

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036490**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.17

(21) Номер заявки
201791898

(22) Дата подачи заявки
2015.12.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/36** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С TFPI, И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ КОМПОЗИЦИЯ

(31) 10-2015-0026555; 10-2015-0135761

(32) 2015.02.25; 2015.09.24

(33) KR

(43) 2018.03.30

(86) PCT/KR2015/014370

(87) WO 2016/137108 2016.09.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МОГАМ ИНСТИТУТ ФОР
БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (KR)**

(72) Изобретатель:
**Ким Тон-Сик, Ли Ми Чон, Пак Чэ
Чан, Ли Сумин, Квак Хичун, Хван
СонХо, Лим Хён-Квон, Ким Кису, Пак
Юн Соуб, Чон Чонхон, Чо Ки Чун
(KR)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A2-2010017196
NCBI Reference Sequence: XP_004032982.1
(03 December 2012). See the whole document
US-A1-20140275493
WO-A1-2011109452
MARONEY et al., "Absence of hematopoietic
tissue factor pathway inhibitor mitigates bleeding in
mice with hemophilia". PNAS, Vol. 109, No. 10, p.
3927-3931 (2012). See abstract

(57) Изобретение относится к антителам, специфично связывающимся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI), к полинуклеотидам, кодирующим эти антитела, к векторам, содержащим указанные полинуклеотиды, к клеткам-хозяевам, трансформированным указанными векторами, к способу получения указанных антител и к фармацевтической композиции для лечения гемофилии, которая содержит указанные антитела в качестве активного ингредиента. Антитела по данному изобретению, специфично связывающиеся с TFPI, способны активировать внешний путь свертывания крови путем ингибирования TFPI. Таким образом, антитела по данному изобретению можно эффективно использовать для лечения больных гемофилией, обусловленной антителами, и предотвращения нарушений свертывания крови при гемофилии А или В.

B1**036490****036490****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к антителам, связывающимся с ингибитором внешнего пути свертывания крови (ингибитором пути тканевого фактора, TFPI), к полинуклеотидам, кодирующим эти антитела, к векторам, содержащим эти полинуклеотиды, к клеткам-хозяевам, содержащим эти векторы, к способу получения указанных антител, и к фармацевтической композиции для лечения гемофилии, содержащей эти антитела в качестве активного ингредиента.

Уровень техники

Известно, что у 30% больных гемофилией А и В образуются антитела против белка, называемого фактором свертывания крови VIII (FVIII), или против белка, называемого фактором свертывания крови IX (FIX), которые используются для лечения этих заболеваний, что значительно снижает терапевтическую эффективность указанных белков. В качестве альтернативы факторам VIII и IX используют введение активированного фактора VIIa или получаемого из плазмы крови активированного концентрата протромбинового комплекса (aPCC).

Указанные выше рекомбинантные белки вводят больным гемофилией путем внутривенной инъекции два раза в неделю или чаще. Однако для пациента всегда с такими повторными введениями всегда связаны неудобство и дискомфорт, поэтому активно исследовалась возможность использования длительно действующих рекомбинантных белков с увеличенным временем полужизни.

В последнее время на моделях гемофилии делаются попытки применить подход, направленный против ингибитора внешнего пути свертывания крови (ингибитора пути тканевого фактора, TFPI). Белок TFPI участвует во внешнем пути свертывания крови; его функцией является подавление свертывания крови путем предотвращения активации фактора X комплексом тканевого фактора с фактором VIIa (TF/FVIIa); см. фиг. 1. Таким образом, при ингибировании белка TFPI направленными против него антителами свертывание крови в случае кровотечения может активироваться внешним путем.

Белок TFPI состоит из трех ингибиторных доменов Кунитца (KPI), причем домен Кунитца 2 (KPI-2) ингибирует фактор Ха, непосредственно связываясь с ним (см. фиг. 2). Это означает, что KPI-2 образует комплекс TF/FVIIa/FXa/TFPI, в результате чего прямо подавляется образование фактора Ха.

Антитела против TFPI можно использовать применительно к больным, у которых образуются антитела против фактора свертывания крови VIII или IX. Кроме того, антитела против TFPI отличаются очень продолжительным временем полужизни - около двух недель, и поэтому частоту их введения можно сократить.

Терапевтические агенты для лечения гемофилии, нацеленные на TFPI, в настоящее время по большей части находятся еще только на стадии исследований или начальных этапов разработки. Например, разработанные в компании Novo Nordisk моноклональные антитела mAb2021, которые представляют собой моноклональные гуманизированные антитела (IgG4) против TFPI, проходят первую фазу клинических испытаний. Разработка продукта ARC19499, созданного в компании Baxter и представляющего собой пэгилированный аптамер - олигонуклеотид с присоединенным полиэтиленгликолем (PEG), мишенью которого является TFPI, еще не дошла до клинических испытаний. Также в стадии доклинических исследований находится продукт JBT2329, разработанный в Baxter & 3B Pharmaceuticals и представляющий собой пэгилированный пептид из 20 аминокислотных остатков, направленный против человеческого TFPI.

Сейчас постоянно говорят о настоятельной потребности в новых агентах для лечения гемофилии и необходимости разработки терапевтических агентов, которые бы действовали иначе, нежели такие агенты, как фактор свертывания крови VIIa, действующий "в обход" системе коагуляционного каскада. В частности, предпочтительны препараты, подавляющие механизм, определяемый TFPI. Среди больных гемофилией, которым вводится какой-либо фактор свертывания крови, есть такие индивиды, которые резистентны к вводимому фактору, так что для них нужно иное, новое лекарство. Но при этом следует учитывать такие медицинские показатели, как клиренс комплекса антиген-антитело (Ag-Ab).

В соответствии со сказанным выше авторы данного изобретения приложили значительные усилия для разработки новых антител, специфично связывающихся с TFPI, и в результате этих работ обнаружили, что при использовании таких антител возможна активация внешнего пути свертывания крови путем подавления противосвертывающего эффекта TFPI; в итоге и возникло данное изобретение.

Раскрытие изобретения

Техническая задача.

Цель данного изобретения состоит в том, чтобы предложить новые антитела, специфично связывающиеся с TFPI; полинуклеотиды, кодирующие эти антитела; векторы, содержащие указанные полинуклеотиды; клетки-хозяева, несущие указанные векторы; способ получения этих антител; фармацевтическую композицию для лечения гемофилии, обусловленной антителами, или для предотвращения нарушений свертывания крови у больных гемофилией А и гемофилией В, которая содержит в качестве активного ингредиента антитела по данному изобретению и может подавлять активность TFPI, тем самым активируя внешний путь свертывания крови.

Решение технической задачи.

Для достижения описанной выше цели данным изобретением предлагаются антитела, специфично связывающиеся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI), представленного последовательностью SEQ ID NO: 39.

Данным изобретением также предлагаются полинуклеотиды, кодирующие антитела против TFPI; векторы, содержащие эти полинуклеотиды; и клетки-хозяева, несущие введенные в них указанные векторы.

Данным изобретением также предлагается фармацевтическая композиция для лечения гемофилии, содержащая в качестве активного ингредиента антитела против TFPI.

Краткое описание иллюстраций

Фиг. 1 - схема внешнего пути свертывания крови и место в нем TFPI.

Фиг. 2 схематически изображает структуру TFPI и функции доменов Кунитца (KPI).

Фиг. 3 представляет результаты электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) очищенных антител против TFPI клонов T417 и T308.

Фиг. 4 представляет аминокислотные последовательности антител против TFPI клона T417 и гуманизированных антител клона 308.

Фиг. 5 представляет аминокислотные последовательности антител против TFPI клонов 308-2 и 302-4, являющихся мутантными антителами клона 308.

Фиг. 6 представляет результаты электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) IgG клонов 308-2 и 302-4, являющихся мутантными антителами против TFPI клона 308.

Фиг. 7 представляет результаты электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) домена 2 Кунитца (KPI-2) TFPI различных животных и человека.

Фиг. 8 - графическое представление данных по аффинности антител против TFPI.

Фиг. 9 - графическое представление данных по оценке эффекта химерных антител против TFPI путем определения активности фактора свертывания крови Ха.

Фиг. 10 - графическое представление данных по оценке эффекта гуманизированных антител против TFPI путем определения активности фактора свертывания крови Ха.

Фиг. 11 - графическое представление данных по оценке эффекта антител против TFPI с обратными мутациями путем определения активности фактора свертывания крови Ха.

Фиг. 12 - графическое представление данных по оценке эффекта химерных антител против TFPI путем определения комплекса TF/FVIIa/FXa.

Фиг. 13 - графическое представление данных по оценке эффекта гуманизированных антител против TFPI путем определения комплекса TF/FVIIa/FXa.

Фиг. 14 - графическое представление данных по оценке эффекта антител против TFPI с обратными мутациями путем определения комплекса TF/FVIIa/FXa.

Фиг. 15 графическое представление данных по оценке эффекта химерных и гуманизированных антител против TFPI путем определения образования тромбина.

Фиг. 16 графическое представление данных по оценке эффекта антител против TFPI с обратными мутациями путем определения образования тромбина.

Фиг. 17 изображает предсказанную картину связывания молекулы антитела против TFPI клона 308 (изображена зеленым цветом) с доменом K2 человеческого TFPI (изображен красным цветом).

Фиг. 18 изображает предсказанную картину связывания варибельной области тяжелой цепи молекулы антитела против TFPI клона 308 с антигеном - человеческим TFPI.

Фиг. 19 изображает предсказанную картину связывания варибельной области легкой цепи молекулы антитела против TFPI клона 308 с антигеном - человеческим TFPI.

Фиг. 20-28 представляют результаты оценки эффектов антител против TFPI с созревшей аффинностью путем определения активности фактора Ха.

Фиг. 29-33 представляют результаты оценки эффектов антител против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FXa.

Фиг. 34 представляет результаты оценки эффектов антител против TFPI с созревшей аффинностью путем определения образования тромбина.

Наилучший вариант осуществления изобретения

Сообщалось, что ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) участвует во внешнем пути свертывания крови и подавляет этот процесс, препятствуя активации фактора X комплексом тканевого фактора с фактором VIIa (TF/FVIIa). Исходя из этого, авторы данного изобретения предприняли попытку сконструировать антитела для лечения или предотвращения гемофилии. В частности, объектом данного изобретения является активация внешнего пути свертывания крови с помощью антител, связывающих один из ингибиторных доменов Кунитца ингибитора пути тканевого фактора (KPI-2 TFPI). Антигенной областью TFPI, служащей мишенью антител по данному изобретению, является второй ингибиторный домен Кунитца (KPI-2), аминокислотная последовательность которого на 90% или более идентична у людей, кроликов и обезьян. Таким образом, при использовании домена KPI-2 TFPI возможны исследования на жи-

вотных и создание простой модели для определения скорости свертывания крови.

В настоящем документе термин "ингибитор внешнего пути свертывания крови/ингибитор пути тканевого фактора/TFPI" относится к любому варианту, изоформе или видоспецифичному гомологу человеческого TFPI, естественным образом экспрессирующимся в клетках. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения связывание антител по данному изобретению с TFPI приводит к сокращению продолжительности свертывания крови.

В одном из примеров по данному изобретению были получены изолированные человеческие моноклональные антитела, обладающие структурными признаками для специфичного связывания с TFPI, представленного последовательностью SEQ ID NO: 39; эти антитела названы "клон 308", "клон 308-2" и "клон 308-4". Аминокислотные последовательности участков, определяющих комплементарность (CDR), тяжелой и легкой цепей каждого из этих антител представлены в приведенных табл. 5 и 7. Как видно из приведенных табл. 4 и 6, антитела против TFPI могут содержать аминокислотные последовательности вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи и гомологичные им последовательности.

В другом примере по данному изобретению с помощью оптического биосенсора Biacore T-200 (производство GE Healthcare, США) количественно определяли сродство очищенных антител клонов T417, T308, 308, 308-2 или 308-4 к рекомбинантному человеческому TFPI (пример 6). В результате этих измерений оказалось, что, как видно из табл. 13 и фиг. 8, все полученные клоны антител несколько различались по своей аффинности к мишени. В частности, было показано, что у антител клонов 308-2 и 308-4 аффинность к мишени гораздо выше, чем у антител клона 308.

Таким образом, в одном из своих аспектов данное изобретение касается антител, специфично связывающихся с ингибитором внешнего пути свертывания крови (ингибитором пути тканевого фактора, TFPI), представленного SEQ ID NO: 39.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариательную область тяжелой цепи, включающую участок CDR1 тяжелой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 5, 11 или 23; участок CDR2 тяжелой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 6, 12, 26 или 27; и участок CDR3 тяжелой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 7 или 13.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариательную область тяжелой цепи, включающую участок CDR1 легкой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 8 или 14; участок CDR2 легкой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 9 или 15; и участок CDR3 легкой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 10 или 16.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариательную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно на 100% гомологична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, 3, 21, 24 или 25, и эти антитела могут содержать вариательную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно на 100% гомологична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 2, 4 или 22.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариательную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, 3, 21, 24 или 25 и вариательную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2, 4 или 22. Антитела по данному изобретению могут быть человеческими моноклональными антителами, но ими не ограничиваются.

В одном из примеров по данному изобретению были получены изолированные моноклональные антитела, обладающие структурными признаками для специфичного связывания с TFPI, представленного последовательностью SEQ ID NO: 39; эти антитела названы "клон 1001", "клон 1015", "клон 1021", "клон 1023", "клон 1024", "клон 1104", "клон 1123", "клон 1202", "клон 1208", "клон 1214", "клон 1216", "клон 1223", "клон 1224", "клон 1232", "клон 1234", "клон 1238", "клон 1243", "клон 1248", "клон 3007", "клон 3016", "клон 3024", "клон 3115", "клон 3120", "клон 3131", "клон 3203", "клон 3241", "клон 4011", "клон 4017", "клон 4034", "клон 4041", "клон 4141", "клон 4146", "клон 4206", "клон 4208", "клон 4278", "клон 4287", "клон 1", "клон 2", "клон 3", "клон 4", "клон 5", "клон 6", "клон 7", "клон 8", "клон 9", "клон 10", "клон 11", "клон 12", "клон 13", "клон 14", "клон 15", "клон 16", "клон 17", "клон 18", "клон 19", "клон 20", "клон 21", "клон 22", "клон 23", "клон A24", "клон A25", "клон A52", "клон A63", "клон A67", "клон A71" и "клон A74".

Аминокислотные последовательности участков CDR тяжелой и легкой цепей каждого из этих антител представлены в приведенных ниже табл. 20 и 23. Как видно из приведенных ниже табл. 19 и 22, антитела против TFPI могут содержать аминокислотные последовательности вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи и гомологичные им последовательности.

В другом примере по данному изобретению с помощью оптического биосенсора Biacore T-200 (производство GE Healthcare, США) количественно определяли сродство связывания очищенных антител

клонов 12, 1023, 1202 и 3241 к рекомбинантному человеческому TFPI (пример 13). В результате этих измерений оказалось, что, как видно из приведенной ниже табл. 24, все полученные клоны антител несколько различались по своей аффинности к мишени.

Таким образом, в одном из своих аспектов данное изобретение касается антител, специфично связывающихся с ингибитором внешнего пути свертывания крови (ингибитором пути тканевого фактора, TFPI), представленного SEQ ID NO: 39.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, включающую участок CDR1 тяжелой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 149, 157, 163, 172, 181, 182, 183, 188, 201 или 203; участок CDR2 тяжелой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 150, 155, 159, 162, 165, 166, 167, 168, 173, 184, 186, 187 или 202; и участок CDR3 тяжелой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 151, 156, 170, 174, 175 или 185.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, включающую участок CDR1 легкой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 152, 158, 160, 169, 171, 176, 177 или 178; участок CDR2 легкой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 153; и участок CDR3 легкой цепи, в котором имеется аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 154, 161, 164, 179 или 180.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно на 100% гомологична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 95, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 105, 107, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 195, 197, 198, 199 или 200, и эти антитела могут содержать вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно на 100% гомологична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 96, 101, 103, 106, 108, 111, 116, 122, 130, 139, 140, 147 или 196.

Антитела по данному изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 95, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 105, 107, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 195, 197, 198, 199 или 200, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 96, 101, 103, 106, 108, 111, 116, 122, 130, 139, 140, 147 или 196. Антитела по данному изобретению могут быть человеческими моноклональными антителами, но ими не ограничиваются.

В аминокислотной последовательности антител по данному изобретению могут быть консервативные замены. В настоящем документе термин "консервативная замена" относится к модификациям полипептида, включающим замену одного или более аминокислотных остатков на другие аминокислотные остатки со сходными биохимическими свойствами, так что такие замены не приводят к потере биологической или биохимической функции данного полипептида. Консервативная аминокислотная замена - это такая замена, когда какой-то аминокислотный остаток заменяется на другой аминокислотный остаток со сходной боковой цепью. В той области техники, к которой принадлежит данное изобретение, принято определенное разделение аминокислот на семейства, в пределах каждого из которых аминокислоты имеют сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), аминокислоты с полярными боковыми цепями, не несущими электрического заряда (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин и цистеин), аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан), аминокислоты с разветвлением боковой цепи по β -атому углерода (например, треонин, валин и изолейцин) и аминокислоты с ароматической боковой цепью (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин). Предполагается, что антитела по данному изобретению при наличии консервативных аминокислотных замен могут сохранять свою активность.

Термин "значительная степень гомологии" применительно к полинуклеотидам и полипептидам означает, что в двух полинуклеотидах или в двух полипептидах или в их заданных последовательностях при оптимальном выравнивании или сравнении с приемлемым количеством соответственно нуклеотидных или аминокислотных вставок или делеций идентичны по меньшей мере около 80% соответственно нуклеотидов или аминокислотных остатков, обычно по меньшей мере около 85%, предпочтительно по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94 или 95, более предпочтительно по меньшей мере около 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 или 99,5% соответственно нуклеотидов или аминокислотных остатков. Или же о значительной степени гомологии полинуклеотидов говорят, когда они гибридизуются избирательно (в жестких условиях) с соответственными комплементарными цепями. Данное изобретение включает также нуклеотидные и аминокислотные последовательности, имеющие значительную степень гомологии с

конкретными нуклеотидными и аминокислотными последовательностями, приведенными в настоящем документе.

Как видно из приведенных ниже табл. 2, 5 и 7, в антителах по данному изобретению аминокислотные последовательности участков CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи (V_H) и участков CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи (V_L) могут быть представлены смесью структурно сходных последовательностей тяжелых цепей (V_H) и легких цепей (V_L), образуя CDR1, CDR2 и CDR3, каждый из которых состоит из пары последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи (V_H/V_L).

Как видно из приведенных ниже табл. 20 и 23, в антителах по данному изобретению аминокислотные последовательности участков CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи (V_H) и участков CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи (V_L) могут быть представлены смесью структурно сходных последовательностей тяжелых цепей (V_H) и легких цепей (V_L), образуя CDR1, CDR2 и CDR3, каждый из которых состоит из пары последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи (V_H/V_L).

В настоящем документе термин "антитела" или "антительная композиция" относится к препарату молекул антител одного молекулярного состава. Композиция из моноклональных антител проявляет единую специфичность связывания и сродство к определенному эпитопу. Соответственно, термин "человеческие моноклональные антитела" относится к антителам, проявляющим единую специфичность связывания и содержащим вариабельную и константную области, происходящие из аминокислотных последовательностей человеческих иммуноглобулинов зародышевой линии. Человеческие антитела по данному изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые нуклеотидными последовательностями генов человеческих иммуноглобулинов зародышевой линии (например, в них могут быть мутации, возникшие путем случайного или же сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или соматические мутации, произошедшие *in vivo*).

В настоящем документе термин "антитела" относится к белковым молекулам, представляющим собой иммуноглобулины, иммунологически реакционноспособные, т.е. способные взаимодействовать с определенным антигеном, и служащие рецепторами, специфически распознающими данный антиген. Этот термин включает все поликлональные антитела, моноклональные антитела, полноразмерные антитела и фрагменты антител. Кроме того, этот термин включает химерные антитела (например, гуманизированные мышиные антитела), бивалентные или биспецифичные антительные молекулы (например, биспецифичные антитела), диантитела, триантитела и тетраантитела.

В молекуле полноразмерного антитела имеются две полноразмерных легких цепи и две полноразмерных тяжелых цепи, причем каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью дисульфидной связью. Полноразмерные антитела включают иммуноглобулины (IgA, IgD, IgE, IgM и IgG), и подтипы иммуноглобулинов G включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Термин "фрагмент антитела/антительный фрагмент" относится к фрагментам, обладающим функцией связывания антигена; подразумевается, что он включает Fab, Fab', F(ab')₂, scFv и Fv.

Фрагмент Fab содержит вариабельные области легкой и тяжелой цепей, константную область легкой цепи и первый домен константной области тяжелой цепи (C_H1); в таком фрагменте имеется один участок связывания антигена. Фрагмент Fab' отличается от Fab тем, что в нем присутствует шарнирный участок, включающий один или более остатков цистеина на C-конце домена C_H1 тяжелой цепи. Антитела F(ab')₂ образованы двумя фрагментами Fab', соединенными дисульфидной связью между остатками цистеина шарнирной области.

Фрагмент Fv (вариабельный фрагмент) - это минимальный антительный фрагмент, в котором имеются только вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи. Обозначение dsFv относится к антительной структуре, в которой вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи соединены друг с другом дисульфидной связью; обозначение scFv, как правило, относится к антительной структуре, в которой вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи соединены друг с другом ковалентно посредством пептидного линкера. Эти фрагменты антител можно получить с помощью протеаз (например, фрагменты Fab получают при расщеплении полноразмерной молекулы антитела папаином, а фрагменты F(ab')₂ получают при расщеплении полноразмерной молекулы антитела пепсином).

Предпочтительно получать указанные антительные фрагменты рекомбинантным путем, например путем амплификации в полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием ДНК, кодирующей тяжелую цепь нужного антитела или ее вариабельную область, и ДНК, кодирующей легкую цепь данного антитела или ее вариабельную область, в качестве матриц с подходящей парой праймеров и проводя амплификацию, используя комбинацию пар праймеров, так что ДНК, кодирующая пептидный линкер, соединяется с ДНК, кодирующей тяжелую цепь или ее вариабельную область, и с ДНК, кодирующей легкую цепь или ее вариабельную область.

В молекуле иммуноглобулина имеются легкие и тяжелые цепи, и в каждой из этих цепей имеются вариабельная и константная области (называемые также доменами). В вариабельных областях легких и тяжелых цепей имеются по четыре каркасных участка и по три гипервариабельных участка, называемых также участками, определяющими комплементарность (CDR). Участки CDR в основном обеспечивают связывание с эпитопом антигена. В каждой цепи участки CDR, как правило, обозначают CDR1, CDR2 и

CDR3, причем нумерация последовательная начиная с N-конца полипептидной цепи; кроме того, обычно указывается, в какой цепи находится данный CDR.

Термин "моноклональные антитела" в настоящем документе относится к молекулам антител одного молекулярного состава, полученных из популяции в основном одинаковых антител. Моноклональные антитела проявляют единую специфичность связывания и сродство к определенному эпитопу.

В настоящем документе термин "моноклональные антитела" относится к молекулам, происходящим из человеческих иммуноглобулинов и имеющим аминокислотную последовательность полноразмерного антитела, включая участки, определяющие комплементарность, и каркасные участки, которая состоит из аминокислотной последовательности человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела обычно используются для лечения заболеваний людей, поскольку обладают следующими преимуществами. Во-первых, человеческие антитела способны легче, чем какие-либо другие антитела, взаимодействовать с иммунной системой человека, так что клетки-мишени разрушаются более эффективно за счет, например, цитотоксичности, зависимой от комплемента (CDC) или клеточно-опосредованной цитотоксичности, зависимой от антител (ADCC). Во-вторых, иммунная система человека не реагирует на такие антитела как на поступившие извне. В-третьих, при введении таких антител в небольшом количестве и с невысокой частотой время полужизни их в кровотоке сходно с таковым антител, присутствующих в крови от природы.

Таким образом, антитела по данному изобретению представляют собой моноклональные антитела, специфично связывающиеся с TFPI, причем обладают высокой аффинностью к этому белку. И поскольку антитела по данному изобретению, имея человеческое происхождение, отличаются низкой иммуногенностью, они эффективно используются для лечения таких заболеваний, как гемофилия, обусловленная антителами (гемофилия А или гемофилия В).

В настоящем документе выражение "клон Т417/клон Т308/клон 308/клон 308-2/клон 308-4, специфично связывающийся с TFPI" означает антитела, которые связываются с TFPI, в результате чего подавляется биологическая активность TFPI. Это выражение может употребляться синонимично термину "антитела против TFPI". В настоящем документе клон Т417 и клон Т308 - это антитела, выделенные у мышей после иммунизации рекомбинантным человеческим TFPI, а клон 308 - это антитела, полученные путем гуманизации клона Т417; клон 308-2 и клон 308-4 - это антитела, полученные в результате мутации, а именно замены лизина (К) в тяжелой цепи клона 308 на глутамин (Q) или глутамат (Е) соответственно (см. фиг. 5).

Константа диссоциации (K_D) для антител против TFPI может быть, например, следующих значений. Для клона 308 K_D составляет $5,5 \times 10^{-11}$ М или меньше, предпочтительно $5,25 \times 10^{-11}$ М или меньше, более предпочтительно $5,0 \times 10^{-12}$ М или меньше; для клона 308-2 K_D составляет $3,63 \times 10^{-11}$ М или меньше, предпочтительно $3,465 \times 10^{-11}$ М или меньше, более предпочтительно $3,3 \times 10^{-11}$ М или меньше; для клона 308-4 K_D составляет $2,64 \times 10^{-11}$ М или меньше, предпочтительно $2,52 \times 10^{-11}$ М или меньше, более предпочтительно $2,4 \times 10^{-11}$ М или меньше.

В настоящем документе выражение "клон 1001/клон 1015/клон 1021/клон 1023/клон 1024/клон 1104/клон 1123/клон 1202/клон 1208/клон 1214/клон 1216/клон 1223/клон 1224/клон 1232/клон 1234/клон 1238/клон 1243/клон 1248/клон 3007/клон 3016/клон 3024/клон 3115/клон 3120/клон 3131/клон 3203/клон 3241/клон 4011/клон 4017/клон 4034/клон 4041/клон 4141/клон 4146/клон 4206/клон 4208/клон 4278/клон 4287/клон 1/клон 2/клон 3/клон 4/клон 5/клон 6/клон 7/клон 8/клон 9/клон 10/клон 11/клон 12/клон 13/клон 14/клон 15/клон 16/клон 17/клон 18/клон 19/клон 20/клон 21/клон 22/клон 23/клон А24/клон А25/клон А52/клон А63/клон А67/клон А71/клон А74, специфично связывающийся с TFPI" означает антитела, которые связываются с TFPI, в результате чего подавляется биологическая активность TFPI. Это выражение может употребляться синонимично термину "антитела против TFPI".

Также в настоящем документе выражение "клон Т417/клон Т308/клон 308/клон 308-2/клон 308-4, специфично связывающийся с TFPI" означает антитела, которые связываются с TFPI, в результате чего подавляется биологическая активность TFPI. Это выражение может употребляться синонимично термину "антитела против TFPI". В настоящем документе клон Т417 и клон Т308 - это антитела, выделенные у мышей после иммунизации рекомбинантным человеческим TFPI; клон 308 - это антитела, полученные путем гуманизации клона Т417; клон 308-2 и клон 308-4 - это антитела, полученные в результате мутации, а именно замены лизина (К) в тяжелой цепи клона 308 на глутамин (Q) или глутамат (Е) соответственно (см. фиг. 5).

Константа диссоциации (K_D) для антител против TFPI может быть, например, следующих значений. Для клона 12 K_D составляет $9,009 \times 10^{-12}$ М или меньше, предпочтительно $8,59 \times 10^{-12}$ М или меньше, более предпочтительно $8,19 \times 10^{-12}$ М или меньше; для клона 1023 K_D составляет $3,31 \times 10^{-11}$ М или меньше, предпочтительно $3,16 \times 10^{-11}$ М или меньше, более предпочтительно $3,01 \times 10^{-11}$ М или меньше; для клона 1202 K_D составляет $10,42 \times 10^{-12}$ М или меньше, предпочтительно $9,94 \times 10^{-12}$ М или меньше, более предпочтительно $9,47 \times 10^{-12}$ М или меньше; для клона 3241 K_D составляет $8,14 \times 10^{-11}$ М или меньше, предпочтительно $7,77 \times 10^{-11}$ М или меньше, более предпочтительно $7,4 \times 10^{-11}$ М или меньше.

В другом примере по данному изобретению были изучены гены переменных областей тяжелой и

легкой цепей, связывающихся с человеческим ТFPI; затем ген варибельной области тяжелой цепи, связывающейся с человеческим ТFPI, соединили с геном константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 и ген варибельной области легкой цепи, связывающейся с человеческим ТFPI, соединили с геном константной области легкой цепи человеческого IgG4. Каждый из полученных составных генов включили в экспрессионный вектор, подходящий для животных клеток. Сконструированными таким образом векторами трансфицировали клетки линии Expi293, которые после этого культивировали для продуцирования антител. Полученные антитела очищали, используя протеин А (см. пример 1).

В другом примере по данному изобретению были изучены гены варибельных областей тяжелой и легкой цепей, связывающихся с человеческим ТFPI; затем ген варибельной области тяжелой цепи, связывающейся с человеческим ТFPI, соединили с геном константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 и ген варибельной области легкой цепи, связывающейся с человеческим ТFPI, соединили с геном константной области легкой цепи человеческого IgG4. Каждый из полученных составных генов включили в экспрессионный вектор, подходящий для животных клеток. Сконструированными таким образом векторами трансфицировали клетки линии Expi293, которые после этого культивировали для продуцирования антител. Полученные антитела очищали, используя протеин А (см. примеры 11 и 12).

Таким образом, в другом своем аспекте данное изобретение касается полинуклеотидов, кодирующих антитела по данному изобретению. По данному изобретению могут использоваться полинуклеотиды, присутствующие в лизате клеток или в частично очищенном виде, или в значительной степени очищенном виде. Полинуклеотид считается выделенным/изолированным или в значительной степени очищенным, когда он отделен от прочих клеточных компонентов или других загрязняющих субстанций, например других клеточных полинуклеотидов или белков, путем стандартных методов очистки, включая щелочной метод с использованием додецилсульфата натрия (SDS), центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия (CsCl), колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие известные в данной области техники методы. Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть представлены ДНК или РНК и могут содержать либо не содержать интронные последовательности.

В еще одном своем аспекте данное изобретение касается векторов, содержащих полинуклеотиды по данному изобретению. Для экспрессии антител или фрагментов антител, получают ДНК, кодирующую частично или полностью легкую и тяжелую цепи антител; такую ДНК получают, применяя стандартные молекулярно-биологические методы, например, амплификацию ДНК с помощью полимеразной цепной реакции или клонирование комплементарной ДНК (кДНК) с использованием гибридом, в которых экспрессируются нужные антитела; полученную ДНК включают в состав экспрессионного вектора таким образом, чтобы она была функционально связана с нуклеотидными последовательностями, регулирующими транскрипцию и трансляцию.

В настоящем документе выражение "функционально связана" подразумевает, что ген антитела встроен (с помощью лигазы) в экспрессионный вектор таким образом, что регуляторные нуклеотидные последовательности, влияющие на транскрипцию и трансляцию, выполняют свои функции применительно к данному гену, т.е. регулируют его транскрипцию и трансляцию с образованием нужных антител. Экспрессионные векторы и нуклеотидные последовательности, регулирующие экспрессию, подбирают такие, чтобы они были совместимы с клетками-хозяевами, используемыми для экспрессии. Ген тяжелой цепи антитела и ген легкой цепи того же антитела могут быть встроены в разные экспрессионные векторы или же оба гена встраивают в один и тот же вектор. Встраивание генов в экспрессионные векторы осуществляется стандартными методами, например путем сшивки по "липким" концам на сайтах рестрикции (рестриктазно-лигазный метод) или в отсутствие сайтов рестрикции по "тупым" концам (коннекторный метод). В некоторых случаях в рекомбинантный экспрессионный вектор включают нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, способствующий секреции синтезированной антительной цепи из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в векторе таким образом, что нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, окажется в одной рамке считывания с геном цепи антитела и этот пептид будет присоединен к ее N-концу. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или же гетерологичным сигнальным пептидом (т.е. сигнальным пептидом белка, не являющегося иммуноглобулином). Кроме того, рекомбинантные экспрессионные векторы содержат регуляторные нуклеотидные последовательности, управляющие экспрессией генов цепей антител в клетке-хозяине. Термин "регуляторная нуклеотидная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие регулирующие экспрессию элементы (например, сигналы полиаденилирования), влияющие на транскрипцию или трансляцию генов антительных цепей. Специалистам в данной области техники понятно, что состав и структура экспрессионного вектора, в том числе выбор регуляторных последовательностей, зависит от таких факторов, как природа подлежащей трансформации клетки-хозяина, уровень экспрессии нужного белка и проч.

В еще одном своем аспекте данное изобретение касается клеток-хозяев, несущих полинуклеотиды по данному изобретению или содержащие их экспрессионные векторы. Эти полинуклеотиды или векторы вводят путем трансфекции в клетки-хозяева. Трансфекцию можно осуществлять различными методами, обычно применяемыми для введения чужеродных полинуклеотидов (ДНК или РНК) в прокариотические или эукариотические клетки - например, электрофорез, осаждение фосфатом кальция или

диэтиламиноэтил-декстраном, липофекция. Антитела по данному изобретению могут экспрессироваться в эукариотических клетках, предпочтительно в клетках млекопитающих ввиду того, что их используют применительно к клеткам млекопитающих. Примеры клеток млекопитающих, пригодных в качестве клеток-хозяев для экспрессии антител по данному изобретению, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки CHO^{dbfr}, дефектные по гену дигидрофолатредуктазы (DHFR), которые используют вместе с геном DHFR в качестве селективного маркера), клетки африканской зеленой мар-тышки (линия COS), клетки миеломы мыши (линии NSO и Sp2).

В еще одном своем аспекте данное изобретение касается способа получения антител, включающего культивирование клеток-хозяев для экспрессии нужных антител. Когда в клетки млекопитающих, служащих хозяевами для экспрессии желаемого продукта, введен рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий ген антител по данному изобретению, продукт этого гена (желаемые антитела) может продуцироваться в при культивировании этих клеток-хозяев в течение промежутка времени, достаточного для экспрессии антител и предпочтительно для секреции их в культуральную среду в процессе культивирования.

В некоторых случаях экспрессируемые антитела можно выделить из клеток-хозяев и очистить. Выделение и очистка антител по данному изобретению осуществляются методами, обычно применяемыми для выделения/очистки белков, например хроматографическими методами, примеры которых включают аффинную хроматографию (в том числе с использованием колонок, содержащих протеин А и протеин G), ионообменную хроматографию и гидрофобную хроматографию. Помимо хроматографических методов, для выделения и очистки антител по данному изобретению можно применять в той или иной комбинации фильтрацию, ультрафильтрацию, высаливание, диализ и др.

В другом примере по данному изобретению для оценки эффектов антител против TFPI определяли активность фактора свертывания крови Ха (см. пример 7). В результате этих экспериментов было обнаружено, как видно на фиг. 9, что среди антител, предполагаемых на роль антител против TFPI, в случае клонов Т308 и Т417, которые представляют собой химерные антитела, поглощение возрастало зависимым от концентрации образом; это указывает на то, что эффект ингибирования TFPI антителами двух указанных клонов усиливается зависимым от концентрации антител образом. Когда эффект ингибирования определяли при концентрации TFPI 10 нМ, ингибирующая активность клона Т417 превышала таковую клона Т308.

Клон 308 был получен путем гуманизации клона Т417, который обладал более выраженным эффектом в описанном выше анализе. В случае клона 308 также наблюдалось зависимое от концентрации возрастание поглощения, свидетельствующее о способности этих антител ингибировать TFPI (см. фиг. 10).

Также для усиления эффекта клона 308 осуществили обратную мутацию и получили клоны 308-2 и 308-4. На фиг. 11 видно, что как клон 308-2, так и клон 308-4 ингибировали TFPI зависимым от концентрации образом. При сравнении образцов, обработанных при концентрациях 40 и 10 нМ видно, что ингибирующая TFPI активность клонов 308-2 и 308-4 выше, чем клона 308. При концентрации 40 нМ клоны 308-2 и 308-4 проявляли ингибирующую TFPI активность 85 и 82% относительно положительного контроля (mAb2021 или антитела против TFPI) соответственно, но при концентрации 10 нМ ингибирующая TFPI активность клона 308-2 составляла 72%, а клона 308-4 - 78%, что лучше, нежели у клона 308-2. Также было обнаружено, что ингибирующая TFPI активность антител этих клонов равна таковой химерных антител клона Т417, у которых ингибирующая TFPI активность составляла 77% (см. фиг. 11).

В еще одном примере по данному изобретению для того, чтобы оценить эффекты антител против TFPI, определяли комплекс тканевого фактора с факторами свертывания крови VIIa и Ха (TF/FVIIa/FXa) (см. пример 8). А именно, по активности фактора Ха судили о количестве фактора Ха, образующегося по действием комплекса тканевого фактора с фактором VIIa и о его ингибировании, когда TFPI присутствовал вместе с антителами против TFPI или независимо от них.

В результате этих экспериментов было обнаружено, что в случае клонов Т308 и Т417, которые являются химерными антителами против TFPI, имеет место зависимое от концентрации увеличение поглощения, свидетельствующее о зависимом от концентрации усилении ингибирующего TFPI эффекта этих двух антител (см. фиг. 12). В частности, на фиг. 12 видно, что у клона Т417 ингибирующая TFPI активность выше, нежели у клона Т308.

Также путем гуманизации антител клона Т417, который эффективнее клона Т308, был получен клон 308. На фиг. 13 видно, что в случае клона 308 тоже наблюдалось зависимое от концентрации возрастание поглощения, свидетельствовавшее о том, что эти антитела ингибируют TFPI.

Также для усиления эффекта гуманизированных антител клона 308 осуществили обратную мутацию. На фиг. 14 видно, что полученные в результате клон 308-2 или клон 308-4 обладали ингибирующей TFPI активностью, превышающей таковую клона 308. При концентрации 25 нМ в случае клона 308-2 наблюдалась ингибирующая TFPI активность, составляющая 37,8%, а в случае клона 308-4 - 68,4%, т.е. больше, чем в случае клона 308-2.

В еще одном примере по данному изобретению определяли образование тромбина для клонов 308-2 и 308-4, которые отобрали для этих экспериментов на основании определения активности фактора Ха и комплекса TF/FVIIa/FXa (см. пример 9). В результате было показано, как видно на фиг. 15, что как для

клона T147, так и для клона 308 наблюдалось увеличение пика образования тромбина по сравнению с наблюдаемым в случае отрицательного контроля (без антител). В образцах, обработанных при концентрации 2,5 нМ, для клонов T417 и 308 величина пика образования тромбина составила 208 и 162% соответственно относительно наблюдаемой в случае отрицательного контроля (без антител); полученные значения эндогенного тромбинового потенциала (ЕТР) указывали, что образование тромбина составляло 131% в случае клона T417 и 122% в случае клона 308. Таким образом, антитела клона T417 оказались эффективнее, нежели клон 308.

Кроме того, как видно на фиг. 16, в случаях клонов 308-2 и 308-4 возрастание пика образования тромбина и суммарное количество образующегося тромбина превышали таковые для клона 308. В частности, в образцах, обработанных при концентрации 2,5 нМ для клонов 308-2 и 308-4, возрастание пика образования тромбина составляло 183 и 191% соответственно относительно наблюдаемой в случае отрицательного контроля (без антител); эндогенный тромбиновый потенциал (ЕТР) составлял 126% как в случае клона 308-2, так и в случае клона 308-4, что указывало на повышенную способность этих антител вызывать образование тромбина.

В другом примере по данному изобретению для того, чтобы оценить эффекты антител против TFPI, определяли активность фактора свертывания крови Ха (см. пример 14). В результате этих экспериментов были продемонстрированы эффекты антител против TFPI с созревшей аффинностью (см. фиг. 20-28). Было обнаружено, что в случае этих антител наблюдается увеличение поглощения, зависящее от концентрации антител; это свидетельствовало, что эффект ингибирования TFPI указанными антителами возрастает зависимым от концентрации антител образом.

В другом примере по данному изобретению для того, чтобы оценить эффекты антител против TFPI, определяли комплекс TF/FVIIa/FXa (см. пример 15). А именно, по активности фактора Ха определяли количество фактора Ха, образующегося под действием комплекса тканевого фактора с фактором VIIa, и степень его ингибирования, когда TFPI присутствовал вместе с антителами против TFPI или независимо от них. В результате этих экспериментов были продемонстрированы эффекты антител с созревшей аффинностью из числа антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 29-33 и табл. 27-36). Было обнаружено, что в случае этих антител наблюдается увеличение поглощения, зависящее от концентрации антител; это свидетельствовало, что эффект ингибирования TFPI указанными антителами возрастает зависимым от концентрации антител образом.

В еще одном примере по данному изобретению определяли образование тромбина для антител против TFPI, которые отобрали для этих экспериментов на основании определения активности фактора Ха (см. пример 16). Было проведено определение образования тромбина для антител № 1023 из числа антител с созревшей аффинностью, отобранных на основании определения активности фактора Ха и комплекса TF/FVIIa/FXa, в сравнении с химерными антителами T417 (см. фиг. 34). При концентрации 2,5 нМ в случае антител T417 наблюдалось увеличение пика тромбина около 335% относительно контроля ("пустая" проба - только разведение образца), а в случае антител № 1023 наблюдалось увеличение пика тромбина около 401% относительно "пустой" пробы. Что касается эндогенного тромбинового потенциала (ЕТР), указывающего суммарное количество образовавшегося тромбина, то при концентрации 2,5 нМ в случае антител T417 увеличение ЕТР составляло около 293% относительно отрицательного контроля (без антител), а в случае антител № 1023 увеличение ЕТР составляло около 309% относительно отрицательного контроля. Сравнение этих двух антител говорит о том, что антитела № 1023, полученные в результате созревания аффинности, эффективнее, нежели антитела T417.

В другом своем аспекте данное изобретение касается фармацевтической композиции для лечения гемофилии, содержащей в качестве активного ингредиента антитела против TFPI.

Данным изобретением предлагается фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антител против TFPI и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к веществам, которые добавляются к активному ингредиенту, чтобы способствовать процессу получения препарата или его стабильности, и не вызывают существенных негативных токсикологических эффектов у больного.

В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителям или разбавителям, которые не нарушают биологическую активность и свойства вводимого соединения и не вызывают в организме никакого раздражения. В композициях по данному изобретению, представленных жидким раствором, в качестве фармацевтически приемлемого носителя используются стерильные биологически совместимые носители. Таким фармацевтически приемлемым носителем может быть физиологический раствор, стерильная вода, раствор Рингера, забуференный солевой раствор, раствор альбумина для инъекций, раствор декстрозы, раствор мальтодекстрина, глицерин, этиловый спирт или смесь из двух или более перечисленных здесь субстанций. Кроме того, при необходимости композиция по данному изобретению может содержать другие обычно используемые в фармацевтике вспомогательные компоненты, в том числе антиоксиданты, забуферивающие вещества и бактериостатические агенты. Композиция по данному изобретению может быть составлена в виде формы для инъекций, например водного раствора, суспензии или эмульсии с добавлением разбавителей, диспергирующих агентов, поверхностно-активных веществ, связующих агентов и смазывающих агентов. Также композиция по дан-

ному изобретению может быть представлена в форме пилюль, капсул, гранул или таблеток. Другие носители описаны в литературных источниках [см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W. Martin)]. Композиции по данному изобретению содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного антитела против TFPI.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. В данной области техники хорошо известно использование таких сред и агентов для фармацевтически активных субстанций. Композиция по данному изобретению предпочтительно готовится для парентерального введения путем инъекции. Композиция по данному изобретению может быть приготовлена в твердом виде, в виде раствора, микроэмульсии, липосом или иных упорядоченных структур, пригодных для высоких концентраций лекарственного вещества. Носитель по данному изобретению может быть представлен растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этиловый спирт, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и подходящие их смеси. В некоторых случаях композиция по данному изобретению может содержать агент, обеспечивающий нужное осмотическое давление, например сахар, многоатомный спирт, сорбит или хлорид натрия. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены из активного вещества, которое содержится в необходимом количестве подходящего растворителя вместе с одним из перечисленных выше ингредиентов или их комбинацией; при необходимости приготовленный раствор стерилизуют путем фильтрации. Дисперсии, как правило, готовят, включая активное вещество в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и при необходимости другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов, предназначенных для введения путем инъекции, предпочтительно получать их путем высушивания в вакууме и лиофилизации, в результате которых получается порошок, содержащий активный ингредиент и какие-либо дополнительные желательные ингредиенты из их раствора, предварительно стерилизованного путем фильтрации.

Антитела против TFPI можно использовать в терапевтических целях для лечения врожденных и приобретенных дефицитных состояний или нарушений, касающихся свертывания крови. Например, эти антитела можно использовать для блокирования взаимодействия между TFPI и фактором свертывания крови Ха или для предотвращения зависящего от TFPI подавления активности комплекса тканевого фактора с фактором свертывания крови VIIa (TF/FVIIa). Кроме того, человеческие моноклональные антитела по данному изобретению можно использовать для восстановления образования фактора Ха, для которого нужен комплекс TF/FVIIa, чтобы таким образом преодолеть недостаточность продукции фактора Ха, зависящей от фактора свертывания крови VIII или IX.

Антитела по данному изобретению применяются терапевтически для лечения расстройств гемостаза, например тромбоцитопении, дисфункции тромбоцитов и расстройств, сопровождающихся кровотечением (например, гемофилии А и В). Лечение таких расстройств может осуществляться путем введения нуждающемуся в том индивиду терапевтически эффективного количества антител против TFPI. Терапевтическое применение антител по данному изобретению включает также лечение профузных кровотечений при наличии соответствующих показаний, например при травме и геморрагическом инсульте. Таким образом, данным изобретением также предлагается способ для сокращения продолжительности кровотечения, включающий введение нуждающемуся в том индивиду терапевтически эффективного количества антител против TFPI.

Терапия антителами по данному изобретению может применяться как в отдельности, так и в сочетании с другими терапевтическими подходами, предназначенными для лечения расстройств гемостаза. Например, одно или более антител по данному изобретению можно вводить вместе с каким-либо фактором свертывания крови (например, с тканевым фактором, фактором VII или фактором X), который считается полезным при лечении гемофилии. Под совместным введением антител по данному изобретению и фактора свертывания крови или комбинированной терапией указанными агентами понимается введение этих двух терапевтических средств по отдельности или же в составе одной композиции; раздельное введение указанных терапевтических агентов может осуществляться приблизительно в одно и то же время либо в разные моменты времени, но в пределах одного и того же периода терапевтического воздействия.

Фармацевтические композиции по данному изобретению вводят больным гемофилией А или В парентерально в дозировке и с частотой, которые могут варьировать в зависимости от степени тяжести кровотечения или - в случае профилактического применения - в зависимости от индивидуальной степени недостаточности механизма свертывания крови. Композиции по данному изобретению можно вводить нуждающимся в том индивидуам внутривенно болюсно или же путем непрерывной инфузии. Например, при болюсном введении антител по данному изобретению, представленных фрагментами Fab, доза составляет от 0,0025 до 100 мг на 1 кг массы тела; от 0,025 до 0,25 мг/кг; от 0,010 до 0,10 мг/кг или от 0,10 до 0,50 мг/кг. В случае непрерывной инфузии доза антител по данному изобретению, представленных фрагментами Fab, может составлять от 0,001 до 100 мг на 1 кг массы тела за 1 мин; 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 от 0,10 до 0,50 мг/кг/мин на про-

тяжении промежутка времени 1-24, 1-12, 2-12, 6-12, 2-8 или 1-2 ч. При введении антител по данному изобретению, представленных полноразмерными антительными молекулами (с полными константными областями), дозировка составляет около 1-10, 2-8 или 5-6 мг/кг. Полноразмерные антитела вводят, как правило, путем инфузии продолжительностью 30-35 мин. Частота введения антител по данному изобретению зависит от степени тяжести состояния индивида. Эта частота может варьировать от трех раз в неделю до одного раза в неделю или в две недели.

Композиции по данному изобретению могут быть введены в организм путем подкожной инъекции. Таким путем антитела против TFPI вводят в дозе от 10 до 100 мг один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" означает такое количество какого-либо варианта антител против TFPI или комбинации этих антител с тканевым фактором (TF), фактором VII (FVII) или фактором X (FX), которое требуется для эффективного увеличения продолжительности свертывания крови *in vivo* или иного измеримого полезного эффекта *in vivo* у нуждающегося в том индивида. Точное значение терапевтически эффективного количества зависит от многих факторов, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) конкретный состав и физические свойства терапевтической композиции, предполагаемый контингент пациентов, индивидуальные особенности пациента и др.; специалисту в данной области техники не составит труда определить такие факторы. Когда такие факторы исчерпывающе рассмотрены, важно вводить больному минимальное количество препарата, достаточное для достижения наибольшего эффекта, возможного без побочных явлений; специалисту в данной области техники не составит труда определить, таким образом, индивидуальную дозу.

Доза фармацевтической композиции по данному изобретению может варьировать в зависимости от различных факторов, в том числе от состояния здоровья индивида и его массы тела, степени тяжести заболевания, типа лекарственного препарата, пути и продолжительности его введения. Композицию по данному изобретению можно вводить однократно или несколько раз в сутки млекопитающим, включая крыс, мышей, домашних животных, человека и др. любым приемлемым путем, например перорально, ректально, внутривенно, подкожно, внутриматочно или в сосуды головного мозга.

Примеры

Далее данное изобретение описывается подробнее на примерах. Для рядового специалиста в данной области техники должно быть ясно, что эти примеры служат только для иллюстративной цели, и их не следует считать ограничивающими объем данного изобретения.

Пример 1. Получение антител против TFPI.

Были получены антитела против ингибитора внешнего пути свертывания крови (ингибитора пути тканевого фактора, TFPI), подавляющие активность фактора свертывания крови X, которые способны препятствовать подавлению свертывания крови, для лечения или предотвращения гемофилии.

1-1. Отбор антител.

Мышей иммунизировали рекомбинантным человеческим TFPI и у иммунизированных особей брали селезенку. Из этого материала выделяли В-лимфоциты, из них выделяли тотальную РНК и по ней синтезировали комплементарную ДНК (кДНК). Используя синтезированную кДНК, клонировали различные гены мышинных антител путем полимеразной цепной реакции (PCR) и встраивали их в фагмидный вектор pComb3X, получая, таким образом, библиотеку антител с антительными фрагментами, имеющими различные аминокислотные последовательности. Чтобы отобрать из этой библиотеки антитела, специфичные к человеческому TFPI, иммобилизовали TFPI на магнитных частицах, смешивали эти частицы с библиотекой антител и клоны, связывающиеся с антигеном-мишенью, выделяли и размножали. Затем путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) выделяли по отдельности каждый из клонов (T417 или T308), специфично связывающихся с антигеном-мишенью (человеческим TFPI), и определяли аминокислотные последовательности этих антител.

В результате, как видно из приведенной табл. 1, были отобраны клоны T417 и T308, специфично связывающиеся с человеческим TFPI, и установлены аминокислотные последовательности этих антител.

В табл. 2 приведены аминокислотные последовательности участков CDR антител клонов, представленных в табл. 1; нумерация аминокислотных остатков дается по Кабату.

Таблица 1

Клон	Вариабельная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO: ID NO
T417	VH	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSY AMSWVRQTPDKRLEWVATITGGSYTYYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMY YCARQDGNFLMDYWGQGTITVTVSS	1
	VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSD GKTYLNLWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQ GTHFPFTFGSGTKLEIKR	2
T308	VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNY PMSWVRQTPDKRLEWVATISNSGSYTYYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMY YCARQVYGNIEDFDYWGQGTITVTVSS	3
	VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSD GKTYLNLWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQ GTHFPYTFGGGTKLELKR	4

Таблица 2

Клон	Вариабельная область	CDR1	CDR2	CDR3
T417	Тяжелая цепь	SYAMS (SEQ ID NO: 5)	TITGGSYTYYP DSVKG (SEQ ID NO: 6)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: 7)
	Легкая цепь	KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 8)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 9)	WQGTHTFPF (SEQ ID NO: 10)
T308	Тяжелая цепь	NYPMS (SEQ ID NO: 11)	TISNSGSYTYYP DSVKG (SEQ ID NO: 12)	QVYGNIEDFDY (SEQ ID NO: 13)
	Легкая цепь	KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 14)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 15)	WQGTHTFPY (SEQ ID NO: 16)

1-2. Клонирование генов IgG антител клонов T417 и T308.

Из клеток, продуцирующих антитела клонов T417 и T308, были выделены фагмидные векторы pComb3X, содержащие гены, кодирующие вариабельные области тяжелых цепей антител клонов T417 и T308. Проводили полимеразную цепную реакцию с выделенными фагмидными векторами pComb3X в качестве матриц, используя смесь для PCR Accupower Pfu PCR premix (Bioneer) и прямой праймер, содержащий сайт рестрикции NotI (см. табл. 3; SEQ ID NO: 17) и обратный праймер, содержащий сайт рестрикции ApaI (см. табл. 3; SEQ ID NO: 18). Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: 10 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 15 с при температуре 94°C, 30 с при 56°C и 90 с при 72°C; после этого 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Затем каждый из выделенных генов обрабатывали ферментами рестрикции NotI и ApaI при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Гены, обработанные указанными рестриктазами, разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли и разделяли в агарозном геле плазмидный вектор pCIW, содержащий ген константной области тяжелой цепи IgG4. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, New England BioLabs (NEB)), каждый из выделенных генов вариабельных областей тяжелых цепей T417 и T308 лигировали по сайтам рестрикции KpnI и ApaI линейного вектора pCIW, содержащего нуклеотидные последовательности, кодирующие константную область человеческой тяжелой цепи. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech) и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и секвенировали выделенную ДНК, определяя тем самым нуклеотидные последовательности нужных генов.

Из клеток, продуцирующих антитела клонов T417 и T308, были выделены фагмидные векторы pComb3X, содержащие гены, кодирующие вариабельные области легких цепей антител клонов T417 и T308. Проводили полимеразную цепную реакцию с выделенными фагмидными векторами pComb3X в качестве матриц, используя смесь для PCR Accupower Pfu PCR premix (Bioneer), прямой праймер, содержащий сайт рестрикции NotI (см. табл. 3; SEQ ID NO: 19), и обратный праймер, содержащий сайт рестрикции KpnI (см. табл. 3; SEQ ID NO: 20). Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: 10 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 15 с при температуре 94°C, 30 с при 56°C и 90 с при 72°C; после этого 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым разме-

рам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Затем каждый из выделенных генов обрабатывали ферментами рестрикции NotI и KpnI при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Гены, обработанные указанными рестриктазами, разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли и разделяли в агарозном геле плазмидный вектор pcIw. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, New England BioLabs (NEB)), каждый из выделенных генов вариабельных областей легких цепей T417 и T308 лигировали по сайтам рестрикции NotI и KpnI линейного вектора pcIw, содержащего нуклеотидные последовательности, кодирующие константную область человеческой легкой цепи. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech) и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и секвенировали выделенную ДНК, определяя тем самым нуклеотидные последовательности нужных генов.

Таблица 3

Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
T417VH-F	GCGGCCGCCATGTATCTG GGTCTGAACATATGTCTTT ATCGTGTTTCTGCTGAAT GGTGTGCAGTCTGAGGTG CACCTGGTGGAGTCT	17
T417VH Apa-R	NNNNGGGCCCTTGGTG CTGGCTGAGGAGACGGT GACCGTGGT	18
T417 VL-F	GCGGCCGCCATGGATAG CCAGGCTCAGGTGCTGAT GCTGCTGCTGCTGTGGGT GTCAGGGACTTGCGGGG ACGTTGTGATGACCCAGA CTCCACT	19
VL-R	NNNNGGTACCAGATTTC AACTGCTCATCAGA	20

1-3. Получение и очистка мутантных антител IgG против TFPI клонов T417, T308.

Чтобы получить и очистить антитела против TFPI клонов T417 и T30, образовавшихся в результате иммунизации мышей, за сутки до трансфекции клетки Expi293F™ высевали в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Через 24 ч их культивирования при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин прибавляли среду Expi293™ Expression medium (номер по каталогу A1435101; Gibco), получая 30 мл клеточной суспензии с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность клеток $\geq 95\%$). Разводили 30 мкг ДНК (15 мкг pcIw, кодирующей тяжелую цепь антител против TFPI и 15 мкг pcIw, кодирующей легкую цепь антител против TFPI) в 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. К 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) прибавляли 80 мкл реагента из набора для трансфекции ExpiFectamine™293 (номер по каталогу A14524, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После этого 1,5 мл разведенной ДНК и 1,5 мл реагента ExpiFectamine™293 хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 мин.

Клетки Expi293F™ обрабатывали 3 мл смеси ДНК и реагента ExpiFectamine™293. Через 16-18 ч культивирования суспензии клеток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин к ней прибавляли 150 мкл реагента Enhancer 1 из набора ExpiFectamine™293 (номер по каталогу A14524, Gibco) и 1,5 мл реагента Enhancer 2 из набора ExpiFectamine™293 (номер по каталогу A14524, Gibco), после чего суспензию клеток культивировали в течение 5 суток. По завершении указанного культивирования культуру клеток центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 20 мин, чтобы удалить обломки клеток, и полученный супернатант пропускали через фильтр с порами диаметром 0,22 мкм. На 30 мл культуральной среды готовили 100 мкл смолы с протеином A MabSelect Xtra (номер по каталогу 17-5269-02, GE Healthcare), центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 2 мин, чтобы удалить раствор, в котором она хранилась, и промывали три раза по 400 мкл буферного раствора для связывания с протеином A (номер по каталогу 21007, Pierce). К подготовленной культуральной среде прибавляли смолу с протеином A и инкубировали с вращением при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной среды и смолы загружали в колпачок-резервуар спин-колонки Pierce (номер по каталогу 69725, Thermo) и проводили экстракцию, используя вакуумное устройство для выделения нуклеиновых кислот QIAvac 24 Plus (номер по каталогу

19413, QIAGEN), так что в колонке оставалась только смола. Эту смолу промывали 5 мл буферного раствора для связывания протеина А, ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора для элюирования протеина А (номер по каталогу 21009, Pierce) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин, после чего центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 1 мин. Полученный элюат нейтрализовали, добавляя 2,5 мкл буферного раствора Tris-HCl (1,5 М; pH 9,0). Элюирование повторяли 4-6 раз и каждую фракцию количественно анализировали, используя спектрофотометр для микрообъемов Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Собирали фракции, в которых определялся белок, указанный буферный раствор заменяли на солевой раствор, забуференный фосфатом (PBS), используя спин-колонки для обессоливания Zeba 7K MWCO объемом 5 мл (номер по каталогу 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ((SDS-PAGE) в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях, чтобы окончательно определить концентрацию антител и проверить их состояние; антитела хранили при температуре 4°C.

По результатам гель-электрофореза видно (см. фиг. 3), что получились очищенные антитела клонов T417 и T308 в хорошем состоянии.

Пример 2. Создание гуманизированных антител путем трансплантации антигенсвязывающей области (CDR) в стабильные каркасные участки.

Когда было количественно определено сродство связывания антигена TFPI (полноразмерного человеческого белка - ингибитора внешнего пути свертывания крови, TFPI) (номер по каталогу TFPI-875H; Creative Biomart, США) с антителами клонов T417 и T308, оказалось, что в случае антител клона T417 эффект наилучший (см. фиг. 8 и пример 6). Осуществляли гуманизацию клона T417, чтобы получить клон 308.

Для гуманизации антител клона T417 мышинного происхождения был выбран метод трансплантации антигенсвязывающей области (CDR), который наиболее широко применяется для гуманизации антител. А именно, была предсказана структура антител клона T417 по образцу, для которого наблюдались наивысшие критерии качества заданной модели QMEAN и GMQE и степень гомологии среди 50 образцов, полученных с сервера для моделирования структуры белков Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), и были идентифицированы участки CDR, связывающиеся с антигеном, и каркасные участки, отличные от CDR, с использованием нумерации аминокислотных остатков по Кабату и Чотиа. Затем провели поиск человеческих каркасных участков с наивысшей степенью гомологии, используя базу данных IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Из ряда комбинаций нескольких переменных областей тяжелых и легких цепей было выбрано сочетание VH3-21/VK2-30, для которого имела место наибольшая скорость образования в клетках зародышевой линии человека (de Wildt R.M. et al., J. Mol. Biol., 285:895-901, 1999; mAbs, 5:3, 445-470). Далее был сконструирован клон 308, представляющий собой гуманизированные антитела клона T417; он включает K24 вариательной области легкой цепи клона T417, принадлежащий каркасной последовательности, который, однако, не влияет на стабильность антител и присутствует в последовательности человеческих антител; и N35 вариательной области тяжелой цепи, принадлежащий последовательности CDR по Кабату, но структурно это каркасная последовательность (Methods, 34:184-199, 2004; <http://www.vbase2.org>) (см. фиг. 4 и табл. 4). В результате, как показано на фиг. 4, путем гуманизации клона T417 был создан клон 308.

В табл. 5 приведены аминокислотные последовательности CDR антител этого клона (см. табл. 4), идентифицированные по системе нумерации Кабата.

Таблица 4

Клон	Варибельная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO: ID NO
308	VH	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMNWVRQAPGKLEWVSTITGGSYTYAD	21
		SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARQDGNFLMDYWGQGLTVTVSS	
	VL	DVVMVTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSD GKTYLNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	22

Таблица 5

Клон	Варибельная область	CDR1	CDR2	CDR3
308	Тяжелая цепь	SYAMN (SEQ ID NO:23)	TITGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:6)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: ID NO:7)
	Легкая цепь	KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:8)	LVSCLDS (SEQ ID NO:9)	WQGTHTFPF (SEQ ID NO:10)

Пример 3. Создание мутантных антител клона 308 путем компьютерного моделирования ("in silico").

Связывание антител клона 308, сконструированного в примере 2, и домена 2 Кунитца ингибитора внешнего пути свертывания крови (KPI-2 TFPI) предсказывали путем компьютерного моделирования и

таким образом было предсказано, в каком положении аминокислотной последовательности изменения могут улучшить связывание антигена (тяжелая цепь - 52а, -64 и легкая цепь 27d) (см. фиг. 5 и табл. 6).

Путем моделирования по гомологии с использованием программы BioLuminate (Schrodinger, США), была получена структура антител клона 308, связывающихся с TFPI. Чтобы смоделировать эту структуру, был осуществлен поиск шаблонов в базе данных Банка данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот (PDB) по последовательности клона 308. В результате была выбрана структура 3QOS (номер по PDB), имеющая сходное строение и высокий комплексный показатель. Можно видеть, что структура 3QOS и антитела клона 308 сходны по последовательностям, кроме области HV CDR H3, в которой имеется структура, специфичная в отношении антигена; 3QOS и клон 308 являются шаблонами, пригодными для моделирования структуры. Было получено множество моделей антител клона 308 и их сравнивали со структурой 3QOS; в итоге были отобраны наиболее сходные структуры. Выбранные модели были сходны в структурах кроме области HV CDR H3, и было смоделировано взаимодействие между антителами клона 308 и TFPI с использованием программы для прогнозирования белок-белкового связывания PIPER (см. фиг. 17; на этом рисунке зеленым цветом изображена молекула антитела клона 308, красным - TFPI). Таким образом, можно идентифицировать предсказанный паратоп антител клона 308 и связывающийся с ним предсказанный эпитоп TFPI (см. табл. 8). На основании предсказанных связывающихся структур в аминокислотной последовательности антител клона 308 были вызваны мутации с целью увеличить аффинность антител клона 308. Иначе говоря, аминокислотный остаток лизина в положении 64 (K64) заменяли на остатки глутамина (Q) и глутаминовой кислоты (E), чтобы вызвать образование ионной связи с аминокислотным остатком аргинина в положении 17 (R17) аминокислотной последовательности TFPI.

В результате, как видно из табл. 6, секвенирование ДНК показало, что получились два мутантных клона 308. Предсказанное связывание варибельной области тяжелой или легкой цепи антител клона 308 с антигеном (человеческим TFPI) изображено на фиг. 18 и 19.

В табл. 7 представлены аминокислотные последовательности участков CDR антител клонов из табл. 6 (по системе нумерации Кабата).

В табл. 8 представлены предсказанный паратоп антител клона 308 и предсказанный эпитоп связывающегося с ним антигена (человеческого TFPI).

Таблица 6

Клон	Варибельная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
308-2	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAASGF TFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSTITT GGSYTYADSVQG RFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAV YYCARQDGNFLM DYWGQGTLVTVSS	24
308-4	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAASGF TFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSTITT GGSYTYADSV <u>EG</u> RFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAV YYCARQDGNFLM DYWGQGTLVTVSS	25

Таблица 7

Клон	Варибельная область	CDR1	CDR2	CDR3
308-2	Тяжелая цепь	SYAMN (SEQ ID NO:23)	TITTTGGSYTYPPDSVQG (SEQ ID NO: 26)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: 7)
308-4	Тяжелая цепь	SYAMN (SEQ ID NO: 23)	TITTTGGSYTYPPDSVEG (SEQ ID NO: 27)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: 7)

Таблица 8

Паратоп клона 308		Эпитоп hTFPI	Тип связывания
HCDR1	S31	Q28	Водородная связь
HCDR2	T52	E11	Водородная связь
HCDR2	T52a	E10	Водородная связь
HCDR2	Y56	P13	Гидрофобное взаимодействие
HCDR2	Y58	K36	Водородная связь
HCDR2	Y59	R17	Водородная связь
HCDR2	D61	R17	Солевой мостик
HCDR3	Q98	R34	Водородная связь
LCDR1	D30a	Y23	Водородная связь
LCDR3	G91	R34	Водородная связь
LCDR3	T92	T21	Водородная связь
LCDR3	T92	R34	Водородная связь
LCDR3	T92	K36	Водородная связь
LCDR3	F94	Y19	Гидрофобное взаимодействие

Пример 4. Получение мутантных антител клона 308.

4-1. Клонирование гена IgG мутантных антител клона 308.

Каждый из синтезированных генов 308-2 и 308-4 (Bioneer, Корея) брали в качестве матрицы, чтобы провести полимеразную цепную реакцию (PCR) для варибельной области тяжелой цепи; при этом использовали ДНК-полимеразу высокой точности PrimeSTAR HS DNA (номер по каталогу R010B; Takara), прямой праймер, содержащий сайт рестрикции KpnI (см. табл. 9; SEQ ID NO: 28), и обратный праймер, содержащий сайт рестрикции ApaI (см. табл. 9; SEQ ID NO: 29). Проводили PCR в следующих условиях: 2 мин при температуре 98°C; затем 30 циклов, в каждом из которых 10 с при 98°C, 10 с при 58°C и 30 с при 72°C; после этого 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (номер по каталогу 287041, QIAGEN). Каждый из выделенных генов обрабатывали ферментами рестрикции KpnI и ApaI при температуре 37°C в течение 4 ч и затем разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли и разделяли в агарозном геле плазмидный вектор pC1W. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, New England BioLabs (NEB)), каждый из выделенных генов лигировали по сайтам рестрикции KpnI и ApaI линейного вектора pC1W. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech) и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и секвенировали выделенную ДНК.

Таблица 9

Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
VH Fo	TGCTGTGGGTGAGTGGTA CCTGTGGGGAAGTGCAG CTCGTGGAGAGCGGT	28
VH Re	AGTGGGAACACGGAGGG CCCCTGGTGCTGGCGGA TGAGACAGTCACAAGTG TCCC	29

4-2. Получение и очистка мутантных антител IgG клона 308.

Чтобы получить и очистить клоны 308-2 и 308-4, являющиеся мутантными вариантами клона 308, за сутки до трансфекции клетки Expi293F™ высевали в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Через 24 ч их культивирования при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин прибавляли среду Expi293™ Expression medium (номер по каталогу A1435101; Gibco), получая 30 мл клеточной суспензии с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность клеток $\geq 95\%$). Разводили 30 мкг ДНК (15 мкг pC1W, кодирующей тяжелую цепь антител против TFPI, и 15 мкг pC1W, кодирующей легкую цепь антител против TFPI) в 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. К 1,5 мл среды OptiPro™ SEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) прибавляли 80 мкл реагента из набора для трансфекции ExpiFectamine™ 293 (номер по каталогу A14524, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После этого 1,5 мл разведенной ДНК и 1,5 мл реагента ExpiFectamine™ 293 хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Клетки Expi293F™ обрабатывали 3 мл смеси ДНК и реагента

ExpiFectamine™293. Через 16-18 ч культивирования суспензии клеток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин к ней прибавляли 150 мкл реагента Enhancer 1 из набора ExpiFectamine™293 (номер по каталогу A14524, Gibco) и 1,5 мл реагента Enhancer 2 из набора ExpiFectamine™293 (номер по каталогу A14524, Gibco), после чего суспензию клеток культивировали в течение 5 суток. По завершении указанного культивирования культуру клеток центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 20 мин, чтобы удалить обломки клеток, и полученный супернатант пропускали через фильтр с порами диаметром 0,22 мкм. На 30 мл культуральной среды готовили 100 мкл смолы с протеином A MabSelect Xtra (номер по каталогу 17-5269-02, GE Healthcare), центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 2 мин, чтобы удалить раствор, в котором она хранилась, и промывали три раза по 400 мкл буферного раствора для связывания с протеином A (номер по каталогу 21007, Pierce). К подготовленной культуральной среде прибавляли смолу с протеином A и инкубировали с вращением при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной среды и смолы загружали в колпачок-резервуар спин-колонки Pierce (номер по каталогу 69725, Thermo), и проводили экстракцию, используя вакуумное устройство для выделения нуклеиновых кислот QIAvac 24 Plus (номер по каталогу 19413, QIAGEN), так что в колонке оставалась только смола. Эту смолу промывали 5 мл буферного раствора для связывания протеина A, ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора для элюирования протеина A (номер по каталогу 21009, Pierce) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин, после чего центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 1 мин. Полученный элюат нейтрализовали, добавляя 2,5 мкл буферного раствора Tris-HCl (1,5 M; pH 9,0). Элюирование повторяли 4-6 раз и каждую фракцию количественно анализировали, используя спектрофотометр для микрообъемов Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Собирали фракции, в которых определялся белок, указанный буферный раствор заменяли на солевой раствор, забуференный фосфатом (PBS), используя спин-колонки для обессоливания Zeba 7K MWCO объемом 5 мл (номер по каталогу 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ((SDS-PAGE) в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях, чтобы окончательно определить концентрацию антител и проверить их состояние; антитела хранили при температуре 4°C.

В итоге было получено 18 клонов антител с одной или более мутациями в четырех положениях аминокислотной последовательности антител клона 308, способными усилить связывание антител с антигеном (рекомбинантным человеческим белком TFPI) и были отобраны на основании предсказанного в примере 3 (см. фиг. 5 и табл. 4-7; аминокислотные последовательности антител клонов 308, 308-2 и 308-4). Анализ путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) показал, что полученные в очищенном виде антитела находятся в хорошем состоянии (см. фиг. 6). Из этих антител в клонах 308-2 и 308-4 в тяжелой цепи место остатка лизина (K), как в клоне 308, занимали остаток глутамин (Q) или глутаминовой кислоты (E).

В табл. 4 и 6 представлены аминокислотные последовательности антител против TFPI этих клонов.

В табл. 5 и 7 представлены аминокислотные последовательности участков CDR антител клонов из табл. 4 и 6, идентифицированных по системе нумерации Кабата.

Пример 5. Получение KPI-2 TFPI.

5-1. Клонирование генов человеческого, кроличьего и мышинного KPI-2 TFPI.

Чтобы получить человеческий, кроличий и мышинный гены домена 2 Кунитца ингибитора внешнего пути свертывания крови (KPI-2 TFPI) (см. табл. 10), в плазмидный вектор pET22b включили сайты расщепления рестриктазами NcoI (номер по каталогу R0193S, NEB) и NotI (номер по каталогу R0189S, NEB). Для каждого гена (синтезированы в компании GeneScript) проводили полимеразную цепную реакцию (PCR), используя прямой праймер, содержащий сайт рестрикции NcoI (см. табл. 11; SEQ ID NO: 33-35), и обратный праймер, содержащий сайт рестрикции NotI (см. табл. 11; SEQ ID NO: 36-38). Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: 2 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 30 с при температуре 94°C, 30 с при 55°C и 30 с при 72°C; после этого 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (номер по каталогу 28704; QIAGEN). Затем каждый из трех выделенных генов обрабатывали ферментами рестрикции NcoI и NotI при температуре 37°C в течение 4 ч. Гены, обработанные указанными рестриктазами, разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли и разделяли в агарозном геле плазмидный вектор pET22b. Полученный вектор pET22b NcoI/NotI и ДНК-вставку смешивали в молярном соотношении 1:3 и прибавляли к этой смеси ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, New England BioLabs (NEB)) и буферный раствор для лигазы (номер по каталогу B0202S; NEB), после чего инкубировали при температуре 25°C в течение 3 ч. Продукт лигирования в количестве 5 мкл прибавляли к химически компетентным клеткам DH5a (Invitrogen) и инкубировали на льду в течение 10 мин. Для теплового шока клетки инкубировали при температуре 42°C в течение 1 мин. Клетки культивировали в суспензии в среде SOC при температуре 37°C в течение 40 мин. Трансформированные клетки DH5a в количестве 50 мкл высевали на среду с карбенициллином и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Из полученных колоний было отобра-

но шесть; их высевали на среду LB, содержащую карбенициллин, и культивировали в суспензии при температуре 37°C при перемешивании со скоростью вращения 220 об/мин в течение 12 ч или дольше. Из клеток, несущих плазмиды, выделяли плазмидную ДНК, используя набор Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и секвенировали выделенную ДНК, определяя тем самым нуклеотидные последовательности нужных генов.

В табл. 10 представлены аминокислотные последовательности домена 2 Кунитца (KPI-2) человеческого, кроличьего и мышинного TFPI.

Таблица 10		
Организм	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NOS:
Человек	KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQCERF KYGGCLGNMNNFETLEECKNICEDG	30
Кролик	KPDFCFLEEDPGICRGFMTRYFYNNQSKQCEQ FKYGGCLGNSNNFETLEECRNTCEDP	31
Мышь	RPDFCFLEEDPGLCRGYMKRYLYNNQTKQCER FVYGGCLGNRNNFETLDECKKICENP	32

В табл. 11 представлены праймеры, которые использовались при клонировании генов домена 2 Кунитца (KPI-2) TFPI в примере 5.

Таблица 11		
Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
HTK2 For	CCATGGAAACCCGACTTT TGCTTCCTGGA	33
RTK2 For	CCATGGAAACCCGATTTC TGCTTTCTGGAG	34
MTK2 For	CCATGGAGACCTGACTTC TGCTTTCTGGAG	35
HTK2 Re	GCGGCCGCCTAGCCGTCT TCACAGATGTTCTTG	36
RTK2 Re	GCGGCCGCCTAGGGGTCC TCACAGGTGTTG	37
MTK2 Re	GCGGCCGCCTAGGGGTTC TCACAGATTTTCTTGCAAT	38

5-2. Получение и очистка человеческого, кроличьего и мышинного KPI-2 TFPI.

Используя клоны с идентифицированными нуклеотидными последовательностями гена, кодирующего TFPI, трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3) (химически компетентные, номер по каталогу C25271, NEB). Каждый из генов (человека, кролика и мыши), кодирующих домен 2 Кунитца (KPI-2) TFPI, прибавляли к бактериальным клеткам и инкубировали на льду в течение 10 мин. Для теплового шока клетки инкубировали при температуре 42°C в течение 1 мин. Затем клетки культивировали в суспензии в среде SOC при температуре 37°C в течение 40 мин. Трансформированные клетки в количестве 50 мкл высевали на среду с карбенициллином и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Одну из полученных колоний высевали на среду LB, содержащую карбенициллин, и культивировали в суспензии при температуре 37°C при перемешивании со скоростью вращения 220 об/мин в течение 12 ч или дольше. На следующий день полученную культуру бактериальных клеток помещали в 500 мл среды "супербульон" (SB) с глюкозой и культивировали в суспензии при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 2 ч. Когда оптическая плотность (OD) культуральной среды достигала 0,6, для индукции экспрессии прибавляли изопропилтиогалактозид (IPTG) в концентрации 0,1 мМ и отслеживали экспрессию с помощью спектрофотометра NanoDrop. Затем клетки культивировали в суспензии при температуре 25°C и перемешивании со скоростью 180 об/мин в течение 12 ч или дольше. Отделяли бактериальные клетки путем центрифугирования со скоростью 6000 об/мин в течение 20 мин; затем для того, чтобы выявить экспрессию нужного белка в периплазматическом пространстве, три раза проводили замораживание и оттаивание, после чего центрифугировали. Полученный супернатант пропускали через фильтр с порами диаметром 0,22 мкм для удаления обломков клеток. Затем проводили очистку, используя смолу Talon для металл-аффинной хроматографии (номер по каталогу 635501, Clonetech), которую стабилизировали фосфатным буферным раствором и инкубировали с профильтрованной культуральной средой при температуре 4°C в течение 12 ч или дольше. Для промывания использовали имидазол в концентрации 10 мМ, для элюирования - имидазол в концентрации 250 мМ. Очищенные белки анализировали путем электрофореза в геле NuPAGE 4-12% Bis-Tris с визуализацией путем окрашивания кумасси синим. Элюированные белки пропускали через центрифужное фильтровальное устройство Vivaspin (номер по каталогу 28-9322-18, GE); прежний буферный раствор заменяли на солевой раствор, забуференный фосфатом (PBS).

Как видно на фиг. 7, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) показал, что все три полученных в очищенном виде белка, а именно домен 2 Кунитца

(KPI-2) TFPI человека, кролика и мыши, были в хорошем состоянии.

Пример 6. Количественное определение сродства антител против TFPI к антигену TFPI.

Сродство связывания антител клонов Т417, Т308, 308, 308-2 или 308-4, являющихся очищенными антителами против TFPI, с рекомбинантным человеческим TFPI, измеряли с помощью оптического биосенсора Biacore T-200 (GE Healthcare, США). Очищенный TFPI (номер по каталогу TFPI-875H, Creative Biomart, США) из клеток НЕК293 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare, США) за счет взаимодействия amino- и карбоксильных групп до максимального сигнала $R_{\max}=200$. Затем антитела клонов Т417, Т308, 308, 308-2 или 308-4 серийно разбавляли в буферном растворе HBS-EP (10 mM гидроксипиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); 0,005% поверхностно-активный агент Р20) и анализировали, используя указанный чип, в концентрации 0,078-10 nM при скорости потока 30 мкл/мин в течение 120 с для ассоциации и 600 с для диссоциации (см. табл. 12). Пропускали раствор глицин-HCl (10 mM; pH 1,5) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с, вызывая диссоциацию антител, связавшихся с TFPI. Сродство связывания выражали кинетическими константами ассоциации (K_{on}) и диссоциации (K_{off}) и рассчитывали равновесную константу диссоциации (K_D), используя программное обеспечение для Biacore T-200.

В результате, как видно из табл. 13 и фиг. 8, было показано, что аффинность полученных антител клонов 308-2 и 308-4 выше, чем у клона 308.

Таблица 12

SPR	Biacore T200
Чип	CM5
Рабочий буферный раствор	HBS-EP pH7,4
Скорость потока	30 мкл/мин
Время ассоциации/диссоциации	120 с / 600 с
Концентрация IgG	0,3125~nM, серийные разведения $1/2$
Регенерация	10 mM глицин-HCl pH1,5; 30 с

SPR - оптический биосенсор, работающий на основе поверхностного плазмонного резонанса.

Таблица 13

	K_{on}	K_{off}	K_D
T417	5.3×10^6	3.5×10^{-5}	6.7×10^{-12}
T308	4.4×10^6	4.2×10^{-5}	9.4×10^{-12}
308	3.5×10^6	1.7×10^{-4}	5.0×10^{-11}
308-2	3.0×10^6	9.9×10^{-5}	3.3×10^{-11}
308-4	3.5×10^6	8.2×10^{-5}	2.4×10^{-11}

Пример 7. Определение активности FXa.

Индукция свертывания крови происходит по внутреннему и внешнему путям, и эти два пути приводят к активации тромбина посредством общего механизма, активирующего фактор X, в результате чего образуется фибрин и начинается свертывание крови. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) состоит из трех доменов Кунитца (K1, K2 и K3). Известно, что домен 1 Кунитца (K1) связывается с фактором VIIa (FVIIa), а домен 2 Кунитца (K2) - с фактором Ха (FXa).

Также известно, что свертывание крови подавляется в результате связывания TFPI с фактором свертывания крови. Поэтому, чтобы установить, как влияют испытываемые антитела против TFPI на процесс свертывания крови, определяли активность фактора Ха. Система для анализа включала только фактор Ха, TFPI и испытываемое антитело, чтобы свести к минимуму влияние ряда факторов. Когда испытываемое антитело связывается с TFPI, функционирование фактора Ха не подавляется, и, следовательно, проявляется активность FXa. Но если испытываемое антитело связывается с TFPI не эффективно, TFPI связывается с фактором Ха, функционирование которого в результате подавляется, и окрашивание (по которому судят об активности FXa) ослабевает. Остаточная активность FXa, не подавленная TFPI, измеряется степенью расщепления хромогенного субстрата, в качестве которого использовали специфичный для фактора Ха агент S-2765; при расщеплении этого вещества образуется хромофор паранитроанилин (pNA), детектируемый на длине волны 405 нм. Эти измерения базируются на определении амидолитической активности. Фактор Ха, TFPI, антитела mAb2021 и агент S-2765 разводили на буферном растворе для амидолитического анализа (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (BSA); 0,02% NaN_3 ; 5 mM CaCl_2 ; pH7,4), как показано в табл. 14, и вносили отмеренное количество в пробирку объемом 1,5 мл.

Таблица 14

Вещество	Исходная концентрация (нМ)	Рабочая концентрация (нМ)	Другое
FXa	2 нМ	0,5 нМ	
TFPI	40 нМ	10 нМ	
S-2765	2 мМ	0,5 мМ	
Стандартная кривая	10 нМ	0,02; 0,1; 0,5; 2,5 нМ	FXa
mAb2021	160 нМ	0,625; 2,5; 10; 40 нМ	Положительный контроль

В лунки планшета вносили по 50 мкл испытываемых антител против TFPI и столько же положительного контроля (моноклональные антитела против TFPI mAb2021; Novo Nordisk) до концентрации 40; 10; 2,5 или 0,625 нМ. В каждую лунку добавляли 50 мкл раствора TFPI концентрацией 40 нМ и планшет оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Для получения стандартной кривой в лунки вносили по 50 мкл раствора фактора Ха в различных концентрациях и по 50 мкл раствора фактора Ха концентрацией 2 нМ и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин. Затем в лунки прибавляли по 50 мкл раствора S-2765 концентрацией 2 мМ и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Определяли поглощение в лунках на длине волны 405 нм с помощью микропланшетного ридера в режиме измерения по конечной точке.

В результате, как видно на фиг. 9, для клонов T308 и T417, которые являются химерными антителами против TFPI, наблюдалось возрастание поглощения, зависимое от концентрации антител; это свидетельствовало, что эффект ингибирования TFPI этими антителами усиливается с увеличением концентрации антител. В случае клона T308 в образце, обработанном в концентрации 40 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 91% от того, что наблюдалось в положительном контроле (образец без TFPI, антитела против TFPI mAb2021); в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 89% от наблюдавшегося в указанном контроле. В случае клона T417 в образце, обработанном в концентрации 40 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 89% от того, что наблюдалось в положительном контроле (образец без TFPI, антитела против TFPI mAb2021); в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 72% от наблюдавшегося в указанном контроле. Если эффект испытываемых антител сравнивать при концентрации TFPI 10 нМ, то видно, что клон T417 обладает более высокой ингибирующей активностью в отношении TFPI, чем клон T308.

Также, как видно на фиг. 10, клон 308, полученный путем гуманизации клона T417, обладал более выраженным эффектом в описанном выше анализе. В случае клона 308 также наблюдалось зависимое от концентрации антител возрастание поглощения, что указывало на его способность ингибировать TFPI. В случае клона 308 в образце, обработанном при концентрации 40 нМ, ингибирующая TFPI активность составляла около 85,1% от того, что наблюдалось в положительном контроле (образец без TFPI, антитела против TFPI mAb2021); в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 58,2% от наблюдавшегося в указанном контроле; это свидетельствовало, что этот клон уступает в ингибировании TFPI клону T417, у которого в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, ингибирующая TFPI активность составляла 78,4%.

Чтобы усилить эффект клона 308, путем обратной мутации были получены клоны 308-2 и 308-4. На фиг. 11 показано, что антитела обоих этих клонов ингибировали TFPI зависимым от концентрации образом. Видно, что в случае образцов, обработанных при концентрациях 40 и 10 нМ, ингибирующая TFPI активность клонов 308-2 и 308-4 выше, чем у клона 308. При концентрации 40 нМ клоны 308-2 и 308-4 проявляли ингибирующую TFPI активность, составлявшую 85 и 82% соответственно, от того, что наблюдалось в положительном контроле (антитела против TFPI mAb2021). При концентрации 10 нМ, ингибирующая TFPI активность клона 308-2 составляла 72%, а клона 308-4 - 78%, что выше, чем у клона 308-2. Показано также, что эти антитела сравнимы с химерными антителами клона T417, ингибирующая TFPI активность которого 77%.

Пример 8. Количественное определение комплекса TF/FVIIa/FXa.

Наиболее важные факторы внешнего пути свертывания крови включают тканевой фактор (TF), фактор VII (FVII), фактор X (FX) и др. Когда под влиянием сигнала извне тканевой фактор и фактор VIIa образуют комплекс, фактор X активируется, становясь фактором Ха. Фактор Ха является компонентом активатора протромбина; протромбин превращается в тромбин, который катализирует превращение фибриногена в фибрин, формирующий тромб. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) связывается с фактором Ха, в результате чего подавляется активность последнего, что препятствует свертыванию крови. Чтобы оценить эффект антител против TFPI в описанном выше механизме, был проведен анализ образования комплекса TF/FVIIa/FXa. В присутствии TFPI вместе с антителами против TFPI или же без них определяли количество фактора Ха, образующегося под действием комплекса TF/FVIIa, и степень его ингибирования колориметрическим способом по развитию окраски, обусловленной расщеплением хромогенного субстрата (агента S2765) под действием фактора Ха; тем самым оценивался эффект антител против TFPI. Иными словами, при усилении ингибирующего TFPI эффекта антител против TFPI возрастает количество фактора Ха, в результате возрастает количество продуктов расщепления хромогенного субстрата и увеличивается поглощение на соответствующей

длине волны.

В пробирках объемом 1,5 мл тканевой фактор (4500L/B, Sekisui diagnostics), фактор VIIa (Novo Nordisk, Novo Seven) и фактор X (PP008A, Nyphen biomed) разбавляли буферным раствором для анализа (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 мг/мл BSA; 0,02% NaN₃; 5 mM CaCl₂; pH 7,4) до концентраций, приведенных в табл. 15.

Таблица 15

Вещество	TF	FVIIa	FX
Концентрация	6 нг/мл	800 нМ	30 нМ

Полученную в результате смесь вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве по 70 мкл. В контрольную ("пустую") лунку вносили 70 мкл указанного выше буферного раствора для анализа. Инкубировали при температуре 37°C в течение 15 мин, после чего добавляли по 30 мкл TFPI до концентрации 50 нМ. В "пустую" лунку и в лунку положительного контроля (образец, не обработанный антителами против TFPI и TFPI) вносили 30 мкл буферного раствора для анализа. Затем в каждую лунку вносили 30 мкл антител против TFPI до концентрации 12,5; 25; 50 и 100 нМ. В "пустую" лунку, в лунку положительного контроля (образец, не обработанный антителами против TFPI и TFPI) и в лунку отрицательного контроля (образец, не обработанный антителами против TFPI) вносили по 30 мкл буферного раствора для анализа. Инкубировали при температуре 37°C в течение 15 мин. После этого в лунки вносили по 20 мкл EDTA (E7889, Sigma-Aldrich) до концентрации 50 mM. Затем в лунки вносили по 50 мкл хромогена S2765 до концентрации 200 мкМ и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин. По истечении этого промежутка времени в каждой лунке определяли поглощение на длине волны 405 нм при помощи микропланшетного ридера.

В результате, как можно видеть на фиг. 12, подтвердился эффект клонов T308 и T41, являющихся химерными антителами. Было показано, что для антител этих двух клонов наблюдалось зависимое от концентрации антител возрастание поглощения; это свидетельствовало, что ингибирование TFPI антителами этих двух клонов усиливается зависимым от концентрации образом. В образце, обработанном при концентрации 100 нМ, ингибирующий TFPI эффект антител клона T308 составил 100%, в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, их ингибирующий TFPI эффект составил около 87% по сравнению с положительным контролем (образцом, не обработанным антителами против TFPI и TFPI). В случае клона T417 как в образце, обработанном при концентрации 100 нМ, так и в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, ингибирующий TFPI эффект составил 100% в сравнении с положительным контролем (образцом, не обработанным антителами против TFPI и TFPI). Таким образом, ингибирующий TFPI эффект клона T417 превышает таковой клона T308.

Также на фиг. 13 представлены результаты для клона 308, полученного путем гуманизации антител клона T417, обладающего более выраженным эффектом, чем клон T308. В случае клона 308 также наблюдалось зависимое от концентрации возрастание поглощения, свидетельствующее о том, что антитела этого клона ингибировали TFPI. В образце, обработанном при концентрации 100 нМ, ингибирующая TFPI активность антител клона 308 составляла около 94,3%, в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, ингибирующая TFPI активность антител клона 308 составляла около 54,2% по сравнению с положительным контролем (образцом, не обработанным антителами против TFPI и TFPI); эти данные говорят о том, что по эффекту ингибирования TFPI клон 308 уступает клону T417, у которого эта активность составила 100%.

Чтобы усилить эффект гуманизированных антител клона 308 в аминокислотной последовательности этих антител создали обратную мутацию, получив таким образом клоны 308-2 и 308-4. На фиг. 14 видно, что и для клона 308-2, и для клона 308-4 наблюдалось зависимое от концентрации антител ингибирование TFPI. В случае образцов, обработанных при концентрации 50 нМ, ингибирующая TFPI активность клонов 308-2 и 308-4 превышает таковую клона 308. При концентрациях 100 и 50 нМ для клонов 308-2 и 308-4 наблюдалась ингибирующая TFPI активность, составлявшая 100% от положительного контроля (в образце, не обработанном антителами против TFPI и TFPI). При концентрации 25 нМ ингибирующая TFPI активность антител клона 308-2 составляла 37,8%, а клона 308-4 - 68,4%, что больше, чем у клона 308-2. Однако видно, что ингибирующая TFPI активность антител с обратными мутациями ниже, чем химерных антител клона T417.

Пример 9. Определение образования тромбина.

Механизм свертывания крови подразделяется на внутренний и внешний пути. Известно, что функция тканевого фактора (TF) во внешнем пути свертывания крови состоит в осуществлении положительной обратной связи в механизме свертывания крови и в обеспечении быстрого массивного образования тромбина. Наиболее важные факторы механизма свертывания крови включают тканевой фактор (TF), фактор VII (FVII), фактор X (FX) и др. Когда под влиянием сигнала извне тканевой фактор и фактор VIIa образуют комплекс, фактор X активируется, становясь фактором Ха. Фактор Ха является компонентом активатора протромбина; протромбин превращается в тромбин, который катализирует превращение фибриногена в фибрин, формирующий тромб. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) связывается с фактором Ха, в результате чего подавляется активность последнего, что препятствует свертыванию крови. Определение образования тромбина вклю-

чает: обработку плазмы крови испытываемым образцом; установление количества образовавшегося в плазме тромбина на основании измерения количества флуоресцирующего продукта, образующегося при происходящем под действием тромбина превращении флуорогенного субстрата в флуоресцентный продукт в присутствии триггерного реагента для определения тромбина в бедной тромбоцитами плазме (PPP-reagent LOW); калибровку наблюдаемого количества образовавшегося тромбина по известному количеству тромбинового калибратора (комплекса тромбин- α 2-макроглобулин) и, таким образом, определение истинного количества образовавшегося тромбина.

В лунки для загрузки образцов предварительно нагретого 96-луночного круглодонного планшета (Immulon 2HB) добавляли по 20 мкл раствора триггерного реагента PPP-reagent LOW и в калибровочные лунки - по 20 мкл раствора калибратора. Испытываемые антитела против TFPI разводили в предварительно приготовленном разведении образца (плазма, дефицитная по фактору VIII) в концентрации 0,3125; 0,625; 1,25 или 2,5 нМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, чтобы произошло связывание с TFPI.

В каждую калибровочную и "пустую" лунки вносили по 80 мкл каждого из разведений образца, а в остальные лунки - по 80 мкл разведенных антител. Чтобы осуществить промывание, нажимали кнопку запуска в низу экрана; при промывании конец подводящей трубки находился в дистиллированной воде на водяной бане с температурой 37°C, а отводящей - в пустой емкости. По окончании промывания нажимали следующую кнопку для осуществления холостого прогона. Конец подводящей трубки помещали в буферный раствор, содержащий флуорогенный субстрат (FluCa), нагретый до температуры 37°C, и давали этому раствору заполнить трубку. Конец отводящей трубки вставляли в отверстие "М" в диспенсере, после чего нажимали следующую кнопку, чтобы в каждую лунку подавалось автоматически 20 мкл раствора FluCa, затем осуществляли перемешивание встряхиванием и начинали анализ.

На фиг. 15 представлены результаты определения образования тромбина для химерных антител клона T417 и гуманизированных антител клона 308, выбранных на основании описанного выше определения активности фактора Ха и комплекса TF/FVIIa/FXa. При концентрации 2,5 нМ в случае клона T417 наблюдалось возрастание пика тромбина 208% по сравнению с "пустой" пробой (обработка разведением образца), в случае клона 308 - 162%. Что касается эндогенного тромбинового потенциала (ЕТР), являющегося показателем суммарного образования тромбина, то в образцах, обработанных при концентрации 2,5 нМ, в случае клона T417 наблюдалось возрастание ЕТР 131% по сравнению с отрицательным контролем (без антител), а в случае клона 308 - 122%. При сравнении клонов T417 и 308 видно, что эффект клона T417 более выражен, нежели антител клона 308.

Образование тромбина определяли также для антител клонов 308-2 и 308-4, выбранных на основании результатов определения активности фактора Ха и комплекса TF/FVIIa/FXa после обратной мутации, созданной с целью усилить эффект гуманизированных антител клона 308. Как для клона 308-2, так и для клона 308-4 было продемонстрировано зависимое от концентрации увеличение образования тромбина. При сравнении результатов анализа образцов, обработанных при концентрации 2,5 нМ, видно, что в случае как клона 308-2, так и клона 308-4 имело место возрастание пика тромбина и увеличение суммарного количества образовавшегося тромбина, превышавшие таковые для клона 308. В образцах, обработанных при концентрации 2,5 нМ, в случае клона 308-2 пик тромбина составил 183% по сравнению с отрицательным контролем (без антител), а в случае клона 308-4 - 191%; значение ЕТР составило 126% как для клона 308-2, так и для клона 308-4, откуда следует, что клоны 308-2 и 308-4 обладают повышенной способностью вызывать образование тромбина. Также способность антител этих двух клонов вызывать образование тромбина превышало таковую антител клона 308 и было сравнимо с этим показателем для химерных антител клона T417.

Пример 10. Предсказание связывания антител против TFPI клона 308-4 с доменом 2 Кунитца.

Были сконструированы антитела против ингибитора внешнего пути свертывания крови (ингибитора пути тканевого фактора, TFPI), которые подавляют активность фактора X и, таким образом, могут служить для лечения и предотвращения гемофилии.

Индукция свертывания крови происходит по внутреннему и внешнему путям, и эти два пути приводят к активации тромбина посредством общего механизма, активирующего фактор X, в результате чего образуется фибрин и начинается свертывание крови. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) состоит из трех доменов Кунитца (K1, K2 и K3). Известно, что домен 1 Кунитца (K1) связывается с фактором VIIa (FVIIa), а домен 2 Кунитца (K2) - с фактором Ха (FXa).

Как описывается в патенте Кореи № 10-2015-0026555, озаглавленном "Новые антитела против TFPI и содержащая их композиция", были получены антитела против TFPI клона 308-4. Эти антитела характеризуются K_D $2,64 \times 10^{-11}$ М или меньше, предпочтительно $2,52 \times 10^{-11}$ М или меньше, более предпочтительно $2,4 \times 10^{-11}$ М или меньше.

В данном изобретении предпринята попытка получить антитела, обладающие более высоким сродством связывания с TFPI путем созревания аффинности клона 308-4.

Для предсказания связывания антител против TFPI клона 308-4 с доменом 2 Кунитца (K2) провели поиск по гомологии в базе данных IgBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), используя аминокислотную последовательность клона 308-4. В результате было обнаружено, что сходное строение имеет структура 3QOS (номер Банка данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот, PDB). Исходя из 3QOS, составили структуру антител клона 308-4, используя моделирование по гомологии с помощью программы BioLuminate (Schrodinger, Германия). С полученной структурой провели молекулярный докинг относительно домена 2 Кунитца, используя программу для предсказания связывания между белковыми молекулами PIPER. Для выбора паратопов в полученной связывающей структуре анализировали взаимодействие между антителом клона 308-4 и доменом 2 Кунитца и в аминокислотной последовательности антител клона 308-4 отобрали аминокислотные остатки, которые образуют нековалентные связи (см. табл. 16). С выбранными паратопами смоделировали созревание аффинности с помощью программы BioLuminate, чтобы рассчитать энергию связывания для каждого паратопа и предсказать изменение энергии связывания при аминокислотных заменах. Таким образом отобрали аминокислотные остатки с неизменными значениями энергии связывания, что отразили в структуре праймеров (см. табл. 17).

В табл. 16 представлены выбранные аминокислотные остатки антител против TFPI клона 308-4, которые должны образовывать нековалентные связи при взаимодействии антител клона 308-4 с доменом 2 Кунитца.

В табл. 17 представлены выбранные аминокислотные остатки с неизменной энергией связывания паратопов при созревании аффинности.

Таблица 16

Варибельная область	Выбранные аминокислотные остатки *
Тяжелая цепь	S31, T52a, Y56, E64, N98
Легкая цепь	S31a, T92, N93

*Нумерация по Кабату.

Таблица 17

Варибельная область	Выбранные аминокислотные остатки
VH S31	H, K, R, T, Y, I, L
VH T52a	F, Y, L, H, K, R, I
VH Y56	H, R, K
VH E64	Q, D, H
VH N98	F, H, K, Q, R, Y
VL S31a	I, L, N, Q, R, F, K, T, V
VL T92	F, Y, I, N
VL N93	Y, L, I, Q, N, K

Пример 11. Получение новых антител путем созревания аффинности клона 308-4 с использованием дисплейной библиотеки фрагментов scFv в дрожжевой системе.

11-1. Создание библиотеки scFv методом клеточного дисплея с использованием клеток дрожжей.

Чтобы ввести мутацию в дрожжевую библиотеку, провели полимеразную цепную реакцию (PCR) для трех фрагментов варибельной области тяжелой цепи и двух фрагментов варибельной области легкой цепи. А именно, в случае фрагмента 1 варибельной области тяжелой цепи нуклеотидную последовательность гена варибельной области тяжелой цепи антител против TFPI клона 308-4 использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 40, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 41-48); в случае фрагмента 2 варибельной области тяжелой цепи нуклеотидную последовательность гена варибельной области тяжелой цепи антител против TFPI клона 308-4 использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 49, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 50-61; в случае фрагмента 3 варибельной области тяжелой цепи нуклеотидную последовательность гена варибельной области тяжелой цепи антител против TFPI клона 308-4 использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 62, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 63-69. В каждом случае PCR проводили с использованием готовой смеси для полимеразной цепной реакции AccuPower Pfu PCR PreMix (номер по каталогу K-2015, Bioneer). PCR проводили в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 60 с при 72°C; после чего 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, номер по каталогу 28706, QIAGEN). В случае фрагмента 1 варибельной области легкой цепи нуклеотидную последовательность гена варибельной области легкой цепи антител против TFPI клона 308-4 использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 720, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 73-82; в случае фрагмента 2 варибельной области легкой цепи нуклеотидную

последовательность гена варибельной области легкой цепи антител против TFPI клона 308-4 использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 83, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 84-87. В каждом случае PCR проводили с использованием готовой смеси для полимеразной цепной реакции AccuPower Pfu PCR PreMix (номер по каталогу K-2015, Bioneer). PCR проводили в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 30 секунд при 95°C, 30 с при 55°C и 60 с при 72°C; после чего 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, номер по каталогу 28706, QIAGEN).

Полученные нуклеотидные последовательности генов фрагментов варибельной области тяжелой цепи брали в молярном соотношении 1:1:1 и использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 70, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 71, для PCR, которую проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции Takara Primer Star PCR premix (номер по каталогу R040B, Takara) в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 20 циклов, каждый из которых включал 10 с при 95°C, 20 с при 55°C и 30 с при 72°C; после чего 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), получая таким образом ген варибельной области тяжелой цепи.

Полученные нуклеотидные последовательности генов фрагментов варибельной области легкой цепи брали в молярном соотношении 1:1 и использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 91, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 92, для PCR, которую проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции Takara Primer Star PCR premix (номер по каталогу R040B, Takara) в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 20 циклов, каждый из которых включал 10 с при 95°C, 30 с при 55°C и 40 с при 72°C; после чего 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), получая таким образом ген варибельной области легкой цепи.

Полученные нуклеотидные последовательности генов варибельных областей тяжелой и легкой цепей брали в молярном соотношении 1:1 и использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 93, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 94, для PCR, которую проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции Takara Primer Star PCR premix (Takara) в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 20 циклов, каждый из которых включал 10 с при 95°C, 20 с при 55°C и 30 с при 72°C; после чего 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), получая таким образом библиотеку ДНК фрагментов scFv антител клона 308-4 для созревания аффинности. Эту ДНК в количестве 200 нг смешивали с 1 мкг плазмидной ДНК (вектор pCTCON), обработанной ферментами рестрикции NheI (номер по каталогу R0131L, NEB) и BamHI (номер по каталогу R0136L, NEB); полученной смесью трансформировали дрожжевые клетки (электрокомпетентные клетки EBY100). Трансформированные дрожжевые клетки суспендировали в 100 мл среды YPD и культивировали при температуре 30°C при перемешивании со скоростью вращения 200 об/мин в течение 1 ч. Культивированные дрожжевые клетки вносили в 1 л среды SD и культивировали при температуре 30°C при перемешивании со скоростью вращения 200 об/мин в течение 12 ч или дольше, после чего центрифугировали для удаления супернатанта и ресуспендировали клетки в буферном растворе для хранения дрожжевых клеток; полученные клетки хранили при температуре -70°C. Чтобы определить размеры библиотеки, через 1 ч после трансформации брали 100 мкл культуральной среды, высевали серийные разведения на среду SD, инкубировали при температуре 30°C в течение 12 ч или дольше и затем подсчитывали колонии.

В табл. 18 представлены праймеры, которые использовались для создания дрожжевой дисплейной библиотеки фрагментов scFv.

Таблица 18

Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
VH FR1 Fo	GAA GTC CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGT	40
VH FR1 Re_S	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA GCT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	41
VH FR1 Re_H	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA ATG GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	42
VH FR1 Re_K	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA TTT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	43
VH FR1 Re_R	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA TCT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	44
VH FR1 Re_T	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA AGT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	45
VH FR1 Re_Y	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA ATA GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	46
VH FR1 Re_I	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA AAT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	47
VH FR1 Re_L	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA AAG GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	48
VH FR2 Fo	TAT GCC ATG AAC TGG GTT CGT CAG GCC	49
VH FR2 Re_T- YH-EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT GTX1 TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	50
VH FR2 Re_T- RK-EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	51
VH FR2 Re_FYLH-YH- EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT GTX1 TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	52

VH FR2 Re_FYlh-RK- EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	53
VH FR2 Re_KRI-YH- EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT GTX1 TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	54
VH FR2 Re_KRI-RK- EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	55
VH FR2 Re_T- YH-EQDH_#2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT ATR TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	56
VH FR2 Re_T- RK-EQDH_#2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	57
VH FR2 Re_FYlh-YH- EQDH_#2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT ATR TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	58
VH FR2 Re_FYlh-RK- EQDH_#2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	59
VH FR2 Re_KRI-YH- EQDH_#2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT ATR TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	60
VH FR2 Re_KRI-RK- EQDH_#2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	61
VH FR3 Fo	GGG CGC TTC ACC ATT TCC CGC GAT AAC	62
VH FR3 Re_N	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA ATT GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	63
VH FR3 Re_F	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA AAA GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	64
VH FR3 Re_H	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA ATG GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	65
VH FR3 Re_K	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA TTT GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	66
VH FR3 Re_Q	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA TTG GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	67
VH FR3 Re_R	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA TCT GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	68
VH FR3 Re_Y	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA ATA GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	69
VH Final Fo	GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GCT AGC GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	70
VH Final Re	GGA GCT CAC AGT CAC CAG CGT GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA	71
VL FR1 Fo	GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	72
VL FR1 Re_S	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC GGA GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	73
VL FR1 Re_I	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	74

VL FR1 Re_L	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAG GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	75
VL FR1 Re_N	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AGC GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	76
VL FR1 Re_Q	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC TTG GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	77
VL FR1 Re_R	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC TCT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	78
VL FR1 Re_F	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAA GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	79
VL FR1 Re_K	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC TTT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	80
VL FR1 Re_T	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AGT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	81
VL FR1 Re_V	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAC GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	82
VL FR2 Fo	GAC GGC AAG ACG TAT CTG AAT TGG CTC CAG	83
VL FR2 Re_T-YH	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA GTR GGT GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	84
VL FR2 Re_T-LIHQNK	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA WWK GGT GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	85
VL FR2 Re_FYIN-YH	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA GTR AWW GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	86
VL FR2 Re_FYIN-LIHQNK	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA WWK AWW GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	87
VL Final Re	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA	88
VL Final Fo Sfil	Cgtggcccaggcggcc GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	89
VL Final Fo Nrul	Cta TCG CGA TTG CAG TGG CAC TGG CTG GTT TCG	90
VL overlap Fo	GGC ACG CTG GTG ACT GTG AGC TCC Gga ggc ggc gga agt ggc gga gga ggc agc ggc gga ggc ggg agt GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	91
VL Final Re	GTC CTC TTC AGA AAT AAG CTT TTG TTC GGA TCC GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA	92
VH Гомологичная рекомбинация	GCT CTG CAG GCT AGT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT gct agc	93
VL Гомологичная рекомбинация	TTG TTA TCA GAT CTC GAG CTA TTA CAA GTC CTC TTC AGA AAT AAG CTT TTG TTC GGA TCC	94

11-2. Отбор антител.

Библиотеку дрожжевых клеток, полученную в примере 11-1, помещали в среду SD и культивировали при температуре 30°C при перемешивании со скоростью вращения 200 об/мин в течение 12 ч или дольше. Затем заменяли среду на среду SG и культивировали при температуре 25°C при перемешивании со скоростью вращения 200 об/мин в течение 12 ч, чтобы произошла экспрессия антител на поверхности клеток. После этого клетки собирали путем центрифугирования, промывали PBSM (натрий-фосфатным буферным раствором, содержащим 3% бычьего сывороточного альбумина), ресуспендировали в 1 мл раствора PBSM и инкубировали с биотинилированным рекомбинантным человеческим TFPI при комнатной температуре в течение 1 ч. Дрожжевые клетки, инкубированные с рекомбинантным человеческим TFPI, промывали раствором PBSM и инкубировали с микрочастицами, несущими стрептавидин (номер по каталогу 130-048-101, Miltenyi biotech) на льду в течение 15 мин. Затем клетки промывали один раз PBSM, ресуспендировали в растворе PBSM и пропускали через колонку магнитного сепаратора MACS (номер по каталогу 130-042-901, Miltenyi biotech), чтобы отделить дрожжевые клетки, несущие белок TFPI. Выделенные клетки помещали в среду SD и культивировали в течение 48 ч или дольше. Описанную выше процедуру повторяли два раза, совершая таким образом отбор антител.

11-3. Получение отдельных клонов методом FACS.

Размноженные индивидуальные колонии, собранные из дрожжевой дисплейной библиотеки, культивировали в среде SD при температуре 30°C при перемешивании со скоростью вращения 200 об/мин в течение 12 ч. Затем среду заменяли на среду SG и культивировали при температуре 25°C при перемешивании со скоростью вращения 200 об/мин в течение 12 ч или дольше, чтобы произошла экспрессия анти-

тел на поверхности клеток. Дрожжевые клетки отделяли путем центрифугирования, промывали раствором PBSF (натрий-фосфатным буферным раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина), ресуспендировали в 50 мкл раствора PBSF и инкубировали с биотинилированным рекомбинантным человеческим TFPI и мышиными антителами против с-туса (номер по каталогу M4439, Sigma)) при комнатной температуре в течение 30 мин. Инкубированные дрожжевые клетки промывали раствором PBSF, ресуспендировали в 50 мкл раствора PBSF и затем инкубировали с противомышиными антителами, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (номер по каталогу F0257, Sigma) и стрептавидином, меченным фикоэритрином (PE), на льду без доступа света в течение 15 мин. Затем клетки промывали раствором PBSF и ресуспендировали в 500 мкл раствора PBSF. После этого клоны, для которых наблюдалась наиболее интенсивная флуоресценция в диапазонах, характерных для FITC и PE, отбирали путем проточной цитометрии в варианте сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS). В итоге получали индивидуальные клоны.

В результате удалось отобрать клоны антител, специфично связывающихся с человеческим TFPI, и были установлены их аминокислотные последовательности (см. табл. 19). В заявке на патент Кореи № 10-2015-0026555, антитела, используемые по данному изобретению, описаны под номером 2015-26555 (SEQ ID NO по предыдущей заявке). В табл. 20 приведены аминокислотные последовательности участков CDR антител клонов, представленных в табл. 19; нумерация аминокислотных остатков по системе Кабата).

Таблица 19

Клон	Вариабельная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
1001	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTTTGGSYTYADSV D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	95
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWWGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1015	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSHYTYADSV E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	97
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWWGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1021	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSYTYADSV D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGH F FLMDYWG QGTLVTVSS	98
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWWGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1023	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSYTYADSV D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	99
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWWGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1024	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM S WV RQAPGKGLEWVSTTTGGSYTYADSV D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	100
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF	101

		TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	
1104	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTTTGGSHYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	102
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDYDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
1123	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSHYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLTVSS	104
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1202	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MNWVRQAPGKGLEWVGTTTGGSYTYADSVQGRFT ISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLM DYWGQGTLLTVSS	105
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1208	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSHYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLTVSS	104
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDYDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTLYLPFTFGQGTKVEIKR	106
1214	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	25
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDYDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
1216	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMNW VRQAPGKGLEWVSTTTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLTVSS	107
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHLPFTFGQGTKVEIKR	108
1223	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTTTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLTVSS	109
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96

1224	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	100
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	96
1232	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQD <u>G</u> HFLMDYWG QGTLVTVSS	98
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	103
1234	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	110
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF T <u>L</u> EISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	111
1238	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV <u>E</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQD <u>G</u> HFLMDYWG QGTLVTVSS	109
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	103
1243	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGG <u>S</u> HTYYADSVHGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQD <u>G</u> HFLMDYWG QGTLVTVSS	112
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	96
1248	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGG <u>S</u> HTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQD <u>G</u> HFLMDYWG QGTLVTVSS	113
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	96
3007	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITLGGSYTYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	114
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>L</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC <u>W</u> QGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	101
3016	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV	115

		RQAPGKGLEWVSTITTGGSHYYADSVGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHLPFTFGQGTKVEIKR	116
3024	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	117
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHLPFTFGQGTKVEIKR	116
3115	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTTITTGGSHYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	117
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDV DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
3120	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSVGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYFLMDYWG QGTLTVSS	118
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
3131	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDQGFLMDYWG QGTLTVSS	119
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
3203	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSVGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	120
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	101
3241	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSVGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	25
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF	96

		TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	
4011	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFY SY AMNW VRQAPGKLEWVSTIT TGG SH TY YADSVEGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	121
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD VDGK TYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHLPFTFGQGTKVEIKR	122
4017	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKLEWVG TIT TGGSYTY Y ADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYFLMDYWG QGTLVTVSS	123
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD IDGK TYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
4034	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKLEWVSTIT TGG SH TY YADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYFLMDYWG QGTLVTVSS	124
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD IDGK TYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
4041	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKLEWVSTIT TGG SH TY YADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYFLMDYWG QGTLVTVSS	125
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD VDGK TYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
4141	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKLEWVG TIT TGGSH TY YADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYFLMDYWG QGTLVTVSS	126
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD VDGK TYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
4146	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKLEWVSTIT TGG SYTY Y ADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYFLMDYWG QGTLVTVSS	127
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD IDGK TYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQ GTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
4206	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKLEWVSTIT TGG SH TY YADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQ MD SLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	128
	Легкая цепь	DVVM TQTPLSLP VTLGQPASISCKSSQSLLD VDGK TYL	122

		NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HLPFTFGQGTKVEIKR	
4208	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVG TITTTGGSYTYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	129
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	130
4278	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMNWF RQAPGKGLEWVSTITLGGSYTYYADSV DGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQYLDGNFLMDY WGQGT LVT VSS	131
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	96
4287	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMNWF RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV EGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQHPYGNFLMDY WGQGT LVT VSS	132
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	96
1	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWF RQAPGKGLEWVG TITTTGGSYTYYADSV DGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	99
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	22
2	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWF RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV EGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	25
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	96
3	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWF RQAPGKGLEWVG TITTTGGSHTYYADSV DGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	117
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV D G KTYL NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	103
4	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWF RQAPGKGLEWVG TITTTGGSHTYYADSV EGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	133
	Легкая цепь	DVVMQTPTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV D G KTYL NWLQORPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYC WQGT HFPFTFGQGTKVEIKR	103

5	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	95
	Легкая цепь	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	22
6	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	134
	Легкая цепь	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	22
7	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	99
	Легкая цепь	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDVGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
8	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	25
	Легкая цепь	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDVGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
9	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	135
	Легкая цепь	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDVGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
10	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	110
	Легкая цепь	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDVGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	103

11	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTTITGGSYTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	136
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
12	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTTITGGSH ^T TY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLTVSS	137
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
13	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTTITGGSH ^T TY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	138
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
14	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMNWF RQAPGKGLEWVSTITLGGSYTY ^Y ADSV ^D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQYLDGNFLMDY WGQGLTVTVSS	131
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^Y FPFTFGQGTKVEIKR	139
15	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMNWF RQAPGKGLEWVSTITLGGSYTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQHPYGNFLMDY WGQGLTVTVSS	132
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGF ^Y FPFTFGQGTKVEIKR	140
16	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMTWV RQAPGKGLEWVSTITLGGSH ^T TY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVTVSS	141
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
17	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWV RQAPGKGLEWVSTITLGGSH ^T TY ^Y ADSV ^Q GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVTVSS	142
	Легкая цепь	DVVMQTPTSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
18	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMTWV RQAPGKGLEWVSTITLGGSH ^T TY ^Y ADSV ^D GRFTISRDN	143

		AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPFTFGQGTKVEIKR	96
19	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMNW VRQAPGKGLEWVSTITKKGSTYYADSVDRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGEFLMDYW QGTLTVSS	144
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPFTFGQGTKVEIKR	22
20	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMNW VRQAPGKGLEWVSTIKKGSTYYADSVDRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGEFLMDYW QGTLTVSS	145
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPFTFGQGTKVEIKR	22
21	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNW RQAPGKGLEWVSTITKGGSTYYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLTVSS	146
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPFTFGQGTKVEIKR	22
22	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNW RQAPGKGLEWVSTITGGSTYYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLTVSS	109
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDYGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPFTFGQGTKVEIKR	147
23	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMNW VRQAPGKGLEWVSTITGGSTYYADSVDRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYW QGTLTVSS	148
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTLPFTFGQGTKVEIKR	108

Таблица 20

Клон	Варибельная область	Аминокислотная последовательность CDR1	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность CDR2	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность CDR3	SEQ ID NO
1001	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITGGSTYYADSDG	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG	152	LVSKLDS	153	WQGTHTFPF	154

		KTYLN					
1015	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV <u>E</u> G	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1021	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	150	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1023	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1024	Тяжелая цепь	SYAM <u>S</u>	157	TITTGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>L</u> DG KTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1104	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV <u>Q</u> G	159	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>V</u> D GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1123	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV <u>E</u> G	155	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1202	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1208	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV <u>E</u> G	155	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>V</u> D GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGYLPF	161
1214	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>V</u> D GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1216	Тяжелая цепь	<u>H</u> YAMN	163	TITTGGSYTTY ADSV <u>E</u> G	162	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYL	152	LVSKLDS	153	WQGTHLPF	164
1223	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSV <u>E</u> G	162	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1224	Тяжелая цепь	SYAM <u>S</u>	157	TITTGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>I</u> DG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154

1232	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSVDG	150	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>VD</u> GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1234	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSVQG	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>IDG</u> KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1238	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSVEG	162	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>VD</u> GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1243	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVHG	166	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>IDG</u> KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1248	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVDG	167	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>IDG</u> KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3007	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITLGGSYTYY ADSVQG	168	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>LDG</u> KTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3016	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLDSDG KTYLN	169	LVSKLDS	153	WQGTHLPF	164
3024	Тяжелая цепь	SYAM <u>S</u>	157	TITTGGSYTYY ADSVQG	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLDSDG KTYLN	169	LVSKLDS	153	WQGTHLPF	164
3115	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVDG	167	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>VD</u> GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3120	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSVEG	162	QDGYFLMDY	170
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>IDG</u> KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3131	Тяжелая цепь	SYAM <u>S</u>	157	TITTGGSYTYY ADSVQG	165	QDGGFLMDY	171
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>IDG</u> KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3203	Тяжелая цепь	SYAM <u>S</u>	157	TITTGGSYTYY ADSVEG	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD <u>LDG</u> KTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3241	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTYY	162	QDGNFLMDY	151

				ADSV			
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4011	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHLPF	164
4017	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSVQ	165	QDGYFLMDY	131
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4034	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV	155	QDGYFLMDY	131
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4041	Тяжелая цепь	SYAMS	157	TITTGGSHTYY ADSV	155	QDGYFLMDY	131
	Легкая цепь	KSSQSLLDVD GKTYL	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4141	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV	155	QDGYFLMDY	131
	Легкая цепь	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4146	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSV	162	QDGYFLMDY	131
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4206	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHLPF	164
4208	Тяжелая цепь	SYAMS	157	TITTGGSYTY ADSVQ	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	205	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4278	Тяжелая цепь	KYAMN	172	TITLGSYTY ADSV	173	QYLDGNFLM DY	174
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4287	Тяжелая цепь	KYAMN	172	TITTGGSYTY ADSV	162	QHPYGNFLM DY	175
	Легкая цепь	KSSQSLLDIDG KTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSV	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDSG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
2	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSV	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDIDG	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154

		KTYLN					
3	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSH ^T TY ADSV ^D VG	167	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^V DG KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
4	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSH ^T TY ADSV ^E G	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^V DG KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
5	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^D VG	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
6	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^E G	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
7	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^D VG	150	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^V DG KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
8	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^E G	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^V DG KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
9	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^Q G	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^V DG KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
10	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^Q G	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^V DG KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
11	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSY ^T TY ADSV ^E G	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^I DG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
12	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSH ^T TY ADSV ^E G	155	QDGH ^F LMDY	156
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^I DG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
13	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSH ^T TY ADSV ^E G	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLD ^I DG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGT ^H FPF	154
14	Тяжелая цепь	KYAMN	172	TITLGGSY ^T TY ADSV ^D VG	173	QYLDGNFLM DY	174
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGT ^Y FPF	179
15	Тяжелая цепь	KYAMN	172	TITTGGSY ^T TY	162	QHPYGNFLM	175

				ADSV	EG	DY	
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGFYFPF	180
16	Тяжелая цепь	HYAMT	181	TITGGSHYY ADSV	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDIDG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGFHFPF	154
17	Тяжелая цепь	SYAMT	182	TITGGSHYY ADSVQ	159	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDIDG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGFHFPF	154
18	Тяжелая цепь	HYAMT	181	TITGGSHYY ADSV	167	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDIDG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGFHFPF	154
19	Тяжелая цепь	QYAMN	183	TITKKGSHYY ADSV	184	QDGEFLMDY	185
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGFHFPF	154
20	Тяжелая цепь	QYAMN	183	TITKKGSHYY ADSV	186	QDGEFLMDY	185
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGFHFPF	154
21	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITKKGSHYY ADSV	187	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSPSLLDSDG KTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGFHFPF	154
22	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITGGSHYY ADSV	155	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSPSLLDV KTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGFYFPF	179
23	Тяжелая цепь	HYAMN	188	TITGGSHYY ADSV	162	QDGHFLMDY	156
	Легкая цепь	KSSPSLLDIDG KTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGFHLPF	164

11-4. Клонирование гена IgG мутантных антител против TFPI клона 308-4, полученных в результате применения клеточного дисплея в дрожжевой системе.

Была проведена полимеразная цепная реакция (PCR) с геном варибельной области легкой цепи мутантных антител против TFPI клона 308-4, полученных в примерах 11-2 и 11-3; при этом использовали ДНК-полимеразу PrimeSTAR HS DNA polymerase (номер по каталогу R040B, Takara) вместе с прямым праймером, содержащим сайт рестрикции KpnI (см. табл. 21; SEQ ID NO: 189), и обратным праймером, представленным в табл. 21 как SEQ ID NO: 190. Также провели PCR с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой к-цепи человеческих антител; при этом использовали прямой и обратный праймеры, представленные в табл. 21 как SEQ ID NO: 191 и SEQ ID NO: 192 соответственно. PCR проводили в следующих условиях: 10 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 15 с при 94°C, 30 с при 56°C и 90 с при 72°C; после этого 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Затем ДНК, кодирующую варибельную область легкой цепи, и ДНК, кодирующую константную область легкой цепи, смешивали в соотношении 1:1, и с этой смесью проводили PCR с перекрывающимися праймерами, используя прямой и обратный праймеры, представленные в табл. 20 как SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 192 соответственно, в следующих условиях: 10 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 15 с при 94°C, 30 с при 56°C и 90 с при 72°C; после этого 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Выделенную ДНК обрабатывали рестриктазами KpnI (номер по каталогу R0142L, NEB) и HindIII (номер по каталогу R0104L, NEB) при температуре 37°C в течение 12 ч и затем разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли плазмидный вектор pcIW и так же разделяли полученную ДНК в агарозном геле. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, NEB), выделенный ген легкой цепи встраивали в линейный вектор pcIW по сайтам рестрикции NotI и HindIII. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий Escherichia coli штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech) и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), выделенную ДНК идентифицировали путем секвенирования.

Была проведена полимеразная цепная реакция (PCR) с геном варибельной области тяжелой цепи мутантных антител клона 308-4 в качестве матрицы; при этом использовали ДНК-полимеразу Prime-STAR HS DNA polymerase (Takara) вместе с прямым праймером, содержащим сайт рестрикции KpnI (см. табл. 21; SEQ ID NO: 193), и обратным праймером, содержащим сайт рестрикции ApaI (см. табл. 21; SEQ ID NO: 194). PCR проводили в следующих условиях: 2 мин при температуре 98°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 10 с при 98°C, 10 с при 58°C и 30 с при 72°C; после этого 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Затем три выделенных гена обрабатывали ферментами рестрикции KpnI и ApaI при температуре 37°C в течение 4 ч. ДНК, обработанную рестриктазами, разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли плазмидный вектор pcIW и так же разделяли полученную ДНК в агарозном геле. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, NEB), выделенный ген встраивали в линейный вектор pcIW, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи, по сайтам рестрикции KpnI (номер по каталогу R0142L, NEB) и ApaI (номер по каталогу R0114L, NEB). Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech), и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и секвенировали выделенную ДНК.

В табл. 21 представлены праймеры, использовавшиеся при клонировании гена IgG мутантных антител против TFPI клона 308-4, полученных в результате применения метода клеточного дисплея в дрожжевой системе.

Таблица 21

Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
VH Fo	TGCTGTGGGTGAGTGGTACCTGTGGG GAA GTC CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGT	189
VH Re	AGT GGG AAC ACG GAG GGC CCC TTG GTG CTG GCG GAG CTC ACA GTC ACC AGC GTG CC	190
VL Fo	TGCTGTGGGTGAGTGGTACCTGTGGG GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	191
VL Re_CL overlap	GAT GAA CAC AGA AGG GGC AGC CAC CGT GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA	192
Ck Fo	ACG GTG GCT GCC CCT TCT GTG TTC ATC	193
Ck Re	GAT TGG ATC CAA GCT TAC TAG CAC TCA CCC CTG TTG AAA GAC TTA	194

11-5. Получение и очистка IgG мутантных антител против TFPI клона 308-4.

Чтобы получить и очистить мутантные антитела против TFPI клонов, полученных в примере 11-4, за сутки до трансфекции высевали клетки эмбриональной почки человека линии Expi293TM в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Через 24 ч их культивирования при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин прибавляли среду Expi293TM Expression medium (номер по каталогу A1435101; Gibco), получая 30 мл клеточной суспензии с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность клеток $\geq 95\%$). Разводили 30 мкг ДНК (15 мкг pcIW, кодирующей тяжелую цепь антител против TFPI, и 15 мкг pcIW, кодирующей легкую цепь антител против TFPI) в среде OptiProTMSEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. К 1,5 мл среды OptiProTMSEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) прибавляли 80 мкл реагента из набора для трансфекции ExpiFectamineTM293 (номер по каталогу A14524, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После этого 1,5 мл разведенной ДНК и 1,5 мл реагента ExpiFectamineTM293 хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Клетки Expi293TM обрабатывали 3 мл смеси ДНК и реагента ExpiFectamineTM293. Через 16-18 ч культивирования суспензии клеток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин к ней прибавляли 150 мкл реагента Enhancer 1 из набора ExpiFectamineTM 293 (номер по каталогу A14524, Gibco) и 1,5 мл реагента Enhancer 2 из набора ExpiFectamineTM293 (номер по каталогу A14524, Gibco), после чего суспензию клеток культивировали в течение 5 суток. По завершении указанного культивирования культуру клеток центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 20 мин, чтобы удалить обломки клеток, и полученный супернатант пропускали через фильтр с порами диаметром 0,22 мкм. На 30 мл культуральной среды готовили 100 мкл смолы с протеином A MabSelect Xtra (номер по каталогу 17-5269-02, GE Healthcare), центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 2 мин, чтобы удалить раствор, в котором она хранилась, и промывали три раза по 400 мкл буферного раствора для связывания протеина A (номер по каталогу 21007, Pierce). К подготовленной культуральной

среде прибавляли смолу с протеином А и инкубировали с вращением при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной среды и смолы загружали в колпачок-резервуар спин-колонки Pierce (номер по каталогу 69725, Thermo) и проводили экстракцию, используя вакуумное устройство для выделения нуклеиновых кислот QIAvac 24 Plus (номер по каталогу 19413, QIAGEN), так что в колонке оставалась только смола. Эту смолу промывали 5 мл буферного раствора для связывания протеина А, ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора для элюирования протеина А (номер по каталогу 21009, Pierce) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин, после чего центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 1 мин. Полученный элюат нейтрализовали, добавляя 2,5 мкл буферного раствора Tris-HCl (1,5 М; pH 9,0). Элюирование повторяли 4-6 раз и каждую фракцию количественно анализировали, используя спектрофотометр для микрообъемов Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Собирали фракции, в которых определялся белок, указанный буферный раствор заменяли на солевой раствор, забуференный фосфатом (натрий-фосфатный буферный раствор, PBS), используя спин-колонки для обессоливания Zeba 7K MWCО объемом 5 мл (номер по каталогу 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях, чтобы окончательно определить концентрацию антител и проверить их состояние; антитела хранили при температуре 4°C.

В результате электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) показал, что мутантные антитела против TFPI клона 308-4 были получены в очищенном виде в хорошем состоянии.

Пример 12. Получение антител против TFPI клона 308-4 с созревшей аффинностью с использованием библиотеки фрагментов Fab, созданной методом фагового дисплея.

12-1. Конструирование фаговой дисплейной библиотеки фрагментов Fab.

Для создания библиотеки фрагментов Fab были получены библиотека вариабельной области тяжелой цепи и библиотека вариабельной области легкой цепи. А именно, проводили полимеразную цепную реакцию (PCR) для фрагмента 1 вариабельной области тяжелой цепи, используя нуклеотидную последовательность гена вариабельной области тяжелой цепи антител против TFPI клона 308-4 в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 40, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 41-48; при PCR для фрагмента 2 вариабельной области тяжелой цепи использовали нуклеотидную последовательность гена вариабельной области тяжелой цепи антител против TFPI клона 308-4 в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 49, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 50-61; при PCR для фрагмента 2 вариабельной области тяжелой цепи использовали нуклеотидную последовательность гена вариабельной области тяжелой цепи антител против TFPI клона 308-4 в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 62, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 63-69. PCR для каждого из фрагментов проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции AccuPower Pfu PCR PreMix (номер по каталогу K-2015, Bioneer) в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 60 с при 72°C; после чего 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Выделенные гены фрагментов вариабельной области тяжелой цепи брали в соотношении 1:1:1 и использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 70, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 71. PCR амплифицированных генов проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции Takara Primer Star PCR premix (Takara), в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 20 циклов, каждый из которых включал 10 с при 95°C, 20 с при 55°C и 30 с при 72°C; после чего 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, номер по каталогу 28706, QIAGEN); таким образом получали ген вариабельной области тяжелой цепи. Полученный ген обрабатывали ферментами рестрикции XhoI (номер по каталогу R0146L, NEB) и ApaI (номер по каталогу R0114L, NEB) при температуре 37°C в течение 4 ч. Полученную ДНК разделяли в 1%-ном агарозном геле. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, NEB), разделенную ДНК встраивали по сайтам рестрикции XhoI и ApaI в линейный вектор pComb3x, содержащий ДНК, кодирующую вариабельную и константную области легкой цепи антител клона 308-4. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки культивировали в 300 мл среды LB при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 1 ч, после чего обрабатывали карбенициллином (150 мкл) и тетрациклином (300 мкл). Обработанные таким образом клетки культивировали в суспензии при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 12 ч или дольше. Затем плазмиды созданной библиотеки вариабельной области тяжелой цепи выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК Midi prep kit (номер по каталогу 12143, QIAGEN). Чтобы определить

размеры полученной библиотеки, через 1 ч после трансформации брали 100 мкл культуральной среды, высевали в серийных разведениях на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech) и инкубировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше, после чего подсчитывали колонии.

В полимеразной цепной реакции (PCR) для фрагмента 1 варибельной области легкой цепи использовали нуклеотидную последовательность гена варибельной области легкой цепи антител против TFPI клона 308-4 в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 72, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 73-82; при PCR для фрагмента 2 варибельной области легкой цепи использовали нуклеотидную последовательность гена варибельной области легкой цепи антител против TFPI клона 308-4 в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 83, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 84-87. PCR для каждого из фрагментов проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции AccuPower Pfu PCR PreMix (номер по каталогу K-2015, Bioneer), в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 60 с при 72°C; после чего 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Выделенные гены фрагментов варибельной области легкой цепи брали в соотношении 1:1 и использовали в качестве матрицы вместе с прямым праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 91, и обратным праймером, представленным в табл. 18 как SEQ ID NO: 92. PCR амплифицированных генов проводили, используя готовую смесь для полимеразной цепной реакции Takara Primer Star PCR premix (Takara), в следующих условиях: 2 мин при температуре 95°C; затем 20 циклов, каждый из которых включал 10 с при 95°C, 30 с при 55°C и 40 с при 72°C; после чего 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN); таким образом получали ген варибельной области легкой цепи. Полученный ген обрабатывали ферментами рестрикции NruI (номер по каталогу R0192L, NEB) и XbaI (номер по каталогу R0145L, NEB) при температуре 37°C в течение 4 ч. Полученную ДНК разделяли в 1%-ном агарозном геле. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, NEB) разделенную ДНК встраивали по сайтам рестрикции NruI и XbaI в библиотеку линейного вектора pComb3x, содержащую библиотеку ДНК, кодирующую варибельную область тяжелой цепи антител клона 308-4. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки культивировали в 300 мл среды LB при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 1 ч, после чего обрабатывали карбенициллином (150 мкл) и тетрациклином (300 мкл), а затем культивировали при температуре 37°C и перемешивании на качалке со скоростью 220 об/мин в течение 1 ч. Затем клетки обрабатывали хелперным фагом VCS M13 в количестве 4,5 мл (10^{11} бляшкообразующих единиц, БОЕ) и культивировали при температуре 37°C и перемешивании на качалке со скоростью 220 об/мин в течение 1 ч. После этого клетки обрабатывали канамицином (300 мкл) и карбенициллином (300 мкл) и культивировали в течение ночи при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин.

На следующий день культуру клеток центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 20 мин и переносили супернатант в чистую емкость. Для осаждения фагов к этому супернатанту прибавляли пятикратный объем раствора полиэтиленгликоля с хлоридом натрия (5×PEG/NaCl - 1×) и держали на льду в течение 30 мин или дольше. Осевшие фаговые частицы отделяли путем центрифугирования со скоростью 8000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отбрасывали, а фаговый осадок ресуспендировали в 10 мл PBS и, чтобы удалить обломки клеток, центрифугировали со скоростью 14000 об/мин в течение 10 мин; отделяли супернатант и хранили его при температуре 4°C. Чтобы определить размеры полученной библиотеки, через 1 ч после трансформации брали 100 мкл культуральной среды, высевали в серийных разведениях на среду LB, содержащую карбенициллин (NaraeBiotech) и инкубировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше, после чего подсчитывали колонии.

12-2. Отбор мутантных антител против TFPI.

Человеческий рекомбинантный белок TFPI (1 мл) помещали в иммунологические полистироловые пробирки с поверхностью для твердофазного анализа (номер по каталогу 444202, Nunc) в концентрации 1 мкг/мл и для покрытия белком поверхности пробирок оставляли их при температуре 4°C на 12 ч или дольше, после чего промывали три раза по 5 мл солевого раствора, забуференного фосфатом и содержащего 0,05% Tween-20 (PBST). Пробирки, покрытые TFPI, блокировали 5 мл 1%-ного раствора BSA/PBS при комнатной температуре в течение 2 ч. Удаляли из пробирок блокирующий буферный раствор, вносили в них фаговую библиотеку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. После этого пробирки промывали раствором PBST четыре раза по 5 мл. Пробирки обрабатывали глициновым буферным раствором для элюирования (по 1 мл; pH 2,0) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Супернатант с элюированными фаговыми частицами нейтрализовали, добавляя 100 мкл раствора

Tris-Cl (1,5 M; pH 8,8). Компетентные клетки XLI-Blue E.coli для электропорации культивировали в течение 2 ч (оптическая плотность культуры на длине волны 600 нм (OD_{600}) = 0,8-1,0) и 10 мл культуры обрабатывали нейтрализованными фаговыми частицами. Оставляли для инфицирования при комнатной температуре на 30 мин, после чего к 10 мл инфицированных клеток XLI-Blue прибавляли 10 мл среды "супербульон" (SB), 20 мкл тетрациклина (50 мг/мл) и 10 мкл карбенициллина (100 мг/мл) и культивировали при температуре 37°C и перемешивании на качалке со скоростью 200 об/мин в течение 1 ч. Затем к клеткам добавляли 1 мл хелперного фага VCSM13 ($>10^{11}$ БОЕ/мл) и культивировали при температуре 37°C и перемешивании на качалке со скоростью 200 об/мин в течение 1 ч. По истечении этого часа к клеткам прибавляли 80 мл среды SB, 100 мкл канамицина и 100 мкл карбенициллина (100 мг/мл) и культивировали при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 200 об/мин в течение ночи. Через 12 ч или более культивирования смесь центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 15 мин, супернатант отделяли, добавляли к нему пятикратный объем буферного раствора PEG/NaCl и держали на льду в течение 30 мин. Затем центрифугировали со скоростью 8000 об/мин в течение 30 мин и удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 2 мл 1%-ного раствора BSA/PBS и центрифугировали со скоростью 12000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант использовали в следующем цикле пэннинга. Описанную выше процедуру повторяли четыре раза.

12-3. Получение индивидуальных клонов антител против TFPI методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Из окончательно амплифицированной библиотеки брали единичные колонии и культивировали в 1,5 мл среды SB с карбенициллином при температуре 37°C при перемешивании со скоростью 220 об/мин до достижения оптической плотности культуры на длине волны 600 нм (OD_{600}) около 0,8-1,0, после чего инкубировали с изопропил-P-D-1-тиогаляктопиранозидом (IPTG) при температуре 30°C при перемешивании со скоростью 200 об/мин в течение 12 ч. Затем клетки центрифугировали со скоростью 5500 об/мин в течение 5 мин, полученный супернатант вносили в лунки планшета для ELISA, покрытые антигеном (TFPI), и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего промывали четыре раза раствором PBST (1×PBS; 0,05% Tween 20). Затем к клеткам прибавляли конъюгат пероксидазы хрена с козьими антителами против фрагмента Fab человеческого IgG (HRP/anti-hFab-HRP; номер по каталогу A0293, Sigma) в разведении 1:5000 в растворе 1%BSA/1×PBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего промывали четыре раза раствором PBST (1×PBS; 0,5% Tween 20). Затем клетки обрабатывали раствором хромогена - 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) в течение 5-10 мин, после чего добавляли раствор для остановки хромогенной реакции. Измеряли поглощение на длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера TECAN Sunrise и отбирали клоны с высокими значениями оптической плотности.

Таким образом, были отобраны клоны антител, специфично связывающихся с TFPI, и были определены их аминокислотные последовательности (см. табл. 22). В заявке на патент Кореи № 10-2015-0026555 антитела, используемые в данном изобретении, описаны под номером 2015-26555 (SEQ ID NO по предыдущей заявке). В табл. 23 представлены аминокислотные последовательности участков CDR антител клонов, представленных в табл. 22 (нумерация аминокислотных остатков по Кабату).

Таблица 22

Клон	Варибельная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
A24	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFHSYAMN WVRQAPGKGLEWVSTITTRGSYTYADSV E GRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	195
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD V DGKT YLNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	103
A25	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSTITTGGSHTYYADSV E GRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	97
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD R DGKT YLNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	196
A52	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSTITTGGSHTYYADSV D GRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	197
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD I DGKTY LNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	96
A63	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSV Q GRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	198
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD V DGKT YLNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	103
A67	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSV E GRFTI	25
		SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD L DGKT YLNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	101
A71	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSV H GRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	199
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD T DGKT YLNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	130
A74	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM H WVRQAPGKGLEWVSTITTGGSYTYADSV Q GRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFL MDYWGQGT L TVSS	200
	Легкая цепь	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD I DGKTY LNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPFTFGQGT KVEIKR	96

Таблица 23

Клон	Вариабельная область	Аминокислотная последовательность CDR1	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность CDR2	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность CDR3	SEQ ID NO
A24	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTRGSYTY YADSV E G	204	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD VDGKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A25	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTY YADSV E G	155	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD R DGKTYLN	201	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A52	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSHTY YADSV D G	167	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD I DGKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A63	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY YADSV Q G	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD VDGKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A67	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY YADSV E G	162	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD L DGKTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A71	Тяжелая цепь	SYAMN	149	TITTGGSYTY YADSV H G	202	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD T DGKTYLN	205	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A74	Тяжелая цепь	SYAM H	203	TITTGGSYTY YADSV Q G	165	QDGNFLMDY	151
	Легкая цепь	KSSQSLLD I DGKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154

12-4. Клонирование гена IgG мутантных антител против TFPI клона 308-4.

Проводили полимеразную цепную реакцию (PCR), используя полученный ген вариабельной области легкой цепи мутантных антител против TFPI клона 308-4 в качестве матрицы, ДНК-полимеразу PrimeSTAR HS (Takara), прямой праймер, содержащий сайт рестрикции KpnI (см. табл. 21; SEQ ID NO: 189), и обратный праймер, представленный в табл. 21 как SEQ ID NO: 190. Также проводили PCR, используя ген константной области легкой к-цепи человеческого антитела в качестве матрицы, прямой праймер, представленный в табл. 21 как SEQ ID NO: 191, и обратный праймер, представленный в табл. 21 как SEQ ID NO: 192. Условия PCR были следующие: 10 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 15 с при температуре 94°C, 30 с при 56°C и 90 с при 72°C; после этого 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Затем брали смесь гена вариабельной области легкой цепи и гена константной области легкой цепи в соотношении 1:1, и проводили с этой смесью PCR с перекрывающимися праймерами, используя прямой и обратный праймеры, представленные в табл. 20 как SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 192 соответственно, в следующих условиях: 10 мин при температуре 94°C; затем 30 циклов, каждый из которых включал 15 с при 94°C, 30 с при 56°C и 90 с при 72°C; после этого 10 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Выделенную ДНК обрабатывали рестриктазами KpnI (номер по каталогу R0142L, NEB) и HindIII (номер по каталогу R0104L, NEB) при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше и затем разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли плазмидный вектор pcIW и так же разделяли полученную ДНК в агарозном геле. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, NEB), выделенный ген легкой цепи встраивали в линейный вектор pcIW по сайтам рестрикции NotI и HindIII. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий Escherichia coli штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NaraeBiotech) и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и анализировали выделенную ДНК путем секвенирования.

Для вариабельной области тяжелой цепи проводили PCR, используя ген вариабельной области тяжелой цепи мутантных антител клона 308-4 в качестве матрицы, ДНК-полимеразу PrimeSTAR HS (Takara), прямой праймер, содержащий сайт рестрикции KpnI (см. табл. 21; SEQ ID NO: 193), и обратный

праймер, содержащий сайт рестрикции *ApaI* (см. табл. 21; SEQ ID NO: 194). Условия PCR были следующие: 2 мин при температуре 98°C; затем 30 циклов, в каждом из которых 10 с при 98°C, 10 с при 58°C и 30 с при 72°C; после этого 5 мин при 72°C. Амплифицированные гены анализировали путем электрофореза в агарозном (1%) геле; из зон геля, соответствующих ожидаемым размерам ДНК, выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля. Затем три выделенных гена обрабатывали ферментами рестрикции *KpnI* (номер по каталогу R0142L, NEB) и *ApaI* (номер по каталогу R0114L, NEB) при температуре 37°C в течение 4 ч. Обработанную рестриктазами ДНК разделяли в 1%-ном агарозном геле. Таким же образом расщепляли плазмидный вектор *pcIW* и так же разделяли полученную ДНК в агарозном геле. Используя ДНК-лигазу бактериофага T4 (номер по каталогу M0203S, NEB), выделенную ДНК встраивали в линейный вектор *pcIW*, содержащий ген константной области тяжелой цепи человеческого антитела, по сайтам рестрикции *KpnI* и *ApaI*. Продуктом лигирования трансформировали клетки бактерий *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (компетентные клетки для электропорации; номер по каталогу 200228, Stratagene); трансформированные бактериальные клетки высевали на среду LB, содержащую карбенициллин (номер по каталогу LN004CA, NacalBiotech) и культивировали при температуре 37°C в течение 12 ч или дольше. Затем отбирали отдельные колонии, культивировали, выделяли из клеток плазмиды, используя набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Mini Kit (номер по каталогу 27405, QIAGEN), и анализировали выделенную ДНК путем секвенирования.

12-5. Получение и очистка IgG мутантных антител против TFPI клона 308-4.

Чтобы получить и очистить мутантные антитела против TFPI, ген которых был клонирован в примере 12-4, за сутки до трансфекции высевали клетки линии *Expi293F*TM в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Через 24 ч их культивирования при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин прибавляли среду *Expi293*TM Expression medium (номер по каталогу A1435101; Gibco), получая 30 мл клеточной суспензии с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл (жизнеспособность клеток $\geq 95\%$). Разводили 30 мкг ДНК (15 мкг *pcIW*, кодирующей тяжелую цепь антител против TFPI, и 15 мкг *pcIW*, кодирующей легкую цепь антител против TFPI) в среде *OptiPro*TM SEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. К 1,5 мл среды *OptiPro*TM SEM (номер по каталогу 12309019, Gibco) прибавляли 80 мкл реагента из набора для трансфекции *ExpiFectamine*TM 293 (номер по каталогу A14524, Gibco) до суммарного объема 1,5 мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После этого 1,5 мл разведенной ДНК и 1,5 мл реагента *ExpiFectamine*TM 293 хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Клетки *Expi293F*TM обрабатывали 3 мл смеси ДНК и реагента *ExpiFectamine*TM 293. Через 16-18 ч культивирования суспензии клеток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при перемешивании со скоростью вращения 125 об/мин к ней прибавляли 150 мкл реагента Enhancer 1 из набора *ExpiFectamine*TM 293 (номер по каталогу A14524, Gibco) и 1,5 мл реагента Enhancer 2 из набора *ExpiFectamine*TM 293 (номер по каталогу A14524, Gibco), после чего суспензию клеток культивировали в течение 5 суток. По завершении указанного культивирования культуру клеток центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 20 мин, чтобы удалить обломки клеток, и полученный супернатант пропускали через фильтр с порами диаметром 0,22 мкм. На 30 мл культуральной среды готовили 100 мкл смолы с протеином A MabSelect Xtra (номер по каталогу 17-5269-02, GE Healthcare), центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 2 мин, чтобы удалить раствор, в котором она хранилась, и промывали три раза по 400 мкл буферного раствора для связывания протеина A (номер по каталогу 21007, Pierce). К подготовленной культуральной среде прибавляли смолу с протеином A и инкубировали с вращением при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь культуральной среды и смолы загружали в колпачок-резервуар спин-колонки Pierce (номер по каталогу 69725, Thermo), и проводили экстракцию, используя вакуумное устройство для выделения нуклеиновых кислот QIAvac 24 Plus (номер по каталогу 19413, QIAGEN), так что в колонке оставалась только смола. Эту смолу промывали 5 мл буферного раствора для связывания протеина A, ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора для элюирования протеина A (номер по каталогу 21009, Pierce) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин, после чего центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 1 мин. Полученный элюат нейтрализовали, добавляя 2,5 мкл буферного раствора Tris-HCl (1,5 M; pH 9,0). Элюирование повторяли 4-6 раз и каждую фракцию количественно анализировали, используя спектрофотометр для микрообъемов Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Собирали фракции, в которых определялся белок, указанный буферный раствор заменяли на солевой раствор, забуференный фосфатом (PBS), используя спин-колонки для обессоливания Zeba 7K MWCO объемом 5 мл (номер по каталогу 0089892, Pierce). Затем проводили электрофорез белка в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ((SDS-PAGE) в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях, чтобы окончательно определить концентрацию антител и проверить их состояние; антитела хранили при температуре 4°C.

В результате электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) показал, что мутантные антитела против TFPI клона 308-4 были получены в очищенном виде в хорошем состоянии.

Пример 13. Количественное определение аффинности мутантных антител клона 308-4 к антигену TFPI.

Определяли аффинность антител против TFPI клона 308-4 с мутациями в варибельной области тяжелой цепи, обозначенных 12, 1023, 1202 и 3241 и полученных в очищенном виде в примерах 11 и 12, к человеческому рекомбинантному TFPI. Для этих измерений использовали оптический биосенсор Biacore T-200 (производство GE Healthcare). А именно, протеин А иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (номер по каталогу BR-1005-30, GE Healthcare) за счет взаимодействия amino- и карбоксильных групп до максимального сигнала $R_{\max}=200$. Затем очищенные антитела каждого из клонов 12, 1023, 1202 и 3241 связывались с иммобилизованным протеином А. Готовили серию разведений рекомбинантного человеческого TFPI в буферном растворе HBS-EP (10 mM HEPES, pH7,4; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,005% поверхностно-активный агент P20) и анализировали, используя указанный чип, в концентрации 0,078-5 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в течение 120 с для ассоциации и 600 с для диссоциации. Диссоциацию TFPI, связавшегося с антителами, вызывали, пропуская раствор глицин-HCl (10 mM; pH 1,5) в течение 30 с. Аффинность выражали кинетическими константами ассоциации (K_{on}) и диссоциации (K_{off}) и рассчитывали равновесную константу диссоциации (K_D), используя программное обеспечение для Biacore T-200. Полученные результаты представлены в табл. 24.

В табл. 24 аффинность антител против TFPI к рекомбинантному человеческому белку TFPI показана константой ассоциации (K_{on}), константой диссоциации (K_{off}) и равновесной константой диссоциации (K_D).

Таблица 24

	K_{on}	K_{off}	K_D
12	$4,87 \times 10^6$	$3,99 \times 10^{-5}$	$8,19 \times 10^{-12}$
1023	$4,91 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,01 \times 10^{-11}$
1202	$7,56 \times 10^6$	$7,16 \times 10^{-5}$	$9,47 \times 10^{-12}$
3241	$1,91 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-11}$

Пример 14. Определение активности фактора Ха.

Индукция свертывания крови происходит по внутреннему и внешнему путям, и эти два пути приводят к активации тромбина посредством общего механизма, активирующего фактор X, в результате чего образуется фибрин и начинается свертывание крови. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) состоит из трех доменов Кунитца (K1, K2 и K3). Известно, что домен 1 Кунитца (K1) связывается с фактором VIIa (FVIIa), а домен 2 Кунитца (K2) - с фактором Ха (FXa). Также известно, что свертывание крови подавляется в результате связывания TFPI с фактором свертывания крови. Поэтому, чтобы установить, как влияют антитела MG113 против TFPI на процесс свертывания крови, определяли активность фактора Ха.

Система для анализа включала только фактор Ха, TFPI и испытываемое антитело, чтобы свести к минимуму влияние ряда факторов. Когда испытываемое антитело связывается с TFPI, функционирование фактора Ха не подавляется, и, следовательно, проявляется активность FXa. Но если испытываемое антитело связывается с TFPI не эффективно, TFPI связывается с фактором Ха, функционирование которого в результате подавляется, и окрашивание (по которому судят об активности FXa) ослабевает. Остаточная активность FXa, не подавленная TFPI, измеряется степенью расщепления хромогенного субстрата, в качестве которого использовали специфичный для фактора Ха агент S-2765; при расщеплении этого вещества образуется хромофор пара-нитроанилин (pNA), детектируемый на длине волны 405 нм. Эти измерения базируются на определении амидолитической активности.

Фактор Ха, TFPI, антитела mAb2021 и агент S-2765 разводили буферным раствором для анализа (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 мг/мл BSA; 0,02% NaN_3 ; 5 mM CaCl_2 ; pH7,4), как показано в табл. 25, и вносили отмеренное количество в пробирку объемом 1,5 мл.

Таблица 25

Вещество	Исходная концентрация (нМ)	Рабочая концентрация (нМ)	Другое
FXa	2 нМ	0,5 нМ	
TFPI	40 нМ	10 нМ	
S-2765	2 мМ	0,5 мМ	
Стандартная кривая	10 нМ	0,02; 0,1; 0,5; 2,5 нМ	FXa
mAb2021	160 нМ	2,5; 5; 10; 20 нМ	Положительный контроль

В лунки планшета вносили по 50 мкл испытываемых антител против TFPI и столько же положительного контроля (антитела против TFPI mAb2021; Novo Nordisk) до концентрации 20; 10; 5 и 2,5 нМ. В каждую лунку добавляли 50 мкл раствора TFPI концентрацией 40 нМ и планшет оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Для получения стандартной кривой в лунки вносили по 50 мкл раствора фактора Ха в различных концентрациях и по 50 мкл раствора фактора Ха концентрацией 2 нМ и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин. Затем в лунки прибавляли по 50 мкл раствора S-2765 концентрацией 2 мМ и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Определяли поглощение в

лунках на длине волны 405 нм с помощью микропланшетного ридера в режиме измерения по конечной точке.

В результате этих экспериментов были изучены эффекты антител № 1015, 1021, 1023, 3007, 3016 и 3024 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 20). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 1015 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 83%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 71% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). В случае антител № 1023 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 86%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 84% относительно положительного контроля. При сравнении эффектов этих антител при концентрации TFPI 10 нМ, оказалось, что антитела № 1023 обладают более высокой ингибирующей TFPI активностью, чем антитела № 1015.

Также были изучены эффекты антител № 3036, 3115, 3120, 3131, 4017 и 4141 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 21). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 4017 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 90%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 70% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № 1001, 1024, 1104 и 1123 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 22). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 1123 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 88%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 69% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № A24, A25, A51, A52, A63 и A67 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 23). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител A67 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 79%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 67% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № 3203, 3241, 4206 и 4208 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 24). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 3241 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 82%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 83% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № 1, 2, 3, 7, 8 и 10 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 25). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 2 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 76%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 79% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 3 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 81%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ этот эффект составлял около 70% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 8 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 80%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 69% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № 1214, 1216, 1224, 1234, 1238 и 4287 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 26). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 1214 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 77%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 63% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № 16, 19, 20, 21 и 23 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 27). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимость от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 16 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 55%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 34% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Также были изучены эффекты антител № 11, 12, 13 и 1202 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 28). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимость от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Из указанных выше антител для антител № 11 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 89%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 81% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 12 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 82%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 82% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 13 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 85%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 76% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 1202 в образце, обработанном при концентрации 20 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 87%, в образце, обработанном при концентрации 10 нМ, этот эффект составлял около 82% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI).

Пример 15. Определение комплекса TF/FVIIa/FX.

Наиболее важные факторы внешнего пути свертывания крови включают тканевой фактор (TF), фактор VII (FVII), фактор X (FX) и др. Когда под влиянием сигнала извне тканевой фактор и фактор VIIa образуют комплекс, фактор X, активируется, становясь фактором Ха. Фактор Ха является компонентом активатора протромбина; протромбин превращается в тромбин, который катализирует превращение фибриногена в фибрин, формирующий тромб. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) связывается с фактором Ха, в результате чего подавляется активность последнего, что препятствует свертыванию крови. Чтобы оценить эффект антител MG1113 против TFPI в описанном выше механизме, был проведен анализ образования комплекса TF/FVIIa/FXa. В присутствии TFPI вместе с антителами MG1113 против TFPI или же без них определяли количество образующегося фактора Ха и степень его ингибирования комплексом TF/FVIIa колориметрическим способом по развитию окраски, обусловленной расщеплением хромогенного субстрата (агента S2765) под действием фактора Ха; тем самым оценивался эффект антител MG1113 против TFPI. Иными словами, при усилении ингибирующего TFPI эффекта антител против TFPI возрастает количество образующегося фактора Ха, в результате возрастает количество продуктов расщепления хромогенного субстрата и увеличивается поглощение на соответствующей длине волны. В пробирках объемом 1,5 мл тканевой фактор (4500L/B, Sekisui diagnostics), фактор VIIa (Novo Nordisk, Novo Seven) и фактор X (PP008A, Hyphen biomed) разбавляли буферным раствором для анализа (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 мг/мл BSA; 0,02% NaN₃; 5 mM CaCl₂; pH 7,4) до концентраций, приведенных в табл. 26.

Таблица 26

Вещество	TF	FVIIa	FX
Концентрация	0,6 нг/мл	1 нМ	17 нМ --> 5 нМ

Полученную в результате смесь вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве по 70 мкл. В контрольную ("пустую") лунку вносили 70 мкл указанного выше буферного раствора для анализа. Инкубировали при температуре 37°C в течение 15 мин, после чего добавляли по 30 мкл TFPI до концентрации 50 нМ. В "пустую" лунку и в лунку положительного контроля (образец, не обработанный антителами MG1113 против TFPI и TFPI) вносили 30 мкл буферного раствора для анализа. Затем в каждую лунку вносили 30 мкл антител MG1113 против TFPI до концентрации 12,5; 25; 50 и 100 нМ. В "пустую" лунку, в лунку положительного контроля (образец, не обработанный антителами против TFPI и TFPI) и в лунку отрицательного контроля (образец, не обработанный антителами MG1113 против TFPI) вносили по 30 мкл буферного раствора для анализа. Инкубировали при температуре 37°C в течение 15 мин. После этого в лунки вносили по 20 мкл EDTA (E7889, Sigma-Aldrich) до концентрации 50 mM. Затем в лунки вносили по 50 мкл S2765 (S-2765, Chromogenix) до концентрации 200 мкМ и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин. По истечении этого промежутка времени в каждой лунке определяли поглощение на длине волны 405 нм при помощи микропланшетного ридера.

В табл. 27 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 27

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	308-4	1015	1023	4017
100 нМ	0,918	0,119	0,937	0,949	0,938	0,944	0,951	0,943
50 нМ			0,929	0,945	0,926	0,919	0,947	0,919
25 нМ			0,918	0,873	0,664	0,269	0,795	0,307
12,5 нМ			0,218	0,242	0,223	0,179	0,228	0,181
6,25 нМ			0,168	0,179	0,177	0,158	0,168	0,150
3,13 нМ			0,145	0,147	0,155	0,148	0,152	0,138
1,56 нМ			0,125	0,134	0,135	0,141	0,143	0,134

В табл. 28 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 28

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	308-4	1015	1023	4017
100 нМ	100,0%	13,0%	102,0%	103,3%	102,1%	102,8%	103,6%	102,7%
50 нМ			101,2%	102,9%	100,8%	100,1%	103,1%	100,1%
25 нМ			100,0%	95,0%	72,3%	29,3%	86,5%	33,4%
12,5 нМ			23,7%	26,3%	24,2%	19,4%	24,8%	19,7%
6,25 нМ			18,2%	19,4%	19,2%	17,2%	18,2%	16,3%
3,13 нМ			15,7%	16,0%	16,8%	16,1%	16,5%	15,0%
1,56 нМ			13,6%	14,5%	14,7%	15,4%	15,6%	14,5%

В итоге этих экспериментов подтвердились эффекты антител № 1015, 1023 и 4017 с созревшей аффинностью из числа испытываемых антител MG1113 против TFPI (см. фиг. 29, табл. 27 и 28). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Для антител № 1015 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 29,3% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 1023 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 86,5% относительно положительного контроля. Для антител № 4017 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 33,4% относительно положительного контроля. Таким образом, обнаружилось, что антитела № 1023 обладают высокой способностью ингибировать TFPI. В табл. 29 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 29

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI(50 нМ)	mAb2021	T417	308-4	1023	1123	A67
100 нМ	0,955	0,143	0,966	0,945	0,926	0,935	0,905	0,907
50 нМ			0,951	0,908	0,909	0,905	0,770	0,895
25 нМ			0,955	0,880	0,716	0,923	0,272	0,914
12,5 нМ			0,233	0,251	0,222	0,259	0,157	0,290
6,25 нМ			0,180	0,186	0,185	0,190	0,150	0,196
3,13 нМ			0,171	0,160	0,164	0,167	0,151	0,177
1,56 нМ			0,151	0,145	0,154	0,153	0,140	0,154

В табл. 30 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 30

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI(50 нМ)	mAb2021	T417	308-4	1023	1123	A67
100 нМ	100,0%	15,0%	101,2%	99,0%	97,0%	98,0%	94,8%	95,0%
50 нМ			99,6%	95,1%	95,2%	94,8%	80,7%	93,7%
25 нМ			100,1%	92,2%	75,0%	96,6%	28,5%	95,8%
12,5 нМ			24,4%	26,3%	23,2%	27,1%	16,4%	30,3%
6,25 нМ			18,8%	19,5%	19,4%	19,9%	15,7%	20,5%
3,13 нМ			17,9%	16,8%	17,2%	17,5%	15,8%	18,5%
1,56 нМ			15,8%	15,2%	16,1%	16,0%	14,7%	16,1%

Также оценивали действие антител № 1023, которые обладали наибольшим эффектом в описанном выше анализе, антител № 1123, которые тоже имели созревшую аффинность, и антител A67 (см. фиг. 30, табл. 29 и 30). Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации анти-

тел увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Для антител № 1023 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 94,8%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 96,6% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 1123 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 80,7%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 28,5% относительно положительного контроля. Для антител А67 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 93,7%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 95,8% относительно положительного контроля. Таким образом, оказалось, что антитела № 1023 и А67 сходны по своей способности ингибировать TFPI.

В табл. 31 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 31

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	1023	A67	3203	3241
100 нМ	0,915	0,115	0,952	0,931	0,939	0,947	0,932	0,937
50 нМ			0,953	0,938	0,938	0,938	0,934	0,935
25 нМ			0,932	0,894	0,914	0,908	0,424	0,911
12,5 нМ			0,241	0,253	0,290	0,330	0,208	0,305
6,25 нМ			0,156	0,183	0,185	0,195	0,173	0,197
3,13 нМ			0,143	0,158	0,160	0,172	0,162	0,171
1,56 нМ			0,137	0,160	0,135	0,149	0,147	0,157

В табл. 32 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 32

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	1023	A67	3203	3241
100 нМ	100,0%	12,6%	104,0%	101,7%	102,6%	103,5%	101,8%	102,3%
50 нМ			104,1%	102,5%	102,5%	102,5%	102,1%	102,1%
25 нМ			101,9%	97,7%	99,8%	99,2%	46,3%	99,6%
12,5 нМ			26,3%	27,7%	31,6%	36,1%	22,7%	33,3%
6,25 нМ			17,0%	20,0%	20,2%	21,3%	18,9%	21,5%
3,13 нМ			15,6%	17,2%	17,5%	18,7%	17,7%	18,7%
1,56 нМ			15,0%	17,5%	14,7%	16,3%	16,1%	17,2%

Также оценивали действие антител № 1023, которые обладали наибольшим эффектом в описанном выше анализе, антител А67 (см. фиг. 31, табл. 31 и 32) и антител № 3203 и № 3241, которые тоже имели созревшую аффинность. Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимость от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Для антител № 1023 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 99,8% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител А67 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 99,2% относительно положительного контроля. Для антител № 3203 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 46,3% относительно положительного контроля. Для антител № 3241 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 100%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 99,6% относительно положительного контроля. Таким образом, оказалось, что антитела № 1023, А67 и № 3241 сходны по своей способности ингибировать TFPI.

В табл. 33 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 33

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	1023	2	3	8
100 нМ	0,809	0,04	0,805	0,745	0,810	0,835	0,842	0,834
50 нМ			0,733	0,509	0,652	0,735	0,743	0,673
25 нМ			0,344	0,154	0,216	0,416	0,527	0,391
12,5 нМ			0,082	0,072	0,079	0,083	0,141	0,088
6,25 нМ			0,050	0,050	0,056	0,052	0,059	0,052
3,13 нМ			0,047	0,049	0,048	0,045	0,046	0,050
1,56 нМ			0,043	0,045	0,050	0,045	0,045	0,041

В табл. 34 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 34

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 M)	mAb2021	T417	1023	2	3	8
100 нМ	100,0%	4,9%	99,4%	92,0%	100,1%	103,2%	104,1%	103,0%
50 нМ			90,6%	62,9%	80,5%	90,9%	91,8%	83,2%
25 нМ			42,5%	19,0%	26,6%	51,4%	65,1%	48,3%
12,5 нМ			10,1%	8,9%	9,7%	10,3%	17,4%	10,8%
6,25 нМ			6,1%	6,2%	6,9%	6,4%	7,2%	6,4%
3,13 нМ			5,7%	6,0%	5,9%	5,6%	5,7%	6,1%
1,56 нМ			5,3%	5,5%	6,2%	5,5%	5,6%	5,1%

Кроме того, провели такой же анализ, как описано выше, изменив концентрацию фактора X: вместо 17 нМ брали 5 нМ, чтобы скорость реакции была меньше и, соответственно, увеличилось разрешение при анализе эффектов испытываемых антител (см. фиг. 32, табл. 33 и 34). Оценивали эффекты антител № 1023, выбранных в результате описанного выше анализа, и антител № 2, 3 и 8, которые тоже обладали созревшей аффинностью. Для испытываемых антител наблюдалось зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Для антител № 1023 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 80,5%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 26,6% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 2 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 99,9%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 51,4% относительно положительного контроля. Для антител № 3 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 91,8%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 61,5% относительно положительного контроля. Для антител № 8 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 83,2%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 48,3% относительно положительного контроля.

В табл. 35 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 35

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	1023	12	13	1202
100 нМ	0,848	0,035	0,852	0,810	0,846	0,847	0,859	0,859
50 нМ			0,730	0,600	0,681	0,803	0,818	0,843
25 нМ			0,462	0,273	0,371	0,489	0,528	0,509
12,5 нМ			0,105	0,074	0,088	0,097	0,101	0,091
6,25 нМ			0,062	0,050	0,071	0,067	0,075	0,059
3,13 нМ			0,046	0,047	0,051	0,048	0,054	0,051
1,56 нМ			0,044	0,045	0,041	0,041	0,046	0,043

В табл. 36 представлены численные результаты, полученные при оценке эффекта антител MG1113 против TFPI с созревшей аффинностью путем определения комплекса TF/FVIIa/FX.

Таблица 36

Концентрация антител	Нормализованная	TFPI (50 нМ)	mAb2021	T417	1023	12	13	1202
100 нМ	100,0%	4,1%	100,4%	95,5%	99,8%	99,9%	101,3%	101,2%
50 нМ			86,1%	70,7%	80,3%	94,6%	96,5%	99,4%
25 нМ			54,4%	32,1%	43,7%	57,7%	62,2%	60,0%
12,5 нМ			12,4%	8,7%	10,3%	11,4%	11,9%	10,7%
6,25 нМ			7,3%	5,8%	8,3%	7,8%	8,8%	6,9%
3,13 нМ			5,4%	5,5%	6,0%	5,6%	6,4%	6,0%
1,56 нМ			5,2%	5,2%	4,8%	4,8%	5,4%	5,1%

Также оценивали эффекты антител № 1023 и антител № 12, 13 и 1202, которые тоже обладали созревшей аффинностью (см. фиг. 33, табл. 35 и 36). Для испытываемых антител наблюдалось зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Было показано, что для всех этих антител наблюдается зависимое от концентрации антител увеличение поглощения, свидетельствующее о том, что

ингибирующий TFPI эффект антител возрастает в зависимости от их концентрации. Для антител № 1023 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял 80,3%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 43,7% относительно положительного контроля (образец, не обработанный TFPI). Для антител № 12 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 94,6%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 57,7% относительно положительного контроля. Для антител № 13 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 96,5%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 62,2% относительно положительного контроля. Для антител № 1202 в образце, обработанном при концентрации 50 нМ, эффект ингибирования TFPI составлял около 99,4%, в образце, обработанном при концентрации 25 нМ, этот эффект составлял около 60,0% относительно положительного контроля.

Пример 16. Определение количества образующегося тромбина.

Механизм свертывания крови подразделяется на внутренний и внешний пути. Известно, что функция тканевого фактора (TF) во внешнем пути свертывания крови состоит в осуществлении положительной обратной связи в механизме свертывания крови и в обеспечении быстрого массивного образования тромбина. Наиболее важные факторы механизма свертывания крови включают тканевой фактор (TF), фактор VII (FVII), фактор X (FX) и др. Когда под влиянием сигнала извне тканевой фактор и фактор VIIa образуют комплекс, фактор X активируется, становясь фактором Ха. Фактор Ха является компонентом активатора протромбина; протромбин превращается в тромбин, который катализирует превращение фибриногена в фибрин, формирующий тромб. Ингибитор внешнего пути свертывания крови (ингибитор пути тканевого фактора, TFPI) связывается с фактором Ха, в результате чего подавляется активность последнего, что препятствует свертыванию крови. Определение образования тромбина включает: обработку плазмы крови испытываемым образцом; установление количества образовавшегося в плазме тромбина на основании измерения количества флуоресцирующего продукта, образующегося при происходящем под действием тромбина превращении флуорогенного субстрата в флуоресцентный продукт в присутствии триггерного реагента для определения тромбина в бедной тромбоцитами плазме (PPP-reagent LOW); калибровку наблюдаемого количества образовавшегося тромбина по известному количеству тромбинового калибратора и таким образом определение истинного количества образовавшегося тромбина.

В лунки для загрузки образцов предварительно нагретого 96-луночного круглодонного планшета (Immulon 2HB) вносили по 20 мкл раствора триггерного реагента PPP-reagent LOW и в калибровочные лунки - по 20 мкл раствора калибратора. Испытываемые антитела против TFPI разводили в предварительно приготовленном разведении образца (плазма, дефицитная по фактору VIII) в концентрации 0,3125; 0,625; 1,25 или 2,5 нМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, чтобы произошло связывание с TFPI.

В каждую калибровочную и "пустую" лунки вносили по 80 мкл каждого из разведений образца, а в остальные лунки - по 80 мкл разведенных антител. Чтобы осуществить промывание, нажимали кнопку запуска в низу экрана; при промывании конец подводящей трубки находился в дистиллированной воде на водяной бане с температурой 37°C, а отводящей - в пустой емкости. По окончании промывания нажимали следующую кнопку для осуществления холостого прогона. Конец подводящей трубки помещали в буферный раствор, содержащий флуорогенный субстрат (FluCa), нагретый до температуры 37°C, и давали этому раствору заполнить трубку. Конец отводящей трубки вставляли в отверстие "M" в диспенсере, после чего нажимали следующую кнопку, чтобы в каждую лунку подавалось автоматически 20 мкл раствора FluCa, затем осуществляли перемешивание встряхиванием и начинали анализ.

На фиг. 34 представлены результаты определения образования тромбина для антител № 1023 из числа антител с созревшей аффинностью, выбранных на основании описанного выше определения активности фактора Ха и комплекса TF/FVIIa/FXa; для сравнения определяли образование тромбина для химерных антител T417. При концентрации антител 2,5 нМ в случае клона T417 наблюдалось возрастание пика тромбина около 401% по сравнению с "пустой" пробой (только разведение образца), в случае антител № 1023 - 401%. Что касается эндогенного тромбинового потенциала (ETP), являющегося показателем суммарного образования тромбина, то в образцах, обработанных при концентрации 2,5 нМ, в случае клона T417 наблюдалось возрастание ETP 293% по сравнению с отрицательным контролем (без антител), а в случае антител № 1023 - 309%. Сравнение антител T417 и № 1023 говорит о том, что эффект антител № 1023, полученных с созреванием аффинности, более выражен, нежели антител T417.

Промышленное применение

Как говорилось выше, антитела по данному изобретению, специфично связывающиеся с TFPI, способны активировать внешний путь свертывания крови путем ингибирования TFPI. Следовательно, антитела по данному изобретению можно эффективно использовать для лечения больных гемофилией, обусловленной антителами, и для предотвращения нарушений свертывания крови при гемофилии А или гемофилии В.

В настоящем документе данное изобретение описывается подробно в его конкретных признаках, однако специалистам в данной области техники должно быть понятно, что это описание относится толь-

ко к предпочтительным воплощениям и не ограничивает объем изобретения. Фактический объем данного изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, специфично связывающееся с TFPI (ингибитором пути тканевого фактора), представленное SEQ ID NO: 39, где антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; и CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

2. Антитело, которое специфически связывается с TFPI (ингибитором пути тканевого фактора), представленное SEQ ID NO: 39, где антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

3. Антитело, которое специфически связывается с TFPI (ингибитором пути тканевого фактора), представленное SEQ ID NO: 39, где антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

4. Антитело, которое специфически связывается с TFPI (ингибитором пути тканевого фактора), представленное SEQ ID NO: 39, где антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

5. Антитело, которое специфически связывается с TFPI (ингибитором пути тканевого фактора), представленное SEQ ID NO: 39, где антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; и CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

6. Антитело, которое специфически связывается с TFPI (ингибитором пути тканевого фактора), представленное SEQ ID NO: 39, где антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156; и CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177, CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, 21, 25, 95, 99, 105 или 137.

8. Антитело по любому из пп.1-6, которое содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2, 22 или 96.

9. Антитело по любому из пп.1-6, которое содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, 21, 25, 95, 99, 105 или 137, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2, 22 или 96.

10. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-9.

11. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.10.

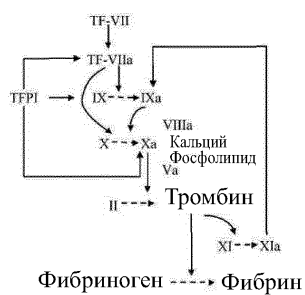
12. Клетка-хозяин, экспрессирующая антитело по любому из пп.1-9, включающая вектор по п.11.

13. Способ получения антитела по любому из пп.1-9, включающий культивирование клеток-хозяев по п.12 для экспрессии указанных антител.

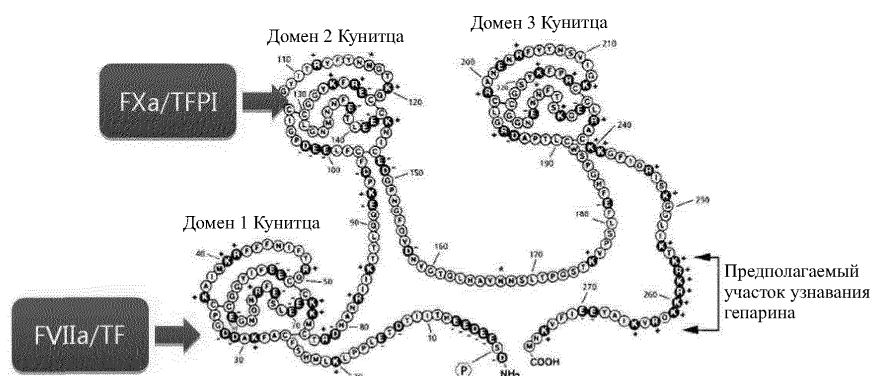
14. Фармацевтическая композиция для лечения гемофилии, содержащая антитело по любому из

пп.1-9 в качестве активного ингредиента.

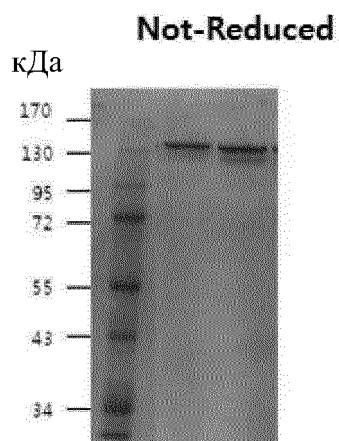
Инициация свертывания крови



Фиг. 1

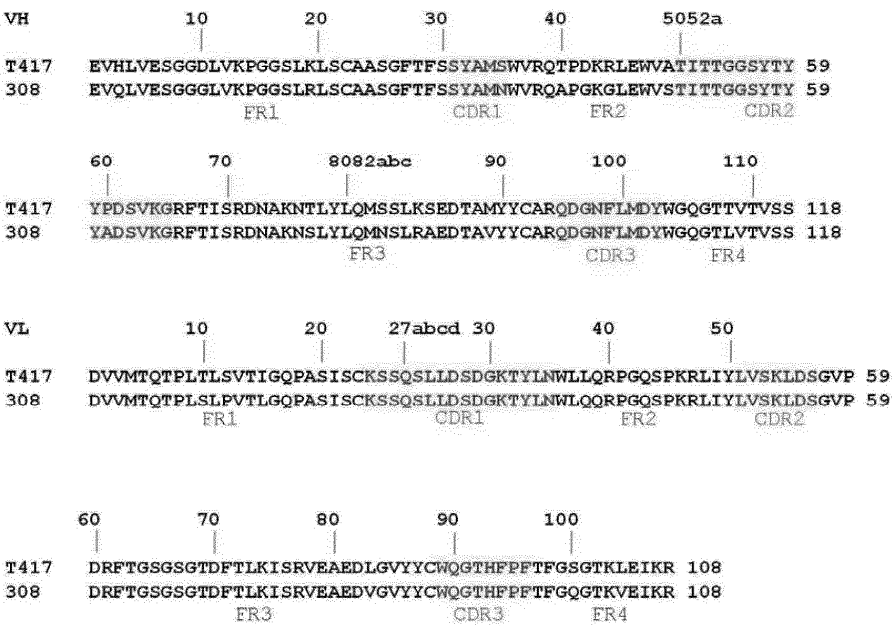


Фиг. 2



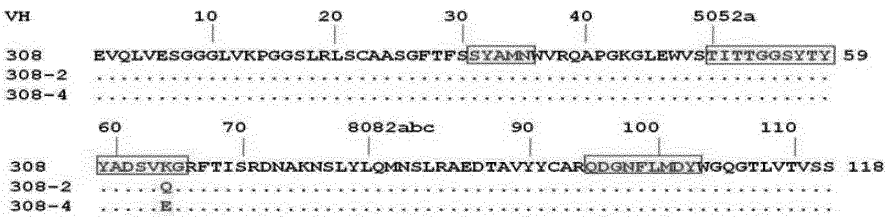
Фиг. 3

Выравнивание последовательностей

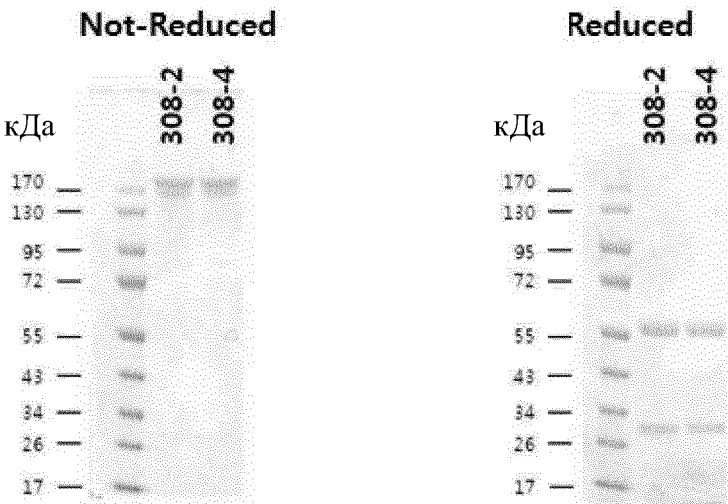


Фиг. 4

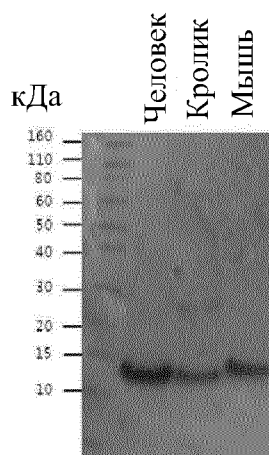
Выравнивание последовательностей



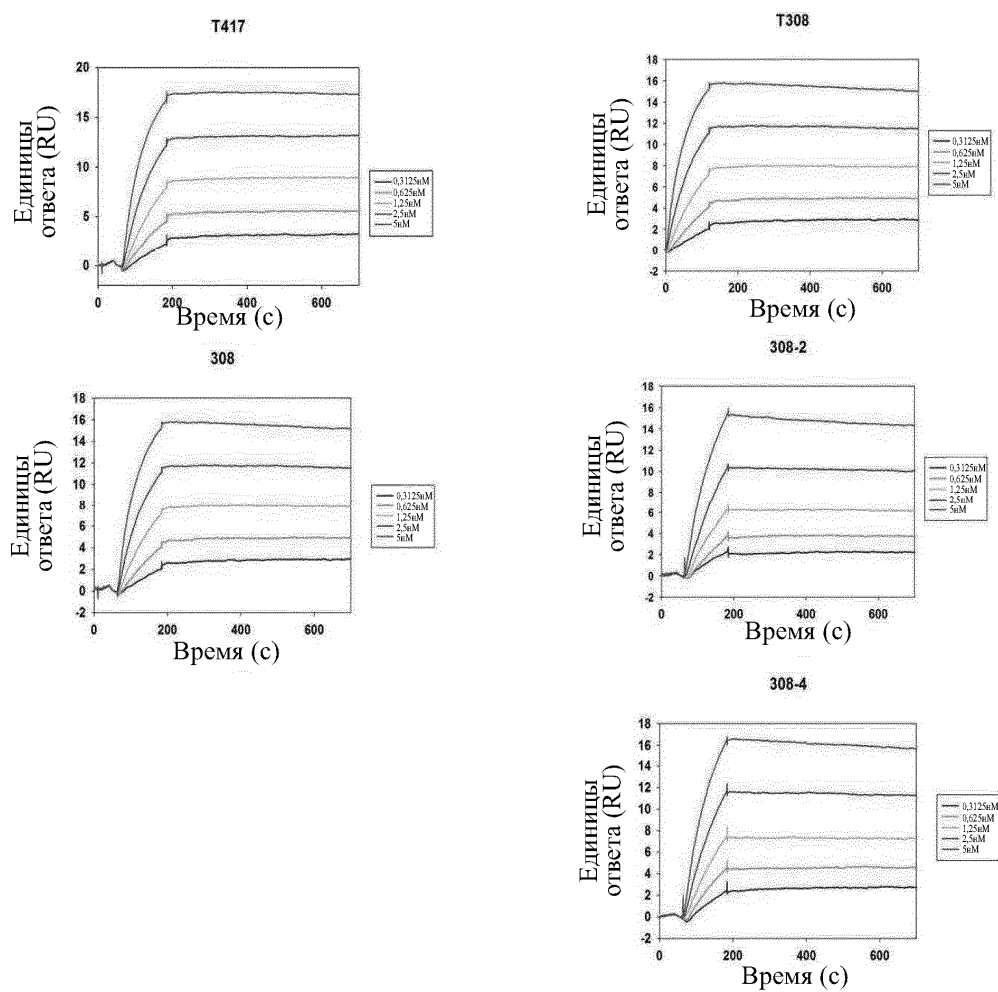
Фиг. 5



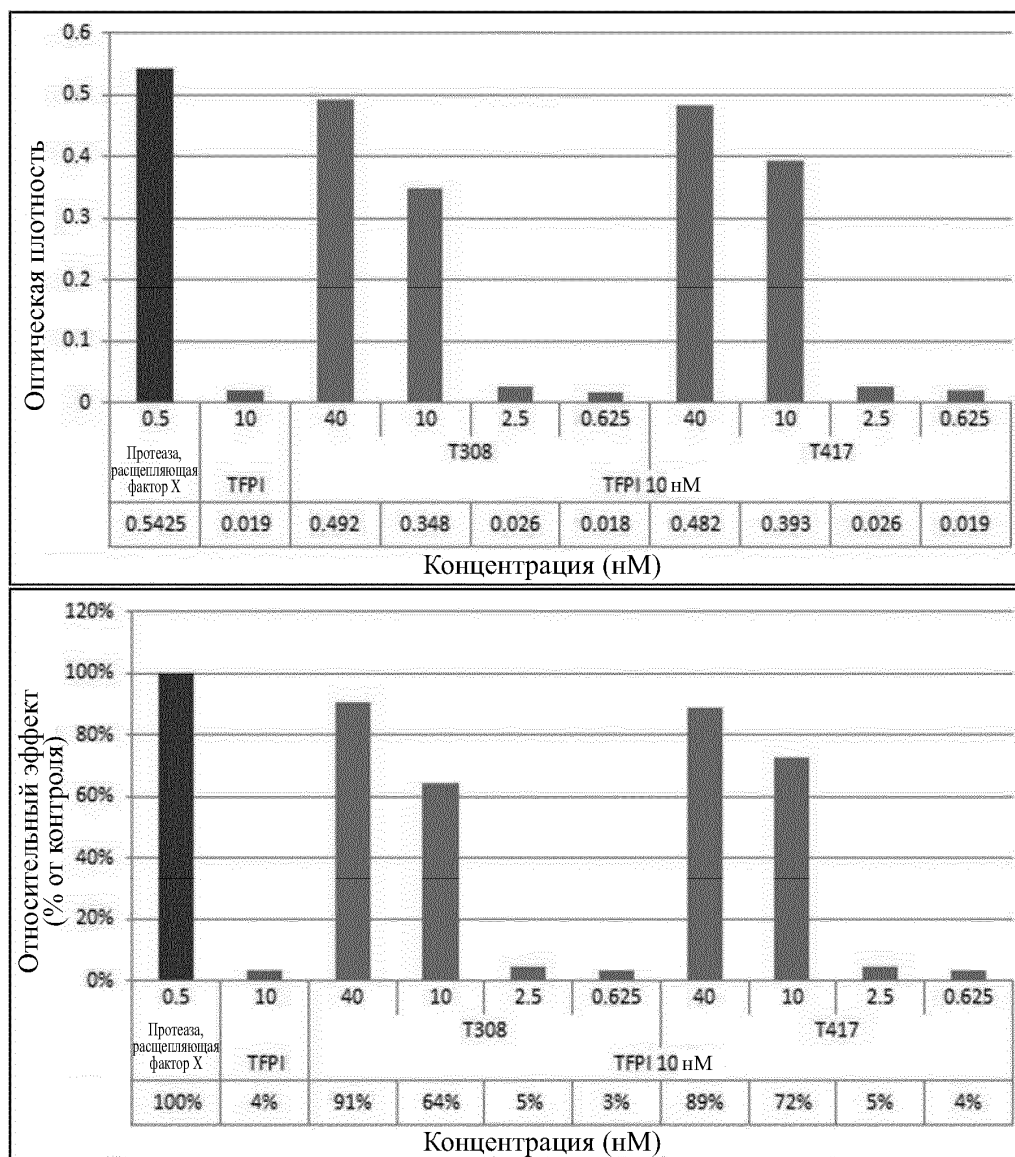
Фиг. 6



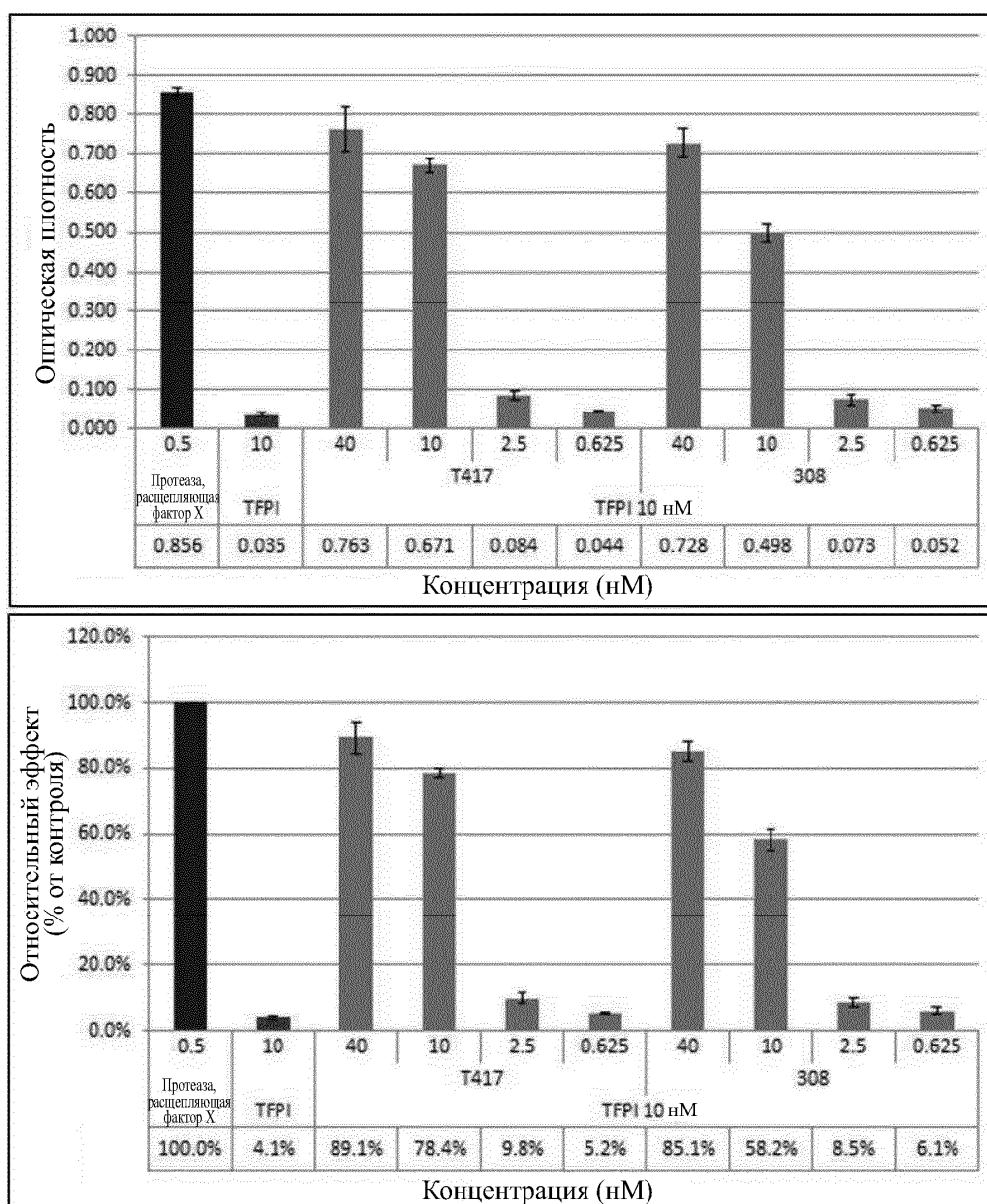
Фиг. 7



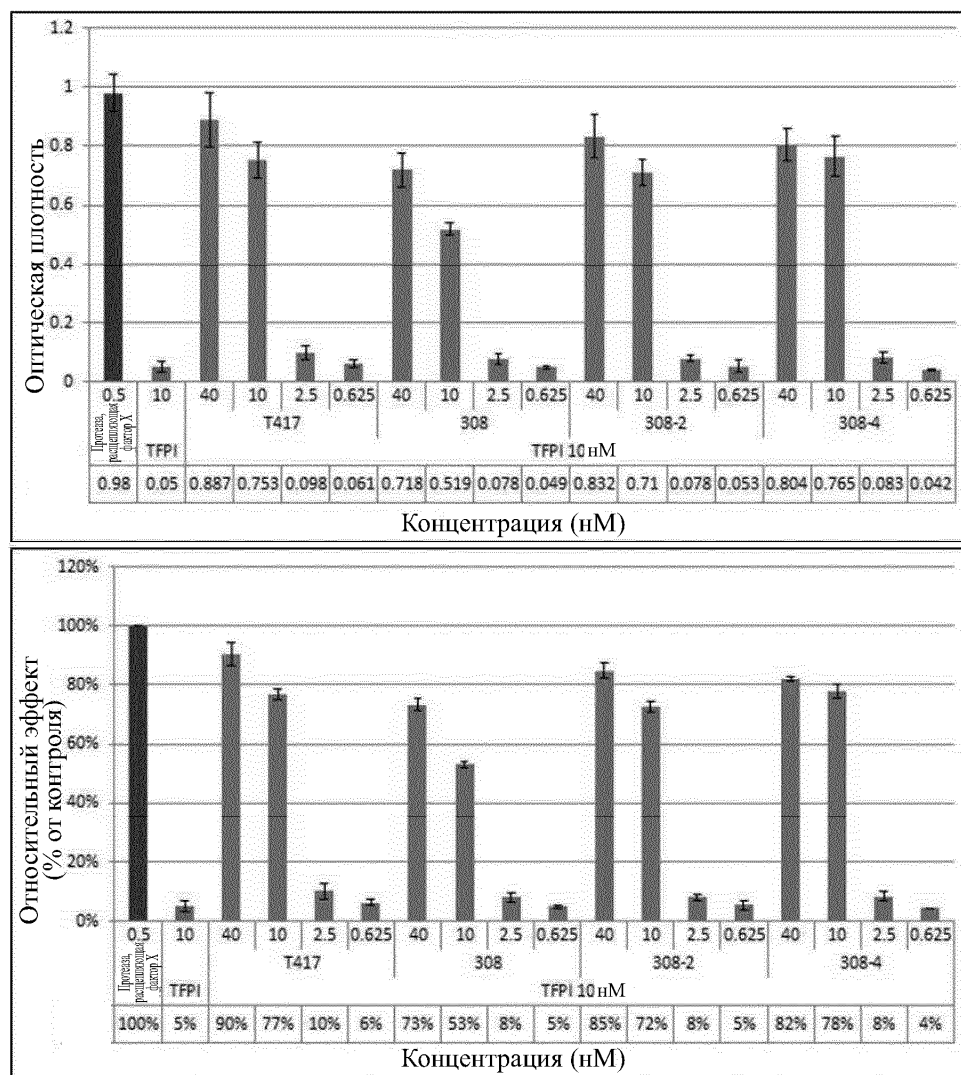
Фиг. 8



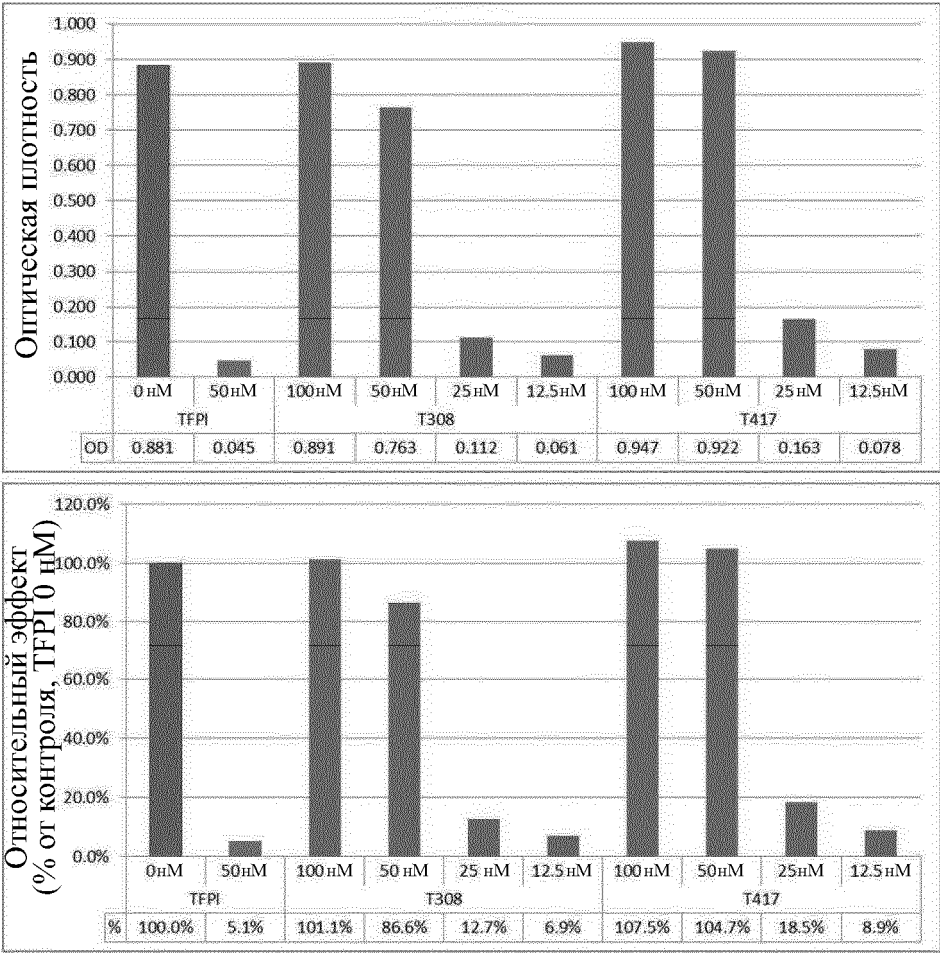
Фиг. 9



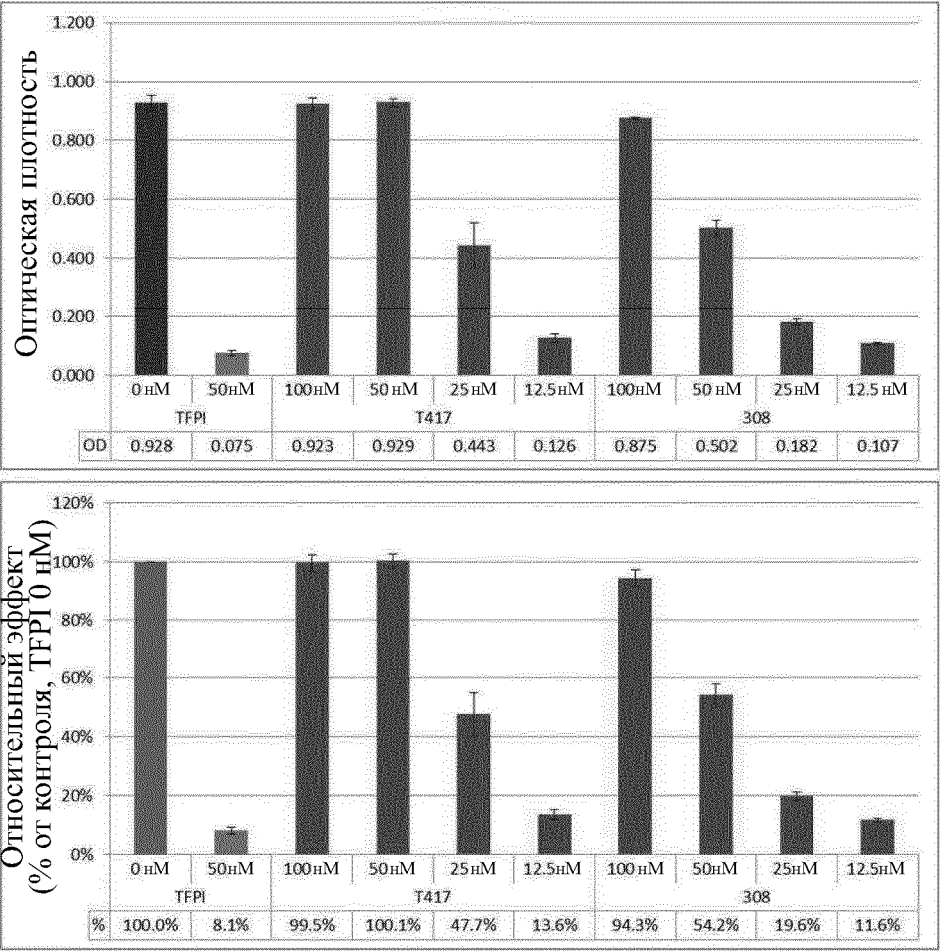
Фиг. 10



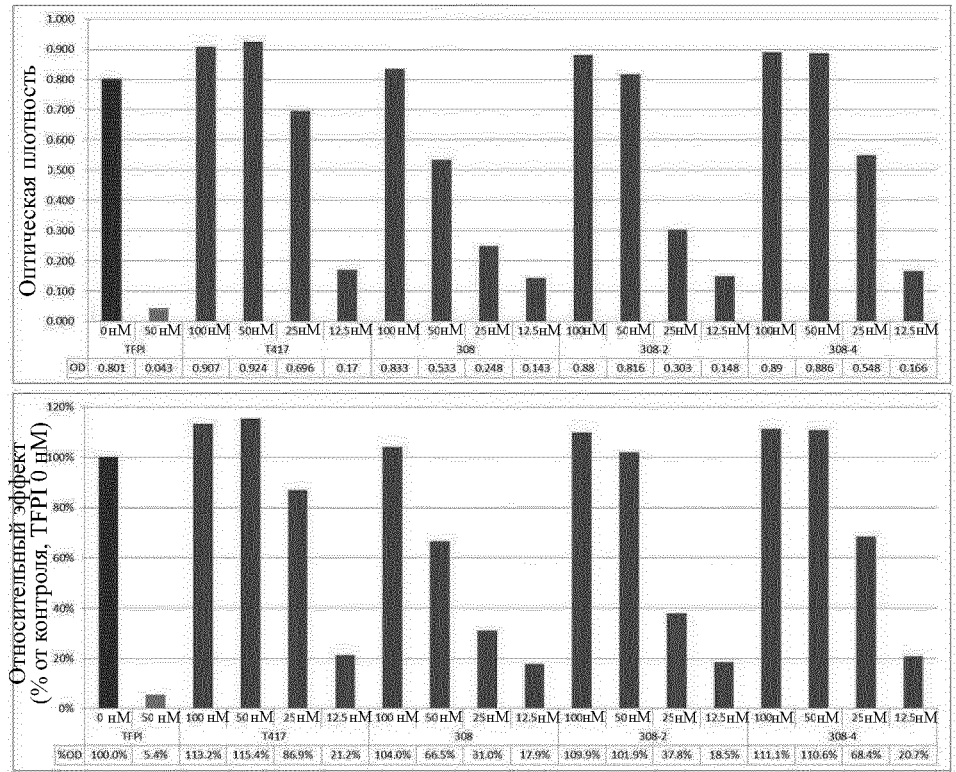
Фиг. 11



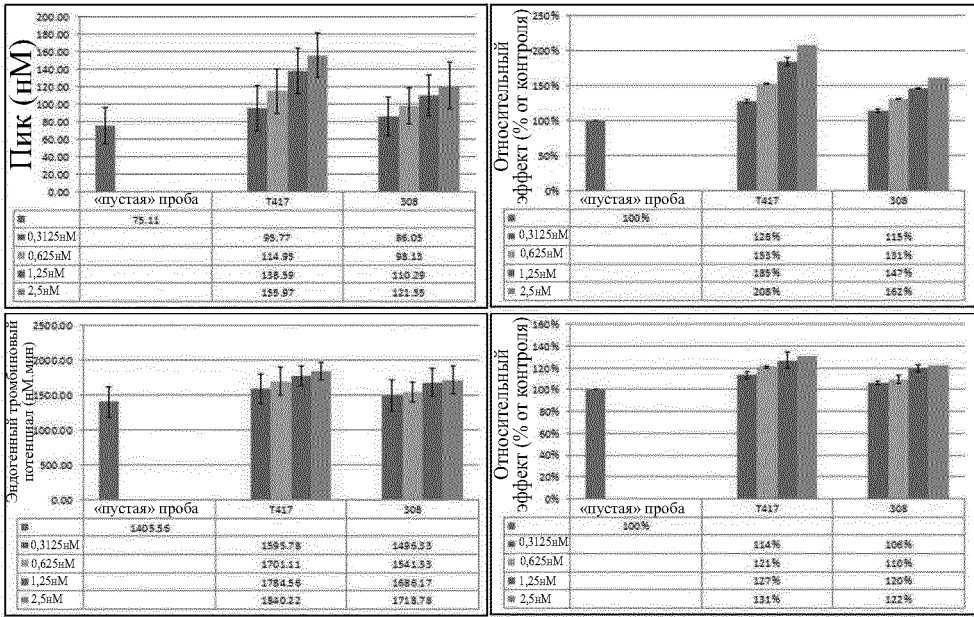
Фиг. 12



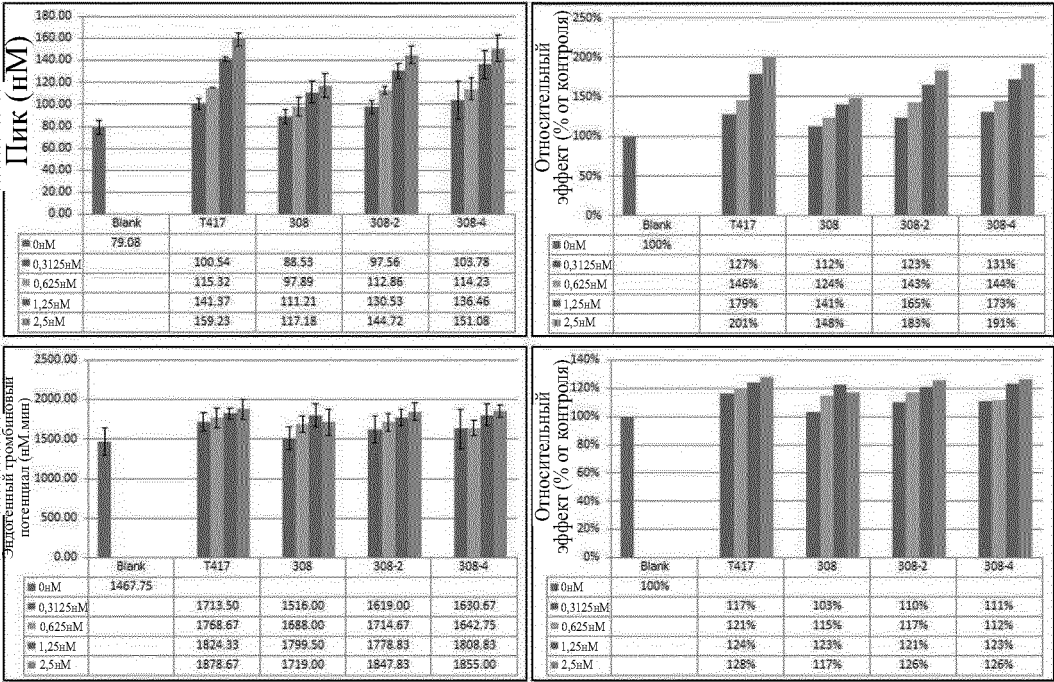
Фиг. 13



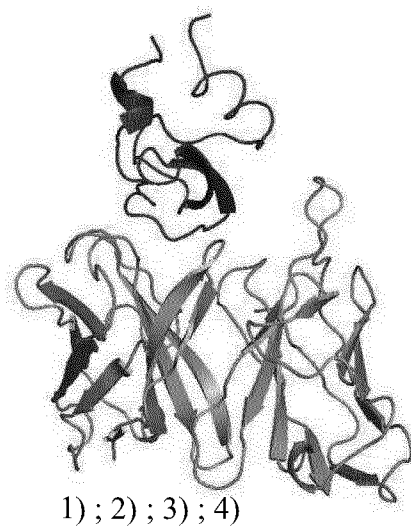
Фиг. 14



Фиг. 15

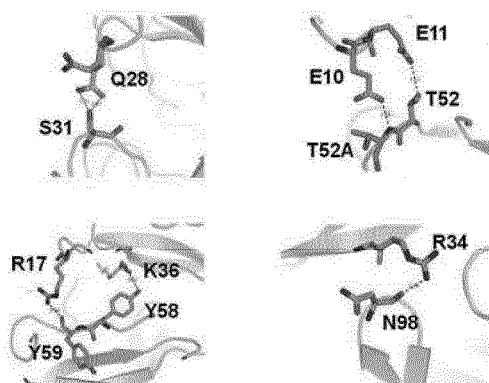


Фиг. 16



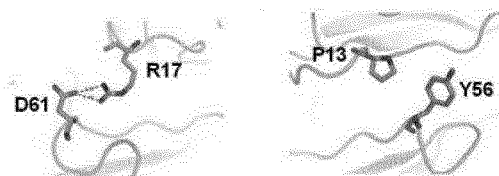
Фиг. 17

Вариабельная область тяжелой цепи
Водородная связь



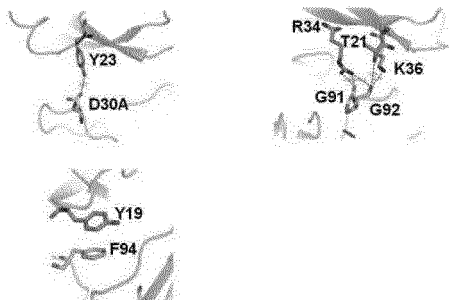
Солевой мостик

Гидрофобное взаимодействие

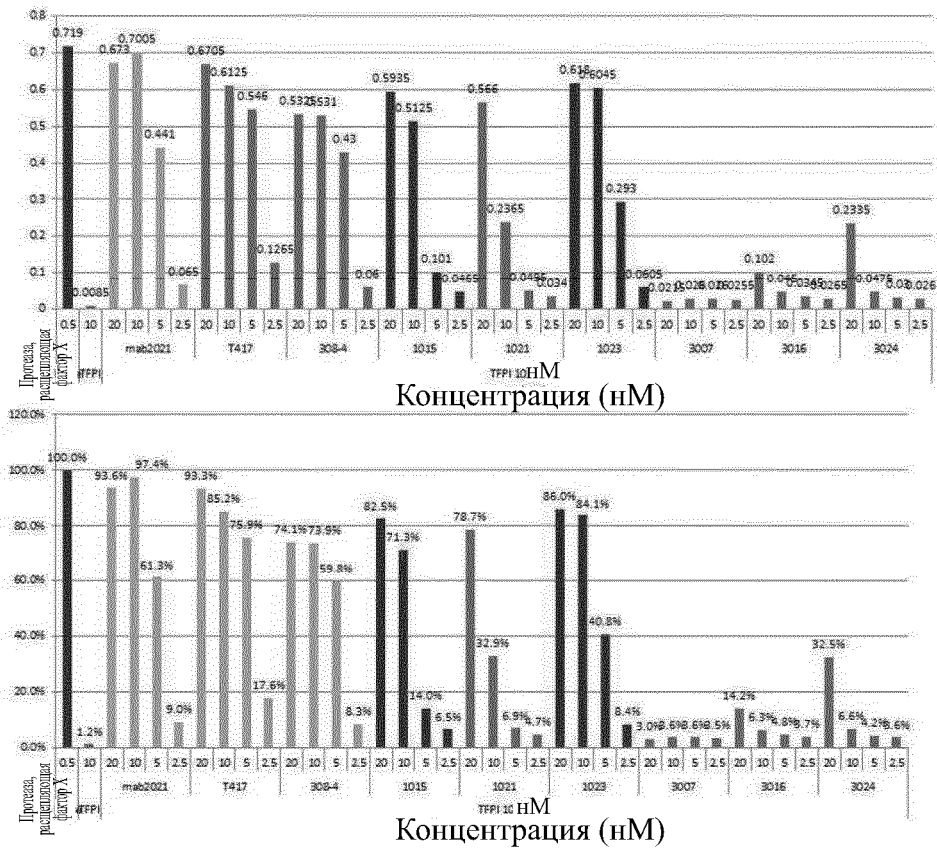


Фиг. 18

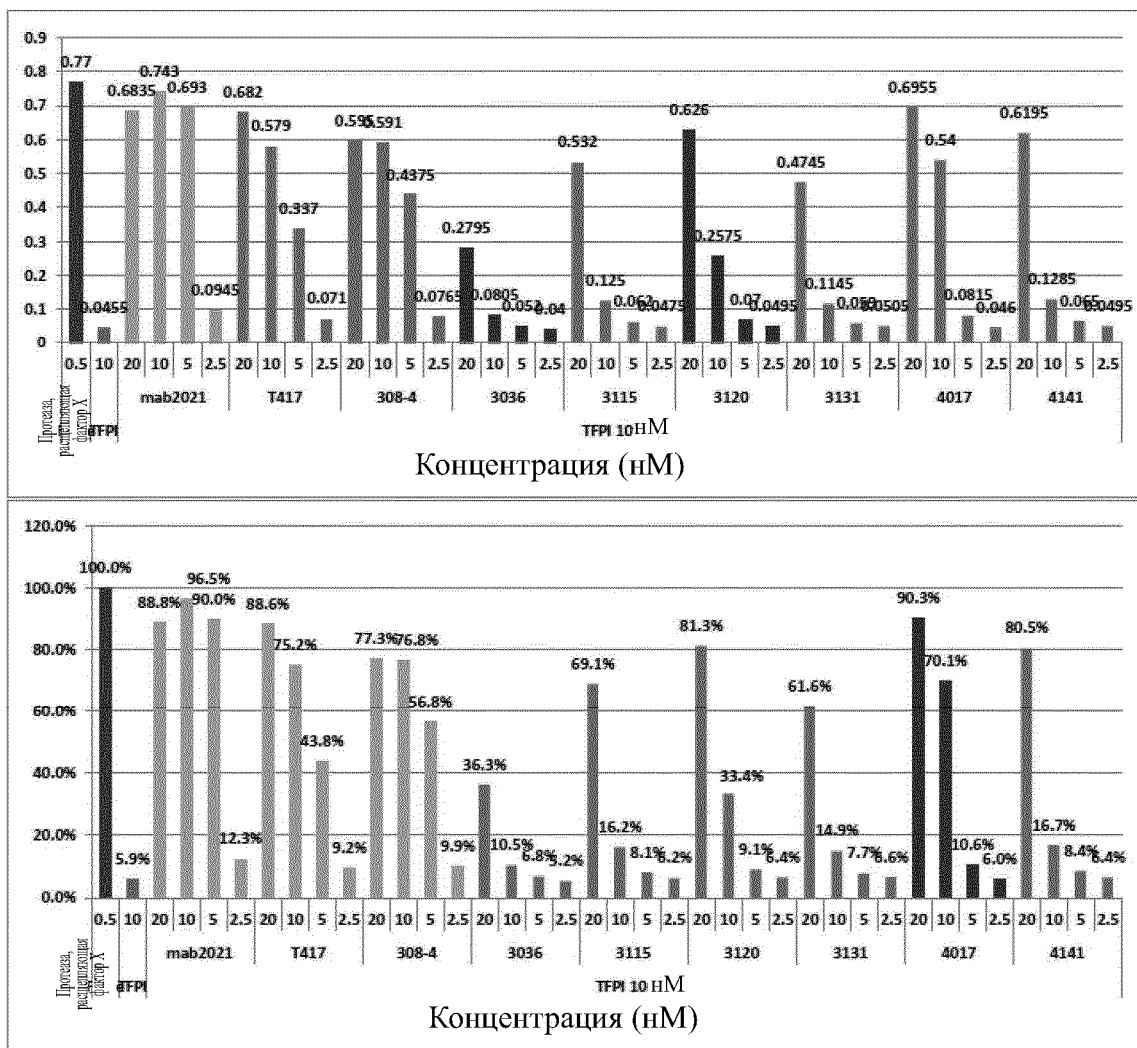
Варибельная область легкой цепи
Водородная связь



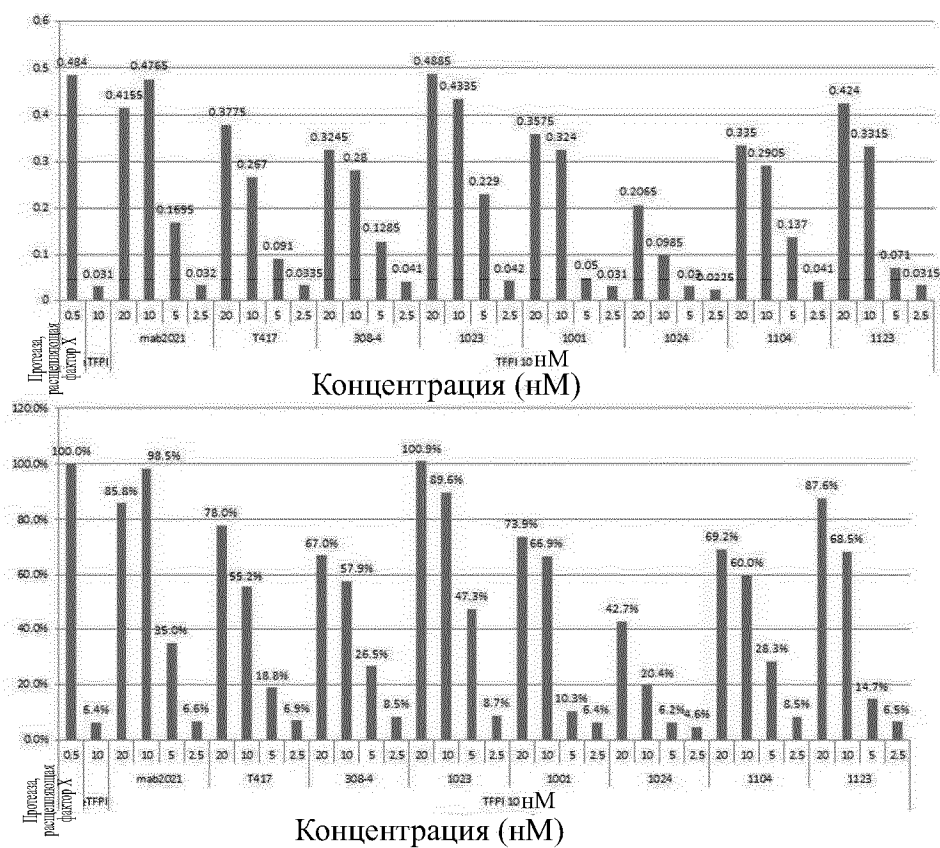
Фиг. 19



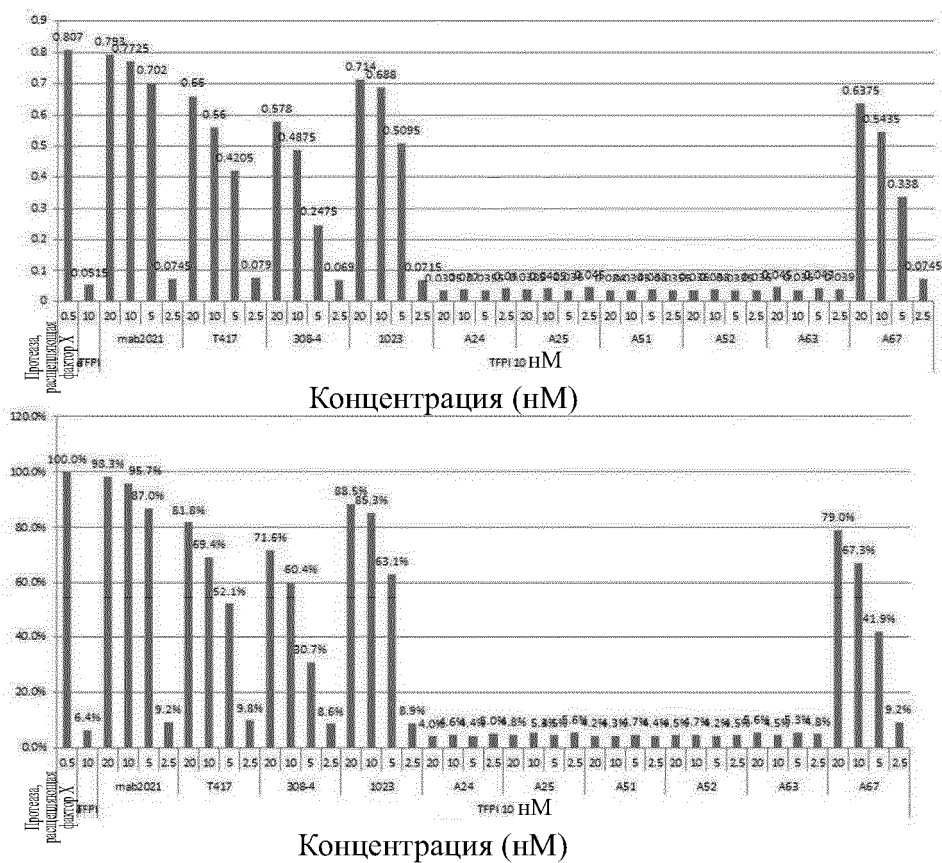
Фиг. 20



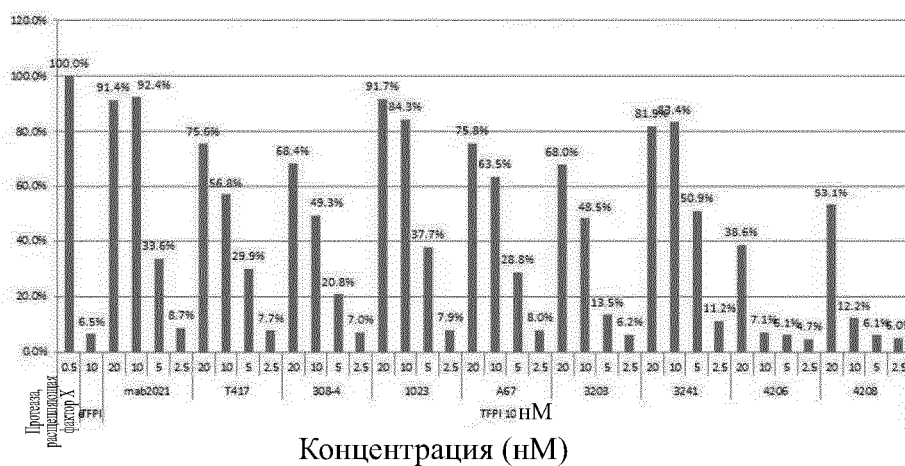
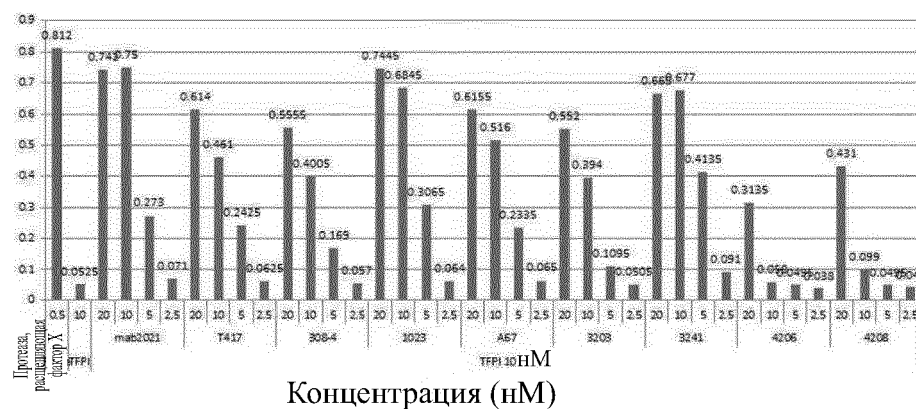
Фиг. 21



Фиг. 22

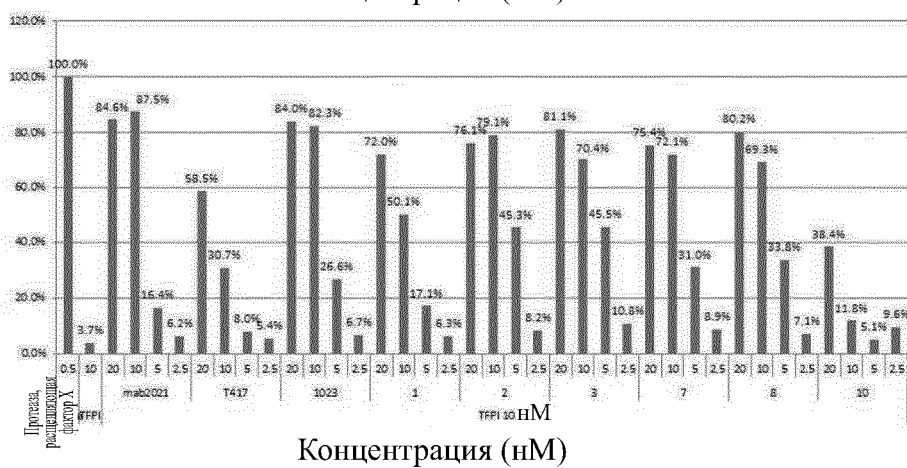


Фиг. 23

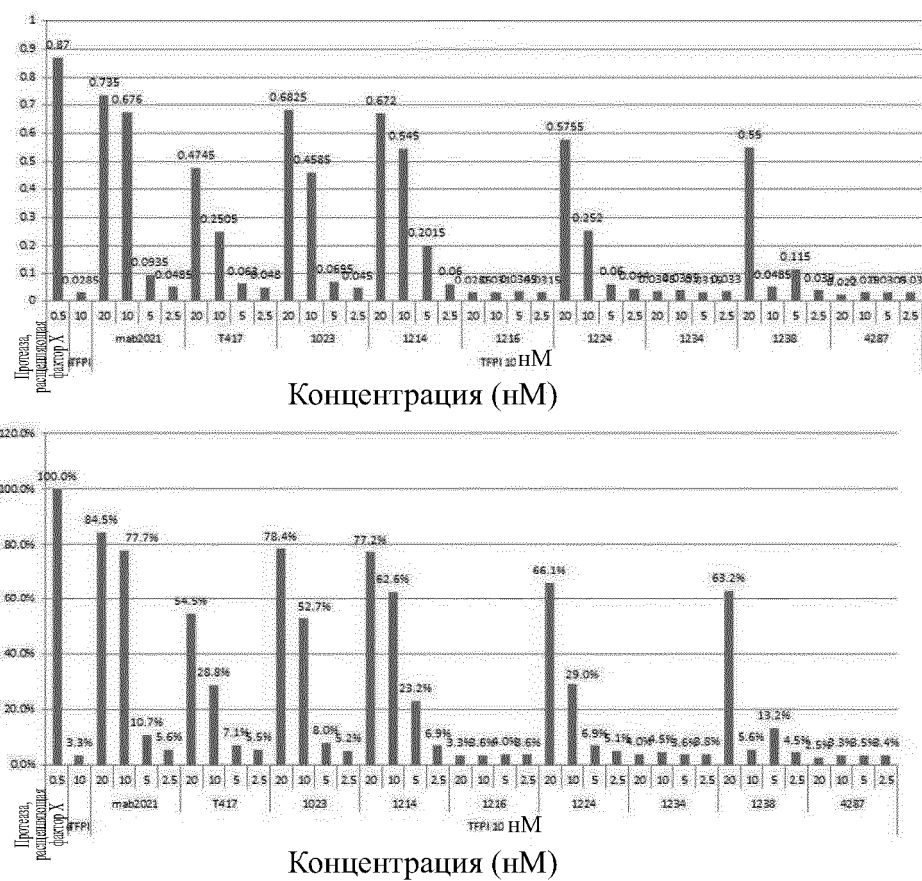


Фиг. 24

036490

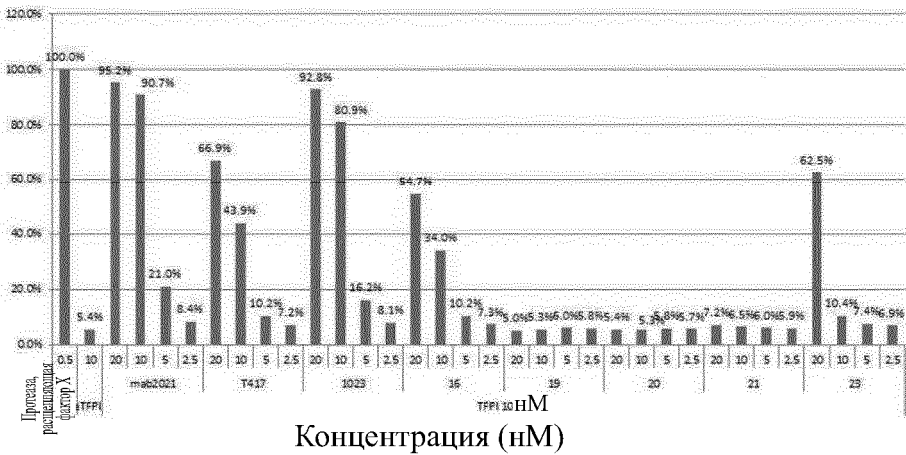
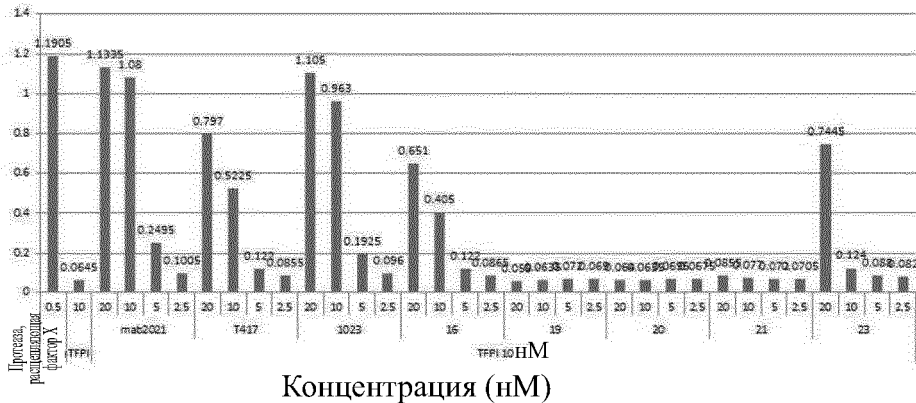


ФИГ. 25

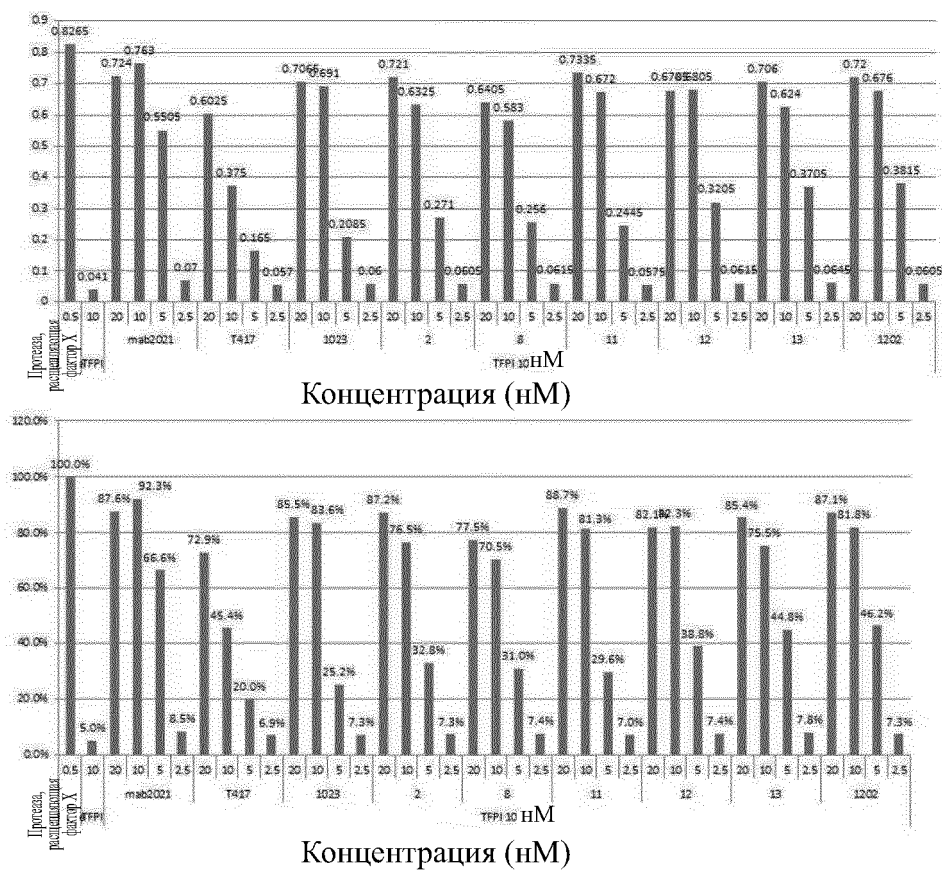


Фиг. 26

036490

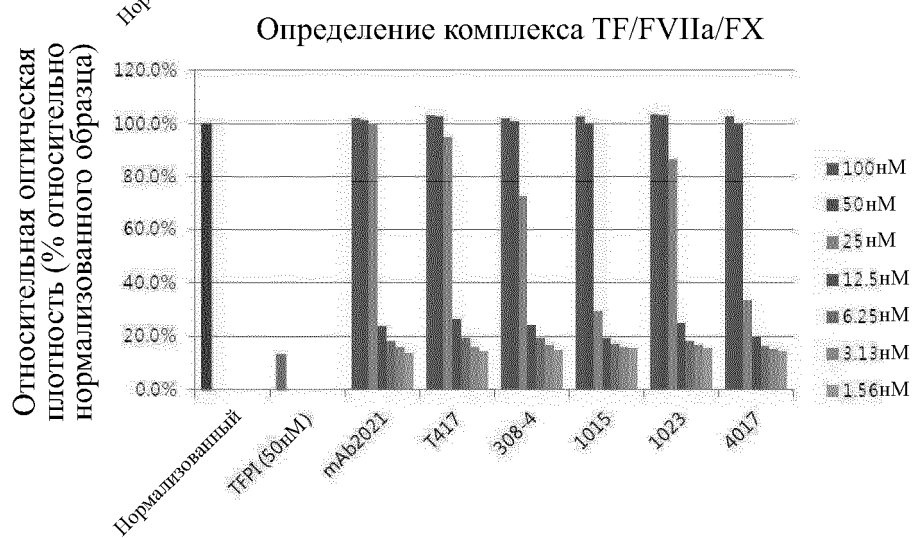
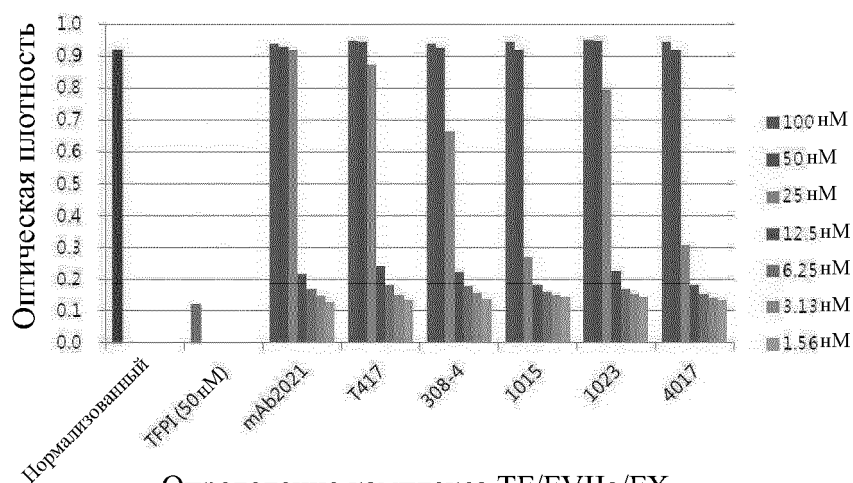


ФИГ. 27



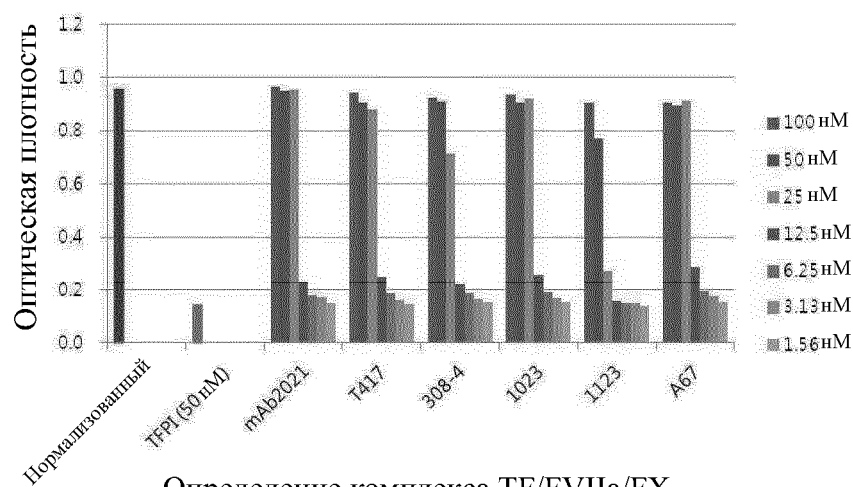
Фиг. 28

Определение комплекса TF/FVIIa/FX

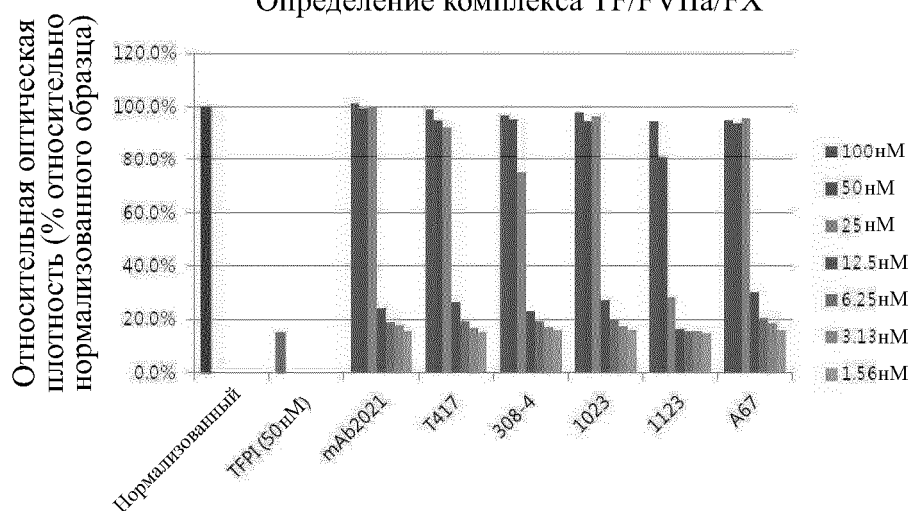


Фиг. 29

Определение комплекса TF/FVIIa/FX

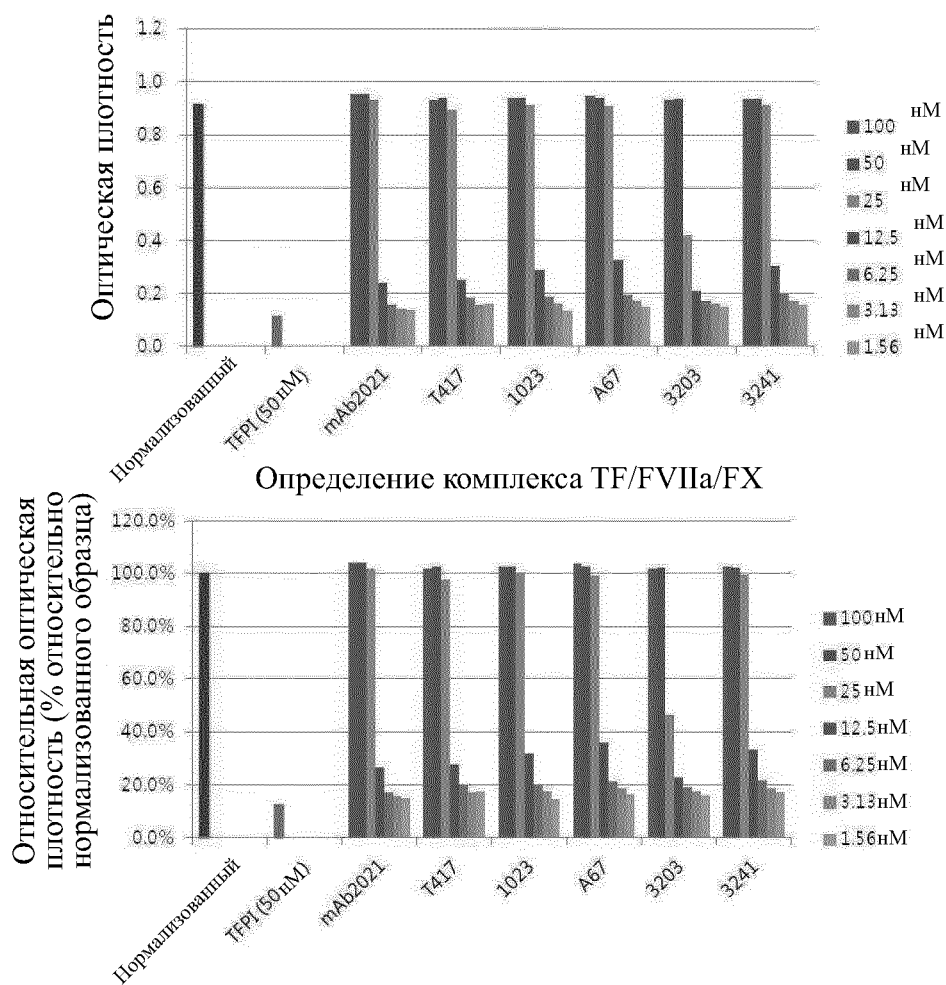


Определение комплекса TF/FVIIa/FX



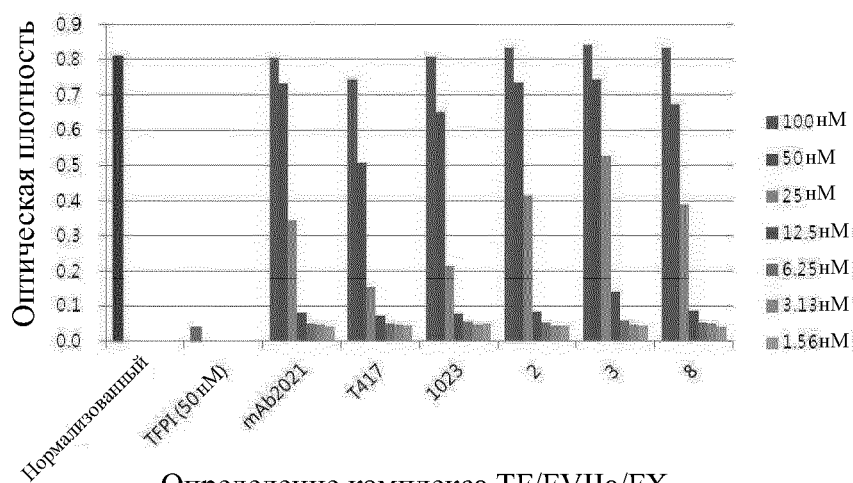
Фиг. 30

Определение комплекса TF/FVIIa/FX

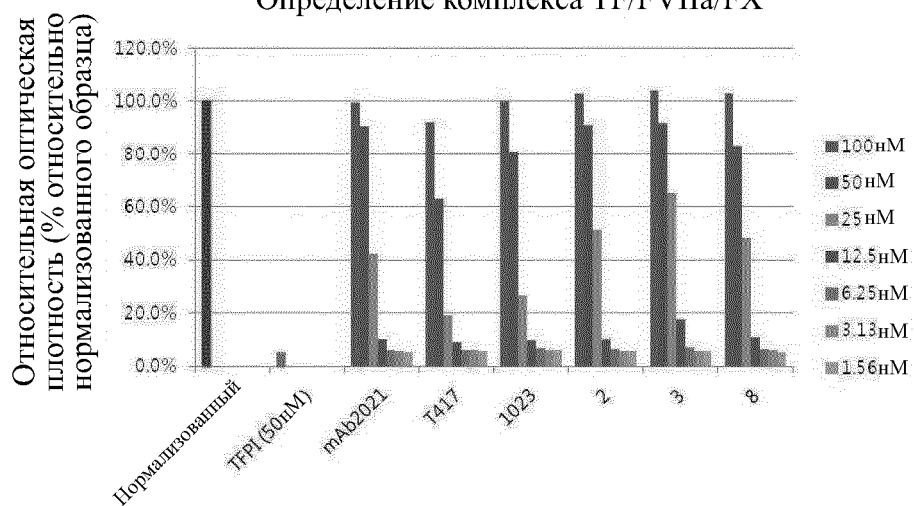


Фиг. 31

Определение комплекса TF/FVIIa/FX

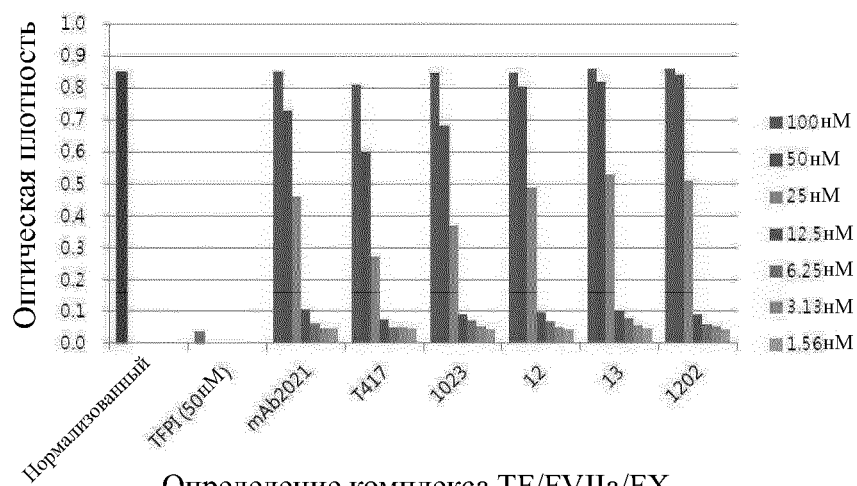


Определение комплекса TF/FVIIa/FX

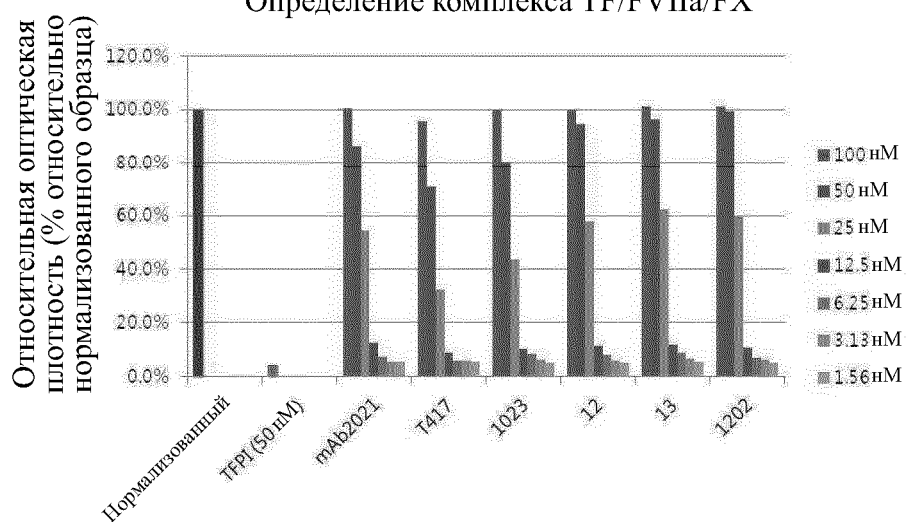


Фиг. 32

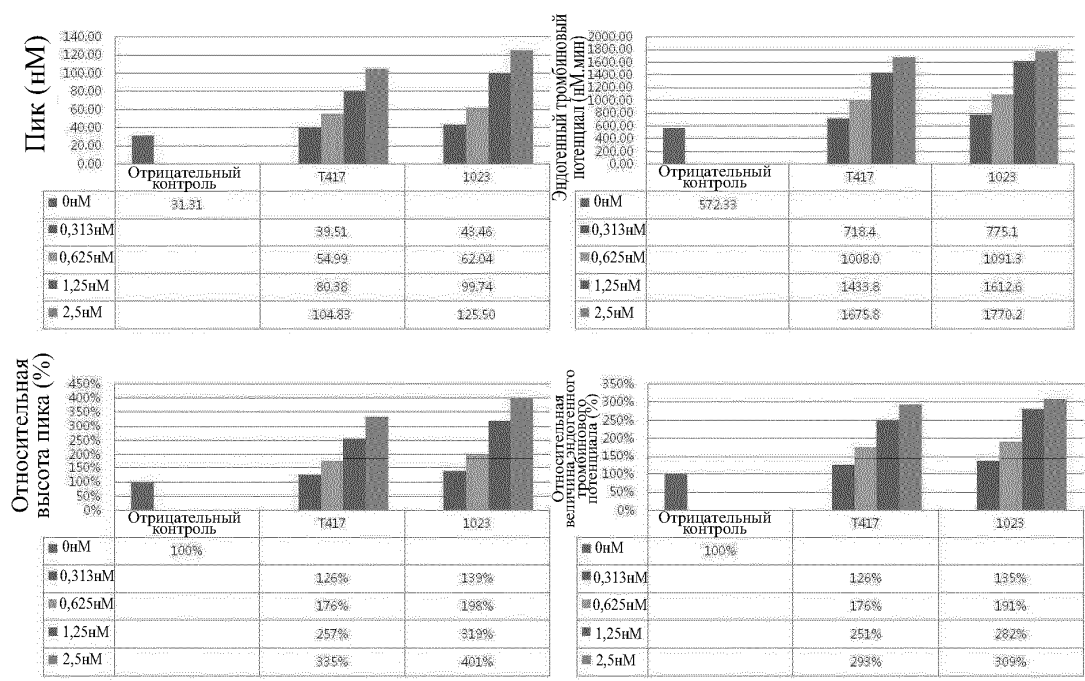
Определение комплекса TF/FVIIa/FX



Определение комплекса TF/FVIIa/FX



Фиг. 33



Фиг. 34

