутант с наиболее высокой APC ингибиторной активностью из данного ряда экспериментов (D8; P4QP2RP1'N) предварительно характеризовали, и он оказался более специфичен в отношении ингибиции APC, чем тромбина, при этом мутации отличались от P2KP1'K (табл. 5). Это свидетельствовало о том, что возможно ввести дополнительные мутации в RCL серпина, которые будут обладать эквивалентными эффектами в отношении уже описанных мутаций.

Для получения более обширного набора данных дополнительные 460 мутантов исследовали как в анализе с положительным, так и с отрицательным отбором. Культуры выращивали, индуцировали и белок экспрессировали в пяти 96-луночных планшетах. Клетки лизировали посредством добавления лизисного буфера и лизаты исследовали на ингибиторную активность в отношении тромбина и APC за счет инкубирования лизата с протеазой в течение 1 ч для тромбина и 30 мин для APC. Затем остаточную активность протеазы измеряли при помощи добавления хромогенного субстрата для протеазы (S2238 для тромбина, S2366 для APC). A22 WT PCI и A22 P2KP1'K PCI использовали в качестве контролей. Любой лизат с более высокой или эквивалентной остаточной активностью тромбина и более низкой или эквивалентной остаточной активностью APC по сравнению с P2KP1'K PCI рассматривали в качестве перспективного APC-специфичного кандидата. Исходя из приведенного набора данных, колонии отбирали и секвенировали по серпинам, которые показали лучшее ингибирование APC и худшее или эквивалентное ингибирование тромбина, чем P2KP1'K, и их повторно тестировали в трех повторностях в таком же исследовании для подтверждения того, что данные варианты действительно достоверны и не являются ложно положительными. Исходя из повторного исследования 15 из 17 мутантов, обнаруженных при начальном скрининге, были определены в качестве лучших или эквивалентных в отношении ингибиции APC по сравнению с P2KP1'K и худших или эквивалентных в отношении ингибиции тромбина (табл. 8). Последовательности вариантов, которые оказались положительны после повторного исследования, приведены в табл. 8. Примечательно, что случайный мутагенез подтвердил благоприятные эффекты положительно заряженных остатков в позициях P2 и P1'. Однако альтернативные композиции RCL также были обнаружены.

Предварительные константы скорости второго порядка для ингибиции тромбина и APC вариантами PCI, полученными в результате случайного мутагенеза, измеряли в условиях псевдо-1-порядка при помощи избытка серпина относительно протеазы. Серпин и протеазу инкубировали вместе в течение различных периодов времени и остаточную активность определяли посредством добавления избытка хромогенного субстрата для протеазы. Графики остаточной активности протеазы относительно времени давали наблюдаемую константу скорости  $k_{obs}$ . Константа скорости второго порядка  $k_2$  представляет собой наклон графика  $k_{obs}$  в зависимости концентрации серпина (рассчитано при помощи линейной регрессионной модели). WT и P2KP1'K показаны для сравнения. Константы скорости приведены в табл. 5. Показанная ошибка представляет собой стандартную ошибку наклона.

Предварительная характеристика некоторых из выбранных мутантов, полученных в результате случайного мутагенеза, показала, что выбранные мутанты были по меньшей мере функционально эквивалентны P2KP1'K PCI, и некоторые обладали слегка увеличенной скоростью ингибиции APC (табл. 5). Данные эксперименты очевидно подтверждают, что P2KP1'K является не единственной композицией, которая может быть использована для получения APC-специфичных серпинов.

Основное ведущее соединение на основе  $\alpha_1$ AT Pitts исходя из констант скорости, показанных в

табл. 1 и 3, представляет собой FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K. Данный мутант не ингибиравал тромбин и лишь немного ингибиравал fXa, но при этом сохранял ингибиование APC (табл. 1 и 3).

Для исследования свойств данного мутанта в более сложной системе плазмы и для исключения отрицательных эффектов на протеазы-прокоагулянты проводили анализ протромбинового времени (РТ). Данный анализ измеряет время до образования сгустка после инициации коагуляции по внешнему пути. Как ожидалось, антикоагулянт  $\alpha_1$ AT Pitts показал увеличение времени коагуляции из-за его ингибиования тромбина и fXa (фиг. 4). Мутант P2KP1'K  $\alpha_1$ AT Pitts наоборот не показал увеличения времени коагуляции и поэтому не препятствовал нормальной коагуляции в данном исследовании.

К настоящему времени данные показывают, что мутант P2KP1'K  $\alpha_1$ AT Pitts не препятствует протеаза-прокоагулянтам ни во внешнем (путь тканевого фактора) пути, ни в общем пути коагуляции. Кроме того, авторы изобретения хотели определить будет ли FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K влиять на внутренний (контактная активация) путь. Константы скорости второго порядка ингибиования fXIa посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S и варианта P2KP1'K измеряли в условиях псевдо-1-порядка при помощи избытка серпина относительно протеазы. Серпин и протеазу инкубировали вместе в течение различных периодов времени и остаточную активность определяли посредством добавления избытка хромогенного субстрата для протеазы (S2366). Графики остаточной протеазной активности относительно времени давали наблюдаемую константу скорости  $k_{obs}$ . Константа скорости второго порядка,  $k_2$ , представляет собой наклон графика  $k_{obs}$  в зависимости от концентрации серпина (рассчитано при помощи линейной регрессионной модели). Стандартные ошибки графика приведены.

fXI активируется в ходе контактного пути активации и он поступает в общий путь коагуляции за счет активации fIX. Кроме того, fXI активируется как только коагуляция инициируется тромбином. fXIa ингибиравали до значительной степени посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S, однако данное ингибиование было сильно снижено для FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K (табл. 6).

Учитывая определенную небольшую степень ингибиования fXIa мутантом P2KP1'K  $\alpha_1$ AT Pitts и для определения любого потенциального отрицательного эффекта на fXIIa, авторы изобретения дополнительно провели аРТТ-анализ. Данный анализ схож с РТ-анализом за исключением того, что он измеряет коагуляцию, инициированную по внутреннему пути. Поэтому аРТТ может быть использован для определения любого отрицательного эффекта на fXIa и контактный путь активации коагуляции. В данном исследовании плазма, инкубированная с FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S, не образовывала сгусток во время анализа, исключая одну реакцию с 0,67 мкМ серпина (фиг. 5А). FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K показал небольшое увеличение времени коагуляции, но дозозависимого увеличения не наблюдалось. (фиг. 5В). Это указывает на то, что fXIa ингибиторная активность FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K вероятно слишком мала для существенного влияния на контактный путь активации. Кроме того, контактный путь активирует каскад коагуляции через активацию fIXa. Поскольку при гемофилиях утрачен fIX или его естественный кофактор fVIII, роль небольшой степени ингибиования контактного пути активации при гемофилиях вероятно будет минимальна.

Для исследования того, будет ли мутант P2KP1'K  $\alpha_1$ AT Pitts ингибиравать APC в системе плазмы, авторы изобретения провели модифицированное исследование образования тромбина (TGA). Образование тромбина измеряли в объединенной нормальной плазме человека (NP) в присутствии и отсутствие рекомбинантного растворимого тромбомодулина (TM). Данный TM экспрессировали и очищали из НЕК-EBNA экспрессионной системы, и он содержал растворимый внеклеточный домен. TM обычно не присутствовал в TGA, поскольку физиологически он представляет собой трансмембранный белок, присутствующий на эндотелиальной мемbrane и в основном отсутствующий в плазме. Таким образом, активация PC пути в нормальном TGA или других коагуляционных анализах с использованием плазмы отсутствует, таких как РТ и аРТТ анализы. Добавление TM к анализу делает возможной активацию PC и может дать более реалистичную картину образования тромбина *in vivo*. Анализы, показанные на фиг. 6 и 7, проводили в объединенной нормальной плазме человека (NP) от George King Biomedical. Коагуляцию инициировали при помощи добавления CaCl<sub>2</sub> и TF/фосфолипида (реагент B с низкой конц. TF и фосфолипидов, Technoclone) для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли за счет расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции относительно известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone).

Добавление TM к объединенной нормальной плазме снижало образование тромбина в зависимости от концентрации. Исходя из данного эксперимента авторы исследования выбрали две концентрации TM для подавления образования тромбина или до промежуточных уровней (конечная концентрация TM в анализе 1,25 нМ) или низких уровней (конечная концентрация TM в анализе 10 нМ). Данные концентрации использовали в последующих анализах для оценки способности FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K ингибиравать APC в плазме.

Добавление FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S к нормальной плазме человека (NP) снижало образование тромбина при всех использованных концентрациях, вероятно, из-за ингибиования тромбина, а также fXa (фиг. 6). FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K наоборот не оказывал влияние на NP в отсутствие TM (фиг. 7А). Одна-

ко в присутствии TM FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K дозозависимо восстанавливал образование тромбина (фиг. 7B-D). Данный эффект является результатом специфического ингибиования APC посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K.

Для проведения таких же экспериментов в fVIII- или fIX-дефицитной плазме было необходимо повысить количество тканевого фактора (TF), использованного для проведения анализа, поскольку при базовых условиях (только RB триггер) образование тромбина в фактор-дефицитной плазме не наблюдалось. Для демонстрации влияния увеличения TF на образование тромбина реакции обогащали различными разведениями реагента TF (Dade Innovin, Siemens) в дополнение к реагенту RB, который использовали для запуска анализа при базовых условиях. Концентрация TF в реагенте Innovin не раскрыта производителем, однако согласно предыдущим измерениям составляет приблизительно 7,36 нМ (Duckers et al., 2010). Повышение количества TF уменьшало период запаздывания и повышало как максимальный тромбин, так и эндогенный потенциал тромбина (ETP) в NP человека, fVIII-дефицитной (НА) и fIX-дефицитной (НВ) плазме. Исходя из данных экспериментов, авторы выбрали разведение Innovin 1:4,000 в конечной реакции для инициации образования тромбина. Реагент RB, который содержит как фосфолипиды, так и TF, добавляли, поскольку для анализа необходимо добавление фосфолипидов.

Поскольку применение фактор-дефицитной плазмы требовало модификации параметров анализа, авторы изобретения повторили эксперимент по титрованию TM для нормальной объединенной плазмы человека в плазме человека с НА с добавлением 1:4,000 Innovin. Анализ проводили в плазме fVIII-дефицитной плазме человека (менее чем 1% fVIII активности) от George King Biomedical. Коагуляцию инициировали добавлением CaCl<sub>2</sub> и/или TF/фосфолипида (реагент В с низкой конц. TF и фосфолипидов, Technoclone) с конечным разведением Dade Innovin (Siemens) 1:4,000 для активации коагуляции по внешнему пути. Образование тромбина измеряли при помощи расщепления флуорогенного субстрата (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Единицы флуоресценции переводили в концентрацию тромбина за счет калибровки единиц флуоресценции против известных концентраций тромбина при помощи набора для калибровки Technothrombin (Technoclone). Обнаружили, что тромбомодулин (TM) снижает образование тромбина в анализе образования тромбина (TGA) в fVIII-дефицитной плазме (НА).

Исходя из данного эксперимента 1,25 нМ и 5 нМ TM выбирали для последующих экспериментов. Применяемая высокая концентрация TM была ниже, чем NP, в основном поскольку общее образование тромбина в плазме НА при применяемых условиях анализа было ниже.

Эффекты обоих FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S и FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K на плазму НА и НВ были сопоставимы с результатами, полученными из объединенной плазмы NP. FL  $\alpha_1$ AT Pitts ингибирал образование тромбина в присутствии и в отсутствие TM как в НА плазме (fVIII-дефицитной), так и в НВ плазме (fIX-дефицитной) (фиг. 8). FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K мог сохранять влияние TM на образование тромбина как в fVIII-, так и в fIX-дефицитной плазме и не оказывать влияния в присутствии TM (фиг. 9 и 10). Это свидетельствует о том, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K может ингибировать APC и оказывать проокоагулянтный эффект в фактор-дефицитной плазме. Это означает, что он может потенциально обеспечивать образование сгустка и снижать кровотечение у пациентов с гемофилией. Значимость данного проокоагулянтного эффекта определяли за счет относительного вклада системы протеина С в снижение образования тромбина *in vivo*. Эксперименты *in vitro*, приведенные в данном документе, не могут быть использованы для предсказания вероятной эффективности данного мутанта *in vivo*, однако они не показывают, что в комплексных системах плазмы FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K может ингибировать APC и не препятствовать проокоагулянтным путям, и что данные эффекты не зависят от присутствия или отсутствия fIX и fVIII.

С целью проверки данных *in vitro*, авторы изобретения хотели использовать мышиные *in vivo* модели гемофилии. Однако для проверки того, что влияние  $\alpha_1$ AT человека на плазму мыши будет сравнимо с влиянием, наблюдаемым в плазме человека, авторы вначале провели TGA в плазме мыши при помощи модифицированного протокола TGA (Bunce et al., 2011; Ivanciu et al., 2011). Данные модификации были необходимы из-за повышенных концентраций ингибиторных белков в плазме мыши, что препятствует анализам TGA в стандартных условиях (Tchaikovski et al., 2007; Bunce et al., 2011; Ivanciu et al., 2011). В сравнении с системой человека в НВ плазме мыши при базовых условиях анализа образования тромбина не наблюдалось. Поэтому авторы изобретения проводили титрование в различных концентрациях Innovin. Концентрация Innovin 1:12,000 была выбрана для последующих анализов.

Поскольку TM мыши не был доступен, авторы изобретения применяли растворимый TM человека, как в TGA плазмы человека, для обеспечения образования APC в анализе TGA мыши. Концентрация, необходимая для того, чтобы увидеть любой эффект TM человека в НВ плазме мыши была ~100 раз выше, чем наблюдаемая в плазме человека. Это может объясняться тем, что нокиновые по TM человека мыши проявляют сниженную способность к активации мышиного PC (Raife et al., 2011). Это свидетельствует о том, что TM человека слабее активирует PC мыши, по сравнению с TM мыши. В последующих экспериментах применяли концентрацию 750 нМ TM человека.

Затем различные концентрации как FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S, так и FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K добавляли к определенным условиям в НВ плазме мыши как в отсутствие, так и в присутствии TM для сравне-

ния эффекта данных мутантов в плазме мыши с предыдущими результатами TGA в плазме человека.

$\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S}$  снижал образование тромбина в НВ плазме мыши в отсутствии ТМ как наблюдалось в случае плазмы человека (фиг. 11А). Однако в присутствии ТМ при наиболее низкой концентрации  $\alpha_1\text{AT}$  наблюдалось частичное сохранение образования тромбина (фиг. 11В). Это вероятно может быть обусловлено разницей в относительных скоростях ингибирования тромбина мыши и APC мыши посредством  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts}$  по сравнению со скоростями, наблюдаемыми для людей, так что образованный APC ингибируется перед ингибированием тромбина. В случае, когда концентрация  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S}$  повышена до таких уровней, что ингибируется весь APC, тромбин также ингибируется. Это может объяснить результаты, приведенные на фиг. 11В, однако дополнительных исследований не проводилось.  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  сохранял образование тромбина, нокаутированное за счет добавления ТМ в НВ плазму мыши, как и в плазме человека (фиг. 11Д). Однако в случае, когда  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  добавляли к НВ плазме мыши в отсутствие ТМ, также наблюдалось повышение образования тромбина (фиг. 11С). Возможно, что данный эффект связан со способом сбора крови, который применяли для данных экспериментов. Для сбора крови хвост надрезали и кровь собирали в цитрат. Затем центрифугировали, удаляли и замораживали плазму. Повреждение, нанесенное для сбора крови, приводит к активации системы коагуляции и может вызвать образование APC в плазме перед экспериментом. Кроме того, мыши не имеют PCI в своей плазме (Zechmeister-Machhart et al., 1996), который может повышать циркулирующий период полужизни APC, так что он не активируется до TGA анализа. Альтернативным объяснением, которое не может быть исключено в настоящем, будет нецелевой прокоагулянтный эффект в плазме мыши. Однако поскольку данный эффект не наблюдается в плазме человека, подразумевается ингибирование протеазы-антикоагулянта, специфичной для мыши.

Для исследования потенциального *in vivo* эффекта  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  и определения его потенциальной пользы в качестве профилактического агента или при лечении гемофилии, авторы проводили два *in vivo* анализа у мышей: обрезание хвоста и модель лазерного повреждения артериолы кремастера. Использовали самцов мышей, fIX нокаутных мышей по BALB/c окружению (Lin et al., 1997; Ivanciu et al., 2011).

В исследовании с обрезанием хвоста белок или буфер инъектировали через хвостовую вену и после инкубационного периода в 5 мин делали надрез диаметром 3 мм и хвост помещали в 14 мл 37°C солевого раствора при 37°C в водяной бане. Кровь собирали в течение 10 мин и конечную потерю крови вычисляли посредством измерения общего гемоглобина после лизиса эритроцитов за счет измерения абсорбции при 575 нм (Ivanciu et al., 2011). Объем потери крови вычисляли за счет получения стандартной кривой, где известные объемы крови, собранной после надрезания хвоста, обрабатывались аналогично образцам после отрезания хвоста. После лизиса эритроцитов определяли абсорбцию при 575 нм и наносили на график относительно объема потери крови для получения стандартной кривой. Исследования с отрезанием хвоста выявили мощный прокоагулянтный эффект  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  (фиг. 12). При дозе 15 мг/кг потерю крови НВ мыши восстанавливали до уровня WT мыши за счет инъекции PBS (фиг. 12). Более низкая доза  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  также показала тенденцию к снижению кровотечения в отношении НВ мыши, хотя это не было статистически значимым.  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S}$  не оказал существенного эффекта на потерю крови при 7,5 мг/кг.

Другая *in vivo* модель, применяемая для оценки агентов-прокоагулянтов, представляет собой интравитальную модель лазерного повреждения артериолы кремастера (Falati et al., 2002). В данной системе катетер вводили в яремную вену мыши для обеспечения инфузии терапевтического белка, а также флуоресцентно-меченные антитела к фибрину и тромбоцитам. Затем кремастер выводили наружу для получения изображения. Получали изображение образования сгустка после лазерного повреждения артериол и вычисляли при помощи флуоресцентной микроскопии.

Для полной качественной оценки повреждения были разделены на три категории: без сгустка (флуоресценция не определялась), тромбоцитарный сгусток (видны только тромбоциты, данные сгустки обычно нестабильны и растворяются в процессе получения изображения) и тромбоциты+фибрин (видимая флуоресценция как тромбоцитов, так и фибрина, сгусток остается стабильным в процессе получения изображения). Это показало дозозависимое повышение стабильности образования тромбоцитарного и фибринового сгустка с увеличением концентрации  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  (фиг. 13). Все изображения количественно измеряли в отношении флуоресценции тромбоцитов и фибрина. Для каждой временной точки вычисляли среднее значение и результаты наносили на график на фиг. 14. Эти данные включали вычисление по всем изображениям, независимо от их категорий, определенных для фиг. 13. Графики средних значений показывают, что у мышей, которым вводили контроль или  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S}$ , не наблюдалось образования сгустка, в то время как и при высокой и низкой дозе  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  была обнаружена агрегация тромбоцитов и отложение фибринова в участке повреждения. Разница между двумя дозами в отношении агрегации тромбоцитов не было обнаружено. Для фибринова наблюдалось дозозависимое повышение отложения фибринова в случае  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  и отсутствие фибринова в случае мышей, которым вводили контроль или  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S}$  (фиг. 14).

В совокупности данные результаты показывают, что  $\text{FL } \alpha_1\text{AT Pitts C232S P2KP1'K}$  оказывает про-

коагулянтный эффект в обоих исследованиях на *in vitro* и *in vivo* моделях гемофилии. Эксперименты *in vivo* проводили на мышиных моделях гемофилии В, однако результаты TGA в плазме человека (фиг. 9 и 10) и предполагаемый механизм действия FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K показывают, что его прокоагулянтный эффект должен быть независим от дефицита fIX или fVIII и поэтому может быть использован при обеих гемофилиях А и В. Прокоагулянтный эффект, наблюдавшийся *in vivo*, был достаточным для снижения кровотечения до тех же уровней, которые наблюдались у мышей WT (фиг. 12), свидетельствуя о том, что серпины, которые ингибируют APC, могут применяться для лечения нарушений свертываемости крови, а не только в качестве профилактики или адьюванта для существующего лечения.

Также применяли стратегию нацеленного случайного мутагенеза на  $\alpha_1$ AT скаффолде с целью изучения потенциальных дополнительных APC мутантов на  $\alpha_1$ AT скаффолде.

Были получены три различных библиотеки вариантов  $\alpha_1$ AT по FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S окружению: рандомизированная по P2, рандомизированная по P1', и библиотека, рандомизированная по P2 и P1'. Полученные библиотеки плазмид трансформировали в экспрессионный штамм Rosetta2(DE3)pLysS и белок экспрессировали в 96-луночных планшетах. Бактерии лизировали и лизаты анализировали в отношении ингибирования тромбина и APC.

Для библиотек единичного варианта анализировали 88 колоний на библиотеку. Для библиотеки двойного варианта (P2P1') анализировали 460 колоний. FL  $\alpha_1$ AT Pitts и FL  $\alpha_1$ AT Pitts P2KP1'K (ведущие APC специфичные варианты) экспрессировали во всех исследуемых планшетах в качестве референсных. Варианты с более высокой или эквивалентной APC активностью (более низкой или эквивалентной остаточной APC активностью) и более низкой или эквивалентной ингибиторной активностью тромбина (более высокой или эквивалентной остаточной активностью тромбина) по сравнению с P2KP1'K  $\alpha_1$ AT принимались в качестве кандидатов для вариантов более специфичных к APC, чем к тромбину. Набор вариантов кандидатов отбирали и повторно исследовали таким же образом для проверки результата первичного скрининга. Затем мутантов, показавших сходные свойства в обоих исследованиях, секвенировали. Полученные последовательности приведены в табл. 9. Для проверки способности данного исследования к отбору вариантов, более специфичных к APC, чем к тромбину, 9 вариантов, идентифицированных в табл. 9, экспрессировали в более широком масштабе в *E. coli* и очищали. Затем для каждого мутанта определяли константу скорости ингибирования второго порядка в отношении тромбина и APC. Результаты приведены в табл. 10. Данные результаты подтверждают, что все исследованные варианты обладают более высокой специфичностью к APC, чем к тромбину в отличие от варианта FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S.

Определенные типы остатков были предпочтительны в  $\alpha_1$ AT Pitts скаффолде в обеих позициях P2 и P1' (табл. 9). Специфичность в первую очередь подтверждалась за счет присутствия объемных полярных (Q, N, Y), объемных гидрофобных (W) или положительно заряженных остатков (R, H, K) в P2 и P1'. Другие остатки, наблюдавшиеся в данных позициях, включали C, A, T, S и V. Данные остатки от средних к маленьким были дополнены в библиотеке двойного варианта за счет дополнения большого положительно заряженного остатка (R, K) или большого полярного остатка (Y, N, Q) в другой позиции, которая вероятно оказывает большее влияние на изменение специфичности. Однако это также может являться совокупным эффектом данных мутаций, в частности, когда P1' представляет собой R. P1'R показал различные результаты в скрининге библиотеки единичного варианта и может обладать небольшой остаточной ингибиторной активностью в отношении тромбина. Известно, что P2 P важен для расщепления субстратов тромбином (Gallwitz et al., 2012). Простое удаление данного остатка совместно с мутацией в позиции P1', приводящей к изменению специфичности, может быть достаточным для получения APC специфичного ингибитора с небольшой остаточной ингибиторной активностью в отношении тромбина. В частности, T в P2 может сам по себе оказывать некоторый эффект, поскольку из его остатков-партнеров в P1' (Q, N, Y, R) только R был идентифицирован в библиотеке единичного варианта остатка P1', как сам по себе достаточный для изменения специфичности.

Примечательно, что неспецифичные мутанты, которые были сгруппированы вокруг  $\alpha_1$ AT Pitts контроля, в основном представляли собой  $\alpha_1$ AT Pitts. Все сохраняли P2 P, указывая на его значение в поддержании ингибиторной активности тромбина. P1' был более вариабельным в соответствии с распределением мутантов в библиотеке варианта P1'. При сравнении разброса вариантов в библиотеках P2 и P1' тромбин оказался более толерантным к мутациям P1', чем к P2. Однако появление подходящих остатков в библиотеках двойного варианта, которые не присутствуют в библиотеках единичного варианта, показывает, что эффекты данных остатков на специфичность могут быть совместными и двойные мутации могут быть более эффективными, чем единичные мутации при повышении специфичности.

Результаты случайного мутагенеза, представленные выше, показали, что получение мутантов, отличных от уже идентифицированных мутантов по лизину, которые проявляли бы большую специфичность к APC, чем к тромбину, возможно. До сих пор применяли стратегию случайного мутагенеза, при которой предполагали, что при получении меньшей специфичности к тромбину, чем к APC, данные мутанты также будут проявлять некоторую большую степень специфичности к APC, чем к другим протеазам-прокоагулянтам. Для проверки этого тестировали РТ и аРТТ случайных мутантов (табл. 10). Данные

результаты отражены в табл. 11. Ни один из мутантов не оказывал существенного эффекта на РТ в отличие от ранее показанного для FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S (фиг. 4). Это свидетельствует о том, что мутанты в основном утрачивали свою ингибиторную активность в отношении протеаз-прокоагулянтов. Однако аPTT являются более чувствительными к присутствию ингибиторов. Поэтому измерение аPTT может давать более точное представление о меньшем остаточном ингибировании. Предыдущие эксперименты (фиг. 5) показали, что FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S делает плазму неспособной к образованию сгустка в аPTT-анализе. Для сравнения, только один из изученных мутантов в данном документе показал такой эффект (P2TP1'N). Некоторые мутанты, такие как P2KP1'H и P2KP1'N, показали лишь относительно небольшую пролонгацию аPTT и поэтому потенциально представляли интерес.

Исходя из данных результатов, авторы изобретения выбрали четыре мутанта: P2R, P2QP1'K, P2KP1'H и P2KP1'N (все Pitts, P1R окружение). Они показали высокое ингибирование APC по сравнению с тромбином (табл. 10) и для некоторых также низкую пролонгацию аPTT (P2KP1'H и P2KP1'N). Поскольку они не пролонгировали РТ, маловероятно, что они ингибируют TF:fVIIa. Наиболее вероятными кандидатами для пролонгации аPTT явились ингибирования fXIa или fXa. Среди них ингибирование fXa в наибольшей степени ингибирует начальные этапы коагуляции, и поэтому оно рассматривалось как наиболее существенное препятствие успешного ингибитора. Константы ингибирования для ингибирования fXa данными четырьмя мутантами поэтому определяли, как описано выше (табл. 12). P2R показал существенное ингибирование fXa, которое может быть причиной пролонгации аPTT. Другие три мутанта показали более низкое ингибирование fXa, но ни один из мутантов не был также специфичен, как идентифицированный ранее мутант P2KP1'K. Несмотря на это, P2KP1'N, P2QP1'K и P2KP1'H являются дополнительными перспективными кандидатами для дальнейшего исследования, поскольку они проявляют большую специфичность к APC, чем к тромбину и fXa. Кроме того, их ингибирование APC является приблизительно в два раза более сильным по сравнению с ингибированием мутантом P2KP1'K, описанным ранее. Данное более быстрое ингибирование может отчасти компенсировать несколько сниженную специфичность.

Однако данные результаты показывают, что выбор большей специфичности к APC, чем к тромбину является недостаточным для создания ингибитора, который также проявляет большую специфичность к APC по сравнению со специфичностью к fXa и другим протеазам-прокоагулянтам. Поэтому стратегию случайного мутагенеза дополнительно продолжали. Мутанты, которые ранее были выбраны по специфичности к APC большей, чем к тромбину, были повторно изучены в отношении fXa, выбирали мутантов, которые в меньшей степени ингибировали fXa, в то же время сохраняя низкое ингибирование тромбина и APC.

Четыре дополнительных мутанта идентифицировали на основании данного дополнительного скрипинга. Все они имели мутацию P1R, а также P2RP1'A, P2RP1'Q, P2WP1'I или P2WP1'H. Для проверки специфичности данных мутантов проводили начальный эксперимент, используя только одну концентрацию серпина и тестируя ингибирование тромбина и fXa. APC ингибирование не рассматривалось на данном этапе, поскольку мутанты были выбраны на основании их низкого ингибирования тромбина и fXa. Серпин и протеазу инкубировали в течение различных периодов времени и в указанные временные точки, реакцию останавливали за счет добавления избытка хромогенного субстрата. Остаточную протеазную активность делили на начальную протеазную активность и натуральный логарифм данного значения наносили на график в зависимости от времени (фиг. 15). Наклон данной линии, разделенный на концентрацию серпина, давал значение константы скорости ингибирования второго порядка. Данные исследования показали, что все мутанты едва ингибировали тромбин, самым быстрым ингибитором являлся P2WP1'H, обладающий константой скорости второго порядка  $\sim 50.3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  (по сравнению с константой ингибирования FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S,  $2,928 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ). Однако P2RP1'A, P2WP1'I и P2WP1'H показали существенное ингибирование fXa. Константы скорости второго порядка была лишь в  $\sim 10$  раз меньше для данных мутантов по сравнению с FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S ( $4,070.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для P2RP1'A по сравнению с  $4,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S). P2RP1'A, P2WP1'I и P2WP1'H показали сходное друг с другом ингибирование fXa.

Только один мутант проявил существенную селективность в отношении как тромбина, так и fXa. Данный мутант имел P2RP1'Q в дополнение к мутации Pitts (P1R). Учитывая его селективность, он представлял интерес для более тщательного исследования. Предыдущие результаты как случайного, так и рационального мутагенеза показали, что остатки R и K проявляли достаточное сходство. Поэтому авторы изобретения также получали мутант P2KP1'Q в P1R окружении, поскольку исходя из результатов, представленных в данном документе, ожидали, что он будет обладать сходными свойствами. Результаты измерения констант ингибирования и аPTT (эксперименты выполнены, как описано ранее) для обоих мутантов приведены в табл. 13. Мутант P2KP1'K приведен для сравнения. Как P2KP1'Q, так и P2RP1'Q показали очень низкое ингибирование тромбина и fXa. Кроме того, не было отмечено почти никакого эффекта на аPTT. Ингибирование APC было существенным, будучи только слегка пониженным по сравнению с P2KP1'K. Поэтому ожидали, что данные два мутанта будут проявлять сходство с P2KP1'K и могут являться другими потенциально перспективными альтернативными молекулами для дальнейшего исследо-

дования.

Авторы изобретения оценили ингибирование тромбина и APC мыши посредством FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K. Тромбин и APC получали из рекомбинантных источников. Примененные протеазы укорочены по сравнению с версией плазматических, включая только EGF2-протеазные домены для APC (APC без Gla-домена) и протеазный домен для тромбина. Следовательно, авторы также исследовали варианты человека данных протеаз, чтобы убедиться, что любые отличия являлись видовыми отличиями, а не отличием в конструктах. Тромбин человека и мыши не показал или показал очень слабую реакционноспособность с FL  $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K от SDS-PAGE, указывающую, что в данном отношении результаты из модельных систем будут релевантны системе человека. Константы скорости ингибирования второго порядка составили  $(8,14 \pm 0,58) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , для APC человека без Gla-домена,  $(3,80 \pm 0,37) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  для APC мыши без Gla-домена, по сравнению с  $(14,88 \pm 1,87) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  для APC плазмы человека. Данные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на то, что реакционноспособность мутанта в моделях мышей вероятно будет ниже, чем у людей, т.е. для достижения такого же эффекта относительная доза возможно потребуется более высокая, эффект в отношении ингибирования протеазы вероятно будет схож.

Представленные данные подтверждают тот принцип, что скаффолд серпина может быть использован для получения специфичных ингибиторов APC при помощи лишь очень небольших мутаций, что данные ингибиторы могут обладать прокоагулянтными активностями как *in vitro*, так и *in vivo* и фактически являются перспективными агентами-прокоагулянтами для лечения и профилактики нарушений свертываемости крови, таких как гемофилия.

#### Ссылки.

- Berntorp E (2009) *Haemophilia* 15: 3–10
- Bertina RM, et al (1994) *Nature* 369: 64–67
- Bohn RL, et al (2004) *Haemophilia* 10: 63–68
- Bolton-Maggs PHB & Pasi KJ (2003) *Lancet* 361: 1801–1809
- Brettler DB (1996) *Baillieres Clin. Haematol.* 9: 319–329
- Brummel-Ziedins KE, et al (2011) *J. Thromb. Haemost.* 9: 2262–2267
- Bunce MW, et al (2011). *Blood* 117: 290–298
- Butenas S, et al (2006) *J. Thromb. Haemost.* 4: 2411–2416
- Carrell R, et al (1985) *Trends in Biochemical Sciences* 10: 20–24
- Chuansumrit A, et al (2000) *Haemophilia* 6: 61–65
- De Nanteuil G, et al (2006) *J. Med. Chem.* 49: 5047–5050
- Di Minno MND, et al (2010) *Haemophilia* 16: e190–201
- DiMichele D (2007) *J. Haematol.* 138: 305–315
- Duckers C, et al (2010) *Blood* 115: 879–886
- Elisen MGLM, et al (1998) *Blood* 91: 1542–1547
- Escobar MA (2010) *Haemophilia* 16 Suppl 3: 29–34
- Escobar M & Sallah S, et al (2013) *J. Thromb. Haemost.* 11, 1449–1453.
- Falati S, et al (2002) *Nat. Med.* 8: 1175–1181
- Fortenberry YM, et al (2011) *J. Thromb. Haemost.* 9: 861–863
- Franchini M & Lippi G (2010) *Thrombosis Research* 125: 119–123
- Fukudome K, et al (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 17491–17498
- Gallwitz, et al (2012) PLoS ONE 7(2): e31756
- Gettins PGW (2002) *Chem. Rev.* 102: 4751–4803
- Gringeri A, et al (2003) *Blood* 102: 2358–2363
- Haya S, et al (2007) *Haemophilia* 13 Suppl 5: 52–60
- Heeb MJ & Griffin JH (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 11613–11616
- Heeb MJ, et al (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 2365–2369
- Hopkins, et al (1993) *Biochemistry* 32: 7650–7657
- Hua B, et al (2009) *Haematologica* 94: 881–884
- Huntington JA, et al (2000) *Nature* 407: 923–926
- Irving, et al (2000) *Genome Res.* 10: 1845–1864
- Ivanciu L, et al (2011) *Nat. Biotechnol.* 29: 1028–1033
- Kalsheker N (1989) *Biosci. Rep.* 9: 129–138
- Laurell CB, et al (1977) *Clin. Sci. Mol. Med.* 52: 457–461

- Laurell M et al (1990) *Blood* 76: 2290–2295  
 Lee M et al (2006) *Haemophilia* 12 Suppl 3: 1–7  
 Li W & Huntington JA (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 36039–36045  
 Li W et al (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 4661–4666  
 Lin HF et al 1997) *Blood* 90: 3962–3966  
 Lowe, G.D. & Ludlam, C.A. (2008) *J. Thromb. Haemost.* 6, 1982–1983.  
 Lu D et al (1996) *Blood* 87: 4708–4717  
 Mannucci PM (2003) *J. Thromb. Haemost.* 1: 1349–1355  
 Mannucci PM (2008) *Haemophilia* 14 Suppl 3: 10–18  
 Mather T et al (1996) *EMBO J* 15: 6822–6831  
 Meijers JC et al 1988) *Biochemistry* 27: 4231–4237  
 Mosnier LO et al (2001) *Thromb. Haemost.* 86: 1057–1064  
 Nagel K. et al (2011) *Haemophilia*, 17, 872-874.  
 Negrier Cet al(2006) *Haemophilia* 12 Suppl 6: 48–52– discussion 52–3  
 Owen MC et al (1983) *N. Engl. J. Med.* 309: 694–698  
 Pratt CW & Church FC (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 8789–8794  
 Pratt CW et al(1992) *J. Biol. Chem.* 267: 8795–8801  
 Raife TJ et al(2011) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2509–2517  
 Schechter I et al (1967) *Biochem Biophys Res Comm* 27: 157–162  
 Stearns-Kurosawa DJ et al(1996) *PNAS. U.S.A.* 93: 10212–10216  
 Suzuki K et al (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 163–168  
 Suzuki K et al(1984) *Journal of Biochemistry* 95: 187–195  
 Tagariello, G et al (2009) *Blood*, 114, 779-784.  
 Tchaikovski SN et al(2007) *J. Thromb. Haemost.* 5: 2079–2086  
 Teitel JM (1999) *Haemophilia* 5 Suppl 3: 43–49  
 Teitel, JM & Sholzberg, M (2013) *Blood Reviews* 27 103-109  
 Turecek PL, et al (2004) *Haemophilia* 10 Suppl 2: 3–9  
 Ullman M et al(2006) *Haemophilia* 12 Suppl 6: 74–9; discussion 79–80  
 World Federation of Hemophilia (2011) 2010 WFH Global Survey Report  
 Yamasaki M et al(2011) *EMBO Rep.* 12: 1011–1017  
 Zechmeister-Machhart M et al (1996) *Immunopharmacology* 32: 96–98

Таблица 1

Константы скорости ингибирования второго порядка ( $\text{мM}^{-1}\cdot\text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	Тромбин	APC	Ингибирован ие APC/тромбин
A22 WT PCI	$28,21 \pm 1,51$	$0,68 \pm 0,032$	0,02
A22 P1'K PCI	$0,022 \pm 0,0024$	$0,88 \pm 0,074$	40
A22 P2KP1'K PCI	$\sim 0,03^*$	$0,28 \pm 0,013$	9,3
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S	$292,76 \pm 17,60$	$108,16 \pm 7,086$	0,4
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2K	$0,051 \pm 0,0028$	$64,82 \pm 7,14$	1,271
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P1'K	$0,17 \pm 0,017$	$95,66 \pm 13,70$	563
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K	Отсутствие ингибирования после 4 ч	$15,14 \pm 1,68$	Отсутствие ингибирования тромбина

Таблица 2

Константы скорости ингибирования второго порядка ( $\text{мM}^{-1}\cdot\text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	Тромбин + гепарин	APC + гепарин	Ингибирование APC/тромбин
A22 WT PCI	$1310,32 \pm 218,72$	$564,47 \pm 71,29$	0,4
A22 P1'K PCI	$0,017 \pm 0,0019$	$321,54 \pm 31,94$	18914
A22 P2KP1'K PCI	$0,11 \pm 0,040^*$	$146,38 \pm 18,85$	1331,7

Таблица 3

Константы скорости ингибиования второго порядка ( $\text{мM}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ )		
Вариант	fXa	Ингибиование APC/fXa
A22 WT PCI	$10,31 \pm 0,73$	0,07
A22 P1'K PCI	$0,52 \pm 0,079$	1,7
A22 P2KP1'K PCI	Ингибиование обнаружено	не
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S	$41,33 \pm 2,36$	2,6
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2K	$3,93 \pm 0,31$	16,5
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P1'K	$4,89 \pm 0,16$	19,6
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K	$0,12 \pm 0,010$	126,2

Таблица 4

Константы скорости ингибиования второго порядка ( $\text{мM}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	fXIa	APC	Ингибиование APC/fXIa
A22 WT PCI	$8,59 \pm 0,43$	$0,68 \pm 0,032$	0,08
A22 P2KP1'K PCI	$0,023 \pm 0,0052$	$0,28 \pm 0,013$	12,2

Таблица 5

Константы скорости ингибиования второго порядка ( $\text{мM}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	Тромбин	APC	Ингибиование APC/тромбин
A22 WT PCI	$28,21 \pm 1,51$	$0,68 \pm 0,032$	0,02
A22 P2KP1'K PCI	$\sim 0,03^*$	$0,28 \pm 0,013$	9,3
A22 D8 PCI (P4QP2RP1'N)	$0,084 \pm 0,0016$	$1,00 \pm 0,15$	11,9
A22 4.H11 PCI (P4KP2RP1'H)	$0,021 \pm 0,0012$	$0,45 \pm 0,15$	21,4
A22 2.B10 PCI (P4SP2LP1'K)	$0,016 \pm 0,00090$	$0,43 \pm 0,0086$	26,9
A22 5.E12 PCI (P4HP2RP1'V)	$0,023 \pm 0,0021$	$0,26 \pm 0,035$	11,3

Таблица 6

Константы скорости ингибиования второго порядка ( $\text{мM}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	fXIa	APC	Ингибиование APC/fXIa
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S	$398,88 \pm 13,012$	$108,16 \pm 7,086$	0,3
FL $\alpha_1$ AT Pitts C232S P2KP1'K	$0,47 \pm 0,037$	$15,14 \pm 1,68$	32,2

Таблица 7

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
E7	T	I	S	T	H	R	R	A	R	L
E10	T	I	R	T	Q	R	V	A	R	L
E11	T	I	T	T	L	R	Y	A	R	L
D8	T	I	Q	T	R	R	N	A	R	L
H11	T	I	A	T	Q	R	Y	A	R	L

Таблица 8

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
2.B10	T	I	S	T	L	R	K	A	R	L
3.B11	T	I	F	T	F	R	R	A	R	L
3.C3	T	I	V	T	R	R	I	A	R	L
3.E8	T	I	F	T	R	R	K	A	R	L
3.G10	T	I	C	T	L	R	K	A	R	L
3.G11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
3.H11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
4.E4	T	I	K	T	D	R	M	A	R	L
4.F7	T	I	F	T	V	R	K	A	R	L
4.F10	T	I	R	T	R	R	I	A	R	L
4.H7	T	I	G	T	I	R	R	A	R	L
4.H11	T	I	K	T	R	R	H	A	R	L
5.D2	T	I	T	T	R	R	V	A	R	L
5.E7	T	I	L	T	R	R	I	A	R	L
5.E12	T	I	H	T	R	R	V	A	R	L

Таблица 9

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
$\alpha_1$ AT WT	L	E	A	I	P	<u>M</u>	S	I	P	P
$\alpha_1$ ATPitts	L	E	A	I	P	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.G11	L	E	A	I	K	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.F10	L	E	A	I	R	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.D8	L	E	A	I	K	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.G8	L	E	A	I	R	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.E7	L	E	A	I	R	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.D10	L	E	A	I	R	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.G4	L	E	A	I	R	<u>R</u>	S	I	P	P
P2.F4	L	E	A	I	R	<u>R</u>	S	I	P	P
P1'.H8	L	E	A	I	P	<u>R</u>	E	I	P	P
P1'.A11	L	E	A	I	P	<u>R</u>	R	I	P	P
P1'.F10	L	E	A	I	P	<u>R</u>	E	I	P	P
P1'.F9	L	E	A	I	P	<u>R</u>	K	I	P	P
P1'.F4	L	E	A	I	P	<u>R</u>	E	I	P	P
4.G9	L	E	A	I	T	<u>R</u>	N	I	P	P
4.G4	L	E	A	I	Q	<u>R</u>	K	I	P	P
3.E5	L	E	A	I	R	<u>R</u>	A	I	P	P
3.B6	L	E	A	I	S	<u>R</u>	R	I	P	P
3.B2	L	E	A	I	K	<u>R</u>	N	I	P	P
3.A10	L	E	A	I	T	<u>R</u>	Y	I	P	P
2.H1	L	E	A	I	R	<u>R</u>	H	I	P	P
2.C6	L	E	A	I	T	<u>R</u>	R	I	P	P
1.H10	L	E	A	I	V	<u>R</u>	R	I	P	P
1.B11	L	E	A	I	R	<u>R</u>	C	I	P	P
1.A12	L	E	A	I	K	<u>R</u>	H	I	P	P
2.E5	L	E	A	I	T	<u>R</u>	R	I	P	P
3.G9	L	E	A	I	Y	<u>R</u>	R	I	P	P
3.F4	L	E	A	I	A	<u>R</u>	R	I	P	P
3.C9	L	E	A	I	C	<u>R</u>	K	I	P	P
2.H5	L	E	A	I	K	<u>R</u>	N	I	P	P
2.E7	L	E	A	I	W	<u>R</u>	N	I	P	P
1.B2	L	E	A	I	S	<u>R</u>	R	I	P	P
5.C12	L	E	A	I	H	<u>R</u>	N	I	P	P

5.A6	L	E	A	I	R	R	N	I	P	P
4.E1	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
4.C12	L	E	A	I	N	R	N	I	P	P
3.F8	L	E	A	I	T	R	M	I	P	P
3.C10	L	E	A	I	T	R	H	I	P	P
2.E8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
1.H9	L	E	A	I	T	R	Q	I	P	P

Таблица 10

Константы скорости ингибиования второго порядка ( $\text{мM}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	Тромбин	APC	Ингибиование APC/тромбин
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S	292,76 $\pm$ 17,60	108,16 $\pm$ 7,086	0,4
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K	Отсутствие ингибиования после 4 ч	15,14 $\pm$ 1,68	Отсутствие ингибиования тромбина
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2R	0,042 $\pm$ 0,0024	61,12 $\pm$ 6,26	1455,2
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P1'R	0,68 $\pm$ 0,068	131,57 $\pm$ 13,32	193,5
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P1'E	0,15 $\pm$ 0,015	2,99 $\pm$ 0,29	19,9
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2TP1'N	0,27 $\pm$ 0,047	62,37 $\pm$ 2,46	231,0
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2TP1'Y	0,023 $\pm$ 0,0014	5,70 $\pm$ 0,83	247,8
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2QP1'K	0,0038 $\pm$ 0,0013	33,41 $\pm$ 6,36	8792,1
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'H	Отсутствие ингибиования после 2 ч	28,84 $\pm$ 3,05	Отсутствие ингибиования тромбина
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'N	0,015 $\pm$ 0,0026	37,80 $\pm$ 2,48	2520,0
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2RP1'C	0,034 $\pm$ 0,0094	24,55 $\pm$ 2,15	722,1

Таблица 11

Вариант	PT (сек)	aPTT (сек)
Plasma	27,2 $\pm$ 0,8	60,3
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2K	27,0 $\pm$ 0,5	107,2
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P1'K	27,1 $\pm$ 0,4	228,1
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2R	27,8 $\pm$ 0,4	111,6
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P1'R	28,1 $\pm$ 0,5	287
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P1'E	27,2 $\pm$ 0,4	84
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2TP1'N	29,5 $\pm$ 0,9	более 300
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2TP1'Y	28,3 $\pm$ 0,8	185,4
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2QP1'K	27,9 $\pm$ 0,3	111,5
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'H	27,4 $\pm$ 0,9	77,8
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'N	27,8 $\pm$ 0,3	81,9
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2RP1'C	28,5 $\pm$ 0,6	HO

Таблица 12

Константы скорости ингибиования второго порядка ( $\text{мM}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ )			
Вариант	fXa	Ингибиование APC/fXa	
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S	41,33 $\pm$ 2,36	2,6	
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K	0,12 $\pm$ 0,010	126,2	
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2R	4,79 $\pm$ 0,58	12,8	
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2QP1'K	1,082 $\pm$ 0,15	30,9	
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'H	0,62 $\pm$ 0,040	46,5	
FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'N	0,91 $\pm$ 0,13	41,5	

Таблица 13

Константы скорости ингибиования второго порядка (мМ <sup>-1</sup> .сек <sup>-1</sup> )					aPTT (сек)
Вариант	Тромбин	APC	fXa		
FL α <sub>1</sub> AT Pitts C232S	292,76 ± 17,60	108,16 ± 7,086	41,33 ± 2,36		более 300 (55,0 ± 3,8)
FL α <sub>1</sub> AT Pitts C232S P2KP1'K	Отсутствие ингибиования после 4 ч	15,14 ± 1,87	0,12 ± 0,010		62,1 ± 4,2 (55,0 ± 3,8)
FL α <sub>1</sub> AT Pitts C232S P2RP1'Q	0,0054 ± 0,0011	8,30 ± 1,11	0,13 ± 0,0067		55,1 ± 2,8 (49,3 ± 2,5)
FL α <sub>1</sub> AT Pitts C232S P2KP1'Q	0,0029 ± 0,0015	9,00 ± 0,67	0,17 ± 0,010		53,9 ± 3,0 (49,3 ± 2,5)

## Последовательности

1 mqlflclv llspqgaslh rhhpremkkr vedlhvgatv apssrrdftf dlyralasaa  
 61 psqniffspv sismlslamls lgagsstkmq ileglglnlq kssekelhrg fqqlqelnlq  
 121 prdgfqlslg nalfdlvvd lqdtfsamk tlyladtfpt nfrdsagamk qindyvakqt  
 181 kgkivdllkn ldsnavvivm nyiffkakwe tsfnhkgtqe qdfyvtsetv vrvpmmsred  
 241 qhylldrnl scrvgvpyq gnatalfilp segkmqqven glsektlirkw lkmfkkqrle  
 301 lylpkfsieg syqlekvlp sgsnvtsh adlsgisnhs niqvsemvhk avvevdesgt  
 361 raaaatgtif **tfrsarlnsq rlvfnrpflm fivdhnifl gkvnrp**

## SEQ ID NO: 1 ингибитор протеина С (PCI)

Зрелый белок, включающий пропептид, соответствует остаткам 20-406. Сигнальная последовательность соответствует остаткам 1-19. Пропептид соответствует остаткам 20-25. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mermlplllal gllaagfcpa vlchpnspld eenltqenqd rgthvdlgla sanvdfafsl  
 61 ykqlvlkapd knvifsplsi stalaflslg ahntltiel kglkfmltet seaeihqsfq  
 121 hllrtlnqss delqlsmgna mfvkeqlsll drftedakrl ygseafatdf qdsaaakkli  
 181 ndyvkngtrg kitdklikld sqtmmvlny iffakwemp fdpqdthqsr fylskkkwvm  
 241 vpmmslhhlt ipyfrdeels ctvvelkytg nasalfilp qdkmeeveam llpetlkrwr  
 301 dslefriye lylpkfsisr dynlndillq lgieeaftsk adlsgitgar nlavsqvvhk  
 361 avldvfeegt easaatavki **tllsalvetr tivrfnrpfl miivptdtqn iffmskvtnp**  
 421 kqa

## SEQ ID NO: 2 альфа-1-антихимотрипсин

Зрелый белок соответствует остаткам 26-423. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 masrltltl llllagdra ssnpnatsss sqdpeslqdr gegkvattvi skmlfvepl  
 61 evsslpttts tttsatktia nttdpepttqp ttepttqpti qptqpttqlp tdsptqpttg  
 121 sfcpgpvtlc sdleshstea vlgdalvdfs lklyhafsam kkvetnmafs pfsiaslltq  
 181 vllgagentk tnlesilsyp kdftcvhqla kfittkgvts vsqifhspdl airdtfvnas  
 241 rtlysssprv lsnnnsdanle lintwvaknt nnkisrllds lpsdtrlvll naiylsakwk  
 301 ttfdfpkktrm epfhfknsvi kpmmmnkkky pvahfidqtl kakvgqlqls hnlslvilvp  
 361 qnlkhrledm eqalspsvfk aimeklemek fqptlltlpr ikvttsqdml simekleffd  
 421 fsydlnlcgli tedpdqvsu mqhqtvleit etgveaaaaas **aisvartllv fevqqpflv**  
 481 lwdqqhkfpv fmgrvydpra

## SEQ ID NO: 3 ингибитор С1-эстеразы

Зрелый белок соответствует остаткам 23-500. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mallwgllvl swsclqgpcv vfspvsamep lgrqltsgpn qeqvsplll klgnqepggq  
 61 talkspvgc srdptpeqth rlarammaft adlflsivaqt stcpnlilsp lsvalalshl  
 121 algaqnhtlq rlqqvlhags gpclphllsr lcqdllgpgaf rlaarmylqk gfpikedfle  
 181 qseqlfgakp vsltgkqedd laninqwvke ategkiqefl sglpedtvll llnaihfqgf  
 241 wrnkfdpslt qrdsfhldeq ftvpvemmqa rtyplrwflf eqpeiqvahf pfknnmsfvv  
 301 lvpthfewnv sqvlanlswd tlhpplvwer ptkvrlpkly lkhqmdlvat lsqqlqelf  
 361 qapdlrgise qslvvsgvqh qstlelsevg veaaaatsiamsrmslssfs vnrpflffif  
 421 edttglplfv gsvrnpnpsa prelkeqqds pgnkdflqsl kgfprgdklf gpdklkvppm  
 481 eedypqfgsp k

#### SEQ ID NO: 4 $\alpha_2$ -антиплазмин

Зрелый белок соответствует остаткам 28-491. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL для ингибиования химотрипсина выделены жирным, остатки для ингибиования плазмина подчеркнуты.

1 mysnvigtvt sgkrkvylls lligfwdcv tchgpvdic takprdpimn pmciyrspeк  
 61 katedegseq kipeatnrrv welskansrf attfyqhlad skndndnifl splsistafa  
 121 mtklgacndt lqqlmевfkf dtisektsdq ihffaklnc rlyrkankss klvsanrlfg  
 181 dksltfnety qdiselvyga klqpldfken aeqsraaink wvsnktegri tdlvipseain  
 241 eltvlvlnvt iyfkglwksk fspentrkel fykadgescs asmmmyqegkf ryrrvaegtq  
 301 vlelpkgdd itmvlipkp ekslakveke ltpevlqewl deleemmlvv hmprfriedg  
 361 fslkeqlqdm glvdlfspeк sklpgivaeg rddlyvsdaf hkaflevnee gseaaastav  
 421 viagrslnpn rvtfkanrpf lvfirevpln tiifmgrvan pcvk

#### SEQ ID NO: 5 антитромбин (ATIII)

Зрелый белок соответствует остаткам 33-464. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mkhslnalli fliitsawgg skgpldqlek ggetaqsdap qweqlnnknл smpllpadfh  
 61 kentvndwi pegeedddyl dlekifsedd dyidivdsis vsptdsdvsa gnilqlfhgk  
 121 sriqrlniln akfafnlyrv lkdqvntfdn ifiapgjist amgmislgik getheqvhsi  
 181 lhfkdfvnas skyeittihh lfrklthrlf rrrngyttrs vndliyqkqf pilldfktkv  
 241 reyyfaeaqi adfsdpafis ktnnhimklt kglikdalen idpatqmmil nciyfkgsww  
 301 nkfpvemthn hnfrlnerev vkvsmmqtkg nflaandqel dc当地leyv ggismlivvp  
 361 hkmmsgmktle aqlptrvver wqksmtnrtr evllpkfkle knynlveslk lmgirmfdk  
 421 ngnmagisdq riadlfkhq gtitvneegt qattvtvgf mplstqvrt vdrpflffly  
 481 ehrtscifm grvanpsrs

#### SEQ ID NO: 6 гепариновый кофактор II

Зрелый белок соответствует остаткам 20-499. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mpssvswgil llaglcclvp vslaedpqgd aaqktdtshh dqdhptfnki tpnlaefafs  
 61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamisl gtkadthdei leglnfnite ipeaqihegf  
 121 qellrtlnqp dsqqltgn glflseglkl vdkfledvkk lyhseafatn fgdteeakkq  
 181 indyvekgtq gkivdlykel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdtreee dfhvdqvttv  
 241 kpvmmkrilm fniqhckkls swvllmkylg nataifflpd egklqhlene lthdiitkfl  
 301 enedrrsasl hlpklsitgt ydlksvlgql gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka  
 361 vltidekgte aagamfleai pmsippev kf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

#### SEQ ID NO: 7 $\alpha_1$ -антитрипсин ( $\alpha_1$ AT)

Зрелый белок соответствует остаткам 25-418. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mhlidylll lvglalshg qlhvehdges csnsshqqil etgegspslk iapanadfaf  
 61 rfyliaset pgkniffspl sisayaml s lgcshrsq ileglfnlt elsesdvhrg  
 121 fqhlhtlnl pghgletrvg salflshnlk flakflndtm avyeaklfht nfydtvgtiq  
 181 lindhvkket rgkvldvse lkkdvlmvlv nyiyfkalwe kpfissrtt kdfyvdentt  
 241 vrvpmmlqdq ehhwylhdry lpcsvlrmddy kgdatvffil pnqgkmreie evlpeimr  
 301 wnnllrkrf ykklehlpk fsisgsyvld qilrlgftd lfskwadlsg itkqqkleas  
 361 ksfhkatldv deagteaaaa tsfaikffa qtnrhilrfn rpflvvifst stqsvlflgk  
 421 vvdptkp

#### SEQ ID NO: 8 каллистатин

Зрелый белок соответствует остаткам 21-427. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mqmspaltcl vlglafvge gsavhhppsy vahlasdfgv rvfqqaqas kdrnvvfspy  
 61 gvasvlamlq ltggetqqq iqaaamgfkid dkgnmapalrh lykelmpwn kdeisttdai  
 121 fvqrdlklvq gfmphffrlf rsvtkqvdfs everarfiin dwvkthkgm isnllgkgav  
 181 dqltrlvvn alyfngqwkt pfpdsssthrr lfhsdgstv svpmmaqtnk fnyteftpd  
 241 ghyydilelp yhgdtslmfi aapyekevpl saltnilsaq lishwggnmt rlprllvlpk  
 301 fsletevdlr kplenlgmtd mfrqfqadft slsdqeplhv aqalqkvkie vnesgtvass  
 361 stavivsarm apeeiimdrp flfvvrhnpt gtvlfmgqvm ep

#### SEQ ID NO: 9 ингибитор активатора плазминогена

Зрелый белок соответствует остаткам 24-402. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mkvvpslls vllaqvwlp glapspqspe tparqnqtsr vvqapkeeee deqeaseeka  
 61 seeekawlma srqqlakets nfgfsllrki smrhdgnmvf spfgmislamt glmlgatgpt  
 121 etqikrglhl qalkptkpgl lpslfkglre tlsrcnlelgl tqgsfafihk dfdvketffn  
 181 lskryfdtec vpmnfrnasq akrlmnhyin ketrgkipkl fdeinpetkl ilvdylfk  
 241 kwltptdfpv tevdtdfhd़ yktikvpmmmy gagkfastfd knfrchvkl pyqgnatmlv  
 301 vlmekmgdhl aledyltdl vetwlrmkt rnmevffpkf kldqkyemhe llrqmgirri  
 361 fspfadlssel satgrnlqvs rvlqrtviev dergteavag ilseitaysm ppvikvdrpf  
 421 hfmieetsg mllflgrvvn ptll

#### SEQ ID NO: 10 протеин Z-зависимый ингибитор

Зрелый белок соответствует остаткам 22-444. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mnwhlplfll asvtlpsics hnplsleel gsntgiqvfn qivksrphdn ivisphgias  
 61 vlgmlqlgad grtkkqlamv mrygvngvkg ilkkinkai skknkddivtv anavfvknas  
 121 eievpfvtrn kdvfqcevrn vnfedpasac dsinawvkne trdmnidlls pdlidgvltr  
 181 ltvnavyfk glwksrfqpe ntkkrtvaa dgksyqvpml aqlsvrcgs tsapndlwyn  
 241 fielpyhges ismlialpte sstplsaiip histktidsw msimvpkrq vilpkftava  
 301 qtdlkplkv lgitdmfdss kanfakitt senlhvshil qkakievsed gtkasaatta  
 361 ijarsppw fidrpflff irhnpptgavl fmqgqinkp

#### SEQ ID NO: 11 протеаза нексин 1

Зрелый белок соответствует остаткам 20-398 - изоформа а. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

1 mpssvsgil llaglcclvp vslaedpqgd aaqktdtshh dqdhpfnki tpnlafafs  
 61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamlsI gk Kadthdei leglnfnlt ipeaqihegf  
 121 qellrlnqp dsqqlttgn glflseglkl vdkfledvkk lyhseaftvn fgdteeakkq  
 181 indyvekgtq gkivdvlkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdtreee dfhvdqvtv  
 241 kvpmmkrlgm fniqhckkls swvllmkylg nataiflpld egklqhlene lthdiitkfl  
 301 enedrrsasl hlpklsitgt ydlksvlgql gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka  
 361 vltidekgte aagamfleai krkippevkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

SEQ ID NO: 12 модифицированный серпин в  $\alpha_1$ AT скаффолде

Зрелый белок соответствует остаткам 25-418. Остатки P4, P2, P1 и P1' RCL выделены жирным и подчеркнуты.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный серпин, имеющий мутации по остаткам P1' и P2 в петле реактивного центра (RCL), где
  - остаток P1 модифицированного серпина представляет собой R или заменен R;
  - остаток P1' заменен Q, H, K или R; а остаток P2 заменен H, K или R; и
  - указанные мутации повышают способность указанного серпина ингибировать активированный протеин C по сравнению с активностью одной или более протеаз-прокоагулянтов, выбранных из тромбина, fVIIa, fXa, fIXa и fXIa.
2. Модифицированный серпин по п.1, где остаток P1' заменен K или Q.
3. Модифицированный серпин по п.1 или 2, где остаток P2 заменен K.
4. Модифицированный серпин по п.1, где остатки P2 и P1' в модифицированном серпине соответственно представляют собой KK, RK, RH, KH, RQ или KQ.
5. Модифицированный серпин по любому из пп.1-4, где модифицированный серпин дополнительно содержит мутацию по остатку P4.
6. Модифицированный серпин по п.5, где остаток P4 заменен F, S, R, V, C, W, K, G, L, H, T, Q или A.
7. Модифицированный серпин по п.5 или 6, где мутации в RCL модифицированного серпина состоят из мутаций в позициях P1' и P2; в позициях P1', P2 и P1; мутаций в позициях P1', P2 и P4 или в позициях P1', P2, P4 и P1.
  - 8. Модифицированный серпин по любому из пп.5-7, где
    - остаток P4 представляет собой K, остаток P2 представляет собой R и остаток P1' представляет собой H;
    - остаток P4 представляет собой F, остаток P2 представляет собой K и остаток P1' представляет собой K;
    - остаток P4 представляет собой F, остаток P2 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;
    - остаток P4 представляет собой S, остаток P2 представляет собой H и остаток P1' представляет собой R;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K и остаток P1' представляет собой K;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой R и остаток P1' представляет собой H;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K и остаток P1' представляет собой H;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой R и остаток P1' представляет собой Q;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K и остаток P1' представляет собой Q;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K;
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой Q; или
    - остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой R, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой Q.
  - 9. Модифицированный серпин по любому из пп.1-8, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности серпина дикого типа.
  - 10. Модифицированный серпин по п.9, где серпин дикого типа выбран из группы, состоящей из  $\alpha_1$ -антитрипсина (SERPINA3), ингибитора C1-эстеразы,  $\alpha_2$ -антиплазмина (SERPINF2), антитромбина (ATIII) (SERPINC1), гепаринового кофактора II (HCII) (SERPIND1), ингибитора протеина C (PCI) (SERPINA5) или  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ AT) (SERPINA1), каллистатина (SERPINA4), ингибитора активатора плазминогена (SERPINE1), протеазы нексин 1 (SERPINE2) и ингибитора протеин Z-зависимой протеазы (SERPINA10).
  - 11. Модифицированный серпин по любому из пп.5-10, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности, состоящей из остатков 25-418 SEQ ID NO: 12, где остаток P4 представляет собой A, остаток P2 представляет собой K, остаток P1 представляет собой R и остаток P1' представляет собой K.
  - 12. Модифицированный серпин по п.11, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность, состоящую из остатков 25-418 SEQ ID NO: 12;

(ii) аминокислотную последовательность, состоящую из остатков 25-418 SEQ ID NO: 12 с мутацией С в S в остатке 256;

(iii) аминокислотную последовательность, состоящую из остатков 25-418 SEQ ID NO: 12 с мутацией Е в S в остатке 25; или

(iv) аминокислотную последовательность, состоящую из остатков 25-418 SEQ ID NO: 12 с мутацией Е в S в остатке 25 и мутацией С в S в остатке 256.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный серпин по любому из пп.1-12.

14. Вектор для экспрессии модифицированного серпина по любому из пп.1-12, содержащий нуклеиновую кислоту по п.13.

15. Рекомбинантная клетка для экспрессии модифицированного серпина по любому из пп.1-12, содержащая вектор по п.14.

16. Фармацевтическая композиция для лечения кровотечения или обеспечения гемостаза, содержащая модифицированный серпин по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

17. Способ лечения кровотечения или обеспечения гемостаза, включающий введение модифицированного серпина по любому из пп.1-12 индивидууму, нуждающемуся в этом.

18. Способ по п.17, где индивидуум имеет нарушение свертываемости крови.

19. Способ по п.18, где нарушение свертываемости крови представляет собой гемофилию.

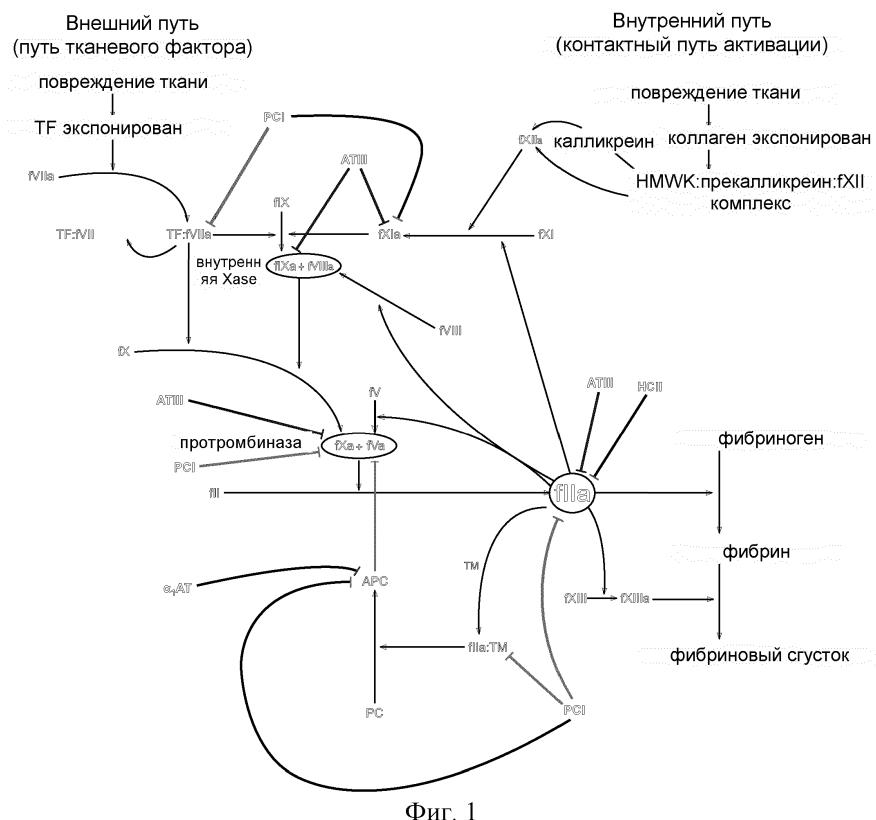
20. Способ по п.17, где индивидуум представляет собой пациента с травмой.

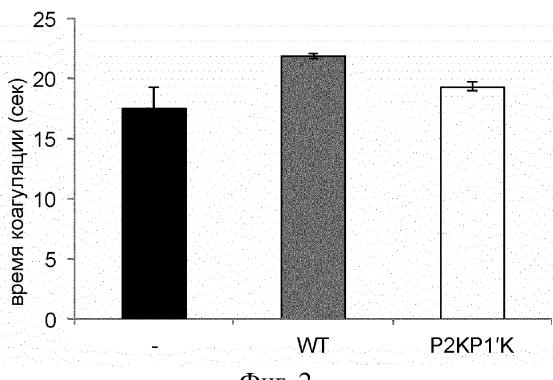
21. Применение модифицированного серпина по любому из пп.1-12 для изготовления лекарственного средства для лечения или предотвращения кровотечения или обеспечения гемостаза у индивидуума.

22. Применение по п.21, где индивидуум имеет нарушение свертываемости крови.

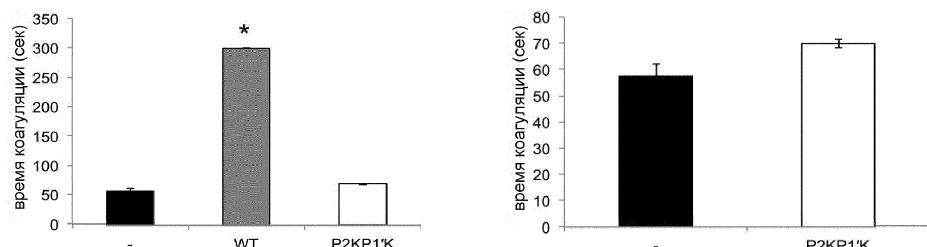
23. Применение по п.22, где нарушение свертываемости крови представляет собой гемофилию.

24. Применение по п.21, где индивидуум представляет собой пациента с травмой.

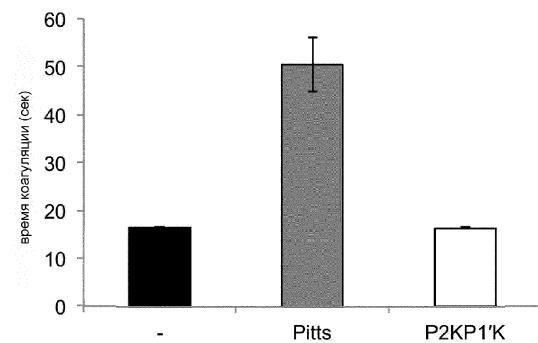




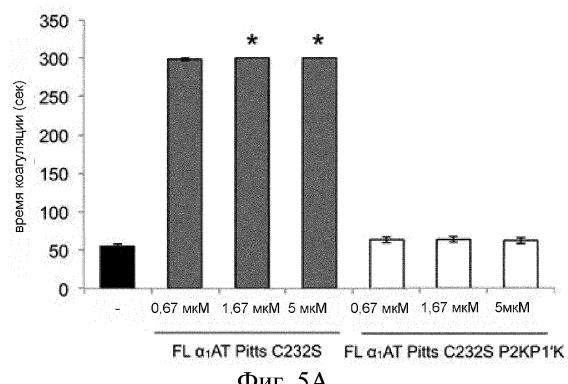
Фиг. 2

**A****B**

Фиг. 3

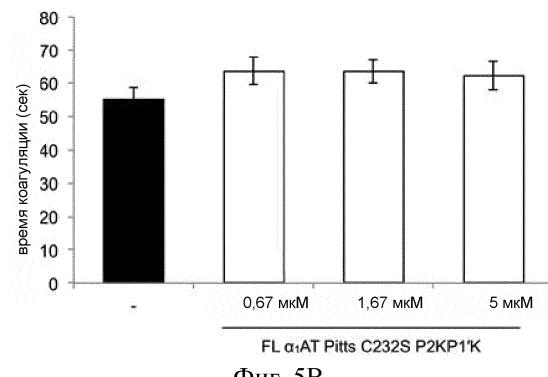


Фиг. 4

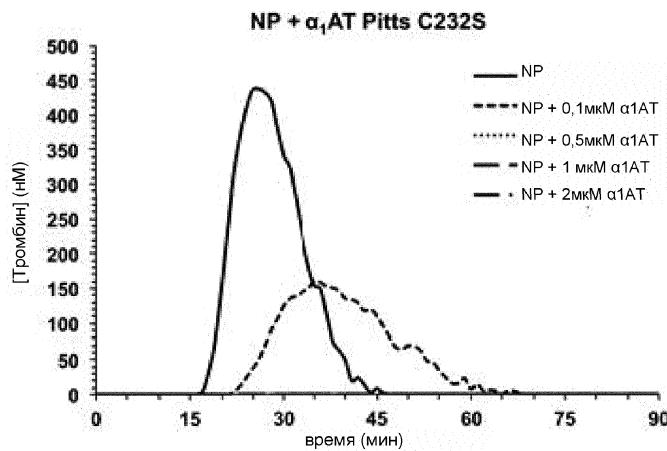


Фиг. 5А

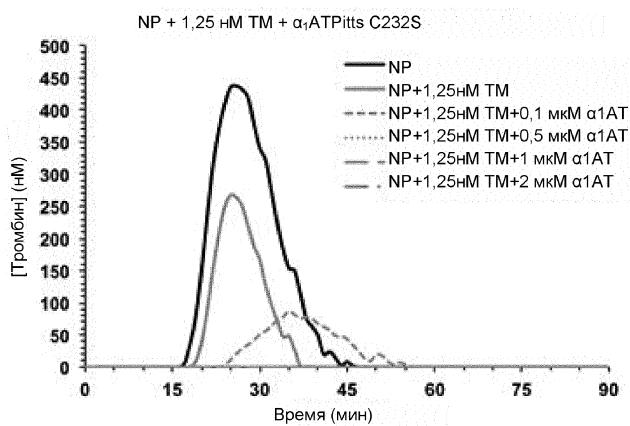
**034050**



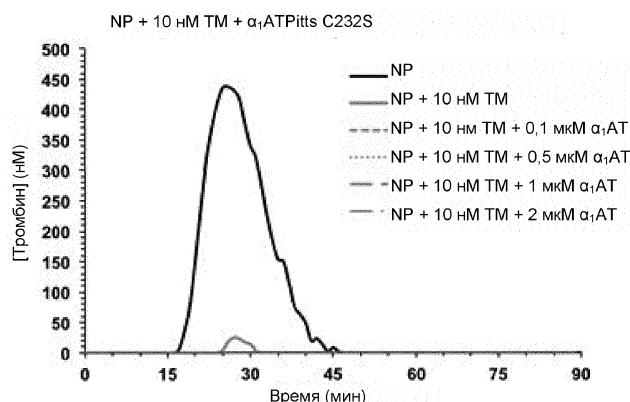
Фиг. 5В



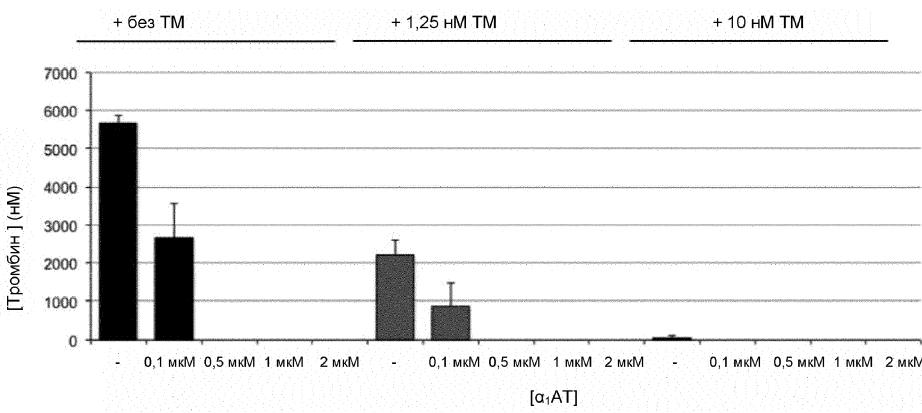
Фиг. 6А



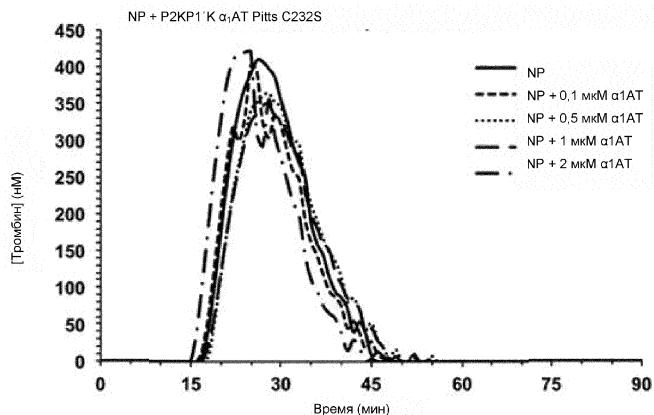
Фиг. 6В



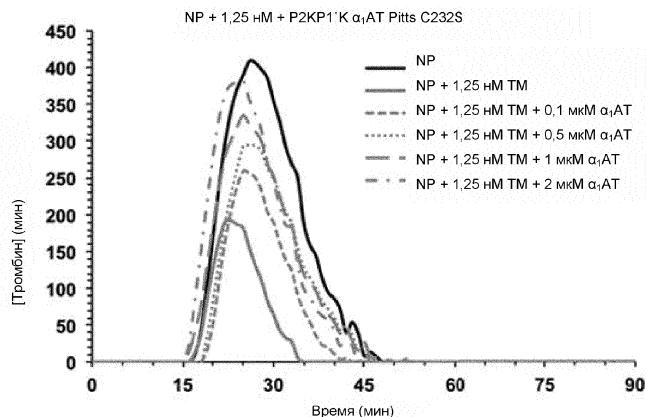
Фиг. 6С



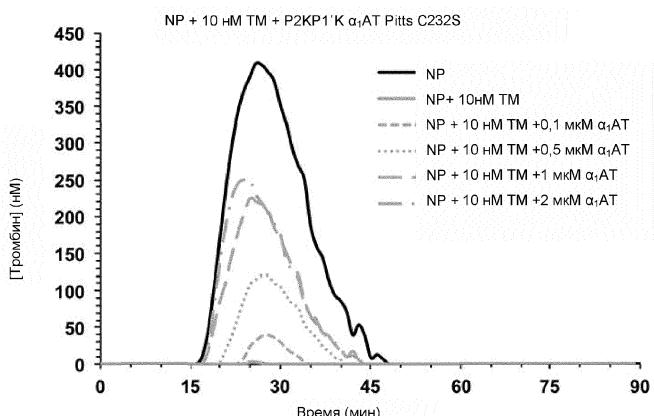
Фиг. 6Д



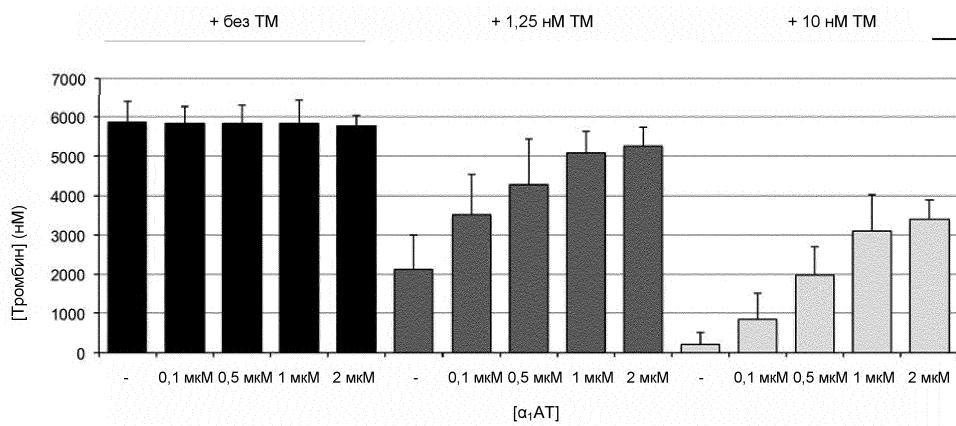
Фиг. 7А



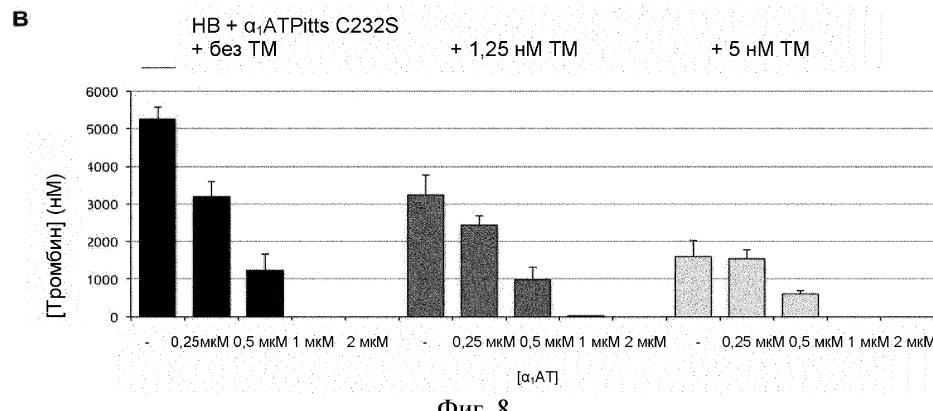
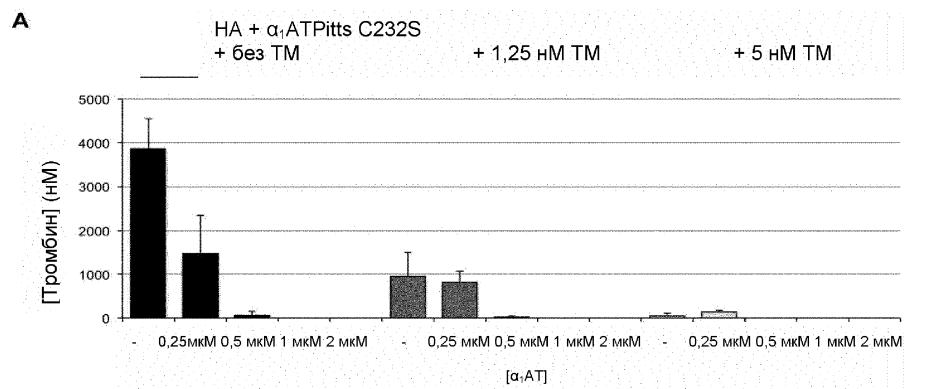
Фиг. 7В



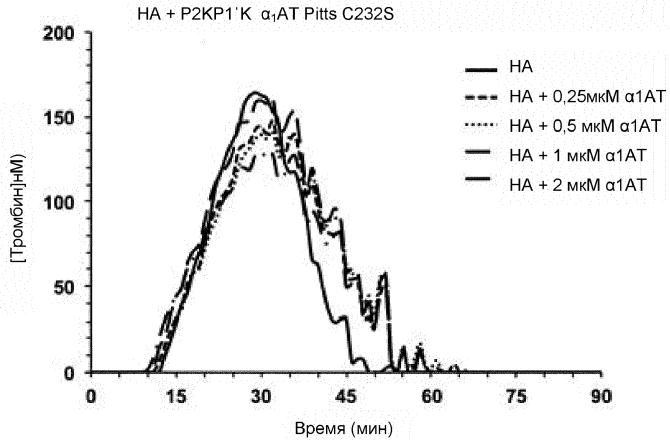
Фиг. 7С



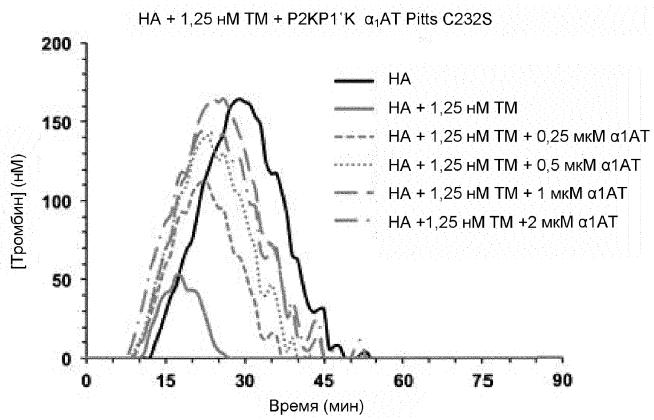
Фиг. 7Д



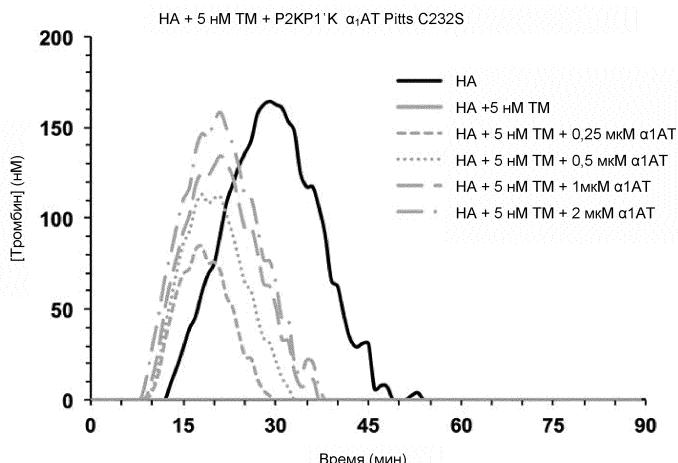
Фиг. 8



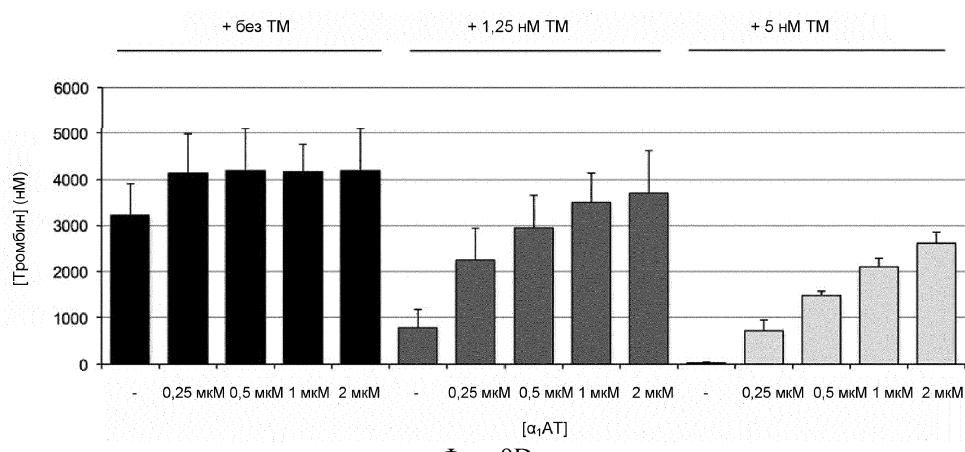
Фиг. 9А



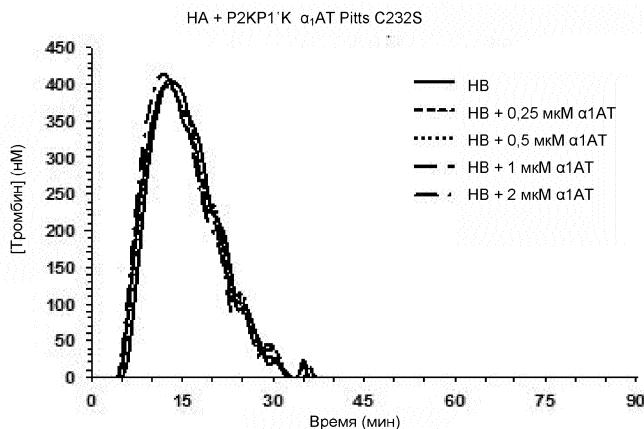
Фиг. 9В



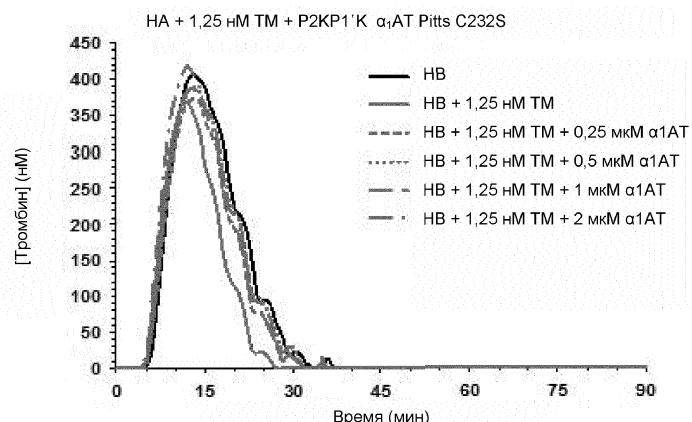
Фиг. 9С



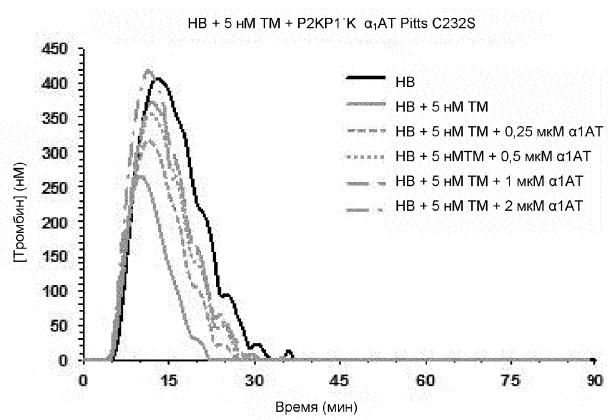
Фиг. 9Д



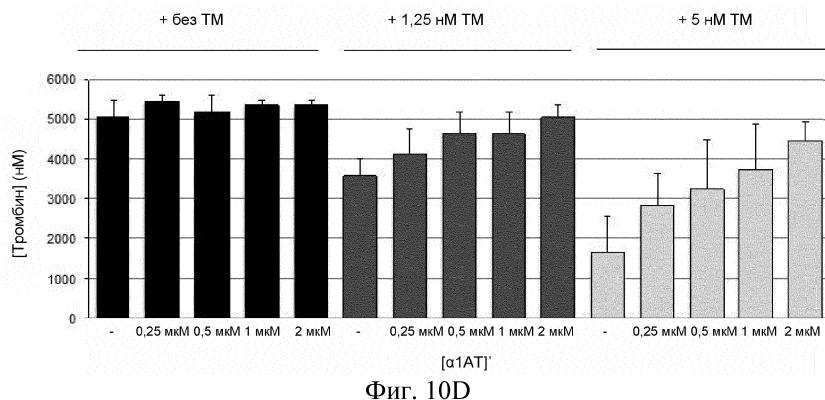
Фиг. 10А



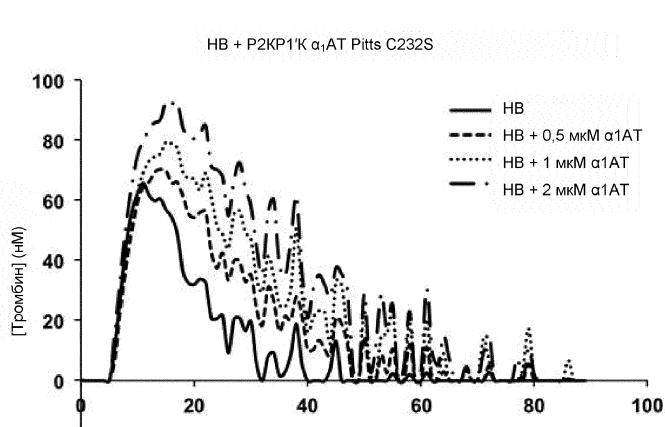
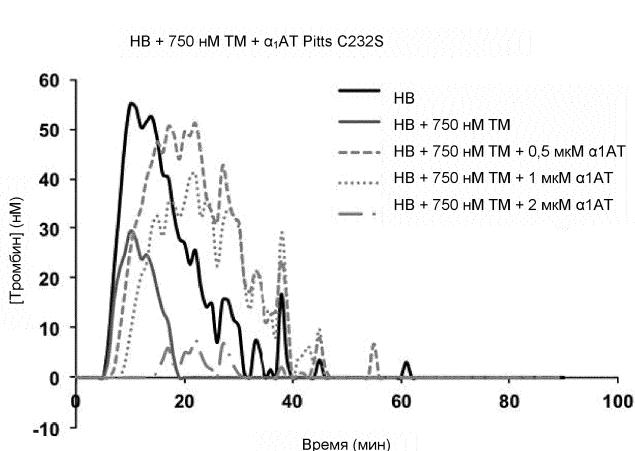
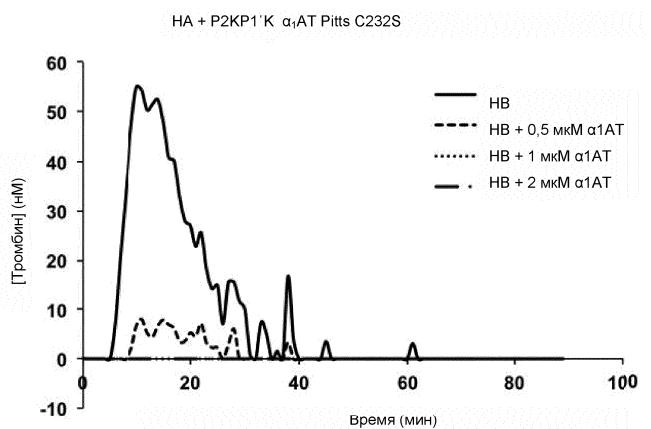
Фиг. 10В



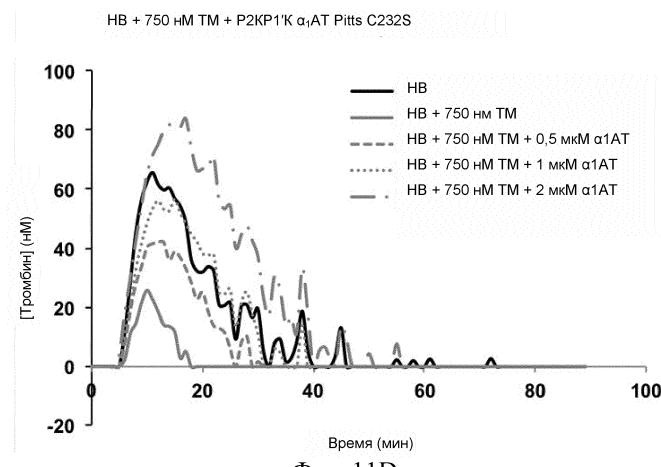
Фиг. 10С



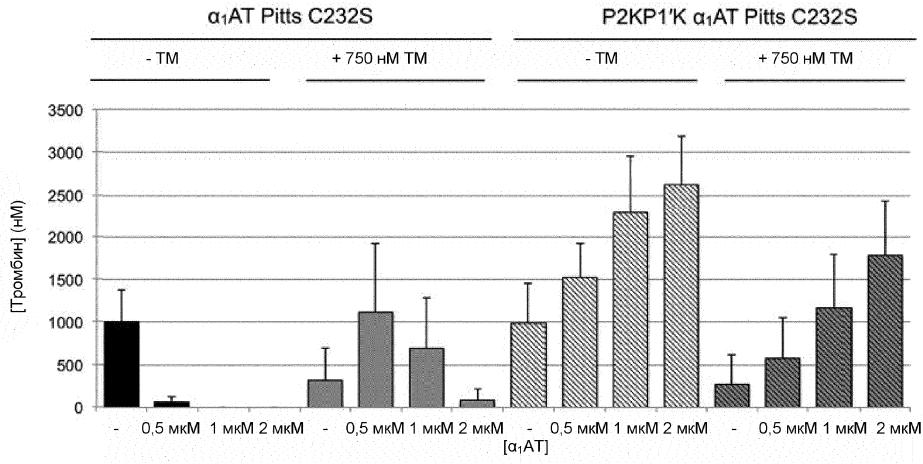
Фиг. 10Д



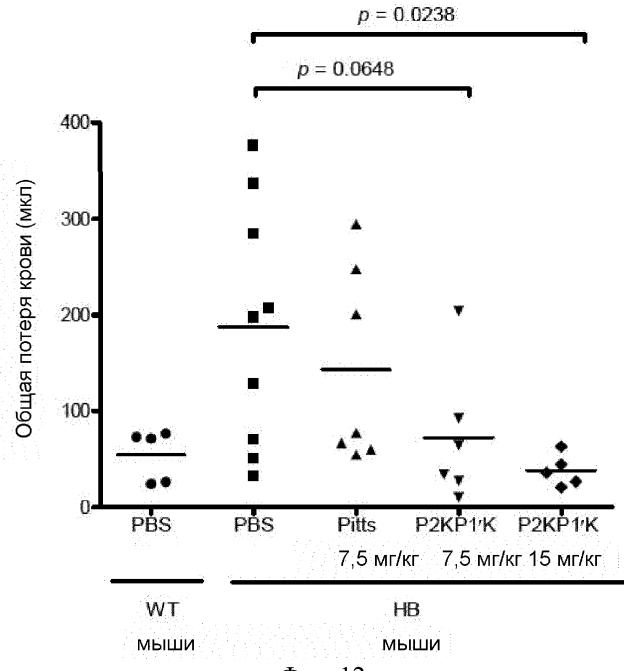
### 034050



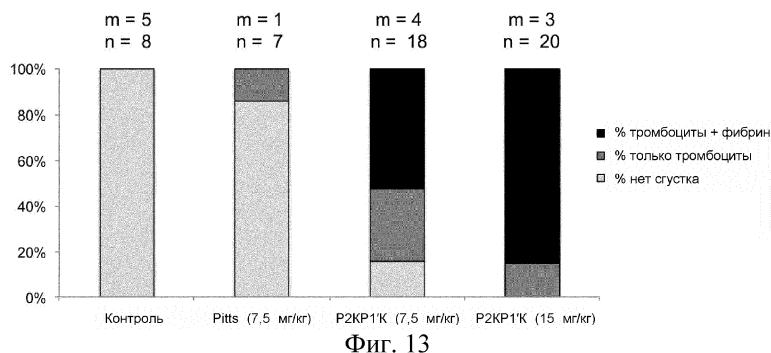
Фиг. 11D



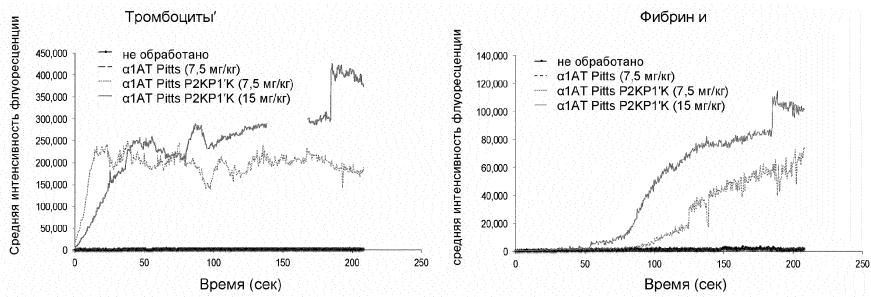
Фиг. 11E



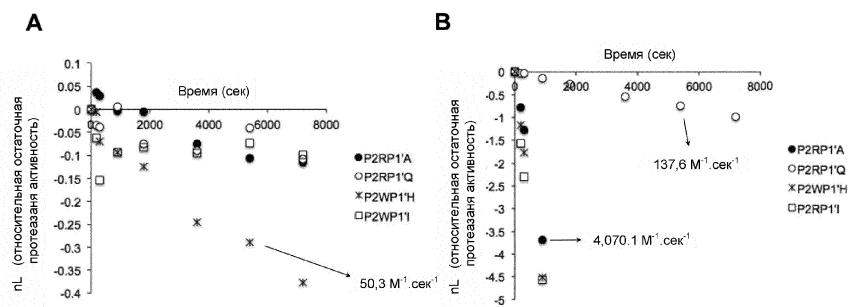
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2