

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034214**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.01.17**

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201301107**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.03.30**

---

(54) **ВЫДЕЛЕННОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, КОТОРЫЙ СВЯЗЫВАЕТСЯ С ЭПИТОПОМ ИНГИБИТОРА ПУТИ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ ЭТОЙ КОМПОЗИЦИИ И КОДИРУЮЩАЯ АНТИТЕЛО МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

---

(31) **61/471,101**

(32) **2011.04.01**

(33) **US**

(43) **2014.11.28**

(86) **PCT/US2012/031538**

(87) **WO 2012/135671 2012.10.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАЙЕР ХЕЛФКЕА ЛЛК (US)**

(56) **WO-A1-20100072691**

UniProt submission P10646, TFPI1 HUMAN,  
01 July 1989 [online]. [Retrieved on 2012-06-11].  
Retrieved from the internet <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10646.txt?version=151>>  
**WO-A2-2010017196**

(72) Изобретатель:  
**Ван Чжучжи, Мёрфи Джон (US),  
Марквардт Тобиас, Мосмайер Дитер  
(DE)**

(74) Представитель:  
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,  
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,  
Кузнецова Е.В. (RU)**

---

(57) Объектом данного изобретения является выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека, а именно с эпитопом, содержащим по крайней мере один остаток, выбранный из группы, включающей Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1, и выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая его. Кроме того, описаны фармацевтическая композиция, которая включает анти-TFPI моноклональное антитело, и способ сокращения времени кровотечения.

---

**034214 B1**

**034214 B1**

### Область воплощений

Предложено выделенное моноклональное антитело и его фрагменты, которые связывают ингибитор пути тканевого фактора человека (TFPI).

#### Предпосылки создания изобретения

Коагуляция крови представляет собой процесс, с помощью которого кровь формирует стабильные сгустки для того, чтобы остановить кровотечение. В процесс вовлечены ряд проферментов и профакторов (или "факторов коагуляции"), которые циркулируют в крови. Эти проферменты и профакторы взаимодействуют с помощью нескольких путей, проходя через которые они превращаются, либо последовательно, либо одновременно в активированную форму. В конечном итоге, процесс приводит к активации протромбина до тромбина с помощью активированного фактора X (FXa) в присутствии фактора Va, ионов кальция и тромбоцитов. Активированный тромбин, в свою очередь, индуцирует агрегацию тромбоцитов и превращает фибриноген в фибрин, который потом перекрестно связывается с помощью активированного фактора XIII (FXIIIa) с образованием сгустка.

Процесс, который приводит к активации фактора X, может осуществляться с помощью двух различных путей: контактного пути активации (который ранее был известен как внутренний путь) и пути тканевого фактора (который ранее был известен как наружный путь). Ранее предполагалось, что каскад коагуляции состоит из двух путей равной важности, которые объединены общим путем. В настоящий момент известно, что первичный путь инициации коагуляции крови представляет собой путь тканевого фактора.

Фактор X может быть активирован с помощью тканевого фактора (TF) в комбинации с активированным фактором VII (FVIIa). Комплекс фактора VIIa и его кофактора TF представляет собой мощный инициатор каскада свертывания.

Путь тканевого фактора коагуляции подвергается негативному контролю с помощью ингибитора пути тканевого фактора ("TFPI"). TFPI представляет собой природный, зависимый от FXa ингибитор комплекса FVIIa/TF с обратной связью. Он является представителем мультивалентных ингибиторов серин-протеазы типа Кунитца. Физиологически TFPI связывается с активированным фактором X (FXa) с образованием гетеродимерного комплекса, который последовательно взаимодействует с комплексом FVIIa/TF, вызывая ингибирование его активности и выключая, таким образом, путь тканевого фактора коагуляции. В принципе, блокирование активности TFPI может восстанавливать активность FXa и FVIa/TF, удлиняя, таким образом, длительность действия пути тканевого фактора и повышая образование FXa, что представляет собой общий недостаток при гемофилии A и B. Действительно, некоторое предварительное экспериментальное подтверждение продемонстрировало, что блокирование активности TFPI с помощью антител против TFPI нормализует удлиненное время коагуляции или укорачивает время свертывания. Например, Nordfang и др. показали, что удлиненное протромбиновое время с разведённым тромбопластином плазмы крови больных гемофилией нормализуется после обработки плазмы крови антителами к TFPI (Thromb. Haemost, 1991, 66(4): 464-467). Подобно этому, Erhardtsen и др. показали, что время кровотечения на модели гемофилии A при использовании кроликов значительно укорачивалось с помощью анти-TFPI антител (Blood coagulation and Fibrinolysis, 1995, 6: 388-394). Эти исследования дают возможность предположить, что ингибирование TFPI с помощью анти-TFPI антител может быть полезным для лечения гемофилии A или B. В этих исследованиях использовали только поликлональное анти-TFPI антитело. При использовании методик гибридом были получены и идентифицированы моноклональные антитела против рекомбинантного человеческого TFPI (rhTFPI). Смотри Yang и др., Chin. Med. J., 1998, 111(8): 718-721. При этом исследовали влияние моноклонального антитела на протромбиновое время с разведённым тромбопластином (PT) и активированное парциальное тромбопластиновое время (APTT). Эксперименты показали, что анти-TFPI моноклональное антитело укорачивает протромбиновое время разведённой тромбопластином плазмы крови, имеющей недостаток фактора IX. Это дает возможность предположить, что путь тканевого фактора играет важную роль не только в физиологическом свертывании крови, но также и при геморрагиях и гемофилии (Yang и др., Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1997, 22(4): 297-300). В соответствии с этим, антитела, специфические для TFPI, необходимы для лечения гематологических заболеваний и рака.

В общем случае терапевтические антитела для лечения заболеваний человека были получены при использовании генетической инженерии. Мышиные моноклональные антитела обладают ограниченным применением в качестве терапевтических агентов по причине короткого времени полураспада в сыворотке крови, неспособности запускать эффекторные функции человека (Brekke и Sandlie, "Therapeutic Antibodies for human diseases at the Dawn of the Twenty-first Century," Nature 2, 53, 52-62, Jan. 2003). Хирургические антитела обеспечивают повышение ответов на человеческое антитело. Гуманизированные антитела дополнительно минимизируют мышинный компонент антител. Однако полное человеческое антитело не имеет иммуногенности, ассоциированной с мышинными элементами. Таким образом, существует потребность в разработке полноразмерных человеческих антител для устранения иммуногенности, ассоциированной с другими формами генетически сконструированных моноклональных антител. В частности, постоянное профилактическое лечение, как это требуется в случае лечения гемофилии с помощью анти-TFPI моноклонального антитела, имеет высокий риск развития иммунного ответа на терапию в слу-

чае, если используется антитело с мышинным компонентом, или антитело, которое имеет происхождение от мыши, из-за режима частого дозирования и длительности терапии.

Например, терапия гемофилии А с помощью антител может требовать еженедельного дозирования для продолжения жизни пациента. Это приводит к непрерывной стимуляции иммунной системы. Таким образом, существует потребность в полноразмерном человеческом антителе для осуществления терапии с помощью антител для лечения гемофилии и родственных врожденных и приобретенных пороков и дефектов коагуляции.

Терапевтические антитела были созданы с помощью гибридной технологии, описанной Koehler и Milstein в "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity," Nature 256, 495-497 (1975). Полноразмерные человеческие антитела могут также быть получены рекомбинантно в прокариотах и эукариотах. Рекомбинантная продукция антител в клетке хозяине по сравнению с их продукцией при использовании гибридом более предпочтительна для терапевтического антитела. Рекомбинантная продукция имеет преимущества в отношении большей однородности продукта, а также более высокого выхода продукции, и контролируемого производства, которое минимизирует или устраняет присутствие животных белков. По этой причине желательно получать рекомбинантное моноклональное анти-TFPI антитело. В дополнение к этому, поскольку TFPI связывается с активированным фактором X (FXa) с высокой аффинностью, эффективное анти-TFPI антитело должно иметь сравнимую аффинность. Таким образом, желательно иметь анти-TFPI антитело, обладающее связывающей аффинностью, которое может конкурировать со связыванием с TFPI/FXa.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Первым объектом данного изобретения является выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека, а именно с эпитопом, содержащим по крайней мере один остаток, выбранный из группы, включающей Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: легкую цепь, включающую Fab-фрагмент, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, включающую Fab-фрагмент, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте осуществления этого изобретения выделенное моноклональное антитело связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO: 1 или же с эпитопом, содержащим по меньшей мере остатки Ile105 и Asp102 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом предпочтительном варианте указанное выделенное моноклональное антитело связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере остатки Ile105, Asp102 и Leu131 последовательности SEQ ID NO: 1, или же с эпитопом, дополнительно содержащим один или более остатков, выбранных из группы, включающей Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, в наиболее предпочтительном варианте выделенное моноклональное антитело связывается с эпитопом, дополнительно содержащим по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, включающей Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1, с эпитопом, содержащим по меньшей мере остаток Pro34 последовательности SEQ ID NO: 1 или с эпитопом, содержащим по меньшей мере остатки Pro34 и Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1. В самом предпочтительном варианте оно связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере остатки Pro34, Lys36 и Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1 или же с эпитопом, дополнительно содержащим один или более остатков, выбранных из группы, включающей Asp31, Asp32, Gly33, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1.

Вторым объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для лечения нарушений коагуляции, включающая терапевтически эффективное количество указанного моноклонального антитела и фармацевтически приемлемый носитель. Еще одним объектом изобретения также является способ сокращения времени кровотечения, который включает введение терапевтически эффективного количества указанной фармацевтической композиции пациенту.

И наконец предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует заявленное моноклональное антитело.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 показывает образование комплекса Fab А и домена 2 TFPI Кунитца с помощью эксклюзионного анализа размеров.

Фиг. 2 показывает графическое изображение взаимодействия между ингибитором пути тканевого фактора человека и его антителом (Fab А). Fab А с обозначенными переменными областями легкой ( $V_L$ ) и тяжелой ( $V_H$ ) цепей, представленными в виде нижней структуры. Домен 2 Кунитца (KD2) TFPI представлен как верхняя структура. Фиг. 3 показывает ключевые остатки эпитопа Asp102 (D102), Ile105 (I105), Arg107 (R107), Cys106-Cys130 дисульфидный мостик и связывание TFPI на поверхности Fab А. Фиг. 4 показывает взаимное расположение TFPI - Fab А комплекса и связанного с трипсином домена Кунитца 2 (KD2), а также демонстрирует исключение одновременного связывания TFPI с фактором Ха и

Fab A. KD2 и Fab A представлены в графическом изображении, трипсин показан как просвечивающаяся поверхность. Также показано стерическое несоответствие Fab A и трипсина.

Фиг. 5 показывает образование комплекса Fab B с доменом 1+2 Кунитца TFPI при использовании эксклюзионного анализа размеров.

Фиг. 6 показывает два графических изображения, демонстрирующие взаимодействие между ингибитором пути тканевого фактора человека и его антителом (Fab B) в первом ракурсе и в другом ракурсе, повернутом на 90 градусов относительно первого ракурса. Fab B с обозначенными переменными областями легкой ( $V_L$ ) и тяжелой ( $V_H$ ) цепей представлен в виде нижней структуры фиг. (закрашен серым цветом). Домен 1 Кунитца (KD1) TFPI представлен в белом цвете, а домен 2 Кунитца (KD2) TFPI - в черном цвете.

Фиг. 7 показывает ключевые остатки эпитопа Asp31 (D31), Asp32 (D32), Pro34 (P34), Lys36 (K36), Glu60 (E60), Cys35-Cys59 дисульфидный мостик и связывание домена Кунитца 1 TFPI на поверхности Fab B. Также представлено связывание домена 2 Кунитца.

Фиг. 8 показывает два угла поля изображения связывания и взаимодействия остатков эпитопа Glu100 (E100), Glu101 (E101), Pro103 (P103), Ile105 (I105), Arg107 (R107), Tyr109 (Y109) домена Кунитца 2 с Fab B. Arg107 взаимодействует с Gly33 (G33) и Cys35 (C35) домена Кунитца 1.

Фиг. 9 показывает взаимное расположение комплекса TFPI - Fab B и комплекса BPTI, фактора VIIa и тканевого фактора, а также демонстрирует исключение одновременного связывания TFPI с фактором VIIa/тканевым фактором и Fab B. Стерическое несоответствие Fab B и фактора VIIa, а также Fab B и тканевого фактора отмечено стрелками.

Фиг. 10 показывает взаимное расположение комплекса TFPI - Fab B и связанного трипсином домена 2 Кунитца, а также демонстрирует исключение одновременного связывания TFPI с фактором Ха и Fab B. Также показано стерическое несоответствие Fab B и трипсина, и Fab B, связанного доменом 1 Кунитца, и трипсина. Фиг. 11 показывает (A) выравнивание последовательности легких и тяжелых цепей Fab A (SEQ ID NOs: 2 и 3) и Fab C (SEQ ID NOs: 6 и 7) и (B) взаимное расположение TFPI - Fab A рентгеновской структуры с моделями гомологии Fab C. (A) остатки паратопа выделены жирным шрифтом и цветом. Остаток паратопа *hc* Asn32, который отличается в Fab A и Fab C, отмечен звездочками. (B) домен Кунитца 2 (KD2) представлен как графическое изображение черным цветом. Fab представлен в виде серой полосы. Остаток паратопа *hc* Asn32 показан в виде блока.

Фиг. 12 показывает (A) выравнивание последовательности легких и тяжелых цепей Fab B (SEQ ID NOs: 4 и 5) и Fab D (SEQ ID NOs: 8 и 9) и (B) взаимное расположение TFPI - Fab B рентгеновской структуры с моделями гомологии Fab D. (A) остатки паратопа выделены жирным шрифтом и цветом. Остатки паратопа, которые отличаются в Fab B и Fab D, отмечены звездочкой. (B) домен Кунитца 1 (KD1) и домен Кунитца 2 (KD2) представлены светло-серым цветом и черным изображением, соответственно. Fab структуры представлены в виде серой полосы. Остатки паратопа, которые отличаются в Fab B и Fab C, представлены в виде блоков. Фиг. 13 показывает (A) данные поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) для Fab C и Fab D, блокирующих связывание FXa и TFPI, и (B) данные поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) для Fab C и Fab D, блокирующих связывание FVIIa/TF на TFPI.

### Подробное описание

#### Определения

Термин "ингибитор пути тканевого фактора" или "TFPI", как используется в данной заявке, относится к любому варианту, изоформе и видам гомолога человеческого TFPI, которые естественным образом экспрессируются клетками. Как используется в данной заявке, "антитело" относится к целому антителу и любому его фрагменту, которые связывают антиген (то есть, "антигенсвязывающий фрагмент") или его отдельной цепи. Термин включает молекулу иммуноглобулина полной длины (например, IgG антитело), которая существует в природе или получена с помощью рекомбинационных процессов из фрагментов гена иммуноглобулина или иммунологически активной части молекулы иммуноглобулина, такой, как фрагмент антитела, который сохраняет активность специфического связывания. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который узнается полноразмерным антителом. Например, фрагмент анти-TFPI моноклонального антитела связывается с эпитопом TFPI. Антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, которые охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и включают (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, который состоит из  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_H1$  доменов; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, бивалентный фрагмент, который включает 2 Fab фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd фрагмент, который состоит из  $V_H$  и  $C_H1$  доменов; (iv) Fv фрагмент, который состоит из  $V_L$  и  $V_H$  доменов одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward и др., (1989) Nature 341: 544-546), который состоит из  $V_H$  домена; (vi) выделенный участок, который определяет комплементарность (CDR); (vii) минитела, диатела, триатела, тетраатела, и каппатела (смотри, например, III и др., Protein Eng 1997; 10: 949-57); (viii) верблужий IgG; и (ix) IgNAR. Кроме того, несмотря на то, что эти два домена Fv фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, они могут соединяться при использовании рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет сконструировать их в виде одного белка, в котором пары участков  $V_L$  и  $V_H$  формируют

моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv); смотри, например, Bird и др. (1988) Science 242: 423-426; и Huston и др. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Такие фрагменты антитела получают при использовании традиционных методик, известных квалифицированному специалисту в данной области техники, и эти фрагменты используются таким же образом, что и интактные антитела.

Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент может охватываться термином "миметик антитела". Термин "миметик антитела" или "миметик", как используется в данной заявке, означает белок, который демонстрирует связывание, подобное антителу, но представляет собой меньшее альтернативное антитело или белок, отличный от антитела. Такой миметик антитела может включаться в каркасную структуру. Термин "каркас" относится к полипептидной платформе для конструирования новых продуктов с оптимизированными функциями и характеристиками.

Термин "эпитоп" относится участку антигена, с которым антитело специфически связывается или взаимодействует, и который указывает на то, где антиген находится в физическом контакте с антителом. В противовес этому, термин "паратоп" относится к поверхности или участку антитела, с которым специфически связывается антиген. Об эпитопах, которые характеризуются конкурентным связыванием, говорят, что они перекрываются. При этом связывание соответствующих антител является взаимоисключающим, то есть связывание одного антитела исключает одновременное связывание другого антитела. Говорят, что эпитопы являются отдельными (уникальными), если антиген способен связывать два соответствующих антитела одновременно.

Термин "конкурирующие антитела," как используется в данной заявке, относится к антителам, которые связываются приблизительно, существенно или преимущественно, с тем же или даже с тем же самым эпитопом, что и антитело к TFPI, как описывается в данной заявке. Термин "конкурирующие антитела" включает антитела с перекрывающимися специфичностями эпитопа. Конкурирующие антитела, таким образом, способны эффективно конкурировать с антителом, как описывается в данной заявке, за связывание с TFPI. Иногда конкурирующее антитело может связываться с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в данной заявке. Альтернативно, конкурирующее антитело, может иметь ту же специфичность эпитопа, что и антитело, описанное в данной заявке.

Как используется в данной заявке, термины "ингибирует связывание" и "блокирует связывание" (например, в отношении ингибирования/блокирования связывания TFPI лиганда с TFPI) охватывают как частичное, так и полное ингибирование или блокирование. Ингибирование и блокирование предназначены для снижения связывающей аффинности TFPI с физиологическим субстратом при контакте с анти-TFPI антителом по сравнению с TFPI, который не приводится в контакт с анти-TFPI антителом. Блокирование взаимодействия TFPI с фактором Ха или блокирование взаимодействия комплекса TFPI-фактор Ха с тканевым фактором, фактором VIIa или с комплексом тканевого фактора/фактора VIIa может составлять по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Термины "моноклональное антитело" и "композиция моноклонального антитела", как используется в данной заявке, относятся к препарату молекул антитела одного молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одну связывающую специфичность и аффинность в отношении конкретного эпитопа. В соответствии с этим термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителу, которое демонстрирует одну связывающую специфичность и которое имеет переменные и константные участки, полученные из последовательностей зародышевого иммуноглобулина человека. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями зародышевого иммуноглобулина (например, мутации, введенные с помощью случайного и сайтспецифического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Термин "выделенное антитело", как используется в данной заявке, предназначен для обозначения антитела, которое является по существу свободным от других антител, обладающих отличными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое связывается с TFPI, является по существу свободным от антител, которые связывают антигены, отличные от TFPI). Выделенное антитело, которое связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого TFPI, может, однако, иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, такими, которые получены из других видов (например, видовые гомологи TFPI). Кроме того, выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических агентов.

Как используется в данной заявке, "специфическое связывание" относится к связыванию антитела с предварительно определенным антигеном. Типично, антитело связывается с аффинностью, которая составляет по крайней мере приблизительно  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , и связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, которая является выше, например по крайней мере в два раза выше, чем его аффинность для связывания с нерелевантным антигеном (например, БСА, казеином), отличным от предварительно определенного антигена или близко родственного антигена. Фразы "антитело, которое узнает антиген" и "антитело, специфическое для антигена" в данной заявке используются взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Как используется в данной заявке, термин "высокая аффинность" для IgG антитела относится к свя-

зывающей аффинности, которая составляет по крайней мере приблизительно  $10^7 \text{M}^{-1}$ , в некоторых случаях по крайней мере приблизительно  $10^8 \text{M}^{-1}$ , по крайней мере приблизительно  $10^9 \text{M}^{-1}$ ,  $10^{10} \text{M}^{-1}$ ,  $10^{11} \text{M}^{-1}$  или более, например, вплоть до  $10^{13} \text{M}^{-1}$  или более. Однако "высокая аффинность" связывания может варьировать для других изоформ антитела. Например, "высокая аффинность" связывания для IgM изоформа относится к связывающей аффинности, которая составляет по крайней мере приблизительно  $1,0 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ . Как используется в данной заявке, термин "изотип" относится к классу антитела (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи.

"Участок, определяющий комплементарность" или "CDR" относится к одному из трех гипервариабельных участков в пределах вариабельного участка тяжелой цепи или вариабельного участка легкой цепи молекулы антитела, который образует N-терминальную антигенсвязывающую поверхность, которая комплементарна трехмерной структуре связанного антигена. Исходя из N-терминального конца тяжелой или легкой цепи, эти участки, определяющие комплементарность, обозначаются как "CDR1," "CDR2," и "CDR3," соответственно. CDR вовлечены в связывание антиген-антитело, а CDR3 включает уникальный участок, специфичный для связывания антиген-антитело. Сайт связывания антигена, таким образом, может включать 6 CDR, включая CDR участки из каждого V-участка тяжелой и легкой цепей. Как используется в данной заявке, термин "консервативные замены" относится к модификациям полипептида, которые приводят к замене одной или более аминокислот, обладающих подобными биохимическими свойствами, которые не приводят к утрате биологической или биохимической функции полипептида. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой такую, в которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим подобную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, которые имеют подобные боковые цепи, определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, гистидин, аргинин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, теронин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин), и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Для нуклеиновых кислот и полипептидов термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или два полипептида, или их сконструированные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны, несмотря на приемлемые нуклеотидные или аминокислотные инсерции или делеции по крайней мере приблизительно на 80% нуклеотидов или аминокислот, обычно по крайней мере приблизительно на 85%, предпочтительно приблизительно на 90, 91, 92, 93, 94 или 95%, более предпочтительно по крайней мере приблизительно на 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3%, 99,4, или 99,5% нуклеотидов или аминокислот. Альтернативно, существенная гомология для нуклеиновых кислот существует тогда, когда сегменты будут гибридизоваться при селективных условиях гибридизации с комплементом цепи.

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, разделяемых последовательностями (то есть, % гомологии = # идентичных положений/общее число # положений  $\times 100$ ), принимая во внимание количество пробелов и длину каждого пробела, которые необходимо ввести для достижения выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено при использовании математического алгоритма, такого, как, но без ограничения, AlignX™ модуль VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Для AlignX™ параметры по умолчанию для множественного выравнивания представляют собой: штраф за открытие пробела: 10; штраф за удлинение пробела: 0,05; штраф за разделение пробелом цепи: 8; % идентичности для задержки выравнивания: 40. (дополнительные детали могут быть найдены в <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LE4fNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html>).

Другое определение наилучшего общего совпадения между последовательностью, которая представляет интерес, и описанной последовательностью, также называется глобальным выравниванием последовательностей, при использовании компьютерной программы CLUSTALW (Thompson и др., *Nucleic Acids Research*, 1994, 2(22): 4673-4680), которая основывается на алгоритме Higgins и др., (*Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, 1992, 8(2):189-191). При выравнивании последовательностей последовательность, которая представляет интерес, и известная последовательность представляют собой последовательности ДНК. Результат указанного глобального выравнивания последовательности выражают в виде процента идентичности. Предпочтительные параметры, используемые в CLUSTALW выравнивании последовательностей ДНК для подсчета процента идентичности с помощью попарного выравнивания, представляют собой: матрица=ШГИ, k-запись=1, количество верхних диагоналей=5, штраф за пробел=3, штраф за открытие пробела=10, штраф за продление пробела=0,1. Для множественных выравниваний следующие параметры CLUSTALW являются предпочтительными: штраф за открытие пробела=10, параметр за удлинение пробела=0,05; штраф за разделение пробелом цепи=8; % идентичности для задержки выравнивания=40.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в лизате клеток или в частично очищенной или в чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "является чистой" тогда, когда очищена от других клеточных компонентов, с которыми она в норме ассоциируется в природной среде. Для выделения нуклеиновой кислоты, могут использоваться стандартные методики, такие, как: щелочная/SDS обработка, расслоение в CsCl, колоночная хроматография, электрофорез в агарозном геле и другие методики, хорошо известные в области техники.

#### **Моноклональные антитела, которые связываются со специфическими эпитопами TFPI**

Моноклональные антитела со специфическим связыванием с человеческим TFPI, как представлено в последовательности SEQ ID NO: 1, могут ингибировать связывание TFPI лиганда с TFPI. Таким образом, анти-TFPI моноклональные антитела могут ингибировать активность TFPI.

Итак, моноклональное антитело связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO: 1), причем этот эпитоп может включать один или более остатков домена Кунитца 2. В некоторых воплощениях изобретения выделенное моноклональное антитело включает легкую цепь, как показано в последовательности в SEQ ID NO: 4. Такое выделенное моноклональное антитело может включать тяжелую цепь, как показано в последовательности в SEQ ID NO: 5. Выделенное моноклональное антитело, кроме того может содержать легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO: 5. Оно также может также включать легкую цепь или тяжелую цепь с существенной гомологией. Например, выделенное моноклональное антитело, которое имеет существенную гомологию, может включать одну или более существенных замен. Такое моноклональное антитело связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO: 1), причем этот эпитоп может включать один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1 и их комбинации.

Указанный эпитоп может включать остаток, выбранный из остатков Glu100 последовательности SEQ ID NO: 1, Glu101 последовательности SEQ ID NO: 1, Asp102 последовательности SEQ ID NO: 1, Pro103 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly104 последовательности SEQ ID NO: 1, Ile105 последовательности SEQ ID NO: 1, Cys106 последовательности SEQ ID NO: 1, Arg107 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly108 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Tyr109 последовательности SEQ ID NO: 1, Lys126 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly128 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly129 последовательности SEQ ID NO: 1, Cys130 последовательности SEQ ID NO: 1, Leu131 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly132 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1, Ile105 и Asp102 последовательности SEQ ID NO: 1, Ile105 и Leu131 последовательности SEQ ID NO: 1, Ile105, Asp102 и Leu131 последовательности SEQ ID NO: 1, Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Cys106, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 или Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1.

Выделенное моноклональное антитело может связываться с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO: 1) который включает две аминокислотные петли, связанные с помощью дисульфидного мостиками между остатками Cys106 и Cys130 последовательности SEQ ID NO: 1. Этот эпитоп дополнительно может содержать один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1. Этот эпитоп может включать остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Asp102 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Leu131 последовательности SEQ ID NO: 1, или же эпитоп дополнительно может включать один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1. Выделенное моноклональное антитело может также связываться с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO: 1), который включает один или более остатков домена Кунитца 1 и один или более остатков домена Кунитца 2. Это антитело может включать легкую цепь или тяжелую цепь с существенной гомологией по отношению к тем, которые вышеуказаны. Например, выделенное моноклональное антитело, которое имеет существенную гомологию, может включать одну или более консервативных замен.

Остатки домена Кунитца 1 могут включать один или более остатков, выбранных из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1 и их комбинации. Остаток домена Кунитца 1 может также включать остаток Asp31 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Asp32 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Gly33 последовательности SEQ ID NO: 1, Pro34 последовательности SEQ ID NO: 1, Cys35 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Lys36 последовательности SEQ ID NO: 1, Cys59 последовательности SEQ ID NO: 1, Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1, Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1. Остатки домена Кунитца 1 также могут включать остатки Pro34 и Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1, остатки Pro34 и Lys36 последовательности SEQ ID NO: 1, остатки Pro34, Lys36 и Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1. Остатки домена Кунитца 2 иногда включают один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128 последовательности SEQ ID NO: 1 и их комбинации, остаток Glu100 последовательности SEQ ID NO: 1, остаток Glu101 по-

следовательности SEQ ID NO: 1, Pro103 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly104 последовательности SEQ ID NO: 1, Ile105 последовательности SEQ ID NO: 1, Cys106 последовательности SEQ ID NO: 1, Arg107 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly108 последовательности SEQ ID NO: 1, Tyr109 последовательности SEQ ID NO: 1, Phe114 последовательности SEQ ID NO: 1, Asn116 последовательности SEQ ID NO: 1, Glu123 последовательности SEQ ID NO: 1, Arg124 последовательности SEQ ID NO: 1, Lys126 последовательности SEQ ID NO: 1, Tyr127 последовательности SEQ ID NO: 1, Arg107 и Glu101 последовательности SEQ ID NO: 1, Arg107 и Tyr109 последовательности SEQ ID NO: 1, Arg107, Glu101 и Tyr109 последовательности SEQ ID NO: 1, Gly128 последовательности SEQ ID NO: 1.

Остаток домена Кунитца 2 может также дополнительно включать один или более остатков, выбранных из Asp102, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1 и их комбинации.

Итак, выделенное моноклональное антитело может включать остаток домена Кунитца 1, который содержит один или более остатков, выбранных из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62; и остаток домена Кунитца 2 который включает один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128.

Выделенное моноклональное антитело может связывать эпитоп ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO: 1), который включает две аминокислотные петли, связанные дисульфидным мостиком между остатками Cys35 и Cys59 последовательности SEQ ID NO: 1. Причем этот эпитоп дополнительно может включать один или более остатков домена Кунитца 1 и один или более остатков домена Кунитца 2. Причем остаток домена Кунитца 1 может содержать один или более остатков, выбранных из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1 или же остаток домена Кунитца 2 может содержать один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128 последовательности SEQ ID NO: 1.

Также можно получить антитела, которые конкурируют за связывание с TFPI с любым из антителом, описанным в данной заявке. Например, антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитела, описанные в данной заявке, будет способно эффективно конкурировать за связывание TFPI. Возможно получение выделенного моноклонального антитела, которое связывается с TFPI, где это антитело является конкурирующим с любым выделенным моноклональным антителом, описанным в данной заявке. Так оно может конкурировать с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO: 4 или с антителом, которое имеет тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO: 5. Антитело может быть конкурирующим с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO: 5. Можно получать биспецифические антитела, которые могут конкурировать с любым антителом, описанным в данной заявке, за связывание с TFPI. Например, такое биспецифическое антитело может связываться с одним или более эпитопов, описанных выше.

Антитело может быть видоспецифическим или может перекрестно реагировать со многими видами. В некоторых воплощениях антитело может специфически реагировать или перекрестно реагировать с TFPI человека, мыши, крысы, морской свинки, кролика, обезьяны, свиньи, собаки, kota или других видов млекопитающих.

Антитело может представлять собой такое, которое относится к различным видам, такое, как, но без ограничения IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, секреторный IgA, IgD и IgE антитело.

#### **Нуклеиновые кислоты, векторы и хозяйские клетки**

Последовательности нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для того, чтобы кодировать эти моноклональные антитела. Такие полинуклеотиды могут кодировать легкую цепь или тяжелую цепь анти-TFPI антитела. В некоторых воплощениях такие полинуклеотиды могут кодировать как легкую цепь, так и тяжелую цепь анти-TFPI антитела, разделенные способной к распаду связью. Кроме того, упомянутые выше антитела могут быть получены при использовании экспрессионных векторов, которые включают молекулы выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующие какое-либо из моноклональных антител, и клеток хозяина, которые включают такие векторы.

#### **Способы получения антител к TFPI**

Моноклональное антитело может быть получено рекомбинантно путем экспрессии в клетке хозяина нуклеотидной последовательности, которая кодирует переменные участки моноклонального антитела в соответствии с воплощениями настоящего изобретения. С помощью экспрессионного вектора нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, может быть трансфицирована и экспрессирована в клетке хозяина, которая является приемлемой для этого.

В соответствии с этим также предложен способ получения моноклонального антитела, которое связывается с человеческим TFPI, который включает:

(а) трансфекцию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей моноклональное антитело в соответствии с изобретением, в клетку хозяина, (b) культивирование клетки хозяина для экспрессии моноклонального антитела в клетке хозяина, и необязательно, (с) выделение и очистку полученного монокло-

нального антитела, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую моноклональное антитело в соответствии с настоящим изобретением.

В одном примере для экспрессии антител или фрагментов антитела, ДНК, кодирующие части или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные с помощью стандартных методик молекулярной биологии, встраивают в экспрессионные векторы так, что гены функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В этом контексте термин "функционально связанный" предназначен для обозначения того, что ген антитела лигируется в вектор так, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в пределах вектора служат для обеспечения регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимыми с экспрессией в используемой клетке хозяина. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут встраиваться в отдельные векторы или, что является более типичным, оба гена встраивают в один и тот же экспрессионный вектор. Гены антитела встраивают в экспрессионный вектор с помощью стандартных способов (например, лигирования комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора, или лигирования тупых концов, в случае, если рестрикционные сайты отсутствуют). Варибельные участки легкой и тяжелой цепей антител, описанных в данной заявке, могут использоваться для создания полноразмерных генов антитела любого изотипа антитела, путем встраивания их в экспрессионные векторы, которые уже кодируют константные участки тяжелой цепи и легкой цепи желаемого изотипа так, что  $V_H$  сегмент функционально связан с  $C_H$  сегментом (сегментами) в пределах вектора, а  $V_L$  сегмент функционально связан с  $C_L$  сегментом в пределах вектора. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид связан в рамке с аминокотерминальным концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид из белка, отличного от иммуноглобулина).

В дополнение к генам, которые кодируют цепь антитела, рекомбинантные экспрессионные векторы в соответствии с изобретением несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке хозяина. Термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описываются, например, у Goeddel; *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). При этом специалисту в данной области техники будет понятно, что конструирование экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки хозяина, которая подвергается трансформации, от уровня экспрессии желаемого белка, и т.д. Примеры регуляторных последовательностей для экспрессии в клетке хозяина млекопитающих включают вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии в клетках млекопитающих, такие, как промоторы и/или энхансеры, которые имеют происхождение от цитомегаловируса (CMV), вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовируса, (например, основного позднего промоторе аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. Альтернативно, могут использоваться невирусные регуляторные последовательности такие, как промотор убиквитина или промотор  $\beta$ -глобина. В дополнение к генам цепи антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, такие, как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках хозяина (например, точки начала репликации) и гены селективного маркера. Ген селективного маркера способствует селекции клеток хозяина, в которые был введен вектор (смотри, например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все относятся к Axel и др.). Например, типично ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким, как G418, гигромицин или метотрексат, клетке хозяина, в которую вектор был введен. Примеры генов селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-хозяйских клетках с селекцией/амплификацией при использовании метотрексата) и ген нео (для G418 селекции).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессионный(ые) вектор(ы), кодирующий(ие) легкие и тяжелые цепи трансфицируют в клетку хозяина с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция" предназначены для того чтобы охватывать широкое разнообразие методик, которые обычно используются для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую хозяйскую клетку, например, электропорацию, преципитацию с использованием фосфата кальция, трансфекцию на основе диэтиламиноэтилдекстрана и подобные им. Несмотря на то, что теоретически возможно экспрессировать антитела в соответствии с изобретением либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках хозяина, экспрессия антител в эукариотических клетках, а именно в клетках млекопитающих наиболее предпочтительна. Эукариотические клетки хозяина и, в частности, клетки млекопитающих более предпочтительны, чем прокариотические клетки, для сборки и секреции правильно собранного и иммунологически активного антитела.

Примеры клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител включают клетки яич-

ника китайского хомячка (CHO клетки) (включая dhfr-CHO клетки, описанные у Urlaub и Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, которые используются с селективным маркером для DHFR, например, так, как описывается у R. J. Kaufman и P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), клетки меланомы NSO, COS клетки, НКВ11 клетки и SP2 клетки. Тогда, когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в клетки млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток хозяина в течение периода времени, достаточного, для того чтобы осуществить экспрессию антитела в клетках хозяина или секрецию антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки хозяина. Антитела извлекают из культуральной среды при использовании стандартных способов очистки белка, таких, как ультрафильтрация, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография и центрифугирование.

#### **Использование частичных последовательностей антитела для экспрессии интактных антител**

Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами главным образом посредством аминокислотных остатков, которые являются расположенными в шести CDR легких и тяжелых цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR имеют большее разнообразие между индивидуальными антителами, чем последовательности за пределами этих CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, возможно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических существующих в природе антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые включают CDR последовательности из специфического существующего в природе антитела, привитые на каркасные последовательности из отличного антитела, которое обладает такими свойствами (смотри, например, Riechmann, L. и др., 1998, Nature 332: 323-327; Jones, P. и др., 1986, Nature 321:522-525; и Queen, C. и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК, которые включают генные последовательности зародышевого антитела. Такие зародышевые последовательности будут отличаться от генной последовательности зрелого антитела, поскольку они не будут включать полностью собранные варибельные гены, которые формируются с помощью V(D)J связывания в процессе созревания В клеток. Таким образом, необходимо получить цельную последовательность ДНК конкретного антитела, для того чтобы воссоздать интактное рекомбинантное антитело, обладающее связывающими способностями, подобными таковым для исходного антитела (смотри WO 9945962). Частичная последовательность легкой и тяжелой цепей, охватывающая участки CDR, типично является достаточной для этой цели. Частичная последовательность используется для определения того, какие зародышевые варибельные и примыкающие генные сегменты осуществляют свой вклад в рекомбинируемые варибельные гены антитела. Последовательность зародышевой линии потом используется для заполнения отсутствующих частей варибельных участков. Лидерные последовательности тяжелой и легкой цепей отщепляются в процессе созревания белка и не осуществляют своего вклада в свойства заключительного антитела. По этой причине необходимо использовать соответствующую зародышевую лидерную последовательность для экспрессионных конструкций. Для добавления отсутствующих последовательностей, клонированные последовательности кДНК могут объединяться с синтетическими олигонуклеотидами путем лигирования или ПЦР амплификации. Альтернативно, цельный варибельный участок может быть синтезирован в виде набора коротких перекрывающихся олигонуклеотидов, которые соединяются путем ПЦР амплификации для создания клона полного синтетического варибельного участка. Этот процесс имеет некоторые недостатки, такие, как удаление или включение определенных рестрикционных сайтов, оптимизация определенных кодонов.

Нуклеотидные последовательности транскриптов тяжелой и легкой цепей используются для конструирования перекрывающегося набора синтетических олигонуклеотидов с целью создания V последовательностей, идентичных природным последовательностям в отношении способности кодирования аминокислот. Синтетические последовательности легкой и тяжелой цепей могут отличаться от природных последовательностей по трем параметрам: цепочки повторяемых нуклеотидных оснований прерываются, для того чтобы способствовать синтезу олигонуклеотидов и ПЦР амплификации; оптимальные сайты инициации вводятся в соответствии с правилами Козака (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); и рестрикционные сайты эндонуклеазы конструируют выше сайта инициации трансляции. Для варибельных участков как легкой, так и тяжелой цепи, оптимизированное кодирование, и соответствующее некодирование цепочки последовательности нарушается в 30-50 нуклеотидных фрагментах приблизительно в центральной точке соответствующего не кодирующего олигонуклеотида. Таким образом, для каждой цепи олигонуклеотиды могут быть соединены в перекрывающиеся двухцепочечные наборы, которые охватывают сегменты из 150-400 нуклеотидов. Пулы потом используются в качестве матриц для получения продуктов ПЦР амплификации из 150-400 нуклеотидов. В типичном случае олигонуклеотидный набор одного варибельного участка будет нарушаться в двух пулах, которые отдельно амплифицируются для получения двух перекрывающихся продуктов ПЦР. Эти перекрывающиеся продукты потом соединяют путем ПЦР амплификации с получением полного варибельного участка. Желательно включение перекрывающегося фрагмента константного участка тяжелой или легкой цепи в продукт ПЦР амплификации для получения фрагментов, которые могут быть легко клонированы в конструкции экспрессионного вектора.

Реконструированные переменные участки легкой и тяжелой цепей потом соединяют с клонированным промотором, последовательностями инициации трансляции, константным участком, 3' нетранслируемыми последовательностями, последовательностями полиаденилирования и терминации транскрипции с образованием конструкций экспрессионного вектора. Экспрессионные конструкции легкой и тяжелой цепей могут быть соединены в один вектор, который совместно трансфицируется, серийно трансфицируется или раздельно трансфицируется в клетки хозяина, которые потом сливают с полученной клеткой хозяина, которая экспрессирует обе цепи.

Таким образом, в другом аспекте структурные признаки человеческого анти-TFPI антитела используются для создания структурно родственных человеческих анти-TFPI антител, которые сохраняют функцию связывания с TFPI. В частности, один или более CDR специфически идентифицированных участков легкой и тяжелой цепей моноклональных антител в соответствии с изобретением могут быть соединены рекомбинантно с известными каркасными участками человека и CDR для получения дополнительных, рекомбинантно сконструированных человеческих анти-TFPI антител в соответствии с изобретением.

#### **Фармацевтические композиции**

Также получены фармацевтические композиции, которые включают терапевтически эффективные количества анти-TFPI моноклонального антитела и фармацевтически приемлемый носитель. "Фармацевтически приемлемый носитель" представляет собой вещество, которое может прибавляться к активному ингредиенту, для того чтобы помочь рецептировать или стабилизировать препарат, и не оказывает значительного вредного токсикологического воздействия на пациента. Примеры таких носителей представляют собой хорошо известные квалифицированному в данной области специалисту и включают воду, сахара, такие, как мальтоза и сахароза, альбумин, соли, такие, как хлорид натрия, и т.д. Другие носители описываются, например, у E. W. Martin Remington's Pharmaceutical Sciences. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество по крайней мере одного анти-TFPI моноклонального антитела. В некоторых воплощениях такие композиции могут включать терапевтически эффективное количество одного или более анти-TFPI моноклональных антител. В некоторых воплощениях фармацевтические композиции могут включать антитело, которое специфически связывается с доменом Кунитца 1, как описывается выше, и антитело, которое специфически связывается с доменом Кунитца 1 и 2, как описывается выше.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения непосредственно перед употреблением стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение такой среды и агентов для фармацевтически активных веществ известно в области техники. Композиция предпочтительно предназначена для парентерального введения. Композиция может быть рецептирована в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, приемлемой для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобное), и их приемлемые смеси. В некоторых случаях он будет содержать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие, как маннит, сорбит, или хлорид натрия, в составе композиции.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем введения активного соединения в желаемом количестве в приемлемый растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, после чего осуществляют стерилизацию микрофильтрацией. В общем случае дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, что были перечислены выше. Для приготовления стерильных инъекционных растворов способы получения предполагают вакуумное высушивание и высушивание замораживанием (лиофилизация), это обеспечивает получение порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из предварительно приготовленного его стерильно отфильтрованного раствора.

#### **Фармацевтические применения**

Моноклональное антитело может использоваться для терапевтических целей для лечения генетических и приобретенных дефектов или нарушений коагуляции. Например, моноклональные антитела в воплощениях, описанных выше, могут использоваться для блокирования взаимодействия TFPI с FXa или для предотвращения зависящего от TFPI ингибирования активности TF/FVIIa. Кроме того, моноклональное антитело может также использоваться для восстановления направляемого TF/FVIIa образования FXa для преодоления недостаточности, зависящей от FVIII или FIX амплификации FXa.

Моноклональные антитела имеют терапевтическое применение в лечении расстройств гомеостаза, таких, как тромбоцитопения, расстройства тромбоцитов, и расстройство кровотечения (например, гемофилия А, гемофилия В и гемофилия С). Такие расстройства могут лечиться путем введения терапевтически эффективного количества анти-TFPI моноклонального антитела пациенту, который в этом нуждается. Моноклональные антитела также имеют терапевтическое применение в лечении неконтролируемых кровотечений при таких показаниях, как травма и геморрагический инсульт. Таким образом, обеспечивается способ сокращения времени кровотечения, который включает введение терапевтически эффектив-

ного количества анти-TFPI моноклонального антитела в соответствии с изобретением пациенту, который в этом нуждается.

Антитела могут использоваться как монотерапия или в комбинации с другими терапиями, направленными против гемостатических расстройств. Например, совместное введение одного или более антител в соответствии с изобретением с фактором свертывания крови, таким, как фактор VIIa, фактор VIII или фактор IX, как предполагается, полезно для лечения гемофилии. Способ лечения пороков коагуляции включает введение (а) моноклонального антитела, которое связывается с ингибитором пути тканевого фактора человека в определенном количестве и (б) фактора VIII или фактора IX в определенном количестве, где указанные количества вместе являются эффективными для лечения указанных дефицитов или пороков. Способ лечения пороков коагуляции может также включать введение (а) моноклонального антитела, которое связывается с ингибитором пути тканевого фактора человека в определенном количестве и (б) фактора VIII или фактора IX в определенном количестве, где указанные количества вместе являются эффективными для лечения указанных дефицитов или пороков, при котором фактор VII не вводится совместно. Изобретение также включает фармацевтическую композицию, которая содержит терапевтически эффективное количество комбинации моноклонального антитела в соответствии с изобретением и фактора VIII или фактора IX, где композиция не содержит фактора VII. "Фактор VII" включает фактор VII и фактор VIIa. Эти комбинационные терапии, вероятно, снижают необходимую частоту инфузий фактора свертывания. Под совместным введением или комбинационной терапией понимают введение двух терапевтических лекарственных средств, каждое из которых является рецептированным отдельно или рецептированным вместе в одной композиции, и тогда, когда оно является рецептированным отдельно, водится либо в то же самое время, или в различные моменты времени, но в течение одного и того же терапевтического периода.

Фармацевтические композиции могут парентерально вводиться субъекту, который страдает от гемофилии А или В, в дозе и при частоте, которые могут варьироваться в соответствии с тяжестью эпизода кровотечения, в случае профилактической терапии, а также могут варьироваться в зависимости от тяжести порока свертывания у пациента. Композиция может вводиться пациентам, которые в этом нуждаются, в виде болюса или путем непрерывной инфузий. Например, болюсное введение антитела в соответствии с изобретением в виде Fab фрагмента может осуществляться в количестве от 0,0025 до 100 мг/кг веса тела, от 0,025 до 0,25 мг/кг, от 0,010 до 0,10 мг/кг или 0,10-0,50 мг/кг. Для непрерывной инфузий антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое присутствует в виде Fab фрагмента, может вводиться в количестве от 0,001 до 100 мг/кг веса тела/минута, от 0,0125 до 1,25 мг/кг/мин., от 0,010 до 0,75 мг/кг/мин., от 0,010 до 1,0 мг/кг/мин или 0,10-0,50 мг/кг/мин в течение периода времени 1-24 ч, 1-12 ч, 2-12 ч, 6-12 ч, 2-8 ч или 1-2 ч. Для введения антитела, которое присутствует в виде полноразмерного антитела (с полными константными участками), дозировка может составлять приблизительно 1-10 мг/кг веса тела, 2-8 мг/кг или 5-6 мг/кг. Такие полноразмерные антитела типично будут вводиться путем инфузий, которая длится в течение периода времени от тридцати минут до трех часов. Частота введения будет зависеть от тяжести состояния. Частота может колебаться в интервале от трех раз в неделю до одного раза в две или три недели. Кроме того, композиция может вводиться пациентам посредством подкожной инъекции. Например, доза от 10 до 100 мг анти-TFPI антитела может вводиться пациенту с помощью подкожной инъекции еженедельно, два раза в неделю или один раз в месяц.

Как используется в данной заявке, "терапевтически эффективное количество" означает количество анти-TFPI моноклонального антитела или комбинации такого антитела и фактора VIII или фактора IX, которое является необходимым для эффективного повышения времени свертывания *in vivo*, или иным образом вызывает способное к измерению преимущество *in vivo* у пациента, который в этом нуждается. Точное количество будет зависеть от ряда факторов, включая (но без ограничения), компоненты и физические характеристики терапевтической композиции, целевую популяцию пациентов, соображения, касающиеся индивидуального пациента, и подобные им, и может быть легко определено квалифицированным специалистом в данной области техники.

### Примеры

Пример 1. Экспрессия и очистка рекомбинантного TFPI (домен Кунитца 2) из *E. coli*.

Экспрессионная система.

Использовали вектор переноса (в соответствии с номенклатурой Gateway), обозначенный как pD Eco5 N. pD Eco5 N основывается на pET-16b (Novagen) и дополнительно кодирует His<sub>10</sub> и NusA метку, а также клонирующую кассету Gateway для экспрессии слитого белка, который состоит из His<sub>10</sub>/NusA и белка, который представляет интерес.

TFPI конструкцию, которая кодирует сайт расщепления тромбина, сливали с N-терминальным концом домена Кунитца 2 (от Lys93 до Phe154, ссылочный номер Uniprot 10646), и сайты присоединений Gateway (attB1-5#, attB2-3#, Invitrogen) клонировали в pD Eco5 N вектор, что приводило к получению экспрессионного вектора, обозначенного как pD Eco5 N TFPI KD2. Использовали экспрессионный штамм BL21 DE3 (Novagen).

Аминокислотная последовательность экспрессированного слитого белка при использовании pD Eco5 N TFPIKD2, 600 AA:

MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES  
 VTFDRITTTQ AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE  
 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN  
 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM  
 TVDDLQAKHQ AEAAHAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL  
 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSVLPRGSKP  
 DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM NNFETLEECK NICEDGPNGF

#### Компоненты последовательности:

His 10 метка: MGHHHHHHHH HH  
 NusA метка: SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL  
 GDYVEDQIES  
 VTFDRITTTQ AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN  
 ISLDLGNNAE  
 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF  
 RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE  
 RIDIVLWDDN  
 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS  
 QLSGWELNVM  
 TVDDLQAKHQ AEAAHAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM  
 KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA  
 ARGVCTLEDL  
 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEA

#### Линкер/транслированные сайты рестрикции эндонуклеазы:

TSGS GLE  
 Транслированный сайт att:  
 TSLYKKA GS  
 Сайт тромбина: LVPRGS  
 TFPI Кунитца 2 GSVLPRGSKP DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM  
 NNFETLEECK  
 NICEDGPNGF

#### Экспрессия.

Штамм BL21 DE3, трансформированный с помощью рD Eco5 N #209, выращивали как пре-культуру в среде LB 2×50 мл с 200 мкг/мл ампициллина в течение 14 ч при 37°C при скорости вращения 180 об/мин. Далее шесть флаконов для встряхивания, содержащие 400 мл среды CIRCLEGROW (Q-Biogene), каждый инокулировали с помощью 8 мл пре-культуры и инкубировали при 37°C, при скорости вращения 180 об/мин. При оптической плотности культуры OD600 прибавляли IPTG (заключительная концентрация 100 мМ) для индукции гена и дополнительно культивировали при 17°C в течение 24 ч при 180 об/мин E. coli осаждали путем центрифугирования (3000 г, 10 мин.) и хранили при -80°C.

#### Очистка.

Осажденную массу E. coli из 3,2 л культуры ресуспендировали в 200 мл литического буфера (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 300 мМ NaCl, 10% (об./об.) глицерина, 40 мМ имидазола, полная смесь ингибиторов протеазы, не содержащая ЭДТА (Roche)), гомогенизировали при использовании устройства высокого давления (Microfluidics) и после этого центрифугировали лизат (100000 г, 60 мин, 4°C). Осуществляли несколько этапов очистки при использовании исследовательской системы Äkta. Концентрированный образец использовали на двух соединенных 5 мл единицах Hi-Trap-сефарозного HP матрикса (GE). Уравновешивание, связывание слитого белка и промывание Hi-Trap-Sepharose HP матрикса осуществляли при использовании Буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 300 мМ NaCl, 40 мМ имидазола). Для элюирования NusA-TFPI слитого белка использовали линейный градиент имидазола от 40 до 500 мМ в Буфере В (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 150 мМ NaCl). Соединяли фракции элюирования и концентрировали (в 6-7 раз при использовании устройства для ультрафильтрации Amicon), а буфер заменяли на Трис НCl pH 8,0.

Концентрированный образец (6-7 мл) в дальнейшем использовали для эксклюзионной хроматогра-

фии размеров с применением Сефакрила-100 (ХК26/74) в Трис HCl pH 8,0. Собирали фракции основного пика, содержащие слитый белок, концентрировали путем ультрафильтрации (Amicon) до объема 5 мл. Тромбин (НТI) прибавляли образцу (соотношение фермент:слитый белок, 1:50 вес./вес), инкубировали в течение 5 часов при 21°C, и реакцию останавливали с помощью PMSF (заклЮчительная концентрация 1 мМ). После этого осуществляли второй этап эксклюзионной хроматографии размеров (Сефакрил-100 (ХК26/74) в Трис HCl pH 8,0) и фракции пика подвергали мониторингу при использовании ПАГЭ. Фракции, которые содержали свободный мономерный домен Кунитца 2 TFPI, собирали и концентрировали (Amicon), получая при этом приблизительно 4 мг продукта из 3,2 л культуры *E. coli*.

Пример 2. Получение рекомбинантного моноклонального Fab А антитела к TFPI, его экспрессия в *E. coli* и очистка.

Экспрессия.

Fab А совместно экспрессировали при использовании экспрессионного вектора pET28а и штамма BL21 Star DE3 *E. coli*. Участки легкой и тяжелой цепей, кодируемые в экспрессионном векторе, каждый соединяли на его N-терминальном конце с периплазматической сигнальной последовательностью. Также вводили His6 метку на С-терминальном конце участка тяжелой цепи для очистки Fab. Трансформированный штамм *E. coli*, выращенный в течение ночи на экспрессионной среде TB-Instant, использовали для аутоиндукции экспрессии рекомбинантного белка (#71491, Novagen). Кратко, 10 мл трансформированной культуры *E. coli* (в пробирке фирмы Falcon на 50 мл) выращивали как пре-культуру в LB среде с добавлением 30 мкг/мл канамицина в течение 14 ч при 37°C и при перемешивании при 180 об/мин. После этого четыре колбы Эрленмейера с 500 мл ночной экспрессионной среды TB-Instant каждый инокулировали с помощью 2 мл пре-культуры и инкубировали в течение 24 часов при 30°C при вращении 180 об/мин. Культуры центрифугировали при 10000 г и температуре 10°C в течение 30 мин, и супернатант, содержащий Fab, сразу же использовали для дополнительной очистки продукта или хранили при -20 или -80°C. Альтернативно, Fab экспрессировали при использовании экспрессионного вектора pET28а и штамма BL21 Star DE3 *E. coli* в 10 л биореакторе (Sartorius). Трансформированную культуру *E. coli* в объеме 500 мл выращивали в LB среде с добавлением 30 мкг/мл канамицина в течение 17 ч при 37°C и при перемешивании при 165 об/мин и использовали для инокуляции биореактора, содержащего 10 л аутоиндукционной среды. Аутоиндукционная среда содержала следующие компоненты на литр: 12 г триптона, 24 г дрожжевого экстракта, 9,9 г глицерина (87%), 12,54 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,31 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 г MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 1 г глюкозы, 2,5 г лактозы, 30 мг канамицина. Культивирование при использовании биореактора осуществляли в течение 24 ч (при 30°C при использовании 350-800 об/мин) и после этого собирали культуральный супернатант путем удаления биомассы с помощью центрифугирования в центрифуге (Heraeus).

Очистка.

Fab очищали с помощью процедуры двухэтапной хроматографии при использовании Äkta Explorer 10s устройства. Модуль с пустотелым волокном (порог отсечения 10 кДа) использовали для концентрирования 1 л осветленного культурального супернатанта до получения заключительного объема 100 мл и для уравнивания буферной композиции при использовании Буфера А (50 мМ Na-фосфата pH 8,0, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола).

На начальном этапе ИМАС хроматографии при использовании системы Äkta Explorer концентрированный образец применяли к 5 мл Ni-NTA Superflow матрикса (Qiagen). Уравнивание, связывание образца и промывание Ni-NTA матрикса осуществляли при использовании Буфера А (связывание осуществляли при 21°C, все другие хроматографические этапы - при 4°C). Для элюирования Fab использовали линейный градиент имидазола от 10 до 250 мМ в Буфере А. Фракции одного пика элюирования соединяли (60 мл общего объема) и концентрировали до 10 мл путем ультрафильтрации, и буфер доводили до PBS с pH 7,4 при использовании Hi-Trer26/10 колонки для обессоливания. Далее 2 мл матрикса капиллярной цепи антитела (среда селективной аффинности каппа, 0833.10 от ВАС), уравниваемого с помощью PBS, инкубировали с концентрированным ИМАС элюатом в течение 1 ч при комнатной температуре с перемешиванием. Матрикс со связанным образцом переносили на хроматографическую колонку и промывали с помощью PBS. Fab образец элюировали с помощью 2 мл глицерина pH 2,0, нейтрализовали при использовании 1 М HEPES pH 7,5 и буфер доводили до PBS при использовании PD10 обессоливающей колонки (GE, 17-0851-01).

Когда Fab экспрессировали в *E. coli* при использовании 10 л биореактора (Sartorius), то использовали следующую процедуру очистки. Отцентрифугированный культуральный супернатант последовательно фильтровали через модули с одноразовыми фильтрами (GE, KMP-HC-9204TT; KGF-A-0504TT) с размером пор 5 и 0,2 мкм. Модуль с пустотелым волокном (порог отсечения 10 кДа) использовали для концентрирования осветленного культурального супернатанта до получения заключительного объема 1500 мл и доводили до получения буферной композиции при использовании Буфера А. 25 мл Ni-NTA superflow матрикса (Qiagen, уравниваемый в буфере А) прибавляли к концентрированному образцу и инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 21°C. Матрикс со связанным образцом переносили на пустую хроматографическую колонку (25×125 мм), соединяли с хроматографическим устройством Äkta Explorer и промывали с помощью буфера А (приблизительно 250 мл). Для элюирования Fab использовали

два последующих этапа с применением градиента от 5% (30 мл) до 10% (35 мл) буфера В, после чего применяли линейный градиент элюирования вплоть до 100% Буфера В. Объединенные фракции элюирования (72 мл) последовательно обрабатывали так, как описано ниже: концентрировали при использовании устройства для центрифужной ультрафильтрации (отсечение 10 кДа, Amicon) до получения заключительного объема 20 мл, применяли к обессоливающей колонке в виде трех порций (GE HiPrep, 26/10) для доведения буфера до PBS pH 7,4, а также осуществляли дополнительное концентрирование в устройстве для центрифужной ультрафильтрации (Amicon) до получения заключительного объема 40 мл. Концентрированный образец инкубировали с 5 мл матрикса антитела к каппа легкой цепи антитела (среда селективной аффинности каппа, ВАС, уравновешенная с помощью PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре с перемешиванием. Сефарозный матрикс со связанным образцом переносили на хроматографическую колонку и обрабатывали при использовании следующей последовательности этапов промывания: 4 раза с помощью 15 мл PBS; дважды с помощью 5 мл промывочного буфера (100 мМ Na-фосфата pH 6,0, 100 мл NaCl, 500 мМ аргинина). Этап элюирования состоял из трехкратного применения 5 мл буфера на основе 100 мМ глицина HCl pH 3,0. Элюат немедленно нейтрализовали при использовании 1 М Трис HCl pH 8,0 и сформировавшиеся преципитаты удаляли с помощью центрифугирования (10 мин., 3200 г). Образцы концентрировали при использовании ультрафильтрации (Amicon) и применяли к колонке 16/60 Superdex-75 препаративной марки на хроматографической системе Äkta Explorer при использовании TBS буфера. Фракции пика анализировали с помощью ПАГЭ, и фракции, представляющие легкую и тяжелую цепи Fab, в молярном соотношении 1,1 соединяли и вновь концентрировали путем ультрафильтрации (Amicon) до получения заключительного объема 1 мл. Приблизительно 4 мг Fab A изолировали из 10 л культурального супернатанта *E. coli*.

Аналитическую эксклюзионную хроматографию размеров использовали (Äkta Micro система S75 5/150 колонка, 100 мМ Трис, HCl, pH 7,5) для демонстрации образования комплекса Fab A/TFPI KD2. Таким образом, Fab A, TFPI KD2 и смесь Fab A плюс TFPI KD2 анализировали отдельно (фиг. 1).

Пример 3. Кристаллизация и определение рентгеновской структуры комплекса TFPI-Fab A.

Кристаллизация.

Сокристаллы домена Кунитца 2 TFPI и моноклональное антитело Fab A получали при 20°C при использовании способа сидячей капли. Белковый комплекс концентрировали до 9 мг/мл и кристаллизовали путем смешивания равного объема раствора белка и раствора в ячейке (15% PEG8000, Трис HCl pH 7,5) в качестве преципитанта. Кристаллы появлялись через один день.

Сбор данных и обработка.

Кристаллы быстро замораживали в жидком азоте с 30% глицерином в кристаллизационном буфере для криозащиты. Данные собирали при использовании канала синхротронного излучения BL14.1, BESSY синхротрон (Berlin) на MAR CCD детекторе. Данные индексировали и обобщали при использовании XDS (W. Kabsch (2010) Acta Cryst. D66, 125-132) или EVIOSFLM (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography (1994) Acta Cryst. D50, 760-763; A.G.W. Leslie, (1992), Joint CCP4 + ESW-EMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26), подготавливали для вычисления с помощью POINTLESS (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82) и масштабировали при использовании SCALA (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82). Кристаллы дифрагировали вплоть до 2,6 Å и охватывали пространственные группы P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> с константами ячеек a=65.7, b=114.7, c=151.9; α=β=γ=90°, и двумя комплексами TFPI-Fab в ассиметричной единице.

Определение структуры и уточнение.

Совместные структуры домена Кунитца 2 TFPI и Fab моноклонального антитела разрешали с помощью молекулярного замещения при использовании PHASER (A.J. McCoy и др. (2007) J. Appl. Cryst. 40, 658-674) и публиковали рентгеновские структуры домена Кунитца 2 TFPI (pdb код 1tfx) и Fab фрагмента (pdb код 3mhw) в качестве исследовательских моделей. Перед проведением молекулярного замещения модельную последовательность Fab модифицировали с помощью CHAINSAW (N. Stein, (2008) J. Appl. Cryst. 41, 641-643). Итеративные циклы построения модели при использовании COOT (P. Emsley и др. (2010) Acta Cryst. D66:486-501) и уточнение максимальной правдоподобности при использовании REFMAC5.5 (G.N. Murshudov и др. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255) завершали построение модели. Участки Phe A 31 - Asn A 35, Pro B 9, Lys M 139 - Ser M 142 и Asp140 - Phe154 KD2 продемонстрировали слабую электронную плотность и не были включены в модель.

Набор данных и статистика уточнения являются подытоженными в табл. 1.

Таблица 1. Набор данных и статистика уточнения для комплекса TFPI-Fab A

Длина волны	0,9184 Å
Разрешение (наивысшая оболочка)	46-2,6 (2,7-2,6) Å
Отражения (наблюдаемое оригинальное)	176619 / 36076

Завершенность <sup>a</sup>	99,9% (100,0%)
$I/\sigma^a$	9,8 (2,5)
$R_{\text{объед.}}^{a,b}$	0,115 (0,70)
Пространственная группа	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Параметры единичной ячейки	
a	65,7 Å
b	114,7 Å
c	151,9 Å
$R_{\text{крис.}}^b$	0,25
$R_{\text{свободн.}}^c$	0,32
Температурный коэффициент Уилсона	23,87 Å <sup>2</sup>
Среднеквадратическое отклонение длины связи <sup>c</sup>	0,009 Å
Среднеквадратическое отклонение углов связи <sup>c</sup>	1,4°
Атомы белка	7580
Молекулы воды	108

<sup>a</sup> Значения в скобках являются такими для высокого разрешения пустот;

<sup>b</sup>  $R_{\text{объед.}} = \frac{\sum |hkl| |I_{\text{hkl}} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|}{\sum |hkl| \langle I_{\text{hkl}} \rangle}$ , где  $I_{\text{hkl}}$  - интенсивность отражения hkl и  $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$  - средняя интенсивность в соответствии с разными наблюдениями;

<sup>c</sup>  $R_{\text{крис.}} = \frac{\sum |F_{\text{набл.}} - F_{\text{подсч.}}|}{\sum |F_{\text{набл.}}|}$ , где  $F_{\text{набл.}}$  и  $F_{\text{подсч.}}$  представляют собой наблюдаемый и подсчитанный структурный фактор, соответственно;

<sup>d</sup> 5%-ная тестовая выборка;

<sup>e</sup> среднеквадратическое отклонение набора параметров от идеальной стереохимии.

Пример 4. Картирование эпитопа Fab A на основе рентгеновской структуры.

Комплекс TFPI-Fab A (фиг. 2) кристаллизовался в виде двух копий комплекса на асимметрическую единицу. Основные цепи комплексов перекрывались с общим значением среднеквадратического отклонения (RMSD) 0,7 Å с каждым Fab, связанным с ассоциированным TFPI эпитопом. Остатки TFPI в контакте с Fab A (эпитоп) и соответствующая углубленная поверхность подвергались анализу при использовании CCP4 программы AREAIMOL (P.J. Briggs (2000) CCP4 Newsletter No. 38). Остатки с минимальным значением 5 Å<sup>2</sup> углубленной поверхности или более чем 50% углубленной поверхности считались контактными (табл. 2). Остатки Fab A в контакте с TFPI (паратоп) и соответствующую углубленную поверхность подвергали анализу с помощью AREAIMOL. Остатки с минимальным размером углубленной поверхности 5 Å<sup>2</sup> или более чем 50% углубленной поверхности считались контактными (табл. 3).

Таблица 2. Остатки TFPI, находящиеся в контакте с Fab A. Цепи C и D соответствуют TFPI соответствующего комплекса в асимметричной единице

Номер остатка	Углублен. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углублен. поверхн. в %
Glu C 100	5.6	4.3
Glu C 101	41.0	41.6
Asp C 102	50.1	85.6
Pro C 103	43.9	71.6
Gly C 104	19.1	98.9
Ile C 105	125.9	100.0
Cys C 106	59.1	93.0
Arg C 107	138.6	53.4
Gly C 108	1.5	4.4
Gly C 128	7.7	57.8
Gly C129	23.2	44.1
Cys C 130	46.2	99.5
Leu C 131	111.5	92.8
Gly C 132	24.5	48.8
Asn C 133	5.5	17.4

Номер остатка	Углублен. поверхн. в Å	Углублен. поверхн. в %
Glu N 100	31.3	20.3
Glu N 101	24.5	23.7
Asp N 102	46.7	77.0
Pro N 103	62.9	90.3
Gly N 104	21.5	89.2
Ile N 105	111.7	97.5
Cys N 106	70.2	96.4
Arg N 107	134.3	53.4
Gly N 108	6.0	12.7
Tyr N 109	7.5	4.3
Lys N 126	11.3	7.8
Tyr N 127	0.9	8.7
Gly N 128	11.0	81.4
Gly N 129	28.3	56.8
Cys N 130	42.5	100.0
Leu N 131	125.6	84.9
Gly N 132	27.2	71.7
Asn N 133	34.1	8.2

Таблица 3. Остатки Fab A, находящиеся в контакте с TFPI. Цепи A, B и цепи L, M представляют собой легкую и тяжелую цепи Fab A соответствующего комплекса в асимметричной единице

Номер остатка	Углублен. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углублен. поверхн. в %
Tyr A 37	41.3	47.5
Tyr A 96	25.8	94.8
Asp A 97	9.5	16.2
Ser A 98	5.6	11.2
Tyr A 99	42.2	57.5
Leu A 101	6.7	51.9
Asn B 32	43.4	41.4
Ser B 33	11.7	27.8
Ala B 35	3.8	100.0
Ile B 52	4.9	100.0
Tyr B 54	44.5	98.0
Arg B 56	40.2	49.7
Ser B 57	2.9	3.3
Lys B 58	16.2	14.0
Tyr B 60	64.0	79.8
Asn B 61	0.8	0.9
Arg B 62	51.3	50.4
Trp B 102	42.6	98.3
Ser B 104	24.5	100.0
Asp B 105	25.9	36.7
Trp B 108	40.2	49.5

Номер остатка	Углублен. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углублен. поверхн. в %
Tyr L 37	42.1	59.1
Tyr L 96	25.3	96.1
Asp L 97	21.4	29.1
Ser L 98	2.7	6.7
Tyr L 99	48.4	68.0
Leu L 101	12.4	81.0
Asn M 32	34.5	39.0
Ser M 33	6.1	17.8
Ala M 35	7.2	90.0
Ile M 52	5.4	100.0
Tyr M 54	57.0	88.3
Arg M 56	115.2	72.4
Ser M 57	4.6	4.3
Lys M 58	27.3	20.0
Tyr M 60	67.0	72.9
Asn M 61	0.8	0.9
Arg M 62	59.2	53.0
Trp M 102	33.5	100.0
Ser M 104	28.0	80.9
Asp M 105	42.5	50.0
Lys M 106	3.3	2.5
Trp M 108	75.8	53.1

Нелинейный эпитоп, который узнается Fab A, определяется участками Glu100-Arg109 и Lys126, Gly128-Asn133. Паратоп в Fab A включает остатки легкой цепи (lc) lc Tyr37, lc Tyr96, lc Asp97, lc Ser98, lc Tyr99 и lc, а также остатки тяжелой цепи (hc) hc Asn32, hc Ser33, hc Ala35, hc Ile52, hc Tyr54, hc Arg56, hc Lys58, hc Tyr60, hc Arg62, hc Trp102, hc Ser104, hc Asp105 и hc Trp108. CDR-L3, CDR-H2 и CDR-H3, по-видимому, представляют собой основные сайты взаимодействия на основе количества контактов.

Эпитоп состоит из двух петель, связанных с помощью дисульфидного мостика между Cys106 и Cys130 (фиг. 3). Дисульфидный мостик укладывается напротив hc Trp108 CDR-H3, в то время как соседние Ile105 и Leu131 углубляются в гидрофобную впадину, которая образуется hc Ala35, hc Ile52, hc Tyr54 (CDR-H2), hc Trp102 (CDR-H3) и lc Tyr96, lc Ser98, lc Tyr99, lc Leu10 (CDR-L3). Основываясь на количестве контактов, Ile105 и Leu131 представляют собой ключевые остатки эпитопа в гидрофобном контакте с CDR-L3, CDR-H2 и CDR-H3. TFPI участок Glu101-Ile105 взаимодействует с CDR-H2. Граница контакта характеризуется hc Tyr54, hc Tyr60 и hc Arg62. Hc Tyr54 демонстрирует полярное взаимодействие с боковой цепью Asp102. Hc Tyr60 демонстрирует полярные взаимодействия с карбонильным кислородом основной цепи Glu101, а hc Arg62 - с боковой цепью Asp102 и карбонильным кислородом основной цепи Gly132. Asp102 представляет собой ключевой остаток эпитопа в полярном взаимодействии с CDR-H2 hc Tyr54 и hc Arg62. Замена hc Asp62 дикого типа на аргинин в Fab A приводит к повышению аффинности более чем в 120 раз. Основываясь на рентгеновской структуре, это может объясняться переключением отталкивания между hc Asp62 и Asp102 на полярное взаимодействие между hc Arg62 и Asp102, и карбонильными кислородами основной цепи.

Группа гуанидина Arg107 непосредственно взаимодействует с боковыми цепями hc Asn32 и hc Asp105 CDR-H1 и CDR-H3, соответственно. Arg107 был продемонстрирован как такой, который является существенным для ингибирования фактора Ха (M.S. Vajaj и др. (2001) *Thromb Haemost* 86(4):959-72.). Fab A охватывает этот критический остаток и конкурирует с функцией Arg107 в отношении связывания фактора Ха.

Пример 5. Сравнение паратопа Fab A и его оптимизированного варианта Fab C.

Для оценки однородности связывания TFPI эпитопа с помощью оптимизированного варианта Fab A, Fab C, выравнивание последовательности легкой и тяжелой цепей (фиг. 11A) и гомологию моделей Fab C (фиг. 11B) подвергали анализу на сохранение остатков паратопа Fab A в Fab C. Модели гомологии рассчитывались с помощью DS MODELER (ACCELRYS, Inc; Fiser, A. и Sali A. (2003) *Methods in Enzymology*, 374: 463-493) при использовании нашей рентгеновской структуры TFPI-Fab A в качестве структуры шаблона ввода данных. Модели гомологии показали почти идентичные конформации по сравнению с Fab A со среднеквадратическим отклонением <0,5 Å. 20 остатков паратопа наблюдали в комплексе TFPI-Fab A, при этом hc Asn32 представляет собой только один остаток паратопа, который отличается в Fab C, где остаток аспартата находится в соответствующем положении (фиг. 11). Hc Asn32 взаимодействует с Arg107 TFPI. Asp32 Fab C должен взаимодействовать более плотно с TFPI с учетом его карбоксилатной группы и предполагаемого взаимодействия с группой гуанидина Arg107. Основываясь на высокой консервативности последовательности между остатками паратопа Fab A и Fab C и прогнозируемых идентичных конформациях, Fab C, вероятно, узнается тем же эпитопом TFPI, что и Fab A.

Пример 6. Объяснение, которое основывается на рентгеновской структуре для ингибирования взаимодействия TFPI-фактор Ха.

Fab A превосходит взаимодействие и ингибирование TFPI-фактор Ха. Перекрытие комплекса TFPI-Fab A со структурой TFPI-трипсин (M.J. Burgering и др. (1997) *J Mol Biol.* 269(3): 395-407) демонстрирует, что TFPI участок, содержащий Fab A эпитоп, является критическим для взаимодействия с трипсином, который является заменителем для фактора Ха. Основываясь на рентгеновской структуре, связывание Fab A с наблюдаемым эпитопом на домене Кунитца 2 будет исключать связывание фактора Ха с помощью стерического препятствия (фиг. 4).

Пример 7. Получение рекомбинантного TFPI (домен Кунитца 1+2), его экспрессия в *E. coli* и очистка Экспрессионная система.

Вектор переноса (в соответствии с номенклатурой Gateway), обозначенный как pD Eco5 N, основывается на pET-16b (Novagen). Этот вектор также кодирует His<sub>10</sub> и NusA метки, а также клонирующую кассету Gateway для экспрессии слитого белка, который состоит из His<sub>10</sub>/NusA и белка, который представляет интерес.

ДНК конструкцию, которая кодирует сайт расщепления TEV протеазы, сливали с N-терминальным концом доменов Кунитца 1+2 (от Asp1 до Phe154, ссылочный номер Uniprot 10646, зрелый TFPI альфа), и сайты присоединений Gateway (attB1-5#, attB2-3#, Invitrogen) клонировали в pD Eco5 N вектор, что приводило к получению экспрессионного вектора, обозначенного как pD Eco5 N TFPI KD1+2. Использованный экспрессионный штамм представлял собой BL21 DE3 (Novagen).

Аминокислотная последовательность экспрессированного слитого белка при использовании pD Eco5 N TFPI KD1+2, 600 AA

Последовательность 699 AA; 78579 MB; 4D2932FF7C1E3F7E CRC64;  
 MGHNNHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES  
 VTFDRITTTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE  
 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGALFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMARGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN  
 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNgQNVRLAS QLSGWELNVM  
 TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL  
 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSDYDIPTTE  
 NLYFQDSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN IFTRQCEEFI  
 YGGCEGNQNR FESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQOEKPD FCFLEEDPGI CRGYITRYFY  
 NQQTKQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

#### Компоненты последовательности

**His 10 метка:** MGHNNHHHHH HH

**NusA метка:** SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL  
 GDYVEDQIES  
 VTFDRITTTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN  
 ISLDLGNNAE  
 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGALFVTR SKPEMLIELF  
 RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMARGARV QAVSTELGGE  
 RIDIVLWDDN  
 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNgQNVRLAS  
 QLSGWELNVM  
 TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM  
 KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA  
 ARGVCTLEDL  
 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDE

**Линкер/транслируемые сайты рестрикции эндонуклеазы:** TSGS GLE

**Транслируемый att-сайт:** TSLYKKA GS

**TEV сайт:** DYDIPTTENLYFQ

**TFPI Кунитца 1+2** DSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN  
 IFTRQCEEFI  
 YGGCEGNQNR FESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQOEKPD FCFLEEDPGI  
 CRGYITRYFY  
 NQQTKQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

#### Экспрессия.

Штамм BL21 DE3, трансформированный с помощью рD Eco5 N TFPI KD1+2, выращивали как прекультуру в среде LB 2×100 мл с 200 мкг/мл ампициллина в течение 14 ч при 37°C при скорости вращения 180 об/мин. Биореактор (Sartorius Stedim Biotech) с объемом культуры 10 л (LB среда, 200 мкг/мл ампициллина) инокулировали с помощью 200 мл прекультуры и инкубировали при 37°C при скорости вращения 150 об/мин. При оптической плотности культуры OD600 прибавляли IPTG до конечной концентрации 100 мМ для индукции гена и дополнительно культивировали при 17°C в течение 24 ч с минимальным уровнем рO<sub>2</sub> 50% и при скорости вращения 180-800 об/мин. E. coli осаждали путем центрифугирования (3000 г, 10 мин) и хранили при -80°C.

#### Очистка.

Осажденную массу E. coli из 10 л культуры ресуспендировали в 500 мл литического буфера (50 мМ Трис-НСl рН 8,0, 300 мМ NaCl, 10% (об./об.) глицерина, 40 мМ имидазола, полная смесь ингибиторов протеазы, не содержащая ЭДТА (Roche)), гомогенизировали при использовании устройства высокого давления (Microfluidics) и после этого центрифугировали лизат (100000 г, 60 мин, 4°C). Осуществляли несколько этапов очистки при использовании исследовательской системы Äkta. Отцентрифугированную

фракцию лизата использовали для начального этапа ИМАС хроматографии на колонке, содержащей 50 мл Ni-сефарозного HP матрикса (GE). Уравновешивание, связывание слитого белка и промывание Ni-Trap-Sepharose HP матрикса осуществляли при использовании Буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 300 мМ NaCl, 40 мМ имидазола). Для элюирования NusA-TFPI слитого белка использовали линейный градиент имидазола от 40 до 500 мМ в Буфере В (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 150 мМ NaCl). Соединяли фракции элюирования (общий объем 140 мл) и наносили в виде фракций на обессоливающую колонку Hi Prep 26/10 (GE) (две соединенные колонки) для замены Буфера на 50 мМ Трис HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Для удаления метки Nus A осуществляли протеолитическое переваривание с помощью меченного His<sub>6</sub> TEV при соотношении фермента к слитому белку 1:66 вес./вес. в течение 16 ч при 4°C. Образец снова наносили на колонку, содержащую 50 мл Ni-сефарозного HP матрикса (GE) для отделения свободного TFPI от нерасщепленного слитого белка и His-TEV. Элюат этапа ИМАС потом использовали для эксклюзионной хроматографии размеров, SEC (S100, GE) для изоляции фракции мономерного TFPI, которую концентрировали путем ультрафильтрации (Amicon, единица с интервалом отсечения 3 кДа) до получения концентрации приблизительно 1,5 мг/мл. Очищенный заключительный образец домена Кунитца 1+2 TFPI разгоняли как двойную полосу ПАГЭ с кажущимся молекулярным весом приблизительно 18 кДа. Дополнительный анализ (SEC, вестерн-блоттинг) выявил, что только один белок, который соответствовал верхней полосе, был иммунореактивным по отношению к Fab В.

Пример 8. Протеолитическая обработка и очистка Fab В из человеческого IgG1.

Экспрессия.

Fab В подвергали протеолизу из человеческой формы IgG1. Fab В IgG1 экспрессировали в клетках млекопитающих (HEK293) как белок секреции. Для изоляции IgG1 1,6 л культурального супернатанта наносили на соединенные между собой колонки HiTrap MabSelectSuRE (от GE, объем слоя 5 мл, скорость истечения 1,5 мл/мин., 4°C, в течение 16 часов). Для промывания и уравновешивания колонки использовали буфер, состоящий из PBS и 500 мМ NaCl. Элюировали связанный IgG1 (50 мМ Na-ацетата, 500 мМ NaCl pH 3,5, после чего использовали тот же буфер с pH 3,0), нейтрализовали (2,5 М Трис > 11) и концентрировали при использовании ультрафильтрации до концентрации приблизительно 13 мг/мл.

Иммобилизованный папаин (Pierce, 20 мл кашицеобразной смеси) использовали для переваривания приблизительно 270 мг (в 12,5 мл) IgG1 при использовании 22 фракций в 1,5 мл реакционных пробирок Эппендорфа (инкубация в течение 16 ч, 37°C, скорость вращения 1400 об/мин). После обработки образцы центрифугировали, собирали супернатант, промывали осадок с помощью PBS, и оба супернатанта и осветленный промывочный раствор объединяли.

Переваренный образец вновь применяли к двум соединенным колонкам HiTrap MabSelectSuRe (2×5 мл), которые позволяют осуществлять разделение Fc и Fab материала. Соединенные изолированные фракции Fab В концентрировали с помощью ультрафильтрации до концентрации приблизительно 8 мг/мл (общий выход 120 мг). Дополнительно для дальнейшей очистки, использовали эксклюзионную хроматографию размеров с помощью Superdex75 (колонка 26/60, скорость истечения 2,5 мл/мин. при использовании PBS). После дополнительной концентрации и стерильной фильтрации заключительный выход Fab В составлял 115 мг при концентрации 8,5 мг/мл.

Аналитическую эксклюзионную хроматографию размеров (система Äkta Micro, S75 5/150 колонка, 100 мМ Трис HCl, pH 7,5) использовали для демонстрации образования комплекса Fab В/TFPIKD1+2 (фиг. 5). Для Fab В наблюдали неожиданно длительное время удержания на колонке SEC, что соответствовало кажущейся молекулярной массе 20 кДа, которая была подобной молекулярной массе, определенной для TFPIKD1+2.

Пример 9. Получение комплекса домен Кунитца 1+2 TFPI с Fab В.

Для формирования иммунного комплекса домен Кунитца 1+2 TFPI и Fab В комбинировали при соотношении приблизительно 1:1,5 (об./об.). Так, 3,85 мг концентрированного мономерного белка домена Кунитца 1+2 TFPI (из S100 соединенных фракций) смешивали с 7,4 мг Fab В (из SEC Superdex75) и инкубировали в течение 16 часов при 21°C. Образование комплекса демонстрировали с помощью аналитической SEC (S200/150) и Вестерн-блоттинга. Комплекс дополнительно очищали с помощью SEC (S200 26/26) в 10 мМ Трис-НСl pH 7,4 при использовании 150 мМ NaCl, концентрировали с помощью ультрафильтрации (Amicon, единица с интервалом отсечения 5 кДа) до концентрации 10,3 мг/мл, которую использовали для кристаллизации.

Пример 10. Кристаллизация и определение рентгеновской структуры комплекса TFPI-Fab В.

Кристаллизация.

Сокристаллы белковой конструкции, которая включает TFPI - домен Кунитца 1 (KD1), домен Кунитца 2 (KD2) и моноклональное TFPI антитело Fab В выращивали при 4°C при использовании способа сидячей капли. Белковый комплекс концентрировали до концентрации 10 мг/мл и кристаллизовали путем смешивания равного объема раствора белка и раствора в ячейке (20% PEG8000) в качестве преципитанта. Кристаллы появлялись через три дня.

Сбор данных и обработка.

Кристаллы быстро замораживали в жидком азоте с 30% глицерином в кристаллизационном буфере для криозащиты. Данные собирали при использовании канала синхротронного излучения BL14.1, BESSY

синхротрон (Berlin) на MAR CCD детекторе. Данные индексировали и обобщали при использовании XDS (W. Kabsch (2010) Acta Cryst. D66, 125-132) или IMOSFLM (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography (1994) Acta Cryst. D50, 760-763; A.G.W. Leslie, (1992), Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26), подготавливали для вычисления с помощью POINTLESS (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82), и масштабировали при использовании SCALA (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82). Кристаллы, дифрагированные вплоть до 2,3 Å, имели пространственную группу P2<sub>1</sub> с константами ячеек a=80,3, b=71,9, c=108,8; β=92,5° и двумя TFPI-KD1, -KD2 - Fab комплексами в ассиметричной единице.

Определение структуры и уточнение.

Совместные структуры TFPI-KD1, -KD2 и Fab моноклонального антитела разрешали с помощью молекулярного замещения при использовании PHASER (A.J. McCoy и др. (2007) J. Appl. Cryst. 40, 658-674) и публиковали рентгеновские структуры TFPI-KD2 (pdb код 1tfx) и Fab фрагмента (pdb код 1w72) в качестве исследовательских моделей. Перед проведением молекулярного замещения Fab и KD1 модели модифицировали с помощью CHAINSAW (N. Stein, (2008) J. Appl. Cryst. 41, 641 - 643). Итеративные циклы построения модели при использовании COOT (P. Emsley и др. (2010) Acta Cryst. D66:486-501) и определение максимальной правдоподобности уточнения при использовании REFMAC5.5 (G.N. Murshudov и др. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255) завершали построение модели. Участки hc Ser131 - hc Ser136 оба из Fab, остатки TFPI Asp1-Leu21, Asp149-Phe154 и KD1-KD2 линкерные остатки Arg78-Glu92 продемонстрировали слабую электронную плотность и не были включены в модель. Набор данных и статистика уточнения являются подытоженными в табл. 4.

Таблица 4. Набор данных и статистика уточнения для комплекса TFPI-Fab B

Длина волны	0,9184 Å
Разрешение (наивысшая оболочка)	47-2,3 (2,4-2,3) Å
Отражения (наблюдаемое оригинальное)	165457 / 36076
Завершенность <sup>a</sup>	97,8% (97,8%)
I/σ <sup>a</sup>	5,8 (2,0)
R <sub>объед.</sub> <sup>a,b</sup>	0,13 (0,52)
Пространственная группа	P2 <sub>1</sub>
Параметры единичной ячейки	
a	80,3 Å
b	71,9 Å
c	108,8 Å
β	92,5°
R <sub>крист.</sub> <sup>b</sup>	0,20
R <sub>свободн.</sub> <sup>c</sup>	0,27
Температурный коэффициент Уилсона	16,7 Å <sup>2</sup>
Среднеквадратическое отклонение длины связи <sup>e</sup>	0,008 Å
Среднеквадратическое отклонение углов связи <sup>e</sup>	1,3°
Атомы белка	8205
Молекулы воды	599

<sup>a</sup> Значения в скобках являются такими для высокого разрешения пустот;

<sup>b</sup>  $R_{объед.} = \frac{\sum hkl |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum hkl \langle I_{hkl} \rangle}$ , где  $I_{hkl}$  - интенсивность отражения hkl и  $\langle I_{hkl} \rangle$  - средняя интенсивность в соответствии с разными наблюдениями;

<sup>c</sup>  $R_{крист.} = \frac{\sum |F_{набл.} - F_{подсч.}|}{\sum F_{набл.}}$ , где  $F_{набл.}$  и  $F_{подсч.}$  представляют собой наблюдаемый и подсчитанный структурный фактор, соответственно;

<sup>d</sup> 5%-ная тестовая выборка;

<sup>e</sup> среднеквадратическое отклонение набора параметров от идеальной стереохимии.

Пример 11. Картирование эпитопа на основе рентгеновской структуры.

Комплекс TFPI-KD1, -KD2 и Fab B (фиг. 6) кристаллизовался в виде двух копий комплекса на ассиметрическую единицу. Основные цепи комплексов перекрывались со значением среднеквадратического отклонения (RMSD) 1,0 Å с каждым Fab B, связанным с эпитопом ассоциированного TFPI-KD1 и -KD2. Оба домена Кунитца взаимодействовали непосредственно или посредством опосредованных водой взаимодействий с Fab B. KD1 и KD2 также взаимодействовали друг с другом. Остатки TFPI в контакте с Fab B (эпитоп) и соответствующая углубленная поверхность подвергались анализу при использовании CCP4 программы AREAIMOL (P. J. Briggs (2000) CCP4 Newsletter No. 38). Остатки с минимальным значением

5 Å<sup>2</sup> углубленной поверхности или более чем 50% углубленной поверхности считались контактными (табл. 6).

Таблица 5. Остатки TFPI, находящиеся в контакте с Fab В. Цепи С, D и цепи N, O соответствуют домену Кунитца 1 и домену Кунитца 2 TFPI соответствующего комплекса в ассиметричной единице

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Phe C 28	3.4	4.1
Asp C 31	26.2	47.3
Asp C 32	6.8	73.9
Gly C 33	7.6	100.0
Pro C 34	87.2	97.2
Cys C 35	45.7	93.4
Lys C 36	139.6	72.4
Ala C 37	0.9	2.2
Ile C 38	3.0	2.1
Cys C 59	11.3	34.7
Glu C 60	83.9	60.4
Gly C 61	0.5	1.4
Asn C 62	4.1	11.2

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Glu D 100	83.2	53.9
Glu D 101	80.8	93.4
Pro D 103	57.4	85.7
Gly D 104	16.6	68.3
Ile D 105	11.4	61.2
Cys D 106	12.5	32.2
Arg D 107	116.8	73.2
Gly D 108	18.6	49.4
Tyr D 109	133.5	74.6
Phe D 114	8.5	72.0
Asn D 116	8.3	24.5
Glu D 123	45.5	56.5
Arg D 124	9.9	6.0
Phe D 125	0.1	0.9
Lys D 126	29.2	39.0
Tyr D 127	1.3	7.1
Gly D 128	6.5	67.0

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Lys N 29	1.1	1.2
Asp N 31	28.9	49.4
Asp N 32	10.2	91.8
Gly N 33	12.5	100.0
Pro N 34	87.9	97.2
Cys N 35	42.1	86.0
Lys N 36	142.5	74.2
Ile N 38	4.3	3.2
Cys N 59	11.9	38.5
Glu N 60	71.7	53.0
Gly N 61	0.4	1.0
Asn N 62	7.0	20.2

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Glu O 100	65.1	44.3
Glu O 101	84.8	97.0
Pro O 103	60.2	84.0
Gly O 104	13.6	64.7
Ile O 105	11.6	67.4
Cys O 106	12.7	37.0
Arg O 107	101.3	69.1
Gly O 108	19.7	52.5
Tyr O 109	139.6	76.4
Thr O 111	0.1	0.1
Phe O 114	11.5	78.2
Asn O 116	13.4	34.6
Glu O 123	24.1	35.9
Arg O 124	11.1	6.7
Phe O 125	0.1	1.2
Lys O 126	35.0	52.6
Tyr O 127	1.2	8.1
Gly O 128	6.4	58.1

Таблица 6. Остатки Fab В, находящиеся в контакте с TFPI. Цепи А, В и цепи L, М представляют собой легкую и тяжелую цепи Fab В соответствующего комплекса в асимметричной единице

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Leu A 27	1.8	39.1
Arg A 28	20.7	13.5
Asn A 29	44.6	38.6
Tyr A 30	56.0	57.7
Tyr A 31	96.9	76.7
Tyr A 48	43.0	75.8
Tyr A 49	39.2	90.7
Asp A 50	16.5	56.7
Asn A 52	10.3	16.8
Pro A 54	10.4	34.2
Ser A 55	5.0	3.9
Asn A 65	6.3	13.4
Trp A 90	19.2	45.9
Asp A 92	13.6	10.2
Gly A 93	8.7	37.8
Gln B 1	12.6	6.8
Gly B 26	29.6	58.6
Phe B 27	21.1	57.9
Thr B 28	56.9	65.0
Arg B 30	32.0	19.2
Ser B 31	52.2	65.9
Tyr B 32	54.0	94.9
Arg B 52	8.0	6.2
Arg B 98	7.0	49.2
Tyr B 100	92.2	98.6
Arg B 101	106.6	71.6
Tyr B 102	80.2	79.4
Trp B 103	21.7	87.7
Asp B 105	15.3	42.6
Tyr B 106	13.7	15.2
Leu L 27	4.2	61.7
Arg L 28	22.2	15.5
Asn L 29	43.0	33.6
Tyr L 30	58.2	67.3
Tyr L 31	103.4	80.3
Tyr L 48	48.7	83.8
Tyr L 49	37.5	88.8
Asp L 50	15.5	59.1
Asn L 52	8.6	14.8
Pro L 54	12.9	45.4
Ser L 55	9.8	8.0
Asn L 65	3.9	7.7
Gly L 67	0.1	0.3
Trp L 90	20.3	48.3
Asp L 92	1.9	1.5
Gly L 93	18.4	49.4
Val M 2	1.6	4.3
Gly M 26	34.2	62.2
Phe M 27	18.2	62.1
Thr M 28	64.4	69.7
Arg M 30	27.1	18.8
Ser M 31	51.5	63.7
Tyr M 32	55.3	95.3
Arg M 52	7.4	6.2
Arg M 98	8.5	57.0
Tyr M 100	86.9	98.3
Arg M 101	110.8	74.4
Tyr M 102	82.8	81.0
Trp M 103	18.5	91.1
Asp M 105	17.3	48.7
Tyr M 106	13.5	15.0

Fab В узнавал нелинейный эпитоп KD1 и KD2, который определяется остатками Asp31-Lys36, Cys59 (который формирует дисульфидный мостик с Cys35), Glu60 и Asn62 TFPI-KD1 и Glu100, Glu101, участком Pro103-Cys106 (который формирует дисульфидный мостик с Cys130), остатками Arg107-Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124 и остатками Lys126-Gly128 TFPI-KD2. Паратоп в Fab В, который

взаимодействует с TFPI-KD1, включает *lc* Leu27-*lc* Tyr31, *lc* Asp50, *lc* Asn65, *lc* Tyr90, *lc* Asp92, *lc* Gly93, а также *hc* Arg101 и *hc* Tyr102. Паратоп в Fab B, который взаимодействует с TFPI-KD2, включает *lc* Tyr31, *lc* Tyr48 и *lc* Tyr49, а также *hc* Thr28, *hc* Arg30-*hc* Tyr32, *hc* Tyr100, *hc* Arg101, *hc* Trp103 и *hc* Asp105. CDR легкой цепи, как выяснилось, представляют собой основные сайты взаимодействия для TFPI-KD1, CDR тяжелой цепи, как выяснилось, представляют собой основные сайты взаимодействия для TFPI-KD2, на основе количества контактов.

Нелинейный эпитоп на TFPI-KD1 состоит из петлевых участков, связанных дисульфидным мостиком между Cys35 и Cys59. Эпитоп характеризуется центральным гидрофобным взаимодействием Pro34, окруженного треугольником полярных взаимодействий Asp31, Asp32, Glu6, и Lys36 с Fab B (фиг. 7).

Pro34 лежит в гидрофобной выемке, которая образуется *lc* Tyr30 и *lc* Tyr31 CDR-L1, *lc* Trp90 CDR-L3 и *hc* Tyr102 CDR-H3. Asp31 и Asp32 имеют полярное взаимодействие с CDR-H3 и сетью гидрофобной связи с *hc* Arg101, *hc* Tyr10, и молекулой воды. Боковая цепь *hc* Tyr102 является хорошо ориентированной для того, чтобы создавать гидрофобное взаимодействие с Pro34, полярное взаимодействие с Asn31 и ароматическое  $\pi$ - $\pi$  взаимодействие с *lc* Tyr90 CDR-L3.

Взаимодействие между Asp31 и Asp32 с CDR-H3 представляет собой ключевую характеристику эпитопа, и ориентации и взаимодействия *hc* Tyr102 и *hc* Arg101 являются критическими. Мутация остатка дикого типа *hc* Lys99 на лейцин приводила к 20-кратному повышению аффинности. *hc* Leu99 располагается на границе гидрофобного взаимодействия между легкой и тяжелой цепью, после чего следует CDR-H3 петля. Полярная и гибкая боковая цепь лизина представляет собой недостаток в этом положении и препятствует образованию оптимальной конформации CDR-H3 и антигенным взаимодействиям.

Glu60, который формирует второй угол полярного треугольника, взаимодействует с боковыми цепями *lc* Tyr30 (CDR-L1), *lc* Trp90 и с азотом главной цепи *lc* Gly93 (CDR-L3). Третий угол треугольника формируется с помощью Lys36. Lys36 представляет собой существенный остаток для ингибирования комплекса фактор VIIa/тканевой фактор с помощью TFPI (M.S. Vajaj и др. (2001) *Thromb Haemost* 86(4):959-72.). В комплексе с Fab B, Lys36 существенно контактирует и прикрывается CDR-L1 *lc* Leu27, *lc* Arg28, *lc* Asn29, *lc* Tyr31, CDR-L2 *lc* Asp50 и молекулой воды. Взаимодействие Lys36 с комплексом фактор VIIa/тканевой фактор при связывании с Fab B и его ингибирование, как выяснилось, исключается.

Нелинейный эпитоп на TFPI-KD2 состоит из трех секций, включающих остатки Glu100, Glu101, Pro103-Tyr109, Phe114; Asn116 и Glu123; Arg124, Lys126-Gly128. KD2-эпитоп формирует полярные и гидрофобные взаимодействия с Fab B CDR-L1, -L2, -H1, и -H3 (фиг. 8).

Glu100, Glu101, Arg107 и Tyr109 представляют собой ключевые остатки эпитопа, которые обеспечивают сильные полярные или гидрофобные якорные точки в контакте с тремя отдельными поверхностными участками Fab B, которые создаются CDR-H1 (взаимодействие с Glu100 и Glu101), CDR-L1, -L2, -H3 (взаимодействие с Arg107), и CDR-L2, -H3 (взаимодействие с Tyr109).

Arg107 в значительной степени контактирует с *lc* Tyr31, *lc* Tyr49, *hc* Arg101 и *hc* Tyr102 CDR-L1, -L2, -H3, соответственно, и дополнительно взаимодействует с Gly33 и Cys35 KD1. Arg107 был продемонстрирован как существенный для ингибирования фактора Ха (M.S. Vajaj и др. (2001) *Thromb Haemost* 86(4):959-72.). Fab B охватывает этот критический остаток и исключает функцию Arg107 в ингибировании фактора Ха.

Glu100 и Glu101 образуют водородную связь с остатками *hc* Arg30, *hc* Ser31, и *hc* Thr28 и *hc* Tyr32 CDR-H1.

Tyr109 лежит в гидрофобной нише, которая образуется CDR-L2 *lc* Tyr48, и CDR-H3 остатками *hc* Tyr100 и *hc* Trp103, и формирует водородную связь с *hc* Asp105.

Пример 12. Сравнение паратопов Fab B и его оптимизированного варианта Fab D.

Для оценки однородности связывания TFPI эпитопа с помощью оптимизированного варианта Fab B, Fab D, анализировали выравнивание последовательностей легкой и тяжелой цепей (фиг. 12A) и модели гомологии Fab D (фиг. 12B) для сохранения остатков паратопа Fab B в Fab D. Модели гомологии рассчитывали с помощью DS MODELER (ACCELRY, Inc; Fiser, A. и Sali A. (2003) *Methods in Enzymology*, 374: 463-493) при использовании нашей рентгеновской структуры TFPI-Fab B в качестве структуры шаблона. Модели гомологии показали почти идентичные конформации скелетов по сравнению с Fab B со значением RMSD < 0,5 Å. Из 29 остатков паратопа, которые наблюдали в TFPI-Fab B комплексе, семь остатков (пять остатков легкой цепи, два остатка тяжелой цепи) отличались в Fab D (фиг. 12). *lc* Arg28; *lc* Asn29, *lc* Asp92 и *lc* Gly93 показали взаимодействия основной цепи с остатками TFPI эпитопа. Замены этих остатков в Fab D не предполагались как такие, которые индуцируют связывание с отличным эпитопом TFPI. Заменой *lc* Tyr48 и *hc* Gln1 фенилаланином и глутаматом в Fab D пренебрегали, поскольку не наблюдали никаких взаимодействий полярной боковой цепи в рентгеновской структуре. *hc* Arg30 продемонстрировал полярное взаимодействие с Glu100 TFPI и заменялся на серин в Fab D. В этом положении аргинин был бы более предпочтительным по сравнению с серином для взаимодействия с TFPI. Основываясь на ожидаемом влиянии проанализированных замен между остатками Fab B и Fab D паратопа, общее сохранение последовательности и низкое значение RMSD модели гомологии Fab D, Fab D рассматривался для узнавания того же TFPI эпитопа, что и Fab B.

Пример 13. Объяснение, которое основывается на рентгеновской структуре, для ингибирования взаимодействия TFPI с фактором Ха и комплексом фактора VIIa/тканевого фактора Fab В связывается как с KD1, так и KD2 TFPI. KD2 связывает и ингибирует фактор Ха. KD1 связывает и ингибирует комплекс фактора VIIa/тканевого фактора. Была описана рентгеновская структура KD2 в комплексе с трипсином (M.J. Burgering и др. (1997) *J Mol Biol.* 269(3):395-407), и BPTI в комплексе с внеклеточной частью TF и фактора VIIa (E. Zhang и др. (1999) *J Mol Biol* 285(5):2089-104.). Трипсин представляет собой заместитель для фактора Ха, BPTI является гомологом TFPI-KD1. Перекрытие комплекса TFPI-Fab В либо с KD2-трипсин, либо с BPTI-фактор VIIa/тканевой фактор выявило, что связывание антитела исключает связывание KD1 и KD2 с их природными лигандами фактором VIIa/тканевым фактором и фактором Ха, соответственно (фиг. 9, фиг. 10).

Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано со ссылкой на специфические воплощения и примеры, будет понятным, что могут быть сделаны различные модификации и изменения, и эквиваленты могут быть замещены без отступления от настоящего духа и объема изобретения. Описание и примеры, соответственно, рассматриваются больше в иллюстративном, но не ограничивающем смысле. Кроме того, все статьи, книги, патентные заявки и патенты, которые упоминаются в данной заявке, являются введенными в нее в качестве ссылки в своей целостности.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека, содержащим по крайней мере один остаток, выбранный из группы, включающей Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь Fab-фрагмента, имеющую последовательность SEQ ID NO: 4, и тяжелую цепь Fab-фрагмента, имеющую последовательность SEQ ID NO: 5.

2. Выделенное моноклональное антитело по п.1, которое связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Выделенное моноклональное антитело по п.1, которое связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, остатки Ile105 и Asp102 последовательности SEQ ID NO: 1.

4. Выделенное моноклональное антитело по п.1, которое связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, остатки Ile105, Asp102 и Leu131 последовательности SEQ ID NO: 1.

5. Выделенное моноклональное антитело по пп.2-4, которое связывается с эпитопом, дополнительно содержащим один или более остатков, выбранных из группы, включающей Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO: 1.

6. Выделенное моноклональное антитело по п.1, которое связывается с эпитопом, дополнительно содержащим по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, включающей Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1.

7. Выделенное моноклональное антитело по п.6, которое связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, остаток Pro34 последовательности SEQ ID NO: 1.

8. Выделенное моноклональное антитело по п.6, которое связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, остатки Pro34 и Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1.

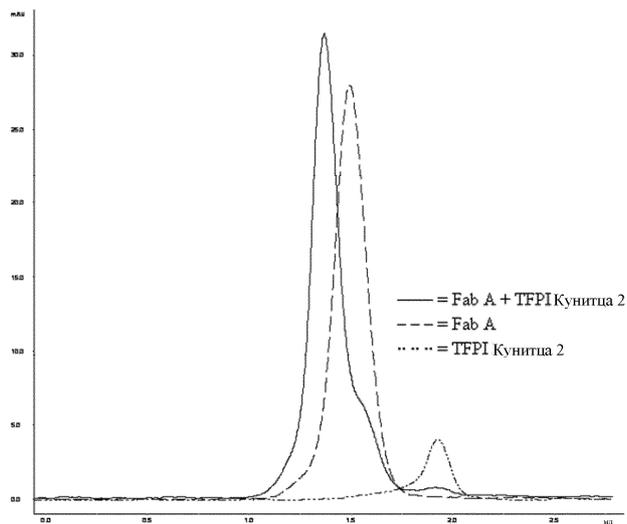
9. Выделенное моноклональное антитело по п.6, которое связывается с эпитопом, содержащим, по меньшей мере, остатки Pro34, Lys36 и Glu60 последовательности SEQ ID NO: 1.

10. Выделенное моноклональное антитело по любому из пп.7-9, которое связывается с эпитопом, дополнительно содержащим один или более остатков, выбранных из группы, включающей Asp31, Asp32, Gly33, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO: 1.

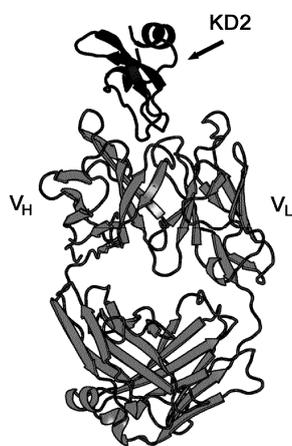
11. Фармацевтическая композиция для лечения генетических или приобретенных дефицитов или нарушений коагуляции, включающая терапевтически эффективное количество моноклонального антитела по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Способ сокращения времени кровотечения, который включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.11 пациенту.

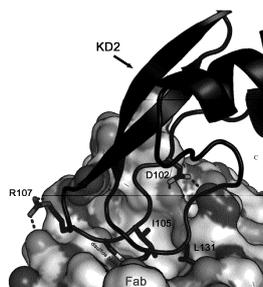
13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует моноклональное антитело по любому из пп.1-10.



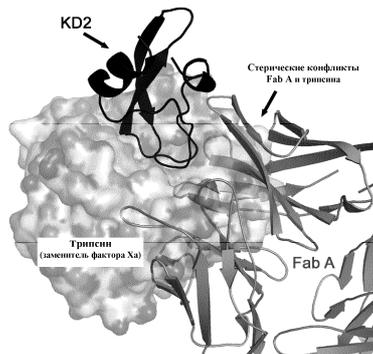
Фиг. 1



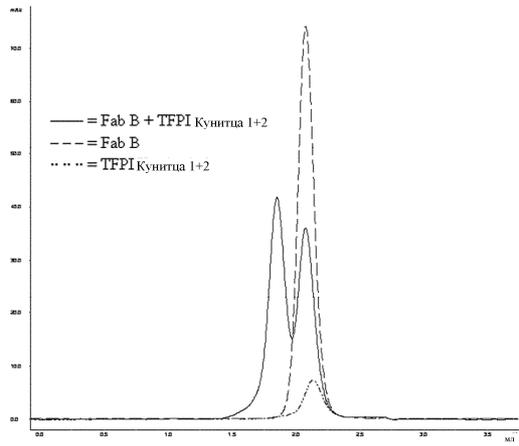
Фиг. 2



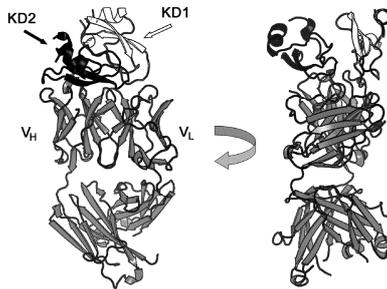
Фиг. 3



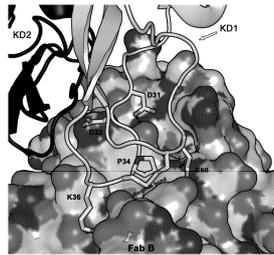
Фиг. 4



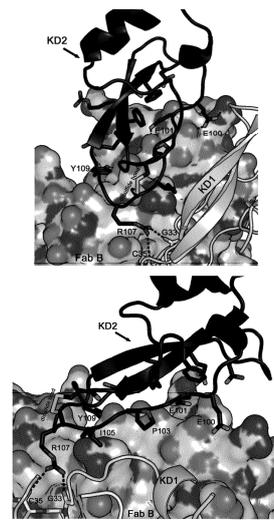
Фиг. 5



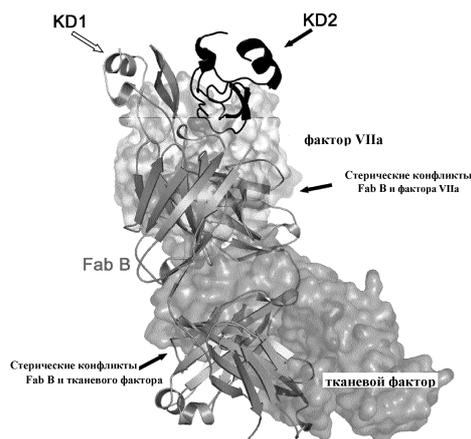
Фиг. 6



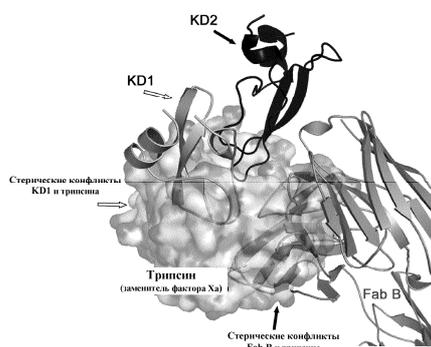
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

## A

## Легкая цепь:

Fab A: 1 DIVMTQSPFLSLPVTPEPASISCRSSQSLVFS~~DN~~TYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA 60  
 DIVMTQSPFLSLPVTPEPASISCRSSQSLVFDGTYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA  
 Fab C: 1 DIVMTQSPFLSLPVTPEPASISCRSSQSLVFRDGIYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA 60

Fab A: 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCC~~QYDSYPL~~TFGQGTKVEIKRTVAAPSV 120  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCCQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV  
 Fab C: 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCCQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV 120

Fab A: 121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL 180  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
 Fab C: 121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL 180

Fab A: 181 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE 218  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 Fab C: 181 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE 218

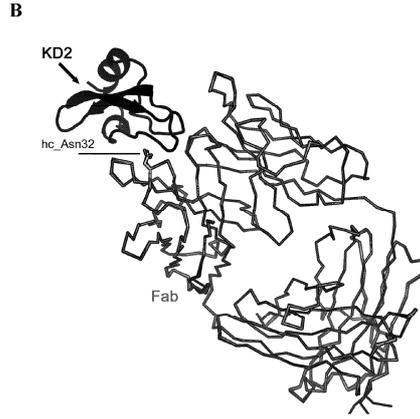
## Тяжелая цепь:

Fab A: 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL~~SLTCAISGDSVSSNS~~AAWSWIRQSPGRGLEWLG~~LIYRSK~~WY 60  
 QVQLQQSGPGLVKPSQTL~~SLTCAISGDSVSS~~SAAWSWIRQSP RGLEWLGIIY RSKWY  
 Fab C: 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL~~SLTCAISGDSVSSD~~SAAWSWIRQSP RGLEWLGIIYRSKWY 60

Fab A: 61 ~~NR~~YAVSVKSRI TINPDTSKNQFSLQ~~LN~~SVTP~~ЭД~~TAVYYCAR~~WHS~~DKHWGFDYWGQGLT 120  
 NRYAVSVKSRI TINPDTSKNQFSLQ~~LN~~SVTP~~ЭД~~TAVYYCAR~~WHS~~DKHWGFDYWGQGLT  
 Fab C: 61 NRYAVSVKSRI TINPDTSKNQFSLQ~~LN~~SVTP~~ЭД~~TAVYYCAR~~WHS~~DKHWGFDYWGQGLT 120

Fab A: 121 VSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL 180  
 VSSASTKGPSVFPPLAP S+STS TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 Fab C: 121 VSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL 180

Fab A: 181 QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK 224  
 QSSGLYSLSVVTVPSS+ GTQTY CNV+HKPSNTKVDK VE K  
 Fab C: 181 QSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVHDKPSNTKVDKTVK 224



Фиг. 11

**A**

**Легкая цепь:**

```

Fab B: 1  DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRNYYAHWYQQKPGQAPVWVIYVDNRPSPGIPER 60
          ELTQPPSVSV+PGQTARI+CSGDNL  YYAHWYQQKPGQAPVWVI+YD  NRPSGIPER
Fab D: 1  SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDNLPRKYAHWYQQKPGQAPVWVIYVDNRPSPGIPER 60

Fab B: 61  FSGSNSGNTATLTIISGTQAEDEADYYCQSWDDGVPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120
          FSGSNSGNTATLTIISGTQA  DEADYYCQ+W  PVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
Fab D: 61  FSGSNSGNTATLTIISGTQAMDEADYYCQAWWSSTPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120

Fab B: 121  SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL 180
          SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK  DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL
Fab D: 121  SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL 180

Fab B: 181  TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS 212
          TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Fab D: 181  TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS 212
    
```

**Тяжелая цепь:**

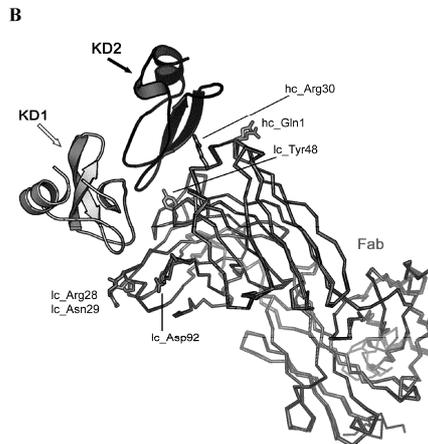
```

Fab B: 1  QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYGMSWVRQAPGKLEWVSSIRGSSSSSTYY 60
          +V+LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF  SYGM WVRQAPGKLEWVSSIRGS  STYY
Fab D: 1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKLEWVSSIRGSRGSTYY 60

Fab B: 61  ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST 120
          ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST
Fab D: 61  ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST 120

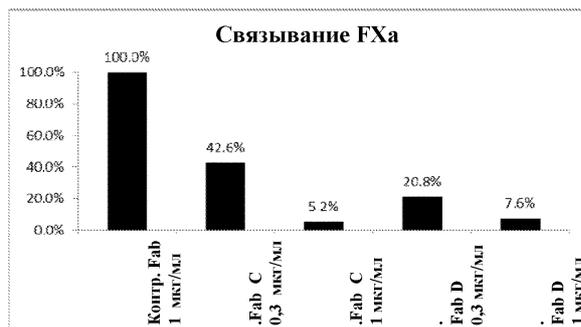
Fab B: 121  KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFTFPAVLQSSGLY 180
          KGPSVFPPLAP S+STS  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFTFPAVLQSSGLY
Fab D: 121  KGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFTFPAVLQSSGLY 180

Fab B: 181  SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC 220
          SLSSVTVPSS+ GTQTY  CNV+HKPSNTKVDK  VE K C
Fab D: 181  SLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKC 220
    
```

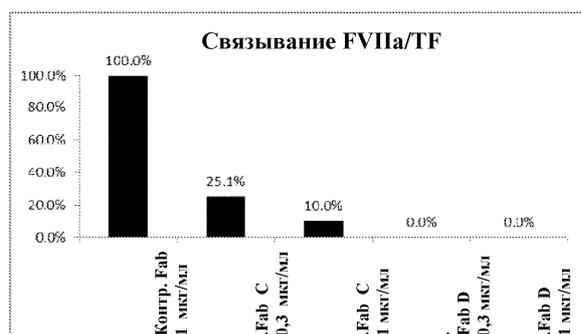


Фиг. 12

А



В



Фиг. 13

