



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.27

(21) Номер заявки
201990373

(22) Дата подачи заявки
2017.08.04

(51) Int. Cl. **A61K 38/48** (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ADAMTS13 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ, УМЕНЬШЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ И/ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ВАЗООККЛЮЗИВНОГО КРИЗА ПРИ СЕРПОВИДНОКЛЕТОЧНОЙ АНЕМИИ, ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЛЕГКОГО И/ИЛИ ОСТРОМ РЕСПИРАТОРНОМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМЕ

(31) **62/371,030**

(32) **2016.08.04**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/US2017/045573**

(87) **WO 2018/027169 2018.02.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
**Эвенштейн Брюс, Голдштейн Брахм
(US), Мажер Бернард, Россато Паоло,
Шайфлингер Фридрих, Туресек
Мариетта (AT)**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Парамонова К.В., Лыгу Т.Н., Строкова
О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Лебедев В.В., Глухарёва А.О.,
Осипенко Н.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) BRANDY PICKENS ET AL.: "Platelet-delivered ADAMTS13 inhibits arterial thrombosis and prevents thrombotic thrombocytopenic purpura in murine models", BLOOD, vol. 125, № 21, 21 May 2015 (2015-05-21), p. 3326-3334, XP055414054, DOI: 10.1182/blood-2014-07-, the whole document

M. CRESCENTE ET AL.: "ADAMTS13 exerts a thrombolytic effect in microcirculation", THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 108, № 3, 1 January 2012 (2012-01-01), p. 527-532, XP055414066, DE, ISSN: 0340-6245, DOI: 10.1160/TH12-01-0046, the whole document, fig. 1

CHAUHAN A.K. ET AL.: "Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 203, № 3, 13 March 2006 (2006-03-13), p. 767-776, XP002564641, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20051732 [retrieved on 2006-03-13], the whole document

JOHN-JOHN B. SCHNOG ET AL.: "ADAMTS13 activity in sickle cell disease", AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 81, № 7, 1 July 2006 (2006-07-01), p. 492-498, XP055413933, US, ISSN: 0361-8609, DOI: 10.1002/ajh.20653, the whole document, p. 493, left-hand column, p. 497, left-hand column

B. PLAIMAUER ET AL.: "Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies : rADAMTS13 overrides inhibitors in TTP plasma", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 9, № 5, 1 May 2011 (2011-05-01), p. 936-944, XP055413920, GB, ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04224.x, the whole document, tables 1, 2

CLAUDIA TERSTEEG ET AL.: "Potential for Recombinant ADAMTS13 as an Effective Therapy for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Significance", ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 35, № 11, 3 September 2015 (2015-09-03), p. 2336-2342, XP055413918, US, ISSN: 1079-5642, DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306014, the whole document, paragraph [Results]

A. KOPIC ET AL.: "Preclinical assessment of a new recombinant ADAMTS-13 drug product (BAX930) for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 14, № 7, 1 July 2016 (2016-07-01), p. 1410-1419, XP055413913, GB, ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/jth.13341, the whole document, fig. 1, 2

M. SKULLY ET AL.: "FIB04 - Recombinant human ADAMTS13: first-in-human study evaluating pharmacokinetics, safety and tolerability in hTTP patients", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 14, № S1, 28 May 2016 (2016-05-28), p. 39, XP055414406, abstract

H.J. EHRLICH ET AL.: "Development of novel treatment options for patients with haemophilia", HAEMOSTASEOLOGIE, vol. 33, № 1, 1 January 2013 (2013-01-01), p. S36-S38, XP055413904, the whole document, p. 538, left-hand column, paragraph 2

BILLAN ZHAO ET AL.: "The Role of von Willebrand Factor and ADAMTS13 in the No-Reflow Phenomenon after Primary Percutaneous Coronary Intervention", TEXAS HEART INSTITUTE JOURNAL, vol. 38, № 5, 1 January 2011 (2011-01-01), p. 516-522, XP055413991, the whole document

CAMILLA L'ACQUA ET AL.: "New perspectives on the thrombotic complications of haemolysis", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 168, № 2, 13

- (57) Изобретение относится к композициям и способу лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения вазоокклюзивного криза (VOC) у субъекта, страдающего серповидноклеточной анемией (SCD). Изобретение также относится к композициям и способам лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего острым повреждением легкого (ALI) и/или острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS) или подверженного риску их развития. Изобретение относится к дезинтегрину и металлопротеиназе с мотивом тромбоспондина 1-го типа 13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, member-13 - ADAMTS13) или композиции, содержащей ADAMTS13, для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения VOC или для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития.

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество по 35 U.S.C. § 119(e) в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/371030, поданной 4 августа 2016 г., которая, таким образом, включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее раскрытие относится к способу лечения серповидноклеточной анемии с помощью дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивом тромбоспондина 1-го типа 13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, member-13 - ADAMTS13). Более конкретно, настоящее раскрытие относится к способу лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения вазоокклюзивного криза (VOC) у субъекта с серповидноклеточной анемией (SCD) путем введения ADAMTS13. Настоящее раскрытие относится к применениям ADAMTS13 и/или композиций, содержащих ADAMTS13, для получения лекарственных препаратов для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения VOC при SCD. Настоящее раскрытие также относится к способу лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего острым повреждением легкого (ALI) и/или острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS) или подверженного риску их развития, посредством ADAMTS13 и к применениям ADAMTS13 и/или композиций, содержащих ADAMTS13, для получения лекарственных препаратов для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения ALI и/или ARDS.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Серповидноклеточная анемия (SCD) представляет собой всемирно распространенное наследственное нарушение эритроцитов, которое возникает в результате точечной мутации (β^S , 6V) в цепи β -глобина, приводящей к образованию дефектной формы гемоглобина - гемоглобина S (HbS). Исследования кинетики полимеризации HbS после дезоксигенации показали, что она является экспоненциальной функцией высокого порядка концентрации гемоглобина, что подчеркивает важнейшую роль концентрации клеточного HbS при серповидности. Патологические исследования показали, что плотные дегидратированные эритроциты играют центральную роль в острых и хронических клинических проявлениях SCD, при этом внутрисосудистое образование серповидных форм эритроцитов в капиллярах, мелких сосудах и крупных сосудах приводит к вазоокклюзии и нарушению кровотока с ишемическим повреждением клеток ряда органов и тканей.

У пациентов с SCD наблюдались повышенные уровни фактора фон Виллебранда (VWF) и ультрабольших мультимеров VWF, которые связаны с острыми вазоокклюзивными эпизодами. Уровни ультрабольших мультимеров VWF зависят от активности металлопротеазы под названием дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1-го типа 13 (ADAMTS13), которая расщепляет гиперреактивные ультрабольшие мультимеры VWF в условиях высокого напряжения сдвига в жидкости, играя важную роль в поддержании надлежащего баланса гемостатической активности и риска развития тромбоза. ADAMTS13 расщепляет VWF между остатками Tyr¹⁶⁰⁵ и Met¹⁶⁰⁶, что соответствует остаткам 842-843 после расщепления препропоследовательности. Именно такое ADAMTS13-опосредованное расщепление VWF в значительной степени отвечает за модуляцию размера мультимера VWF и гемостатическую активность. VWF, высвобождаемый в результате стимуляции или циркулирующий в крови, важен при тромбоцитарном тромбообразовании, поскольку он играет определенную роль с коллагеном при адгезии и агрегации тромбоцитов в субэндотелиальной ткани, включая поврежденные стенки сосудов. Высвобождение VWF сопровождается и частично запускается активацией эндотелия сосудов. Таким образом, биомаркеры сосудистого воспаления дают дополнительную информацию о риске развития вазоокклюзивных эпизодов.

Внеклеточный гемоглобин (ECHb) повышается у пациентов с SCD и ингибирует опосредованный ADAMTS13 протеолиз VWF путем связывания с доменом A2 VWF, в частности с сайтом расщепления ADAMTS13. Тромбоспондин-1 (TSP1), который также повышается у пациентов с SCD, связывается с доменом A2 ультрабольших мультимеров VWF, а также предупреждает разрушение VWF под действием ADAMTS13 путем конкурентного ингибирования активности ADAMTS13.

SCD представляет собой врожденное пожизненное заболевание. Люди с SCD наследуют два аномальных гена гемоглобина β^S , по одному от каждого родителя. Когда у человека присутствуют два гена гемоглобина S, Hemoglobin SS (Hb SS), заболевание называется серповидноклеточной анемией. Это наиболее распространенная и зачастую наиболее тяжелая разновидность SCD. Двумя другими распространенными формами SCD являются заболевание с гемоглобином SC и талассемия с гемоглобином S β . При всех формах SCD по меньшей мере один из двух аномальных генов обуславливает выработку организмом человека гемоглобина S или серповидного гемоглобина в своих эритроцитах. Гемоглобин представляет собой белок эритроцитов, который переносит кислород в организме. Серповидный гемоглобин отличается от нормального гемоглобина своей склонностью формировать полимеры в условиях низкого давления кислорода, которые образуют жесткие стержни в эритроцитах, превращая его в полумесяц или серповидную форму. Серповидные клетки не обладают гибкостью, что может привести к закупорке, которая замедляет или останавливает кровоток и фактически препятствует микроциркуляции. Когда это

происходит, кислород не может достичь близлежащих тканей. Недостаток кислорода в тканях может вызвать приступы внезапной сильной боли, называемой вазоокклюзивным кризом (VOC), болевым кризом или серповидноклеточным кризом, что приводит к ишемическому повреждению снабжаемого органа и последующей боли. Болевые кризы представляют собой наиболее отличительный клинический признак VOC при SCD и являются основной причиной посещений отделений неотложной помощи и госпитализаций для больных пациентов.

VOC инициируется и поддерживается взаимодействиями между серповидными клетками, в том числе серповидноклеточными ретикулоцитами, эндотелиальными клетками, лейкоцитами и компонентами плазмы крови, в том числе VWF. Вазоокклюзия ответственна за широкий спектр клинических осложнений при SCD, включая болевые синдромы, инсульт, язвы ног, самопроизвольный аборт и почечную недостаточность. Боль при VOC зачастую нельзя полностью излечить. Современное лечение VOC включает, среди прочего, применение жидкостей, кислорода и анальгезии, при этом частоту VOC можно уменьшить постоянным переливанием эритроцитов (RBC), а также гидроксимочевины. Тем не менее несмотря на достижения в лечении боли врачи зачастую неохотно дают пациентам надлежащие дозировки наркотических анальгетиков из-за опасений по поводу развития зависимости, толерантности и побочных эффектов. Помимо острого VOC другие острые и хронические осложнения SCD включают заболевание почек, инфаркт селезенки, повышенный риск развития бактериальной инфекции, острую и хроническую анемию, грудной синдром, инсульт и заболевание глаз.

Острая боль у пациентов с SCD обусловлена ишемическим повреждением ткани в результате окклюзии микрососудистого ложа серповидными эритроцитами во время острого криза. Например, считается, что сильная боль в костях, которая характерна для VOC, вызвана повышенным внутримедуллярным давлением, особенно в пределах околоуставных областей трубчатых костей, на фоне острой воспалительной реакции на некроз сосудов костного мозга серповидными эритроцитами. Боль также может возникать из-за вовлечения надкостницы или околоуставной мягкой ткани суставов. Влияние непредсказуемых рецидивов острых кризов на хроническую боль создает уникальный болевой синдром.

Тяжесть SCD широко варьирует среди различных людей. Достижения в диагностике и лечении SCD увеличили предполагаемую продолжительность жизни людей с SCD. В странах с высоким уровнем дохода, таких как США, предполагаемая продолжительность жизни человека с SCD составляет сейчас приблизительно 40-60 лет, тогда как 40 лет назад это было всего лишь 14 лет. Тем не менее в настоящее время пересадка гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) является единственным лекарством от SCD. К сожалению, большинство людей с SCD либо слишком стары для пересадки, либо не имеют родственника, который имеет достаточно хорошее генетическое соответствие, чтобы он мог выступать в качестве донора для успешной пересадки. Таким образом, в настоящей области техники существует потребность в улучшенных средствах лечения SCD, включая лечение вазоокклюзивных эпизодов SCD, с помощью которых можно уменьшить симптомы, предупредить осложнения и увеличить продолжительность и улучшить качество жизни.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие относится к способу лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения вазоокклюзивного криза (VOC) у субъекта, страдающего серповидноклеточной анемией (SCD), причем способ предусматривает введение нуждающемуся в том субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ADAMTS13.

Настоящее раскрытие относится к способу лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего острым повреждением легкого (ALI) и/или острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS), причем способ предусматривает введение нуждающемуся в том субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ADAMTS13.

Настоящее раскрытие относится к применениям ADAMTS13 и/или композиций, содержащих ADAMTS13, для получения лекарственных препаратов. В настоящем раскрытии приведены также и другие родственные аспекты.

Настоящее раскрытие относится к способу лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD, причем способ предусматривает введение нуждающемуся в том субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ADAMTS13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекта лечат после появления симптомов VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекта лечат до появления симптомов VOC криза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение уменьшает по меньшей мере одно из воспаления, вазоконстрикции или агрегации тромбоцитов или комбинации любых из них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение приводит в результате по меньшей мере к одному из улучшенной выживаемости, улучшенного функционирования легкого или уменьшенного повреждения органа, уменьшенной легочной транссудации или комбинации любых из них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение уменьшает и/или предупреждает по меньшей мере одно из нарушения кровотока (например, ишемии), свертывания крови, сосудистого воспаления, тромбоза, ишемического повреждения клеток или повреждения органа или комбинации любых из них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение уменьшает боль или тяжесть боли и/или пре-

дупреждает их развитие. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение уменьшает частоту возникновения VOC и/или продолжительность приступов VOC. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере одного из VCAM-1, ICAM-1, соотношения P-NF-kB/NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 в органе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сравнение проводят с контрольным субъектом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сравнение проводят с результатами измерений, проведенных до лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления к органам относятся без ограничения легкие, печень, поджелудочная железа, кожа, сетчатка, предстательная железа, яичник, лимфатический узел, надпочечник, почка, сердце, желчный пузырь или желудочно-кишечный тракт. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань органа включает без ограничения ткани легких, печени, селезенки и/или почек. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к увеличению по меньшей мере одного из уровней Hct, Hb, MCV и MCH в крови и/или к снижению по меньшей мере одного из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов в крови по сравнению с контролем.

Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия терапевтически эффективное количество ADAMTS13 для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD, составляет от приблизительно 20 до приблизительно 6000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 40 до приблизительно 4000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 3000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 50 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела.

Согласно конкретным аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD, составляет от приблизительно 10 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 50 до приблизительно 450 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 40 до приблизительно 150 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 400 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 300 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 300 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 200 до приблизительно 300 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 100, приблизительно 150, приблизительно 200, приблизительно 250, приблизительно 300, приблизительно 350, приблизительно 400, приблизительно 450 или приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела.

Согласно дополнительным аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD, составляет от приблизительно 50 до приблизительно 1000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 900 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 200 до приблизительно 800 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 300 до приблизительно 700 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 400 до приблизительно 600 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD, вводят однократной болюсной инъекцией раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз

в день, раз в 12 ч, раз в 8 ч, раз в 6 ч, раз в 4 ч или раз в 2 ч. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят внутривенно или подкожно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят внутривенно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят подкожно.

Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 48 ч после начала VOC. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 24 ч после начала VOC. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 12 ч после начала VOC. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 6 ч после начала VOC.

Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, для предупреждения VOC является достаточным для поддержания эффективного уровня активности ADAMTS13 у субъекта. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, для предупреждения VOC вводят раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю или два раза в неделю для предупреждения VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение является подкожным. Согласно некоторым аспектам введение является внутривенным.

Настоящее раскрытие относится к применению композиции, содержащей ADAMTS13, для лечения или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к композиции, содержащей ADAMTS13, для применения в качестве лекарственного препарата для лечения или предупреждения VOC у субъекта, страдающего SCD.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способы лечения или предупреждения VOC предусматривают (i) введение ADAMTS13 и (ii) оценку того, изменился ли параметр или симптом, причем этот параметр выбран из группы, состоящей из воспаления, вазоконстрикции, агрегации тромбоцитов, функционирования легкого, повреждения органа (например, легкого или почки), легочной трансудации, кровотока, свертывания крови, сосудистого воспаления, тромбоза, ишемического повреждения клеток, наличия боли, тяжести боли, частоты возникновения VOC, продолжительности приступов VOC, VCAM-1, ICAM-1, соотношения P-NF-kB/NF-kB, ET-1, TXAS, HO-1, Hct, Hb, MCV, HDW, количества ретикулоцитов и количества нейтрофилов.

Настоящее раскрытие также относится к способу лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития, причем способ предусматривает введение нуждающемуся в том субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ADAMTS13. Согласно некоторым аспектам субъект страдает патологическим состоянием или комбинацией патологических состояний, которые выбраны из группы, состоящей из воспалительного отека легких, воспалительных легочных инфильтратов, нарушенной оксигенации и гипоксемии. Согласно некоторым аспектам лечение приводит в результате по меньшей мере к одному из улучшенной выживаемости, улучшенного функционирования легкого или уменьшенного повреждения органа, уменьшенной легочной трансудации или комбинации любых из них. Согласно некоторым аспектам лечение уменьшает по меньшей мере одно из воспаления, вазоконстрикции или агрегации тромбоцитов или комбинации любых из них. Согласно некоторым аспектам лечение уменьшает и/или предупреждает по меньшей мере одно из нарушения кровотока (например, ишемии), свертывания крови, сосудистого воспаления, тромбоза, ишемического повреждения клеток или повреждения органа или комбинации любых из них. Согласно некоторым аспектам лечение уменьшает боль или тяжесть боли и/или предупреждает их развитие. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение уменьшает частоту возникновения ALI и/или ARDS и/или продолжительность приступов ALI и/или ARDS. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере одного из VCAM-1, ICAM-1, соотношения P-NF-kB/NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 в органе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сравнение проводят с контрольным субъектом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сравнение проводят с результатами измерений, проведенных до лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления к органам относятся без ограничения легкие, печень, поджелудочная железа, кожа, сетчатка, предстательная железа, яичник, лимфатический узел, надпочечник, почка, сердце, желчный пузырь или желудочно-кишечный тракт. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань органа включает без ограничения ткани легких, печени, селезенки и/или почек. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к

Согласно конкретным аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития, составляет от приблизительно 10 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 50 до приблизительно 450 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 40 до приблизительно 150 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 400 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 300 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 300 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 200 до приблизительно 300 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 100, приблизительно 150, приблизительно 200, приблизительно 250, приблизительно 300, приблизительно 350, приблизительно 400, приблизительно 450 или приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела.

Согласно дополнительным аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития, составляет от приблизительно 50 до приблизительно 1000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 900 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 200 до приблизительно 800 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 300 до приблизительно 700 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 400 до приблизительно 600 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития, вводят субъекту в пределах 48 ч после обнаружения воспалительного отека легких, воспалительных легочных инфильтратов, нарушенной оксигенации или гипоксемии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 24 ч после обнаружения воспалительного отека легких, воспалительных легочных инфильтратов, нарушения оксигенации или гипоксемии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 12 ч после обнаружения воспалительного отека легких, воспалительных легочных инфильтратов, нарушенной оксигенации или гипоксемии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 6 ч после обнаружения воспалительного отека легких, воспалительных легочных инфильтратов, нарушенной оксигенации или гипоксемии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят однократной болюсной инъекцией раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз в день, раз в 12 ч, раз в 8 ч, раз в 6 ч, раз в 4 часа или раз в 2 ч. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят внутривенно или подкожно. В соот-

ветствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят внутривенно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят подкожно.

Согласно различным аспектам настоящего раскрытия, ADAMTS13 является рекомбинантным ADAMTS13. Согласно некоторым аспектам ADAMTS13 получен из плазмы.

Согласно различным аспектам настоящего раскрытия, субъектом является млекопитающее. Согласно некоторым аспектам субъектом является человек.

Согласно некоторым аспектам композиция находится в стабильном водном растворе, готовом для введения.

Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13, для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения повреждения легкого является достаточным для поддержания эффективного уровня активности ADAMTS13 в кровотоке у субъекта.

Настоящее раскрытие относится к применению композиции, содержащей ADAMTS13, для лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития. Согласно некоторым аспектам субъект страдает ALL. Согласно некоторым аспектам субъект страдает ARDS.

Настоящее раскрытие также относится к композиции, содержащей ADAMTS13, для применения в качестве лекарственного препарата для лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения повреждения легкого у субъекта, страдающего ALI и/или ARDS или подверженного риску их развития.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способы лечения или предупреждения ALI/ARDS предусматривают (i) введение ADAMTS13 и (ii) оценку того, изменился ли параметр или симптом, причем этот параметр выбран из группы, состоящей из воспаления, вазоконстрикции, агрегации тромбоцитов, функционирования легкого, повреждения органа (например, легкого или почки), легочной трансудации, кровотока, свертывания крови, сосудистого воспаления, тромбоза, ишемического повреждения клеток, частоты возникновения ALI/ARDS, продолжительности приступов ALI/ARDS, VCAM-1, ICAM-1, соотношения P-NF-kB/NF-kB, ET-1, TXAS, HO-1, Hct, Hb, MCV, HDW, количества ретикулоцитов и количества нейтрофилов.

Вышеизложенное краткое изложение не предназначено для определения каждого аспекта настоящего изобретения, и дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как нижеследующее подробное описание. Предполагается, что весь документ должен быть связан как единое раскрытие, и следует понимать, что предусматриваются любые комбинации описанных в настоящем документе признаков, даже если такая комбинация признаков не встречается совместно в одном предложении, абзаце или разделе настоящего документа. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из последующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены лишь в качестве иллюстрации, поскольку специалистам в настоящей области техники из этого подробного описания станут очевидны различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, на котором показано, что ADAMTS13 защищает мышей с серповидноклеточной анемией (SCD) от гибели, связанной с тяжелым острым VOC. Мышей (n=6) обрабатывали посредством гADAMTS13 (BAX930/SHP655 (2940 FRETS-ед./кг (~3200 ME/кг))) и подвергали воздействию 7% кислорода в течение 10 ч с последующим восстановлением в течение 3 ч на 21% кислороде. Кривые выживания для мышей с SCD, обработанных гADAMTS13, мышей AA (здоровых), обработанных средой, и мышей AA, обработанных ADAMTS13, значительно отличались ($p < 0,001$) от таковых у мышей с SCD, обработанных средой. Через 13 ч ни одно животное не выжило в группе обработанных средой мышей с SCD, в то время как во всех остальных трех группах выжило 100% животных.

На фиг. 2А показано, что у мышей с SCD (SS) было значительно большее количество лейкоцитов и значительно большее содержание белка в бронхоальвеолярном лаваже по сравнению с контролями, что свидетельствует о трансудации. Обработка посредством гADAMTS13 (BAX930/SHP655) заметно уменьшало этот эффект, что свидетельствует об уменьшении системного воспаления и нарушений при легочной сосудистой дисфункции.

На фиг. 2В показано, что гADAMTS13 (BAX930/SHP655) предупреждал индуцированную гипоксией активацию NF-kB в легких мышей AA и мышей с SCD, что свидетельствует о том, что ADAMTS13 уменьшает воспалительный процесс в легких, запускаемый гипоксией.

На фиг. 2С показано, что гADAMTS13 (BAX930/SHP655) предупреждал активацию различных маркеров сосудистой активации и воспалительной васкулопатии в легких у мышей с SCD после воздействия гипоксических условий.

На фиг. 3А показано, что гADAMTS13 (BAX930/SHP655) предупреждал индуцированную гипоксией активацию NF-kB в почках мышей AA и мышей с SCD, а также мышей с SCD в нормальных кислородных условиях, что свидетельствует о том, что ADAMTS13 уменьшает воспалительный процесс, за-

пускаемый гипоксией в почках, а также в легких.

На фиг. 3В показано, что гADAMTS13 (BAX930/SHP655) предупреждал активацию различных маркеров сосудистой активации и воспалительной васкулопатии в почках у мышей с SCD после воздействия гипоксических условий.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие относится согласно различным аспектам к ADAMTS13 для предупреждения, уменьшения интенсивности и/или лечения VOC при SCD. Перед подробным пояснением каких-либо вариантов осуществления настоящего раскрытия раскрываются следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено в своем применении деталями конструкции и расположением компонентов, изложенных в последующем описании или проиллюстрированных на чертежах и в примерах. Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены лишь для организации и не должны рассматриваться как ограничивающие описываемый предмет. Все ссылки, приведенные в настоящей заявке, однозначно включены в настоящее описание посредством ссылки для любых целей.

Настоящее раскрытие охватывает другие варианты осуществления и осуществляется на практике или реализуется различными способами. Кроме того, следует понимать, что фразеология и терминология, применяемые в настоящем документе, предназначены для описания и не должны рассматриваться как ограничивающие. Термины "включающий", "содержащий" или "имеющий" и их варианты понимают как охватывающие перечисленные после них элементы и их эквиваленты, а также дополнительные элементы.

В настоящей заявке используют следующие сокращения:

мышь AA - трансгенные мыши, гомозиготные по гемоглобину А (HbA);

ADAMTS - дезинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондином;

ADAMTS13 - дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1-го типа 13;

ALI - острое повреждение легкого;

ARDS - острый респираторный дистресс-синдром;

BAL - бронхоальвеолярный лаваж;

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

ET-1 - эндотелин 1;

FRETs-ед. - единицы FRETs;

GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

HbA - гемоглобин А;

HbS - серповидный гемоглобин;

HO-1 - гемоксигеназа 1;

H/R - гипоксия/реоксигенация;

ICAM-1 - молекула межклеточной адгезии 1;

ME - международные единицы;

кДа - килодальтон;

LDH - лактатдегидрогеназа;

NF-κB - ядерный фактор каппа-B;

p-NF-κB - фосфо-ядерный фактор каппа-B;

гADAMTS13 - рекомбинантный ADAMTS13;

RBC - эритроцит;

РНК - рибонуклеиновая кислота;

SCD - серповидноклеточная анемия;

мышь SS - трансгенные мыши, гомозиготные по HbS;

TXAS - тромбоксансинтаза;

VCAM-1 - молекула адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа;

VOC - вазоокклюзивный криз;

VWF - фактор фон Виллебранда.

Тут следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают отсылку к формам множественного числа, если контекст очевидно не предписывает иное. Что касается аспектов настоящего раскрытия, описанных как род, все отдельные виды считаются отдельными аспектами настоящего раскрытия. Если аспекты настоящего раскрытия описаны как "включающие" элемент, то также предполагаются варианты осуществления "состоящие из" или "фактически состоящие из" такого элемента.

Применяемые в контексте настоящего документа термины имеют приписываемые им значения, если не указано иное.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "серповидноклеточная анемия (SCD)" описывает группу наследственных нарушений эритроцитов, которые существуют в нескольких формах. Некоторыми формами SCD являются гемоглобин SS, гемоглобин SC, талассемия с гемоглобином Sβ⁰, талассемия с гемоглобином Sβ⁺, гемоглобин SD и гемоглобин SE. Хотя заболевание с гемоглобином SC

и талассемия с гемоглобином S β являются двумя распространенными формами SCD, настоящее раскрытие относится ко всем формам SCD и включает все такие формы.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "вазоокклюзивный криз (VOC)" представляет собой приступ внезапной сильной боли, которая может возникать без предвещающего симптома. VOC, также известный как болевой криз или серповидноклеточный криз, является распространенным болезненным осложнением SCD у подростков и взрослых. VOC инициируется и поддерживается взаимодействиями между серповидными клетками, эндотелиальными клетками и компонентами плазмы крови. Вазоокклюзия ответственна за широкий спектр клинических осложнений при SCD, включая болевые синдромы, инсульт, язвы ног, самопроизвольный аборт и/или почечную недостаточность.

Термины "острое повреждение легкого" (ALI) и "острый респираторный дистресс-синдром" (ARDS) описывают клинические синдромы острой дыхательной недостаточности со значительной заболеваемостью и смертностью (Johnson et al., J. Aerosol Med. Pulmon. Drug Deliv., 23:243-52, 2010). Как ALI, так и более тяжелый ARDS представляют собой спектр заболеваний легких, характеризующихся внезапным началом воспалительного отека легких на фоне множества локальных или системных поражений, включая двусторонние воспалительные легочные инфильтраты и нарушенную оксигенацию или гипоксемию (Walkey et al., Clinical Epidemiology, 4:159-69, 2012). Хотя ALI и ARDS и являются двумя клиническими синдромами повреждения или заболевания легких, настоящее раскрытие относится к и включает в себя применение ADAMTS13 при лечении, предупреждении или уменьшении интенсивности не только ALI и ARDS, но и всех форм повреждения легкого и заболевания легких, особенно заболевания легких, связанного с нарушенной оксигенацией.

"Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1-го типа 13 (ADAMTS13)" также известная как протеаза, расщепляющая фактор фон Виллебранда (VWFPC). Применяемый в контексте настоящего документа термин "ADAMTS13" или "белок ADAMTS13" включает аналоги, варианты, производные (включая химически модифицированные производные) ADAMTS13 и их фрагменты. Согласно некоторым аспектам аналоги, варианты, производные и их фрагменты обладают повышенной биологической активностью по сравнению с ADAMTS13. Согласно различным аспектам ADAMTS13 представляет собой рекомбинантный ADAMTS13 (rADAMTS13) или полученный из крови ADAMTS13, в том числе ADAMTS13, полученный из плазмы или сыворотки крови.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "аналог" относится к полипептиду, например, ADAMTS13, практически схожему по структуре и имеющему такую же биологическую активность, хотя в некоторых случаях и в некоторой степени отличающуюся, что и природная молекула. Аналоги отличаются по составу своих аминокислотных последовательностей по сравнению с природным полипептидом, из которого получен аналог, по одной или нескольким мутациям, включая

(i) делецию одного или нескольких аминокислотных остатков на одном или нескольких концах полипептида (включая фрагменты, как описано выше) и/или в одном или нескольких внутренних участках природной полипептидной последовательности;

(ii) вставку или добавление одной или нескольких аминокислот на одном или нескольких концах (как правило, аналог "с добавлением") полипептида и/или в одном или нескольких внутренних участках (обычно аналог "со вставкой") природной полипептидной последовательности; или

(iii) замену одной или нескольких аминокислот другими аминокислотами в природной полипептидной последовательности; замены являются консервативными или неконсервативными в зависимости от физико-химической или функциональной связи заменяемой аминокислоты и заменяющей ее аминокислоты.

Термин "консервативно модифицированные аналоги" применим как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, то консервативно модифицированные нуклеиновые кислоты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или фактически идентичные аминокислотные последовательности, или, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, то к фактически идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой заданный белок кодирует большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодоном указан аланин, кодон можно изменить на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие изменения нуклеиновой кислоты являются "молчащими изменениями", которые являются одним из видов консервативно модифицированных аналогов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем документе, которая кодирует полипептид, также описывает каждое возможное молчащее изменение нуклеиновой кислоты. Специалист в настоящей области техники поймет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно в каждой описываемой последовательности подразумевают каждое молчащее изменение нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

Что касается аминокислотных последовательностей, специалист в настоящей области техники пой-

мет, что отдельные замены, вставки, делеции, добавления или укорочения последовательности нуклеиновой кислоты, пептидной, полипептидной или белковой последовательности, которая изменяет, добавляет или удаляет одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, дают "консервативно модифицированный аналог", в котором изменение приводит к замене аминокислоты на химически схожую аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в которых приведены функционально схожие аминокислоты, хорошо известны в настоящей области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по настоящему раскрытию.

Каждая из последующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T); и
- 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

Применяемый в контексте настоящего документа термин "вариант" относится к полипептиду, белку или его аналогу, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию, вставку или модификацию при условии, что этот вариант сохраняет биологическую активность нативного полипептида. Термин "вариант" согласно некоторым аспектам взаимозаменяемо применяют с термином "мутант".

Применяемый в контексте настоящего документа термин "аллельный вариант" относится к любой из двух или более полиморфных форм гена, занимающих один и тот же генетический локус. Аллельные изменения возникают естественным путем в результате мутации и согласно некоторым аспектам приводят к формированию фенотипического полиморфизма в популяциях. Согласно определенным аспектам генные мутации являются молчащими (без изменений в кодируемом полипептиде) или согласно другим аспектам кодируют полипептиды, имеющие измененные аминокислотные последовательности. "Аллельные варианты" также относятся к молекулам кДНК, полученным из транскриптов мРНК генетических аллельных вариантов, а также к кодируемым ими белкам.

Термин "производное" относится к полипептидам, которые ковалентно модифицированы путем конъюгирования с терапевтическими или диагностическими средствами, мечения (например, с помощью радионуклидов или различных ферментов), ковалентного присоединения полимера, такого как пегилирование (derivatization с полиэтиленгликолем) и вставки или замены с помощью химического синтеза не встречающихся в природе аминокислот. Согласно некоторым аспектам производные модифицированы так, чтобы они содержали дополнительные химические фрагменты, которые в норме не являются частью молекулы. Согласно определенным аспектам такие производные называют химически модифицированными производными. Такие функциональные фрагменты, согласно различным аспектам, модулируют растворимость, абсорбцию и/или биологический период полужизни молекулы. Функциональные фрагменты, согласно различным другим аспектам, альтернативно уменьшают токсичность молекулы и устраняют или ослабляют любой нежелательный побочный эффект молекулы и т.д. Функциональные фрагменты, способные опосредовать такие эффекты, раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). Процедура связывания таких функциональных фрагментов с молекулой хорошо известна в настоящей области техники. Например, согласно некоторым аспектам производное ADAMTS13 представляет собой молекулу ADAMTS13, имеющую химическую модификацию, которая придает белку более длительный период полужизни *in vivo*. В соответствии с одним вариантом осуществления, полипептиды модифицированы путем добавления известного в настоящей области техники водорастворимого полимера. В соответствии с родственным вариантом осуществления, полипептиды модифицированы гликозилированием, пегилированием и/или полисиалированием.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "фрагмент" полипептида относится к любой части полипептида, которая меньше полноразмерного полипептидного или белкового продукта экспрессии. Фрагменты, как правило, являются делеционными аналогами полноразмерного полипептида, в котором один или несколько аминокислотных остатков были удалены с аминоконца и/или карбоксиконца полноразмерного полипептида. Соответственно "фрагменты" представляют собой подмножество описанных ниже делеционных аналогов.

Термин "рекомбинантный" или "рекомбинантная система экспрессии" при использовании в отношении, например, клетки, указывает на то, что клетка была модифицирована путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка или что клетка получена из модифицированной таким образом клетки. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не встречаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в ином случае экспрессируются аномально, недо-

экспрессируются или вообще не экспрессируются. Настоящий термин также означает клеток-хозяев, которые имеют стабильно интегрированный рекомбинантный генетический элемент или рекомбинантные генетические элементы, играющие регулируемую роль в экспрессии генов, например, промоторы или энхансеры. Рекомбинантные системы экспрессии, определение которым дано в настоящем документе, будут экспрессировать эндогенные для клетки полипептиды или белки после индукции регуляторных элементов, связанных с эндогенным сегментом ДНК или подлежащим экспрессии геном. Клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими.

Термин "рекомбинантный" при использовании в настоящем документе для обозначения полипептида или белка означает, что полипептид или белок получен из рекомбинантных систем экспрессии (например, микроорганизмов или млекопитающих). "Полученный из микроорганизма" относится к рекомбинантным полипептидам или белкам, полученным в бактериальных или грибковых (например, дрожжевых) системах экспрессии. Термин "рекомбинантный вариант" относится к любому полипептиду, отличающемуся от природных полипептидов аминокислотными вставками, делециями и заменами, созданными с помощью методов рекомбинантной ДНК. Руководство по определению того, какие аминокислотные остатки могут быть заменены, добавлены или удалены без устранения представляющих интерес активностей, можно найти путем сравнения последовательности конкретного полипептида с последовательностью гомологичных пептидов и минимизации количества изменений аминокислотной последовательности, сделанных в участках с высокой гомологией.

Термин "средство" или "соединение" описывает любую молекулу, например белок или фармацевтический препарат, способную влиять на биологический параметр в настоящем раскрытии.

Термин "контроль", применяемый в контексте настоящего документа, может относиться к активному, положительному, отрицательному контролю и контролю в виде среды. Как будет понятно специалистам в настоящей области техники, контроли применяют для установления релевантности экспериментальных результатов и обеспечения возможности сравнения для тестируемого условия. Согласно определенным аспектам контролем является субъект, который не получает активной профилактической или терапевтической композиции. Согласно определенным аспектам контролем является субъект без SCD, VOC, ALI и/или ARDS, например, без ограничения здоровый контроль или субъект без каких-либо симптомов.

Термин "уменьшает степень тяжести" в отношении симптома SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS означает, что симптом имеет отсроченное начало, уменьшенную степень тяжести, уменьшенную частоту появления или наносит меньше повреждений субъекту. Как правило, степень тяжести симптома сравнивают с контролем, например, субъектом, который не получает активную профилактическую или терапевтическую композицию, или сравнивают со степенью тяжести симптома до введения терапевтического средства. В таком случае можно сказать, что композиция уменьшает степень тяжести симптома SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если симптом уменьшается приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или приблизительно на 100% (т.е. фактически устраняется) по сравнению с контрольным уровнем симптома. В определенных аспектах можно сказать, что композиция уменьшает степень тяжести симптома SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если симптом уменьшается на величину, варьирующую от приблизительно 10% до приблизительно 100%, от приблизительно 20% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 80%, от приблизительно 40% до приблизительно 70% или от приблизительно 50% до приблизительно 60%, по сравнению с контрольным уровнем симптома. В определенных аспектах можно сказать, что композиция уменьшает степень тяжести симптома SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если симптом уменьшается на величину, варьирующую от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 50% до приблизительно 70%, от приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 70% до приблизительно 90% или от приблизительно 80% до приблизительно 100%, по сравнению с контрольным уровнем симптома. Согласно некоторым аспектам лечение посредством способов по настоящему раскрытию уменьшает степень тяжести боли и/или других симптомов VOC при SCD и/или ALI/ARDS.

Термины "уменьшает экспрессию", "уменьшает уровень" и "уменьшает активацию" в отношении биомаркера SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS (например, без ограничения VCAM-1, ICAM-1, соотношения P-NF-kB/NF-kB, ET-1, TXAS, HO-1, Hct, Hb, MCV, HDW, количества ретикулоцитов и количества нейтрофилов) означает, что экспрессия, уровень и/или активация биомаркера были уменьшены по сравнению с контролем. В таком случае можно сказать, что композиция уменьшает экспрессию, уровень и/или активацию биомаркера SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если экспрессия, уровень и/или активация биомаркера уменьшаются приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или приблизительно на 100% (т.е. фактически устраняются) по сравнению с контро-

лем. В определенных аспектах можно сказать, что композиция уменьшает экспрессию, уровень и/или активацию SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если экспрессия, уровень и/или активация уменьшаются на величину, варьирующую от приблизительно 10% до приблизительно 100%, от приблизительно 20% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 80%, от приблизительно 40% до приблизительно 70% или от приблизительно 50% до приблизительно 60%, по сравнению с контролем. В определенных аспектах можно сказать, что композиция уменьшает экспрессию, уровень и/или активацию биомаркера SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если экспрессия, уровень и/или активация биомаркера уменьшаются на величину, варьирующую от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 50% до приблизительно 70%, от приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 70% до приблизительно 90% или от приблизительно 80% до приблизительно 100%, по сравнению с контролем.

Термины "увеличивает экспрессию", "увеличивает уровень" и "увеличивает активацию" в отношении биомаркера SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS означает, что экспрессия, уровень и/или активация биомаркера были увеличены по сравнению с контролем. В таком случае можно сказать, что композиция увеличивает экспрессию, уровень и/или активацию биомаркера SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если экспрессия, уровень и/или активация биомаркера увеличиваются приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или приблизительно на 100% (т.е. фактически устраняются) по сравнению с контролем. В определенных аспектах можно сказать, что композиция увеличивает экспрессию, уровень и/или активацию SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если экспрессия, уровень и/или активация увеличиваются на величину, варьирующую от приблизительно 10% до приблизительно 100%, от приблизительно 20% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 80%, от приблизительно 40% до приблизительно 70% или от приблизительно 50% до приблизительно 60%, по сравнению с контролем. В определенных аспектах можно сказать, что композиция увеличивает экспрессию, уровень и/или активацию биомаркера SCD, VOC при SCD и/или ALI/ARDS, если экспрессия, уровень и/или активация биомаркера увеличиваются на величину, варьирующую от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 50% до приблизительно 70%, от приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 70% до приблизительно 90% или от приблизительно 80% до приблизительно 100%, по сравнению с контролем.

Каждый из терминов "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству полипептида, например полипептида ADAMTS13, или композиции, применяемой для поддержания наблюдаемого уровня одной или нескольких биологических активностей полипептида ADAMTS13, как изложено в настоящем документе. Например, эффективное количество согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия будет количеством, необходимым для лечения или предупреждения симптомов VOC при SCD и/или ALI/ARDS.

"Субъекту" дают его обычное значение не относящегося к растениям, не относящегося к простейшим живого существа. Согласно большинству аспектов субъект является животным. Согласно конкретным аспектам животное является млекопитающим. Согласно более конкретным аспектам млекопитающее является человеком. Согласно другим аспектам млекопитающее является домашним животным или животным-компаньоном, одомашненным фермерским животным или животным в зоопарке. Согласно определенным аспектам млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кролика, морскую свинку, свинью или отличного от человека примата. Согласно другим аспектам млекопитающее представляет собой кошку, собаку, лошадь или корову. Согласно другим различным аспектам млекопитающее представляет собой оленя, мышь, бурундука, белку, опоссума или енота.

Также определенно ясно, что любое числовое значение, указанное в настоящем документе, включает все значения от нижнего значения до верхнего значения, т.е. все возможные комбинации числовых значений между наименьшим значением и наивысшим из перечисленных значений необходимо рассматривать как явно указанные в настоящей заявке. Например, если диапазон концентраций указан как приблизительно от 1 до 50%, подразумевают, что в настоящем описании ясно перечислены такие значения, как от 2 до 40%, от 10 до 30% или от 1 до 3% и т.д. Перечисленные выше значения являются лишь примерами того, что собственно подразумевают.

Диапазоны согласно различным аспектам в настоящем документе выражаются как от "приблизительно" или "примерно" одного конкретного значения и/или до "приблизительно" или "примерно" другого конкретного значения. Если значения выражены в виде аппроксимаций с помощью предшествующего "приблизительно", будет понятно, что в диапазон включена некоторая величина отклонения. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, еще более предпочтительно в пределах 10% и еще более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином

"приблизительно" или "примерно", зависит от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в настоящей области техники.

Серповидноклеточная анемия и вазоокклюзия при серповидноклеточной анемии.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к ADAMTS13 и композициям, содержащим ADAMTS13, при лечении, уменьшении интенсивности и/или предупреждении VOC при SCD. SCD является распространенным по всему свету наследственным заболеванием эритроцитов, вызванным точечной мутацией в гене β -глобина, приводящей к синтезу патологического HbS и аномальной полимеризации HbS в гипоксических условиях. Двумя основными клиническими проявлениями SCD являются хроническая гемолитическая анемия и острый VOC, которые являются основными причинами госпитализации пациентов с SCD. Недавние исследования подчеркнули центральную роль серповидной васкулопатии в создании острых эпизодов, связанных с серповидноклеточной анемией, и хронических осложнений со стороны органов (Sparkenbaugh et al., Br. J. Haematol., 162:3-14, 2013; De Franceschi et al., Semin. Thromb. Hemost., 226-36, 2011; и Hebbel et al., Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets, 9:271-92, 2009). Патофизиология этих осложнений основана на внутрисосудистом образовании серповидных форм эритроцитов в капиллярах и мелких сосудах, что приводит к VOC, нарушению кровотока, сосудистому воспалению и/или тромбозу с ишемическим повреждением клеток.

Наиболее распространенным клиническим проявлением SCD является VOC. VOC возникает, когда микроциркуляция затруднена серповидными эритроцитами, вызывая ишемическое повреждение снабжаемого органа и, как следствие, боль. Болевые кризы представляют собой наиболее отличительный клинический признак SCD при SCD и являются основной причиной посещений отделений неотложной помощи и/или госпитализаций для субъектов или пациентов, больных SCD.

VOC испытывают примерно половина субъектов с SCD или пациентов с заболеванием из-за гомозиготного HbS. Частота криза крайне изменчива. Некоторые субъекты или пациенты с SCD имеют до шести или более приступов в год, в то время как у других могут быть лишь приступы с большими интервалами или вообще может не быть приступов. Каждый субъект или пациент обычно имеет постоянную картину частоты возникновения криза.

Настоящее раскрытие относится к способам уменьшения по меньшей мере одного симптома VOC, включая без ограничения ишемию и боль (например, дактилит, приапизм, боли в области живота, боль в груди и боль в суставах), желтуху, инфаркт кости, нарушение дыхания (например, тахипноэ и одышка), гипоксию, ацидоз, гипотензию и/или тахикардию, связанные с VOC. Согласно определенным аспектам VOC можно определить как патологическое состояние, включающее один или несколько из этих симптомов. Болевые кризы начинаются внезапно. Криз может длиться от нескольких часов до нескольких дней и заканчиваться так же внезапно, как и начинаться. Боль может затрагивать любую часть тела, и зачастую вовлекает живот, придатки, грудь, спину, кости, суставы и мягкие ткани, и может проявляться как дактилит (двусторонние болезненные и опухшие руки и/или ступни у детей), острый некроз сустава, или аваскулярный некроз, или острый живот. При периодических приступах в селезенке становятся обычными инфаркты и аутоспленэктомия, предрасполагающие к опасной для жизни инфекции. Также могут иметь место инфаркты в печени и со временем прогрессировать до ее отказа. Папиллярный некроз является распространенным почечным проявлением VOC, приводящим к изостенурии (т.е. неспособности концентрировать мочу).

Сильная глубокая боль присутствует в конечностях, включая трубчатые кости. Боль в животе может быть сильной, напоминающей острый живот; она может быть результатом отраженной боли из других мест или инфаркта внутрибрюшинного солидного органа или внутрибрюшинной мягкой ткани. Реактивная кишечная непроходимость приводит к растяжению кишечника и боли. Также может вовлекаться лицо. Боль может сопровождаться лихорадкой, недомоганием, затрудненным дыханием, болезненной эрекцией, желтухой и лейкоцитозом. Боль в костях зачастую возникает из-за инфаркта костного мозга. Некоторые паттерны являются предсказуемыми, так как боль имеет тенденцию вовлекать кости с наибольшей активностью костного мозга и потому что активность костного мозга с возрастом изменяется. В течение первых 18 месяцев жизни могут вовлекаться плюсовые и пястные кости, проявляясь как дактилит или синдром "кисть-стопа". Хотя описанные выше паттерны описывают часто встречающиеся проявления, при VOC могут быть затронуты любые области тела субъекта с кровоснабжением и сенсорными нервами.

Зачастую нельзя выявить причину, вызывающую VOC. Тем не менее поскольку дезоксигенированный HbS становится полутвердым, наиболее вероятным физиологическим триггером VOC является гипоксемия. Она может быть связана с острым грудным синдромом или сопровождать респираторные осложнения. Обезвоживание также может спровоцировать боль, поскольку ацидоз приводит к сдвигу кривой диссоциации кислорода (эффект Бора), что приводит к более легкой десатурации гемоглобина. Гемоконцентрация также является распространенным механизмом. Другим распространенным триггером VOC являются изменения температуры тела, будь то повышение из-за лихорадки или снижение из-за изменения температуры окружающей среды. Пониженная температура тела, вероятно, приводит к кризам в результате периферической вазоконстрикции.

В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как наличие

увеличения количества периферических нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение легочной трансудации (например, увеличенное количество лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) и/или содержание белка (белок BAL (мг/мл)) по сравнению с контролем.

В соответствии с определенными вариантами осуществления маркером VOC являются повышенные уровни сосудистой активации (например, измеренные по повышенной экспрессии, уровням и/или активности VCAM-1 и/или ICAM-1) в органе по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления маркером VOC являются повышенные уровни воспалительной васкулопатии (например, измеренные по повышенной экспрессии, уровням и/или активности VCAM-1 и/или ICAM-1) в органе по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления маркером VOC являются повышенные уровни сосудистой активации и воспалительной васкулопатии в ткани по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое и/или почку. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличенную экспрессию, увеличенные уровни и/или активацию по меньшей мере одного из NF-kB (причем активацию NF-kB измеряют по P-NF-kB или с помощью соотношения P-NF-kB/NF-kB), VCAM-1 и/или ICAM-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличенную экспрессию или увеличенный уровень по меньшей мере одного из эндотелина-1 (ET-1), тромбоксансинтазы (TXAS) и гемоксигеназы-1 (HO-1) по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие увеличения наблюдаются в ткани легкого. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие увеличения наблюдаются в ткани почки. В соответствии с определенными вариантами осуществления маркерами VOC являются увеличенная экспрессия и/или увеличенные уровни TXAS, ET-1 и VCAM-1 и активация NF-kB в ткани почки.

В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определять с помощью гематологических параметров. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней по меньшей мере одного из Hct, Hb, MCV и MCH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней по меньшей мере двух из Hct, Hb, MCV и MCH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней по меньшей мере трех из Hct, Hb, MCV и MCH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение уровней по меньшей мере одного из CHCM, HDW, количества нейтрофилов и LDH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение уровней по меньшей мере двух из CHCM, HDW, количества нейтрофилов и LDH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение уровней по меньшей мере трех из CHCM, HDW, количества нейтрофилов и LDH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней Hct по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней Hb по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение MCV по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение MCH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение CHCM по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение HDW по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как увеличение LDH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней по меньшей мере одного из Hct, Hb, MCV и MCH по сравнению с контролем и/или увеличение уровней по меньшей мере одного из CHCM, HDW, количества нейтрофилов и LDH по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления VOC можно определить как снижение уровней Hct, Hb, MCV и MCH по сравнению с контролем и/или увеличение уровней CHCM, HDW, количества нейтрофилов и LDH по сравнению с контролем.

Модели SCD и способы тестирования эффективности профилактики или лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к изучению эффектов рекомбинантного ADAMTS13 (т.е. BAX930/SHP655) на мышинной модели SCD (мышь Tim Townes) во время острых, связанных с SCD эпизодов, имитируемых путем воздействия гипоксией на мышей с SCD. Исследования проводят в нормальных кислородных и гипоксических условиях, при этом эффективность профилактических(ой) или лечебных(ой) доз(ы) на мышинной модели (включая измерение общей выживаемости) и биологические эффекты способа(ов) лечения посредством BAX930/SHP655 на

повреждение легкого и сосудистое воспаление изучают после воздействия гипоксией на мышей с серповидноклеточной анемией.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления применяют трансгенную мышиную модель с SCD (Kalish et al., *Haematologica*, 100:870-80, 2015). Согласно некоторым аспектам здоровых контрольных ($Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm3(HBG1,HBB)Tow}$) мышей и мышей с SCD ($Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm2(HBG1,HBB*)Tow}$) подвергают стрессу в форме гипоксии/реоксигенации (H/R) (Kalish et al., ниже). Было показано, что такой стресс H/R биологически воспроизводит острый VOC и повреждение органов, наблюдаемое при остром VOC у пациентов-людей с SCD. Согласно некоторым аспектам здоровых мышей (AA) и мышей с SCD (SS) подвергают гипоксии (например, приблизительно 7 или 8% кислорода) в течение определенных периодов времени (например, приблизительно 10 ч) с последующими определенными периодами времени (например, 3 ч) реоксигенации (например, приблизительно 21% кислородом, кондиционирование комнатным воздухом) (Kalish et al., ниже).

Согласно различным аспектам модели с SCD и контроли подвергают нормальным кислородным условиям или условиям гипоксии. В экспериментах с нормальными кислородными условиями здоровые контрольные мыши (AA) и мыши с SCD (SS) получают однократное внутривенное введение либо rADAMTS13 (например, 2940 FRETs-ед./кг (~3200 ME/кг)), либо буфера (среды) в фиксированном объеме (например, 10 мл/кг) и подвергают воздействию нормальных кислородных условий (например, приблизительно 21% кислорода, кондиционирование комнатным воздухом). Животных изучают в течение различных периодов времени после обработки посредством ADAMTS13 или среды и воздействия нормальными кислородными условиями или гипоксии. Собирают кровь и проводят клинический анализ крови (CBC). CBC представляет собой анализ крови, применяемый для оценки общего состояния здоровья и обнаружения широкого спектра нарушений, в том числе, среди прочих, анемии. Измеряют различные другие конечные точки, включая без ограничения гематологию, параметры свертывания, биомаркеры воспаления, васкулопатию и гистопатологию.

Согласно иллюстративным аспектам, проводят эксперименты с гипоксией, в которых здоровые контрольные мыши (AA) и мыши с SCD (SS) получают однократное внутривенное введение ADAMTS13 (например, 500, 1000 или 3200 ME/кг) или среды в фиксированном объеме (например, 10 мл/кг). В соответствии с определенными вариантами осуществления доза, вводимая субъекту-человеку, составляет приблизительно 10% от дозы, вводимой субъекту-грызуну (например, мыши). В соответствии с определенными вариантами осуществления доза, вводимая субъекту-человеку, составляет приблизительно 9% от дозы, вводимой субъекту-грызуну (например, мыши). В соответствии с определенными вариантами осуществления доза, вводимая субъекту-человеку, составляет приблизительно 8% от дозы, вводимой субъекту-грызуну (например, мыши). В соответствии с определенными вариантами осуществления доза, вводимая субъекту-человеку, составляет приблизительно 7% от дозы, вводимой субъекту-грызуну (например, мыши). В соответствии с определенными вариантами осуществления доза, вводимая субъекту-человеку, составляет менее приблизительно 10%, например, от приблизительно 7% до приблизительно 10% от дозы, вводимой субъекту-грызуну (например, мыши).

После инъекции (например, приблизительно через 1-3 ч после инъекции) мышей подвергают гипоксии (например, приблизительно 7 или 8% кислорода) в течение некоторого периода времени (например, приблизительно 10 ч), за которым следует некоторый период реоксигенации (например, приблизительно 3 ч) для имитации эпизодов VOC, связанных с SCD. Согласно некоторым аспектам оценивают те же параметры, которые описаны для исследований с нормальными кислородными условиями.

Согласно дополнительным иллюстративным аспектам, проводят эксперименты с гипоксией, в которых здоровых контрольных мышей (AA) и мышей с SCD (SS) подвергают гипоксии (например, приблизительно 8% кислорода или выше) в течение некоторого периода времени (например, приблизительно 10 ч), за которым следует некоторый период реоксигенации (например, приблизительно 3 часа) для имитации эпизодов VOC, связанных с SCD. Затем в различные моменты времени, включая без ограничения сразу после или примерно через 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч после экспериментально индуцированного вазоинклюзивного эпизода, мыши получают либо одно внутривенное введение ADAMTS13 (например, 500, 1000 или 3200 ME/кг) или среды в фиксированном объеме (например, 10 мл/кг) или многократные инъекции с 12 или 24 интервалами. Согласно некоторым аспектам оценивают те же параметры, которые описаны для исследований с нормальными кислородными условиями.

Согласно различным аспектам исследуют любую ткань-мишень на эффективность лечения посредством ADAMTS13 на моделях *in vitro* или *in vivo* и/или в условиях VOC. Согласно некоторым аспектам к ткани органа относятся без ограничения ткань легкого, печени, поджелудочной железы, кожи, сетчатки, предстательной железы, яичника, лимфатического узла, надпочечника, почки, сердца, желчного пузыря или желудочно-кишечного тракта. Согласно некоторым аспектам ткань органа включает без ограничения ткани легких, печени, селезенки и/или почек.

Например, согласно некоторым аспектам ткани-мишени собирают для изучения эффектов ADAMTS13 в нормальных кислородных условиях или в условиях гипоксии. Ткани замораживают и/или фиксируют в формалине. Замороженные ткани применяют для иммуноблот-анализа со специфическими антителами к ядерному фактору каппа-B (NF-kB), эндотелину-1 (ET-1), гемоксигеназе 1 (HO-1), молеку-

ле межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), тромбоксансинтазе (TXAS) и молекуле адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1). Фиксированные органы применяют для стандартной патологии (окрашивание г/э).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для определения эффективности лечения измеряют маркеры вазоконстрикции, агрегации тромбоцитов, воспаления, окислительного стресса, антиоксидантного ответа и/или повреждения ткани. Согласно некоторым аспектам ядерный фактор каппа-B измеряют как в его нормальной (NF-kB), так и в активированной (P-NF-kB) формах. NF-kB является транскрипционным фактором, для которого было описано, что он координирует воспалительный и антиоксидантный ответ. Оценивают соотношение между активированной и нормальной формами. Согласно некоторым аспектам измеряют ET-1. ET-1 является мощным вазоконстриктором, который вырабатывается клетками эндотелия сосудов. ET-1 играет роль в нескольких патофизиологических процессах, включая сердечно-сосудистую гипертрофию, легочную гипертензию и хроническую почечную недостаточность. Согласно некоторым аспектам измеряют HO-1. HO-1 является индуцируемым, ограничивающим скорость ферментом в катаболизме гема и может ослаблять степень тяжести исходов от вазоокклюзивных и гемолитических кризов, выступая в качестве вазопротекторного антиоксиданта. Согласно некоторым аспектам измеряют ICAM-1. ICAM-1 постоянно присутствует в низких концентрациях в мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Хотя ICAM-1, судя по всему, не вовлечен в адгезию серповидных клеток к эндотелию сосудов, ICAM-1 может усиливать VOC, способствуя адгезии лейкоцитов. Согласно некоторым аспектам измеряют TXAS. TXAS представляет собой мембранный белок эндоплазматического ретикулума, который катализирует превращение простагландина H₂ в тромбоксан A₂. TXAS является мощным вазоконстриктором и индуктором агрегации тромбоцитов. Следовательно, TXAS является мощным индуктором вазоконстрикции и агрегации тромбоцитов. TXAS играет роль в нескольких патофизиологических процессах, включая гемостаз, сердечно-сосудистые заболевания и инсульт. Согласно некоторым аспектам измеряют VCAM-1. VCAM-1 опосредует адгезию лимфоцитов и других клеток крови к эндотелию сосудов и, следовательно, может способствовать возникновению вазоокклюзивных эпизодов. Согласно некоторым аспектам в тканях органов измеряют воспалительные клеточные инфильтраты.

Согласно иллюстративным аспектам для определения эффективности лечения проводят иммуноблот-анализы со специфическими антителами к NF-kB, ET-1, HO-1, ICAM-1, TXAS и VCAM-1 для измерения экспрессии этих ферментов в клетках и тканях моделей или субъектов по настоящему раскрытию. Согласно иллюстративным аспектам измеряют экспрессию NF-kB, ET-1, HO-1, ICAM-1, TXAS и/или VCAM-1 в ткани органа от мышей AA и мышей с SCD, обработанных либо средой, либо ADAMTS13. В соответствии с определенными вариантами осуществления к органам относятся без ограничения легкие, печень, поджелудочная железа, кожа, сетчатка, предстательная железа, яичник, лимфатический узел, надпочечник, почка, сердце, желчный пузырь или желудочно-кишечный тракт. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое, печень, селезенку и/или почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению уровня сосудистой активации и/или воспалительной васкулопатии в органе по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере одного из VCAM-1, ICAM-1, NF-kB (причем снижение активации NF-kB измеряют по P-NF-kB или с помощью соотношения P-NF-kB/NF-kB), ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере двух из VCAM-1, ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере трех из VCAM-1, ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере четырех из VCAM-1, ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере пяти из VCAM-1, ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации VCAM-1, ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации VCAM-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации ICAM-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации VCAM-1 и ICAM-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществ-

ления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня ET-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня TXAS по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению соотношения P-NF-kB/NF-kB по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению по меньшей мере одного из соотношения P-NF-kB/NF-kB, экспрессии и/или уровня ET-1, экспрессии и/или уровня TXAS и экспрессии и/или уровня HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению соотношения P-NF-kB/NF-kB, экспрессии и/или уровня ET-1, экспрессии и/или уровня TXAS и экспрессии и/или уровня HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой почку.

Согласно дополнительным иллюстративным аспектам измерение этих маркеров проводят после воздействия на животных моделей условиями гипоксии и реоксигенации (H/R), как описано в настоящем документе. Согласно дополнительным иллюстративным аспектам измерение этих маркеров проводят после того, как субъекты перенесли VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в качестве показателя эффективности лечения измеряют кровоток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кровоток измеряют без ограничения ультразвуком, PET, fMRI, NMR, лазерным доплеровским электромагнитным измерителем кровотока или носимым устройством.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления показателем эффективности лечения является уменьшение или предупреждение тромбоза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления наличие тромбоза измеряют без ограничения гистопатологическим исследованием, ультразвуком, анализом D-димеров, венографией, МРТ или компьютерной томографией. Согласно некоторым аспектам в ткани органа определяют тромбообразование.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления показателем эффективности лечения является уменьшение или предупреждение легочной транссудации (т.е. пропотевания и повреждения легкого). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в качестве маркеров легочной транссудации (для определения степени повреждения легкого и эффективности лечения (например, лечения посредством ADAMTS13)) измеряют показатели или параметры бронхоальвеолярного лаважа (BAL) (общее содержание белка и лейкоцитов). Легочная транссудация может привести к увеличению содержания белка и/или лейкоцитов в BAL. Собирают жидкости BAL, извлекают клеточное содержимое центрифугированием и подсчитывают с помощью микроцитометрии, как сообщалось ранее (Kalish et al., Haematologica, 100:870-80, 2015, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте и для любых целей). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления показателем эффективности лечения является уменьшение или предупреждение увеличения периферических нейтрофилов. Процент нейтрофилов определяют при центрифугировании на центрифуге, а надосадочные жидкости используют для определения общего содержания белка (Kalish et al., ранее).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в качестве показателя эффективности лечения измеряют улучшение функционирования легких. Функционирование легких можно измерить без ограничения тестом пикового потока, спирометрическим и бронходилатационным тестом, тестом объема легкого, тестом на перенос газа, тестом дыхательных мышц, тестом на выдыхаемый монооксид углерода или тестом на выдыхаемый оксид азота.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для определения эффективности лечения (например, лечения посредством ADAMTS13) измеряют гематологические параметры. Определяют следующие гематологические параметры:

- лактатдегидрогеназу (LDH) в качестве общего маркера повреждения клеток;
- гематокрит (Hct) и средний корпускулярный объем (MCV) в качестве показателя жизнеспособности эритроцитов;
- гемоглобин (Hb), корпускулярный гемоглобин (MCH) и среднюю концентрацию клеточного гемоглобина (CHCM) в качестве показателей способности связывать кислород;
- неоднородность распределения эритроцитов (HDW) в качестве показателя наличия плотных эритроцитов;
- количество ретикулоцитов в качестве показателя статуса анемии; и
- количество нейтрофилов в качестве показателя системного статуса воспаления.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность уменьшения уровней по меньшей мере одного из Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность уменьшения уровней по меньшей мере двух из Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность уменьшения уровней по меньшей мере трех из Hct, Hb, MCV и

MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность уменьшения уровней Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность увеличения по меньшей мере одного из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность увеличения по меньшей мере двух из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность увеличения по меньшей мере трех из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает интенсивность увеличения CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления ADAMTS13 уменьшает интенсивность уменьшения уровней Hct, Hb, MCV и MCH и уменьшает интенсивность увеличения уровней CHCM, HDW, LDH и нейтрофилов по сравнению с контролем.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к увеличению уровней по меньшей мере одного из Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к увеличению уровней по меньшей мере двух из Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к увеличению уровней по меньшей мере трех из Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к увеличению уровней Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению по меньшей мере одного из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению по меньшей мере двух из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению по меньшей мере трех из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления ADAMTS13 приводит к увеличению уровней Hct, Hb, MCV и MCH и уменьшению уровней CHCM, HDW, LDH и нейтрофилов по сравнению с контролем.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления применяют способы измерения уровней VWF и ультрабольших мультимеров VWF. У пациентов с SCD наблюдались повышенные уровни VWF и ультрабольших мультимеров VWF, которые связаны с острыми вазоокклюзивными эпизодами. Повышенные уровни мультимеров VWF в кровотоке зависят от активности ADAMTS13, который расщепляет гиперадгезивный ультрабольшой VWF в условиях высокого напряжения сдвига в жидкости, играя важную роль в поддержании надлежащего баланса гемостатической активности и риска развития тромбоза. Более конкретно, ADAMTS13 расщепляет VWF между аминокислотными остатками Thr¹⁶⁰⁵ и Met¹⁶⁰⁶, что соответствует аминокислотным остаткам 842-843 после расщепления препропоследовательности. Именно такое ADAMTS13-опосредованное расщепление в значительной степени отвечает за размер мультимера VWF, который коррелирует с основной гемостатической активностью. Для измерения экспрессии или уровня VWF осуществляют способы измерения VWF и ультрабольших мультимеров VWF, в том числе различные типы иммуноблот-анализов со специфическими антителами к VWF. Кроме того, в различных аспектах настоящего раскрытия включены и другие известные способы измерения VWF.

Согласно некоторым аспектам эффективность измеряют по снижению повреждения органов по сравнению с результатами контрольных или исходных измерений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повреждение органов измеряют с помощью рентгенологической визуализации, такой как без ограничения компьютерная томография, ультразвуковое исследование, рентгеновское исследование, МРТ и медицинская радиология. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повреждение органов измеряют по изменению различных биомаркеров, включая без ограничения азот мочевины в крови (BUN), креатинин, соотношение BUN/креатинин, тропонин, нейрон-специфическую енолазу (NSE). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изменения в ткани измеряют посредством гистопатологического исследования.

Специалист в настоящей области техники сможет подобрать подходящий показатель любого раскрытого в настоящем документе биомаркера, который связан с органом (как определено выше) и/или подлежащей измерению биологической жидкостью. К биологическим жидкостям относятся без ограничения кровь (в том числе плазма крови и сыворотка крови), лимфа, спинномозговая жидкость, продукты лактации (например, молоко), амниотические жидкости, моча, слюна, пот, слезы, менструальные выделения, кал и в том числе их фракции.

Согласно некоторым аспектам эффективность измеряют посредством оценивания качества жизни субъекта (например, с помощью информационной системы для измерения качества жизни взрослого с

серповидно-клеточной анемией (англ. Adult Sickle Cell Quality-of-Life Measurement Information System (ASCQ-Me)), которая раскрыта в публикации Treadwell et al., Clin. J. Pain, 30(10):902-915 (2016)). ASCQ-Me сосредоточена вокруг семи тем:

- эмоциональное воздействие (опрос из пяти вопросов, связанных с эмоциональным дистрессом (например, безнадежность, одиночество, депрессия и беспокойство);
- частота и тяжесть болевых приступов (количество приступов, время с момента последнего приступа; степень тяжести боли при последнем обострении по шкале от 1 до 10);
- как долго продолжалось обострение, насколько сильно обострение повлияло на вашу жизнь);
- влияние боли (вопрос о частоте и степени тяжести и о том, как это повлияло на деятельность);
- лист с историей болезни касательно серповидноклеточной анемии;
- влияние на сон (как легко засыпаете, как часто не можете заснуть);
- влияние на социальное функционирование (зависимость от других, как состояние здоровья повлияло на деятельность); и
- влияние скованности (скованные суставы, вызывающие бессонницу, движение в течение дня, движение после бодрствования).

Согласно различным аспектам эффективность профилактики и/или лечения определяют посредством измерения степени тяжести боли (например, измеряемой по шкале оценки боли), облегчения боли, ощущаемой потребности в лекарстве, удовлетворенности лечением, частоты случаев VOC, длительности приступа VOC, продолжительности и/или длительности госпитализации, затрат, связанных с пребыванием в больнице, и/или длительности потребности в обезболивающих (например, внутривенных опиатах).

Согласно определенным аспектам степень тяжести боли измеряют с помощью опросника боли МакГилла/Мелзака (Melzack et al., Pain, 1975 Sep, 1(3):277-99), в котором субъект выбирает одно или несколько слов, которые лучше всего описывают его боль. Согласно определенным аспектам степень тяжести боли измеряют с помощью визуальной аналоговой шкалы (VAS). VAS представляет собой 10-сантиметровую неразменную линию, на одном конце которой закреплен фиксатор "отсутствие боли", а на другом конце - "наихудшая возможная боль". Пациентам дают указание отметить уровень их боли между двумя фиксаторами. VAS-оценки рассчитывают путем измерения расстояния в сантиметрах между фиксатором "отсутствие боли" и отметкой пациента, указывающей на уровень его боли, получая в результате оценку степени тяжести боли в диапазоне от 0 мм до 10 см. Согласно определенным аспектам степень тяжести боли измеряют с помощью количественной шкалы оценки (NRS). NRS представляет собой 11-балльную шкалу с фиксаторами "отсутствие боли" и "наихудшая возможная боль". Пациентам дают указание сообщить о текущем уровне их боли по шкале от 0 до 10, где 0 означает отсутствие боли, а 10 означает наихудшую возможную боль.

Согласно определенным аспектам облегчение боли можно измерять как общую оценку того, как боль пациента могла измениться с момента последней оценки (т.е. текущая оценка минус предыдущая оценка), которую используют для фиксации изменений, отмеченных на шкалах NRS и VAS. Пациенты сообщали об уменьшении боли в ответ на вопрос: "По сравнению с прошлым разом, когда Вы отмечали свою боль, скажите, насколько изменилась Ваша боль". Пациенты могли отвечать, что их боль была "намного хуже", "немного хуже", "такой же", "немного лучше" или "намного лучше". Согласно определенным аспектам о необходимости в медикаментах может сообщать пациент или медицинский работник.

Согласно определенным аспектам об удовлетворенности лечением может сообщать пациент. Сообщение может быть по шкале от "совсем нет", "до некоторой степени удовлетворен (доволен)", "очень удовлетворен (доволен)" или "не знаю".

Острое повреждение легкого и острый респираторный дистресс-синдром.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к ADAMTS13, композициям, содержащим ADAMTS13, и способам применения ADAMTS13 при лечении, уменьшении интенсивности и/или предупреждении острого повреждения легкого (ALI) и острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), в том числе к последующему повреждению легких, связанному с аппаратом искусственной вентиляции легких. Патогенез ALI/ARDS объясняют повреждением как сосудистого эндотелия, так и альвеолярного эпителия. Клинические испытания III фазы, производимые NHLBI ARDS Network, привели к повышению выживаемости и сокращению продолжительности искусственной вентиляции легких с помощью защищающей легкие стратегии вентиляции и протокола сохранения жидкости. Тем не менее существует острая неудовлетворенная медицинская потребность в дополнительных средствах лечения, поскольку не существует каких-либо конкретных фармакологических терапевтических средств для лечения ALI/ARDS. Следовательно, применение ADAMTS13 при лечении ALI/ARDS представляет собой прорыв в лечении ALI/ARDS.

ALI согласно некоторым аспектам представляет собой нарушение острого воспаления, которое вызывает разрушение эндотелиальных и эпителиальных барьеров легких. Клеточные характеристики ALI включают потерю целостности альвеолярно-капиллярной мембраны, чрезмерную трансэпителиальную миграцию нейтрофилов и высвобождение провоспалительных цитотоксических медиаторов. В нескольких исследованиях было задокументировано повышенное высвобождение VWF и повышение количества молекулы внутриклеточной адгезии 1 (ICAM-1) после повреждения эндотелия (Johnson, ранее). Трансэ-

пителиальная миграция нейтрофилов является важным признаком ALI, поскольку нейтрофилы являются основными виновниками воспаления. Продолжительная активация нейтрофилов способствует разрушению базальной мембраны и повышению проницаемости альвеолярно-капиллярного барьера (Johnson, ранее).

ARDS согласно некоторым аспектам включает тахипноэ с острым началом, гипоксемию, диффузные легочные инфильтраты и потерю легочной эластичности, характеризующуюся высокой внезапной смертностью у взрослых (Walkey, ранее). Терапевтические стратегии при ARDS фокусируются на лечении лежащей в основе этиологии и оказании поддерживающей помощи, которая уменьшает прогрессирование повреждения легкого. У большинства пациентов с ARDS развивается дыхательная недостаточность, достаточно тяжелая, чтобы потребовалась поддержка в виде механической вентиляции легких. Механическая вентиляция может вызвать дополнительное повреждение легких, которое называется ИВЛ-ассоциированное повреждение легких (VALI), из-за сочетания механистических усилий чрезмерного расширения и циклического раскрытия объема легких. VALI производит "биотравму" в результате системного высвобождения воспалительных цитокинов. В настоящее время основной целью контроля ARDS является уменьшение VALI. (Walkey, ранее).

ADAMTS13 значительно уменьшал уровни маркеров повреждения легкого и сосудистой дисфункции у нормальных мышей. Более конкретно, в настоящем раскрытии продемонстрировано, что введение нормальным (контрольным) мышам дозы рекомбинантного ADAMTS13 в гипоксических условиях приводило к уменьшенной экспрессии в легких различных белковых маркеров повреждения легкого и сосудистой дисфункции, что свидетельствует о том, что ADAMTS13 можно применять для лечения или уменьшения интенсивности повреждения легкого, возникающего в результате острого повреждения легкого, характеризующегося внезапным началом отека легких (в том числе воспалительного отека легких), который является следствием множества локальных или системных повреждений, включая двусторонние воспалительные легочные инфильтраты и нарушенную оксигенацию или гипоксемию.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить по одному из нескольких без ограничения следующих: ишемии, нарушения дыхания (например, тахипноэ и одышки), некардиогенного отека легких, легочных инфильтратов, сниженной оксигенации и сниженной вентиляции, ассоциированной с ALI/ARDS. Настоящее раскрытие относится к способам уменьшения симптомов ALI/ARDS, включая без ограничения по меньшей мере одно из ишемии, нарушения дыхания (например, тахипноэ и одышки), некардиогенного отека легких, легочных инфильтратов, сниженной оксигенации и сниженной вентиляции, ассоциированной с ALI/ARDS.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить как наличие увеличения количества периферических нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить как увеличение легочной трансудации (например, увеличенное количество лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) и/или содержания белка (белка BAL (мг/мл)) по сравнению с контролем.

В соответствии с определенными вариантами осуществления повышенные уровни сосудистой активации в органе по сравнению с контролем являются маркером ALI и/или ARDS. В соответствии с определенными вариантами осуществления повышенные уровни воспалительной васкулопатии в органе по сравнению с контролем являются маркером ALI и/или ARDS. В соответствии с определенными вариантами осуществления повышенные уровни сосудистой активации и воспалительной васкулопатии в ткани по сравнению с контролем являются маркером ALI и/или ARDS. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое и/или почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить как увеличенную экспрессию, увеличенные уровни и/или активацию по меньшей мере одного из NF- κ B (причем активацию NF- κ B измеряют по P-NF- κ B или с помощью соотношения P-NF- κ B/NF- κ B), VCAM-1 и/или ICAM-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить как увеличенную экспрессию или увеличенный уровень по меньшей мере одного из эндотелина-1 (ET-1), тромбоксансинтазы (TXAS) и гемоксигеназы-1 (HO-1) по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие увеличения наблюдаются в ткани легкого. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие увеличения наблюдаются в ткани почки. В соответствии с определенными вариантами осуществления маркерами ALI и/или ARDS являются увеличенная экспрессия и/или увеличенные уровни TXAS и ET-1 и активация NF- κ B в ткани почки.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определять с помощью гематологических параметров. В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить как увеличение количеств нейтрофилов по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS можно определить как увеличение количеств нейтрофилов по сравнению с контролем.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ALI и/или ARDS также можно определить по увеличению по меньшей мере одного из следующих биомаркеров в сыворотке крови: сурфактантного белка (SP)-A, SP-B, SP-D, KL-6/MUC1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF α , молекул

адгезии (например, E, L-селектина), MMP-9, LTB4 и ферритина. См., например, публикацию Tzouvelekis et al., *Respiratory Research*, 2005, 6:62, которая включена в настоящий документ во всей своей полноте.

Модели ALI/ARDS и способы тестирования эффективности профилактики или лечения.

Животные модели ALI описаны в публикации Matute-Bello et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 295(3):L379-99, 2008, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей. В некоторых случаях ALI у людей характеризуют гистопатологически по нейтрофильному альвеолиту, повреждению альвеолярного эпителия и эндотелия, образованию гиалиновых мембран и тромбам в капиллярах. Согласно некоторым аспектам для исследования механизмов ALI можно применять животные модели экспериментального повреждения легкого. Например, вы можете воспроизвести факторы риска развития ARDS, такие как сепсис, липидная эмболия на фоне переломов костей, кислотная аспирация, ишемия-реперфузия легочных или дистальных сосудистых русел и другие клинические риски. Согласно определенным аспектам животные модели ALI воспроизводят механизмы и последствия ALI, в том числе происходящие физиологические и патологические изменения. У людей внутрилегочный воспалительный ответ начинается до начала клинически определяемого ALI и наиболее интенсивен приблизительно через 3 дня после начала ALI и/или ARDS. После острой воспалительной фазы идет хроническая фибропролиферативная фаза. Например, тесты на функционирование легких могут продемонстрировать ограничение, что согласуется с паренхиматозным фиброзом, наблюдаемым в биоптатах легких или при вскрытии.

Животные модели для ARDS описаны в публикации Bastarche et al., *Dis. Model. Mech.*, 2(5-8):218-23, 2009, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей. Например, у людей пневмония и сепсис являются двумя наиболее распространенными патологическими состояниями, predisposing к развитию ARDS. Согласно некоторым аспектам эти патологические состояния можно смоделировать на мышах с использованием эндотоксина LPS грамотрицательных бактерий, который можно вводить либо непосредственно в легкие посредством интратрахеальной инъекции или ингаляции, либо вводить внутривенно или интравенно для стимуляции системного воспалительного ответа. У мышей, обработанных интратрахеальным LPS, имеет место острая и интенсивная миграция воспалительных клеток в легкие с разрешением к 48 ч. Внутривенный LPS активирует системное воспаление и связан с умеренным повреждением легких. Это повреждение можно усилить либо повторными инъекциями LPS, либо имплантацией помпы с LPS в брюшную полость для непрерывного высвобождения LPS в течение нескольких часов или даже дней. Другой широко используемой моделью повреждения легкого является гипероксия, когда мыши дышат высоким парциальным давлением кислорода, что является высокотоксичным для альвеолярного эпителия и вызывает обширное повреждение альвеолярного эпителия лишь с умеренным воспалением. Дополнительной широко изученной моделью является ИВЛ-индуцированное повреждение легких, которое отлично коррелирует с ИВЛ-индуцированным повреждением легких у человека, однако в отсутствие дополнительного стимула или чрезвычайно высоких дыхательных объемов эта модель не вызывает значительного повреждения легкого у мышей. Одно недавнее исследование продемонстрировало умеренную степень воспаления легких, трансфузию и активацию альвеолярной коагуляции с дыхательными объемами 15 мл/кг в сравнении с низкими дыхательными объемами 7,5 мл/кг. Для получения более тяжелой травмы необходимые большие дыхательные объемы (до 35 мл/кг). Каждая модель подробно рассмотрена в недавнем всестороннем обзоре по животным моделям ALI в публикации Matute-Bello et al. (*Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 295:L379-L399, 2008), также включенной в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

Согласно определенным аспектам с помощью раскрываемых способов и композиции можно уменьшить симптомы, такие как без ограничения ишемия, нарушение дыхания (например, тахипноэ и одышка), некардиогенный отек легких, легочные инфильтраты (например, измеренные с помощью рентгенографии грудной клетки), пониженная оксигенация (например, измеренная с помощью анализа пульсоксиметрии [SpO₂] или анализа крови на газы и кислотность [PaO₂]) и пониженная вентиляция легких (например, измеренная с помощью анализа CO₂ в конце спокойного выдоха или анализа крови на газы и кислотность [PaCO₂]), уменьшение количества дней на аппарате для искусственной вентиляции легких или увеличение количества дней без аппарата для искусственной вентиляции легких), которые связаны с ALI/ARDS.

Согласно различным аспектам эффективность профилактики и/или лечения определяют путем измерения выживаемости, продолжительности и/или частоты госпитализации, продолжительности и/или длительности госпитализации в отделении интенсивной терапии и/или затрат, связанных с пребыванием в больнице.

Согласно различным аспектам эффективность профилактики и/или лечения определяют путем измерения уменьшения количества и/или степени тяжести осложнений, связанных с ALI и/или ARDS. Осложнения могут включать без ограничения легочные осложнения (например, баротравму, волютравму, легочную эмболию, легочный фиброз, ИВЛ-ассоциированную пневмонию (CAP) и осложнения дыхательных путей); желудочно-кишечные осложнения (например, кровотечение (язву, очаги поражения), нарушение подвижности, пневмоперитонеум и бактериальную транслокацию); сердечные осложнения (например, нарушение сердечных ритмов и дисфункцию миокарда); почечные осложнения (острую по-

чечную недостаточность и водный положительный баланс); механические осложнения (например, повреждение сосудов, пневмоторакс (при установке катетера легочной артерии), повреждение/стеноз трахеи (результат интубации и/или раздражения эндотрахеальной трубкой), осложнения с питанием (например, недоедание (катаболическое состояние), дефицит электролитов); общие осложнения (например, мышечную слабость и переносимость физической нагрузки).

В соответствии с определенными вариантами осуществления показатель эффективности лечения, уменьшения интенсивности и предупреждения является таким же, как раскрыто выше для VOC.

В соответствии с определенными вариантами осуществления к органам относятся без ограничения легкие, печень, поджелудочная железа, кожа, сетчатка, предстательная железа, яичник, лимфатический узел, надпочечник, почка, сердце, желчный пузырь или желудочно-кишечный тракт. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкие, печень, селезенку и/или почки. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению уровней сосудистой активации и/или воспалительной васкулопатии в органе по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой легкое. В соответствии с определенными вариантами осуществления орган представляет собой почку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере одного из ICAM-1, NF-kB (причем снижение активации NF-kB измеряют по P-NF-kB или с помощью соотношения P-NF-kB/NF-kB), ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере двух из ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере трех из ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации по меньшей мере четырех из ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии, уровня и/или активации ICAM-1, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня ICAM-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня ET-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня TXAS по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит в результате к снижению экспрессии и/или уровня HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению соотношения P-NF-kB/NF-kB по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению по меньшей мере одного из соотношения P-NF-kB/NF-kB, экспрессии и/или уровня ET-1, экспрессии и/или уровня TXAS и экспрессии и/или уровня HO-1 по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению соотношения P-NF-kB/NF-kB, экспрессии и/или уровня ET-1, экспрессии и/или уровня TXAS и экспрессии и/или уровня HO-1 по сравнению с контролем.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к уменьшению интенсивности увеличения количества нейтрофилов в крови по сравнению с контролем.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 приводит к снижению по меньшей мере одного из следующих биомаркеров в сыворотке крови по сравнению с контролем: сурфактантного белка (SP)-A, SP-B, SP-D, KL-6/MUC1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF α , молекул адгезии (например, E, L-селектина), MMP-9, LTB4 и ферритина.

ADAMTS13.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к ADAMTS13 (также известному под названием "A13") и композициям, содержащим ADAMTS13, в лечении и предупреждении SCD. Согласно конкретным аспектам настоящее раскрытие относится к ADAMTS13 и композициям, содержащим ADAMTS13, в лечении и предупреждении VOC при SCD. Протеаза ADAMTS13 представляет собой гликозилированный белок массой от 180 до 200 кДа, продуцируемый преимущественно печенью. ADAMTS13 представляет собой плазменную металлопротеазу, которая расщепляет мультимеры VWF и даунрегулирует их активность при агрегации тромбоцитов. До настоящего времени ADAMTS13 ассоциировался с нарушениями свертываемости крови, такими как наследственная тромбоцитопеническая тромбогемолитическая пурпура (ТТР), приобретенная ТТР, инфаркт головного мозга, инфаркт миокарда, ишемически-реперфузионное повреждение, тромбоз глубоких вен и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (DIC), такой как DIC, связанный с сепсисом.

Для применения в способах и применениях настоящего раскрытия предусмотрены все известные из

уровня техники формы ADAMTS13. Зрелый ADAMTS13 имеет расчетную молекулярную массу приблизительно 145 кДа, тогда как очищенный ADAMTS13, полученный из плазмы крови, имеет кажущуюся молекулярную массу приблизительно от 180 до 200 кДа, вероятно, из-за посттрансляционных модификаций, совмещающихся с настоящими консенсусными последовательностями для 10 потенциальных сайтов N-гликозилирования и нескольких сайтов O-гликозилирования, а также одного сайта C-маннозилирования в повторах TSP1.

В контексте настоящего документа "ADAMTS13" относится к металлопротеазе из семейства ADAMTS (дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 1-го типа), которая расщепляет VWF между остатками Tyr¹⁶⁰⁵ и Met¹⁶⁰⁶. В контексте настоящего раскрытия "ADAMTS13", "A13" или "белок ADAMTS13" охватывает любой белок ADAMTS13, например ADAMTS13, от млекопитающего, такого как примат, человек (NP620594), обезьяна, кролик, свинья, бык (XP610784), грызун, мышь (NP001001322), крыса (XP342396), хомяк, песчанка, собака, кошка, лягушка (NP001083331), курица (XP415435) и их биологически активные производные. В контексте настоящего документа "ADAMTS13", "A13" или "белок ADAMTS13" относится к рекомбинантному, природному или полученному из плазмы крови белку ADAMTS13. Также охвачены мутантные и модифицированные белки ADAMTS13, обладающие активностью, а также функциональные фрагменты белков ADAMTS13 и химерные белки на их основе. Согласно некоторым аспектам белок ADAMTS13 дополнительно содержит метку, которая облегчает очистку, детекцию или как первое, так и второе. Белок ADAMTS13 по настоящему изобретению согласно некоторым аспектам дополнительно модифицирован посредством дополнительного терапевтического функционального фрагмента или функционального фрагмента, подходящего для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

Белок ADAMTS13 включает любой белок или полипептид с активностью ADAMTS13, в частности способностью расщеплять пептидную связь между остатками Tyr-842 и Met-843 в VWF. Белки ADAMTS13 человека включают без ограничения полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность под номером доступа в GenBank NP 620594 (NM139025.3), или процессированный из нее полипептид, например, полипептид, в котором был удален сигнальный пептид (аминокислоты 1-29) и/или пропептид (аминокислоты 30-74). Согласно определенным аспектам белок ADAMTS13 относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая очень схожа с последовательностью NP 620596 (изоформа 2 ADAMTS13, препробелок) или с аминокислотами 75-1371 из P_620594 (изоформа 2 ADAMTS13, зрелый полипептид). В соответствии с еще одним вариантом осуществления, белки ADAMTS13 включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, очень схожую с последовательностью NP 620595 (изоформа 3 ADAMTS13, препробелок) или с аминокислотами 75-1340 из NP_620595 (изоформа 1 ADAMTS13, зрелый полипептид). Согласно определенным аспектам к белку ADAMTS13 относятся природные варианты с VWF-расщепляющей активностью и искусственные конструкции с VWF-расщепляющей активностью. Согласно определенным аспектам ADAMTS13 охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, которые сохраняют некоторую основную активность. Из уровня техники известны многие природные варианты ADAMTS13 человека, и они охватываются составами по настоящему раскрытию, некоторые из которых включают мутации, выбранные из R7W, V88M, H96D, R102C, R193W, T196I, H234Q, A250V, R268P, W390C, R398H, Q448E, Q456H, P457L, P475S, C508Y, R528G, P618A, R625H, I673F, R692C, A732V, E740K, A900V, S903L, C908Y, C951G, G982R, C1024G, A1033T, R1095W, R1095W, R1123C, C1213Y, T1226I, G1239V и R1336W. Кроме того, к белкам ADAMTS13 относятся природные и рекомбинантные белки, которые были подвергнуты мутации, например одной или несколькими консервативным мутациям по аминокислоте, которая не относится к незаменимым. Предпочтительно, аминокислоты, незаменимые для ферментативной активности ADAMTS13, не будут подвергнуты мутации. К ним относятся, например, остатки, о которых известно или предполагают, что они являются незаменимыми для связывания металлов, такие как остатки 83, 173, 224, 228, 234, 281 и 284, и остатки, находящиеся в активном центре фермента, например остаток 225. Аналогично в контексте настоящего раскрытия к белкам ADAMTS13 относятся альтернативные изоформы, например изоформы, в которых отсутствуют аминокислоты 275-305 и/или 1135-1190 полноразмерного человеческого белка.

Согласно некоторым аспектам белки ADAMTS13 дополнительно модифицированы, например, посредством посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования по одной или нескольким аминокислотам, выбранным из человеческих остатков 142, 146, 552, 579, 614, 667, 707, 828, 1235, 1354, или по любому другому природному или созданному методами инженерии сайту модификации) или посредством *ex vivo* химической или ферментативной модификации, в том числе без ограничения гликозилирования, модификации водорастворимым полимером (например, пегилирования, силирования, методики HESylation® и т.д.), мечения и др.

Согласно некоторым аспектам белок ADAMTS13 представляет собой ADAMTS13 человека или его биологически активное производное или фрагмент, которые описаны в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей.

Согласно определенным аспектам рекомбинантный ADAMTS13 может представлять собой BAX930/SHP655. Согласно определенным аспектам к белку ADAMTS13 относится любой белок или полипептид с активностью ADAMTS13, в частности способностью расщеплять пептидную связь между остатками Тир-842 и Мет-843 в VWF по меньшей мере с 70%, по меньшей мере с 75%, по меньшей мере с 80%, по меньшей мере с 85%, по меньшей мере с 90%, по меньшей мере с 91%, по меньшей мере с 92%, по меньшей мере с 93%, по меньшей мере с 94%, по меньшей мере с 95%, по меньшей мере с 96%, по меньшей мере с 97%, по меньшей мере с 98% или по меньшей мере с 99% гомологии последовательности с BAX930/SHP655.

Протеолитически активный рекомбинантный ADAMTS13 можно получить посредством экспрессии в культурах клеток млекопитающих, как описано в публикации Plaimauer et al. (2002, Blood, 15, 100(10):3626-32) и в US 2005/0266528, раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для любых целей. Способы экспрессии рекомбинантного ADAMTS13 в культуре клеток раскрыты в публикации Plaimauer B, Scheifflinger F. (Semin Hematol., 2004 Jan, 41(1):24-33 и в US 2011/0086413, раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для любых целей. См. также WO 2012/006594, включенную посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей, в отношении способов получения рекомбинантного ADAMTS13 в культуре клеток.

Способы очистки белка ADAMTS13 из образца описаны в патенте США № 8945895, который включен в настоящий документ посредством ссылки для любых целей. Такие способы предусматривают согласно некоторым аспектам обогащение белка ADAMTS13 путем приведения в хроматографический контакт образца с гидроксипатитом в условиях, которые позволяют белку ADAMTS13 появиться в элюате или супернатанте из гидроксипатита. Способы могут дополнительно предусматривать тандемную хроматографию со смолой смешанного катионообменного/гидрофобного взаимодействия, которая связывает белок ADAMTS13. Дополнительные необязательные стадии включают ультрафильтрацию/диафильтрацию, анионообменную хроматографию, катионообменную хроматографию и инактивацию вирусов. Согласно некоторым аспектам такие способы предусматривают инактивацию вирусных загрязнителей в образцах белка, причем белок иммобилизован на подложке. Также согласно некоторым аспектам в настоящем документе предложены композиции с ADAMTS13, полученные согласно способам, описанным в патенте США № 8945895.

Композиции с ADAMTS13 и введение.

Согласно аспектам настоящего раскрытия ADAMTS13 вводят нуждающемуся в том субъекту. Для введения описываемого в настоящем документе ADAMTS13 субъекту ADAMTS13 согласно некоторым аспектам составлен в композиции, содержащей один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Термин "фармацевтически приемлемый", применяемый в связи с описываемыми в настоящем документе композициями, относится к молекулярным структурам и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают неблагоприятных реакций при введении млекопитающему (например, человеку). Предпочтительно термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулятивным органом федерального правительства или правительства штата или внесенный в перечень Фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения на млекопитающих и более конкретно на людях. К "фармацевтически приемлемым носителям" относятся все без исключения клинически пригодные растворители, диспергаторы, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и др. Согласно некоторым аспектам композиция образует сольваты с водой или традиционными органическими растворителями. Такие сольваты также включены.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к стабилизированным составам с белками полученного из плазмы крови ADAMTS13 и рекомбинантного ADAMTS13 (rADAMTS13), которые описаны в заявке на выдачу патента США № 2011/0229455 (теперь патенте США № 8623352) и/или в заявке на выдачу патента США № 2014/0271611, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки для любых целей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемые в настоящем документе составы сохраняют значительную активность ADAMTS13 при хранении в течение продолжительных периодов времени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления составы по настоящему раскрытию уменьшают или замедляют димеризацию, олигомеризацию и/или агрегацию белка ADAMTS13.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к составам с ADAMTS13, содержащим терапевтически эффективное количество или дозу белка ADAMTS13, субфизиологическую или физиологическую концентрацию фармацевтически приемлемой соли, стабилизирующую концентрацию одного или нескольких сахаров и/или сахароспиртов, неионогенное поверхностно-активное вещество, буферное средство, обеспечивающее нейтральный pH составу и необязательно соль кальция и/или цинка. Обычно, стабилизированные составы с ADAMTS13, представленные в настоящем документе, являются подходящими для фармацевтического введения. Согласно некоторым аспектам белок ADAMTS13 представляет собой ADAMTS13 человека или его биологически активное производное или фрагмент, кото-

рые описаны в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей.

Согласно некоторым аспектам составы с ADAMTS13 представляют собой жидкие или лиофилизированные составы. В соответствии с другими вариантами осуществления лиофилизированный состав лиофилизирован из жидкого состава, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей. В соответствии с определенными вариантами осуществления составов, представленных в настоящем документе, белок ADAMTS13 представляет собой ADAMTS13 человека, или рекомбинантный ADAMTS13 человека, или его биологически активное производное или фрагмент, которые описаны в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей.

Композицию по настоящему раскрытию согласно различным аспектам вводят перорально, применяют местно, вводят трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или внутривенной инъекцией. Термин "парентеральный", применяемый в контексте настоящего документа, включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостальные инъекционные или инфузионные методики. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение является подкожным. Также предусмотрено введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрааммарной, внутрибрюшной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретном месте. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение является внутривенным. Обычно композиции фактически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для принимающего ее пациента.

Состав композиции или фармацевтической композиции будет варьировать в зависимости от выбранного пути введения (например, раствор или эмульсия). Подходящую композицию, содержащую подлежащую введению композицию, готовят в физиологически приемлемой среде или носителе. В случае растворов или эмульсий к подходящим носителям относятся, например, водные или спирто-водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и забуференные среды. К парентеральным средам согласно некоторым аспектам относятся раствор хлорида натрия, декстроза Рингера, декстроза и хлорид натрия, лактатный раствор Рингера или нелетучие масла. К внутривенным средам согласно определенным аспектам относятся различные добавки, консерванты или жидкие, питательные наполнители или наполнители электролитов.

Композиции или фармацевтические композиции, пригодные в соединениях и способах по настоящему раскрытию и содержащие ADAMTS13 в качестве активного ингредиента, содержат согласно различным аспектам фармацевтически приемлемые носители или добавки в зависимости от пути введения. Примеры таких носителей или добавок включают воду, фармацевтически приемлемый органический растворитель, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиполивиниловый полимер, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакриловый натрий, альгинат натрия, водорастворимый декстран, карбоксиметилкрахмал натрия, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую камедь, гуммиарабик, казеин, желатин, агар, диглицерин, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, человеческий сывороточный альбумин (HSA), маннит, сорбит, лактозу, фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество и др. Применяемые добавки выбирают без ограничения из перечисленных выше или их комбинаций по обстоятельствам в зависимости от лекарственной формы.

Различные водные носители, например вода, забуференная вода, 0,4%-ный солевой раствор, 0,3%-ный глицин или водные суспензии, содержат согласно различным аспектам активное соединение в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для получения водных суспензий. Такими вспомогательными веществами являются суспендирующие средства, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие средства в некоторых случаях представляют собой природный фосфатид, например лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например полиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например гептадекаэтиленоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, такие как полиоксиэтиленсорбитмоноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии согласно некоторым аспектам содержат один или несколько консервантов, например, этил или n-пропил, п-гидроксibenзоат.

Согласно некоторым аспектам ADAMTS13 или композиции с ADAMTS13 лиофилизуют для хранения и ресуспендируют в подходящем носителе перед применением. Используют любые подходящие

методики лиофилизации и ресуспендирования, которые известны из уровня техники. Специалисты в настоящей области техники поймут, что лиофилизация и ресуспендирование приводит к различной степени потери активности белка и что уровни применения зачастую корректируют для компенсации этой потери.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии путем добавления воды, дают активное соединение в смеси с диспергирующим или смачивающим средством, суспендирующим средством и одним или несколькими консервантами. Подходящие диспергирующие или смачивающие средства и суспендирующие средства проиллюстрированы упомянутыми выше.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе составы с ADAMTS13 могут дополнительно содержать один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей и/или разбавителей, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе составы с ADAMTS13 будут обладать тоничностью в описываемом диапазоне, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и для любых целей.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к составам с ADAMTS13, включая иллюстративные составы, описанные в Разделе III ("Композиции и составы с ADAMTS13") заявки на выдачу патента США № 2011/0229455. Способы получения ADAMTS13 и композиции с ним, которые описаны в заявке на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в заявке на выдачу патента США № 2014/0271611, включены в настоящий документ посредством ссылки в их полном объеме для любых целей. Кроме того, актуальные способы получения парентерально вводимых составов и композиций известны или очевидны специалистам в настоящей области техники и описаны более подробно, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

Согласно различным аспектам фармацевтические композиции имеют форму стерильной инъекционной водной, маслянистой суспензии, дисперсий или стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного введения. Суспензию согласно некоторым аспектам составляют согласно известному из уровня техники способу с применением таких подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств, которые были упомянуты выше. Стерильный инъекционный препарат согласно определенным аспектам представляет собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель представляет собой растворяющую или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и др.), подходящие смеси из них, растительные масла, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворяющей или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели используют любое легкое нелетучее масло, согласно различным аспектам, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении инъекционных препаратов находят применение такие жирные кислоты, как олеиновая кислота.

Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко ввести при помощи шприца. Надлежащую текучесть поддерживают, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Предупреждение действия микроорганизмов осуществляют с помощью различных противобактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и др. Во многих случаях будет желательно включение изотонических средств, например сахаров или хлорида натрия. Согласно определенным аспектам пролонгированной абсорбции инъекционных композиций достигают применением в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Для повышения их эффективности пригодные для введения композиции согласно определенным аспектам составлены с усилителями всасывания или абсорбции. К таким усилителям относятся, например, салицилат, гликохолат/линолеат, глихолат, аprotинин, бацитрацин, SDS, капрат и др. См., например, публикации Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285, 1996) и Oliyai et al. (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544, 1993), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в их полном объеме и для любых целей.

Кроме того, свойства гидрофильности и гидрофобности композиций, применяемых в композициях и способах по настоящему раскрытию, хорошо сбалансированы, что повышает их полезность для применения *in vitro* и особенно для применения *in vivo*, тогда как другие композиции, не имеющие такого баланса, имеют существенно меньшую полезность. В частности, композиции в настоящем раскрытии обла-

дают подходящей степени солюбилизации в водной среде, что обеспечивает абсорбцию и биодоступность в организме, и при этом обладают некоторой степенью солюбилизации в липидах, что позволяет соединениям проходить через клеточную мембрану к предполагаемому месту действия.

В конкретных аспектах ADAMTS13 представлен в фармацевтически приемлемом (т.е. стерильном и нетоксичном) жидком, полутвердом или твердом разбавителе, который служит фармацевтической средой, вспомогательным веществом или средой. Применяют любой известный в настоящей области техники разбавитель. К иллюстративным разбавителям относятся без ограничения полиоксиэтиленсорбитан-монолаурат, стеарат магния, метил- и пропилгидроксibenзоат, тальк, альгинаты, крахмалы, лактоза, сахароза, декстроза, сорбит, маннит, аравийская камедь, фосфат кальция, минеральное масло, твердое какао-масло и жидкое масло какао.

Композицию упаковывают в удобные для доставки формы. Композиция заключают в капсулу, каплету, саше, крахмальную облатку, желатин, бумагу или другую емкость. Такие формы доставки являются предпочтительными, если они совместимы с доставкой композиции в организм принимающего ее пациента и, в частности, если композицию вводят в форме однократной дозы. Дозированные единицы упаковывают, например, во флаконы, таблетки, капсулы, суппозитории или крахмальные облатки.

Настоящее раскрытие относится к способам лечения, уменьшения интенсивности и/или предупреждения VOC при SCD у субъекта, предусматривающим введение эффективного количества ADAMTS13 или композиции с ADAMTS13, которые описаны в настоящем документе. Композицию вводят подлежащему лечению субъекту любым общепринятым способом, как подробно описано в настоящем документе ранее. Согласно определенным аспектам композицию вводят однократной дозой или множеством доз в течение некоторого периода времени (как более подробно описано ниже).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту в пределах приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 60, 72, 84, 96, 108 или 120 ч после начала VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту в пределах приблизительно 1-2 ч, приблизительно 1-5 ч, приблизительно 1-10 ч, приблизительно 1-12 ч, приблизительно 1-24 ч, приблизительно 1-36 ч, приблизительно 1-48 ч, приблизительно 1-60 ч, приблизительно 1-72 ч, приблизительно 1-84 ч, приблизительно 1-96 ч, приблизительно 1-108 ч или приблизительно 1-120 ч после начала VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту в пределах приблизительно 2-5 ч, приблизительно 5-10 ч, приблизительно 10-20 ч, приблизительно 20-40 ч, приблизительно 30-60 ч, приблизительно 40-80 ч, приблизительно 50-100 ч или приблизительно 60-120 ч после начала VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в день после VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в неделю после VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в день. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в два дня. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в три дня. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят два раза в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят до разрешения клинических проявлений (например, симптомов и/или биомаркеров). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят до следующего дня после разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в течение по меньшей мере двух дней после разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в течение по меньшей мере трех дней после разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в течение по меньшей мере недели после разрешения клинических проявлений.

Согласно некоторым аспектам композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту для предупреждения начала VOC. При таком превентивном лечении ADAMTS13 вводят однократной болюсной инъекцией или многократными дозами для поддержания в кровотоке уровня ADAMTS13, эффективного для предупреждения начала VOC. Согласно таким аспектам композицию, содержащую ADAMTS13, вводят раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз в два дня или раз в день. Согласно конкретным аспектам инъекцию вводят подкожно. Согласно другим аспектам инъекцию вводят внутривенно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту до начала VOC для предупреждения VOC. Согласно таким аспектам настоящего раскрытия, композицию вводят в терапевтически эффективном количестве или дозой, достаточной для поддержания эффективного уровня активности ADAMTS13 у субъекта или в крови субъекта.

Настоящее раскрытие относится к способам лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения ALI или ARDS у субъекта, предусматривающим введение эффективного количества ADAMTS13 или композиции с ADAMTS13, которые описаны в настоящем документе. Композицию вводят подлежащему лечению субъекту любым общепринятым способом, как подробно описано в настоящем документе

ранее. Согласно определенным аспектам композицию вводят однократной дозой или множеством доз в течение некоторого периода времени (как более подробно описано ниже).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 60, 72, 84, 96, 108 или 120 ч после начала ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту в пределах приблизительно 1-2 ч, приблизительно 1-5 ч, приблизительно 1-10 ч, приблизительно 1-12 ч, приблизительно 1-24 ч, приблизительно 1-36 ч, приблизительно 1-48 ч, приблизительно 1-60 ч, приблизительно 1-72 ч, приблизительно 1-84 ч, приблизительно 1-96 ч, приблизительно 1-108 ч или приблизительно 1-120 ч после начала ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту в пределах приблизительно 2-5 ч, приблизительно 5-10 ч, приблизительно 10-20 ч, приблизительно 20-40 ч, приблизительно 30-60 ч, приблизительно 40-80 ч, приблизительно 50-100 ч или приблизительно 60-120 ч после начала ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в пределах 4 ч, в пределах 8 ч, в пределах 12 ч, в пределах 1 дня, в пределах 2 дней, в пределах 3 дней, в пределах 4 дней, в пределах 5 дней, в пределах 6 дней после начала или постановки диагноза ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в пределах 1 недели после начала или постановки диагноза ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в день после начала или постановки диагноза ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в неделю после начала или постановки диагноза ALI или ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в день. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в два дня. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят раз в три дня. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят два раза в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят до разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят до следующего дня после разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в течение по меньшей мере двух дней после разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в течение по меньшей мере трех дней после разрешения клинических проявлений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят в течение по меньшей мере недели после разрешения клинических проявлений.

Согласно некоторым аспектам композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту для предупреждения начала ALI или ARDS. При таком превентивном лечении ADAMTS13 вводят однократной болюсной инъекцией или многократными дозами для поддержания в кровотоке уровня ADAMTS13, эффективного для предупреждения начала ALI или ARDS. Согласно таким аспектам композицию, содержащую ADAMTS13, вводят раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз в два дня или раз в день. Согласно конкретным аспектам инъекцию вводят подкожно. Согласно другим аспектам инъекцию вводят внутривенно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую ADAMTS13, вводят субъекту до начала ALI или ARDS для предупреждения ALI или ARDS. Согласно таким аспектам настоящего раскрытия, композицию вводят в терапевтически эффективном количестве или дозой, достаточной для поддержания эффективного уровня активности ADAMTS13 у субъекта или в крови субъекта.

Введение доз композиций с ADAMTS13/способы лечения.

Согласно различным аспектам эффективная дозировка подлежащего введению ADAMTS13 или подлежащей введению композиции с ADAMTS13 варьирует в зависимости от множества факторов, которые модифицируют действие лекарственных средств, например возраста, общего состояния, массы тела, пола и рациона питания субъекта, тяжести какой-либо инфекции, времени введения, способа введения и других клинических факторов, в том числе степени тяжести VOC при SCD.

Согласно некоторым аспектам составы или композиции по настоящему раскрытию вводят посредством начального болюса с последующей бустерной доставкой по истечении некоторого периода времени. Согласно определенным аспектам составы по настоящему раскрытию вводят посредством начального болюса с последующей непрерывной инфузией для поддержания терапевтических уровней ADAMTS13 в кровотоке. Согласно конкретным аспектам ADAMTS13 или композицию с ADAMTS13 по настоящему раскрытию вводят в течение продолжительных периодов времени. Согласно некоторым аспектам ADAMTS13 или композицию с ADAMTS13 дают по схеме быстрого лечения для облегчения острых симптомов VOC. Согласно некоторым аспектам ADAMTS13 или композицию с ADAMTS13 дают по схеме пролонгированного или варьированного лечения для предупреждения возникновения VOC. В качестве другого примера, композицию или состав по настоящему раскрытию вводят в виде однократной дозы. Специалисты в настоящей области техники легко оптимизируют эффективные дозы и схемы введения, определяясь надлежащей медицинской практикой и клиническим состоянием отдельного субъекта. Частота введения доз зависит от фармакокинетических параметров средств, пути введения и общего

состояния субъекта.

Фармацевтический состав определяет специалист в настоящей области техники в зависимости от пути введения и требуемой дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18042), с. 1435-1712, раскрытие которых, таким образом, включено посредством ссылки для любых целей. Такие составы в некоторых случаях влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* введенной композиции. Подходящую дозу рассчитывают в зависимости от пути введения, в частности в зависимости от массы тела, площади поверхности тела или размера органа. Согласно некоторым аспектам подходящие дозировки определяют с помощью общепризнанных анализов для определения дозировок для достижения определенного уровня в крови в сочетании с соответствующими данными по зависимости дозы от ответа. Согласно определенным аспектам для определения оптимальной схемы дозировки и введения измеряют титр антител у индивидуума. Конечная схема дозирования будет определяться лечащим врачом или терапевтом с учетом различных факторов, которые модифицируют действие фармацевтических композиций, например, удельной активности композиции, чувствительности субъекта, возраста, общего состояния, массы тела, пола и рациона питания субъекта, тяжести какой-либо инфекции или злокачественного состояния, времени введения и других клинических факторов, в том числе степени тяжести боли или VOC.

Согласно определенным аспектам ADAMTS13 или композиция с ADAMTS13 содержит любую дозу ADAMTS13, достаточную для вызова ответа у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза ADAMTS13 является достаточной для лечения VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза ADAMTS13 является достаточной для предупреждения VOC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза ADAMTS13 является достаточной для лечения ALL В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза ADAMTS13 является достаточной для предупреждения ALL В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза ADAMTS13 является достаточной для лечения ARDS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления доза ADAMTS13 является достаточной для предупреждения ARDS. Эффективное количество ADAMTS13 или композиции с ADAMTS13 для использования в терапевтических целях будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в настоящей области техники поймет, что соответствующие уровни дозировки для лечения или предупреждения будут, таким образом, варьировать в зависимости, отчасти, от доставляемой молекулы, показания, для которого применяют ADAMTS13 или композицию с ADAMTS13, пути введения и размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и общего состояния (возраста и состояния здоровья) пациента. Соответственно для получения оптимального терапевтического эффекта клиницист в некоторых случаях подбирает дозировку и модифицирует путь введения.

Дозировка, если отдельно не указано иное, представлена в международных единицах. Как рассмотрено в настоящем документе ниже, применение международных единиц (МЕ) является новым стандартом для измерения активности ADAMTS13. До недавнего времени стандартом для измерения активности ADAMTS13 были единицы FRETS (или единицы теста FRETS). 20 единиц FRETS (FRETS-ед.) эквивалентны примерно 21,78 МЕ. Другими словами, 20 МЕ ADAMTS13 эквивалентны приблизительно 18,22 FRETS-ед. ADAMTS13.

Типичная дозировка, согласно различным аспектам, варьирует от приблизительно 10 международных единиц на килограмм массы тела до приблизительно 10000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество ADAMTS13 составляет до приблизительно 10000 международных единиц на килограмм массы тела или более, в зависимости от упомянутых выше факторов. Согласно другим аспектам дозировка может варьировать от приблизительно 20 до приблизительно 6000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество ADAMTS13 составляет от приблизительно 40 до приблизительно 4000 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 3000 международных единиц на килограмм массы тела.

Согласно отдельным аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 10 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 50 до приблизительно 450 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 40 до приблизительно 100 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 40 до приблизительно 150 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 500 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 100 до приблизительно 400 международных единиц на килограмм массы тела. Согласно некоторым аспектам дозировка или терапевтически эффективное количество со-

тела, приблизительно 8500 международных единиц на килограмм массы тела, приблизительно 9000 международных единиц на килограмм массы тела, приблизительно 9500 международных единиц на килограмм массы тела и приблизительно 10000 международных единиц на килограмм массы тела.

В контексте настоящего документа "одну единицу активности ADAMTS13" или "одну единицу активности" определяют как величину активности в 1 мл объединенной в пул нормальной плазмы крови человека, независимо от используемого анализа. Тем не менее как указано выше, новым стандартом для измерения или дозирования ADAMTS13 являются международные единицы (МЕ). 20 единиц теста FRETs или 20 единиц FRETs (FRETs-ед.) эквивалентны примерно 21,78 МЕ. Другими словами, 20 МЕ ADAMTS13 эквивалентны приблизительно 18,22 FRETs-ед. ADAMTS13. Таким образом, переход на новый стандарт приводит к примерному сдвигу на 8,9% при преобразовании FRETs-ед. в МЕ.

Согласно некоторым аспектам для измерения активности ADAMTS13 применяют анализ методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRETs). Для FRETs необходимы два взаимодействующих партнера, один из которых помечен донорным флуорофором, а другой помечен акцепторным флуорофором. FRETs-анализы для ADAMTS13 предусматривают использование химически модифицированного фрагмента домена A2 из VWF, который охватывает сайт расщепления ADAMTS13. Он легко расщепляется нормальной плазмой крови, но не плазмой с дефицитом ADAMTS13. Это расщепление блокируется ЭДТА, и поэтому образцы для этого анализа должны быть собраны в пробирки, которые содержат цитрат в качестве антикоагулянта, а не ЭДТА. Одной единицей FRETs-VWF73-активности ADAMTS13 является величина активности, необходимая для расщепления того же количества субстрата FRETs-VWF73 (Kokame et al., Br. J. Haematol., 2005 April, 129(1):93-100, которая включена в настоящий документ посредством ссылки), которое расщепляется одним мл объединенной в пул нормальной плазмы крови человека.

Согласно некоторым аспектам для измерения активности ADAMTS13 применяют дополнительные анализы активности. Например, можно провести прямые анализы активности ADAMTS13 для обнаружения расщепления либо полноразмерных молекул VWF, либо фрагментов VWF с применением электрофореза в агарозном геле с добавлением SDS, а не прямое обнаружение активности ADAMTS13 можно произвести с помощью анализов связывания коллагена. Прямые анализы, в том числе анализ FRETs, который описан в настоящем документе, предусматривают обнаружение расщепления продуктов либо полноразмерной молекулы VWF, либо фрагмента VWF, который охватывает сайт расщепления ADAMTS13. При электрофорезе в агарозном геле с добавлением SDS и вестерн-блоттинге очищенный VWF инкубируют с плазмой в течение 24 ч. Происходит расщепление VWF посредством ADAMTS13, что приводит к уменьшению размеров мультимеров. Это уменьшение визуализируют с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим вестерн-блоттингом с конъюгированным с пероксидазой антителом к VWF. Активность концентрации ADAMTS13 в тестируемом образце можно установить путем сравнения с серией разведенных образцов нормальной плазмы крови. Также можно провести SDS-PAGE и вестерн-блоттинг, что предусматривает визуализацию димерных фрагментов VWF после SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Этот анализ технически проще, чем электрофорез в агарозном геле с добавлением SDS, и представляется очень чувствительным способом измерения уровней активности ADAMTS13.

Согласно некоторым аспектам не прямые анализы предусматривают обнаружение расщепления продуктов либо полноразмерной молекулы VWF, либо фрагмента VWF, который охватывает сайт расщепления ADAMTS13 в домене A2 у VWF. К таким анализам относятся анализы связывания коллагена, где нормальную плазму крови или очищенный VWF инкубируют с тестируемым образцом плазмы крови в присутствии BaCl_2 и 1,5 М мочевины, которая денатурирует VWF. VWF расщепляется посредством ADAMTS13, а остаточный VWF измеряют по его связыванию с коллагеном III типа. Связанный VWF количественно оценивают с помощью ИФА-анализа с конъюгированным антителом к VWF. Другим непрямым анализом является анализ индуцированной ристоцетином агрегации. Он схож с описанным выше анализом связывания коллагена, но остаточный VWF измеряют по индуцированной ристоцетином агрегации тромбоцитов с использованием тромбоцитарного агрегометра. Другим непрямым анализом является функциональный ИФА. В этом анализе фрагмент рекомбинантного VWF иммобилизуют на планшете для ИФА с применением антитела к метке на VWF. Фрагмент VWF кодирует домен A2 и сайт расщепления ADAMTS13 в участке Tyr1605-Met1606 и помечен S-трансферазой [GST] с гистидином [GST-VWF73-His]. Добавляют плазму крови к иммобилизованному фрагменту GST-VWF73-His, и в сайте расщепления ADAMTS13 происходит расщепление иммобилизованного фрагмента. Остаточный расщепленный фрагмент VWF измеряют с применением второго моноклонального антитела, которое распознает только расщепленный фрагмент VWF, но не фрагмент взаимодействия. Следовательно, активность ADAMTS13 обратно пропорциональна концентрации остаточного субстрата.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ADAMTS13 поставляют или вводят в терапевтически эффективной концентрации от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл в конечном составе. В соответствии с другими вариантами осуществления, ADAMTS13 присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл. В соответствии с еще одними вариантами осуществления, ADAMTS13 присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до

приблизительно 5 мг/мл. В соответствии с другим вариантом осуществления ADAMTS13 присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 2 мг/мл. В соответствии с еще одними вариантами осуществления ADAMTS13 может присутствовать в концентрации приблизительно 0,01 мг/мл или в концентрации приблизительно 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 мг/мл или в более высокой концентрации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления концентрацию ADAMTS13 в относительно чистом составе можно определить с помощью спектроскопии (т.е. общего белка, измеряемого на A280) или другого метода определения для бестарных форм (например, с помощью анализа Брэдфорда, окрашивание серебром, взвешивания лиофилизированного порошка и т.д.). В соответствии с другими вариантами осуществления, концентрацию ADAMTS13 можно определить с помощью ИФА-анализа ADAMTS13 (например, мг/мл антигена).

Согласно некоторым аспектам концентрацию ADAMTS13 в составе по настоящему раскрытию выражают в виде уровня ферментативной активности. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 10 единиц FRET-S-VWF73-активности до приблизительно 10000 единиц FRET-S-VWF73-активности или других подходящих ферментативных единиц ADAMTS13 (ME). В соответствии с другими вариантами осуществления состав может содержать от приблизительно 20 единиц FRET-S-VWF73-активности (ед._{FV73}) до приблизительно 8000 единиц FRET-S-VWF73-активности, или от приблизительно 30 ед._{FV73} до приблизительно 6000 ед._{FV73}, или от приблизительно 40 ед._{FV73} до приблизительно 4000 ед._{FV73}, или от приблизительно 50 ед._{FV73} до приблизительно 3000 ед._{FV73}, или от приблизительно 75 ед._{FV73} до приблизительно 2500 ед._{FV73}, или от приблизительно 100 ед._{FV73} до приблизительно 2000 ед._{FV73}, или от приблизительно 200 ед._{FV73} до приблизительно 1500 ед._{FV73}, или в пределах других приблизительных диапазонов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ADAMTS13 поставляют или вводят дозой от приблизительно 10 до 10000 ед._{FV73}/кг массы тела. В соответствии с одним вариантом осуществления ADAMTS13 вводят дозой от приблизительно 20 ед._{FV73}/кг массы тела до приблизительно 8000 ед._{FV73}/кг массы тела. В соответствии с одним вариантом осуществления ADAMTS13 вводят дозой от приблизительно 30 ед._{FV73}/кг массы тела до приблизительно 6000 ед._{FV73}/кг массы тела. В соответствии с одним вариантом осуществления ADAMTS13 вводят дозой от приблизительно 40 ед._{FV73}/кг массы тела до приблизительно 4000 ед._{FV73}/кг массы тела. В соответствии с одним вариантом осуществления ADAMTS13 вводят дозой от приблизительно 100 ед._{FV73}/кг массы тела до приблизительно 3000 ед._{FV73}/кг массы тела. В соответствии с одним вариантом осуществления ADAMTS13 вводят дозой от приблизительно 200 ед._{FV73}/кг массы тела до приблизительно 2000 ед._{FV73}/кг массы тела. В соответствии с другими вариантами осуществления ADAMTS13 вводят в количестве приблизительно 10 ед._{FV73}/кг массы тела, приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 или 10000 ед._{FV73}/кг массы тела или промежуточной дозой или диапазоном его доз.

Согласно некоторым аспектам предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 20 ед._{FV73} до приблизительно 10000 ед._{FV73}. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав содержит приблизительно 10 единиц FRET-S-VWF73-активности или приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 10000 или более единиц FRET-S-VWF73-активности.

Согласно некоторым аспектам концентрацию ADAMTS13 можно выразить в виде ферментативной активности на единицу объема, например, ферментативных единиц ADAMTS13 на мл (ME/мл). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 10 ME/мл до приблизительно 10000 ME/мл. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления, состав содержит от приблизительно 20 ME/мл до приблизительно 10000 ME/мл, или от приблизительно 20 ME/мл до приблизительно 8000 ME/мл, или от приблизительно 30 ME/мл до приблизительно 6000 ME/мл, или от приблизительно 40 ME/мл до приблизительно 4000 ME/мл, или от приблизительно 50 ME/мл до приблизительно 3000 ME/мл, или от приблизительно 75 ME/мл до приблизительно 2500 ME/мл, или от приблизительно 100 ME/мл до приблизительно 2000 ME/мл, или от приблизительно 200 ME/мл до приблизительно 1500 ME/мл, или в пределах других приблизительных диапазонов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 150 ME/мл до приблизительно 600 ME/мл. В соответствии с другим вариантом осуществления, предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит

от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 1000 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 800 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 600 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 400 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 300 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 100 МЕ/мл до приблизительно 200 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит от приблизительно 300 МЕ/мл до приблизительно 500 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит приблизительно 100 МЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемый в настоящем документе состав с ADAMTS13 содержит приблизительно 300 МЕ/мл. В соответствии с различными вариантами осуществления, состав содержит приблизительно 10 МЕ/мл или приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 10000 или более МЕ/мл.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе составы с ADAMTS13 могут дополнительно содержать один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей и/или разбавителей, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена посредством ссылки во всей их полноте для любых целей. Более того, в соответствии с одним вариантом осуществления, представленные в настоящем документе составы с ADAMTS13 будут обладать тоничностью в описываемом диапазоне, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0229455 и/или в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0271611, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для любых целей.

Частота введения доз будет зависеть от фармакокинетических параметров молекулы ADAMTS13 в применяемом составе. Как правило, врач будет вводить композицию до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, которая достигает требуемого эффекта. Таким образом, композицию, согласно различным аспектам, вводят в виде одной дозы или в виде двух или более доз (которые могут содержать или не содержать одинаковое количество требуемой молекулы) на протяжении периода времени или в виде непрерывной инфузии с помощью имплантируемого устройства или катетера. Согласно некоторым аспектам композицию, содержащую ADAMTS13, вводят однократной болюсной инъекцией раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз в два дня, раз в день, раз в 12 ч, раз в 8 ч, раз в 6 ч, раз в 4 ч или раз в 2 ч. Согласно аспектам настоящего раскрытия, относящимся к профилактическому или превентивному лечению, ADAMTS13 вводят несколькими дозами для поддержания в кровотоке уровня ADAMTS13, эффективного для предупреждения начала VOC, ALI или ARDS. Согласно таким аспектам композицию, содержащую ADAMTS13, вводят раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз в два дня или раз в день. Согласно отдельным аспектам инъекцию вводят подкожно (например, WO2014151968, включенная в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей). Согласно другим аспектам инъекцию вводят внутривенно. Дополнительно уточнение подходящей вводимой дозировки и времени введения обычно производится специалистами в настоящей области техники и находится в пределах спектра задач, которые они обычно выполняют. Подходящие дозировки зачастую определяют с помощью соответствующих данных по зависимости дозы от ответа, которые получают стандартным способом.

Наборы, содержащие ADAMTS13.

В качестве дополнительного аспекта настоящее раскрытие относится к наборам, которые содержат один или несколько фармацевтических составов для введения ADAMTS13 или композиции с ADAMTS13 субъекту, упакованных таким образом, чтобы это облегчало их применение во время введения субъекту.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее раскрытие относится к наборам для получения одной единицы дозы для введения. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее раскрытие относится к наборам для получения множества единиц доз для введения. Каждый из наборов согласно различным аспектам содержит как первую емкость с сухим белком, так и вторую

емкость с водным составом. В объем настоящего раскрытия также включены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

В соответствии с другим вариантом осуществления, такой набор включает описываемый в настоящем документе фармацевтический состав (например, композицию, содержащую терапевтический белок, например, ADAMTS13), упакованный в емкость, такую как герметичная бутылка или сосуд, с прикрепленной к емкости или включенной в упаковку этикеткой, на которой описано применение соединения или композиции при осуществлении на практике способа. В соответствии с одним вариантом осуществления, фармацевтический состав упакован в емкости таким образом, что количество свободного пространства в емкости (например, количество воздуха между жидким составом и верхней частью емкости) было очень малым. Предпочтительно количество свободного пространства является незначительным (т.е. почти отсутствует).

Согласно некоторым аспектам фармацевтический состав или композиция содержит стабилизатор. Термин "стабилизатор" относится к веществу или вспомогательному веществу, которое защищает композицию от неблагоприятных условий, таких как те, которые возникают во время нагревания или замораживания, и/или продлевает стабильность или срок годности композиции или фармацевтической композиции в стабильном состоянии. Примеры стабилизаторов включают без ограничения сахара, такие как сахароза, лактоза и манноза; сахароспирты, такие как маннит; аминокислоты, такие как глицин или глутаминовая кислота; и белки, такие как человеческий сывороточный альбумин или желатин.

Согласно некоторым аспектам фармацевтический состав или композиция содержит противомикробный консервант. Термин "противомикробный консервант" относится к любому веществу, которое добавляют в композицию и которое ингибирует рост микроорганизмов, которые могут быть внесены при повторном проколе флаконов с множеством доз, если используются такие емкости. Примеры противомикробных консервантов включают без ограничения такие вещества, как тимеросал, 2-феноксиэтанол, бензетония хлорид и фенол.

Согласно одному аспекту набор содержит первую емкость, содержащую терапевтический белок или белковую композицию, и вторую емкость, содержащую физиологически приемлемый раствор для ресуспендирования композиции. Согласно одному аспекту фармацевтический состав упакован в виде стандартной лекарственной формы. Набор необязательно дополнительно включает устройство, подходящее для введения фармацевтического состава конкретным путем введения. Согласно некоторым аспектам набор содержит этикетку, на которой описано применение фармацевтических составов.

Предполагается, что весь настоящий документ должен быть связан как единое раскрытие, и следует понимать, что предусматриваются любые комбинации описанных в настоящем документе признаков, даже если такая комбинация признаков не встречается совместно в одном предложении, абзаце или разделе настоящего документа. Настоящее раскрытие также включает, например, все варианты осуществления настоящего раскрытия, которые имеют более узкий объем, чем те варианты, которые конкретно упомянуты выше. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки во всей своей полноте в той степени, в которой это не противоречит настоящему раскрытию.

Дополнительные варианты осуществления.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения вазоокклюзивного криза (VOC) у субъекта, страдающего серповидноклеточной анемией (SCD). Субъекту вводят терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13. Субъектом может быть пациент-человек с SCD или животное с SCD. ADAMTS13 может иметь рекомбинантную форму. ADAMTS13 может быть частью состава, подходящего для внутривенной инъекции. ADAMTS13 может быть частью состава, подходящего для подкожной инъекции. Дозировка ADAMTS13 может составлять от 2500 до 4000 МЕ/кг, от 2800 до 3800 МЕ/кг, от 3000 до 3400 МЕ/кг, приблизительно 3200 или 3200 МЕ/кг у грызуна. Дозировка ADAMTS13 может составлять от 40 до 100 МЕ/кг, от 100 до 300 МЕ/кг, от 120 до 240 МЕ/кг, от 150 до 200 МЕ/кг или от 300 до 500 МЕ/кг у пациента-человека. ADAMTS13 можно вводить внутривенно до, во время или после острого VOC у пациента-человека или пациента-животного с SCD. ADAMTS13 можно вводить подкожно до, во время или после острого VOC у пациента-человека или пациента-животного с SCD. Лечение может быть эффективным для защиты субъекта, например пациента-человека или животного с SCD, от заболеваемости и смертности, ассоциированных с VOC или гипоксией.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения острого повреждения легкого (ALI) или острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS). Субъекту вводят терапевтически эффективное количество композиции, содержащей ADAMTS13. ADAMTS13 может иметь рекомбинантную форму. ADAMTS13 может быть частью состава, подходящего для внутривенной инъекции. ADAMTS13 может быть частью состава, подходящего для подкожной инъекции. Дозировка ADAMTS13 может составлять от 2500 до 4000 МЕ/кг, от 2800 до 3800 МЕ/кг, от 3000 до 3400 МЕ/кг, приблизительно 3200 или 3200 МЕ/кг у грызуна. Дозировка

ADAMTS13 может составлять от 40 до 100 МЕ/кг, от 100 до 300 МЕ/кг, от 120 до 240 МЕ/кг, от 150 до 200 МЕ/кг или от 300 до 500 МЕ/кг у пациента-человека. ADAMTS13 можно вводить внутривенно до, во время или после ALI или ARDS у пациента-человека или пациента-животного. ADAMTS13 можно вводить подкожно до, во время или после ALI или ARDS у пациента-человека или пациента-животного. Лечение может быть эффективным для защиты субъекта, например, пациента-человека с ALI или ARDS, от заболеваемости и смертности.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, уменьшения интенсивности или предупреждения (а) VOC у субъекта, страдающего SCD, или (b) повреждения легкого у субъекта, страдающего острым повреждением легкого (ALI) и/или острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS) или подверженного риску их развития. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество ADAMTS13. Повреждение легкого или сосудистое воспаление могут быть вторичными или индуцированными гипоксией. Повреждение легкого или сосудистое воспаление могут быть вторичными или индуцированными реоксигенационным стрессом. Во время гипоксии или реоксигенационного стресса уровень кислорода может составлять приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, 7-10 или 7-9%. Субъектом может быть пациент-человек с SCD, пациент-человек в состоянии VOC, пациент-человек с ALI, пациент-человек с ARDS, животное с SCD, животное в состоянии VOC, животное с ALI, животное с ARDS или животное, гомозиготное по HbA. ADAMTS13 может быть частью состава, подходящего для внутривенной инъекции. ADAMTS13 может быть частью состава, подходящего для подкожной инъекции. Дозировка ADAMTS13 может составлять от 2500 до 4000 МЕ/кг, от 2800 до 3800 МЕ/кг, от 3000 до 3400 МЕ/кг, приблизительно 3200 или 3200 МЕ/кг у грызуна. Дозировка ADAMTS13 может составлять от 40 до 100 МЕ/кг, от 100 до 300 МЕ/кг, от 120 до 240 МЕ/кг, от 150 до 200 МЕ/кг или от 300 до 500 МЕ/кг у пациента-человека. Субъекта можно отслеживать на предмет одного или нескольких из содержания белка BAL и количества лейкоцитов в BAL один или несколько раз до, во время и после лечения. Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения содержания белка BAL по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 36%, по меньшей мере на 37%, по меньшей мере на 38%, по меньшей мере на 39%, по меньшей мере на 40, 30-45, 33-43, 34-42, 35-41 или 36-40% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения количества лейкоцитов в BAL по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 36%, по меньшей мере на 37%, по меньшей мере на 38%, по меньшей мере на 39%, по меньшей мере на 40, 30-45, 33-43, 34-42, 35-41 или 36-40% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение).

В соответствии по меньшей мере с указанными выше вариантами осуществления введение ADAMTS13 может быть эффективным для предупреждения активации или повышенной экспрессии или повышенного уровня по меньшей мере одного из VCAM-1 и ICAM-1 и/или для снижения экспрессии по меньшей мере одного из ET-1, TXAS и HO-1. См. фиг. 2B, 2C и 3B. Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии или уровня TXAS или ET-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 68%, по меньшей мере на 71%, по меньшей мере на 74%, по меньшей мере на 77%, по меньшей мере на 80, 65-80, 70-80 или 70-75% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии, или уровня, или активности ICAM-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 53%, по меньшей мере на 56%, по меньшей мере на 59%, по меньшей мере на 62%, по меньшей мере на 65, 53-65, 55-62 или 57-60% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии или уровня HO-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 46%, по меньшей мере на 47%, по меньшей мере на 48%, по меньшей мере на 49, 46-49, 47-49 или 46-48% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения соотношения P-NF-kB/NF-kB, измеренного с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 63%, по меньшей мере на 67%, по меньшей мере на 71%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 79%, по меньшей мере на 83%, 63-83, 67-79 или 71-75% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). У субъекта с SCD или в состоянии VOC введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии, уровня или активности VCAM-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 42%, по меньшей мере на 44%, по меньшей мере на 46%, по меньшей мере на 48%, по меньшей мере на 50, 40-50, 42-48 или 44-46% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). В соответствии с определенными вариантами осуществления биомаркер (например, VCAM-1, ICAM-1, P-NF-kB, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1) измеряют в легком. В соответствии с определенными вариантами осуществления биомаркер (например, VCAM-1, ICAM-1, P-NF-kB, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1) измеряют в почке.

В соответствии по меньшей мере с указанными выше вариантами осуществления в отношении лечения повреждения легкого или сосудистого воспаления, ассоциированного с SCD, VOC, ALI и/или ARDS, введение ADAMTS13 может быть эффективным для предупреждения активации или повышенной экспрессии или повышенного уровня по меньшей мере одного из VCAM-1 и ICAM-1 и/или для снижения

экспрессии или уровня по меньшей мере одного из ET-1, TXAS и HO-1. См. фиг. 2B и 2C. Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии или уровня TXAS или ET-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 68%, по меньшей мере на 71%, по меньшей мере на 74%, по меньшей мере на 77%, по меньшей мере на 80, 65-80, 70-80 или 70-75% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии, или уровня, или активности ICAM-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 53%, по меньшей мере на 56%, по меньшей мере на 59%, по меньшей мере на 62%, по меньшей мере на 65, 53-65, 55-62 или 57-60% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии или уровня HO-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 46%, по меньшей мере на 47%, по меньшей мере на 48%, по меньшей мере на 49, 46-49, 47-49 или 46-48% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения соотношения P-NF-kB/NF-kB, измеренного с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 63%, по меньшей мере на 67%, по меньшей мере на 71%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 79%, по меньшей мере на 83, 63-83, 67-79 или 71-75% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). У субъекта с SCD и/или в состоянии VOC введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии, равно как и уровня или активности VCAM-1, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 42%, по меньшей мере на 44%, по меньшей мере на 46%, по меньшей мере на 48%, по меньшей мере на 50, 40-50, 42-48 или 44-46% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). В соответствии с определенными вариантами осуществления биомаркер (например, VCAM-1, ICAM-1, P-NF-kB, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1) измеряют в легком.

В соответствии по меньшей мере с указанными выше вариантами осуществления в отношении лечения повреждения почки или сосудистого воспаления, ассоциированного с SCD, VOC, ALI и/или ARDS, введение ADAMTS13 может быть эффективным для предупреждения активации и/или повышенных уровней экспрессии VCAM-1, уменьшения соотношения P-NF-kB/NF-kB и/или для снижения экспрессии или уровня по меньшей мере одного из ET-1 или TXAS. См. фиг. 3A и 3B. Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии, равно как и уровня TXAS, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 73%, по меньшей мере на 76%, по меньшей мере на 78%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 82, 70-82, 73-80 или 76-78% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения соотношения P-NF-kB/NF-kB, измеренного с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 68%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 72%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 78, 68-78, 70-75 или 72-75% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения экспрессии, или уровня, или активности VCAM-1 у субъекта с SCD или в состоянии VOC, измеренных с помощью денситометрии, например, по меньшей мере на 58%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 62%, по меньшей мере на 64%, по меньшей мере на 67, 58-67, 60-64 или 60-62% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). В соответствии с определенными вариантами осуществления биомаркер (например, VCAM-1, P-NF-kB, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1) измеряют в почке.

В соответствии по меньшей мере с приведенными выше вариантами осуществления у субъекта можно взять образец крови, например, для контроля лечения SCD, VOC, ALI, и/или ARDS, при этом измеряют одно или несколько из следующих значений гематокрита: % гематокрита (Hct) и среднего корпускулярного объема (MCV) в качестве показателей жизнеспособности эритроцитов; гемоглобина (Hb), среднего корпускулярного гемоглобина (MCH) и средней концентрации клеточного гемоглобина (CHCM) в качестве показателей способности связывать кислород; неоднородности распределения эритроцитов (HDW) в качестве показателя наличия плотных эритроцитов; количества ретикулоцитов (Retics) в качестве показателя статуса анемии; количества нейтрофилов в качестве показателя системного статуса воспаления; и/или лактатдегидрогеназы (LDH) в качестве общего маркера повреждения клеток. Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения содержания CHCM по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 6,5% или по меньшей мере на 7% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для увеличения Retics по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 11% или по меньшей мере на 13% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения (количества клеток/микролитра) нейтрофилов по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% по сравнению с контролем (например, субъектом, который не проходил лечение). Введение ADAMTS13 может быть эффективным для снижения (количества клеток/микролитра) LDH по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25% или по мень-

ветствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 снижало тромбообразование в ткани легких по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает тромбообразование в легких по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 снижало количество инфильтратов воспалительных клеток в ткани почки по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает количество инфильтратов воспалительных клеток в почке по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 60%. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 снижало тромбообразование в ткани легких по сравнению с контролем. В соответствии с определенными вариантами осуществления введение ADAMTS13 уменьшает тромбообразование в легких по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30% или по меньшей мере на 40%.

Понятно, что описываемые в настоящем документе примеры и варианты осуществления предназначены лишь для иллюстративных целей и что специалистам в настоящей области техники будут предложены различные модификации или изменения в их свете, и они должны быть включены в сущность и содержание настоящей заявки и в объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Дополнительные аспекты и детали настоящего раскрытия станут понятны из приведенных далее примеров, которые предназначены для иллюстрации, а не ограничения.

Пример 1.

ADAMTS13 предупреждал гибель мышей с SCD, подвергнутых VOC, который индуцирован смертельной гипоксией.

Поскольку острые эпизоды серповидно-клеточной анемии вызываются низким содержанием кислорода (гипоксией), этот пример был осуществлен для оценки влияния ADAMTS13 на выживаемость у модельного животного с SCD, подвергнутого гипоксии. Цель этого примера заключалась в определении, может ли рекомбинантный ADAMTS13 (rADAMTS13 (BAX930/SHP655)) защитить гуманизированных мышей с SCD, подвергнутых VOC, который индуцирован смертельной гипоксией. Ранее было продемонстрировано, что воздействие на мышей с SCD очень тяжелым, опасным для жизни стрессом в форме гипоксии/реоксигенации может быть пригодным для оценки эффективности новых терапевтических средств лечения на выживаемость мышей с SCD (Sabaa et al., JCI, 118:1924, 2008).

Эксперименты проводили на 4-6-недельных здоровых контрольных ($Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm3(HBG1,HBV)Tow}$) мышях (т.е. AA) и мышях с SCD ($Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm2(HBG1,HBV)Tow}$) (гуманизированной мышинной модели для изучения серповидно-клеточной анемии (т.е. мышей с SCD или SS)). Здоровых (AA) мышей и мышей с серповидно-клеточной анемией (SCD или SS) обрабатывали либо средой, либо rADAMTS13 дозировкой 2940 FRETs-ед./кг (~3200 ME/кг) внутривенно (iv) за 1 час до тяжелого стресса в форме гипоксии/реоксигенации (приблизительно 7% кислорода в течение 10 ч) с последующей 3-часовой реоксигенацией (приблизительно 21% кислорода), который, как ранее было показано, биологически воспроизводит повреждение органов, наблюдаемое при остром VOC у пациентов-людей с SCD. См. схожий протокол, который изложен в публикации Kalish et al. (ранее). Более конкретно, четыре группы (n=6) мышей AA и мышей с SCD обрабатывали либо средой, либо ADAMTS13 (BAX930/SHP655) (2940 FRETs-ед./кг (~3200 ME/кг)) и подвергали воздействию условий гипоксического стресса.

Обработка рекомбинантным ADAMTS13 полностью защищала мышей с SCD от гибели по сравнению с мышами с SCD, обработанными средой (смертность 0% у мышей с SCD, обработанных rADAMTS13, против 83,3% смертности у мышей с SCD, обработанных средой, при 10-часовой гипоксии; 0% смертности у мышей с SCD, обработанных rADAMTS13, против 100% смертности у мышей с SCD, обработанных средой, при 10-часовой гипоксии и последующей 3-часовой реоксигенации; $p < 0,001$) (фиг. 1). Никаких различий в выживаемости мышей не наблюдали у здоровых мышей, обработанных либо средой, либо rADAMTS13.

Из этих данных видно, что ADAMTS13 оказывал защитный эффект, в том числе увеличенную выживаемость, у модели с SCD после воздействия гипоксического стресса.

Пример 2.

ADAMTS13 уменьшает нарушения в легком, индуцированные стрессом в форме гипоксии/реоксигенации.

Цель этого примера заключалась в оценке влияния ADAMTS13 на повреждение легких и сосудистое воспаление, индуцированное стрессом в форме гипоксии/реоксигенации (H/R).

Здоровых контрольных ($Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm3(HBG1,HBV)Tow}$) мышей и мышей с SCD ($Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm2(HBG1,HBV)Tow}$) подвергали стрессу в форме гипоксии/реоксигенации (H/R), который, как было показано ранее, биологически воспроизводит острый VOC и повреждение органов, наблюдаемые при остром VOC у пациентов-людей с SCD. В частности, использовали шесть экспериментальных групп:

- (1) AA без обработки в нормальных кислородных условиях;
- (2) SS без обработки в нормальных кислородных условиях;

- (3) AA обработка средой плюс H/R;
- (4) AA обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R;
- (5) SS обработка средой плюс H/R; и
- (6) SS обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R.

В этом эксперименте условия H/R представляли собой 8% кислорода в течение 10 ч с последующим восстановлением в течение 3 ч на приблизительно 21% кислороде, экспериментальная схема, которая обычно не фатальна для мышей с SCD (Kalish et al., Haematologica, 100:870-80, 2015).

Как при нормальных кислородных условиях, так и при условиях H/R легочную транссудацию оценивали у мышей путем измерения содержания белка и количества лейкоцитов (общего количества лейкоцитов, измеряемого в количестве клеток/микролитр) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BAL).

Легочную транссудацию исследовали путем измерения содержания белка и количества лейкоцитов (т.е. числа клеток) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BAL). Как показано в табл. 1, в нормальных кислородных условиях повышенный уровень белка BAL и количества лейкоцитов в BAL были обнаружены у мышей с SCD в сравнении со здоровыми мышами, что свидетельствовало о накоплении белков и воспалительных клеток в альвеолярном пространстве. Что интересно, в ответ на H/R как уровень белка BAL, так и количество лейкоцитов в BAL были значимо увеличены как у мышей с SCD, так и у мышей AA.

Таблица 1

Результаты экспериментов по легочной транссудации, проведенных на мышах AA и мышах с SCD как в нормальных кислородных условиях, так и в гипоксических условиях

	Нормальные кислородные условия		Гипоксическое состояние (8% кислорода)			
	Мыши AA без обработки (n=6)	Мыши с SCD без обработки (n=6)	Мыши AA Среда (n=6)	Мыши AA BAX930 (n=6)	Мыши с SCD Среда (n=6)	Мыши с SCD BAX930 (n=6)
Содержание белка BAL (мг/мл)	0,9±0,03	2,5±0,05°	3,1±0,04	1,8±0,05*	5,33±0,4°	3,4±0,07*
Лейкоциты в BAL (клеток/мкл)	200±40	832±36°	567±20	328±12*	1977±54°	1198±22*

AA: HbA гомозиготные контрольные мыши или здоровые мыши;

SCD: HbS гомозиготные мыши или мыши с серповидными клетками; и

BAL: бронхоальвеолярный лаваж;

*P<0,05 по сравнению с мышами, обработанными средой;

°P<0,05 по сравнению с мышами AA.

Из данных видно, что у мышей с SCD было значимое увеличение периферических нейтрофилов (клеток/микролитр) по сравнению с мышами AA; однако обработка посредством ADAMTS13 значимо снижала количество нейтрофилов. Из данных также видно, что мыши с SCD имели большее количество лейкоцитов (общее количество лейкоцитов (клеток/микролитр) в бронхоальвеолярном лаваже (BAL)) и большее содержание белка лейкоцитов (белок BAL (мг/мл) в бронхоальвеолярном лаваже) по сравнению с контролями, что свидетельствовало о том, что мыши с SCD страдали транссудацией. Обработка посредством ADAMTS13 заметно уменьшала этот эффект (фиг. 2А и табл. 1), что свидетельствовало о том, что ADAMTS13 уменьшал системное воспаление и уменьшал нарушения при легочной сосудистой дисфункции. Эти данные свидетельствовали о том, что ADAMTS13 предупреждал индуцируемую гипоксией воспалительную васкулопатию и нарушения, вызванные легочной транссудацией, в легких у мышей с SCD во время острого вазоокклюзивного криза. Более того, ADAMTS13 значимо снижал как содержание белка BAL, так и количество лейкоцитов у мышей с SCD и мышей AA по сравнению с контрольными животными, обработанными средой, что свидетельствовало о том, что ADAMTS13 оказывал защитный эффект на легкое в гипоксических условиях.

Пример 3.

ADAMTS13 уменьшал активацию сосудов в легком, индуцированную стрессом в форме гипоксии/реоксигенации.

Для исследования эффектов ADAMTS13 на повреждение и сосудистое воспаление в легком проводили дополнительные эксперименты с теми же шестью экспериментальными группами, которые описаны в примере 2, т.е.

- (1) AA без обработки в нормальных кислородных условиях;
- (2) SS без обработки в нормальных кислородных условиях;

- (3) AA обработка средой плюс H/R;
- (4) AA обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R;
- (5) SS обработка средой плюс H/R; и
- (6) SS обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R.

В этом примере, аналогично тому, что было описано в примере 2, животным вводили среду или ADAMTS13, а затем подвергали 8% кислородному стрессу в течение 10 ч с последующим восстановлением в течение 3 ч на 21% кислороде. Дополнительные контроли (AA и SCD) также подвергали нормальным кислородным условиям без среды или ADAMTS13.

Иммуноблот-анализы со специфическими антителами к различным маркерам воспаления, вазоконстрикции и агрегации тромбоцитов (т.е. ядерному фактору каппа-B (NF-kB), эндотелину-1 (ET-1), гемоксигеназе 1 (HO-1), молекуле межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), тромбоксансинтазе (TXAS) и молекуле адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа (VCAM-1)) проводили для измерения экспрессии этих белков в легких здоровых контрольных (AA) мышей и мышей с SCD, которых обрабатывали средой или гADAMTS13 после воздействия гипоксическими (например, H/R) или нормальными кислородными условиями.

Из данных, полученных в этом примере, видно, что ADAMTS13 предупреждал индуцированную гипоксией активацию NF-kB в тканях легких мышей AA и мышей с SCD, что свидетельствовало о том, что ADAMTS13 уменьшает воспалительный процесс в легких, запускаемый гипоксией (фиг. 2B). В легких мышей с SCD в условиях гипоксии ADAMTS13 предупреждал активацию VCAM-1 и ICAM-1, маркеров сосудистой активации и воспалительной васкулопатии, и уменьшал экспрессию эндотелина-1 (ET-1), тромбоксансинтазы (TXAS) и гемоксигеназы-1 (HO-1) (фиг. 2C).

В табл. 2 приведены денситометрические значения, полученные с помощью иммуноблот-анализа со специфическими антителами к ядерному фактору каппа-B (NF-kB) и его активированной формы (P-NF-kB), эндотелину 1 (ET-1), гемоксигеназе 1 (HO-1), молекуле межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), тромбоксансинтазе (TXAS) и молекуле адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа (VCAM-1) в легких у здоровых контрольных (AA) мышей и мышей с серповидно-клеточной анемией (SCD), которых обрабатывали либо средой, либо гADAMTS13 и подвергали нормальным кислородным условиям или стрессу в форме гипоксии/реоксигенации.

Как показано в табл. 2, в нормальных кислородных условиях для всех измеряемых белковых маркеров (кроме ICAM-1) наблюдали повышенную экспрессию белка у мышей с SCD по сравнению с мышами AA. В гипоксических условиях дополнительно имела место повышенная экспрессия всех измеряемых маркеров как у здоровых контролей, так и у мышей с SCD. Однако обработка посредством ADAMTS13 (т.е. BAX930/SHP655) имела защитный эффект у мышей AA и мышей с SCD, о чем свидетельствовали более низкие уровни всех маркеров воспаления, вазоконстрикции и агрегации тромбоцитов.

Таблица 2

	Нормальные кислородные условия		Гипоксическое состояние (8% кислорода)			
	Мыши AA без обработки (n=6)	Мыши с SCD без обработки (n=6)	Мыши AA Среда (n=6)	Мыши AA BAX930 (n=6)	Мыши с SCD Среда (n=6)	Мыши с SCD BAX930 (n=6)
TXAS (DU)	0,9±0,09	2±0,025°	2,4±0,05	0,7±0,04*	3,7±0,05°	0,8±0,034*
ET-1 (DU)	0,55±0,06	1,65±0,07°	1,7±0,025	0,4±0,042*	2±0,06°	0,6±0,03*
VCAM-1 (DU)	0,5±0,03	1,4±0,07°	2,1±0,04	2,0±0,02	3,2±0,09°	1,8±0,03*
ICAM-1 (DU)	0,8±0,03	0,9±0,07	1,7±0,045	0,75±0,04*	2,3±0,081°	0,85±0,07*
HO-1 (DU)	0,4±0,06	1,1±0,03°	2,8±0,02	1,5±0,07*	3,0±0,04	1,44±0,09*
Соотношение P-NF-kB / NF-kB (DU)	0,8±0,03	1,6±0,08°	2±0,6	0,7±0,05*	3,8±0,34°	0,6±0,03*

AA: HbA гомозиготные контрольные мыши или здоровые мыши;

SCD: HbS гомозиготные мыши или мыши с серповидными клетками;

TXAS: тромбоксансинтаза; ET-1: эндотелин 1;
 VCAM-1: молекула адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа;
 ICAM-1: молекула межклеточной адгезии-1;
 HO-1: гемоксигеназа 1;
 P-NF-kB: фосфо-ядерный фактор каппа-B; и
 NF-kB: ядерный фактор каппа-B;
 *P<0,05 по сравнению с мышами, обработанными средой;
 °P<0,05 по сравнению с мышами AA.

Рекомбинантный ADAMTS13 заметно снижал уровни экспрессии каждого из тестируемых белковых маркеров у мышей с SCD (т.е. по сравнению с мышами с SCD, которых обрабатывали средой) (табл. 2). Кроме того, рекомбинантный ADAMTS13 снижал экспрессию в легких всех тестируемых белковых маркеров за исключением VCAM-1 у здоровых контрольных (AA) мышей (т.е. по сравнению с контрольными мышами, которых обрабатывали средой).

Эти данные свидетельствовали о том, что ADAMTS13 предупреждал индуцируемую гипоксией воспалительную васкулопатию и нарушения, вызванные легочной транссудацией, в легких у мышей с SCD во время острого вазоокклюзивного криза. Кроме того, ADAMTS13 предупреждал индуцируемую гипоксией повышенную экспрессию мощных модуляторов тонуса сосудов, таких как ET-1 и TXAS, для обоих из которых было показано, что они являются факторами, способствующими дисфункции сосудов, описанной при SCD во время острых эпизодов. Более того, из данных также видно, что ADAMTS13 оказывал защитный эффект на ткань легких у здоровых животных, подверженных гипоксическим условиям. Таким образом, данные свидетельствовали о том, что ADAMTS13 уменьшает активацию сосудов и воспалительные реакции, связанные с гипоксическим стрессом в легких мышей с SCD и здоровых мышей.

Пример 4.

ADAMTS13 уменьшает активацию сосудов в почке, индуцированную стрессом в форме гипоксии/реоксигенации.

Для исследования эффектов ADAMTS13 на повреждение и сосудистое воспаление в почке проводили дополнительные эксперименты с теми же шестью экспериментальными группами, которые описаны в примере 2, т.е.

- (1) AA без обработки в нормальных кислородных условиях;
- (2) SS без обработки в нормальных кислородных условиях;
- (3) AA обработка средой плюс H/R;
- (4) AA обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R;
- (5) SS обработка средой плюс H/R; и
- (6) SS обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R.

В этом примере, аналогично тому, что было описано в примерах 2 и 3, животным вводили средой или ADAMTS13, а затем подвергали 8% кислородному стрессу в течение 10 ч с последующим восстановлением в течение 3 ч на приблизительно 21% кислороде, что, как было показано ранее, биологически воспроизводит острый VOC и повреждение органов, наблюдаемое при остром VOC у пациентов-людей с SCD. Дополнительные контроли (AA и SCD) также подвергали нормальным кислородным условиям без среды или ADAMTS13.

Иммуноблот-анализы со специфическими антителами к NF-kB и его активированной формы, P-NF-kB, а также ET-1, TXAS и VCAM-1 проводили для измерения экспрессии этих белков в почках у мышей AA и мышей с SCD, которых обрабатывали либо средой, либо rADAMTS13.

В табл. 3 приведены денситометрические значения, полученные с помощью иммуноблот-анализа со специфическими антителами к ядерному фактору каппа-B (NF-kB) и его активированной формы (P-NF-kB), эндотелин 1 (ET-1), тромбоксансинтазе (TXAS) и молекуле адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа (VCAM-1) в почках у здоровых контрольных (AA) мышей и мышей с серповидно-клеточной анемией (SCD), которых обрабатывали либо средой, либо rADAMTS13 и подвергали нормальным кислородным условиям или гипоксическим (стрессу в форме гипоксии/реоксигенации) условиям. Как можно видеть из табл. 3, в нормальных кислородных условиях уровни всех белковых маркеров были выше у мышей с SCD, чем у мышей AA. В гипоксических условиях уровни экспрессии всех белковых маркеров, кроме VCAM-1, дополнительно повышались как у мышей с SCD, так и у мышей AA.

Таблица 3

	Нормальные кислородные условия		Гипоксическое состояние (8% кислорода)			
	Мыши AA без обработки (n=6)	Мыши с SCD без обработки (n=6)	Мыши AA Среда (n=6)	Мыши AA BAX930 (n=6)	Мыши с SCD Среда (n=6)	Мыши с SCD BAX930 (n=6)
TXAS (DU)	0,6±0,05	0,97±0,03°	1,8±0,07	0,4±0,022*	2,5±0,041°	0,6±0,02*
ET-1 (DU)	0,5±0,051	0,98±0,05°	1,1±0,012	0,99±0,02	1,5±0,03°	1,4±0,02
VCAM-1 (DU)	1,1±0,02	1,9±0,06°	1,05±0,08	0,9±0,05	2,1±0,08°	0,8±0,03*
Соотношение P-NF-kB / NF-kB (DU)	0,4±0,02	1,5±0,045°	2,4±0,08	0,6±0,055*	2,3±0,023	0,7±0,08*

AA: HbA гомозиготные контрольные мыши или здоровые мыши;

SCD: HbS гомозиготные мыши или мыши с серповидными клетками;

TXAS: тромбоксансинтаза;

ET-1: эндотелин 1;

VCAM-1: молекула адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа;

P-NF-kB: фосфо-ядерный фактор каппа-B; и

NF-kB: ядерный фактор каппа-B;

*P<0,05 по сравнению с мышами, обработанными средой;

°P<0,05 по сравнению с мышами AA.

Из данных, полученных в этом примере, видно, что ADAMTS13 предупреждал индуцированную гипоксией активацию NF-kB в почках мышей AA и мышей с SCD, а также у мышей с SCD в нормальных кислородных условиях (табл. 3 и фиг. 3А). У подвергнутых гипоксии мышей с SCD имела место повышенная экспрессия VCAM-1, ET-1 и TXAS. ADAMTS13 предупреждал индуцируемую гипоксией повышенную экспрессию VCAM-1 и TXAS в почках у обеих линий мышей и уровни ET-1 в почках у мышей AA (табл. 3 и фиг. 3В).

Эти данные свидетельствовали, что ADAMTS13 предупреждал индуцируемую гипоксией повышенную экспрессию мощных модуляторов тонуса сосудов или факторов, способствующих дисфункции сосудов, описанной при SCD во время острых эпизодов.

Данные свидетельствовали о том, что ADAMTS13 уменьшает активацию сосудов и воспалительные реакции, связанные с гипоксическим стрессом в почках мышей с SCD и здоровых мышей. Из этого примера видно, что rADAMTS13 мог уменьшать такие связанные с серповидноклеточной анемией эпизоды, как вазоконстрикция и воспалительная васкулопатия в почке.

Пример 5.

ADAMTS13 уменьшает интенсивность нарушений, индуцированных стрессом в форме гипоксии/реоксигенации, по различным гематологическим показателям.

Для исследования эффектов ADAMTS13 на различные гематологические параметры проводили дополнительные эксперименты с теми же шестью экспериментальными группами, которые описаны в примере 2, т.е.

- (1) AA без обработки в нормальных кислородных условиях;
- (2) SS без обработки в нормальных кислородных условиях;
- (3) AA обработка средой плюс H/R;
- (4) AA обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R;
- (5) SS обработка средой плюс H/R; и
- (6) SS обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс H/R.

В этом примере аналогично тому, что было описано в примерах 2-4, животным вводили среду или ADAMTS13, а затем подвергали нормальным кислородным условиям или H/R (8% кислородному стрессу в течение 10 ч с последующим восстановлением в течение 3 ч на приблизительно 21% кислороде).

Определяли следующие гематологические параметры: % гематокрита (Hct) и средний корпускулярный объем (MCV) в качестве показателей жизнеспособности эритроцитов; гемоглобин (Hb), средний корпускулярный гемоглобин (MCH) и среднюю концентрацию клеточного гемоглобина (CHCM) в качестве показателей способности связывать кислород; неоднородность распределения эритроцитов (HDW) в

качестве показателя наличия плотных эритроцитов; количество ретикулоцитов в качестве показателя статуса анемии; количество нейтрофилов в качестве показателя системного статуса воспаления; и/или лактатдегидрогеназу (LDH) в качестве общего маркера повреждения клеток.

Гематокрит представляет собой соотношение объема эритроцитов к общему объему крови. MCV представляет собой средний объем RBC. Гемоглобин является белком, ответственным за транспортировку кислорода в крови, а MCH является средним количеством гемоглобина на RBC в образце крови; CHCM отражает содержание гемоглобина в интактных RBC. Ширина распределения гемоглобина (HDW) является показателем неоднородности концентрации гемоглобина в эритроцитах. Ретикулоциты представляют собой недавно произведенные относительно незрелые эритроциты; количество ретикулоцитов отображает, достаточно ли эритроцитов вырабатывается в костном мозге. Нейтрофилы рекрутируются в место повреждения в течение нескольких минут после получения травмы; таким образом, нейтрофилы являются отличительной чертой острого воспаления, а количество нейтрофилов указывает на воспалительный статус.

В табл. 4 показаны гематологические параметры у здоровых контрольных (AA) и больных серповидно-клеточной анемией (SCD) мышей в нормальных кислородных условиях и после обработки посредством ADAMTS13 (т.е. BAX930/SHP655) или средой и воздействия стресса в форме гипоксии/реоксигенации. Как показано в табл. 4, в нормальных кислородных условиях уровни Hct и Hb были ниже, тогда как уровни MCV и HDW были выше, как и количество ретикулоцитов и количество нейтрофилов у мышей с SCD по сравнению с контрольными (AA) мышами. У здоровых контрольных мышей гипоксические условия увеличивали количество ретикулоцитов и нейтрофилов. Введение ADAMTS13 контрольным мышам уменьшало интенсивность значительного увеличения количества нейтрофилов, что свидетельствовало об уменьшении воспаления. У мышей с SCD гипоксические условия снижали Hct, Hb, MCV и MCH и увеличивали CHCM, HDW и количество нейтрофилов. Введение ADAMTS13 мышам с SCD уменьшало интенсивность снижения Hct, Hb, MCV и MCH и уменьшало интенсивность увеличения CHCM, HDW и количества нейтрофилов.

Таблица 4

	Нормальные кислородные условия		Гипоксическое состояние (8% кислорода)			
	Мыши AA без обработки (n=6)	Мыши с SCD без обработки (n=6)	Мыши AA Среда (n=6)	Мыши AA BAX930 (n=5)	Мыши с SCD Среда (n=6)	Мыши с SCD BAX930 (n=5)
Hct (%)	46,3±0,95	35,6±1,6°	45,3±0,8	44,3±0,4	15,8±2,3°	27,9±0,8*
Hb (г/дл)	13,8±1,3	8,7±0,51°	13,4±0,1	13,1±0,5	5,99±0,5°	7,4±0,5*
MCV (фл)	37,9±0,2	50,9±1,8°	38,3±0,3	38,5±0,3	41,3±1,7°	51,2±1,8*
MCH (г/дл)	12,0±0,5	11,8±1,2	12,0±0,4	11,2±0,2	9,1±0,2°	9,7±0,4
CHCM (г/дл)	25,2±0,1	25,1±0,4	25,1±0,6	23,3±0,9	26,8±0,3°	24,8±0,2*
HDW (г/дл)	2,88±0,03	4,72±0,08°	2,86±0,03	2,9±0,04	5,63±0,06°	4,78±0,04*
Retics (%)	7,22±0,5	43,1±11°	8,59±0,7	9,6±0,21	42,1±12°	45±2,9
Нейтрофилы (клеток/мкл)	841±135	3251±488°	3600±120	1768±299*	6800±250°	4399±133*
LDH (ед./л)	288±12	573±30°	293±15	277±26	1234±81°	852±19*

AA: HbA гомозиготные контрольные мыши или здоровые мыши;

SCD: HbS гомозиготные мыши или мыши с серповидно-клеточной анемией;

Hct: гематокрит;

Hb: гемоглобин;

MCV: средний корпускулярный объем;

MCH: средний корпускулярный гемоглобин;

CHCM: концентрация клеточного гемоглобина;

HDW: неоднородность распределения эритроцитов;

Retics: ретикулоциты; и

LDH: лактатдегидрогеназа;

*P<0,002 по сравнению с мышами, обработанными средой;

°P<0,005 по сравнению с мышами АА.

Пример 6.

ADAMTS13 уменьшает интенсивность нарушений, индуцированных стрессом в форме гипоксии/реоксигенации, по различным гистопатологическим показателям

Для исследования эффектов ADAMTS13 на различные гистопатологические параметры проводили дополнительные эксперименты с четырьмя экспериментальными группами:

(1) АА обработка средой плюс Н/Р;

(2) АА обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс Н/Р;

(3) SS обработка средой плюс Н/Р; и

(4) SS обработка ADAMTS13 (BAX930/SHP655) плюс Н/Р.

В этом примере животным вводили среду или ADAMTS13, а затем подвергали условиям Н/Р (8% кислородному стрессу в течение 10 ч с последующим восстановлением в течение 3 ч на приблизительно 21% кислороде).

Легкие и почки собирали после 3-часовой реоксигенации. Анализировали патологию легких и почек и определяли инфильтрат воспалительных клеток и наличие тромбов.

Из результатов гистологического анализа было видно, что Н/Р стресс индуцировал серьезное повреждение тканей, связанное с SCD, как в легком, так и в почке мышей с SCD. В легком Н/Р индуцировал инфильтрацию воспалительных клеток и тромбообразование у всех мышей с SCD (табл. 5). У мышей АА Н/Р индуцировал умеренную инфильтрацию воспалительных клеток и некоторое тромбообразование у незначительного количества мышей. У мышей с SCD ADAMTS13 (BAX930/SHP655) уменьшал количество инфильтрата воспалительных клеток и тромбообразование по сравнению с мышами с SCD, которые были обработаны средой. У мышей АА ADAMTS13 (BAX930/SHP655) уменьшал количество инфильтрата воспалительных клеток в легком. В почке Н/Р индуцировал инфильтрацию воспалительных клеток и появление тромбов у всех мышей с SCD. У мышей АА Н/Р индуцировал ограниченную инфильтрацию воспалительных клеток с незначительным тромбообразованием у малого количества мышей. ADAMTS13 (BAX930/SHP655) уменьшал количество инфильтратов воспалительных клеток в почке у подвергнутых Н/Р мышей с SCD, что также влияло на тромбообразование. У мышей АА ADAMTS13 (BAX930/SHP655) уменьшал количество инфильтратов воспалительных клеток без каких-либо эффектов на тромбообразование (табл. 5).

Таблица 5

	Мыши АА		Мыши с SCD	
	Н/Р, среда	Н/Р, BAX930	Н/Р, среда	Н/Р, BAX930
Легкое	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=4)
<i>Инфильтраты воспалительных клеток</i>	+ (4/5)	+ (2/5)	+ (2/5) ++ (3/5)	+ (1/4)
<i>Тромбы</i>	+ (2/5) 2,5 на область наблюдения	+ (5/5) 2,2 на область наблюдения	+ (5/5) 3 на область наблюдения	+ (1/4) 3 на область наблюдения
Почка	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=4)
<i>Инфильтраты воспалительных клеток</i>	+ (2/5)	+ (1/5)	+ (2/5) ++ (1/5)	0
<i>Тромбы</i>	+ (4/5) 3,8 на область наблюдения	+ (5/5) 3,2 на область наблюдения	+ (5/5) 5 на область наблюдения	+ (4/4) 2,5 на область наблюдения

Н/Р: стресс в форме гипоксии/реоксигенации; наличие тромбов на область 250× увеличения, приведенное в цифрах; наличие инфильтратов воспалительных клеток на область увеличения (250× в случае ткани легких, 400× в случае почек): + 1-10 клеток на область увеличения; ++ 10-50 клеток на область увеличения; количество животных с обнаруженными результатами указаны в скобках.

Пример 7.

ADAMTS13 уменьшает повреждение органов у субъектов, страдающих гипоксемией, и у субъектов с риском развития ARDS.

Было продемонстрировано, что ADAMTS13 уменьшает повреждение органа-мишени на мышинной модели тяжелой гипоксемии (8% кислорода в течение 10 ч с последующим 3-часовым восстановлением на приблизительно 21% кислороде). Поскольку серьезное гипоксемическое повреждение является фактором, способствующим развитию патофизиологии, наблюдаемой у пациентов, страдающих острым повреждением легкого (ALI) и острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS) (ALI/ARDS), была выдвинута гипотеза, что введение ADAMTS13 пациентам, которые либо подвержены риску развития или у которых уже развились ALI и/или ARDS (ALI/ARDS), сможет предупредить, вылечить или уменьшить интенсивность патологического процесса и привести к улучшению результатов, таких как выживание, долгосрочное функционирование легких и предотвращение повреждения другого органа-мишени.

Мышам вводили LPS либо непосредственно в легкие посредством внутритрахеальной инъекции или ингаляции, либо внутривентриально или внутривенно, чтобы вызвать системный воспалительный ответ. У мышей, обработанных внутритрахеальным LPS, имела место острая и интенсивная миграция воспалительных клеток в легкое с разрешением к 48 ч. Внутривентриальный LPS активирует системное воспаление и связан с умеренным повреждением легких. Это повреждение можно было усилить либо повторными инъекциями LPS, либо имплантацией помпы с LPS в брюшную полость для непрерывного высвобождения LPS в течение нескольких часов или даже дней.

ADAMTS13 вводили дозами, составлявшими приблизительно 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 и 3000 международных единиц на килограмм массы тела, перед обработкой посредством LPS и через 12, 24, 48, 72 и 96 ч после обработки посредством LPS. Дозы ADAMTS13 вводили раз в день или раз в 12 ч подкожно или внутривенно до умерщвления субъектов для изучения воспалительного ответа в легком и повреждения органа.

Обработка посредством ADAMTS13 уменьшала воспалительный ответ, в том числе миграцию воспалительных клеток в легкие, что измеряли по уменьшенному количеству нейтрофилов, макрофагов, моноцитов, тучных клеток, эозинофилов и/или базофилов, присутствующих в легких мышей, обработанных посредством ADAMTS13. Обработка посредством ADAMTS13 также уменьшала повреждение органа, что измеряли по азоту мочевины в крови (BUN), креатинину, соотношению BUN/креатинин, тропонину, нейрон-специфической енолазе (NSE).

Настоящее изобретение было описано посредством конкретных вариантов осуществления, которые, как считается или предполагается, включают конкретные способы осуществления настоящего изобретения на практике. Для специалистов в настоящей области техники будут очевидны различные модификации и вариации описанного изобретения без отступления от объема и сущности настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение и было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявляемое изобретение не следует чрезмерно ограничивать такими конкретными вариантами осуществления. Действительно подразумевается, что в объем приведенной далее формулы изобретения должны попадать различные модификации описанных способов осуществления настоящего изобретения, которые очевидны для специалистов в соответствующих областях техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей эффективное количество дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивом тромбоспондина 1-го типа 13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, member-13 - ADAMTS13) для лечения или предупреждения вазоокклюзивного криза у субъекта, страдающего серповидноклеточной анемией.

2. Применение по п.1, предусматривающее, что композицию, содержащую ADAMTS13, вводят после появления симптомов вазоокклюзивного криза.

3. Применение по любому из пп.1 или 2, предусматривающее, что композицию, содержащую ADAMTS13, вводят до появления симптомов вазоокклюзивного криза.

4. Применение по любому из пп.1-3, предусматривающее, что ADAMTS13 уменьшает по меньшей мере одно из воспаления, вазоконстрикции, агрегации тромбоцитов или комбинации любых из них по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

5. Применение по любому из пп.1-4, предусматривающее, что ADAMTS13 приводит по меньшей мере к одному из улучшенной выживаемости, улучшенного функционирования легкого, уменьшенного повреждения органа, уменьшенной легочной транссудации или комбинации любых из них по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

6. Применение по любому из пп.1-5, предусматривающее, что ADAMTS13 уменьшает и/или предупреждает развитие по меньшей мере одного из нарушения кровотока, свертывания крови, сосудистого воспаления, тромбоза, ишемического повреждения клеток или повреждения органа или комбинации любых из них по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

7. Применение по любому из пп.1-6, предусматривающее, что ADAMTS13 уменьшает и/или предупреждает развитие по меньшей мере одного из нарушения кровотока, свертывания крови, сосудистого воспаления, тромбоза, ишемического повреждения клеток или повреждения органа или комбинации любых из них по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

преждает боль или тяжесть боли по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

8. Применение по любому из пп.1-7, предусматривающее, что ADAMTS13 уменьшает частоту возникновения VOC и/или продолжительность приступов VOC по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

9. Применение по любому из пп.1-8, предусматривающее, что ADAMTS13 уменьшает экспрессию, уровень и/или активацию по меньшей мере одного из VCAM-1, ICAM-1, P-NF-kB, NF-kB, ET-1, TXAS и HO-1 в органе по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

10. Применение по любому из пп.1-9, предусматривающее, что ADAMTS13 увеличивает уровень по меньшей мере одного из Hct, Hb, MCV и MCH в крови по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

11. Применение по любому из пп.1-10, предусматривающее, что ADAMTS13 уменьшает уровень по меньшей мере одного из CHCM, HDW, LDH и количества нейтрофилов в крови по сравнению с контрольным субъектом при отсутствии лечения.

12. Применение по любому из пп.1-11, предусматривающее, что терапевтически эффективное количество ADAMTS13 составляет от 20 до 6000 международных единиц на килограмм массы тела.

13. Применение по любому из пп.1-12, предусматривающее, что терапевтически эффективное количество ADAMTS13 составляет от 20 до 4000 международных единиц на килограмм массы тела.

14. Применение по любому из пп.1-13, предусматривающее, что терапевтически эффективное количество ADAMTS13 составляет от 20 до 3000 международных единиц на килограмм массы тела.

15. Применение по любому из пп.1-14, предусматривающее, что терапевтически эффективное количество ADAMTS13 составляет от 20 до 500 международных единиц на килограмм массы тела.

16. Применение по любому из пп.1-15, предусматривающее, что композицию, содержащую ADAMTS13, вводят однократной болюсной инъекцией раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, раз в день, раз в 12 ч, раз в 8 ч, раз в 6 ч, раз в 4 ч или раз в 2 ч.

17. Применение по любому из пп.1-16, предусматривающее, что композицию, содержащую ADAMTS13, вводят внутривенно или подкожно.

18. Применение по любому из пп.1-17, предусматривающее, что ADAMTS13 является рекомбинантным ADAMTS13.

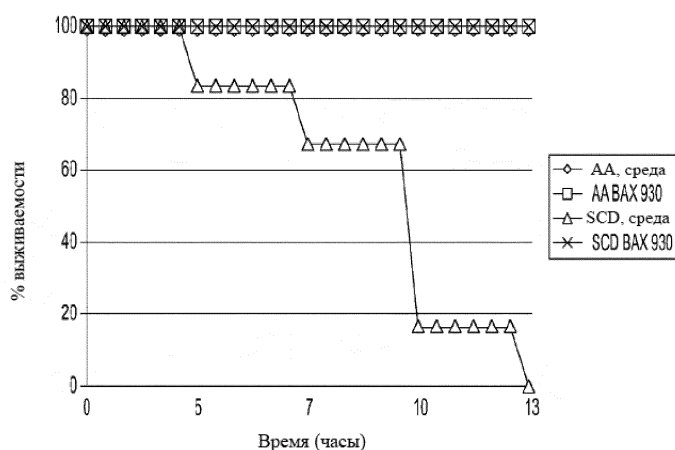
19. Применение по любому из пп.1-17, предусматривающее, что ADAMTS13 получен из плазмы крови.

20. Применение по любому из пп.1-19, предусматривающее, что субъектом является млекопитающее.

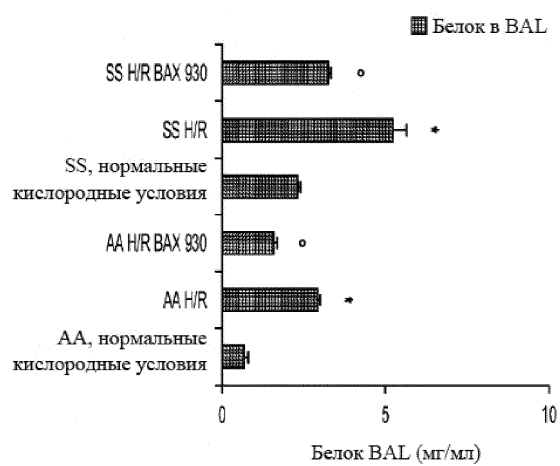
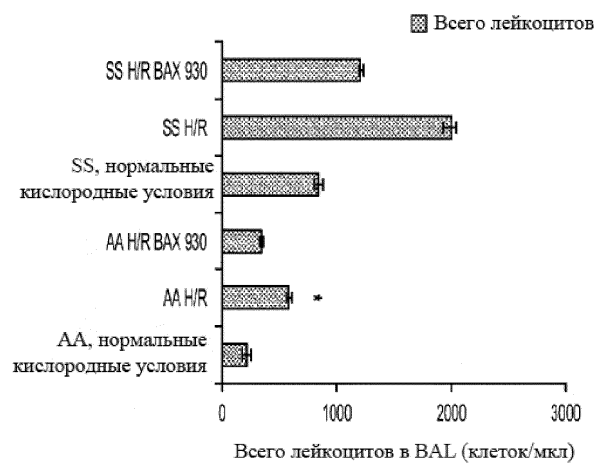
21. Применение по любому из пп.1-20, предусматривающее, что субъектом является человек.

22. Применение по любому из пп.1-21, предусматривающее, что композиция находится в стабильном водном растворе, готовом для введения.

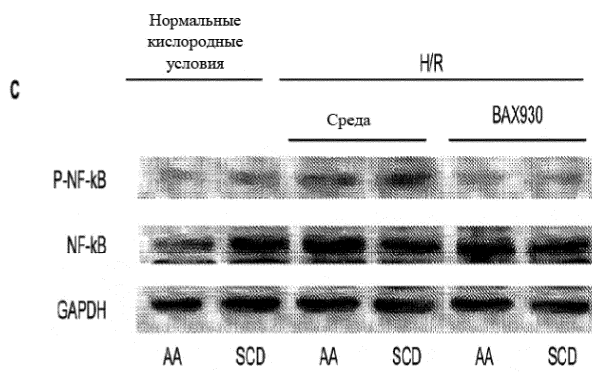
23. Применение по любому из пп.1-22, предусматривающее, что композицию, содержащую терапевтически эффективное количество ADAMTS13, вводят субъекту в пределах 48 ч после начала вазоокклюзивного криза.



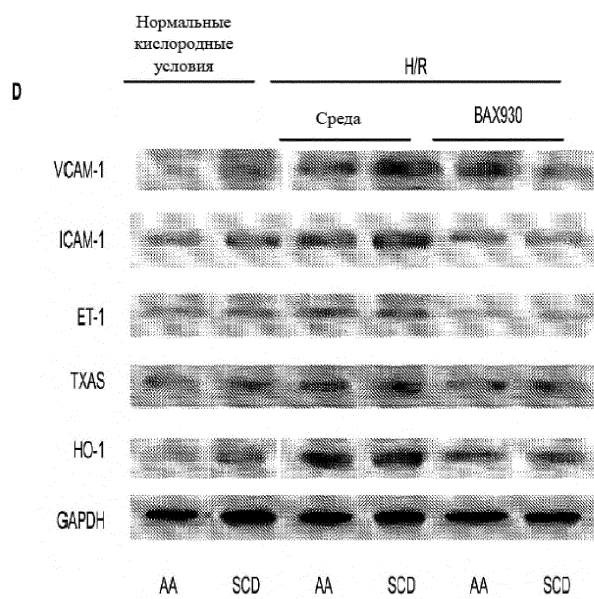
Фиг. 1



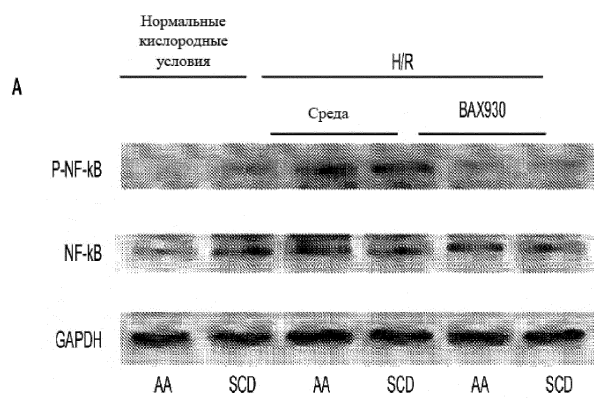
Фиг. 2А



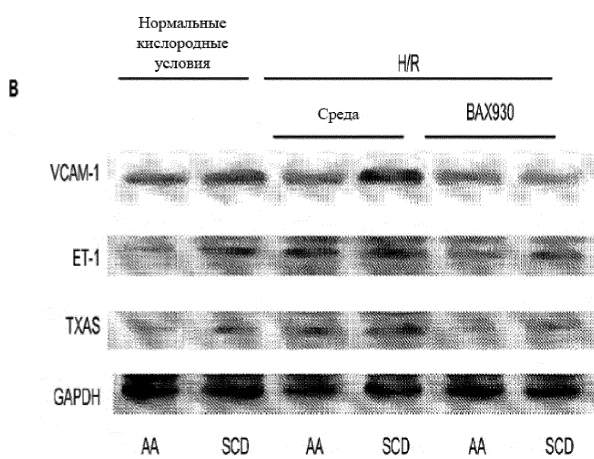
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 3А



Фиг. 3В

