

创新团队成果专栏

靶向凝血因子FIXa-FVIIIa复合物结合位点的新型抗栓抗体

孙天瑶^{1*}, 蒋时枫^{2*}, 徐沁², 刘俊岭¹, 党素英^{1#}, 樊雪梅^{1#}

1. 上海交通大学生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学生命科学技术学院生物工程系, 上海 200240

[摘要] **目的**·制备以内源性凝血途径中关键的凝血因子IXa (coagulation factor IXa, FIXa) 为靶点的单克隆抗体, 并研究其抗栓功能及作用机制。**方法**·通过免疫小鼠、杂交瘤技术、单克隆抗体细胞表达纯化技术, 制备高纯度的抗FIXa单克隆抗体; 通过酶联免疫吸附测定筛选与FIXa具有高亲和力的单抗, 利用活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 和凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 评估单抗的抗栓效果; 然后利用显色底物法检测其对FIXa酶活性的影响; 采用计算机模拟蛋白-蛋白对接的方法预测抗体与FIXa相互作用可能的结合位点, 并通过竞争实验 (间接通过显色底物法) 对这一结合位点进行验证。**结果**·制备得到1种高亲和力抗FIXa的单克隆抗体FIXa-4; 虽然它不影响PT和FIXa的酶活性, 但可显著延长APTT至88.8 s, 是对照组 (25.5 s) 的3.5倍, 并且具有浓度依赖性。蛋白-蛋白对接预测结果发现, FIXa-4不直接与FIXa的底物催化位点结合, 而是占据了FIXa和FVIIIa的结合区域。竞争实验进一步验证了上述结果, FIXa-4以剂量依赖的方式抑制FXa的生成, FIXa-4的浓度达到400 pmol/L即可使FXa的生成几乎完全被抑制, 而FVIIIa可纠正抗体的抑制作用达到近50%。**结论**·获得抗FIXa的单抗FIXa-4; FIXa-4与FVIIIa竞争性结合FIXa阻碍了FVIIIa-FIXa复合物形成, 阻断FX向FXa的转化, 该抗体主要通过抑制内源性凝血途径发挥抗栓作用。

[关键词] 凝血因子IXa; 单克隆抗体; 活化部分凝血活酶时间; 酶活性; 凝血因子VIIIa; 抗栓作用

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.09.001 **[中图分类号]** R34 **[文献标志码]** A

A novel antithrombotic antibody targeting the binding sites of the coagulation factor FIXa-FVIIIa complex

SUN Tian-yao^{1*}, JIANG Shi-feng^{2*}, XU Qin², LIU Jun-ling¹, DANG Su-ying^{1#}, FAN Xue-mei^{1#}

1. Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Bioengineering, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective**·To prepare a monoclonal antibody targeting coagulation factor IXa (FIXa), a key factor in endogenous coagulation pathways, and study its antithrombotic roles and mechanisms. **Methods**·Immunization of mice, hybridoma technology, cell expression and purification were used to prepare the anti-FIXa monoclonal antibodies of high purity. The monoclonal antibodies with high affinity for FIXa were screened by enzyme-linked immunosorbent assay. The activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) were used to evaluate the antithrombotic effects of the monoclonal antibody. And then chromogenic substrate method was used to detect the effect of monoclonal antibody on the enzyme activity of FIXa. The method of computer simulation of protein-protein docking was adopted to predict the possible binding sites between FIXa and the antibody, and the binding site, was verified by competitive experiments (indirectly through the chromatic substrate method). **Results**·FIXa-4, an anti-FIXa monoclonal antibody with high affinity, was generated. Although FIXa-4 did not affect PT and the enzyme activity of FIXa, it significantly prolonged APTT to 88.8 s, which was 3.5 times of the control group (25.5 s), in a concentration-gradient dependence. The protein-protein docking prediction results revealed that FIXa-4 did not directly bind to substrate catalytic sites of FIXa, but occupied the binding region of FIXa and FVIIIa. Competitive experiments further verified the above results. FIXa-4 inhibited FXa production in a dose-dependent manner, almost completely inhibiting FXa production at the concentrations of 400 pmol/L, and FVIIIa could correct the inhibition effect of the antibody up to nearly 50%. **Conclusion**·The monoclonal antibody against FIXa-4 is obtained. FIXa-4 competes with FVIIIa to bind FIXa, and inhibits the conversion of FX to FXa which is catalyzed by FVIIIa-FIXa complex; it plays an antithrombotic role mainly by inhibiting endogenous coagulation pathway.

[Key words] coagulation factor IXa (FIXa); monoclonal antibody; activated partial thromboplastin time (APTT); enzyme activity; coagulation factor VIIIa (FVIIIa); antithrombosis

血栓栓塞性疾病是一类以动静脉和微血管血栓形成或栓塞为特点的临床常见疾病; 血栓形成后血流受阻, 或栓子脱落导致下游血流中断, 将会造成组织器官的缺

血和坏死^[1]。全球约有1 790万人死于心血管疾病, 占全球死亡人数的31%^[2]。血栓形成是引发各类严重心脑血管疾病的重要因素, 血栓性疾病已成为当今社会威胁人

[基金项目] 国家自然科学基金(81970123); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZDCX20180101)。

[作者简介] 孙天瑶 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: sty19950531@163.com。蒋时枫 (1998—), 男, 本科生; 电子信箱: jack-carpenter@sjtu.edu.cn。*为共同第一作者。

[通信作者] 樊雪梅, 电子信箱: fanxuemei@sjtu.edu.cn。党素英, 电子信箱: suyingdang@shsmu.edu.cn。#为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81970123); Innovative Research Team of High-level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZDCX20180101).

[Corresponding Author] FAN Xue-mei, E-mail: fanxuemei@sjtu.edu.cn. DANG Su-ying, E-mail: suyingdang@shsmu.edu.cn. #Co-corresponding authors.

类健康和生命的首要原因^[1]。血栓栓塞性疾病的主要治疗手段是抗栓治疗,包括抗凝、抗血小板以及溶栓^[3]。其中,抗凝治疗主要通过抑制凝血级联反应中不同的凝血因子阻断凝血过程^[4]。目前,临床上使用的抗凝药物有肝素及其衍生物、维生素K拮抗剂(如华法林)^[5]、小分子抑制剂(利伐沙班、达比加群等),均可作用于凝血瀑布的共同凝血途径(凝血因子IIa、Xa),难以避免对生理性止血功能产生影响,因而这些药物存在严重的出血危险^[6],特别是脑出血^[7-8]。由于内源性凝血途径与病理性血栓形成密切相关而非止血功能所必需^[9],内源性凝血因子的选择性抑制剂已成为新型抗凝血药物研究的热点^[10]。

凝血因子IXa (coagulation factor IXa, FIXa) 是内源性凝血途径中关键的凝血因子,是唯一可溶形式的凝血蛋白^[11-12]。FIX可以在聚集的血小板上由FXIa直接激活成为FIXa, FIXa能够有效地从组织因子承载细胞扩散到血小板,成为凝血链起始和放大阶段之间的关键环节^[4]。FIXa通过形成FIXa-FVIIIa复合物激活FX,该过程的速度是组织因子(tissue factor, TF)-FVIIa复合物的50倍以上^[13],同时也是凝血酶产生的限速步骤^[14-16]。Lollar等^[17]在体外证明了FIXa活性位点抑制剂(FIXai)可抑制凝血反应;Benedict等^[18]在实验动物模型中证明了FIXai可以预防血栓形成但对生理性止血影响较小。因此, FIXa被认为是抗血栓形成的安全靶标^[19-21]。目前多种针对FIXa的抑制剂正在被开发,包括小分子抑制剂、大分子竞争性活性位点阻断抑制剂、单克隆抗体、RNA适配体等^[22]。

本课题组在此研究中制备了一株以FIXa-FVIIIa为靶点的高亲和性单克隆抗体FIXa-4, FIXa-4不直接与FIXa的底物催化位点结合,而是占据了FIXa和FVIIIa的结合区域,针对该作用位点的新型抑制剂具有良好的抗凝作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞来源 BALB/c小鼠、裸鼠均为SPF级,购自苏州西山生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(沪)2018-0003。实验动物由上海交通大学医学院动科部饲养在SPF屏障系统中,实行严格的微生物学控制,使用许可证号为SCXK(沪)2018-0003。动物实验操作均符合伦理规范。骨髓瘤细胞SP2/0来源于中国科学院细胞库,目录号为TCM18。

1.1.2 主要试剂及仪器 半固体培养基购自美国STEMCELL公司,完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、聚

乙二醇(PEG)、四甲基十五烷(pristane)购自美国Sigma公司,人凝血因子FIXa、FX购自美国Enzyme Research Laboratories公司,活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)试剂、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)试剂、Owren's veronal缓冲液(Owren's veronal buffer, OVB)购自德国Siemens公司,凝血酶、磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸混合物(PC/PS)购自法国Hyphen Biomed公司,蛋白G琼脂糖树脂购自上海翊圣生物科技有限公司,人凝血因子FVIII购自上海莱士血液制品股份有限公司,ELISA-TMB显色液购自美国Gibco公司,正常人混合血浆购自美国Instrumentation Laboratory公司, SPECTROZYME® FIXa发色底物购自加拿大Biomedica Diagnostics公司,蝥蛇毒液(Russell's viper venom, RVV)购自法国Diagnostica Stago公司, S2765发色底物购自意大利Chromogenix公司, HRP标记的鼠源二抗购自美国Jackson Immuno Research Laboratories公司。

APTT和PT仪器(STart 4 fibrinometer)购自法国Diagnostica Stago公司,酶标仪(type1530)购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 制备以FIXa为靶点的单克隆抗体

1.2.1 免疫小鼠及细胞融合 免疫SPF级BALB/c雄性小鼠,6~8周龄4只。初次免疫将FIXa抗原与弗氏完全佐剂混合, FIXa终浓度为100 μg/100 μL, 2只足垫各注射50 μg/50 μL;第2次免疫,将弗氏完全佐剂替换为弗氏不完全佐剂;第3次免疫, FIXa抗原用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)稀释至100 μg/100 μL,进行腹腔注射;第4次免疫,即加强免疫,以100 μg/100 μL剂量进行尾静脉注射。共进行4次免疫,每次免疫间隔2周。

加强免疫后第3日取免疫小鼠的脾细胞,与骨髓瘤细胞SP2/0在PEG作用下进行细胞融合,获得杂交瘤细胞。

1.2.2 抗体阳性细胞株筛选和克隆化 杂交瘤细胞培养7 d后,采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)进行抗体阳性检测。在ELISA板中包被抗原FIXa 0.1 μg/100 μL, 37℃孵育1.5 h;再用2%牛血清白蛋白37℃封闭1 h;然后加入细胞培养上清液, 37℃孵育1.5 h;接着加入鼠源二抗, 37℃孵育30 min;最后加入显色底物TMB室温避光孵育5 min后,加入终止液2 mol/L H₂SO₄,终止反应。根据在酶标仪450 nm处测量的吸光度,筛选抗体阳性细胞株;然后在半固体培养基中进行克隆化培养,7 d后挑选出单克隆到

96孔板中,按上述ELISA再次进行筛选,最终获得抗体阳性的单克隆细胞株。

1.2.3 抗体测序 收取足量抗体阳性细胞,提取RNA,反转录为cDNA,使用小鼠抗体测序引物进行PCR。反应条件:98℃ 300 s; 98℃ 10 s, 58℃ 15 s, 72℃ 30 s,共40个循环;72℃ 300 s。最后将PCR产物送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.2.4 腹水制备及抗体纯化 选择雄性裸鼠4只,6~8周龄。提前7 d注射pristane 0.5 mL/只,然后在小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 $(0.5\sim 1)\times 10^6$ 个/0.5 mL;7~10 d后可见裸鼠腹部胀大,在左下腹腔刺入针头,收集腹水至离心管中,2 400×g离心10 min,收集上清液,加入叠氮钠使之终浓度为0.02%。

按照蛋白G琼脂糖纯化树脂的说明书流程,将上述收集的腹水依次进行平衡、上样、洗杂、洗脱;最后用超滤管(截留相对分子质量 $\geq 30\,000$)对洗脱液进行超滤浓缩,得到高纯度的单克隆抗体。

1.3 抗体亲和力检测

采用ELISA进行抗体亲和力检测。在ELISA板中包被抗原FIXa 0.1 $\mu\text{g}/100\,\mu\text{L}$,37℃孵育1.5 h;再用2%牛血清白蛋白37℃封闭1 h;然后分别加入不同浓度梯度的抗体,37℃孵育1.5 h;接着加入鼠源二抗,37℃孵育30 min;最后加入显色底物TMB室温避光孵育5 min后,加入终止液2 mol/L H_2SO_4 ,终止反应。酶标仪检测450 nm处吸光度。

1.4 抗凝血测定

1.4.1 APTT 首先将仪器及相关试剂预热至37℃。然后将抗体用OVB稀释,再选定APTT程序,放置反应杯。依次加入50 μL APTT试剂、50 μL 正常人混合血浆和磁珠,按启动键使磁珠开始振荡。然后加入25 μL 抗体,按下计时键开始计时,180 s后加入25 μL 50 mmol/L CaCl_2 ,同时按手柄上的测量键。观察磁珠振荡直至血浆凝固,记录仪器上的秒数。最后,根据血浆中抗体终浓度的对数值和凝血时间绘制曲线。

1.4.2 PT 首先将仪器和试剂预热至37℃。然后将抗体稀释于正常人混合血浆中,再选定PT程序,放置反应杯。加入磁珠,按启动键使磁珠开始振荡,然后加入50 μL 含抗体的正常人混合血浆,并按下计时键开始计时。60 s后加入100 μL PT试剂,同时按手柄上的测量键。观察磁珠振荡直至血浆凝固,记录仪器上的秒数。根据血浆中抗体终浓度的对数值和凝血时间绘制曲线。

1.5 发色底物法检测抗体对酶活性的影响

首先将酶标仪设置为37℃,选择动力学循环模式,测量吸光度的动态变化值,总时间设置为10 min,间隔5 s,循环次数为121次。然后参考SPECTROZYME® FIXa发色底物的说明书,在96孔板中依次加入100 μL Tris缓冲液(50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L CaCl_2 、33%乙二醇, pH=7.4)、10 μL FIXa蛋白(2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、2.5 μL 抗体或对照,最后加入12.5 μL 的FIXa发色底物(10 mmol/L),触发反应;测量其在405 nm处吸光值的变化情况 $\Delta D/\text{min}$ 。

1.6 FIXa与单克隆抗体相互作用结合位点的预测

FIXa的催化结构域三维模型依据FIXa-抑制剂复合物(PDBentry: 3LC3)的晶体结构构建而成。考虑到3LC3中氨基酸残基依照胰凝乳蛋白酶编号,下述用此编号的FIXa残基均在编号前加c字符。通过SabPred网站的Abody Builder^[23]来预测单克隆抗体可变区的三维结构。通过ClusPro进行抗体与FIXa的对接,其中在对接的过程中使用抗体模式屏蔽抗体的非互补性决定区(complementarity determining region, CDR)区域^[24]。对接结果由open-source PyMOL(2.5.0版)提供^[25]。

1.7 抗体与FVIIIa结合FIXa的竞争实验

1.7.1 FVIII的激活 在125 μL 缓冲液(20 mmol/L HEPES、300 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L CaCl_2)中加入1 U/100 μL 凝血酶和100 $\mu\text{g}/25\,\mu\text{L}$ FVIII,37℃孵育10 min,得到FVIIIa(终浓度约为0.4 mg/mL)。最后加入1 U水蛭素(hirudin),防止FVIIIa崩解^[26]。

1.7.2 抗体对FIXa-FVIIIa复合物激活FX的抑制作用检测 首先将50 ng/2 μL PC/PS、5 μL FIXa(20 nmol/L)、10 μL FX(3 $\mu\text{mol}/\text{L}$)混合,然后加入预先混合好的8 μL FVIIIa(80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和5 μL 抗体,37℃孵育15 min。再加入20 μL EDTA(20 mmol/L)终止反应,最后加入150 μL 含0.1% PEG8000的TBS- Ca^{2+} 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L CaCl_2 、0.1%牛血清白蛋白)稀释反应产物^[27]。

将酶标仪设置为37℃,选择动力学循环总时间设置为5 min,间隔10 s,循环次数为31次。在96孔板中加入40 μL 反应产物,再加入40 μL 发色底物S2765(1 mmol/L),触发反应^[28]。测量其在405 nm处吸光值的变化情况 $\Delta D/\text{min}$ 。

1.7.3 FVIIIa纠正抗体对FIXa-FVIIIa复合物抑制作用的检测 选取“1.7.2”中合适的抗体作用浓度,按照同样的

方法, 将上述反应体系中的 5 μL 抗体换为 2.5 μL FVIIIa 和 2.5 μL 抗体 (终浓度不变), 测量其在 405 nm 处吸光值的变化情况 ($\Delta D/\text{min}$)。纠正率为加入 FVIIIa 后对应的 FXa 生成量减去未加入 FVIIIa 体系的 FXa 生成量的差除以未加入 FVIIIa 体系的 FXa 生成量。

1.7.4 建立 FXa 生成量与裂解底物速率的标准曲线 按说明书操作, 首先将 25 μL FX (200 nmol/L)、25 μL RVV (42 nmol/L)、50 μL TBS- Ca^{2+} 缓冲液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, FX 被激活为 FXa, 此反应体系中完全活化的 FXa 终浓度为 10 nmol/L。

然后将酶标仪设置为 37 $^{\circ}\text{C}$, 选择动力学循环模式, 总时间设置为 5 min, 间隔 10 s, 循环次数为 31 次。在 96 孔板中加入 40 μL 不同浓度 FXa 和 40 μL 发色底物 S2765 (1 mmol/L), 触发反应, 测量其在 405 nm 处吸光值的变化情况 ($\Delta D/\text{min}$), 即为裂解底物速率。根据 FXa 的终浓度和对应的反应速率绘制标准曲线。

2 结果

2.1 APTT、PT 评估单抗的抗凝作用

先后通过免疫小鼠、杂交瘤融合、抗体测序、细胞表达与纯化技术得到 1 株与人 FIXa 具有高亲和力的单克隆抗体 (图 1A, $\text{EC}_{50}=94.67 \text{ ng/mL}$), 命名为 FIXa-4。接着检测该单抗对 APTT 和 PT 的影响, 用来评估其在内源性凝血途径和外源性凝血途径中的作用。分别将不同浓度的单克隆抗体 (终浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.39 $\mu\text{g/mL}$) 加入到 APTT 或 PT 反应体系中。实验结果显示, 与对照组相比, FIXa-4 使 APTT 显著延长; 且随着 FIXa-4 浓度的增加, 其对 APTT 的延长效应也增强, 最大可使 APTT 延长至 88.8 s, 相当于对照组 25.5 s 的 3.5 倍 (图 1B, $\text{IC}_{50}=7.71 \mu\text{g/mL}$)。这一延长效应明显高于目前抗栓药物要求的 2.5 倍 APTT

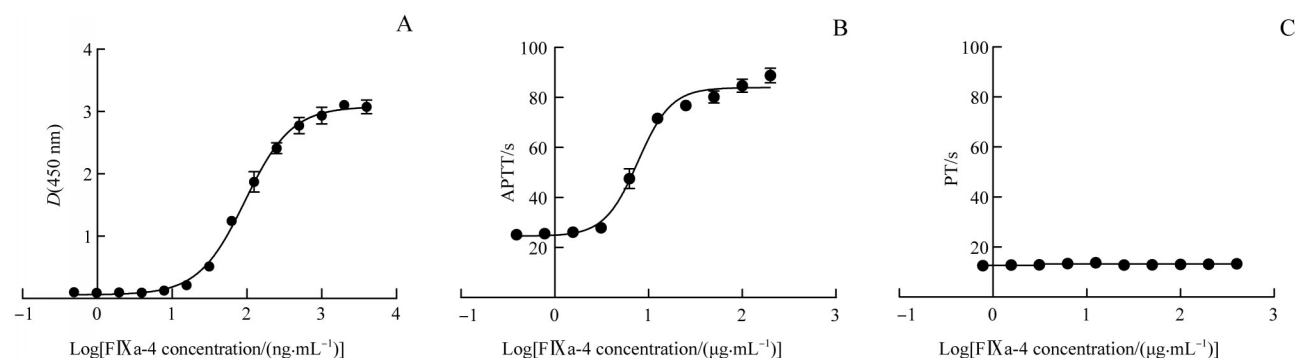
延长效应。而 FIXa-4 基本不影响 PT (图 1C)。以上实验数据表明 FIXa-4 特异性地抑制了内源性凝血途径, 而不作用于 FX、FII 等外源性凝血途径和共同凝血途径中的凝血因子。

2.2 FIXa-4 不直接结合 FIXa 的催化活性位点

在内源性凝血途径中, FIXa 作为酶催化 FX 形成 FXa 来介导凝血瀑布反应的。因此, 为了研究 FIXa-4 的抗凝机制, 我们首先检测了其对于 FIXa 催化活性的影响, 用酶催化底物裂解的速率来反映酶的催化活性。分别将不同浓度的 FIXa-4 (终浓度为 1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g/mL}$) 与 FIXa 蛋白混合孵育 3 min, 再加入 FIXa 发色底物进行反应, 实时监测 $D(405 \text{ nm})$ 。 $\Delta D/\text{min}$ 反映了酶的催化活性。实验结果显示, FIXa-4 对 FIXa 的酶催化活性无明显影响 (图 2)。此实验结果表明 FIXa-4 并不是通过直接结合 FIXa 的催化活性位点发挥抗凝活性。

2.3 FIXa-4 抗体与 FIXa 催化结构域结合位点的预测

为了进一步研究 FIXa-4 的抗凝作用机制, 我们利用蛋白对接的方法对 FIXa-4 与 FIXa 的结合位点进行预测。由于蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中没有经实验测定的 FIXa 全长蛋白的完整结构, 同时考虑到我们主要关注抗体对于 FIXa 催化活性的影响, 因此我们基于一个 FIXa 催化结构域的抑制剂复合物结构建立了 FIXa 催化结构域的三维模型; 同时利用抗体结构预测工具建立了 FIXa-4 结合区域的三维模型, 通过蛋白-蛋白对接方法预测了两者的最优构象集合。该构象集合中, 总共 979 个对接构象形成了 30 个聚类。对每个聚类的代表构象观察发现, 大多数 FIXa 与 FIXa-4 的结合构象共享 1 个结合表面, 其中接触频率较高的残基列于表 1 中。在所有的构象中, FIXa-4 与 FIXa 之间的结合都不阻碍 FIXa



Note: A. Affinity of FIXa-4 antibodies to FIXa. B. Effect of FIXa-4 on APTT. C. Effect of FIXa-4 on PT.

图1 FIXa-4 与 FIXa 的亲合力及对内源性和外源性凝血途径的影响

Fig 1 Affinity between FIXa-4 and FIXa and its effect on endogenous and exogenous coagulation pathways

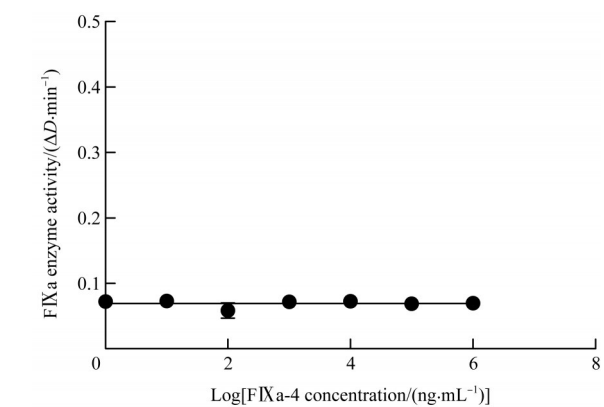


图2 FIXa-4对FIXa催化活性的影响
Fig 2 Effect of FIXa-4 on FIXa catalytic activity

催化位点的底物进出(图3A)。同时,虽然对接过程中并未考虑FIXa与抗体本身的构象变化,但考虑到结合位点与催化位点相距较远,且催化结构域三维结构比较稳定,受结合影响产生较大形变的可能性不高,因此可以初步推测FIXa-4结合并不直接影响FIXa的催化。

另一方面,这些接触残基与之前预测的FIXa-FVIIIa结合面^[29]有相当部分重叠(图3B、C)。例如,表1中FIXa的Asn-c 93、Lys-c 132、Arg-c 165和Thr-c 175等残基也参与FIXa与FVIIIa的结合,而且Ala-c 95、Lys-c 98、Asp-c 164、Lys-c 173、Tyr-c 177残基在序列上与预测的FIXa-FVIIIa结合残基也很接近,均间隔少于2个残基位点。在三维结构中这些残基占据了位于FIXa蛋白c170-螺旋和c131-螺旋之间的共同表面,这恰恰是FIXa与FVIIIa的558-螺旋相结合的关键区域,因此FIXa-4可能与FVIIIa在FIXa的结合上形成竞争关系。总之,对于FIXa-4与FIXa催化结构域结合位点的预测表明FIXa-4并不是通过直接结合FIXa的催化活性位点而降低其活性,而是与FVIIIa竞争性结合FIXa,阻碍了FVIIIa-FIXa复合物的形成,从而抑制内源性凝血途径中FVIIIa对于FIXa的激活,从而降低了FIXa的催化活性。

表1 FIXa与FIXa-4结合面上的接触残基

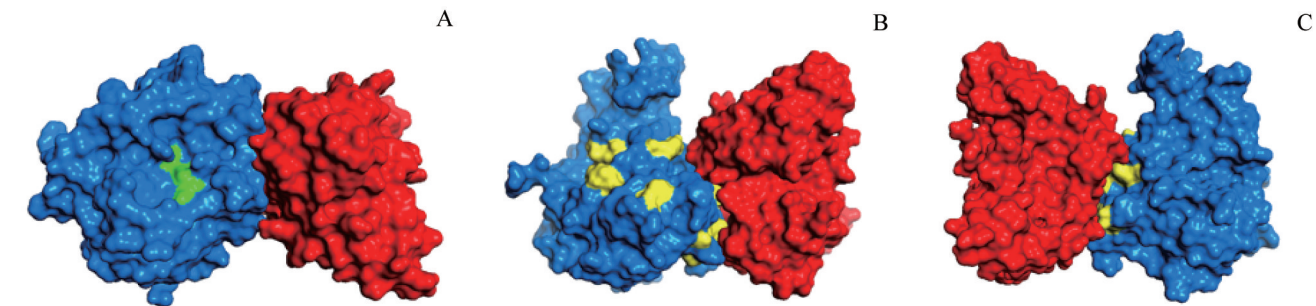
Tab 1 Most frequent residues of FIXa contacting with FIXa-4

Residue	Contact frequency/%
Asn-c 93 ^①	62
Ala-c 95 ^②	34
Lys-c 98 ^②	32
Lys-c 126	87
Asn-c 129	45
Lys-c 132 ^①	48
Asp-c 164 ^②	30
Arg-c 165 ^①	90
Lys-c 173 ^②	33
Thr-c 175 ^①	33
Tyr-c 177 ^②	45
Asn-c 178	93
Lys-c 230	46
Arg-c 233	95
Asn-c 236	36

Note: All the residues in the table are numbered according to chymotrypsin. The residues of FIXa within the proximity of 3 Å (1 Å=10⁻¹⁰ m) to the antibody were considered as contact residues. The frequency was calculated as $\frac{\sum s^*}{\sum S}$, where s^* was the number of members of a docking cluster which contained the residue proximate to the antibody and s was the number of members of every cluster. ^①Residues same to the predicted sites of FIXa binding to FVIIIa. ^②Residues in the vicinity of those binding residues by less than 2 residues in sequence.

2.4 FIXa-4与FVIIIa竞争性结合FIXa

假定FIXa-4与FVIIIa竞争性结合FIXa,那么随着FVIIIa浓度的增加,FIXa-4的作用会减弱。首先我们建立了模拟体内FIXa-FVIIIa复合物产生FXa的体外模型。在此体系中加入PS/PC、FIXa、FVIIIa与FX,反应产生FXa,然后向此反应体系中加入FXa发色底物来确定FXa的产生量。



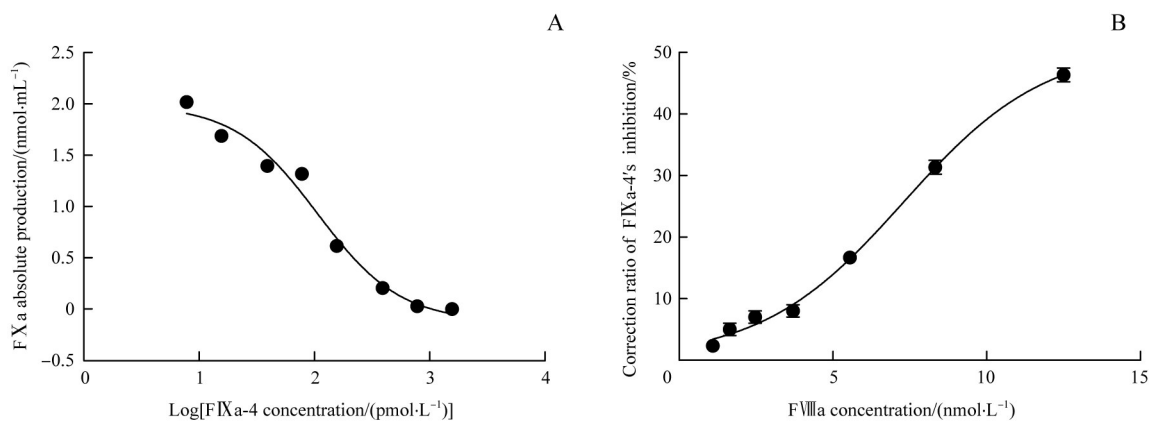
Note: A. Active site of FIXa (green) was not blocked by the binding of FIXa-4. B. Contact surface between FIXa-4 and FIXa overlapped part of the predicted binding sites between FIXa and FVIIIa (yellow). C. Back view of B.

图3 FIXa-4(红色)与FIXa催化结构域(蓝色)的结合面预测

Fig 3 Binding surface prediction between the antibody FIXa-4 (red) and FIXa catalytic domains (blue)

结果 (图 4A) 发现, 将不同浓度的 FIX a-4 (终浓度为 1 560、780、390、156、78、39、15.6、7.8 pmol/L) 加入到此体系中, FIX a-4 以剂量依赖的方式抑制了 FXa 的生成。FIX a-4 的浓度达到 400 pmol/L 就使 FXa 的生成几乎完全被抑制。在此体系 (抗体浓度为 400 pmol/L) 中添

加 FVIII a 至不同浓度 (终浓度为 1.1、1.6、2.5、3.7、5.6、8.3、12.5 nmol/L), 结果 (图 4B) 显示随着所加 FVIII a 浓度的升高, 抗体的抑制作用逐渐被纠正, 纠正率达到近 50%。该实验结果验证了 FIX a-4 与 FVIII a 竞争性结合 FIX a 发挥抗凝作用这一推测。



Note: A. Inhibition of FIX a-4 on the production of FX a. B. Correction of FVIII a in the inhibition of FIX a-4.

图 4 FIX a-4 与 FVIII a 竞争性结合 FIX a 的验证

Fig 4 Verification of FIX a-4 competed with FVIII a in combination with FX a

3 讨论

目前使用的抗凝剂有多种局限性, 包括不可预测的药代动力学、缺乏可逆性, 在某些情况下还有免疫原性^[30]; 开发安全有效的抗栓药物仍是当代医药领域的研究热点。在选择靶向的凝血因子时, 有 2 个重要的考虑因素。首先, 在凝血瀑布反应显著放大发生之前阻断该通路。第二, 以限速步骤为目标, 应在最宽的治疗范围内提供有效的抗凝作用^[31]。FIX a 是内源性凝血途径中关键的凝血因子^[4]。有研究^[32]表明, 靶向 FIX a 是有效降低缺血性并发症而不增加出血并发症的非常有前景的治疗方法。

单克隆抗体具有结合抗原特异性强、半衰期长等特性。随着单克隆抗体技术的不断发展, 抗体药物在疾病预防、诊断和治疗方面发挥着举足轻重的作用。本研究中先后通过杂交瘤技术、抗体测序、细胞表达与纯化技术得到了一种新型的抗 FIX a 单克隆抗体 FIX a-4, 并通过 APTT、PT 功能检测, 描述了 FIX a-4 的抗栓特性。虽然 FIX a-4 延长 APTT 的作用是剂量依赖性的, 但大量增加抗体浓度并未使 APTT 不受控制地延长, 而是将 APTT 延长比例限定在 3.5 倍的范围内。这一结果表明 FIX a-4 有效治疗浓度窗

口较大, 不易增加出血风险, 符合临床应用需求。

在探究其抗栓活性的作用机制时我们发现, FIX a-4 与之前报道的 FIX a 抑制剂不同, 它并不直接作用于 FIX a 的酶催化活性位点, 而是占据了 FIX a 和 FVIII a 之间的大部分结合区域, 阻断了 FIX a-FVIII a 复合物形成, 进而影响其催化 FX 向 FX a 的转化而引发抗凝作用。更有意思的是, FIX a-4 可基本阻断体外 FX a 的产生, 而补充 FVIII a 可使这一抑制作用得到纠正; 也就是说 FIX a-4 的抗栓作用随着 FVIII a 浓度的增加得到部分逆转。与现有抗栓药物相比, 抗栓作用可逆是现今开发新型安全有效抗栓药物需要考虑的, 因为在临床用药过程中可利用这一特性预防或治疗过度抗凝而引起的不可控出血。在接下来的研究中, 我们将测试食蟹猴、鼠、犬等不同动物种属的 FIX a 与 FIX a-4 反应, 以找到可与 FIX a-4 相互作用的动物模型, 评测靶向 FIX a-FVIII a 结合位点的单克隆抗体 FIX a-4 在体内的药代动力学、药效学及安全性。

综上所述, 本研究制备了一种新型抗栓抗体, 其作用机制为通过与 FVIII a 竞争结合 FIX a 上的位点, 抑制 FVIII a-FIX a 复合物的形成进而发挥抗凝作用。该研究成果不仅为治疗血栓提供了新的思路, 也为目前仍未明确的 FVIII a 与 FIX a 结合位点提供了间接证据。

参·考·文·献

- [1] 张珀, 邓云, 桂阳, 等. 抗血栓药物作用机制的研究进展[J]. 基层医学论坛, 2020, 24(25): 3682-3685.
- [2] Tscharré M, Michelson AD, Gremmel T. Novel antiplatelet agents in cardiovascular disease[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2020, 25(3): 191-200.
- [3] 刘莅欣, 胡桃红. 血栓性疾病抗栓治疗的研究进展[J]. 中国临床医生, 2013, 41(5): 15-17.
- [4] 徐亭亭, 石慧, 王平保, 等. 靶向凝血因子的新型口服抗凝药物研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2020, 30(10): 636-642.
- [5] 孙思, 赵爱民. 复发性流产常用抗凝及抗血小板药物妊娠期暴露的安全性[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(3): 402-407.
- [6] 陈一竹, 张俊峰. 抗血小板治疗新靶点: 糖蛋白VI[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(7): 1078-1081.
- [7] Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence[J]. Circulation, 1998, 97(2): 211-218.
- [8] Adeboyeje G, Sylwestrak G, Barron JJ, et al. Major bleeding risk during anticoagulation with warfarin, dabigatran, apixaban, or rivaroxaban in patients with nonvalvular atrial fibrillation[J]. J Manag Care Specialty Pharm, 2017, 23(9): 968-978.
- [9] Toomey JR, Smith KJ, Stafford DW. Localization of the human tissue factor recognition determinant of human factor VIIa[J]. J Biol Chem, 1991, 266(29): 19198-19202.
- [10] 余婷. 刺囊酸, 皂皮酸及金合欢酸内酯的合成研究[D]. 南昌: 江西师范大学, 2019.
- [11] Misenheimer TM, Yang BY, Sheehan JP. The heparin-binding exosite is critical to allosteric activation of factor IXa in the intrinsic tenase complex: the role of arginine 165 and factor X[J]. Biochemistry, 2007, 46(26): 7886-7895.
- [12] Spanier TB, Chen JM, Oz MC, et al. Selective anticoagulation with active site-blocked factor IXa suggests separate roles for intrinsic and extrinsic coagulation pathways in cardiopulmonary bypass[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(5): 860-869.
- [13] Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation[J]. J Biol Chem, 1991, 266(17): 11317-11327.
- [14] Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, et al. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation[J]. Blood, 1995, 86(5): 1794-1801.
- [15] Butenas S, Orfeo T, Gissel MT, et al. The significance of circulating factor IXa in blood[J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 22875-22882.
- [16] Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, et al. Thrombin production, inactivation and expression during open heart surgery measured by assays for activation fragments including a new ELISA for prothrombin fragment F1+2[J]. Thromb Haemost, 1993, 70(2): 253-258.
- [17] Lollar P, Fass DN. Inhibition of activated porcine factor IX by dansyl-glutamyl-glycyl-arginyl-chloromethylketone[J]. Arch Biochem Biophys, 1984, 233(2): 438-446.
- [18] Benedict CR, Ryan J, Wolitzky B, et al. Active site-blocked factor IXa prevents intravascular thrombus formation in the coronary vasculature without inhibiting extravascular coagulation in a canine thrombosis model[J]. J Clin Invest, 1991, 88(5): 1760-1765.
- [19] Walsh PN. Roles of factor XI, platelets and tissue factor-initiated blood coagulation[J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(10): 2081-2086.
- [20] Mathur A, Zhong D, Sabharwal AK, et al. Interaction of factor IXa with factor VIIIa. Effects of protease domain Ca^{2+} binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid, and factor X[J]. J Biol Chem, 1997, 272(37): 23418-23426.
- [21] Lenting PJ, Christophe OD, Maat H, et al. Ca^{2+} binding to the first epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX promotes enzyme activity and factor VIII light chain binding[J]. J Biol Chem, 1996, 271(41): 25332-25337.
- [22] Smiley DA, Becker RC. Factor IXa as a target for anticoagulation in thrombotic disorders and conditions[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(9): 1445-1453.
- [23] Venkateswarlu D. Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: a computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 408-414.
- [24] Dunbar J, Krawczyk K, Leem J, et al. SAbPred: a structure-based antibody prediction server[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(W1): W474-W478.
- [25] Brenke R, Hall DR, Chuang GY, et al. Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking[J]. Bioinformatics, 2012, 28(20): 2608-2614.
- [26] Verhoef D, Visscher KM, Vosmeer CR, et al. Engineered factor Xa variants retain procoagulant activity independent of direct factor Xa inhibitors[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 528.
- [27] Scheiflinger F, Dockal M, Rosing J, et al. Enhancement of the enzymatic activity of activated coagulation factor IX by anti-factor IX antibodies[J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(2): 315-322.
- [28] Lu QY, Yang LK, Manithody C, et al. Molecular basis of the clotting defect in a bleeding patient missing the Asp-185 codon in the factor X gene[J]. Thromb Res, 2014, 134(5): 1103-1109.
- [29] DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system[J]. Protein Struct Funct Genet, 2002, 30: 442-454.
- [30] Xu YM, Cai C, Chandarajoti K, et al. Homogeneous low-molecular-weight heparins with reversible anticoagulant activity[J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(4): 248-250.
- [31] Weitz JI, Buller HR. Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes: present and future[J]. Circulation, 2002, 105(8): 1004-1011.
- [32] Choudhri TF, Hoh BL, Prestigiacomo CJ, et al. Targeted inhibition of intrinsic coagulation limits cerebral injury in stroke without increasing intracerebral hemorrhage[J]. J Exp Med, 1999, 190(1): 91-99.

[收稿日期] 2021-03-09

[本文编辑] 瞿麟平





特约创新团队介绍

创新团队名称

微环境对肿瘤细胞命运决定的调控和干预

团队负责人介绍

刘俊岭 LIU Jun-ling

博士, 教授, 研究员, 博士生导师

Ph.D, Professor, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-2510-790X

刘俊岭(1970—), 上海交通大学医学院教授、博士生导师。国家杰出青年基金获得者、上海交通大学特聘教授、上海市特聘教授、教育部“新世纪优秀人才”。2001年于北京大学医学部获得药物化学博士学位, 2001—2008年在美国从事博士后研究工作并担任研究助理教授职位。2012—2020年担任上海交通大学基础医学院副院长。目前, 担任中国病理生理学会血管医学专委会委员和中国生理学会血栓止血专业委员会委员, 以及多个国际期刊编委和海外基金评审专家。

刘俊岭研究员长期从事血栓及出血性疾病、肿瘤相关疾病发生发展机制的研究, 并对部分研究成果进行了转化; 先后主持国家自然科学基金重点项目、重大研究计划集成项目和科技部重大科学研究计划, “973计划”子课题等多项科研项目, 并获得上海市高校特聘教授、上海市教育委员会“曙光学子”等多项人才项目支持。以通信作者在 *Circulation*、*Cell Metab*、*Blood*、*Hepatology*、*J Clin Invest*、*Arterioscler Thromb Vasc Biol*、*J Pathol* 等国际期刊发表多篇论文。部分研究成果获得教育部科技进步一等奖和国家科技进步二等奖。

团队主要成员

糜军(研究员/博士) 徐颖洁(研究员/博士) 侯建(教授/博士)
贾浩(副研究员/博士) 樊雪梅(副研究员/博士) 张琳(高级实验师/硕士)
路莎莎(住院医师/博士)

LIU Jun-ling (1970—), professor and doctoral supervisor of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. Dr. LIU is a recipient of the National Fund for Distinguished Young Scholars, a Distinguished Professor of Shanghai Jiao Tong University, a Distinguished Professor of Shanghai, and winner of “New Century Excellent Talents” of the Ministry of Education. Dr. LIU received his doctoral degree in pharmaceutical chemistry from Peking University Health Science Center. During 2001 and 2008, he received the postdoctoral training and then worked as a research assistant professor in the United States. From 2012 to 2020, Dr. LIU served as Deputy Dean of Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences. At present, Dr. LIU is a member of the Vascular Medicine Committee of the Chinese Society of Pathophysiology and a member of the Thrombosis and Hemostasis Committee of the Chinese Society of Physiology, as well as an editorial board member of several international journals and an overseas fund evaluation expert.

Dr. LIU has focused on understanding the pathogenesis of thrombosis, hemorrhagic diseases and tumor-related diseases and has already carried on the transformation of the research achievements. He has presided over key and the major integrated projects of the National Natural Science Foundation of China, major scientific research programs of the Ministry of Science and Technology, and the sub-projects of “973 Program”. Dr. LIU has been supported by the Program for Professor of Special Appointment at Shanghai Institutions of Higher Learning, and Shuguang Project of Shanghai Municipal Education Commission. He has published several articles as the corresponding author in *Circulation*, *Cell Metab*, *Blood*, *Hepatology*, *J Clin Invest*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *J Pathol* and other international journals. Parts of the research achievements have won the first prize of Science and Technology Progress Award of the Ministry of Education and the second prize of the National Science and Technology Progress Award.

主要研究方向

刘俊岭研究员领导的团队围绕“微环境对肿瘤细胞命运决定的调控和干预”这一核心科学问题，重点以肝癌、乳腺癌和血液肿瘤为研究对象，结合临床肿瘤样本，从肿瘤微环境的细胞和因子构成，以及微环境对肿瘤细胞转分化、转移及耐药等的作用和机制研究入手，整合基础和临床优势力量，重点研究微环境中关键受体、胞内信号调控、代谢通路调控等在肿瘤发生、转移和耐药中的作用机制。研究成果发表在 *Circulation*、*Cell Metab*、*Blood*、*Hepatology*、*Blood Adv* 等国际著名杂志。申请专利 3 项，其中一项处于转化阶段。这一系列研究成果，受到了国际同行的广泛关注与认可。

Dr. LIU's team focuses on the core scientific issue "the regulation and intervention of microenvironment on the fate determination of tumor cells", especially in liver cancer, breast cancer and hematological malignancy, based on the clinical tumor samples. Beginning with studying the constitution of cells and factors in the tumor microenvironment, the effects of the microenvironment on tumor cell transdifferentiation, metastasis and drug-resistance and the mechanisms, the team has integrated basic and clinical advantages and engaged in the key receptors, intracellular signal regulation, and metabolic pathway regulation in the microenvironment function in tumorigenesis, metastasis and drug-resistance. The research findings were published in the well-known international journals, such as *Circulation*, *Cell Metab*, *Blood*, *Hepatology*, and *Blood Adv*. Three patents have been applied, one of which is in the transformation stage. The series of research results have been widely concerned and recognized by the international counterparts.

近 2 年代表性成果

- 1) Jiang HJ, Yu Z, Ding N, et al. The role of AGK in thrombocytopoiesis and possible therapeutic strategies[J]. *Blood*, 2020, 136(1): 119-129.
- 2) Xu Y, Jiang H, Li L, et al. Branched-chain amino acid catabolism promotes thrombosis risk by enhancing tropomodulin-3 propionylation in platelets[J]. *Circulation*, 2020, 142(1): 49-64.
- 3) Hu Z, Qu G, Yu X, et al. Acylglycerol kinase maintains metabolic state and immune responses of CD8⁺ T cells[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(2): 290-302. e5.