

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201301107** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2014.11.28

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

(22) Дата подачи заявки  
2012.03.30

---

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИНГИБИТОРА ПУТИ ТКАНЕВОГО  
ФАКТОРА (TFPI)**

---

(31) 61/471,101

(32) 2011.04.01

(33) US

(86) PCT/US2012/031538

(87) WO 2012/135671 2012.10.04

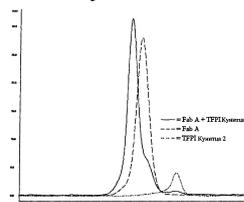
(88) 2012.12.13

(71) Заявитель:  
**БАЙЕР ХЕЛФКЕА ЛЛК (US)**

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

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

(57) Обеспечиваются изолированные моноклональные антитела, которые связываются со специфическими эпитопами ингибитора пути тканевого фактора человека (TFPI), и изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие их. Также обеспечиваются фармацевтические композиции, которые включают анти-TFPI моноклональные антитела и способы лечения дефицитов или пороков коагуляции путем введения антител.



201301107

A1

A1

201301107

5

10

15

Заявка № 201301107

Заявитель Байер Хелфкеа ЛЛК, US

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИНГИБИТОРА ПУТИ ТКАНЕВОГО  
ФАКТОРА (TFPI)

20

**Подача списка последовательностей**

Список последовательностей, связанных с данной заявкой, подается в электронном формате посредством EFS-Web и, таким образом, является введенным путем ссылки в описание в своей целостности.

25

**Область воплощений**

Обеспечиваются изолированные моноклональные антитела и их фрагменты, которые связывают ингибитор пути тканевого фактора человека (TFPI).

30

**Предпосылки создания изобретения**

Коагуляция крови представляет собой процесс, с помощью которого кровь формирует стабильные сгустки для того, чтобы остановить кровотечение. Процесс вовлекает ряд проферментов и профакторов (или “факторов коагуляции”), которые циркулируют в крови. Эти проферменты и профакторы взаимодействуют с помощью нескольких путей,

проходя через которые они превращаются, либо последовательно, либо одновременно, в активированную форму. В конечном итоге, процесс приводит к активации протромбина до тромбина с помощью активированного фактора X (FXa) в присутствии фактора Va, ионов кальция и тромбоцитов. Активированный тромбин, в свою очередь, индуцирует агрегацию тромбоцитов и превращает фибриноген в фибрин, который потом перекрестно связывается с помощью активированного фактора XIII (FXIIIa) с образованием сгустка.

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

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

Путь тканевого фактора коагуляции подвергается негативному контролю с помощью ингибитора пути тканевого фактора ("TFPI"). TFPI представляет собой природный, зависимый от FXa ингибитор комплекса FVIIa/TF с обратной связью. Он является представителем мультивалентных ингибиторов серин-протеазы типа Кунитца.

Физиологически TFPI связывается с активированным фактором X (FXa) с образованием гетеродимерного комплекса, который последовательно взаимодействует с комплексом FVIIa/TF, вызывая ингибирование его активности и выключая, таким образом, путь тканевого фактора коагуляции. В принципе, блокирование активности TFPI может восстанавливать активность FXa и FVIIa/TF, удлиняя, таким образом, длительность действия пути тканевого фактора и повышая образование FXa, что представляет собой общий недостаток при гемофилии A и B.

Действительно, некоторое предварительное экспериментальное подтверждение продемонстрировало, что блокирование активности TFPI с помощью антител против TFPI нормализует удлиненное время коагуляции или укорачивает время свертывания. Например, Nordfang и др. показали, что удлиненное протромбиновое время с разведённым тромбопластином плазмы крови больных гемофилией нормализуется после обработки плазмы крови антителами к TFPI (Thromb. Haemost., 1991, 66(4): 464-

467). Подобно этому, Erhardtsen и др. показали, что время кровотечения в модели гемофилии А при использовании кроликов значительно укорачивалось с помощью анти-TFPI антител (Blood coagulation and Fibrinolysis, 1995, 6: 388-394). Эти исследования дают возможность предположить, что ингибирование TFPI с помощью анти-TFPI антител может быть полезным для лечения гемофилии А или В. В этих исследованиях использовали только поликлональное анти-TFPI антитело.

При использовании методик гибридом были получены и идентифицированы моноклональные антитела против рекомбинантного человеческого TFPI (rhTFPI). Смотри Yangи др., Chin. Med. J., 1998, 111(8): 718-721. При этом исследовали влияние моноклонального антитела на протромбиновое время с разведённым тромбопластином (PT) и активированное парциальное тромбопластиновое время (APTT). Эксперименты показали, что анти-TFPI моноклональное антитело укорачивает протромбиновое время с разведённым тромбопластином плазмы крови, имеющей недостаток фактора IX. Это дает возможность предположить, что путь тканевого фактора играет важную роль не только в физиологическом свертывании крови, но также и при геморрагиях и гемофилии (Yangи др., Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1997, 22(4): 297-300).

В соответствии с этим, антитела, специфические для TFPI, являются необходимыми для лечения гематологических заболеваний и рака.

В общем случае, терапевтические антитела для лечения заболеваний человека были получены при использовании генетической инженерии для создания мышиных, химерных, гуманизированных и полностью человеческих антител. Мышиные моноклональные антитела были продемонстрированы как такие, которые обладают ограниченным применением в качестве терапевтических агентов по причине короткого времени полураспада в сыворотке крови, неспособности запускать эффекторные функции человека и продукции человеческих антимышиных антител (Brekke и Sandlie, "Therapeutic Antybidies for human deseases at the Dawn of the Twenty-first Century," Nature 2, 53, 52-62, Jan. 2003). Химерные антитела были продемонстрированы как такие, которые обеспечивают повышение ответов на человеческое анти-химерное антитело. Гуманизированные антитела дополнительно минимизируют мышиный компонент антител. Однако полное человеческое антитело не имеет иммуногенности, ассоциированной с мышиными элементами. Таким образом, существует потребность в разработке полных человеческих антител для устранения иммуногенности, ассоциированной с другими формами генетически сконструированных моноклональных антител. В частности, постоянное профилактическое лечение, как это

будет требоваться в случае лечения гемофилии с помощью анти-TFPI моноклонального антитела, имеет высокий риск развития иммунного ответа на терапию в случае, если используется антитело с мышинным компонентом или антитело, которое имеет происхождение от мыши, по причине необходимого режима частого дозирования и высокой длительности терапии. Например, терапия на основе антител для терапии гемофилии А может требовать еженедельного дозирования для продолжения жизни пациента. Это является непрерывной стимуляцией иммунной системы. Таким образом, существует потребность в полном человеческом антителе для осуществления терапии на основе антител для лечения гемофилии и родственных врожденных и приобретенных пороков и дефектов коагуляции.

Терапевтические антитела были созданы с помощью гибридной технологии, описанной Koehler и Milstein в "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity," *Nature* 256, 495-497 (1975). Полные человеческие антитела могут также быть получены рекомбинантно в прокариотах и эукариотах. Рекомбинантная продукция антител в хозяйской клетке по сравнению с их продукцией при использовании гибридом является более предпочтительной для терапевтического антитела. Рекомбинантная продукция имеет преимущества в отношении большей однородности продукта, а также более высокого уровня продукции, и контролируемого производства, которое минимизирует или устраняет присутствие животных белков. По этой причине является желательным иметь рекомбинантно полученное моноклональное анти-TFPI антитело.

В дополнение к этому, поскольку TFPI связывается с активированным фактором X (FXa) с высокой аффинностью, эффективное анти-TFPI антитело должно иметь сравнимую аффинность. Таким образом, является желательным иметь анти-TFPI антитело, обладающее связывающей аффинностью, которая может конкурировать со связыванием TFPI/FXa.

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

Обеспечиваются моноклональные антитела, которые обладают специфическим связыванием со специфическим эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (TFPI). Также обеспечиваются полинуклеотиды, которые кодируют анти-TFPI моноклональные антитела. Также обеспечиваются фармацевтические композиции, включающие анти-TFPI моноклональные антитела, и способы лечения генетических или приобретенных пороков и дефектов коагуляции, таких, как гемофилия А и В.

### Краткое описание рисунков

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

5 Фигура 2 показывает графическое изображение взаимодействия между ингибитором пути тканевого фактора человека и его антителом (Fab А). Fab А с обозначенными переменными доменами легкой ( $V_L$ ) и тяжелой ( $V_H$ ) цепей является представленным в виде нижней структуры. Домен 2 Кунитца (KD2) TFPI является представленным как верхняя структура.

10 Фигура 3 показывает ключевые остатки эпитопа Asp102 (D102), Ile105 (I105), Arg107 (R107), Cys106-Cys130 дисульфидный мостик и связывание TFPI на поверхности Fab А.

Фигура 4 показывает взаимное расположение TFPI - Fab А комплекса и связанного с трипсин домена Кунитца 2 (KD2), а также демонстрирует исключение одновременного связывания TFPI с фактором Ха и Fab А. KD2 и Fab А являются представленными в

15 графическом изображении, трипсин показан как просвечивающаяся поверхность.

Также показано стерическое несоответствие Fab А и трипсина.

Фигура 5 показывает образование комплекса Fab В и домена 1+2 Кунитца TFPI при использовании эксклюзионного анализа размеров.

20 Фигура 6 показывает два графических изображения, демонстрирующие взаимодействие между ингибитором пути тканевого фактора человека и его антителом (Fab В) в первом ракурсе и в другом ракурсе, повернутом на 90 градусов относительно первого ракурса.

Fab В с обозначенными переменными доменами легкой ( $V_L$ ) и тяжелой ( $V_H$ ) цепей является представленным в виде нижней структуры Фигуры (закрашен серым цветом).

Домен 1 Кунитца (KD1) TFPI является представленным в белом цвете, а домен 2

25 Кунитца (KD2) TFPI является представленным в черном цвете.

Фигура 7 показывает ключевые остатки эпитопа Asp31 (D31), Asp32 (D32), Pro34 (P34), Lys36 (K36), Glu60 (E60), Cys35-Cys59 дисульфидный мостик и связывание домена Кунитца 1 TFPI на поверхности Fab В. Также является представленным, но не перечислено, связывание домена 2 Кунитца.

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

Фигура 9 показывает взаимное расположение комплекса TFPI - Fab В и комплекса ВРТИ, фактора VIIa и тканевого фактора, а также демонстрирует исключение одновременного связывания TFPI с фактором VIIa/тканевым фактором и Fab В. Стерическое несоответствие Fab В и фактора VIIa, а также Fab В и тканевого фактора является отмеченным стрелками.

Фигура 10 показывает взаимное расположение комплекса TFPI - Fab В и связанного трипсином домена 2 Кунитца, а также демонстрирует исключение одновременного связывания TFPI с фактором Ха и Fab В. Также показано стерическое несоответствие Fab В и трипсина, и Fab В, связанного доменом 1 Кунитца, и трипсина.

10 Фигура 11 показывает (А) выравнивание последовательности легких и тяжелых цепей Fab А (SEQ ID NOs: 2 и 3) и Fab С (SEQ ID NOs: 6 и 7) и (В) взаимное расположение TFPI - Fab А рентгеновской структуры с моделями гомологии Fab С. (А) остатки паратопа являются выделенными жирным шрифтом и выделены цветом. Остаток паратопа hc\_Asn32, который отличается в Fab А и Fab С, является отмеченным  
 15 звездочками. (В) домен Кунитца 2 (KD2) является представленным как графическое изображение черным цветом. Fab является представленным в виде серой полосы. Остаток паратопа hc\_Asn32 показан в виде блока.

Фигура 12 показывает (А) выравнивание последовательности легких и тяжелых цепей Fab В (SEQ ID NOs: 4 и 5) и Fab D (SEQ ID NOs: 8 и 9) и (В) взаимное расположение  
 20 TFPI - Fab В рентгеновской структуры с моделями гомологии Fab D. (А) остатки паратопа являются выделенными жирным шрифтом и выделены цветом. Остатки паратопа, которые отличаются в Fab В и Fab D, является отмеченным звездочкой. (В) домен Кунитца 1 (KD1) и домен Кунитца 2 (KD2) являются представленным светло-серым цветом и черным изображением, соответственно. Fab структуры являются  
 25 представленными в виде серой полосы. Остатки паратопа, которые отличаются в Fab В и Fab С, представлены в виде блоков.

Фигура 13 показывает (А) данные поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) для Fab С и Fab D, блокирующих связывание FXa и TFPI, и (В) данные поверхностного  
 30 плазмонного резонанса (Biacore) для Fab С и Fab D, блокирующих связывание FVIIa/TF на TFPI.

## Подробное описание

### Определения

Термин “ингибитор пути тканевого фактора” или “TFPI”, как используется в данной заявке, относится к любому варианту, изоформе и видам гомолога

5 человеческого TFPI, который естественным образом экспрессируется клетками. В предпочтительном воплощении изобретения связывание антитела в соответствии с изобретением с TFPI снижает время свертывания крови.

Как используется в данной заявке, “антитело” относится к целному антителу и любому его фрагменту, который связывает антиген (то есть, “антигенсвязывающая часть”) или его единичной цепи. Термин включает молекулу иммуноглобулина полной

10 длины (например, IgG антитело), которая существует в природе или является образованной с помощью нормальных рекомбинационных процессов из фрагментов гена иммуноглобулина или иммунологически активной части молекулы иммуноглобулина, такой, как фрагмент антитела, который сохраняет активность

15 специфического связывания. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который узнается антителом полной длины. Например, фрагмент анти-TFPI моноклонального антитела связывается с эпитопом TFPI.

Антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться с помощью фрагментов антитела полной длины. Примеры связывающих фрагментов, которые охватываются

20 термином “антигенсвязывающая часть” антитела и включают (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, который состоит из  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$  доменов; (ii)  $F(ab')_2$  фрагмент, бивалентный фрагмент, который включает 2 Fab фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd фрагмент, который состоит из  $V_H$  и  $C_{H1}$  доменов; (iv) Fv фрагмент, который состоит из  $V_L$  и  $V_H$  доменов одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward и др., (1989) Nature 341: 544-546), который состоит из  $V_H$  домена; (vi) изолированный участок, который определяет комплементарность (CDR); (vii) минитела, диатела, триатела, тетратела, и каппатела (смотри, например, III и др., Protein Eng 1997; 10: 949-57); (viii) верблюжий IgG; и (ix) IgNAR . Кроме того, несмотря на то, что эти два домена Fv фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, они

30 могут соединяться при использовании рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть сконструированными в виде одного белка, в котором пары участков  $V_L$  и  $V_H$  формируют моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv); смотри, например, Bird и др. (1988) Science 242: 423-426; и Huston и др. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такие

одноцепочечные антитела также являются предназначенными для того, чтобы быть охваченными термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Такие фрагменты антитела получают при использовании традиционных методик, известных квалифицированному специалисту в данной области техники, и эти фрагменты 5 подвергаются анализу для использования таким же образом, что и интактные антитела. Кроме того, подразумевается, что антигенсвязывающий фрагмент может охватываться термином миметика антитела. Термин "миметик антитела" или "миметик", как используется в данной заявке, означает белок, который демонстрирует связывание, подобное такому для антитела, но представляет собой меньшее альтернативное 10 антитело или белок, отличный от антитела. Такой миметик антитела может включаться в каркасную структуру. Термин "каркас" относится к полипептидной платформе для конструирования новых продуктов с оптимизированными функциями и характеристиками.

Термин "эпитоп" относится к площади или участку антигена, с которым антитело 15 специфически связывается или взаимодействует, и который в некоторых воплощениях указывает, где антиген находится в физическом контакте с антителом. В противовес этому, термин "паратоп" относится к поверхности или участку антитела, на которой антиген специфически связывается. Об эпитопах, которые характеризуются конкурентным связыванием, говорят, что они перекрываются, если связывание 20 соответствующих антител является взаимоисключающим, то есть связывание одного антитела исключает одновременное связывание другого антитела. Говорят, что эпитопы являются отдельными (уникальными), если антиген является способным обеспечивать связывание обоих соответствующих антител одновременно.

Термин "конкурирующие антитела," как используется в данной заявке, относится к 25 антителам, которые связываются с приблизительно, существенно или преимущественно, тем же или даже с тем самым эпитопом, что и антитело против TFPI, как описывается в данной заявке. Термин "конкурирующие антитела" включает антитела с перекрывающимися специфичностями эпитопа. Конкурирующие антитела, таким образом, являются способными эффективно конкурировать с антителом, как 30 описывается в данной заявке, за связывание с TFPI. Является предпочтительным, когда конкурирующее антитело может связываться с тем же эпитопом, что и антитело описанное в данной заявке. Альтернативно, рассматривается конкурирующее антитело, которое имеет ту же специфичность эпитопа, что и антитело, описанное в данной заявке.

Как используется в данной заявке, термины "ингибирует связывание" и "блокирует связывание" (например, в отношении ингибирования/блокирования связывания TFPI лиганда с TFPI) применяются поочередно и охватывают как частичное, так и полное ингибирование или блокирование. Ингибирование и блокирование являются также

5 предназначенным для включения любого способного к измерению снижения связывающей аффинности TFPI с физиологическим субстратом при контакте с анти-TFPI антителом по сравнению с TFPI, который не приводится в контакт с анти-TFPI антителом, например, блокирование взаимодействия TFPI с фактором Ха или

10 блокирование взаимодействия комплекса TFPI-фактор Ха с тканевым фактором, фактора VIIa или комплекса тканевого фактора/фактора VIIa, по крайней мере, приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Термины "моноклонального антитела" или "композиция моноклонального антитела", как используется в данной заявке, относятся к препарату молекул антитела одного

15 молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одну связывающую специфичность и аффинность для конкретного эпитопа. В соответствии с этим термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, которые демонстрируют одну связывающую специфичность и которые имеют

20 переменные и константные участки, полученные из последовательностей зародышевого иммуноглобулина человека. Человеческие антитела в соответствии с изобретением могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями зародышевого иммуноглобулина (например, мутации, введенные с помощью случайного и специфического для сайта мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*).

25 Термин "изолированное антитело," как используется в данной заявке, является предназначенным для обозначения антитела, которое является существенно свободным от других антител, обладающих отличными антигенными специфичностями (например, изолированное антитело, которое связывается с TFPI, является существенно свободным от антител, которые связывают антигены, отличные от TFPI). Изолированное антитело,

30 которое связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого TFPI, может, однако, иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, такими, которые получены из других видов (например, видовые гомологи TFPI). Кроме того, изолированное антитело может быть существенно свободным от другого клеточного материала и/или химических агентов.

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

Как используется в данной заявке, термин "высокая аффинность" для IgG антитела относится к связывающей аффинности, которая составляет, по крайней мере, приблизительно  $10^7 M^{-1}$ , в некоторых воплощениях, по крайней мере, приблизительно  $10^8 M^{-1}$ , в некоторых воплощениях, по крайней мере, приблизительно  $10^9 M^{-1}$ ,  $10^{10} M^{-1}$ ,  $10^{11} M^{-1}$  или более, например, вплоть до  $10^{13} M^{-1}$  или более. Однако "высокая аффинность" связывания может варьировать для других изотипов антитела. Например, "высокая аффинность" связывания для IgM изотипа относится к связывающей аффинности, которая составляет, по крайней мере, приблизительно  $1,0 \times 10^7 M^{-1}$ . Как используется в данной заявке, термин "изотип" относится к классу антитела (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи. "Участок, определяющий комплементарность" или "CDR" относится к одному из трех гипервариабельных участков в пределах вариабельного участка тяжелой цепи или вариабельного участка легкой цепи молекулы антитела, который образует N-терминальную антигенсвязывающую поверхность, которая является комплементарной к трехмерной структуре связанного антигена. Исходя из N-терминального конца тяжелой или легкой цепи, эти участки, определяющие комплементарность, обозначаются как "CDR1," "CDR2," и "CDR3," соответственно. CDR являются вовлеченными в связывание антиген-антитело, а CDR3 включает уникальный участок, специфический для связывания антиген-антитело. Сайт связывания антигена, таким образом, может включать 6 CDR, включая CDR участки из каждого V-участка тяжелой и легкой цепей.

Как используется в данной заявке, термин "консервативные замены" относится к модификациям полипептида, которые вовлекают замену одной или более аминокислот для аминокислот, обладающих подобными биохимическими свойствами, которые не

приводят к утрате биологической или биохимической функции полипептида.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой такую, в которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим подобную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, которые имеют подобные боковые цепи, являются определенными в области техники. Эти семейства включают

5 аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, гистидин, аргинин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, теронин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями

10 (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин), и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Предусматривается, что антитело в соответствии с настоящим изобретением может иметь консервативные аминокислотные замены и сохранять

15 активность.

Для нуклеиновых кислот и полипептидов термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или два полипептида, или их сконструированные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются

20 идентичными, с приемлемыми нуклеотидными или аминокислотными инсерциями или делециями, по крайней мере, приблизительно на 80% нуклеотидов или аминокислот, обычно, по крайней мере, приблизительно на 85%, предпочтительно приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95%, более предпочтительно, по крайней мере, приблизительно на 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, или 99,5% нуклеотидов или аминокислот. Альтернативно, существенная гомология для

25 нуклеиновых кислот существует тогда, когда сегменты будут гибридизоваться при селективных условиях гибридизации с комплементом цепи. Изобретение включает последовательности нуклеиновой кислоты и полипептидные последовательности, которые обладают существенной гомологией со специфическими последовательностями нуклеиновой кислоты и аминокислотными последовательностями, приведенными в

30 данной заявке.

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, разделяемых последовательностями (то есть, % гомологии = # идентичных положений / общее число # положений x 100), принимая во внимание количество пробелов и длину каждого пробела, которые необходимо

ввести для достижения выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено при использовании математического алгоритма, такого, как, но без ограничения, AlignX™ модуль VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Для AlignX™ параметры по умолчанию для множественного выравнивания представляют собой: штраф за открытие пробела: 10; штраф за удлинение пробела: 0,05; штраф за разделение пробелом цепи: 8; % идентичности для задержки выравнивания: 40. (дополнительные детали могут быть найдены в <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html>).

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

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в лизате клеток или в частично очищенной или существенно чистой форме. Нуклеиновая кислота является "изолированной" или "представляется существенно чистой" тогда, когда является очищенной от других клеточных компонентов, с которыми она в норме ассоциируется в природной среде. Для изоляции нуклеиновой кислоты, могут использоваться

стандартные методики, такие, как: щелочная/SDS обработка, расслоение в CsCl, колоночная хроматография, электрофорез в агарозном геле и другие методики, хорошо известные в области техники.

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

В данной заявке обеспечиваются моноклональные антитела со специфическим связыванием с человеческим TFPI, как представлено в последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях анти-TFPI моноклональные антитела ингибируют связывание TFPI лиганда с TFPI. Таким образом, в некоторых воплощениях анти-TFPI моноклональные антитела могут ингибировать активность TFPI.

Обеспечивается также моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп включает один или более остатков домена Кунитца 2. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:2 или в SEQ ID NO:4. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:3 или в SEQ ID NO:5. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:2, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:3. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:4, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:5. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело может также включать легкую цепь или тяжелую цепь с существенной гомологией по отношению к тем, которые обеспечиваются. Например, изолированное моноклональное антитело, которое имеет существенную гомологию, может включать одну или более существенных замен.

В некоторых воплощениях обеспечивается изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп включает один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO:1 и их комбинации.

В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Glu100 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Glu101 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Asp102 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Pro103 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Gly104 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Cys106 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Arg107 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Gly108 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Tyr109 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Lys126 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Gly128 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Gly129 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Cys130 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Leu131 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Gly132 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Asn133 последовательности SEQ ID NO:1.

В некоторых воплощениях эпитоп включает остатки Ile105 и Asp102 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остатки Ile105 и Leu131 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остатки Ile105, Asp102 и Leu131 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп дополнительно включает остаток Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Cys106, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 или Asn133 последовательности SEQ ID NO:1.

В некоторых воплощениях обеспечивается изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп включает две аминокислотные петли, связанные с помощью дисульфидного мостиками между остатками Cys106 и Cys130 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп дополнительно включает один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131,

Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп включает остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых других воплощениях эпитоп включает остаток Asp102 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых других воплощениях эпитоп включает остаток Leu131 последовательности SEQ ID NO:1. Кроме того, в некоторых воплощениях эпитоп дополнительно включает один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO:1.

Также обеспечивается изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп включает один или более остатков домена Кунитца 1 и один или более остатков домена Кунитца 2. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает легкую цепь, как представлено в последовательности SEQ ID NO:6 или в SEQ ID NO:8. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает тяжелую цепь, как представлено в последовательности SEQ ID NO:7 или в SEQ ID NO:9. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:6, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых воплощениях изолированное моноклональное антитело включает легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:8, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:9. В некоторых воплощениях также предполагается, что изолированное моноклональное антитело может включать легкую цепь или тяжелую цепь с существенной гомологией по отношению к тем, которые обеспечиваются. Например, изолированное моноклональное антитело, которое имеет существенную гомологию, может включать одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях остатки домена Кунитца 1 включают один или более остатков, выбранных из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID NO:1 и их комбинации. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Asp31 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Asp32 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Gly33 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Pro34 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток

Cys35 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Lys36 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Cys59 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Glu60 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает остаток Asn62 последовательности SEQ ID NO:1.

В некоторых воплощениях остатки домена Кунитца 1 включают остатки Pro34 и Glu60 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остатки домена Кунитца 1 включают остатки Pro34 и Lys36 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остатки домена Кунитца 1 включают остатки Pro34, Lys36 и Glu60 последовательности SEQ ID NO:1.

В некоторых воплощениях остатки домена Кунитца 2 включают один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128 последовательности SEQ ID NO:1 и их комбинации. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Glu100 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Glu101 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Pro103 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Gly104 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Cys106 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Arg107 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Gly108 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Tyr109 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Phe114 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Asn116 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Glu123 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Arg124 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Lys126 последовательности

SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Tyr127 последовательности SEQ ID NO:1.

В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остатки Arg107 и Glu101 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена

5 Кунитца 2 включает остатки Arg107 и Tyr109 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остатки Arg107, Glu101 и Tyr109 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает остаток Gly128 последовательности SEQ ID NO:1.

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

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

Также обеспечивается изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный  
20 эпитоп включает две аминокислотные петли, связанные дисульфидным мостиком между остатками Cys35 и Cys59 последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых воплощениях эпитоп дополнительно включает один или более остатков домена Кунитца 1 и один или более остатков домена Кунитца 2. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 1 включает один или более остатков, выбранных из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 последовательности SEQ ID  
25 NO:1. В некоторых воплощениях остаток домена Кунитца 2 включает один или более остатков, выбранных из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128 последовательности SEQ ID NO:1.

30 Также обеспечиваются антитела, которые могут конкурировать с любым из антител, описанных в данной заявке, за связывание с TFPI. Например, антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитела, описанные в данной заявке, будет способным эффективно конкурировать за связывание TFPI. В некоторых воплощениях обеспечивается изолированное моноклональное антитело, которое связывается с TFPI,

где изолированное моноклональное антитело является конкурирующим с любым из изолированных моноклональных антител, описанных в данной заявке. В некоторых воплощениях антитело является конкурирующим с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:8. В некоторых воплощениях антитело является конкурирующим с антителом, которое имеет тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:9. В некоторых воплощениях антитело является конкурирующим с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:2, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:3. В некоторых воплощениях антитело является конкурирующим с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:4, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:5. В некоторых воплощениях антитело является конкурирующим с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:6, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых воплощениях антитело является конкурирующим с антителом, которое имеет легкую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:8, и тяжелую цепь, как показано в последовательности SEQ ID NO:9.

Также обеспечиваются биспецифические антитела, которые могут конкурировать с любым из антител, описанных в данной заявке, за связывание с TFPI. Например, такое биспецифическое антитело может связываться с одним или более эпитопов, описанных выше.

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

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

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

Несмотря на то, что обеспечиваются аминокислотные последовательности моноклональных антител, предполагается, что последовательности нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для того, чтобы кодировать эти моноклональные антитела. Такие полинуклеотиды могут кодировать легкую цепь или тяжелую цепь

анти-TFPI антитела. В некоторых воплощениях такие полинуклеотиды могут кодировать как легкую цепь, так и тяжелую цепь анти-TFPI антитела, разделенные способной к распаду связью. Кроме того, упомянутые выше антитела могут быть получены при использовании экспрессионных векторов, которые включают молекулы изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующие какое-либо из моноклональных антител, и хозяйских клеток, которые включают такие векторы.

### *Способы получения антител к TFPI*

Моноклональное антитело может быть получено рекомбинантно путем экспрессии нуклеотидной последовательности, которая кодирует переменные участки моноклонального антитела в соответствии с воплощениями настоящего изобретения, в хозяйской клетке. С помощью экспрессионного вектора нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, может быть трансфицирована и экспрессирована в хозяйской клетке, которая является приемлемой для получения. В соответствии с этим также обеспечивается способ получения моноклонального антитела, которое связывается с человеческим TFPI, который включает:

- (a) трансфекцию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей моноклональное антитело в соответствии с изобретением, в хозяйскую клетку,
- (b) культивирование хозяйской клетки для экспрессии моноклонального антитела в хозяйской клетке, и необязательно,
- (c) изоляцию и очистку полученного моноклонального антитела, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую моноклональное антитело в соответствии с настоящим изобретением.

В одном примере для экспрессии антител или фрагментов антитела, ДНК, кодирующие часть или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные с помощью стандартных методик молекулярной биологии, встраивают в экспрессионные векторы так, что гены являются оперативно связанными с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В этом контексте термин "оперативно связанный" является предназначенным для обозначения того, что ген антитела является лигированным в вектор так, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в пределах вектора служат для своей функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимыми с экспрессией в используемой хозяйской клетке. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела

могут встраиваться в отдельные векторы или, что является более типичным, оба гена встраивают в тот же экспрессионный вектор. Гены антитела встраивают в экспрессионный вектор с помощью стандартных способов (например, лигирования комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора, или лигирования тупых концов, в случае, если рестрикционные сайты отсутствуют).

5 Вариабельные участки легкой и тяжелой цепей антител, описанных в данной заявке, могут использоваться для создания полноразмерных генов антитела любого изотипа антитела путем встраивания их в экспрессионные векторы, которые уже кодируют константные участки тяжелой цепи и легкой цепи желаемого изотипа так, что  $V_H$  сегмент является оперативно связанным с  $C_H$  сегментом (сегментами) в пределах вектора, а  $V_L$  сегмент является оперативно связанным с  $C_L$  сегментом в пределах вектора. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из хозяйской клетки. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор таким

10 образом, что сигнальный пептид является связанным в рамке с аминоконцевым концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид из белка, отличного от иммуноглобулина).

15 В дополнение к генам, которые кодируют цепь антитела, рекомбинантные экспрессионные векторы в соответствии с изобретением несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в хозяйской клетке. Термин "регуляторная последовательность" является предназначенным для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют

20 транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описываются, например, у Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). При этом специалисту в данной области техники будет понятно, что конструирование экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может

25 зависеть от таких факторов, как выбор хозяйской клетки, которая подвергается трансформации, от уровня экспрессии желаемого белка, и т.д. Примеры регуляторных последовательностей для экспрессии в хозяйской клетке млекопитающих включают вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии в клетках млекопитающих, такие, как промоторы и/или энхансеры, которые имеют

30

происхождение от цитомегаловируса (CMV), вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовируса, (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. Альтернативно, могут использоваться невирусные регуляторные последовательности такие, как промотор убиквитина или промотор  $\beta$ -глобина.

5 В дополнение к генам цепи антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, такие, как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в хозяйских клетках (например, точки начала репликации) и гены селективного маркера. Ген селективного маркера способствует селекции хозяйских клеток, в которые  
10 был введен вектор (смотри, например, патенты США №№ 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017, все относятся к Axl и др.). Например, типично ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким, как G418, гигромицин или метотрексат, хозяйской клетке, в которую вектор был введен. Примеры генов селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения  
15 в dhfr-хозяйских клетках с селекцией/амплификацией при использовании метотрексата) и ген neo (для G418 селекции).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессионный(ые) вектор(ы), кодирующий(ие) легкие и тяжелые цепи трансфицируют в хозяйскую клетку с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция" являются  
20 предназначенными для того, чтобы охватывать широкое разнообразие методик, которые обычно используются для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую хозяйскую клетку, например, электропорацию, преципитацию с использованием фосфата кальция, трансфекцию на основе диэтиламиноэтилдекстрана и подобные им. Несмотря на то, что теоретически является возможным  
25 экспрессировать антитела в соответствии с изобретением либо в прокариотических, либо в эукариотических хозяйских клетках, экспрессия антител в эукариотических клетках, и наиболее предпочтительно в хозяйских клетках млекопитающих, является наиболее предпочтительной поскольку такие эукариотические хозяйские клетки и, в частности, клетки млекопитающих, является более предпочтительными, чем  
30 прокариотические клетки для сборки и секреции правильно собранного и иммунологически активного антитела.

Примеры хозяйских клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (включая dhfr-CHO клетки, описанные у Urlaub и Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220,

которые используются с селективным маркером для DHFR, например, так, как описывается у R. J. Kaufman и P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), клетки меланомы NS0, COS клетки, HKB11 клетки и SP2 клетки. Тогда, когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в хозяйские клетки млекопитающих, антитела получают путем культивирования хозяйских клеток в течение периода времени, достаточного для того, чтобы осуществить экспрессию антитела в хозяйских клетках или секрецию антитела в культуральную среду, в которой выращивают хозяйские клетки. Антитела извлекают из культуральной среды при использовании стандартных способов очистки белка, таких, как ультрафильтрация, эксклюзионная хроматография размеров, ионообменная хроматография и центрифугирование.

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

Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами главным образом посредством аминокислотных остатков, которые являются расположенными в шести CDR легких и тяжелых цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR имеют большее разнообразие между индивидуальными антителами, чем последовательности за пределами этих CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, является возможным экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических существующих в природе антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые включают CDR последовательности из специфического существующего в природе антитела, привитые на каркасные последовательности из отличного антитела, которое обладает иными свойствами (смотри, например, Riechmann, L. и др., 1998, Nature 332: 323-327; Jones, P. и др., 1986, Nature 321: 522-525; и Queen, C. и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК, которые включают генные последовательности зародышевого антитела. Такие зародышевые последовательности будут отличаться от генной последовательности зрелого антитела, поскольку они не будут включать полностью собранные переменные гены, которые формируются с помощью V(D)J связывания в процессе созревания В клеток. Является необходимым получить цельную последовательность ДНК конкретного антитела для того, чтобы воссоздать интактное рекомбинантное антитело, обладающее связывающими способностями, подобными

такowym для исходного антитела (смотри WO 99/45962). Частичная последовательность легкой и тяжелой цепей, охватывающая участки CDR, типично является достаточной для этой цели. Частичная последовательность используется для определения какие зародышевые переменные и примыкающие генные сегменты осуществляют свой вклад в рекомбинируемые переменные гены антитела. Последовательность зародышевой линии потом используется для заполнения отсутствующих частей переменных участков. Лидерные последовательности тяжелой и легкой цепей отщепляются в процессе созревания белка и не осуществляют своего вклада в свойства заключительного антитела. По этой причине является необходимым использовать соответствующую зародышевую лидерную последовательность для экспрессионных конструкций. Для добавления отсутствующих последовательностей клонированные последовательности кДНК могут объединяться с синтетическими олигонуклеотидами путем лигирования или ПЦР амплификации. Альтернативно, цельный переменный участок может быть синтезирован в виде набора коротких перекрывающихся олигонуклеотидов, которые соединяются путем ПЦР амплификации для создания клона полного синтетического переменного участка. Этот процесс имеет некоторые недостатки, такие, как удаление или включение определенных рестрикционных сайтов, оптимизация определенных кодонов.

Нуклеотидные последовательности транскриптов тяжелой и легкой цепей используются для конструирования перекрывающегося набора синтетических олигонуклеотидов с целью создания V последовательностей, идентичными природным последовательностям в отношении способности кодирования аминокислот. Синтетические последовательности легкой и тяжелой цепей могут отличаться от природных последовательностей по трем параметрам: цепочки повторяемых нуклеотидных оснований прерываются для того, чтобы способствовать синтезу олигонуклеотидов и ПЦР амплификации; оптимальные сайты инициации вводятся в соответствии с правилами Козака (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); и рестрикционные сайты эндонуклеазы конструируют выше сайта инициации трансляции. Для переменных участков как легкой, так и тяжелой цепи, оптимизированное кодирование, и соответствующее некодирование цепочки последовательности нарушается в 30-50 нуклеотидных фрагментах приблизительно в центральной точке соответствующего не кодирующего олигонуклеотида. Таким образом, для каждой цепи олигонуклеотиды могут быть соединены в перекрывающиеся двухцепочечные наборы, которые охватывают сегменты из 150-400 нуклеотидов. Пулы потом используются в

качестве матриц для получения продуктов ПЦР амплификации из 150-400 нуклеотидов. В типичном случае олигонуклеотидный набор одного варибельного участка будет нарушаться в двух пулах, которые отдельно амплифицируются для получения двух перекрывающихся продуктов ПЦР. Эти перекрывающиеся продукты потом соединяют 5 путем ПЦР амплификации с получением полного варибельного участка. Может также быть желательным включение перекрывающегося фрагмента константного участка тяжелой или легкой цепи в продукт ПЦР амплификации для получения фрагментов, которые могут быть легко клонированы в конструкции экспрессионного вектора. Реконструированные варибельные участки легкой и тяжелой цепей потом соединяют с 10 клонированным промотором, последовательностями инициации трансляции, константного участка, 3' нетранслируемыми последовательностями, последовательностями полиаденилирования и терминации транскрипции с образованием конструкций экспрессионного вектора. Экспрессионные конструкции легкой и тяжелой цепей могут быть соединены в один вектор, который совместно 15 трансфицируется, серийно трансфицируется или раздельно трансфицируется в хозяйские клетки, которые потом сливают с получением хозяйской клетки, которая экспрессирует обе цепи.

Таким образом, в другом аспекте структурные признаки человеческого анти-TFPI антитела используются для создания структурно родственных человеческих анти-TFPI 20 антител, которые сохраняют функцию связывания с TFPI. В частности, один или более CDR специфически идентифицированных участков легкой и тяжелой цепей моноклональных антител в соответствии с изобретением могут быть соединены рекомбинантно с известными каркасными участками человека и CDR для получения дополнительных, рекомбинантно сконструированных человеческих анти-TFPI антител 25 в соответствии с изобретением.

#### ***Фармацевтические композиции***

Также обеспечиваются фармацевтические композиции, которые включают терапевтически эффективные количества анти-TFPI моноклонального антитела и фармацевтически приемлемый носитель. “Фармацевтически приемлемый носитель” 30 представляет собой вещество, которое может прибавляться к активному ингредиенту для того, чтобы помочь рецептировать или стабилизировать препарат и не оказывает значительного вредного токсикологического воздействия на пациента. Примеры таких носителей представляют собой хорошо известные квалифицированному в данной области техники специалисту и включают воду, сахара, такие, как мальтоза и сахароза,

альбумин, соли, такие, как хлорид натрия, и т.д. Другие носители описываются, например, у E. W. Martin Remington's Pharmaceutical Sciences. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество, по крайней мере, одного анти-  
TFPI моноклонального антитела. В некоторых воплощениях такие композиции могут  
5 включать терапевтически эффективное количество одного или более анти-TFPI  
моноклональных антител. В некоторых воплощениях фармацевтические композиции  
могут включать антитело, которое специфически связывается с доменом Кунитца 1, как  
описывается выше, и антитело, которое специфически связывается с доменом Кунитца  
1 и 2, как описывается выше.

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

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

### *Фармацевтические применения*

Моноклональное антитело может использоваться для терапевтических целей для лечения генетических и приобретенных дефицитов или нарушений коагуляции.

5 Например, моноклональные антитела в воплощениях, описанных выше, могут использоваться для блокирования взаимодействия TFPI с FXa или для предотвращения зависимого от TFPI ингибирования активности TF/FVIIa. Кроме того, моноклональное антитело может также использоваться для восстановления направляемого TF/FVIIa образования FXa для обхода недостаточности, зависимой от FVIII или FIX амплификации FXa.

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

Антитела могут использоваться как монотерапия или в комбинации с другими терапиями, направленными против гемостатических расстройств. Например, совместное введение одного или более антител в соответствии с изобретением с фактором свертывания крови, таким, как фактор VIIa, фактор VIII или фактор IX, как  
25 предполагается, является полезным для лечения гемофилии. В одном воплощении обеспечивается способ лечения генетических и приобретенных дефицитов или пороков коагуляции, который включает введение (а) первого количества моноклонального антитела, которое связывается с ингибитором пути тканевого фактора человека и (b) второго количества фактора VIII или фактора IX, где указанные первое и второе  
30 количества вместе являются эффективными для лечения указанных дефицитов или пороков. В другом воплощении обеспечивается способ лечения генетических и приобретенных дефицитов или пороков коагуляции, включающий введение (а) первого количества моноклонального антитела, которое связывается с ингибитором пути тканевого фактора человека и (b) второго количества фактора VIII или фактора IX, где

указанные первое и второе количества вместе являются эффективными для лечения указанных дефицитов или пороков, а также где фактор VII не вводится совместно. Изобретение также включает фармацевтическую композицию, которая содержит терапевтически эффективное количество комбинации моноклонального антитела в соответствии с изобретением и фактора VIII или фактора IX, где композиция не содержит фактора VII. “Фактор VII” включает фактор VII и фактор VIIa. Эти комбинационные терапии, вероятно, снижают необходимую частоту инфузий фактора свертывания. Под совместным введением или комбинационной терапией понимают введение двух терапевтических лекарственных средств, каждое из которых является рецептированным отдельно или рецептированным вместе с одной композицией, и тогда, когда оно является рецептированным отдельно, вводится либо в то же самое время, или в различные моменты времени, но в течение одного и того же терапевтического периода.

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

Кроме того, композиция может вводиться пациентам посредством подкожной инъекции. Например, доза от 10 до 100 мг анти-TFPI антитела может вводиться пациенту с помощью подкожной инъекции еженедельно, два раза в неделю или один раз в месяц.

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

## Примеры

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

### *Экспрессионная система*

- 20 Использовали вектор переноса (в соответствии с номенклатурой Gateway), обозначенный как pD Eco5 N. pD Eco5 N основывается на pET-16 b (Novagen) и дополнительно кодирует His<sub>10</sub> и NusA метку, а также клонирующую кассету Gateway для экспрессии слитого белка, который состоит из His<sub>10</sub>/NusA и белка, который представляет интерес.
- 25 TFPI конструкцию, которая кодирует сайт расщепления тромбина, сливали с N-терминальным концом домена Кунитца 2 (от Lys93 до Phe154, ссылочный номер Uniprot 10646), и сайты присоединений Gateway (attB1-5#, attB2-3#, Invitrogen) клонировали в pD Eco5 N вектор, что приводило к получению экспрессионного вектора, обозначенного как pD Eco5 N TFPI KD2. Использовали экспрессионный штамм BL21
- 30 DE3 (Novagen).

***Аминокислотная последовательность экспрессированного слитого белка при использовании pD Eco5 N TFPI KD2, 600 AA***

MGNNNNNNNN HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY

EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT OPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES  
 VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE  
 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN  
 5 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM  
 TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL  
 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSLVPRGSKP  
 DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM NNFETLEECK NICEDGPNGF

10

### ***Компоненты последовательности***

His 10 метка: MGHNNNNNNH HH

NusA метка: SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT OPTKEITLEA ARYEDESLNL

15 GDYVEDQIES

VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN  
 ISLDLGNNAE

AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF  
 RIEVPEIGEE

20

VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE  
 RIDIVLWDDN

PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS  
 QLSGWELNVM

25

TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM  
 KELLEIEGLD

EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA  
 ARGVCTLEDL

AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEA

Линкер/транслированные сайты рестрикции эндонуклеазы:

30

TSGS GLE

Транслированный сайт att:

TSLYKKA GS

Сайт тромбина: LVPRGS

TFPI Кунитца 2 GSLVPRGSKP DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM  
 35 NNFETLEECK

NICEDGPNGF

### ***Экспрессия***

40 Штамм BL21 DE3, трансформированный с помощью pD Eco5 N #209, выращивали как  
 пре-культуру в среде LB 2 x 50 мл с 200 мкг/мл ампициллина в течение 14 часов при

37°C при скорости вращения 180 об./мин. Далее шесть флаконов для встряхивания, содержащие 400 мл среды Circlegrow (Q-Biogene), каждый инокулировали с помощью 8 мл пре-культуры и инкубировали при 37°C, при скорости вращения 180 об./мин. При оптической плотности культуры OD600 прибавляли IPTG (заключительная концентрация 100 мМ) для индукции гена и дополнительно культивировали при 17°C в течение 24 часов при 180 об./мин. *E. coli* осаждали путем центрифугирования (3000 g, 10 мин.) и хранили при -80°C.

### **Очистка**

Осажденную массу *E. coli* из 3,2 л культуры ресуспендировали в 200 мл литического буфера (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 300 мМ NaCl, 10% (об./об.) глицерина, 40 мМ имидазола, полная смесь ингибиторов протеазы, не содержащая ЭДТА (Roche)), гомогенизировали при использовании устройства высокого давления (Microfluidics) и после этого центрифугировали лизат (100000 g, 60 мин., 4°C). Осуществляли несколько этапов очистки при использовании исследовательской системы Äkta.

Концентрированный образец использовали на двух соединенных 5 мл единицах Ni-Trap-сефарозного НР матрикса (GE). Уравновешивание, связывание слитого белка и промывание Ni-Trap-Sepharose НР матрикса осуществляли при использовании Буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 300 мМ NaCl, 40 мМ имидазола). Для элюирования NusA-TFPI слитого белка использовали линейный градиент имидазола от 40 до 500 мМ в Буфере В (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 150 мМ NaCl). Соединяли фракции элюирования и концентрировали (в 6-7 раз при использовании устройства для ультрафильтрации Amicon), а буфер заменяли на Трис НСl pH 8,0.

Концентрированный образец (6-7 мл) в дальнейшем использовали для эксклюзионной хроматографии размеров с применением Сефакрила-100 (ХК26/74) в Трис НСl pH 8,0. Собирали фракции основного пика, содержащие слитый белок, концентрировали путем ультрафильтрации (Amicon) до объема 5 мл. Тромбин (НТИ) прибавляли образцу (соотношение фермент : слитый белок, 1:50 вес./вес.), инкубировали в течение 5 часов при 21°C, и реакцию останавливали с помощью PMSF (заклучительная концентрация 1 мМ). После этого осуществляли второй этап эксклюзионной хроматографии размеров (Сефакрил-100 (ХК26/74) в Трис НСl pH 8,0) и фракции пика подвергали мониторингу при использовании ПАГЭ. Фракции, которые содержали свободный мономерный домен Кунитца 2 TFPI, собирали и концентрировали (Amicon), получая при этом приблизительно 4 мг продукта из 3,2 л культуры *E. coli*.

## **Пример 2. Получение рекомбинантного моноклонального Fab A антитела к ТРР1, его экспрессия в *E. coli* и очистка**

### **Экспрессия**

Fab A совместно экспрессировали при использовании экспрессионного вектора pET28a и штамма BL21 Star DE3 *E. coli*. Участки легкой и тяжелой цепей, кодируемые в экспрессионном векторе, каждый соединяли на его N-терминальном конце с периплазматической сигнальной последовательностью. Также вводили His6 метку на C-терминальном конце участка тяжелой цепи для очистки Fab. Трансформированный штамм *E. coli*, выращенный в течение ночи на экспрессионной среде TB-Instant, использовали для аутоиндукции экспрессии рекомбинантного белка (#71491, Novagen). Кратко, 10 мл трансформированной культуры *E. coli* (в пробирке фирмы Falcon на 50 мл) выращивали как пре-культуру в LB среде с добавлением 30 мкг/мл канамицина в течение 14 часов при 37°C и при перемешивании при 180 об./мин. После этого четыре колбы Эрленмейера с 500 мл ночной экспрессионной среды TB-Instant каждый инокулировали с помощью 2 мл пре-культуры и инкубировали в течение 24 часов при 30°C при вращении 180 об./мин. Культуры центрифугировали при 10000 g и температуре 10°C в течение 30 минут, и супернатант, содержащий Fab, сразу же использовали для дополнительной очистки продукта или хранили при -20 или -80°C. Альтернативно, Fab экспрессировали при использовании экспрессионного вектора pET28a и штамма BL21 Star DE3 *E. coli* в 10 л биореакторе (Sartorius). Трансформированную культуру *E. coli* в объеме 500 мл выращивали в LB среде с добавлением 30 мкг/мл канамицина в течение 17 часов при 37°C и при перемешивании при 165 об./мин. и использовали для инокуляции биореактора, содержащего 10 л аутоиндукционной среды. Аутоиндукционная среда содержала следующие компоненты на литр: 12 г триптона, 24 г дрожжевого экстракта, 9,9 г глицерина (87%), 12,54 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,31 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 г MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1 г глюкозы, 2,5 г лактозы, 30 мг канамицина. Культивирование при использовании биореактора осуществляли в течение 24 часов (при 30°C при использовании 350 - 800 об./мин.) и после этого собирали культуральный супернатант путем удаления биомассы с помощью центрифугирования в центрифуге (Heraeus).

### **Очистка**

Fab очищали с помощью процедуры двухэтапной хроматографии при использовании Äkta Explorer 10s устройства. Модуль с пустотелым волокном (порог отсека 10 кДа) использовали для концентрирования 1 л осветленного культурального супернатанта до

получения заключительного объема 100 мл и для уравнивания буферной композиции при использовании Буфера А (50 мМ Na-фосфата рН 8,0, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола).

5 На начальном этапе ИМАС хроматографии при использовании системы Äkta Explorer концентрированный образец применяли к 5 мл Ni-NTA Superflow матрикса (Qiagen). Уравнивание, связывание образца и промывание Ni-NTA матрикса осуществляли при использовании Буфера А (связывание осуществляли при 21°C, все другие хроматографические этапы - при 4°C). Для элюирования Fab использовали линейный градиент имидазола от 10 до 250 мМ в Буфере А. Фракции одного пика элюирования 10 соединяли (60 мл общего объема) и концентрировали до 10 мл путем ультрафильтрации, и буфер доводили до PBS с рН 7,4 при использовании Ni-Prep26/10 колонки для обессоливания. Далее 2 мл матрикса каппа-легкой цепи антитела (среда селективной аффинности каппа, 0833.10 от ВАС), уравнишенного с помощью PBS, инкубировали с концентрированным ИМАС элюатом в течение 1 часа при комнатной 15 температуре с перемешиванием. Матрикс со связанным образцом переносили на хроматографическую колонку и промывали с помощью PBS. Fab образец элюировали с помощью 2 мл глицина рН 2,0, нейтрализовали при использовании 1 М HEPES рН 7,5 и буфер доводили до PBS при использовании PD10 обессоливающей колонки (GE, 17-0851-01).

20 Когда Fab экспрессировали в *E. coli* при использовании 10 л биореактора (Sartorius), то использовали следующую процедуру очистки. Отцентрифугированный культуральный супернатант последовательно фильтровали через модули с одноразовыми фильтрами (GE, KMP-NC-9204TT; KGF-A-0504TT) с размером пор 5 и 0,2 мкм. Модуль с пустотелым волокном (порог отсечения 10 кДа) использовали для концентрирования 25 осветленного культурального супернатанта до получения заключительного объема 1500 мл и доводили до получения буферной композиции при использовании Буфера А. 25 мл Ni-NTA superflow матрикса (Qiagen, уравнишенный в буфере А) прибавляли к концентрированному образцу и инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 21°C. Матрикс со связанным образцом переносили на пустую хроматографическую 30 колонку (25 x 125 мм), соединяли с с хроматографическим устройством Äkta Explorer и промывали с помощью буфера А (приблизительно 250 мл). Для элюирования Fab использовали два последующих этапа с применением градиента от 5% (30 мл) до 10 % (35 мл) буфера В, после чего применяли линейный градиент элюирования вплоть до 100% Буфера В. Объединенные фракции элюирования (72 мл) последовательно

обрабатывали так, как описано ниже: концентрировали при использовании устройства для центрифужной ультрафильтрации (отсечение 10 кДа, Amicon) до получения заключительного объема 20 мл, применяли к обессоливающей колонке в виде трех порций (GE HiPrep, 26/10) для доведения буфера до PBS pH 7,4, а также осуществляли

5 дополнительное концентрирование в устройстве для центрифужной ультрафильтрации (Amicon) до получения заключительного объема 40 мл. Концентрированный образец инкубировали с 5 мл матрикса антитела к каппа легкой цепи антитела (среда селективной аффинности каппа, ВАС, уравновешенная с помощью PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре с перемешиванием. Сефарозный матрикс со

10 связанным образцом переносили на хроматографическую колонку и обрабатывали при использовании следующей последовательности этапов промывания: 4 раза с помощью 15 мл PBS; дважды с помощью 5 мл промывочного буфера (100 мМ Na-фосфата pH 6,0, 100 мл NaCl, 500 мМ аргинина). Этап элюирования состоял из трехкратного применения 5 мл буфера на основе 100 мМ глицина HCl pH 3,0. Элюат немедленно

15 нейтрализовали при использовании 1 М Трис HCl pH 8,0 и сформировавшиеся преципитаты удаляли с помощью центрифугирования (10 мин., 3200 g). Образцы концентрировали при использовании ультрафильтрации (Amicon) и применяли к колонке 16/60 Superdex-75 препаративной марки на хроматографической системе Äkta Explorer при использовании TBS буфера. Фракции пика анализировали с помощью

20 ПАГЭ, и фракции, представляющие легкую и тяжелую цепи Fab, в молярном соотношении 1,1 соединяли и вновь концентрировали путем ультрафильтрации (Amicon) до получения заключительного объема 1 мл. Приблизительно 4 мг Fab A изолировали из 10 л культурального супернатанта *E. coli*.

Аналитическую эксклюзионную хроматографию размеров использовали (Äkta Micro система S75 5/150 колонка, 100 мМ Трис, HCl, pH 7,5) для демонстрации образования

25 комплекса Fab A/TFPI KD2. Таким образом, Fab A, TFPI KD2 и смесь Fab A плюс TFPI KD2 анализировали отдельно (Фигура 1).

### **Пример 3. Кристаллизация и определение рентгеновской структуры комплекса**

30 **TFPI-Fab A**

#### ***Кристаллизация***

Сокристаллы домена Кунитца 2 TFPI и моноклональное антитело Fab A получали при 20°C при использовании способа сидячей капли. Белковый комплекс концентрировали до 9 мг/мл и кристаллизовали путем смешивания равного объема раствора белка и

раствора в ячейке (15% PEG8000, Трис HCl pH 7,5) в качестве преципитанта.

Кристаллы появлялись через один день.

### ***Сбор данных и обработка***

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

### ***Определение структуры и уточнение***

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

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

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

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

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

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

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

<sup>d</sup> 5%-ная тестовая выборка

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

10 **Пример 4. Картирование эпитопа Fab A на основе рентгеновской структуры**  
 Комплекс TFPI-Fab A (Фигура 2) кристаллизовался в виде двух копий комплекса на ассиметрическую единицу. Основные цепи комплексов перекрывались с общим значением среднеквадратического отклонения (RMSD) 0,7 Å с каждым Fab, связанным с ассоциированным TFPI эпитопом. Остатки TFPI в контакте с Fab A (эпитоп) и  
 15 соответствующая углубленная поверхность подвергались анализу при использовании CCP4 программы AREAIMOL (P.J. Briggs (2000) CCP4 Newsletter No. 38). Остатки с минимальным значением 5 Å<sup>2</sup> углубленной поверхности или более чем 50%

углубленной поверхности считались контактными (Таблица 2). Остатки Fab A в контакте с TFPI (паратоп) и соответствующую углубленную поверхность подвергли анализу с помощью AREAIMOL. Остатки с минимальным размером углубленной поверхности  $5 \text{ \AA}^2$  или более чем 50% углубленной поверхности считались контактными (Таблица 3).

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

Номер остатка	Углублен. поверхн. в $\text{\AA}^2$	Углублен. поверхн. в %
Glu C 100	5.6	4.3
Glu C 101	41.0	41.6
Asp C 102	50.1	85.6
Pro C 103	43.9	71.6
Gly C 104	19.1	98.9
Ile C 105	125.9	100.0
Cys C 106	59.1	93.0
Arg C 107	138.6	53.4
Gly C 108	1.5	4.4
Gly C 128	7.7	57.8
Gly C 129	23.2	44.1
Cys C 130	46.2	99.5
Leu C 131	111.5	92.8
Gly C 132	24.5	48.8
Asn C 133	5.5	17.4

10

Номер остатка	Углублен. поверхн. в $\text{\AA}^2$	Углублен. поверхн. в %
Glu N 100	31.3	20.3
Glu N 101	24.5	23.7
Asp N 102	46.7	77.0
Pro N 103	62.9	90.3
Gly N 104	21.5	89.2
Ile N 105	111.7	97.5
Cys N 106	70.2	96.4
Arg N 107	134.3	53.4
Gly N 108	6.0	12.7
Tyr N 109	7.5	4.3
Lys N 126	11.3	7.8
Tyr N 127	0.9	8.7
Gly N 128	11.0	81.4
Gly N 129	28.3	56.8
Cys N 130	42.5	100.0
Leu N 131	125.6	84.9
Gly N 132	27.2	71.7
Asn N 133	34.1	8.2

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

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

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

5

Нелинейный эпитоп, который узнается Fab A, определяется участками Glu100 - Arg109 и Lys126, Gly128 - Asn133. Паратоп в Fab A включает остатки легкой цепи (Ic) Ic\_Tyr37,

lc\_Tyr96, lc\_Asp97, lc\_Ser98, lc\_Tyr99 и lc\_, а также остатки тяжелой цепи (hc) hc\_Asn32, hc\_Ser33, hc\_Ala35, hc\_Ile52, hc\_Tyr54, hc\_Arg56, hc\_Lys58, hc\_Tyr60, hc\_Arg62, hc\_Trp102, hc\_Ser104, hc\_Asp105 и hc\_Trp108. CDR-L3, CDR-H2 и CDR-H3, по-видимому, представляют собой основные сайты взаимодействия на основе количества контактов.

Эпитоп состоит из двух петель, связанных с помощью дисульфидного мостика между Cys106 и Cys130 (Фигура 3). Дисульфидный мостик укладывается напротив hc\_Trp108 CDR-H3, в то время как соседние Ile105 и Leu131 углубляются в гидрофобную впадину, которая образуется hc\_Ala35, hc\_Ile52, hc\_Tyr54 (CDR-H2), hc\_Trp102 (CDR-H3) и lc\_Tyr96, lc\_Ser98, lc\_Tyr99, lc\_Leu101 (CDR-L3). Основываясь на количестве контактов, Ile105 и Leu131 представляют собой ключевые остатки эпитопа в гидрофобном контакте с CDR-L3, CDR-H2 и CDR-H3.

TFPI участок Glu101 - Ile105 взаимодействует с CDR-H2. Граница контакта характеризуется hc\_Tyr54, hc\_Tyr60 и hc\_Arg62. Hc\_Tyr54 демонстрирует полярное взаимодействие с боковой цепью Asp102. Hc\_Tyr60 демонстрирует полярные взаимодействия с карбонильным кислородом основной цепи Glu101, а hc\_Arg62 - с боковой цепью Asp102 и карбонильным кислородом основной цепи Gly132.

Asp102 представляет собой ключевой остаток эпитопа в полярном взаимодействии с CDR-H2 hc\_Tyr54 и hc\_Arg62. Замена hc\_Asp62 дикого типа на аргинин в Fab A приводит к повышению аффинности более чем в 120 раз. Основываясь на рентгеновской структуре, это может объясняться переключением отталкивания между hc\_Asp62 и Asp102 на полярное взаимодействие между hc\_Arg62 и Asp102, и карбонильными кислородами основной цепи.

Группа гуанидина Arg107 непосредственно взаимодействует с боковыми цепями hc\_Asn32 и hc\_Asp105 CDR-H1 и CDR-H3, соответственно. Arg107 был продемонстрирован как такой, который является существенным для ингибирования фактора Ха (M.S. Bajaj и др. (2001) *Thromb Haemost* 86(4): 959-72.). Fab A охватывает этот критический остаток и конкурирует с функцией Arg107 в отношении связывания фактора Ха.

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

Для оценки однородности связывания TFPI эпитопа с помощью оптимизированного варианта Fab A, Fab C, выравнивание последовательность легкой и тяжелой цепей (Фигура 11A) и гомологию моделей Fab C (Фигура 11B) подвергали анализу на

сохранение остатков паратопа Fab A в Fab C. Модели гомологии рассчитывались с помощью DS MODELER (ACCELRYS, Inc; Fiser, A. и Sali A. (2003) *Methods in Enzymology*, 374: 463-493) при использовании нашей рентгеновской структуры TFPI - Fab A в качестве структуры шаблона ввода данных. Модели гомологии показали почти идентичные конформации по сравнению с Fab A со среднеквадратическим отклонением  $< 0,5 \text{ \AA}$ . 20 остатков паратопа наблюдали в комплексе TFPI-Fab A, при этом hc\_Asn32 представляет собой только один остаток паратопа, который отличается в Fab C, где остаток аспартата находится в соответствующем положении (Фигура 11). Hc\_Asn32 взаимодействует с Arg107 TFPI. Asp32 FabC должен взаимодействовать более плотно с TFPI с учетом его карбоксилатной группы и предполагаемого взаимодействия с группой гуанидина Arg107. Основываясь на высокой консервативности последовательности между остатками паратопа Fab A и Fab C и прогнозируемых идентичных конформациях, Fab C, вероятно, узнается тем же эпитопом TFPI, что и Fab A.

15

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

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

25

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

***Экспрессионная система***

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

30

ДНК конструкцию, которая кодирует сайт расщепления TEV протеазы, сливали с N-терминальным концом доменов Кунитца 1 + 2 (от Asp1 до Phe154, ссылочный номер

Uniprot 10646, зрелый TFPI альфа), и сайты присоединений Gateway (attB1-5#, attB2-3#, Invitrogen) клонировали в pD Eco5 N вектор, что приводило к получению экспрессионного вектора, обозначенного как pD Eco5 N TFPI KD1+2. Использованный экспрессионный штамм представлял собой BL21 DE3 (Novagen).

5

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

Последовательность 699 AA; 78579 MB; 4D2932FF7C1E3F7E CRC64;

MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 10 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES  
 VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE  
 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGALFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN  
 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM  
 15 TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL  
 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSDYDIPTTE  
 NLYFQDSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN IFTRQCEEFI  
 YGGCEGNQNR FESLEECKM CTRDNANRII KTTLQQEKPD FCFLEEDPGI CRGYITRYFY  
 20 NQQTKQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

***Компоненты последовательности***

His 10 метка: MGHHHHHHHH HH

25 NusA метка: SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY  
 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL  
 GDYVEDQIES  
 VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN  
 ISLDLGNNAE  
 30 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGALFVTR SKPEMLIELF  
 RIEVPEIGEE  
 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE  
 RIDIVLWDDN  
 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS  
 35 QLSGWELNVM  
 TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM  
 KELLEIEGLD  
 EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA  
 ARGVCTLEDL

AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDE

Линкер/транслируемые сайты рестрикции эндонуклеазы: TSGS GLE

Транслируемый att-сайт: TSLYKKA GS

5

TEV сайт: DYDIPTTENLYFQ

TFPI Кунитца 1+2 DSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN  
IFTRQCEEFI

10

YGGCEGNQNR FESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQKEKPD FCFLEEDPGI  
CRGYITRYFY

NQQTQQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

### Экспрессия

15 Штамм BL21 DE3, трансформированный с помощью pD Eco5 N *TFPI KDI+2*,  
выращивали как пре-культуру в среде LB 2 x 100 мл с 200 мкг/мл ампициллина в  
течение 14 часов при 37°C при скорости вращения 180 об./мин.. Биореактор (Sartorius  
Stedim Biotech) с объемом культуры 10 л (LB среда, 200 мкг/мл ампициллина)  
инокулировали с помощью 200 мл пре-культуры и инкубировали при 37°C при  
20 скорости вращения 150 об./мин. При оптической плотности культуры OD600  
прибавляли IPTG до получения заключительная концентрации 100 мМ для индукции  
гена и дополнительно культивировали при 17°C в течение 24 часов с минимальным  
уровнем pO<sub>2</sub> 50% и при скорости вращения 180 – 800 об./мин. *E. coli* осаждали путем  
центрифугирования (3000 g, 10 минут) и хранили при -80°C.

### 25 Очистка

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

Отцентрифугированную фракцию лизата использовали для начального этапа ИМАС  
хроматографии на колонке, содержащей 50 мл Ni-сефарозного HP матрикса (GE).  
Уравновешивание, связывание слитого белка и промывание Ni-Trap-Sepharose HP  
35 матрикса осуществляли при использовании Буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 8,0, 300 мМ  
NaCl, 40 мМ имидазола). Для элюирования NusA-TFPI слитого белка использовали

линейный градиент имидазола от 40 до 500 мМ в Буфере В (50 мМ Трис-НСl рН 8,0, 150 мМ NaCl). Соединяли фракции элюирования (общий объем 140 мл) и наносили в виде фракций на обессоливающую колонку Ni Prep 26/10 (GE) (две соединенные колонки) для замены Буфера на 50 мМ Трис HCl рН 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>).

5 Для удаления метки Nus A осуществляли протеолитическое переваривание с помощью меченного His<sub>6</sub> TEV при соотношении фермента к слитому белку 1:66 вес./вес. в течение 16 часов при 4°C. Образец снова наносили на колонку, содержащую 50 мл Ni-сефарозного HP матрикса (GE) для отделения свободного TFPI от нерасщепленного слитого белка и His-TEV. Элюат этапа ИМАС потом использовали для эксклюзионной  
10 хроматографии размеров, SEC (S100, GE) для изоляции фракции мономерного TFPI, которую концентрировали путем ультрафильтрации (Amicon, единица с интервалом отсечением 3 кДа) до получения концентрации приблизительно 1,5 мг/мл. Очищенный заключительный образец домена Кунитца 1 + 2 TFPI разгоняли как двойную полосу ПАГЭ с кажущимся молекулярным весом приблизительно 18 кДа. Дополнительный  
15 анализ (SEC, вестерн-блоттинг) выявил, что только один белок, который соответствовал верхней полосе, был иммунореактивным по отношению к Fab В.

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

#### ***Экспрессия***

20 Fab В подвергали протеолизу из человеческой формы IgG1. Fab В\_IgG1 экспрессировали в клетках млекопитающих (HEK 293) как белок секреции. Для изоляции IgG1 1,6 л культурального супернатанта наносили на соединенные между собой колонки NiTrap MabSelectSuRE (от GE, объем слоя 5 мл, скорость истечения 1,5 мл/мин., 4°C, в течение 16 часов). Для промывания и уравнивания колонки  
25 использовали буфер, состоящий из PBS и 500 мМ NaCl. Элюировали связанный IgG1 (50 мМ Na-ацетата, 500 мМ NaCl рН 3,5, после чего использовали тот же буфер с рН 3,0), нейтрализовали (2,5 М Трис > 11) и концентрировали при использовании ультрафильтрации до концентрации приблизительно 13 мг/мл.

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

Переваренный образец вновь применяли к двум соединенным колонкам HiTrap MabSelectSuRe (2 x 5 мл), которые позволяют осуществлять разделение Fc и Fab материала. Соединенные изолированные фракции Fab В концентрировали с помощью ультрафильтрации до концентрации приблизительно 8 мг/мл (общий выход 120 мг).

5 Дополнительно для дальнейшей очистки, использовали эксклюзионную хроматографию размеров с помощью Superdex75 (колонка 26/60, скорость истечения 2,5 мл/мин. при использовании PBS). После дополнительной концентрации и стерильной фильтрации заключительный выход Fab В составлял 115 мг при концентрации 8,5 мг/мл.

10 Аналитическую эксклюзионную хроматографию размеров (система Äkta Micro, S75 5/150 колонка, 100 mM Трис HCl, pH 7,5) использовали для демонстрации образования комплекса Fab В/TFPI KD1+2 (Фигура 5). Для Fab В наблюдали неожиданно длительное время удержания на колонке SEC, что соответствовало кажущейся молекулярной массе 20 кДа, которая была подобной молекулярному массе,  
15 определенной для TFPI KD1+2.

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

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

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

##### ***Кристаллизация***

Сокристаллы белковой конструкции, которая включает TFPI - домен Кунитца 1 (KD1), домен Кунитца 2 (KD2) и моноклональное TFPI антитело Fab В выращивали при 4°C при использовании способа сидячей капли. Белковый комплекс концентрировали до

концентрации 10 мг/мл и кристаллизовали путем смешивания равного объема раствора белка и раствора в ячейке (20% PEG8000) в качестве преципитанта. Кристаллы появлялись через три дня.

## 5 ***Сбор данных и обработка***

Кристаллы быстро замораживали в жидком азоте с 30% глицерином в кристаллизационном буфере для криозащиты. Данные собирали при использовании канала синхротронного излучения BL14.1, BESSY синхротрон (Berlin) на MAR CCD детекторе. Данные индексировали и обобщали при использовании XDS (W. Kabsch (2010) Acta Cryst. D66, 125-132) или IMOSFLM (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography (1994) Acta Cryst. D50, 760-763; A.G.W. Leslie, (1992), Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26), подготавливали для вычисления с помощью POINTLESS (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82), и масштабировали при использовании SCALA (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82). Кристаллы, дифрагированные вплоть до 2,3 Å, имели пространственную группу P2<sub>1</sub> с константами ячеек  $a=80,3$ ,  $b=71,9$ ,  $c=108,8$ ;  $\beta=92,5^\circ$  и двумя TFPI-KD1, -KD2 - Fab комплексами в ассиметричной единице.

### ***Определение структуры и уточнение***

Совместные структуры TFPI-KD1, -KD2 и Fab моноклонального антитела разрешали с помощью молекулярного замещения при использовании PHASER (A.J. McCoy и др. (2007) J. Appl. Cryst. 40, 658-674) и публиковали рентгеновские структуры TFPI-KD2 (pdb код 1tfx) и Fab фрагмента (pdb код 1w72) в качестве исследовательских моделей. Перед проведением молекулярного замещения Fab и KD1 модели модифицировали с помощью CHAINSAW (N. Stein, (2008) J. Appl. Cryst. 41, 641 - 643). Итеративные циклы построения модели при использовании COOT (P. Emsley и др. (2010) Acta Cryst. D66:486-501) и определение максимальной правдоподобности уточнения при использовании REFMAC5.5 (G.N. Murshudov и др. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255) завершали построение модели. Участки hc\_Ser131 - hc\_Ser136 оба из Fab, остатки TFPI Asp1 - Leu21, Asp149 - Phe154 и KD1 - KD2 линкерные остатки Arg78 - Glu92 продемонстрировали слабую электронную плотность и не были включены в модель. Набор данных и статистика уточнения являются подытоженными в Таблице 4.

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

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

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

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

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

<sup>d</sup> 5%-ная тестовая выборка

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

10

### Пример 11. Картирование эпитопа на основе рентгеновской структуры

Комплекс TFPI-KD1, -KD2 и Fab B (Фигура 6) кристаллизовался в виде двух копий комплекса на ассиметрическую единицу. Основные цепи комплексов перекрывались со

значением среднеквадратического отклонения (RMSD) 1,0 Å с каждым Fab В, связанным с эпитопом ассоциированного TFPI-KD1 и -KD2. Оба домена Кунитца взаимодействовали непосредственно или посредством опосредованных водой взаимодействий с Fab В. KD1 и KD2 также взаимодействовали друг с другом. Остатки TFPI в контакте с Fab В (эпитоп) и соответствующая углубленная поверхность подвергались анализу при использовании CCP4 программы AREAIMOL (P.J. Briggs (2000) CCP4 Newsletter No. 38). Остатки с минимальным значением 5 Å<sup>2</sup> углубленной поверхности или более чем 50% углубленной поверхности считались контактными (Таблица 6).

10

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

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

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

15

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

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

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

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Leu A 27	1.8	39.1
Arg A 28	20.7	13.5
Asn A 29	44.6	38.6
Tyr A 30	56.0	57.7
Tyr A 31	96.9	76.7
Tyr A 48	43.0	75.8
Tyr A 49	39.2	90.7
Asp A 50	16.5	56.7
Asn A 52	10.3	16.8
Pro A 54	10.4	34.2
Ser A 55	5.0	3.9
Asn A 65	6.3	13.4
Trp A 90	19.2	45.9
Asp A 92	13.6	10.2
Gly A 93	8.7	37.8
Gln B 1	12.6	6.8
Gly B 26	29.6	58.6
Phe B 27	21.1	57.9
Thr B 28	56.9	65.0
Arg B 30	32.0	19.2
Ser B 31	52.2	65.9
Tyr B 32	54.0	94.9
Arg B 52	8.0	6.2
Arg B 98	7.0	49.2
Tyr B 100	92.2	98.6
Arg B 101	106.6	71.6
Tyr B 102	80.2	79.4
Trp B 103	21.7	87.7
Asp B 105	15.3	42.6
Tyr B 106	13.7	15.2

Номер остатка	Углубл. поверхн. в Å <sup>2</sup>	Углубл. поверхн. в %
Leu L 27	4.2	61.7
Arg L 28	22.2	15.5
Asn L 29	43.0	33.6
Tyr L 30	58.2	67.3
Tyr L 31	103.4	80.3
Tyr L 48	48.7	83.8
Tyr L 49	37.5	88.8
Asp L 50	15.5	59.1
Asn L 52	8.6	14.8
Pro L 54	12.9	45.4
Ser L 55	9.8	8.0
Asn L 65	3.9	7.7
Gly L 67	0.1	0.3
Trp L 90	20.3	48.3
Asp L 92	1.9	1.5
Gly L 93	18.4	49.4
Val M 2	1.6	4.3
Gly M 26	34.2	62.2
Phe M 27	18.2	62.1
Thr M 28	64.4	69.7
Arg M 30	27.1	18.8
Ser M 31	51.5	63.7
Tyr M 32	55.3	95.3
Arg M 52	7.4	6.2
Arg M 98	8.5	57.0
Tyr M 100	86.9	98.3
Arg M 101	110.8	74.4
Tyr M 102	82.8	81.0
Trp M 103	18.5	91.1
Asp M 105	17.3	48.7
Tyr M 106	13.5	15.0

Fab В узнавал нелинейный эпитоп KD1 и KD2, который определяется остатками Asp31 - Lys36, Cys59 (который формирует дисульфидный мостик с Cys35), Glu60 и Asn62

5 TFPI-KD1 и Glu100, Glu101, участком Pro103 - Cys106 (который формирует дисульфидный мостик с Cys130), остатками Arg107 - Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124 и остатками Lys126 - Gly128 TFPI-KD2. Паратоп в Fab В, который взаимодействует с TFPI-KD1, включает lc\_Leu27 - lc\_Tyr31, lc\_Asp50, lc\_Asn65, lc\_Trp90, lc\_Asp92, lc\_Gly93, а также hc\_Arg101 и hc\_Tyr102. Паратоп в Fab В, который

10 взаимодействует с TFPI-KD2, включает lc\_Tyr31, lc\_Tyr48 и lc\_Tyr49, а также hc\_Thr28, hc\_Arg30 - hc\_Tyr32, hc\_Tyr100, hc\_Arg101, hc\_Trp103 и hc\_Asp105. CDR легкой цепи, как выяснилось, представляют собой основные сайты взаимодействия для TFPI-KD1, CDR тяжелой цепи, как выяснилось, представляют собой основные сайты взаимодействия для TFPI-KD2, на основе количества контактов.

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

5 Pro34 лежит в гидрофобной выемке, которая образуется lc\_Tyr30 и lc\_Tyr31 CDR-L1, lc\_Trp90 CDR-L3 и hc\_Tyr102 CDR-H3. Asp31 и Asp32 имеют полярное взаимодействие с CDR-H3 и сетью гидрофобной связи с hc\_Arg101, hc\_Tyr10, и молекулой воды. Боковая цепь Hc\_Tyr102 является хорошо ориентированной для того, чтобы создавать гидрофобное взаимодействие с Pro34, полярное взаимодействие с Asn31 и ароматическое  $\pi$ - $\pi$  взаимодействие с lc\_Trp90 CDR-L3.

10 Взаимодействие между Asp31 и Asp32 с CDR-H3 представляет собой ключевую характеристику эпитопа, и ориентации и взаимодействия hc\_Tyr102 и hc\_Arg101 являются критическими. Мутация остатка дикого типа hc\_Lys99 на лейцин приводила к 20-кратному повышению аффинности. Hc\_Leu99 располагается на границе гидрофобного взаимодействия между легкой и тяжелой цепью, после чего следует CDR-H3 петля. Полярная и гибкая боковая цепь лизина представляет собой недостаток в этом положении и препятствует образованию оптимальной конформации CDR-H3 и антигенным взаимодействиям.

15 Glu60, который формирует второй угол полярного треугольника, взаимодействует с боковыми цепями lc\_Tyr30 (CDR-L1), lc\_Trp90 и с азотом главной цепи lc\_Gly93 (CDR-L3).

20 Третий угол треугольника формируется с помощью Lys36. Lys36 представляет собой существенный остаток для ингибирования комплекса фактор VIIa/тканевой фактор с помощью TFPI (M.S. Vajaj и др. (2001) *Thromb Haemost* 86(4): 959-72.). В комплексе с Fab B, Lys36 существенно контактирует и прикрывается CDR-L1 lc\_Leu27, lc\_Arg28, lc\_Asn29, lc\_Tyr31, CDR-L2 lc\_Asp50 и молекулой воды. Взаимодействие Lys36 с комплексом фактор VIIa/тканевой фактор при связывании с Fab B и его ингибирование, как выяснилось, исключается.

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

Glu100, Glu101, Arg107 и Tyr109 представляют собой ключевые остатки эпитопа, которые обеспечивают сильные полярные или гидрофобные якорные точки в контакте

с тремя отдельными поверхностными участками Fab B, которые создаются CDR-H1 (взаимодействие с Glu100 и Glu101), CDR-L1, -L2, -H3 (взаимодействие с Arg107), и CDR-L2, -H3 (взаимодействие с Tyr109).

Arg107 в значительной степени контактирует с lc\_Tyr31, lc\_Tyr49, hc\_Arg101 и

5 hc\_Tyr102 CDR-L1, -L2, -H3, соответственно, и дополнительно взаимодействует с Gly33 и Cys35 KD1. Arg107 был продемонстрирован как существенный для

ингибирования фактора Ха (M.S. Vajaj и др. (2001) *Thromb Haemost* 86(4): 959-72.). Fab B охватывает этот критический остаток и исключает функцию Arg107 в ингибировании фактора Ха.

10 Glu100 и Glu101 образуют водородную связь с остатками hc\_Arg30, hc\_Ser31, и hc\_Thr28 и hc\_Tyr32 CDR-H1.

Tyr109 лежит в гидрофобной нише, которая образуется CDR-L2 lc\_Tyr48, и CDR-H3 остатками hc\_Tyr100 и hc\_Trp103, и формирует водородную связь с hc\_Asp105.

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

Для оценки однородности связывания TFPI эпитопа с помощью оптимизированного варианта Fab B, Fab D, анализировали выравнивание последовательностей легкой и тяжелой цепей (Фигура 12A) и модели гомологии Fab D (Фигура 12B) для сохранения

20 остатков паратопа Fab B в Fab D. Модели гомологии рассчитывали с помощью DS MODELER (ACCELRYN, Inc; Fiser, A. и Sali A. (2003) *Methods in Enzymology*, 374: 463-493) при использовании нашей рентгеновской структуры TFPI - Fab B в качестве

структуры шаблона. Модели гомологии показали почти идентичные конформации скелетов по сравнению с Fab B со значением RMSD < 0,5 Å. Из 29 остатков паратопа,

25 которые наблюдали в TFPI-Fab B комплексе, семь остатков (пять остатков легкой цепи, два остатка тяжелой цепи) отличались в Fab D (Фигура 12). Lc\_Arg28; lc\_Asn29,

lc\_Asp92 и lc\_Gly93 показали взаимодействия основной цепи с остатками TFPI эпитопа.

Замены этих остатков в Fab D не предполагались как такие, которые индуцируют

связывание с отличным эпитопом TFPI. Заменой lc\_Tyr48 и hc\_Gln1 фенилаланином и

30 глутаматом в Fab D пренебрегали, поскольку не наблюдали никаких взаимодействий полярной боковой цепи в рентгеновской структуре. Hc\_Arg30 продемонстрировал

полярное взаимодействие с Glu100 TFPI и заменялся на серин в Fab D. В этом

положении аргинин был бы более предпочтительным по сравнению с серином для взаимодействия с TFPI. Основываясь на ожидаемом влиянии проанализированных

замен между остатками Fab B и Fab D паратопа, общее сохранение последовательности и низкое значение RMSD модели гомологии Fab D, Fab D рассматривался для узнавания того же TFPI эпитопа, что и Fab B.

5 **Пример 13 Объяснение, которое основывается на рентгеновской структуре, для ингибирования взаимодействия TFPI с фактором Ха и комплексом фактора VIIa/тканевого фактора**

Fab B связывается как с KD1, так и KD2 TFPI. KD2 связывает и ингибирует фактор Ха. KD1 связывает и ингибирует комплекс фактора VIIa/тканевого фактора. Была описана  
 10 рентгеновская структура KD2 в комплексе с трипсином (M.J. Burgering и др. (1997) J Mol Biol. 269(3): 395-407), и BPTI в комплексе с внеклеточной частью TF и фактора VIIa (E. Zhang и др. (1999) J Mol Biol 285(5): 2089-104.). Трипсин представляет собой заменитель для фактора Ха, BPTI является гомологом TFPI-KD1. Перекрывание комплекса TFPI-Fab B либо с KD2-трипсин, либо с BPTI-фактор VIIa/тканевой фактор  
 15 выявило, что связывание антитела исключает связывание KD1 и KD2 с их природными лигандами фактором VIIa/тканевым фактором и фактором Ха, соответственно (Фигура 9, Фигура 10).

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

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Байер Хелфкеа ЛЛК
- 5 <120> Моноклональные антитела против ингибитора пути тканевого фактора (TFPI)
- <130> ВНС 11 5 001
- 10 <160> 9
- <170> PatentIn версия 3.5
- 15 <210> 1  
<211> 276  
<212> Белок  
<213> Homo Sapiens
- 20 <400> 1
- Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu  
1 5 10 15
- 25 Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp  
20 25 30
- 30 Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr  
35 40 45
- 35 Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn  
50 55 60
- 40 Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn  
65 70 75 80
- 45 Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe  
85 90 95
- 50 Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg  
100 105 110
- 55 Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly  
115 120 125
- 60 Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys  
130 135 140
- Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly  
145 150 155 160
- 60 Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys

5 Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro  
 180 185 190

10 Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn  
 195 200 205

15 Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly  
 210 215 220

20 Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys  
 225 230 235 240

25 Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys  
 245 250 255

30 Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe  
 260 265 270

35 Val Lys Asn Met  
 275

<210> 2  
 <211> 219  
 <212> Белок  
 <213> Homo Sapiens

40 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

45 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Ser  
 20 25 30

50 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

55 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

60 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 85 90 95

Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                  105                  110

5

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
           115                  120                  125

10

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
       130                  135                  140

15

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145                  150                  155                  160

20

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
                   165                  170                  175

25

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
           180                  185                  190

30

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
           195                  200                  205

35

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ala  
       210                  215

<210> 3  
 <211> 225  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

40

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1                  5                  10                  15

45

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
           20                  25                  30

50

Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu  
           35                  40                  45

55

Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Arg Tyr Ala  
       50                  55                  60

60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 65                  70                  75                  80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

5 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Ser Asp Lys His Trp Gly Phe Asp Tyr  
 100 105 110

10 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

15 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

20 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160

25 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

30 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

35 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

40 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

45 Ser  
 225

50 <210> 4  
 <211> 212  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 4

60 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

65 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Asn Tyr Tyr Ala  
 20 25 30

70 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Tyr  
 35 40 45

75 Tyr Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

5

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Asp Gly Val Pro Val  
 85 90 95

10

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala  
 100 105 110

15

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn  
 115 120 125

20

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val  
 130 135 140

25

Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu  
 145 150 155 160

30

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser  
 165 170 175

35

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser  
 180 185 190

40

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro  
 195 200 205

Thr Glu Cys Ser  
 210

45

<210> 5  
 <211> 224  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

50

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

55

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

60

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Arg Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val



Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

5

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

10

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 85 90 95

15

Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

20

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125

25

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

35

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

40

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190

45

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205

50

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

55

<210> 7  
 <211> 225  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

60

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp  
 20 25 30

Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

	35		40		45														
5	Trp	Leu	Gly	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Ala			
	50						55					60							
10	Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn			
	65					70					75					80			
15	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val			
					85					90					95				
20	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	His	Ser	Asp	Lys	His	Trp	Gly	Phe	Asp	Asp			
				100					105					110					
25	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly			
			115					120						125					
30	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser			
		130					135					140							
35	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val			
	145					150					155					160			
40	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe			
					165					170					175				
45	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val			
				180					185					190					
50	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val			
			195					200						205					
55	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys			
	210						215							220					
60	Cys																		
	225																		
	<210>	8																	
	<211>	212																	
	<212>	Белок																	
	<213>	Homo sapiens																	
	<400>	8																	
60	Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln			
	1				5					10					15				

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Lys Tyr Tyr Ala  
 20 25 30  
 5  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Phe  
 35 40 45  
 10  
 Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 15  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80  
 20  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Trp Ser Ser Thr Pro Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala  
 100 105 110  
 25  
 Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn  
 115 120 125  
 30  
 Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val  
 130 135 140  
 35  
 Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu  
 145 150 155 160  
 40  
 Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser  
 165 170 175  
 Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser  
 180 185 190  
 45  
 Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro  
 195 200 205  
 50  
 Thr Glu Cys Ser  
 210  
 55  
 <210> 9  
 <211> 219  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 60  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп  
5 включает один или более остатков, выбранных из группы, которая состоит из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO:1.
- 10 2. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 1, где указанный эпитоп включает остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO:1.
3. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 1, где  
15 указанный эпитоп включает остаток Ile105 и Asp102 последовательности SEQ ID NO:1.
4. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 1, где  
20 указанный эпитоп включает остаток Ile105, Asp102 и Leu131 последовательности SEQ ID NO:1.
5. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктами 2-4, где  
эпитоп дополнительно включает один или более остатков, выбранных из группы,  
которая состоит из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Cys106, Arg107, Gly108,  
Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133  
25 последовательности SEQ ID NO:1.
6. Изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом  
ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп  
включает две аминокислотные петли, связанные дисульфидным мостиком между  
30 остатками Cys106 и Cys130 последовательности SEQ ID NO:1.
7. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 6, где  
указанный эпитоп дополнительно включает один или более остатков, выбранных из  
группы, состоящей из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106,

Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO:1.

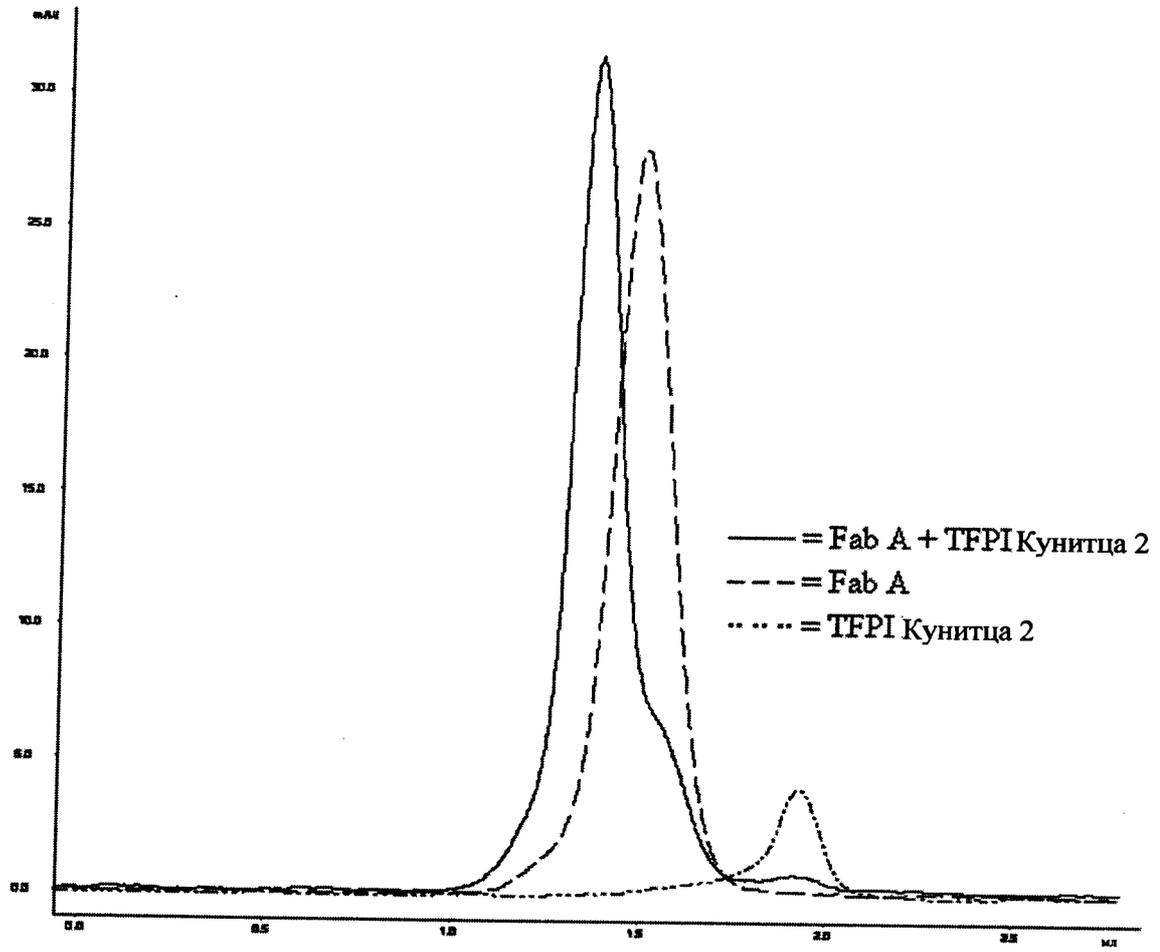
- 5 8. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 7, где указанный эпитоп включает остаток Ile105 последовательности SEQ ID NO:1.
9. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктами 7, где эпитоп включает остаток Asp102 последовательности SEQ ID NO:1.
- 10 10. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 7, где эпитоп включает остаток Leu131 последовательности SEQ ID NO:1.
- 15 11. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 8-10, где эпитоп дополнительно включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 и Asn133 последовательности SEQ ID NO:1.
- 20 12. Изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп включает один или более остатков домена Кунитца 1 и один или более остатков домена Кунитца 2.
- 25 13. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 12, где остаток домена Кунитца 1 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62.
- 30 14. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 13, где остаток домена Кунитца 1 включает остаток Pro34.
15. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 13, где остатки домена Кунитца 1 включают остатки Pro34 и Glu60.

16. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 13, где остатки домена Кунитца 1 включают остатки Pro34, Lys36 и Glu60.
- 5 17. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с любым из пунктов 14-16, где остатки домена Кунитца 1 включают один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Asp31, Asp32, Gly33, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62.
- 10 18. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 12, где остаток домена Кунитца 2 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128.
- 15 19. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 18, где остаток домена Кунитца 2 включает остаток Arg107.
- 20 20. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 18, где остаток домена Кунитца 2 включает остаток Glu101.
- 25 21. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 18, где остаток домена Кунитца 2 включает остаток Tyr109.
- 30 22. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с любым из пунктов 19-21, где остатки домена Кунитца 2 дополнительно включают один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128.
- 30 23. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 12, где остаток домена Кунитца 1 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62, и где остаток домена Кунитца 2 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128.

24. Изолированное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO:1), где указанный эпитоп включает две аминокислотные петли, связанные с помощью дисульфидного мостика между остатками Cys35 и Cys59 последовательности SEQ ID NO:1.
- 5
25. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 24, где указанный эпитоп дополнительно включает один или более остатков домена Кунитца 1 и один или более остатков домена Кунитца 2.
- 10
26. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 25, где остаток домена Кунитца 1 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62.
- 15
27. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 25, где остаток домена Кунитца 2 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128.
- 20
28. Изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 22, где остаток домена Кунитца 1 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 и Asn62 и где остаток домена Кунитца 2 включает один или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 и Gly128.
- 25
29. Изолированное моноклональное антитело, которое связывается с TFPI, где изолированное моноклональное антитело является конкурирующим с любым из изолированных моноклональных антител в соответствии с пунктами 1 - 28 для связывания с TFPI.
- 30
30. Изолированное биспецифическое антитело, которое связывается с TFPI, где биспецифическое антитело является конкурирующим с любым из изолированных моноклональных антител в соответствии с пунктами 1 - 28 для связывания с TFPI.

31. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество моноклонального антитела в соответствии с любым из пунктов 1-30 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 5 32. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество, по крайней мере, двух моноклональных антител в соответствии с любым из пунктов 1-30 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 10 33. Фармацевтическая композиция в соответствии с пунктом 32, где первое моноклональное антитело включает изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 1, а второе моноклональное антитело включает изолированное моноклональное антитело в соответствии с пунктом 12.
- 15 34. Способ лечения генетических или приобретенных дефицитов или пороков коагуляции, который включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с любым из пунктов 30-32 пациенту.
35. Способ в соответствии с пунктом 34, где способ лечит гемофилию А, В или С.
- 20 36. Способ сокращения времени кровотечения, который включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с любым из пунктов 31-33 пациенту.
- 25 37. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, которое связывается с эпитопом ингибитора пути тканевого фактора человека (SEQ ID NO: 1), кодирующая указанное изолированное моноклональное антитело в соответствии с любым из пунктов 1-29.

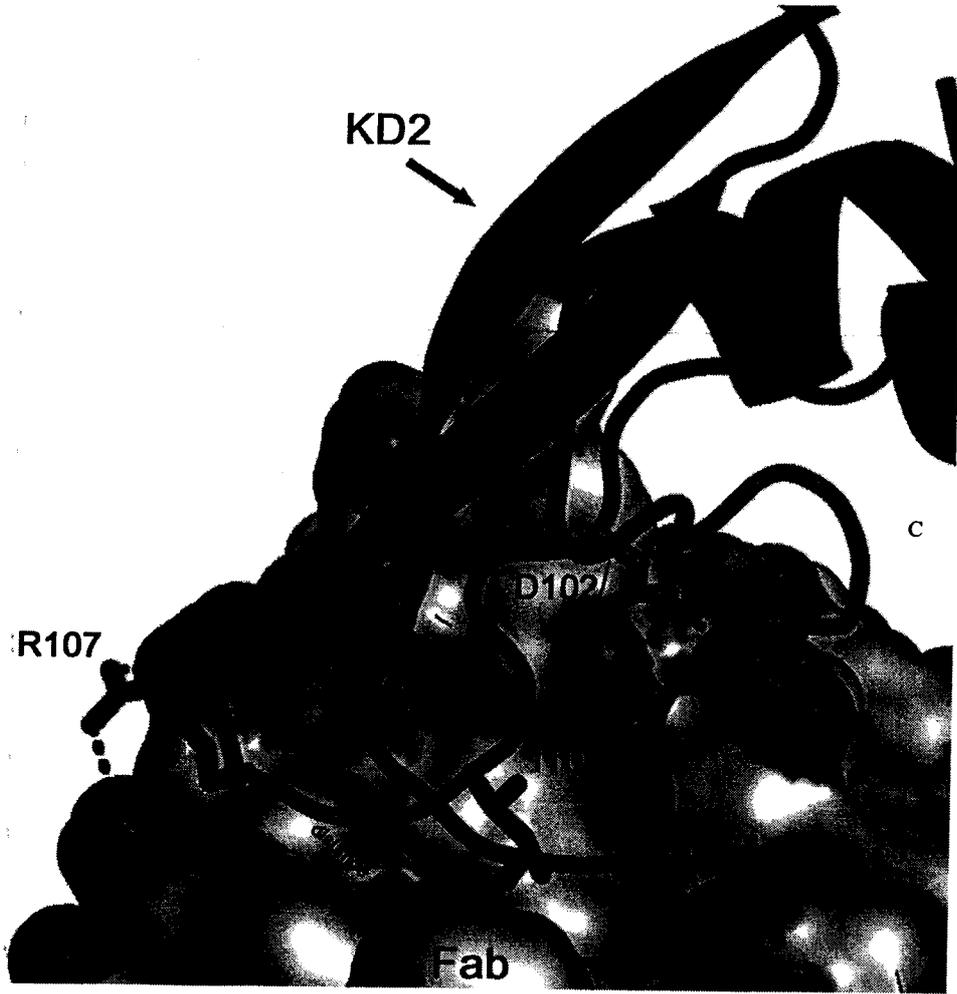
Фигура 1



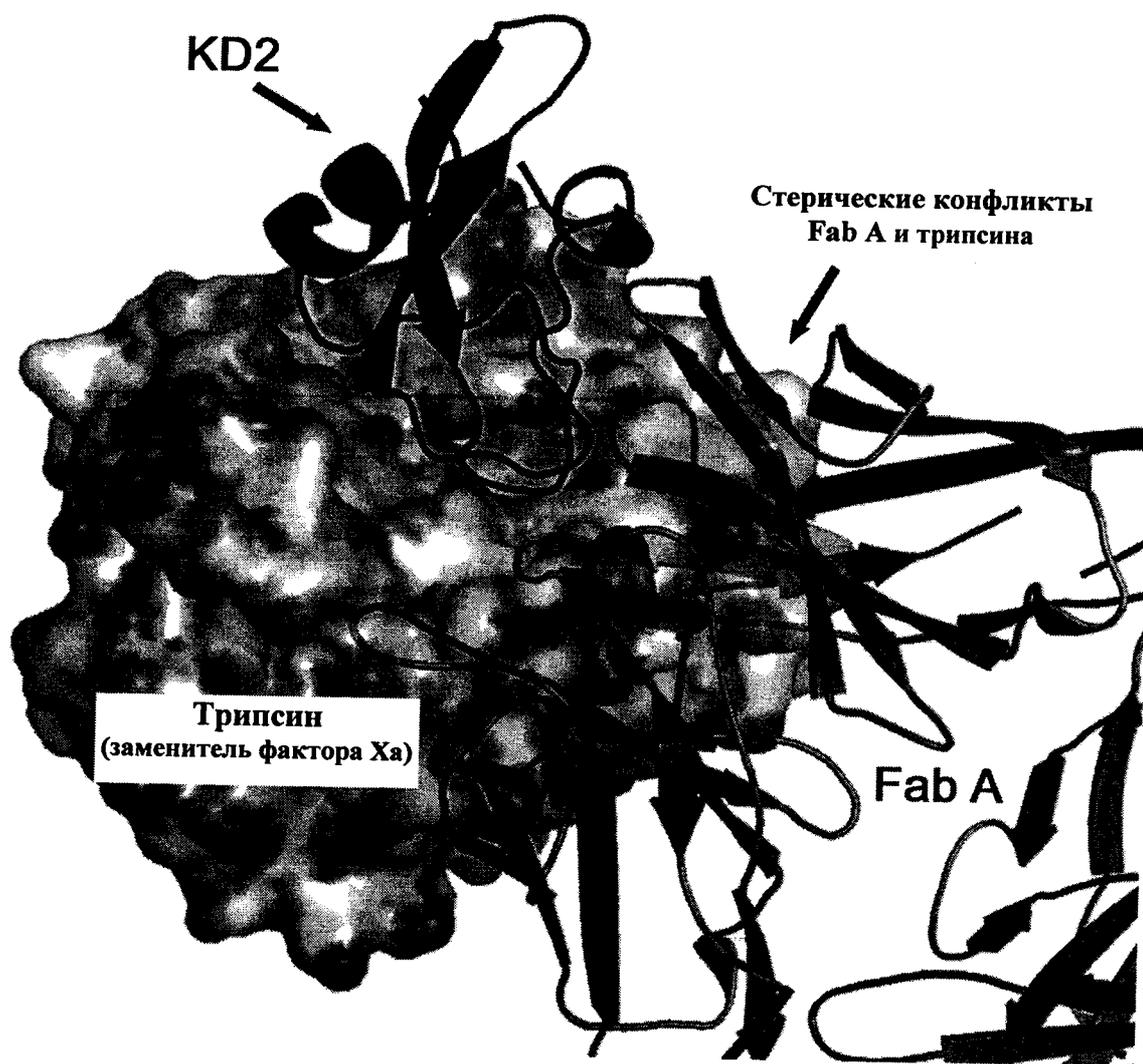
Фигура 2



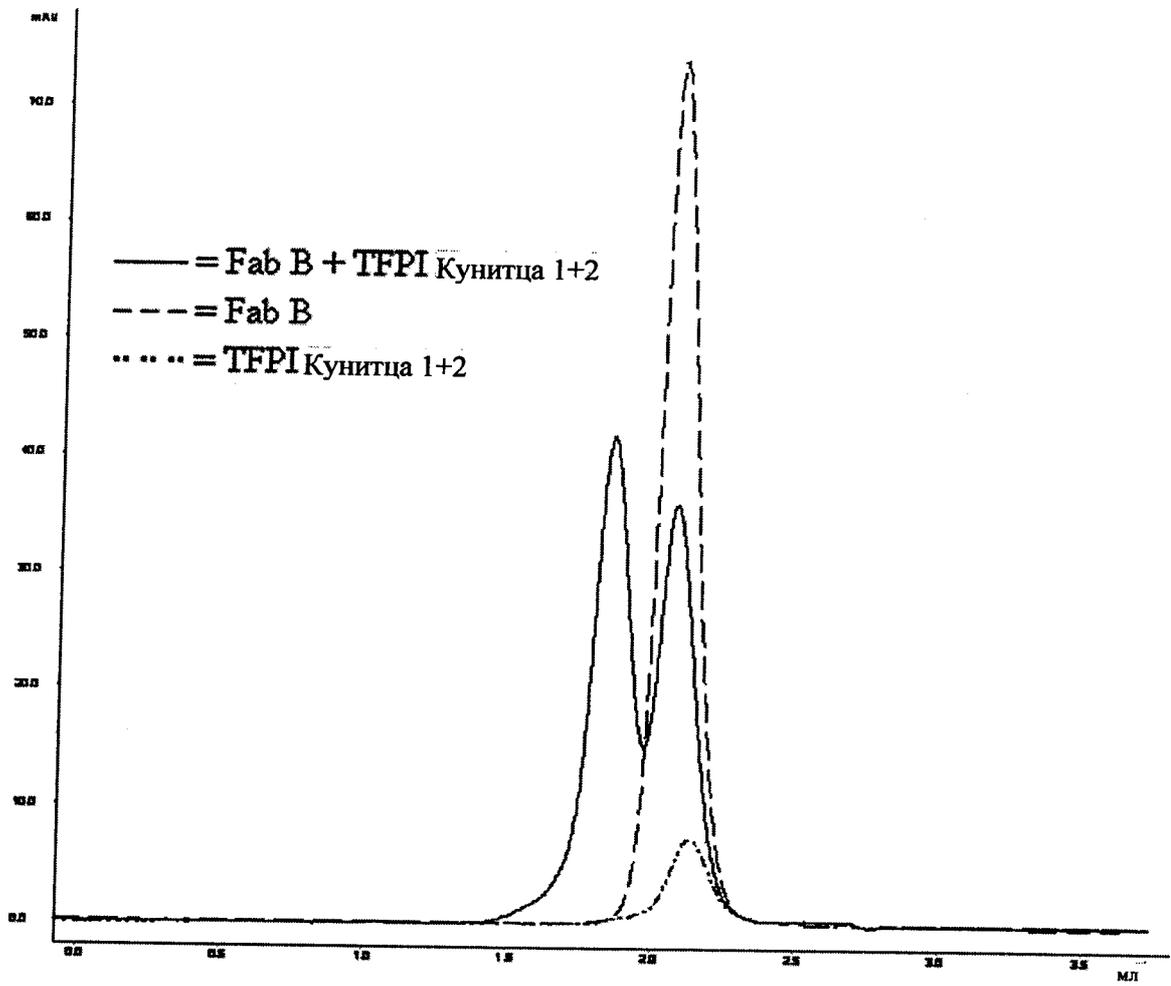
Фигура 3

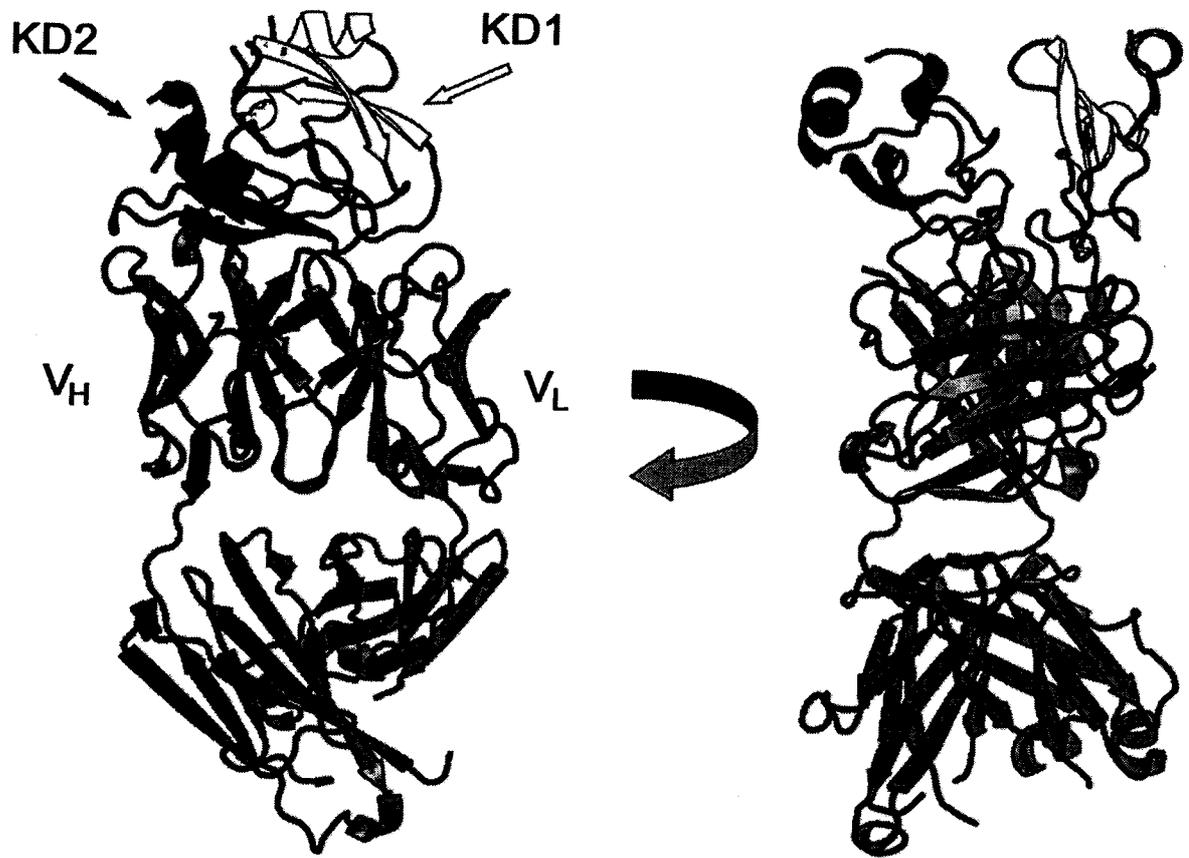


Фигура 4



Фигура 5

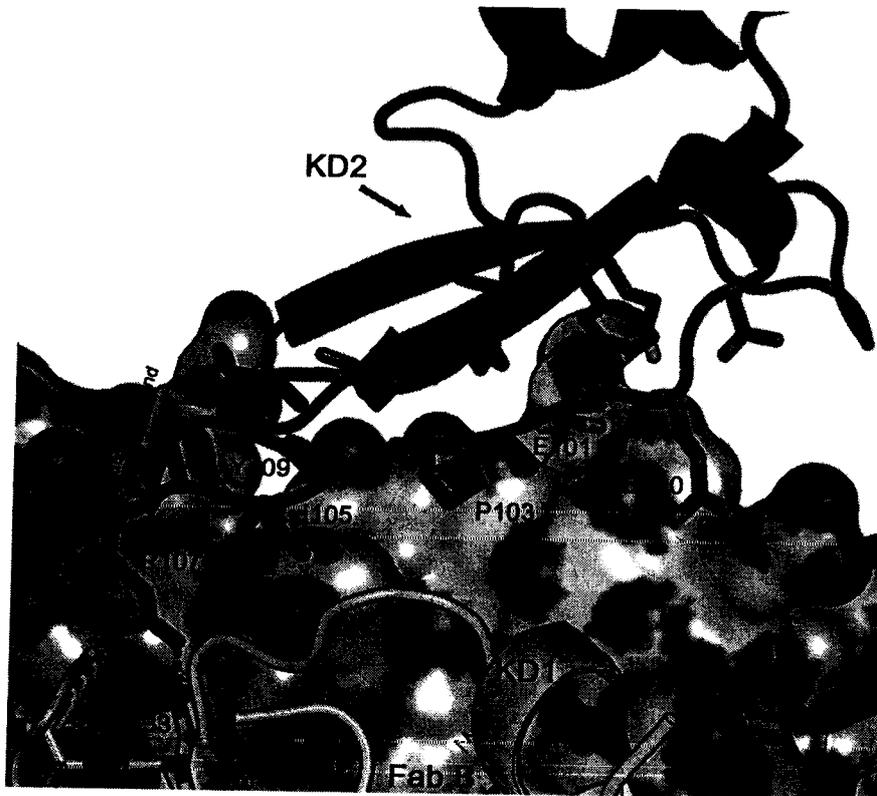
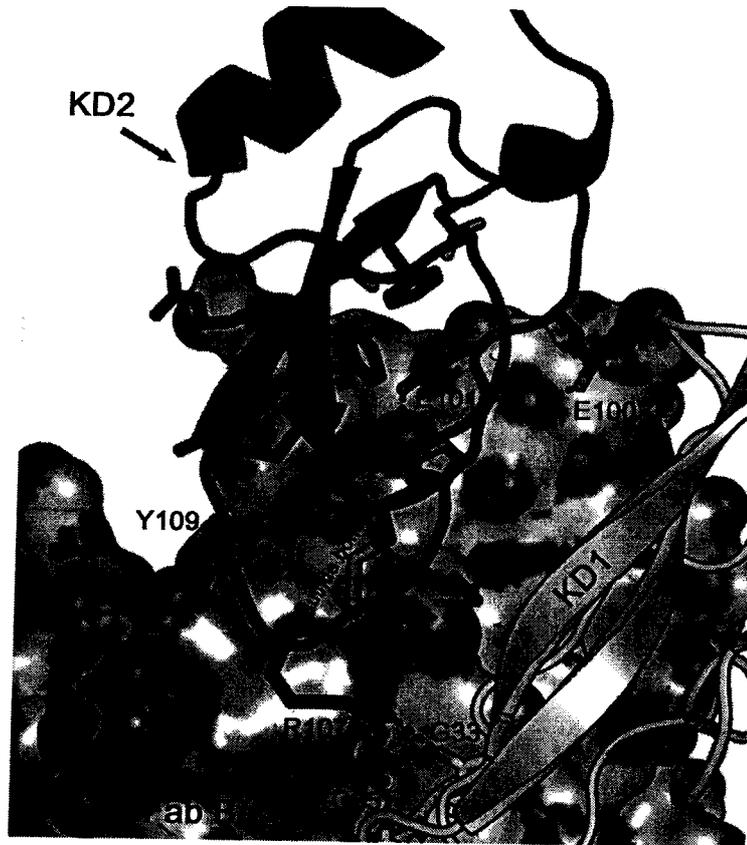




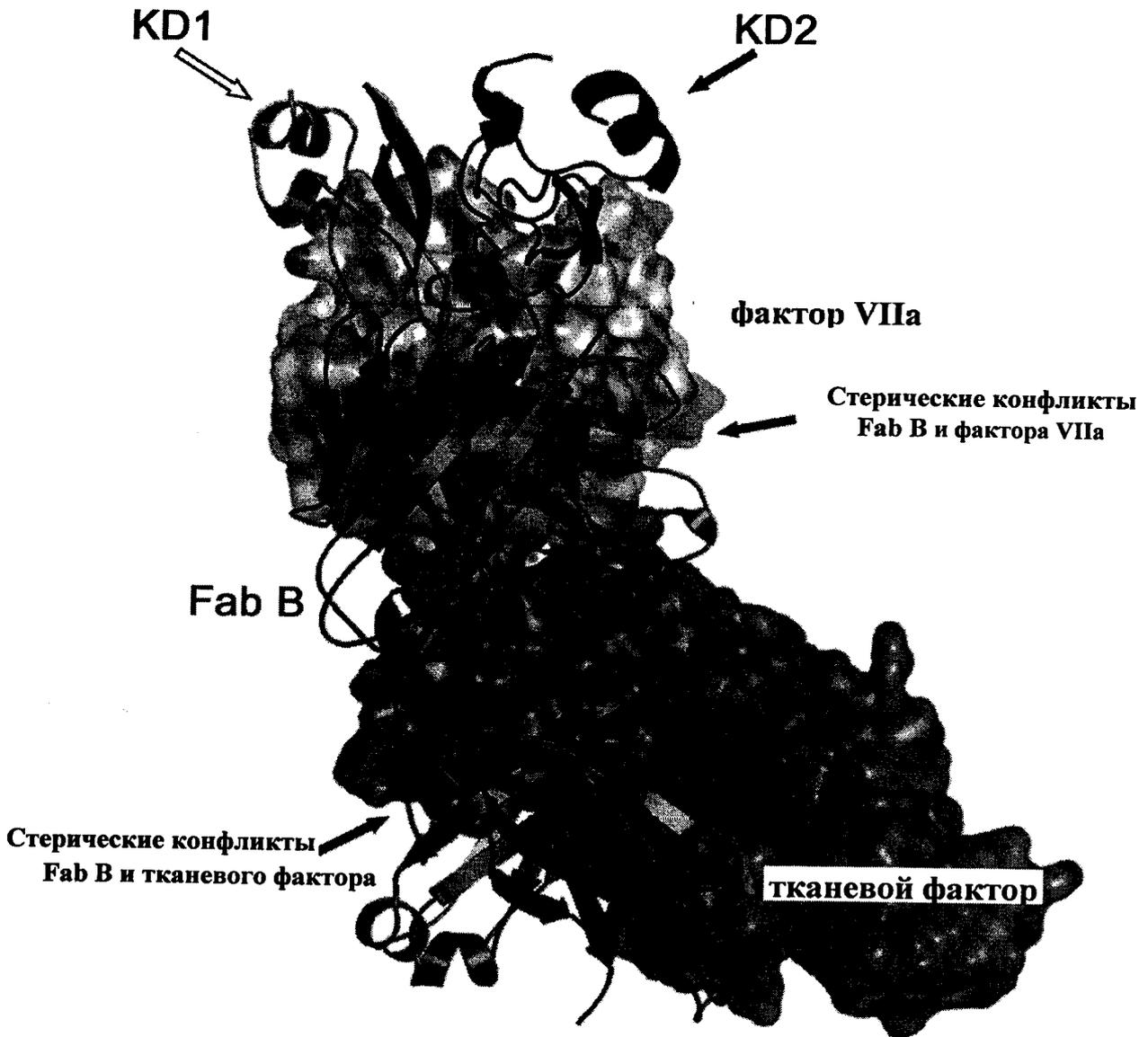
Фигура 7



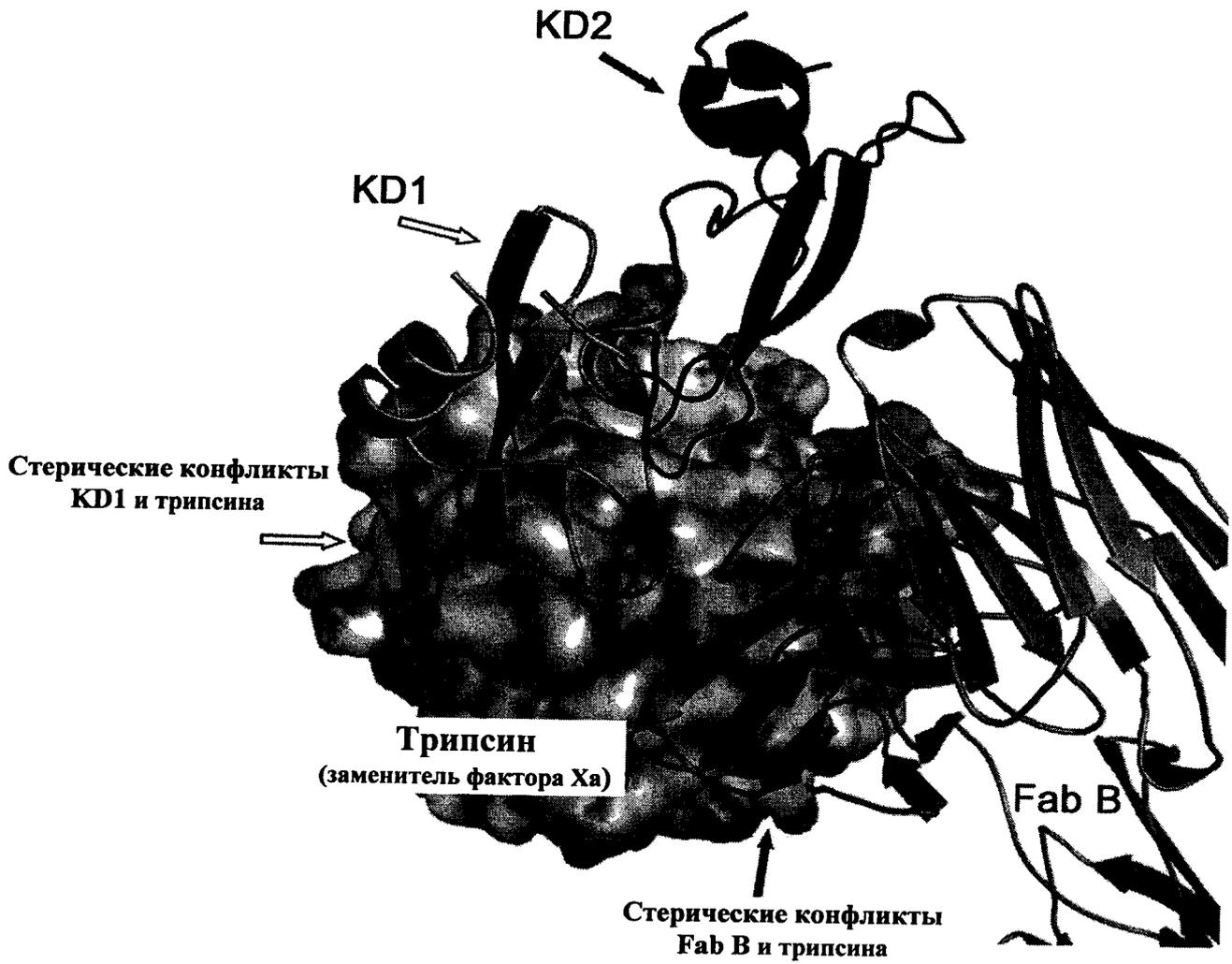
Фигура 8



Фигура 9



Фигура 10



## Фигура 11

## A

## Легкая цепь:

Fab A: 1 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVFSGNTLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA 60  
 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVF DG TYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA  
 Fab C: 1 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVFRDGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA 60

Fab A: 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV 120  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV  
 Fab C: 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV 120

Fab A: 121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL 180  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL  
 Fab C: 121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL 180

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

## Тяжелая цепь:

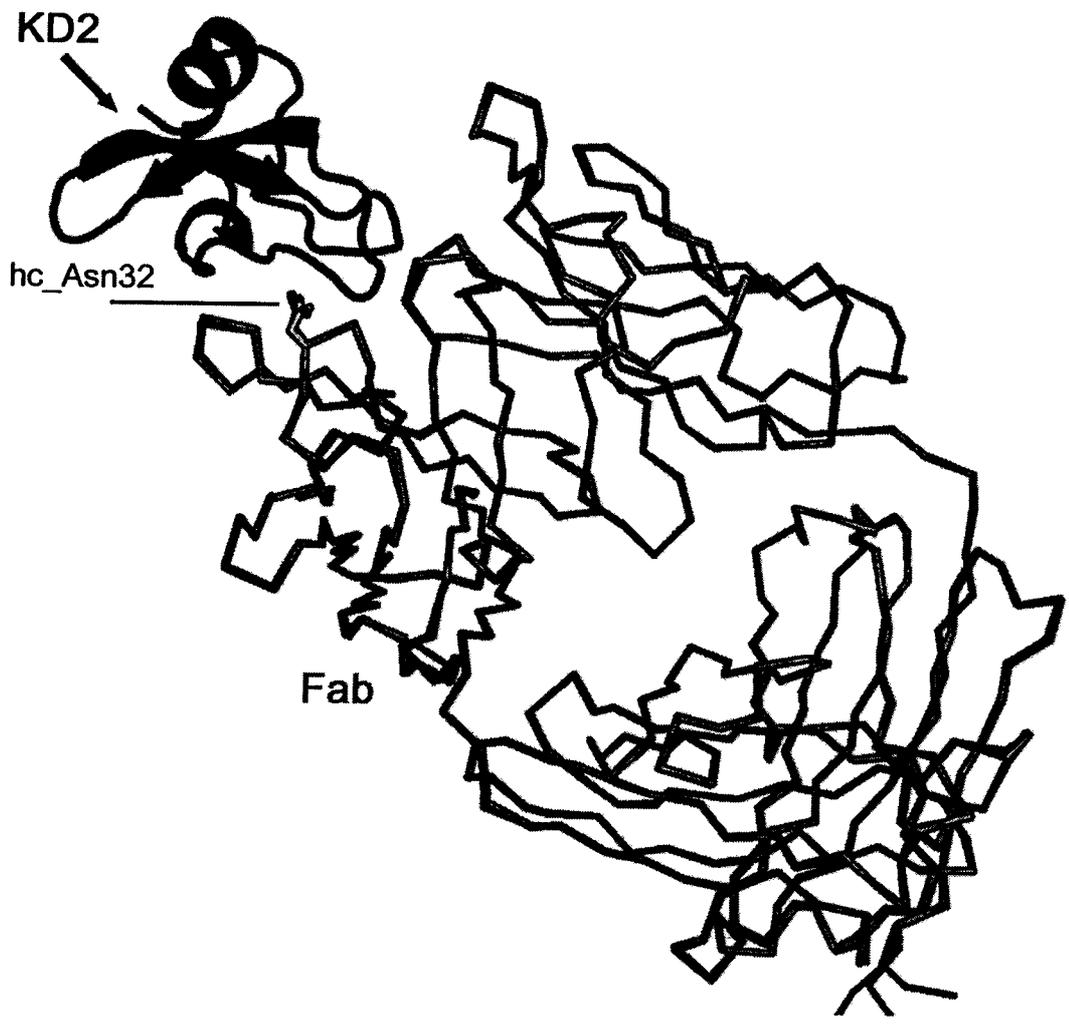
Fab A: 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSAASWIRQSPRGRLEWLGIIYKRSKWKY 60  
 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSAASWIRQSP RGLEWLGIIY RSKWY  
 Fab C: 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSAASWIRQSPRGRLEWLGIIYYRSKWKY 60

Fab A: 61 NRYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPЭДТАVYYCARWHSKHWGFDYWGQGLVT 120  
 NRYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPЭДТАVYYCARWHSKHWGFD WGQGLVT  
 Fab C: 61 NRYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPЭДТАVYYCARWHSKHWGFDDWGQGLVT 120

Fab A: 121 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL 180  
 VSSASTKGPSVFPLAP S+STS TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 Fab C: 121 VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL 180

Fab A: 181 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK 224  
 QSSGLYSLSSVVTVPSS+ GTQTY CNV+HKPSNTKVDK VE K  
 Fab C: 181 QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHDKPSNTKVDKTVK 224

**B**



## Фигура 12

## A

## Легкая цепь :

Fab B: 1    DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNL <sup>\*\*</sup> ~~██████████~~ AHWYQOKPGQAPVVVI <sup>\*</sup> ~~██████████~~ YDNRPSGIPER 60  
                   ELTQPPSVSV+PGQTARI+CSGDNL ~~██████████~~ YYAHWYQOKPGQAPVVVI YD NRPSGIPER  
 Fab D: 1    SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDNL ~~██████████~~ YYAHWYQOKPGQAPVVVI ~~██████████~~ YDVNRPSGIPER 60

Fab B: 61    FSGS ~~██████████~~ SGNATLTISGTQAEDEADYYCQS <sup>\*\*</sup> ~~██████████~~ D ~~██████████~~ GVPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120  
                   FSGSNSGNATLTISGTQA DEADYYCQ+W ~~██████████~~ PVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP  
 Fab D: 61    FSGSNSGNATLTISGTQAMDEADYYCQAWW ~~██████████~~ STPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120

Fab B: 121    SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSL 180  
                   SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK DSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSL  
 Fab D: 121    SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSL 180

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

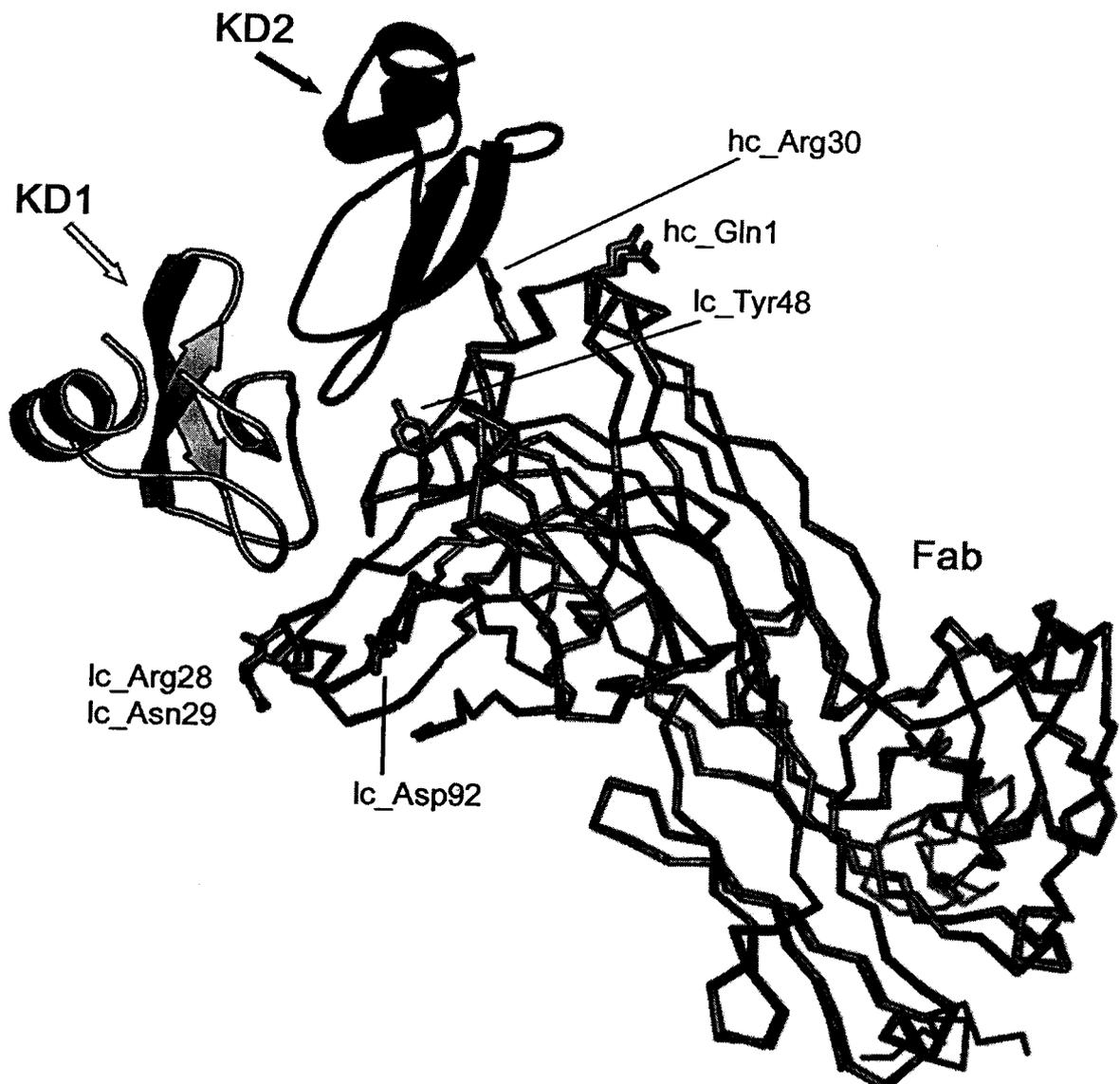
## Тяжелая цепь :

Fab B: 1    <sup>\*</sup> ~~██████████~~ VELVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS ~~██████████~~ F ~~██████████~~ S ~~██████████~~ GMSWVRQAPGKGLEWVSSI ~~██████████~~ GSSSSTYY 60  
                   ~~██████████~~ V+LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF ~~██████████~~ SYGM WVRQAPGKGLEWVSSIRGS STYY  
 Fab D: 1    ~~██████████~~ VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF ~~██████████~~ SYGMDWVRQAPGKGLEWVSSIRGSRGSTYY 60

Fab B: 61    ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAЭДТАVYYCA ~~██████████~~ L ~~██████████~~ F ~~██████████~~ WGQGLTVTVSSAST 120  
                   ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAЭДТАVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST  
 Fab D: 61    ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAЭДТАVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST 120

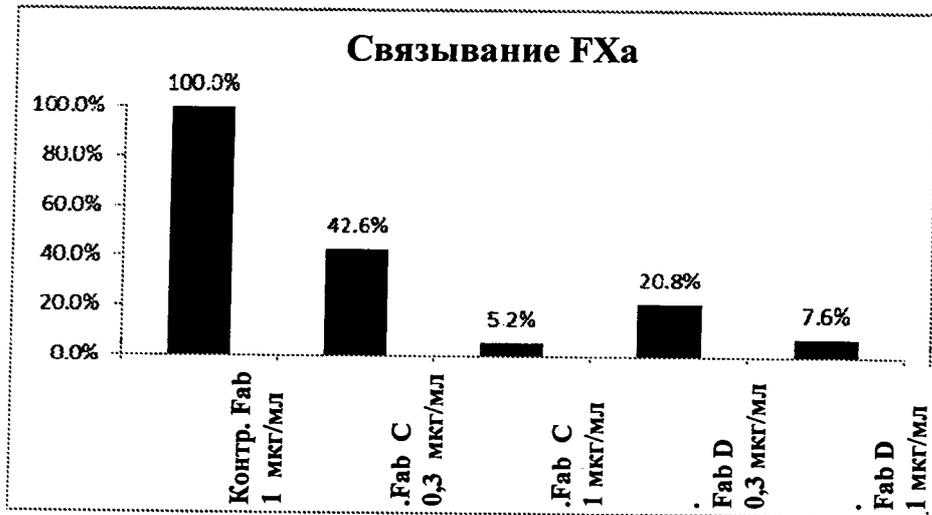
Fab B: 121    KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY 180  
                   KGPSVFPLAP S+STS TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
 Fab D: 121    KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY 180

Fab B: 181    SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC 220  
                   SLSSVTVPSS+ GTQTY CNV+HKPSNTKVDK VE K C  
 Fab D: 181    SLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCC 220

**B**

Фигура 13

А



В

