



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111670198 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 15

(21) 申请号 201880072254.0

(22) 申请日 2018.09.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111670198 A

(43) 申请公布日 2020.09.15

(30) 优先权数据
2017903685 2017.09.11 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2018/050985 2018.09.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/046912 EN 2019.03.14

(73) 专利权人 莫纳什大学
地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 J·哈密尔顿 M·斯利曼

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 郑天松

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0107072 A1, 2001.02.01

W0 9943809 A2, 1999.09.02

Takeshi Sangawa等. A Murine Monoclonal Antibody That Binds N-Terminal Extracellular Segment of Human Protease-Activated Receptor-4.《HYBRIDOMA》.2008, 第27卷(第5期),

Shauna L. French等. A function-blocking PAR4 antibody is markedly antithrombotic in the face of a hyperreactive PAR4 variant.《Blood Advances》.2018, 第11卷(第2期),

Michele M. Mumaw等. Development and characterization of monoclonal antibodies against Protease Activated Receptor 4 (PAR4).《Thrombosis Research》.2015, 第135卷

S . L . FRENCH等. Inhibition of protease-activated receptor 4 impairs platelet procoagulant activity during thrombus formation in human blood.《Journal of Thrombosis and Haemostasis》.2016, 第14卷

审查员 杨佳倩

权利要求书2页 说明书68页
序列表39页 附图21页

(54) 发明名称

人凝血酶受体PAR4的结合蛋白

(57) 摘要

本公开涉及人蛋白酶活化受体4(PAR4)结合蛋白(例如抗体)。特别地,作为人PAR4的拮抗剂的抗PAR4结合蛋白以及其方法和用途。

1. 一种蛋白酶活化受体4 (PAR4) 结合蛋白, 所述蛋白酶活化受体4 (PAR4) 结合蛋白是抗 PAR4 重组或合成或单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PAR4 结合蛋白特异性地结合至跨越 PAR4 的凝血酶切割位点的表位, 且包含:

(i) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的可变重链 (VH), 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的可变轻链 (VL), 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18;

(ii) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VH, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:49, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VL, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51 和 SEQ ID NO:52;

(iii) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VH, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:26, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VL, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:29;

(iv) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VH, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:56, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VL, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:58;

(v) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VH, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:61, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VL, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:62;

(vi) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VH, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:73 和 SEQ ID NO:74, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VL, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:58; 或

(vii) 具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VH, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87 和 SEQ ID NO:88, 和

具有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的 VL, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别由下列序列组成: SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:51 和 SEQ ID NO:85。

2. 根据权利要求 1 所述的 PAR4 结合蛋白, 其中所述蛋白质在凝血酶存在下抑制细胞表面表达 PAR4 的 50% 或更高的切割。

3. 根据权利要求 1 所述的 PAR4 结合蛋白, 其包含:

(i) SEQ ID NO:11 所示的 VH 和 SEQ ID NO:12 所示的 VL;

(ii) SEQ ID NO:45 所示的 VH 和 SEQ ID NO:46 所示的 VL;

(iii) SEQ ID NO:22 所示的 VH 和 SEQ ID NO:23 所示的 VL;

(iv) SEQ ID NO:53 所示的 VH 和 SEQ ID NO:54 所示的 VL;

(v) SEQ ID NO:89 所示的 VH 和 SEQ ID NO:90 所示的 VL;

- (vi) SEQ ID NO:97所示的VH和SEQ ID NO:98所示的VL;或
- (vii) SEQ ID NO:107所示的VH和SEQ ID NO:108所示的VL。
4. 根据权利要求1~3之任一项所述的PAR4结合蛋白，其中所述表位包含选自下列的序列或由选自下列的序列组成：
- (i) APRGY；
- (ii) ILPAPRGY；或
- (iii) APRGYPGQV，并且
- 其中所述凝血酶切割位点对应于RG。
5. 根据权利要求1所述的PAR4结合蛋白，其中所述抗体结合至人PAR4的Ala120和/或Thr120变体。
6. 根据权利要求1所述的PAR4结合蛋白，其中所述蛋白质不结合至人PAR1、PAR2或PAR3。
7. 根据权利要求1~3之任一项所述的PAR4结合蛋白，其中所述抗原结合片段是：
- (i) 单链Fv片段(scFv)；
- (ii) 二聚scFv(di-scFv)；
- (iii) 连接至重链恒定区或Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3的(i)和/或(ii)中的至少一者。
8. 根据权利要求1~3之任一项所述的PAR4结合蛋白，所述PAR4结合蛋白缀合至部分，其中所述部分选自由以下组成的组：放射性同位素、可检测标记、治疗化合物、胶体、毒素、核酸、肽、蛋白质、增加所述PAR4结合蛋白在受试者中的半衰期的化合物以及它们的混合物。
9. 一种核酸，所述核酸编码根据权利要求1~3之任一项所述的PAR4结合蛋白。
10. 根据权利要求9所述的核酸，其中所述PAR4结合蛋白包含：
- (i) SEQ ID NO:20中列出的VH核酸序列，和SEQ ID NO:21中列出的VL核酸序列；或
- (ii) SEQ ID NO:30中列出的VH核酸序列，和SEQ ID NO:31中列出的VL核酸序列。
11. 一种组合物，所述组合物包含根据权利要求1至3中任一项所述的PAR4结合蛋白和适合的载体。
12. 根据权利要求1至3中任一项所述的PAR4结合蛋白或根据权利要求11所述的组合物在制备用于治疗、预防或缓解受试者的血栓形成或血栓栓塞性病症的药物中的用途。

人凝血酶受体PAR4的结合蛋白

[0001] 【以引用的方式并入】

[0002] 本文所引用或参考的所有文件和本文引用的文件中引用或参考的所有文件,以及本文提及的任何产品或在本文中引用的方式并入的任何文件中的任何制造商说明书、描述、产品说明书和产品清单特此以引用的方式整体并入本文。

[0003] 本申请要求2017年9月11日提交的澳大利亚专利申请2017903685的优先权,所述申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0004] 序列表电子提交的全部内容出于所有目的以引用的方式整体并入。

【技术领域】

[0005] 本公开涉及人蛋白酶活化受体4 (PAR4) 结合蛋白(例如抗体)。特别地,作为人PAR4的拮抗剂的抗PAR4结合蛋白以及其方法和用途。

[0006] 【发明背景】

[0007] 活化的血小板是动脉血栓形成的关键细胞组分,动脉血栓形成是世界上死亡和残疾的最常见原因(Rosendaal FR等人(2014) 384:1653-4),占许多国家的死亡的近40%(Mozaffarian D等人(2015)Circulation 131e29-322),包括澳大利亚(澳大利亚统计局,Causes of Death,Australia,2011 3303第42011章(2013))。动脉血栓形成导致心脏病发作和缺血性中风。

[0008] 血小板是形成动脉血栓的细胞。血小板由触发血小板凝集的内源性激动剂与促进凝血的组合活化,它们一起促进病理性血栓形成。抗血小板药物因此构成预防动脉血栓形成的主要药物疗法。然而,尽管有许多此类剂,但是在安全性和/或功效方面的局限性使得合理化新药物靶标成为必要。在广泛临床环境中迫切需要改进的抗血小板药物,并且对开发新剂非常感兴趣。

[0009] 凝血酶是人血小板的最有效的已知活化剂,并且也是凝血级联的关键效应蛋白酶。凝血酶主要经由蛋白酶活化的细胞表面受体(PAR)即PAR1和PAR4活化血小板,成为人体最有效的血小板活化剂(Vu T-KH等人(1991)Cell 64:1057-68;Coughlin SR(1992)J Clin Invest 99:351-5;Coughlin SR(2000)Nature 407:258-64)。丧失受体属于七次跨膜受体、即G蛋白偶联受体(GPCR)的独特家族,所述受体通过它们的N-末端的蛋白水解而活化。一旦切割,新暴露的N-末端就充当通过结合细胞外环2活化受体的拴系配体(Vu T-KH等人(1991)Cell 64:1057-68)。PAR家族中有4个成员(PAR1-4)广泛表达并且被多种蛋白酶活化。

[0010] 缺乏所有血小板PAR功能的小鼠(PAR4^{-/-})被保护免受血栓形成,且不显示自发性出血(Hamilton J等人(2004)Thromb Haemost 2:1429-35;Hamilton J等人(2009)Blood Rev 23:61-5),从而表明靶向这些受体进行抗血栓治疗的潜力。人血小板上存在两种主要PAR,PAR1和PAR4。在这些之中,PAR1是较高亲和力的凝血酶受体,并且已成为使用已在临床试验中被评价的两种PAR1拮抗剂,即阿托帕沙(E5555)(Goto S等人(2010)Eur Heart J 31:2601-13)和沃拉帕沙(Tricoci P等人(2012)New Engl J Med 366:20-33;Morrow DA等

人(2012)New Engl J Med 366:1404-13)进行抗血小板药物开发的焦点。沃拉帕沙于2014年底获得US FDA批准,并且由TGA于2016年中期计划用于预防心肌梗塞和外周动脉疾病。但是,沃拉帕沙与单一或双重抗血小板疗法的组合与显著增加的颅内出血率相关,特别是在具有中风病史或其它易感因素的患者中(Tricoci P等人(2012)New Engl J Med 366:20-33;Morrow DA等人(2012)New Engl J Med 366:1404-13)。

[0011] 因此,PAR4拮抗剂的开发已引起极大的兴趣。PAR4的功能作用主要关于血小板阐明。区别PAR4的关键特征是其与PAR1和ADP受体P2Y₁₂两者形成异寡聚体的能力,这使得PAR4影响凝血酶和ADP引发的信号传导(Li D等人(2011)J Biol Chem 286:3805-14)。两种血小板PAR之间的一种主要区别涉及细胞内信号传导的动力学(Holinstat M等人(2006)J Biol Chem 281:26665-74;Voss B等人(2007)Mol Pharmacol 71:1399-406;Holinstat M等人(2007)Mol Pharmacol 71:686-94)。PAR1和PAR4两者均经由G_q发出信号,以动员细胞内钙并驱动血小板功能,包括整联蛋白活化、颗粒分泌和磷脂酰丝氨酸(PS)暴露。然而,PAR4活化比PAR1活化诱导更慢且更持续的细胞内钙信号(Covic L等人(2002)PNAS 99:643-8)。钙信号传导的这种时间差异可部分归因于PAR4切割位点C-末端的阴离子序列(Jacques S等人(2003)Biochem J 376:733-40)。PAR4下游的这种持续血小板活化的细胞后果尚未完全表征,但鉴于这些现象对持续的、升高的细胞内钙水平的依赖,可能涉及持续的血小板分泌动力学(Jonnalagadda D等人(2012)120:5209-16)和血小板促凝功能(Williamson P等人(1995)34:10448-55;Dachary-Prigent J等人(1995)Biochemistry 34:11625-34)。

[0012] 尚无研究检查PAR4对人血栓形成环境中的促凝血活性的贡献,这可能是由于此类研究所需的适当PAR4拮抗剂的可用性有限。最常用的PAR4拮抗剂是小分子YD-3(Wu CC等人(2000)Br J Pharmacol 130:1289-96)、肽模拟物tc-YPGKF-NH₂(Hollenberg MD等人(2001)79:439-42)以及pepducin P4pal-10和P4pal-il(Leger AJ等人(2006)Circulation 113:1244-54;Covic L等人(2002)PNAS 99:643-8;Stampfuss JJ等人(2003)Nat Med 9:1447)。然而,在使用人血小板的研究中,这些剂没有广泛获得(例如YD-3)或据报告缺乏特异性(例如pepducin)和/或功效(例如tc-YPGKF-NH₂) (Stampfuss JJ等人(2003)Nat Med 9:1447;Hollenberg MD等人(2004)Br J Pharmacol 143:443-54;Wu CC等人(2002)Thromb Haemost 87:1026-33)。目前正在检查处于早期临床试验的PAR4拮抗剂(BMS-986141)用于治疗血栓形成,然而,常见的PAR4变体(在19%-82%的人中存在,取决于群体)使所述受体对小分子抑制剂如BMS-986141不敏感。

[0013] 基于前述内容,对于技术人员显而易见的是,鉴定用于药物治疗血栓形成的改进的人PAR4结合蛋白将是有益的。此外,具有最小不良副作用的血栓形成治疗是显著未满足的医疗需求。因此,在本领域中需要PAR4拮抗剂,所述PAR4拮抗剂提供优于现有策略的优点并且在治疗或预防血栓形成方面提供相对于靶向PAR1改进的治疗特征谱。

【发明内容】

[0014] 当前的临床计划正在开发小分子正构PAR4抑制剂。然而,最近揭示,这种方法在大部分患者中完全无效。具体地,PAR4中的单核苷酸多态性(SNP;rs773902)使受体对正构PAR4拮抗作用不敏感(Edelstein LC等人(2014)Blood 124:3450-3458)。这种小核苷酸多

态性(SNP)决定氨基酸120是丙氨酸(Ala120)还是苏氨酸(Thr120)。药理学研究表明,正构PAR4拮抗作用有效抑制基因分型为Ala120的患者中的PAR4诱导的血小板活化,但即使在高浓度下,对来自基因分型为Thr120的血小板也完全没有影响。杂合性仅导致部分抑制(Edelstein LC等人(2014)Blood 124:3450-3458)。抗抑制剂的Thr120形式的PAR4的频率非常高(在一些群体中>80%),从而表明这种拮抗作用不敏感性的影响显著。Thr120等位基因具有种族二态性,在154个北美洲人的群组中在63%的自我鉴定的黑人中出现,相比之下白人为19%。来自人基因组多样性计划(HGDP)的数据显示,SNP rs773902并非是区域特异性的,撒哈拉以南非洲地区多达80%的人以及约三分之二的巴布亚人和美拉尼西亚人具有Thr120 PAR4变体。

[0015] 除了使PAR4对正构抑制剂具有抗性外,SNP rs773902还提高PAR4对受体活化的敏感性,从而使得具有Thr120变体的患者中血小板过度活跃(Edelstein LC等人(2013)Nat Med 19:1609-1616)。在用标准护理抗血小板药物(阿司匹林和/或P2Y₁₂抑制剂)治疗的患者中,这种增加的PAR4功能持续存在。

[0016] 本发明人开发了特异性地结合至人PAR4并抑制凝血酶对PAR4的活化的单克隆抗体。因此,这些抗体是凝血酶诱导的PAR4切割的拮抗剂。本发明人所鉴定的抗体能够拮抗或减少PAR4介导的事件(例如血栓形成)。此外,本发明人已经发现,与靶向PAR1(现有技术抗体的常见靶标)相比,靶向PAR4不太可能引起出血并发症,这是由于其独特的作用机制和总体上更广泛的安全性特征。

[0017] 特别地,本发明人所鉴定的抗体针对两种PAR4受体变体,即Ala120和Thr120均有效,这意味着它们对所有受试者(不仅仅是具有敏感性PAR4变体的那些受试者)的血栓栓塞性病症的治疗均有效。另外,因为所述抗体以与PAR1的最小交叉反应性特异性地结合至PAR4,所以出血并发症可最小化或避免。因此,本发明的抗体因此不同于现有技术的PAR1拮抗剂和PAR4小分子抑制剂。

[0018] 另外,本发明人发现,所述抗体显著抑制凝血酶诱导的人血小板的PAR4切割和聚集。此外,可通过使所述抗体与免疫肽竞争来逆转这些作用。

[0019] 因此,本公开提供了用于诊断或预测受试者的血栓形成的各种试剂。本公开还提供了用于治疗、预防或改善受试者的血栓形成或血栓栓塞性病症的方法。

[0020] 本公开提供了一种包含抗原结合结构域的PAR4结合蛋白,其中所述抗原结合结构域特异性地结合至人PAR4,并且其中所述蛋白质拮抗至少一种PAR4介导的事件(例如血栓形成)。在一个实例中,所述蛋白质在凝血酶存在下拮抗至少一种PAR4介导的事件(例如血栓形成)。

[0021] 在一个实例中,抗原结合结构域来自或源自非抗体PAR4结合蛋白。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白不是小分子拮抗剂,例如在W02013/163244中描述的咪唑并噻二唑衍生物或例如在US7879792中描述的合成肽类似物。

[0022] 本公开还提供了一种人PAR4结合蛋白,所述人PAR4结合蛋白包含抗PAR4抗体的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域特异性地结合至PAR4,并且其中所述蛋白质在与表达PAR4的细胞接触时拮抗至少一种PAR4介导的事件(例如血栓形成)。在一个实例中,所述蛋白质在凝血酶存在下拮抗至少一种PAR4介导的事件(例如血栓形成)。

[0023] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白抑制表达PAR4的细胞(例如血小板)的细胞表面

上磷脂酰丝氨酸(PS)的外在化。在一个实例中,当通过全血血栓形成测定测量时,所述PAR4结合蛋白减小血栓体积。

[0024] 本公开提供了一种蛋白酶活化受体4(PAR4)结合蛋白,所述蛋白酶活化受体4(PAR4)结合蛋白是抗PAR4重组或合成或单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述PAR4结合蛋白基本上抑制由凝血酶诱导的人PAR4切割。

[0025] 本领域的技术人员将能够使用适当的体外测定来测量PAR4切割。作为非限制性实例,可在其表面上表达荧光标记的加标签的PAR4蛋白的细胞系中评估PAR4切割。在存在凝血酶的情况下PAR4的切割导致FLAG从细胞表面损失,这可进行量化。在一个特定实例中,可在转染的HEK293细胞中测定PAR4切割,所述HEK293细胞包含编码含有荧光标记的FLAG标签的PAR4的核酸。在凝血酶(例如0.1U/ml)存在下PAR4的切割导致FLAG从细胞表面损失,这可通过使用流式细胞术来定量。

[0026] 在一个实例中,在凝血酶存在下,所述结合蛋白将细胞表面表达的人PAR4的切割抑制等于或大于50%。

[0027] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白特异性地结合至跨越人PAR4的凝血酶切割位点的表位。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白特异性地结合至表位,所述表位包含在如GDDSTPSILPAPRGYPGQVC(SEQ ID NO:2)中列出的序列内所含的残基。在一个实例中,所述肽由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2组成。例如,所述肽在噬菌体的表面上展示。

[0028] 在另一个实例中,表位包含序列APRGY(SEQ ID NO:42),其中凝血酶切割位点对应于RG。在另一个实例中,所述表位包含选自ILPAPRGY(SEQ ID NO:43)或APRGYPGQV(SEQ ID NO:44)的序列或由所述序列组成。在另一个实例中,PAR4结合蛋白特异性地结合至包含如PRGYPG(SEQ ID NO:1)所列出的序列的表位。

[0029] 在一个实例中,PAR4结合蛋白特异性地结合至人PAR4的Ala120或Thr120变体。在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至人PAR4的Ala120和Thr120变体两者。

[0030] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至根据SEQ ID NO:19的人PAR4序列中的凝血酶切割位点。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至匹配SEQ ID NO:19中列出的人PAR4序列的残基35-54的序列。在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至如SEQ ID NO:2所列出的序列,任选地另外包含钥孔虫凝血蓝蛋白(KLH)或其它免疫刺激分子。在另一实例中,所述PAR4结合蛋白结合至SEQ ID NO:4中列出的序列。

[0031] 在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至如SEQ ID NO:2所列出的序列,任选地另外包含C-末端GGGG和链霉亲和素-k/生物素(SKB)。在一个实例中,所述PAR4蛋白结合至如SEQ ID NO:7所列出的序列。

[0032] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白不结合或基本上不结合至人PAR3、PAR2或PAR1。

[0033] 在另一实例中,所述PAR4结合蛋白不结合或基本上不结合至选自由以下组成的组的PAR序列:SEQ ID NO:3(小鼠PAR4)、SEQ ID NO:8(人PAR3)、SEQ ID NO:9(人PAR2)或SEQ ID NO:10(人PAR1)。

[0034] 在一个实例中,通过固定肽(例如,根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的肽)并且使所述肽与所述PAR4结合蛋白接触来评估结合水平。

[0035] 本文所述的具有此类结合特征的示例性PAR4结合蛋白包含指定为5ARC3.F10b.H4b(以下称为5A.RC3)或5F.RF3.A7b.A1(以下称为5F.RF3)的抗体的可变区

和/或CDR。

[0036] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7中列出的序列组成的肽,或者以与指定为5A.RC3、51.RG1、5F.RG3、5G.RA1、5D.RH4、5H.RH4、5G.RF6、5G.RD6、5H.RA3、5G.RG1、5H.RG4、5G.RC5、5F.RE6、5H.RF2的抗体相似或基本上同一的水平或以相似或基本上同一的亲合力结合至人PAR4。

[0037] 在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白竞争性地抑制指定为5A.RC3、51.RG1、5F.RG3、5G.RA1、5D.RH4、5H.RH4、5G.RF6、5G.RD6、5H.RA3、5G.RG1、5H.RG4、5G.RC5、5F.RE6、5H.RF2的抗体与人PAR4的结合。在另一实例中,所述蛋白质竞争性地抑制指定为5A.RC3、51.RG1、5F.RG3、5G.RA1、5D.RH4、5H.RH4、5G.RF6、5G.RD6、5H.RA3、5G.RG1、5H.RG4、5G.RC5、5F.RE6、5H.RF2的抗体与由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7中列出的序列组成的肽的结合。

[0038] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白以抗体所结合的量的75%以内的量结合至肽,所述肽由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7中列出的序列组成,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中列出的序列的VH以及含有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108中列出的序列的VL。

[0039] 在一个实例中,通过使所述PAR4结合蛋白与由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7中列出的序列组成的肽接触和与所述肽接触的PAR4结合蛋白的量(例如10 μ g/ml)来评估所结合的蛋白质或抗体的量。然后测定与所述肽结合的PAR4结合蛋白的量并将所述量与结合至所述肽的抗体的量进行比较,所述抗体分别包含含有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中列出的序列的VH以及含有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108中列出的序列的VL。在一个实例中,结合至所述肽的PAR4结合蛋白的量在抗体结合的量的约80%或70%或60%或40%之内。

[0040] 本公开还提供了一种PAR4结合蛋白,所述PAR4结合蛋白竞争性地抑制指定为以下抗体:

[0041] (i) 5A.RC3,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:12中列出的序列的VL;

[0042] (ii) 5I.RG1,所述5I.RG1包含含有SEQ ID NO:45中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:46中列出的序列的VL;

[0043] (iii) 5F.RF3,所述5F.RF3包含含有SEQ ID NO:22中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:23中列出的序列的VL;

[0044] (iv) 5G.RA1,所述5G.RA1包含含有SEQ ID NO:53中列出的序列的VH和含有SEQ ID

NO:54中列出的序列的VL;

[0045] (v) 5D.RH4,所述5D.RH4包含含有SEQ ID NO:89中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:90中列出的序列的VL;

[0046] (vi) 5H.RH4,所述5H.RH4包含含有SEQ ID NO:91中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:92中列出的序列的VL;

[0047] (vii) 5G.RF6,所述5G.RF6包含含有SEQ ID NO:93中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:94中列出的序列的VL;

[0048] (viii) 5G.RD6,所述5G.RD6包含含有SEQ ID NO:95中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:96中列出的序列的VL;

[0049] (ix) 5H.RA3,所述5H.RA3包含含有SEQ ID NO:97中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:98中列出的序列的VL;

[0050] (x) 5G.RG1,所述5G.RG1包含含有SEQ ID NO:99中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:100中列出的序列的VL;

[0051] (xi) 5H.RG4,所述5H.RG4包含含有SEQ ID NO:103中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:104中列出的序列的VL;

[0052] (xii) 5G.RC5,所述5G.RC5包含含有SEQ ID NO:103中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:104中列出的序列的VL;

[0053] (xiii) 5F.RE6,所述5F.RE6包含含有SEQ ID NO:105中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:106中列出的序列的VL;或

[0054] (xiv) 5H.RF2,所述5H.RF2包含含有SEQ ID NO:107中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:108中列出的序列的VL;与包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7中列出的序列或由所述序列组成的肽或与人PAR4(例如SEQ ID NO:19)的结合。

[0055] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白减少了凝血酶诱导的在细胞表面(例如,用含有N-末端FLAG标签的PAR4转染的HEK293细胞)上表达的人PAR4的切割(即具有PAR4拮抗剂活性)。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白(例如浓度为10 μ g/ml)减少了凝血酶诱导的表达PAR4的HEK293细胞(例如约5 \times 10⁴个细胞)的切割(例如在0.1U/ml下)。具有这种活性的示例性抗体包含抗体5A.RC3、5I.RG1、5F.RF3、5G.RA1、5D.RH4、5H.RH4、5G.RF6、5G.RD6、5H.RA3、5G.RG1、5H.RG4、5G.RC5、5F.RE6或5H.RF2的可变区或互补决定区(CDR)或包含它们的CDR的抗体。

[0056] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至包含如本文所述的人PAR4的凝血酶切割位点的肽或结合至人PAR4的N-末端细胞外区域的亲和力解离常数(KD)为2nM或更小,如1.5nM或更小,例如1nM或更小。在一个实例中,所述KD介于约0.01nM至约2nM之间,例如介于约0.05nM至约1nM之间,例如介于约0.1nM至约1nM之间,例如介于约0.3nM至约1nM之间。在一个实例中,所述KD介于约0.01nM与1nM之间,如介于约0.05nM与0.9nM之间,例如介于约0.09nM与0.7nM之间,例如介于约0.1nM与0.6nM之间。

[0057] 在一个实例中,通过利用链霉亲和素芯片并在所述芯片的表面上捕获生物素偶联的人PAR4肽(例如,根据SEQ ID NO:7的肽)并在其上传递所述PAR4结合蛋白来评估KD。

[0058] 在一个实例中,通过利用链霉亲和素芯片并在所述芯片的表面上捕获生物素偶联的人PAR4肽(例如,根据SEQ ID NO:7的肽)并在其上传递所述PAR4结合蛋白来评估KD。

[0059] 当通过SA芯片生物素肽SPR评估时,本公开的示例性PAR4结合蛋白具有介于约0.01与0.61之间的KD。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白具有约0.4nM(例如 \pm 0.1nM)的KD。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白具有如表4中所示的KD,对应于其中的PAR4结合蛋白中的任一种。

[0060] 在一个实例中,本公开的PAR4结合蛋白特异性地结合至人PAR4。在一个实例中,通过ELISA和高通量抗原微阵列来评估蛋白质的结合。

[0061] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白结合至人PAR4中的相同表位或人PAR4中与以下抗体所结合的表位重叠的表位:

[0062] (i) 5A.RC3,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:12中列出的序列的VL;

[0063] (ii) 5I.RG1,所述5I.RG1包含含有SEQ ID NO:45中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:46中列出的序列的VL;

[0064] (iii) 5F.RF3,所述5F.RF3包含含有SEQ ID NO:22中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:23中列出的序列的VL;

[0065] (iv) 5G.RA1,所述5G.RA1包含含有SEQ ID NO:53中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:54中列出的序列的VL;

[0066] (v) 5D.RH4,所述5D.RH4包含含有SEQ ID NO:89中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:90中列出的序列的VL;

[0067] (vi) 5H.RH4,所述5H.RH4包含含有SEQ ID NO:91中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:92中列出的序列的VL;

[0068] (vii) 5G.RF6,所述5G.RF6包含含有SEQ ID NO:93中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:94中列出的序列的VL;

[0069] (viii) 5G.RD6,所述5G.RD6包含含有SEQ ID NO:95中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:96中列出的序列的VL;

[0070] (ix) 5H.RA3,所述5H.RA3包含含有SEQ ID NO:97中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:98中列出的序列的VL;

[0071] (x) 5G.RG1,所述5G.RG1包含含有SEQ ID NO:99中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:100中列出的序列的VL;

[0072] (xi) 5H.RG4,所述5H.RG4包含含有SEQ ID NO:103中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:104中列出的序列的VL;

[0073] (xii) 5G.RC5,所述5G.RC5包含含有SEQ ID NO:103中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:104中列出的序列的VL;

[0074] (xiii) 5F.RE6,所述5F.RE6包含含有SEQ ID NO:105中列出的序列的VH和含有SEQ ID NO:106中列出的序列的VL;或

[0075] (xiv) 5H.RF2,所述5H.RF2包含含有SEQ ID NO:107中列出的序列的VH。

[0076] 本公开还提供了一种PAR4结合蛋白,所述PAR4结合蛋白特异性地结合至人PAR4并且是抗PAR4重组或合成或单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0077] 在一个实例中,所述抗体基本上抑制凝血酶对PAR4的切割。

[0078] 在一个实例中,PAR4在人血小板上表达。

[0079] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白是包含人重链和轻链恒定区序列的嵌合抗体。在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白是人源化或完全人抗体。

[0080] 在一个实例中,在凝血酶或PAR1拮抗剂存在下,所述PAR4结合蛋白将细胞表面表达的PAR4的切割抑制等于或大于60%。在其它实例中,所述蛋白质将PAR4的切割抑制至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少90%、至少92%、至少94%、至少95%、至少97%或100%。

[0081] 在另一个实例中,通过Flag标签从表达带flag标签的PAR4的HEK293细胞中的损失来测量凝血酶对PAR4的切割。在另一个实例中,通过流式细胞术测量切割。

[0082] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白不结合或基本上不结合至人PAR1、PAR2或PAR3。

[0083] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白包含如以下所列出的可变重链(VH)序列:

[0084] $QX_1QLVESGGGVVQPGRSRLSXC_2ASGFX_3X_4SX_5X_6GMHWVRQAPGKGLEWVX_7VIWX_8DGX_9X_{10}X_{11}X_{12}YX_{13}DSVX_{14}GRFX_{15}ISRDX_{16}SKNTX_{17}X_{18}LQMNX_{19}LRAEDTAVYYCAREX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}PFDYWGQGL$
VTVSS

[0085] 其中

[0086] X_1 是V或I;

[0087] X_2 是A或V;

[0088] X_3 是T或A;

[0089] X_4 是L或F;

[0090] X_5 是N或S;

[0091] X_6 是Y或D;

[0092] X_7 是S或A;

[0093] X_8 是Y或F;

[0094] X_9 是S或R;

[0095] X_{10} 是N或S;

[0096] X_{11} 是K或R;

[0097] X_{12} 是H或Y;

[0098] X_{13} 是A、L或T;

[0099] X_{14} 是K或R;

[0100] X_{15} 是T或D;

[0101] X_{16} 是N或T;

[0102] X_{17} 是L或Q;

[0103] X_{18} 是Y或F;

[0104] X_{19} 是S或I;

[0105] X_{20} 是S或T;

[0106] X_{21} 是I、S或A;

[0107] X_{22} 是V、I、M或L;

[0108] X_{23} 是E、S、V或I;

[0109] X_{24} 是V、T、R或G;

[0110] X_{25} 是L、R或G;并且

- [0111] X_{26} 是P或V。
- [0112] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白还包含以下中列出的可变轻链(VL)序列:
- [0113] X_1 I V L T Q S P G T L S L S P G E R X₂ T L S C X₃ X₄ S Q X₅ X₆ R X₇ X₈ Y L A W X₉ Q Q K P G Q A P R L
- [0114] X_{10} I Y G A S S R A T G X₁₁ P D R F S G S G S G T D F X₁₂ X₁₃ T I X₁₄ R L E P E D F A X₁₅ Y Y C Q Q Y G X₁₆ S Y T F G Q G T K L E I K
- [0115] 其中
- [0116] X_1 是K或E;
- [0117] X_2 是V或A;
- [0118] X_3 是R或G;
- [0119] X_4 是A或T;
- [0120] X_5 是R或S;
- [0121] X_6 是V或I;
- [0122] X_7 是N或S;
- [0123] X_8 是N或S;
- [0124] X_9 是F或Y;
- [0125] X_{10} 是F或L;
- [0126] X_{11} 是I或T;
- [0127] X_{12} 是I或T;
- [0128] X_{13} 是F或L;
- [0129] X_{14} 是S或T;
- [0130] X_{15} 是V或L;并且
- [0131] X_{16} 是N、R或S。
- [0132] 在一个实例中,所述VH包含选自由以下组成的组的CDR1序列:
- [0133] (i) GFTLSNYG (SEQ ID NO:13);
- [0134] (ii) GFTFSSDG (SEQ ID NO:59);
- [0135] (iii) GFTFSNYG (SEQ ID NO:68);
- [0136] (iv) GFTFSSYG (SEQ ID NO:55);
- [0137] (v) GFAFSSYG (SEQ ID NO:70);以及
- [0138] (vi) GFTLSSYG (SEQ ID NO:75)。
- [0139] 在一个实例中,所述VH包含选自由以下组成的组的CDR2序列:
- [0140] (i) IWYDGSNK (SEQ ID NO:14);
- [0141] (ii) IWFDGRNK (SEQ ID NO:60);
- [0142] (iii) IWYDGSNR (SEQ ID NO:71);以及
- [0143] (iv) IWYDGSSK (SEQ ID NO:76)。
- [0144] 在一个实例中,所述VH包含选自由以下组成的组的CDR3序列:
- [0145] (i) ARESIVEVLPPFDY (SEQ ID NO:15);
- [0146] (ii) ARESSISTRPPFDY (SEQ ID NO:61);
- [0147] (iii) ARETIMVRGVPFDY (SEQ ID NO:69);
- [0148] (iv) ARETALVRGVPFDY (SEQ ID NO:56);
- [0149] (v) ARETAMVRGVPFDY (SEQ ID NO:72);以及

[0150] (vi)ARETILIGGVFPDY (SEQ ID NO:77)。

[0151] 在一个实例中,所述VL包含选自由以下组成的组的CDR1序列:

[0152] (i)QRVRNNY (SEQ ID NO:16);

[0153] (ii)QSVRSSY (SEQ ID NO:57);和

[0154] (iii)QSIRSNY (SEQ ID NO:78)。

[0155] 在一个实例中,所述VL包含CDR2序列GAS (SEQ ID NO:28)。

[0156] 在一个实例中,所述VL包含选自由以下组成的组的CDR3序列:

[0157] (i)QQYGNSYT (SEQ ID NO:18);

[0158] (ii)QQYGRSYT (SEQ ID NO:62);和

[0159] (iii)QQYGSSYT (SEQ ID NO:58)。

[0160] 在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白包含以下中列出的可变重链 (VH) 序列:

[0161] 在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白包含如以下所列出的可变重链 (VH) 序列:

[0162] QVQLQQWGAGLLKPSETLX₁LX₂CAX₃X₄X₅GSX₆SX₇YX₈WX₉WIX₁₀QPPGKGLEWIGEIX₁₁HX₁₂GX₁₃
TX₁₄YNPSLKS₁₅RVTISVDTSKX₁₆QX₁₇SLX₁₈LSSVTAADTAVYYCX₁₉X₂₀EX₂₁SX₂₂SX₂₃GX₂₄YYYGMDVWGQTTV
TVSS

[0163] 其中

[0164] X₁是A或S;

[0165] X₂是T或A;

[0166] X₃是V或I;

[0167] X₄是Y或S;

[0168] X₅是G或S;

[0169] X₆是L或F;

[0170] X₇是N、D或T;

[0171] X₈是Y或F;

[0172] X₉是S或R;

[0173] X₁₀是R或H;

[0174] X₁₁是N或I;

[0175] X₁₂是S或T;

[0176] X₁₃是T或S;

[0177] X₁₄是N或T;

[0178] X₁₅是K或N;

[0179] X₁₆是F或L;

[0180] X₁₇是K或N;

[0181] X₁₈是A或K;

[0182] X₁₉是I、F或V;

[0183] X₂₀是Y或H;

[0184] X₂₁是N或S;

[0185] X₂₂是R、G或S;并且

[0186] X₂₃是V或H。

[0187] 在一个实例中, PAR4结合蛋白还包含以下中列出的可变轻链(VL)序列:

[0188] DIQMTQSPSSLSASX₁GDRX₂TITCRASQX₃ISX₄YLNWYQQX₅PGKAPX₆LLIYAASX₇LX₈SGVPSRFS
GS₉SGTDFTLTIS₁₀SLQPEDFX₉X₁₀YYCX₁₁QX₁₂YX₁₃TPLTFGGGTKX₁₄IK

[0189] 其中

[0190] X₁是V或A;

[0191] X₂是V或I;

[0192] X₃是S或T;

[0193] X₄是S、Y或N;

[0194] X₅是K或I;

[0195] X₆是N或K;

[0196] X₇是R或S;

[0197] X₈是R或Q;

[0198] X₉是T或A;

[0199] X₁₀是T或S;

[0200] X₁₁是Q或R;

[0201] X₁₂是T、S或N;

[0202] X₁₃是N或N;

[0203] X₁₄是E或G。

[0204] 在一个实例中, 所述VH包含选自由以下组成的组的CDR1序列:

[0205] (i) GGSLSDYIY (SEQ ID NO:86);

[0206] (iii) SGSFSTYF (SEQ ID NO:47); 和

[0207] (iv) GGSFSNYY (SEQ ID NO:66)。

[0208] 在一个实例中, 所述VH包含选自由以下组成的组的CDR2序列:

[0209] (i) INHSGTT (SEQ ID NO:87);

[0210] (ii) IIHTGST (SEQ ID NO:64); 或

[0211] (iii) INHSGST (SEQ ID NO:48)。

[0212] 在一个实例中, 所述VH包含选自由以下组成的组的CDR3序列:

[0213] (i) AIEYSNSRGGYYGMDV (SEQ ID NO:88);

[0214] (ii) AFEYSSSGGYYGMDV (SEQ ID NO:49); 和

[0215] (iii) KVEHSSSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:65)。

[0216] 在一个实例中, 所述VL包含选自由以下组成的组的CDR1序列:

[0217] (i) QTISNY (SEQ ID NO:109);

[0218] (ii) QSISSY (SEQ ID NO:50); 和

[0219] (iii) QTISYY (SEQ ID NO:66)。

[0220] 在一个实例中, 所述VL包含CDR2序列AAS (SEQ ID NO:51)。

[0221] 在一个实例中, 所述VL包含选自由以下组成的组的CDR3序列:

[0222] (i) RQNYNTPLT (SEQ ID NO:85);

[0223] (iii) QQTYSTPLT (SEQ ID NO:52); 或

[0224] (iv) QQSYSTPLT (SEQ ID NO:67)。

[0225] 本公开还提供了一种PAR4结合蛋白,所述PAR4结合蛋白包含具有CDR1、CDR2和CDR3序列的可变重链(VH),所述CDR1、CDR2和CDR3序列分别包含以下各项或由以下各项组成:

- [0226] (i)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15;
- [0227] (ii)SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:49;
- [0228] (iii)SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;
- [0229] (iv)SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:56;
- [0230] (v)SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61;
- [0231] (vi)SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65;
- [0232] (vii)SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:69;
- [0233] (viii)SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72;
- [0234] (ix)SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74;
- [0235] (x)SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77;
- [0236] (xi)SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81;
- [0237] (xii)SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:83;
- [0238] (xiii)SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74;或
- [0239] (xiv)SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87和SEQ ID NO:88。

[0240] 本公开还提供了一种PAR4结合蛋白,所述PAR4结合蛋白包含具有CDR1、CDR2和CDR3序列的可变轻链(VL),所述CDR1、CDR2和CDR3序列分别包含以下各项或由以下各项组成:

- [0241] (i)SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;
- [0242] (ii)SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52;
- [0243] (iii)SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29;
- [0244] (iv)SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:58;
- [0245] (v)SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:62;
- [0246] (vi)SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:67;
- [0247] (vii)SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:58;
- [0248] (viii)SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:58;
- [0249] (ix)SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:62;
- [0250] (x)SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:85;
- [0251] (xi)SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:58;
- [0252] (xii)SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:58;或
- [0253] (xiii)SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:85。

[0254] 在一个实例中,所述PAR-4结合蛋白包含:

[0255] (i) VH,所述VH包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任一个中列出的序列至少50%同一的序列,或其人源化、嵌合或脱免疫型式;和/或

[0256] (ii) VL,所述VL包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:

54、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108中列出的序列至少85%同一的序列,或其人源化、嵌合或脱免疫型式。

[0257] 在一个实例中,所述VH包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任一个至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%同一的序列。

[0258] 在一个实例中,所述VL包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108中的任一个至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%同一的序列。

[0259] 在一个实例中,所述VH包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%同一的序列,CDR序列除外。

[0260] 在一个实例中,所述VL包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%同一的序列,CDR序列除外。

[0261] 在一个实例中,所述CDR由IMGT编号系统定义。

[0262] 本公开还提供了一种PAR4结合蛋白,所述PAR4结合蛋白包含

[0263] (i)SEQ ID NO:11中列出的VH和SEQ ID NO:12中列出的VL;

[0264] (ii)SEQ ID NO:45中列出的VH和SEQ ID NO:46中列出的VL;

[0265] (iii)SEQ ID NO:22中列出的VH和SEQ ID NO:23中列出的VL;

[0266] (iv)SEQ ID NO:53中列出的VH和SEQ ID NO:54中列出的VL;

[0267] (v)SEQ ID NO:89中列出的VH和SEQ ID NO:90中列出的VL;

[0268] (vi)SEQ ID NO:91中列出的VH和SEQ ID NO:92中列出的VL;

[0269] (vii)SEQ ID NO:93中列出的VH和SEQ ID NO:94中列出的VL;

[0270] (viii)SEQ ID NO:95中列出的VH和SEQ ID NO:96中列出的VL;

[0271] (ix)SEQ ID NO:97中列出的VH和SEQ ID NO:98中列出的VL;

[0272] (x)SEQ ID NO:99中列出的VH和SEQ ID NO:100中列出的VL;

[0273] (xi)SEQ ID NO:101中列出的VH和SEQ ID NO:102中列出的VL;

[0274] (xii)SEQ ID NO:103中列出的VH和SEQ ID NO:104中列出的VL;

[0275] (xiii)SEQ ID NO:105中列出的VH和SEQ ID NO:106中列出的VL;或

[0276] (xiv)SEQ ID NO:107中列出的VH和SEQ ID NO:108中列出的VL;

[0277] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白抗原结合片段是:

[0278] (i)单链Fv片段(scFv)；

[0279] (ii)二聚scFv(di-scFv)；

[0280] (iii)连接至重链恒定区或Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3的(i)和/或(ii)中的至少一者；或

[0281] (iv)连接至结合至血小板的蛋白质(例如冯维勒布兰德因子(vWF))的(i)和/或(ii)中的至少一者。

[0282] 在本公开的另一个实例中,所述VL和VH处于单独的多肽链中。例如,所述PAR4结合蛋白是:

[0283] (i)双体抗体；

[0284] (ii)三体抗体；

[0285] (iii)四体抗体；

[0286] (iv)Fab；

[0287] (v)F(ab')₂；

[0288] (vi)Fv；或

[0289] (vii)连接至重链恒定区或Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3的(i)至(vi)中的至少一者；或

[0290] (viii)连接至结合至血小板的蛋白质(例如vWF)的(i)至(vi)中的至少一者。

[0291] 本公开还提供了一种包含如本文所述的VH和VL的嵌合抗体,其中所述VH连接至人重链恒定区,并且所述VL连接至人轻链恒定区。

[0292] 基于本文的公开内容,对于本领域技术人员而言显而易见的是,本公开的PAR4结合蛋白涵盖人、人源化、同人源化、嵌合和灵长类化蛋白质。

[0293] 本公开的抗体可属于任何类别,包括IgM、IgG、IgE、IgA、IgD或亚类。IgG的示例性亚类是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0294] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白是重组的。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白是合成的。

[0295] 在一个实例中,本公开的PAR4结合蛋白或抗体缀合至部分。例如,所述部分选自自由以下组成的组:放射性同位素、可检测标记、治疗化合物、胶体、毒素、核酸、肽、蛋白质、增加所述PAR4结合蛋白在受试者中的半衰期的化合物以及它们的混合物。

[0296] 本公开还提供了一种编码本公开的PAR4结合蛋白或抗体的分离的核酸。在一个实例中,所述PAR4结合蛋白或抗体包含SEQ ID NO:20中列出的VH核酸序列和/或SEQ ID NO:21中列出的VL核酸序列。在另一个实例中,所述PAR4结合蛋白或抗体包含SEQ ID NO:30中列出的VH核酸序列和/或SEQ ID NO:31中列出的VL核酸序列。

[0297] 本公开另外提供了一种表达构建体,所述表达构建体包含可操作地连接至启动子的本公开的核酸。这种表达构建体可处于载体中,例如处于质粒中。

[0298] 在涉及单一多肽PAR4结合蛋白的本公开的实例中,所述表达构建体可包含连接至编码所述多肽链的核酸的启动子。

[0299] 在涉及形成PAR4结合蛋白的多种多肽的实例中,本公开的表达构建体包含可操作地连接至启动子的编码所述多肽中的一种(例如,包含VH)的核酸和可操作地连接至另一启动子的编码所述多肽中的另一种(例如,包含VL)的核酸。

[0300] 在另一个实例中,所述表达构建体是双顺反子表达构建体,例如,包含呈5'至3'顺序的以下可操作地连接的组分:

[0301] (i) 启动子

[0302] (ii) 编码第一多肽的核酸;

[0303] (iii) 内部核糖体进入位点;以及

[0304] (iv) 编码第二多肽的核酸。

[0305] 例如,所述第一多肽包含VH且所述第二多肽包含VL,或者所述第一多肽包含VL且所述第二多肽包含VH。

[0306] 本公开还考虑了分离的表达构建体,所述表达构建体中的一者编码第一多肽(例如,包含VH和任选的重链恒定区或其一部分),并且所述表达构建体中的另一者编码第二多肽(例如,包含VL和任选的轻链恒定区)。例如,本公开还提供了一种组合物,所述组合物包含:

[0307] (i) 第一表达构建体,所述第一表达构建体包含编码多肽(例如,包含可操作地连接至启动子的VH)的核酸;以及

[0308] (ii) 第二表达构建体,所述第二表达构建体包含编码多肽(例如,包含可操作地连接至启动子的VL)的核酸,

[0309] 其中所述第一多肽与所述第二多肽缔合以形成本公开的PAR4结合蛋白。

[0310] 本公开另外提供了一种分离的细胞,所述分离的细胞表达本公开的PAR4结合蛋白或抗体;或一种被遗传修饰为表达本公开的PAR4结合蛋白或抗体的重组细胞。在一个实例中,所述细胞是分离的杂交瘤。在另一个实例中,所述细胞包含本公开的核酸或表达构建体,或:

[0311] (i) 第一表达构建体,所述第一表达构建体包含可操作地连接至启动子的编码多肽(例如,包含VH)的核酸;以及

[0312] (ii) 第二表达构建体,所述第二表达构建体包含可操作地连接至启动子的编码多肽(例如,包含VL)的核酸,

[0313] 其中所述第一多肽与所述第二多肽缔合以形成本公开的PAR4结合蛋白或抗体。

[0314] 本公开另外提供了一种组合物,所述组合物包含本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞以及适合的载体。在一个实例中,所述组合物包含本公开的PAR4结合蛋白。

[0315] 在一个实例中,所述载体式药学上可接受的。

[0316] 本公开的组合物可单独或与其它治疗、治疗剂或剂组合同时地或顺序地施用。

[0317] 本公开另外提供了一种用于治疗或预防受试者的血栓形成或血栓栓塞性病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞或组合物。在一个实例中,所述受试者是处于PAR4介导的事件如血栓形成的风险的受试者。在一个实例中,所述受试者是患有或先前曾患有PAR4介导的事件(例如血栓形成)的受试者。

[0318] 在一个实例中,所述方法包括向所述受试者施用抗体,所述抗体包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ

ID NO:103、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任一个中列出的序列或其人源化或脱免疫型式；以及VL，所述VL包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108中的任一个中列出的序列或其人源化或脱免疫型式。

[0319] 本公开另外提供用于医学中的本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞或组合物。

[0320] 本公开另外提供用于治疗或预防PAR4介导的事件(例如血栓形成)的本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞或组合物。

[0321] 在一个实例中，本公开提供了一种治疗、预防或改善血栓形成或血栓栓塞性病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞的组合物。

[0322] 在一些实例中，本公开提供了一种治疗、预防或改善有需要的受试者的血栓形成的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞或组合物。

[0323] 在一个实例中，本公开提供了一种降低与外科手术相关的血栓形成的风险的方法，所述方法包括在外科手术之前和/或之后向所述受试者施用本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞或组合物。在一个实例中，所述外科手术是肝移植，并且血栓形成是肝动脉血栓形成。

[0324] 在一些实例中，本公开提供了一种用于确定根据本公开的PAR4结合蛋白或抗体的剂量是否适当的方法。此类方法包括(i)从已经用本公开的PAR4结合蛋白或抗体治疗的受试者获得血液样品，(ii)在体外用PAR4激动剂处理来自所述血液样品的血小板，(iii)测量血小板活化；以及(iv)将用所述PAR4结合蛋白或抗体处理后的血液样品中的血小板活化与用所述PAR4结合蛋白或抗体处理之前获得的血液样品中的血小板活化进行比较。

[0325] 适合的PAR4激动剂的实例是本领域技术人员熟悉的。非限制性实例包括激动剂肽，如AYPGKF-NH₂(Tocris)。

[0326] 在一个实例中，根据本文实施例中例示的方法测量血小板活化。

[0327] 在一些实施方案中，本公开包括一种抑制或预防血小板凝集的方法，所述方法包括将治疗有效量的根据本公开的PAR4结合蛋白施用至有需要的受试者(如人)的步骤。

[0328] 在一些实例中，本公开提供了一种治疗或预防血栓形成或血栓栓塞性病症的方法，所述方法涉及向有需要的受试者(例如人)施用治疗有效量的根据本公开的PAR4-结合蛋白并且抑制PAR4切割和/或信号转导，其中所述受试者具有双重PAR1/PAR4血小板受体库。

[0329] 优选地，所述受试者是人。

[0330] 本公开另外提供了本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞或组合物在医学中的用途。

[0331] 本公开另外提供了本公开的PAR4结合蛋白或核酸或表达构建体或细胞在制造用于治疗或预防血栓形成或血栓栓塞性病症的药物中的用途。

[0332] 本公开另外提供了一种用于检测样品中的PAR4的方法，所述方法包括使样品与本

公开的PAR4结合蛋白或抗体接触以使得抗原-蛋白质复合物形成,以及检测所述复合物,其中检测到所述复合物指示所述样品中的PAR4。

[0333] 本公开还提供了一种疫苗抗原,所述疫苗抗原包含根据SEQ ID NO:4的序列或由其组成,以及用于产生人PAR4的拮抗剂抗体的药学上可接受的载体。

[0334] 本公开还提供了在凝血酶存在下不会或仅部分地抑制PAR-4的切割的PAR-4结合蛋白。

[0335] 因此,在一个实例中,本公开还提供了一种PAR4结合蛋白,所述PAR4结合蛋白包含:

[0336] (i) VH,所述VH包含与SEQ ID NO:32中列出的序列至少50%同一的序列,或其人源化、嵌合或脱免疫形式;和/或

[0337] (ii) VL,所述VL包含与SEQ ID NO:33中列出的序列至少85%同一的序列,或其人源化、嵌合或脱免疫形式。

【附图说明】

[0338] 图1示出PAR4的凝血酶切割和活化位点的细胞外位置以及本文所述的抗体的抗PAR4靶区域的示意图。

[0339] 图2示出如通过流式细胞术所定量,用含有N-末端FLAG标签的人PAR4转染的HEK293细胞的细胞表面上存在的完整PAR4的百分比。在用凝血酶(2U/ml持续10分钟)处理之前,用从第一杂交瘤筛选(MoB5ARC3、MoB5BRB4、MoB5BRC6、MoB5BBRH3和MoB5CRC4)获得的五种不同杂交瘤上清液对细胞进行预处理。阳性对照是多克隆抗PAR4抗体(French等人(2016) *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14:1642-1654)。数据是三个单独数据点的平均值±平均值的标准误差。

[0340] 图3示出如通过流式细胞术所定量,用含有N-末端FLAG标签的人PAR4转染的HEK293细胞的细胞表面上存在的完整PAR4的百分比(如通过FLAG表位%所测量)。在用凝血酶处理(2U/ml持续10分钟)之前,用来自5A.RC3的两个亚克隆(指定为B6b和H4b)的上清液预先处理细胞。数据是四个单独数据点的平均值+平均值的标准误差。

[0341] 图4示出如通过流式细胞术所定量,用含有N-末端FLAG标签的人PAR4的Thr120或Ala120变体转染的HEK293细胞的细胞表面上存在的完整PAR4的百分比(通过FLAG表位%所测量)。用如所指示的各种浓度的5A.RC3亚克隆预先处理细胞,然后用凝血酶(2U/ml)处理。

[0342] 图5示出(A) 5A.RC3(深色)和5B.RB4(浅色)杂交瘤上清液在对应于免疫原PAR4以及PAR 1、2和3的相应区域的经固定蛋白质上的结合的基于ELISA的筛选。(B)在不同浓度下测量的5A.RC3亚克隆的PAR4抗体与人PAR4肽的结合亲和力的Biacore分析。

[0343] 图6 5A.RC3抑制Ala120和Thr120 PAR4变体两者的凝血酶切割。为了评估PAR4变体的凝血酶切割,用PAR4-120Ala或PAR4-120Thr变体瞬时转染HEK293T细胞,所述PAR4-120Ala或PAR4-120Thr变体包含在凝血酶切割位点上游的FLAG表位。(A)用增加剂量的凝血酶(0.1-2U/mL)刺激细胞,并且使用FITC缀合的抗FLAG抗体通过流式细胞术测量作为FLAG表位的损失的凝血酶切割的量。(B)在凝血酶刺激之前用5A.RC3对转染的细胞进行预孵育提供凝血酶切割的几乎完全抑制,无论PAR4变体如何都达到了相同的程度。比较了1、10和100µg/ml 5A.RC3的剂量。

[0344] 图7 5A.RC3亚克隆在具有PAR4 Thr120变体的供体中抑制上调的凝血酶诱导的血小板聚集应答。评估了不同PAR4变体的人分离的血小板对于对PAR4激动剂的血小板聚集应答的应答。如所预测的,响应于(A) PAR4-AP和(B) 凝血酶的中等剂量,T等位基因的存在与较高的最大聚集相关,其中在用沃拉帕沙(90nM)阻断PAR1存在下,对于(C) 凝血酶刺激观察到相似的趋势。(D) 显示针对Thr120变体的功效、指示抗体介导的PAR4抑制的5A.RC3在PAR1拮抗剂(即PAR4依赖性)存在下针对凝血酶诱导的血小板凝集的抑制活性的浓度应答在所有基因型上均有效。(E) 在PAR4依赖性凝血酶诱导的血小板聚集中5A.RC3抑制活性的IC50。

[0345] 图8示出5A.RC3(10ug/mL)结合分离的血小板中的人PAR4,如通过流式细胞术针对同种型对照所示。

[0346] 图9示出PAR4基因型与促凝血小板表型的增加相关,并且可通过抗体介导的抑制来靶向。经由测量响应于(A) PAR4活化肽(AP)刺激和(B) 凝血酶刺激的磷脂酰丝氨酸暴露来评估人分离的血小板的促凝血活性。注意,Thr120变体导致PAR4-AP刺激的血小板中PS暴露增加,在凝血酶刺激的血小板中观察到相似的趋势。(C) 用5A.RC3亚克隆进行预处理剂量依赖性地抑制凝血酶诱导的磷脂酰丝氨酸暴露,无论供体基因型如何。

[0347] 图10-1和10-2示出5A.RC3亚克隆抑制血栓形成,无论供体基因型如何。在凝血条件下,在人全血血栓形成测定中,在10分钟的时间段内实时测量以下血栓形成参数:(A) 血小板沉积(PE缀合的抗CD9)、凝血酶活性(基于FRET的凝血酶探针)、纤维蛋白体积(Dylight650缀合的抗纤维蛋白抗体)和每个血栓的纤维蛋白比率(所示的数据在10分钟终点)。注意,尽管持续血小板沉积,但直接凝血酶抑制剂水蛭素(800U/mL)仍消除了凝血酶活性和纤维蛋白体积。(B-E) 观察到跨PAR4基因型的这些参数没有显著差异。用5A.RC3(空心条形,100 μ g/mL)进行预处理对(F) 血小板沉积没有影响,但与对照(黑色条形)相比显著抑制(G) 凝血酶活性(H) 纤维蛋白体积和(I) 每血栓体积的纤维蛋白比率。数据是每种基因型N=4-6的平均值 \pm SEM(总计n=15;颜色指示PAR4基因型:黑色圆圈=AA,灰色圆圈=AT,白色圆圈=TT)。对于(G)和(H),将数据相对于水蛭素基线归一化,并且表示为未处理对照的百分比。通过单因素ANOVA(B-E)或学生T检验(F-G)确定统计显著性,*表示P<0.05

[0348] 图11示出用于血小板聚集的初始杂交瘤上清液的功能筛选。

[0349] 图12示出具有根据IMGT编号鉴定的CDR的MoB5A-RC3.F10b.H4b(5A.RC3)的VH(A)和VL(B)氨基酸序列。VH=重链可变区,VL=轻链可变区,CDR=互补决定区,并且FWR=框架区。这种Ab展现PAR4抑制功能。

[0350] 图13示出具有根据IMGT编号鉴定的CDR的MoB5H-RD2.A7b(5H.RD2)的VH(A)和VL(B)氨基酸序列。VH=重链可变区,VL=轻链可变区,CDR=互补决定区,并且FWR=框架区。这种Ab结合至PAR4,但是未展现针对PAR4的抑制功能。

[0351] 图14示出具有根据IMGT编号鉴定的CDR的MoB5F-RF3.A7b.C9(5F.RF3)的VH(A)和VL(B)氨基酸序列。VH=重链可变区,VL=轻链可变区,CDR=互补决定区,并且FWR=框架区。这种Ab展现PAR4抑制功能。

[0352] 图15示出通过ELISA纯化的mAb与hPAR4肽的反应性。用与碱性磷酸酶(Ap)缀合的抗小鼠Fc检测到的纯化的mAb以剂量依赖性方式与hPAR4肽结合。对于针对不相关的非PAR4抗原的IC(同种型对照)mAb未观察到结合。

[0353] 图16示出通过ELISA,纯化的抗HPAR4 mAb特异性地结合至hPAR4生物素化肽,并且

在10 μ g/ml下未与hPAR1、hPAR2和hPAR3(生物素化肽)非特异性地反应。

[0354] 图17示出通过流式细胞术,纯化的抗hPAR4 mAb对比同种型对照与人分离的血小板的浓度依赖性结合。所示的是原始数据,表示为几何平均荧光强度。每种mAb以浓度依赖性方式结合。N=3-5。数据点是平均值 \pm SEM。

[0355] 图18示出三种抗hPAR4 mAb克隆对由0.1U/ml凝血酶诱导的人血小板聚集的浓度依赖性抑制。在所测试的最高浓度下每个克隆均实现了接近最大的抑制。从这些浓度抑制曲线确定的IC₅₀值(μ g/ml)也在图中示出。N=4-8。数据点是平均值 \pm SEM。

[0356] 图19示出单克隆抗体5A.RC3和5D.RH4对人血栓形成的抑制。用5D.RH4或5A.RC3(两者均为100 μ g/ml)对血液进行预处理减少总体血栓体积。示出单独数据点。条形是平均值 \pm SEM。*P<0.05(未配对的学生t检验)。

[0357] 图20示出抗-hPAR4 mAb的可变重链的序列,其显示根据IMGT编号系统的互补决定区(CDR)。

[0358] 图21示出抗-hPAR4 mAb的可变轻链的序列,其显示根据IMGT编号系统的互补决定区(CDR)

[0359] 图22示出用于抗hPAR4 mAb的表位作图的合成肽。合成了跨越原始人PAR4抗原的重叠肽,这些重叠肽由氨基酸残基1-9、氨基酸残基8-15和氨基酸残基11-20组成。凝血酶切割位点的序列加下划线。C-末端半胱氨酸残基已被除去以防止多聚体的形成。

[0360] 图23示出纯化的hPAR4 mAb与肽1-9、肽8-15和肽11-20的反应性。从背景水平中减去吸光度值,并且非hPAR4对照mAb不与三种肽中的任一种反应。

[0361] 【序列表的关键点】

[0362] SEQ ID NO:1:PAR4的表位序列

[0363] SEQ ID NO:2:hPAR4的序列(裸)

[0364] SEQ ID NO:3:mPAR4的序列(裸)

[0365] SEQ ID NO:4:用作免疫原的hPAR4(KLH)的序列

[0366] SEQ ID NO:5:用作免疫原的mPAR4(KLH)的序列

[0367] SEQ ID NO:6:mPAR4(生物素)的序列

[0368] SEQ ID NO:7:hPAR4(生物素)的序列

[0369] SEQ ID NO:8:hPAR3(生物素)的序列

[0370] SEQ ID NO:9:hPAR2(生物素)的序列

[0371] SEQ ID NO:10:hPAR1(生物素)的序列

[0372] SEQ ID NO:11:5A.RC3 VH的氨基酸序列

[0373] SEQ ID NO:12:5A.RC3 VL的氨基酸序列

[0374] SEQ ID NO:13:5A.RC3 VH CDR1的序列

[0375] SEQ ID NO:14:5A.RC3 VH CDR2的序列

[0376] SEQ ID NO:15:5A.RC3 VH CDR3的序列

[0377] SEQ ID NO:16:5A.RC3 VL CDR1的序列

[0378] SEQ ID NO:17:5A.RC3 VL CDR2的序列

[0379] SEQ ID NO:18:5A.RC3 VL CDR3的序列

[0380] SEQ ID NO:19:人PAR4的序列

- [0381] SEQ ID NO:20:5A.RC3 VH的核酸序列
- [0382] SEQ ID NO:21:5A.RC3 VL的核酸序列
- [0383] SEQ ID NO:22:5A.RC3 VH的氨基酸序列
- [0384] SEQ ID NO:23:5F.RF3 VL(5F.RF3)的氨基酸序列
- [0385] SEQ ID NO:24:5F.RF3 VH CDR1的序列
- [0386] SEQ ID NO:25:5F.RF3 VH CDR2的序列
- [0387] SEQ ID NO:26:5F.RF3 VH CDR3的序列
- [0388] SEQ ID NO:27:5F.RF3 VL CDR1的序列
- [0389] SEQ ID NO:28:5F.RF3 VL CDR2的序列
- [0390] SEQ ID NO:29:5F.RF3 VL CDR3的序列
- [0391] SEQ ID NO:30:5F.RF3 VH的核酸序列
- [0392] SEQ ID NO:31:5F.RF3 VL的核酸序列
- [0393] SEQ ID NO:32:5H.RD2 VH的氨基酸序列
- [0394] SEQ ID NO:33:5H.RD2 VL的氨基酸序列
- [0395] SEQ ID NO:34:5H.RD2 VH CDR1的序列
- [0396] SEQ ID NO:35:5H.RD2 VH CDR2的序列
- [0397] SEQ ID NO:36:5H.RD2 VH CDR3的序列
- [0398] SEQ ID NO:37:5H.RD2 VL CDR1的序列
- [0399] SEQ ID NO:38:5H.RD2 VL CDR2的序列
- [0400] SEQ ID NO:39:5H.RD2 VL CDR3的序列
- [0401] SEQ ID NO:40:5H.RD2 VH的核酸序列
- [0402] SEQ ID NO:41:5H.RD2 VL的核酸序列
- [0403] SEQ ID NO:42:表位序列
- [0404] SEQ ID NO:43:表位序列
- [0405] SEQ ID NO:44:表位序列
- [0406] SEQ ID NO:45:5I.RG1 VH的氨基酸序列
- [0407] SEQ ID NO:46:5I.RG1 VL的氨基酸序列
- [0408] SEQ ID NO:47:5I.RG1 VH CDR1的序列
- [0409] SEQ ID NO:48:5I.RG1 VH CDR2的序列
- [0410] SEQ ID NO:49:5I.RG1 VH CDR3的序列
- [0411] SEQ ID NO:50:5I.RG1 VL CDR1的序列
- [0412] SEQ ID NO:51:5I.RG1 VL CDR2的序列
- [0413] SEQ ID NO:52:5I.RG1 VL CDR3的序列
- [0414] SEQ ID NO:53:5G.RA1 VH的氨基酸序列
- [0415] SEQ ID NO:54:5G.RA1 VL的氨基酸序列
- [0416] SEQ ID NO:55:5G.RA1 VH CDR1的序列
- [0417] SEQ ID NO:14:5G.RA1 VH CDR2的序列
- [0418] SEQ ID NO:56:5G.RA1 VH CDR3的序列
- [0419] SEQ ID NO:57:5G.RA1 VL CDR1的序列

- [0420] SEQ ID NO:28:5G.RA1 VL CDR2的序列
- [0421] SEQ ID NO:58:5G.RA1 VL CDR3的序列
- [0422] SEQ ID NO:89:5D.RH4 VH的氨基酸序列
- [0423] SEQ ID NO:90:5D.RH4 VL的氨基酸序列
- [0424] SEQ ID NO:59:5D.RH4 VH CDR1的序列
- [0425] SEQ ID NO:60:5D.RH4 VH CDR2的序列
- [0426] SEQ ID NO:61:5D.RH4 VH CDR3的序列
- [0427] SEQ ID NO:57:5D.RH4 VL CDR1的序列
- [0428] SEQ ID NO:28:5D.RH4 VL CDR2的序列
- [0429] SEQ ID NO:62:5D.RH4 VL CDR3的序列
- [0430] SEQ ID NO:91:5H.RH4 VH的氨基酸序列
- [0431] SEQ ID NO:92:5H.RH4 VL的氨基酸序列
- [0432] SEQ ID NO:63:5H.RH4 VH CDR1的序列
- [0433] SEQ ID NO:64:5H.RH4 VH CDR2的序列
- [0434] SEQ ID NO:65:5H.RH4 VH CDR3的序列
- [0435] SEQ ID NO:66:5H.RH4 VL CDR1的序列
- [0436] SEQ ID NO:51:5H.RH4 VL CDR2的序列
- [0437] SEQ ID NO:67:5H.RH4 VL CDR3的序列
- [0438] SEQ ID NO:93:5G.RF6 VH的氨基酸序列
- [0439] SEQ ID NO:94:5G.RF6 VL的氨基酸序列
- [0440] SEQ ID NO:68:5G.RF6 VH CDR1的序列
- [0441] SEQ ID NO:14:5G.RF6 VH CDR2的序列
- [0442] SEQ ID NO:69:5G.RF6 VH CDR3的序列
- [0443] SEQ ID NO:57:5G.RF6 VL CDR1的序列
- [0444] SEQ ID NO:28:5G.RF6 VL CDR2的序列
- [0445] SEQ ID NO:58:5G.RF6 VL CDR3的序列
- [0446] SEQ ID NO:95:5G.RD6 VH的氨基酸序列
- [0447] SEQ ID NO:95:5G.RD6 VL的氨基酸序列
- [0448] SEQ ID NO:70:5G.RD6 VH CDR1的序列
- [0449] SEQ ID NO:71:5G.RD6 VH CDR2的序列
- [0450] SEQ ID NO:72:5G.RD6 VH CDR3的序列
- [0451] SEQ ID NO:57:5G.RD6 VL CDR1的序列
- [0452] SEQ ID NO:28:5G.RD6 VL CDR2的序列
- [0453] SEQ ID NO:58:5G.RD6 VL CDR3的序列
- [0454] SEQ ID NO:97:5H.RA3 VH的氨基酸序列
- [0455] SEQ ID NO:98:5H.RA3 VL的氨基酸序列
- [0456] SEQ ID NO:55:5H.RA3 VH CDR1的序列
- [0457] SEQ ID NO:73:5H.RA3 VH CDR2的序列
- [0458] SEQ ID NO:74:5H.RA3 VH CDR3的序列

- [0459] SEQ ID NO:57:5H.RA3 VL CDR1的序列
- [0460] SEQ ID NO:28:5H.RA3 VL CDR2的序列
- [0461] SEQ ID NO:58:5H.RA3 VL CDR3的序列
- [0462] SEQ ID NO:99:5G.RG1 VH的氨基酸序列
- [0463] SEQ ID NO:100:5G.RG1 VL的氨基酸序列
- [0464] SEQ ID NO:75:5G.RG1 VH CDR1的序列
- [0465] SEQ ID NO:76:5G.RG1 VH CDR2的序列
- [0466] SEQ ID NO:77:5G.RG1 VH CDR3的序列
- [0467] SEQ ID NO:78:5G.RG1 VL CDR1的序列
- [0468] SEQ ID NO:28:5G.RG1 VL CDR2的序列
- [0469] SEQ ID NO:62:5G.RG1 VL CDR3的序列
- [0470] SEQ ID NO:101:5H.RG4 VH的氨基酸序列
- [0471] SEQ ID NO:102:5H.RG4 VL的氨基酸序列
- [0472] SEQ ID NO:79:5H.RG4 VH CDR1的序列
- [0473] SEQ ID NO:80:5H.RG4 VH CDR2的序列
- [0474] SEQ ID NO:81:5H.RG4 VH CDR3的序列
- [0475] SEQ ID NO:57:5H.RG4 VL CDR1的序列
- [0476] SEQ ID NO:28:5H.RG4 VL CDR2的序列
- [0477] SEQ ID NO:58:5H.RG4 VL CDR3的序列
- [0478] SEQ ID NO:103:5G.RC5 VH的氨基酸序列
- [0479] SEQ ID NO:104:5G.RC5 VL的氨基酸序列
- [0480] SEQ ID NO:82:5G.RC5 VH CDR1的序列
- [0481] SEQ ID NO:80:5G.RC5 VH CDR2的序列
- [0482] SEQ ID NO:83:5G.RC5 VH CDR3的序列
- [0483] SEQ ID NO:57:5G.RC5 VL CDR1的序列
- [0484] SEQ ID NO:51:5G.RC5 VL CDR2的序列
- [0485] SEQ ID NO:58:5G.RC5 VL CDR3的序列
- [0486] SEQ ID NO:105:5F.RE6 VH的氨基酸序列
- [0487] SEQ ID NO:106:5F.RE6 VL的氨基酸序列
- [0488] SEQ ID NO:55:5F.RE6 VH CDR1的序列
- [0489] SEQ ID NO:73:5F.RE6 VH CDR2的序列
- [0490] SEQ ID NO:74:5F.RE6 VH CDR3的序列
- [0491] SEQ ID NO:84:5F.RE6 VL CDR1的序列
- [0492] SEQ ID NO:51:5F.RE6 VL CDR2的序列
- [0493] SEQ ID NO:85:5F.RE6 VL CDR3的序列
- [0494] SEQ ID NO:107:5H.RF2 VH的氨基酸序列
- [0495] SEQ ID NO:108:5H.RF2 VL的氨基酸序列
- [0496] SEQ ID NO:86:5H.RF2 VH CDR1的序列
- [0497] SEQ ID NO:87:5H.RF2 VH CDR2的序列

- [0498] SEQ ID NO:88:5H.RF2 VH CDR3的序列
[0499] SEQ ID NO:109:5H.RF2 VL CDR1的序列
[0500] SEQ ID NO:51:5H.RF2 VL CDR2的序列
[0501] SEQ ID NO:85:5H.RF2 VL CDR3的序列。

【具体实施方式】

[0502] 总则

[0503] 在本说明书中,除非另外具体地说明或上下文另外要求,否则提及单个步骤、物质的组合物、步骤的组或物质组合物的组应视为涵盖那些步骤、物质组合物、步骤的组或物质组合物的组中的一个和多个(即一个或多个)。

[0504] 本领域的技术人员应了解,本发明容许具体描述的内容以外的变化和修改。应理解本公开包括所有所述变型和修改。本公开还包括在本说明书中单独或共同地提及或指示的所有步骤、特征、组合物和化合物,和所述步骤或特征的任何和所有组合或任何两个或更多个。

[0505] 本公开不限于本文所描述的特定实施例的范围,所述特定实施例仅欲出于范例的目的。功能上等同的产物、组合物以及方法显然在本发明的范围内。

[0506] 本文本公开的任何实施例应理解为在作了必要修改的情况下适用于本公开的任何其它实施例,除非另外明确陈述。

[0507] 除非另外明确定义,否则本文中所有的技术和科学术语应理解为具有与本领域的普通技术人员通常所理解相同的含义(例如,在细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学中)。

[0508] 除非另外说明,否则本公开中所用的重组蛋白质、细胞培养和免疫学技术是本领域的技术人员所数值的标准程序。在整个文献中在诸如Perbal (1984); Sambrook等人, (1989); Brown (1991); Glover和Hames (1995和1996)以及Ausubel等人, (1988,包括迄今为止的所有更新); Harlow和Lane, (1988); Coligan等人, (包括迄今为止的所有更新); 和Zola (1987)的来源中描述并解释了此类技术。

[0509] 本文中可变区及其部分、免疫球蛋白、抗体及其片段的描述和定义可通过Kabat, 1987和/或1991; Bork等人, 1994和/或Chothia和Lesk, 1987和/或1989或Al-Lazikani等人, 1997或the IMGT numbering of Lefranc M.-P., (1997) Immunology 5Today 18,509中的论述进一步阐明。

[0510] 在整篇本说明书中,词语“包含(comprise)”或诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”的变化形式应理解为暗示包括所述要素、整数或步骤、或一组要素、整数或步骤,而非排除任何其它要素、整数或步骤、或一组要素、整数或步骤。

[0511] 如本文中所有的,术语“来源于”应意味指示指定的整数可从特定的来源来获得,即使不一定直接来自该来源。

[0512] 本发明采用本领域技术范围内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。参见例如Sambrook等人“Molecular Cloning” A Laboratory Manual (1989)。

[0513] 所选择的定义

[0514] 除非上下文另外清楚地指示,否则如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所

述”包括复数个指示物。术语“一个/种(a/an)”以及术语“一个/种或多个/种(one or more)”和“至少一个/种(at least one)”可在本文中互换使用。

[0515] 此外,当在本文中使用时将“和/或”视为对两个指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者的具体公开内容。因此,如本文中诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下实施方案中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0516] 术语“约”在本文中用于意指近似、大致、大约或在……左右。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过扩展列举的数值的上限和下限将所述范围加以修饰。一般来说,术语“约”在本文中用于以高于和低于所述值10%(%)上下(升高或降低)的变化来修饰数值。

[0517] 应当理解,本文所述的PAR4结合蛋白和抗体、核酸、细胞和载体呈分离的形式。“分离的”是指多肽、抗体、多核苷酸、载体或细胞处于自然界中未发现的形式。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体或细胞包括已被纯化至它们不再存在于自然中的形式的程度的那些。在一些方面中,分离的抗体、多核苷酸、载体或细胞是基本上纯的。在一些方面中,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。

[0518] 如本文所用,术语“蛋白酶活化的受体(PAR4)”是指脊椎动物细胞表面蛋白的全部或部分,其被凝血酶或凝血酶激动剂特异性活化、从而活化PAR4介导的信号传导事件(例如磷酸肌醇水解、Ca外排、血小板凝集)。所述多肽的特征在于具有本文所述的配体活化性质(包括激动剂活化性质和拮抗剂抑制性质)和组织分布。所述术语包括能够结合凝血酶的PAR4的那些部分或如SEQ ID NO:2中所列出的PAR4受体部分。

[0519] 术语“PAR4拮抗剂”表示结合PAR4并抑制PAR4切割和/或信号传导的血小板聚集的抑制剂。通常,与对照细胞中的此类活性相比,PAR4活性以剂量依赖性方式降低至少10%>、20%>、30%>、40%>、50%>、60%>、70%>、80%>、90%>或100%。对照细胞是尚未用化合物处理的细胞。PAR4活性通过本领域的任何标准方法,包括本文所述的那些方法(例如,表达PAR4的细胞中的钙动员、血小板聚集、测量例如钙动员、p-选择蛋白或CD40L释放或血栓形成的血小板活化测定和止血模型)来确定。

[0520] 术语“hPAR4”或“人PAR4”是指完全人抗体。出于命名但不限制的目的,hPAR4的氨基酸序列在SEQ ID NO:19中列出。

[0521] 如本文所用的术语“mAb”意图指包含小鼠恒定区序列和人可变区序列的单克隆抗体。

[0522] 术语“抗体”描述天然或部分或全部合成产生或重组产生的免疫球蛋白。所述术语也涵盖具有为抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源的结合结构域的任何多肽或蛋白质。此术语也考虑了CDR移植抗体。“抗体”是结合特异性表位的任何免疫球蛋白,包括抗体及其片段。所述术语涵盖多克隆抗体、单克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。术语“抗体”还指包含通过二硫键相互连接的至少两个免疫球蛋白重(H)链和两个轻(L)链的蛋白质或其抗原结合部分。每个重链包含重链可变区(在本文缩写为VH)和重链恒定区(在本文缩写为CH)。CH通常由三个结构域CH1、CH2和CH3组成(IgM,例如具有另外的恒定区结构域CH4)。每条轻链包含轻链可变区(在本文缩写为VL)和轻链恒定区(在本文缩写为CL)。CL由一个结构域组成,并且可具有λ或κ类型。VH区和VL区可进一步细分

为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着较保守的区域,称为框架区(FWR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FWR组成,其按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列:FWR1、CDR1、FWR2、CDR2、FWR3、CDR3、FWR4。在某些实施方案中,所述VH和VL一起包含与抗原相互作用的结合结构域。在其它实施方案中,单个VH或单个VL结构域可与抗原特异性地相互作用。抗体的CH结构域可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)、内衬血管壁的细胞、表达免疫球蛋白的CH结构域的受体的其它细胞和经典补系统的第一组分(C1q)。免疫球蛋白分子可具有任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA以及IgY)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2)。如本文所用本文的术语“抗体”还包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列同一或同源,而所述一条或多条链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段中的对应序列同一或同源,只要它们表现出所需的生物活性(美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。脊椎动物系统中的基本抗体结构相对较好理解。(参见例如,Harlow等人(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(第2版;Cold Spring Harbor Laboratory Press)。术语“抗体”的含义中还包括任何“抗原结合片段”。

[0523] 术语“抗原结合片段”是指抗体的保留与抗原特异性地结合的能力的一个或多个片段。全长抗体的片段可以执行抗体的抗原结合功能。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括:(i)Fab片段,其是由VL结构域和CL结构域、VH结构域以及CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab)2片段,其是在铰链区包含由二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)Fd片段,其由VH结构域和CH1结构域组成;(iv)Fv片段,其由抗体的单臂的VH结构域和CL结构域组成;(v)单结构域抗体片段或dAb(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由仅VH结构域或v1结构域组成;以及(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由单独基因编码,但它们可使用重组或合成方法,例如通过合成接头加以接合,所述合成接头使其能够以单一蛋白链形式制得,在所述单一蛋白链中,VH区和VL区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv));参见例如,Bird等人(1988)Science 242:423-426;和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。scFv也涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式针对效用筛选所述片段。

[0524] 如本文所用,“抗体可变区”是指抗体分子的轻链和重链的部分,所述部分包括互补决定区(CDR;即CDR1,CDR2和CDR3)和框架区(FWR)的氨基酸序列。VH是指重链可变区。VL是指轻链可变区。根据本发明中使用的方法,分配给CDR和FR的氨基酸位置可根据Kabat(Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1987和1991))或Chotia和Lesk 1987 J.Mol Biol.196:901-917)或根据IMGT编号系统定义。

[0525] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指具有单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体显示对于具体表位的单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体可从任何动物,例如小鼠、大鼠、兔、猪等产生,或者可合成产生,并且部分或全部为人序列。

[0526] 如本文所用的术语“多克隆抗体”是指从其中注射了抗原以产生针对所述抗原的抗体的哺乳动物的血清中纯化的抗体的混合物。多克隆抗体可从任何哺乳动物,例如小鼠、

大鼠、兔、猪、人等产生,或者可合成产生,例如作为VH和VL基因噬菌体展示文库。

[0527] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体:其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种(例如鼠类)的或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,而所述链的剩余部分与源自另一物种(例如,灵长类动物)的或属于另一个抗体类别或亚类的抗体、以及此类抗体的片段中的相应序列同一或同源,只要它们表现出所需的生物活性即可。

[0528] 术语“人源化抗体”应理解是指通常使用重组技术制备的嵌合分子,所述嵌合分子具有源自非人物种的免疫球蛋白的表位结合位点且所述分子的剩余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点优选地包含来自非人抗体的互补决定区(CDR),所述互补决定区被移植到人抗体的可变结构域中的适当框架区和来自人抗体的剩余区域上。

[0529] 如本文中与抗体分子和结合蛋白结合使用的术语“人抗体”是指具有源自或对应于在人中、例如在人种系或体细胞中发现的序列的可变(例如VH、VL、CDR和FR区)和恒定抗体区的抗体。

[0530] 如本文所用的“IMGT编号”是指用于鉴定抗体可变区的CDR和FWR序列的编号系统。IMGT独特编号已被定义来比较可变结构域,无论抗原受体、链类型或物种如何(Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., ThouveninContet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))。在IMGT独特编号中,保守氨基酸始终具有相同位置,例如半胱氨酸23(第1CYS)、色氨酸41(保守TRP)、疏水性氨基酸89、半胱氨酸104(第2CYS)、苯丙氨酸或色氨酸118(J-PHE或J-TRP)。IMGT独特编号提供框架区(FR1-IMGT:位置1至26, FR2-IMGT:39至55, FR3-IMGT:66至104和FR4-IMGT:118至128)和互补决定区:CDR1-IMGT:27至38、CDR2-IMGT:56至65和CDR3-IMGT:105至117的归一化界限。由于空位代表未占用的位置,因此CDR-IMGT长度成为关键信息。IMGT独特编号用于指定为IMGT Colliers de Perles的2D图形表示中(Ruiz, M.和Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q.和Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007))以及3D structures in IMGT/3Dstructure-DB(Kaas, Q., Ruiz, M.和Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004))。

[0531] 如本文所用,术语“特异地结合”将用来指,与用替代细胞或物质的情况相比,本公开的蛋白质以更久的持续时间和/或以更大的亲和力与特定细胞或物质更频繁、更迅速地反应或缔合。通过阅读所述定义还应理解,例如,特异地结合第一抗原的蛋白质可能或可能不特异地结合第二抗原。照此,“特异性结合”未必需要另一抗原的排外的结合或不能检测的结合,这由术语“选择性结合”释义。

[0532] “转染的”、“转染的细胞”等是指已经通过遗传工程化将编码PAR4的DNA分子(或编码生物活性片段或其类似物的DNA)引入其中(或引入其祖先)的细胞。这种DNA分子被“定位以表达”是指所述DNA分子与指导所述序列的转录和翻译的DNA序列相邻定位(即,促进PAR4蛋白或其片段或类似物的产生)。

[0533] 术语“同一性”及其语法变化形式是指两个或更多个参考的实体同一。因此,在两个抗体序列同一的情况下,它们至少在参考区域或部分内具有同一的氨基酸序列。当两个

核酸序列同一时,它们至少在参考区域或部分内具有同一的多核苷酸序列。同一性可在序列的定义区域(区或结构域)上。多核苷酸的同一性%通过GAP (Needleman和Wunsch, J.Mol Biol.48:444-453.1970)分析(GCG程序)在空位产生罚分(gap creation penalty)=5和空位延长罚分(gap extension penalty)=0.3下测定。除非另外陈述,否则查询序列的长度是至少45个核苷酸,且GAP分析在至少45个核苷酸的区域上比对两个序列。优选地,查询序列的长度是至少100个核苷酸,且GAP分析在至少100个核苷酸的区域上比对两个序列。更优选地,两个序列在其整个长度上比对。

[0534] 如本文所用的术语“药物组合物”是指含有至少一种治疗或生物活性剂并且适合于施用至患者的任何组合物。任何这些制剂都可通过本领域众所周知的且认可的方法制备。参见例如,Gennaro,A.R.,编辑,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.(2000)。

[0535] 本文采用短语“药学上可接受的”来指在合理医学判断范围内、适用于与人和动物组织接触而无过量毒性、刺激、过敏反应和/或其它问题或并发症、与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0536] 如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗和预防性或防治性措施,其中目的是为了预防或减缓(减轻)不希望的生理学变化或病症,如血栓栓塞,例如急性冠状动脉综合征的进展。有益或所需的临床结果包括但不限于症状减轻、疾病程度减轻、疾病状态稳定化(即未恶化)、疾病进展延迟或减缓、疾病状态改善或缓和以及缓解(无论是部分缓解还是全部缓解),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可意指与未接受治疗时预期的存活相比延长存活。需要治疗的那些包括已患有病状或病症的那些以及易于患上病状或病症的那些或打算预防病状或病症的那些。

[0537] 如本文所用,“预防(prophylaxis)”或“预防(treatment)”是指旨在降低临床疾病状态发生的可能性的哺乳动物,特别是人中亚临床疾病状态的预防性治疗。基于已知因素选择患者用于预防性治疗,与一般人群相比,这些因素会增加患上临床疾病的风险。“预防”疗法可分为(a)一级预防和(b)二级预防。一级预防被定义为尚未表现出临床疾病状态的受试者的治疗,而二级预防被定义为防止相同或相似临床疾病状态的第二次发生。

[0538] 术语“治疗有效量”应理解为是指足够量的PAR4结合蛋白或抗体,以使PAR4活化的一种或多种症状减少或抑制至低于所观察到并被接受作为所述病症的临床特征的水平。本领域技术人员将意识到,这种量将取决于特异性抗体、片段和/或特定受试者和/或病症的类型或严重程度或水平而变化。因此,此术语不应被解释为将本发明限制为具体量。

[0539] 如本文所用,术语“PAR4拮抗剂疗法”是指用PAR4拮抗剂治疗受试者。

[0540] “受试者”是指需要诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、熊、鸡、两栖动物、爬行动物等。如本文所用,诸如“患有PAR4介导的疾患或病症的受试者”的短语包括将从PAR4拮抗剂的施用中受益的受试者,如哺乳动物受试者。

[0541] 如本文所用,提及“相似”的结合水平应理解为是指抗体以其结合至另一抗原的水平约30%或25%或20%以内的水平结合至抗原。所述术语还可意指一种抗体以另一种抗体结合至相同抗原的水平相比约30%或25%或20%以内的水平结合至抗原。

[0542] 如本文所用,提及“基本上相同”的结合水平应理解为是指抗体以其结合至另一抗原的水平约15%或10%或5%以内的水平结合至抗原。所述术语还可意指一种抗体以另一种抗体结合至相同抗原的水平相比约5%或4%或3%以内的水平结合至抗原。

[0543] 术语“竞争性地抑制”应理解为意指本公开的蛋白质减少或防止所产生的所述抗体(例如5A.RC3)与PAR4的凝血酶切割位点或其片段的结合。从上述内容中将显而易见所述蛋白质不必完全抑制抗体的结合,而是其仅需要使结合减少统计学上显著的量,例如至少约10%或20%或30%或40%或50%或60%或70%或80%或90%或95%。用于测定对结合的竞争性抑制的方法在本领域中已知和/或在本文中描述。例如,在存在或不存在蛋白质的情况下,使抗体暴露于PAR4或其片段。如果与在不存在所述蛋白质的情况下相比较,在存在所述蛋白质的情况下较少抗体结合,则将所述蛋白质认为是竞争性抑制所述抗体的结合。在一个实例中,使所述蛋白质和抗体基本上同时暴露于PAR4。用于确定结合的竞争性抑制的另外方法对本领域技术人员而言是显而易见的和/或本文所述。在一个实例中,蛋白质的抗原结合结构域竞争性地抑制抗体的结合。

[0544] 在两种表位的上下文中的“重叠”将用以指两种表位共用足够数量的氨基酸残基以容许与一种表位结合的抗体竞争性地抑制与另一表位结合的抗体的结合。例如,所述表位共享至少一个或两个或三个或四个或五个或六个或七个或八个或九个或十个氨基酸。

[0545] 如本文所用,术语“不可检测地结合”应理解为是指蛋白质(例如抗体)以高于背景不到10%、8%或6%或5%的水平结合至候选抗原。背景可以是在不存在蛋白质和/或存在阴性对照蛋白(例如同种型对照抗体)的情况下检测到的结合信号的水平和/或在存在阴性对照抗原的情况下检测到的结合水平。使用生物传感器分析(例如Biacore)检测结合的水平,其中将蛋白质固定并与抗原接触。

[0546] 抗体

[0547] 为避免疑问,单克隆抗体mAb ARC3与这种抗体的其它名称同义,如实施例中所示,如MoB5A-RC3。这种抗体已进一步亚克隆至衍生的单克隆抗体MoB5-ARC3.F10b.H4b。这种子克隆也被称为mAb ARC3.H4b。对应于这种抗体的序列见于SEQ ID NO:11-18中。

[0548] 功能上等效的抗体

[0549] 本公开还考虑了具有抗体mAb ARC3.H4b的重链和轻链可变区序列的一个或多个氨基酸添加、缺失或取代、但仍保留mAb ARC3.H4b的功能的抗PAR4抗体或其抗原结合片段。在一些实例中,所述PAR4结合蛋白包含10个或更少、例如9或8或7或6或5或4或3或2或1个保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链和/或疏水性(hydrophobicity)和/或亲水性(hydrophilicity)的氨基酸残基置换的情况。疏水(hydrophobic)指数例如描述于Kyte和Doolittle(1982)中,且亲水(hydrophilic)指数描述于例如US4554101中。

[0550] 这些修饰可能是故意的,例如像通过定点诱变;或者可能是偶然的,如通过表达抗体的宿主中的突变获得的那些修饰。

[0551] 突变的(改变的)多肽可使用本领域已知的任何技术进行制备。例如,本公开的多核苷酸可进行体外诱变。这种体外诱变技术包括将多核苷酸亚克隆到适合的载体中,将载体转化为“突变体”菌株,如大肠杆菌XL-1红(Stratagene),并使转化的细菌繁殖适合的世代数。源自突变/改变的DNA的产物可容易地使用本文所述的技术进行筛选,以便确定它们

是否具有受体结合和/或抑制活性。

[0552] 在设计氨基酸序列突变体时,突变位点的位置和突变的性质将取决于待改变的一个或多个特征。突变的位点可例如通过(1)首先用保守氨基酸选择取代并且然后用更多基团选择取代(这取决于所实现的结果)、(2)缺失目标残基或者(3)与所定位的位点相邻地插入其它残基来单独或连续地改变。

[0553] 氨基酸序列缺失的范围通常为约1至15个残基,更优选为约1至10个残基并且通常为约1至5个连续的残基。

[0554] 取代突变体在抗体和/或免疫球蛋白链分子中(包括在可变区中)除去至少一个氨基酸残基,并且在其位置插入了不同的残基。取代诱变最感兴趣的位点包括被鉴定为对抗原结合重要的位点。这些位点,特别是落入人抗体和/或免疫球蛋白链的至少三个其它相同保守位点的序列内的那些位点,优选以相对保守的方式被取代。此类保守性取代在“示例性取代”的标题下的表1中示出。

[0555] 本发明也考虑了保守性氨基酸取代。这些被认为是指以下表中列出的氨基酸取代。

[0556] 表1示例性取代

原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val; leu; ile; gly
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; his
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser

[0557]

[0558]

原始残基	示例性取代
Gln (Q)	Asn; his
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro、ala
His (H)	Asn; gln
Ile (I)	Leu; val; ala
Leu (L)	Ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu; phe
Phe (F)	Leu; val; ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

[0559] 本文所述的氨基酸优选呈“L”异构形式。然而,只要多肽保留了免疫球蛋白结合的所需功能性质,呈D异构体形式的残基就可取代任何L-氨基酸残基。修饰还包括结构和功能

类似物,例如具有合成或非天然氨基酸或氨基酸类似物和衍生形式的肽模拟物。

[0560] 本公开还涵盖非保守氨基酸变化。例如,特别值得注意的是带电的氨基酸被另一带电的氨基酸和被中性或带正电的氨基酸取代。在一些实例中,所述PAR4结合蛋白包含10个或更少、例如9或8或7或6或5或4或3或2或1个非保守氨基酸取代。

[0561] 根据任何实例的本文所述的PAR4结合蛋白的突变体形式保留特异性地结合至PAR4的能力。用于测定与PAR4的特异性结合的方法在本文中描述。例如,使标记的PAR4结合蛋白与固定的PAR4或包含PAR4的凝血酶切割位点的肽(例如,如SEQ ID NO:2所示)接触。在洗涤之后,检测结合的标记物。如上所述,也使标记的PAR4结合蛋白与固定的PAR4和相关的蛋白质或PAR4的突变体形式或PAR4的片段接触,并且在洗涤后检测结合的标记。检测到与PAR4结合但不与相关的蛋白质(例如PAR1、PAR2或PAR3)或突变体蛋白或PAR4的片段结合的标记表明突变体PAR4结合蛋白保留与PAR4特异性结合的能力。

[0562] 在一个实例中,所述突变发生在本公开的PAR4结合蛋白的FWR内。在另一实例中,所述突变发生在本公开的PAR4结合蛋白的CDR内。

[0563] 抗体产生

[0564] 用于产生抗体的方法是本领域已知的和/或在Harlow和Lane(1988)或Zola(1987)中描述。一般而言,在此类方法中,将Fn14蛋白或其免疫原性片段或含表位或表达和展示其(即免疫原)的细胞(任选地与任何适合或所需的载体、佐剂或药学上可接受的赋形剂一起配制)施用至非人动物受试者,例如小鼠、鸡、大鼠、兔、豚鼠、狗、马、牛、山羊或猪。可通过鼻内、肌内、皮下、静脉内、皮内、腹膜内或其它已知途径施用免疫原。

[0565] 多克隆抗体的产生可通过在免疫之后在多个点对免疫的动物的血液取样来监测。如果需要,可给予一次或多次进一步免疫以实现所需的抗体滴度。重复加强和滴定的过程,直至获得适合的滴度。当获得所需水平的免疫原性时,将免疫的动物放血且分离并保存血清,和/或使用所述动物来产生单克隆抗体(mAb)。

[0566] 单克隆抗体为由本公开涵盖的示例性抗体。术语“单克隆抗体”或“mAb”或“MAb”是指能够结合至相同抗原并且例如结合至所述抗原内的相同表位的均质抗体群体。此术语不意图就抗体的来源或制备方式进行限制。

[0567] 为了产生mAb,可使用多种已知技术中的任一种,例如像US4,196,265或Harlow和Lane(1988)Antibodies:A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory or Zola(1987)Monoclonal antibodies:A manual of techniques中例示的程序。

[0568] 例如,在足以刺激产生抗体的细胞的条件下,用有效量的蛋白质或其免疫原性片段或表位或表达所述蛋白质或其免疫原性片段或表位的细胞对适合的动物进行免疫。啮齿类动物,如兔、小鼠和大鼠是示例性动物,最常用的是小鼠。经遗传工程化以表达人免疫球蛋白蛋白质而不表达鼠免疫球蛋白蛋白质的小鼠也可用于产生本公开的抗体(例如,如W02002/066630中所述)。

[0569] 在免疫后,选择有潜力产生抗体的体细胞,特别是B淋巴细胞(B细胞)用于mAb产生方案中。这些细胞可从脾、扁桃体或淋巴结活检或从外周血样品中获得。然后将来自经免疫的动物的B细胞与永生性骨髓瘤细胞的细胞融合,所述永生性骨髓瘤细胞通常源自与用免疫原免疫的动物相同的物种。通过在一种或多种促进细胞膜融合的剂(化学或电)存在下孵育细胞类型的混合物来使B细胞和永生细胞融合。使用仙台病毒的融合方法已由Kohler和

Milstein, (1975);以及Kohler和Milstein, (1976)描述。使用聚乙二醇(PEG),如37% (v/v) PEG的方法由Geftter等人, (1977) Somatic Cell Genet.3(2):231-6)描述。电诱导融合方法的使用也是适当的。

[0570] 通过在包含阻断组织培养基中核苷酸的从头合成的剂的选择性培养基中培养来扩增杂合体。示例性剂是氨基蝶呤、氨甲蝶呤和氮杂嘌呤。

[0571] 对扩增的杂交瘤进行抗体特异性和/或滴度的功能选择,例如像通过流式细胞术和/或免疫组织化学和/或免疫测定(例如放射免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、噬菌斑测定、斑点免疫测定等)。本公开还考虑了产生抗体的细胞的亚克隆,例如,如本文所例示。

[0572] 或者,使用ABL-MYC技术(NeoClone, Madison WI 53713, USA)来产生分泌mAb的细胞系(例如,如Kumar等人, (1999) Immunol Lett.65(3):153-9)中所描述。

[0573] 还可通过筛选展示文库,例如噬菌体展示文库,例如,如US6300064EP0368684和/或US5885793中所述来产生或分离抗体。

[0574] 嵌合抗体和蛋白质

[0575] 在一个实例中,本公开的抗体或PAR4结合蛋白是嵌合抗体,或PAR4结合蛋白是嵌合蛋白质。术语“嵌合蛋白质”是指如下蛋白质:其中抗原结合结构域VH或VL与源自特定物种(例如鼠类,如小鼠或大鼠)或属于特定抗体类别或亚类的蛋白质中的相应序列同一或同源,而链蛋白质的剩余部分与源自另一物种(例如,灵长类动物,如人)或属于另一抗体类别或亚类的蛋白质中的相应序列同一或同源。在一个实施例中,嵌合蛋白质为包含来自非人抗体(例如,鼠科抗体)的VH和VL的嵌合抗体,且所述抗体的剩余区域来自人抗体。所述嵌合蛋白质的产生在本领域中已知,且可通过标准方法(如,例如在US6331415;US5807715;US4816567和US4816397中所述)来实现。此类嵌合抗体的产生在本领域中是已知的,并且可通过标准手段(如例如,在Morrison, Science 229:1202(1985);Oi等人, BioTechniques 4:214(1986);Gillies等人, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202;美国专利号5,807,715;4,816,567和4,816,397中所述)来实现。进一步涵盖的是,本发明的嵌合抗体的人恒定区可选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5、IgG6、IgG7、IgG8、IgG9、IgG10、IgG11、IgG12、IgG13、IgG14、IgG15、IgG16、IgG17、IgG18或IgG19恒定区。

[0576] 人源化和人抗体/蛋白质

[0577] 本公开的PAR4结合蛋白可以是人源化的或人的。

[0578] 术语“人源化蛋白质”应理解是指包含人样可变区的蛋白质,包括来自非人物种的抗体的CDR移植到来自人抗体的FR上或插入所述FR中(这种类型的抗体也称为“CDR移植抗体”)。人源化蛋白质还包括其中人蛋白质的一个或多个残基通过一次或多次氨基酸取代修饰和/或人蛋白质的一个或多个FR残基被相应非人残基置换的蛋白质。人源化蛋白质还可包含在人抗体中或在非人抗体中都见不到的残基。所述蛋白质的任何另外的区域(例如, Fc区域)通常为人的。人源化可使用本领域已知的方法进行,例如US5225539、US6054297、US7566771或US5585089。术语“人源化蛋白质”还涵盖超人源化蛋白质,例如,如在US7732578中所述。

[0579] 在一个实例中,人源化蛋白质包含在本文中公开的重链序列中在26与33之间、在51与58之间和在97与110之间和在27与33之间、在51与53之间和在90与97之间(根据IMGT编

号系统编号)的区域。

[0580] 如本文所用的术语“人蛋白质”是指具有来源于人或对应于在人中、例如在人种系或体细胞中发现的序列的可变且任选恒定的抗体区的蛋白质。“人”抗体可包括并非由人序列编码的氨基酸残基,例如通过体外无规或部位定向突变引入的突变(尤其是包括保守取代的突变或在蛋白质的少量残基中的突变,例如在蛋白质的1、2、3、4或5个残基中突变)。这些“人抗体”实际上不需要通过人的免疫应答产生,更确切地讲,它们可使用重组方法(例如,筛选噬菌体展示文库)和/或通过包含编码人抗体恒定和/或可变区的核酸的转基因动物(例如,小鼠)和/或使用引导选择(例如,如在或US5565332中所述)来产生。此术语还涵盖此类抗体的亲和力成熟形式。人蛋白质还将被认为包括包含来自人抗体的FR或包含来自人FR的共有序列的序列的FR的蛋白质,且其中CDR中的一个或多个为无规或半无规的,例如,如在US6300064和/或US6248516中所述。

[0581] 识别所选定表位的人蛋白质或抗体还可使用被称为“引导选择”的技术来产生。在这种方法中,将所选定的非人单克隆抗体,例如小鼠抗体用于引导对于识别相同表位的完全人抗体的选择(Jespers LS等人,(1988)Biotechnology 12(9):899-903)。

[0582] 本公开的人PAR4结合蛋白包含人抗体的可变区。

[0583] 同源性化和灵长类化蛋白质

[0584] 本公开的PAR4结合蛋白可以是同源性化蛋白质。术语“同源性化蛋白质”是指通过在W02007/019620中描述的方法制备的蛋白质。同源性化PAR4结合蛋白包括抗体的可变区,其中所述可变区包含来自新世界灵长类抗体可变区的FR和得自非新世界灵长类抗体可变区的CDR。例如,同源性化PAR4结合蛋白包括抗体的可变区,其中所述可变区包含来自新世界灵长类抗体可变区的FWR和来自例如如在本文中所述的小鼠抗体的CDR。在一个实例中,所述同源性化PAR4结合蛋白是PAR4结合抗体,其中所述可变区中的一个或两个为同源性化的。

[0585] 本公开的PAR4结合蛋白可以是灵长类化蛋白质。“灵长类化蛋白质”包含来自在使非人灵长类动物(例如,食蟹猴)免疫之后产生的抗体的可变区。任选地,所述非人灵长类动物抗体的可变区与人恒定区连接以制备灵长类化抗体。用于产生灵长类化抗体的示例性方法描述在US6113898中。

[0586] 脱免疫化抗体和蛋白质

[0587] 本公开还考虑了脱免疫化抗体或PAR4结合蛋白。脱免疫化抗体具有一个或多个被除去(即,突变)的表位,例如B细胞表位或T细胞表位,由此减少受试者将产生对于所述抗体或蛋白质的免疫应答的可能性。用于产生脱免疫化抗体和蛋白质的方法是本领域已知的,并且描述于例如W000/34317、W02004/108158和W02004/064724中。

[0588] 基于本文的描述,用于引入适合的突变以及表达和测定所得蛋白质的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0589] 含抗体可变区的蛋白质.

[0590] 单结构域抗体

[0591] 在一些实例中,本公开的PAR4结合蛋白是单结构域抗体(其与术语“结构域抗体”或“dAb”可互换使用)。单结构域抗体是包含抗体的重链可变区的全部或一部分的单一多肽链。在某些实例中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例

如,US6248516;W090/05144和/或W02004/058820)。

[0592] 双体抗体、三体抗体、四体抗体

[0593] 包含抗体抗原结合结构域的示例性PAR4结合蛋白是双体抗体、三体抗体、四体抗体和更高阶的蛋白质复合物,如W098/044001和W094/007921中所述的那些。

[0594] 例如,双体抗体是包含两个缔合多肽链的蛋白质,每个多肽链包含结构VL-X-VH或VH-X-VL,其中VL是抗体轻链可变区,VH是抗体重链可变区,X是包含不足以允许单一多肽链中的VH和VL缔合(或形成Fv)的残基的接头或不存在,并且其中一个多肽链的VH结合至另一多肽链的VL以形成抗原结合位点,即形成能够特异性地结合至一种或多种抗原的Fv分子。每个多肽链中的VL和VH可相同,或者每个多肽链中的VL和VH可不同以便形成双特异性双体抗体(即,包含具有不同特异性的两个Fv)。

[0595] 单链Fv(scFv)片段

[0596] 技术人员将意识到,scFv包含单一多肽链中的VH和VL区。所述多肽链还包含在VH与VL之间的多肽接头,所述接头使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构(即,使得单一多肽链的VH与VL能够彼此缔合以形成Fv)。例如,所述接头包含超过12个氨基酸残基,其中(Gly₄Ser)₃是用于scFv的更有利的接头之一。

[0597] 本公开还涵盖二硫键稳定的Fv(或diFv或dsFv),其中在VH的FR和VL的FR中引入单个半胱氨酸残基并且所述半胱氨酸残基由二硫键连接以产生稳定Fv(参见例如,Brinkmann等人,(1993)Proc Natl Acad Sci USA 90:547-551)。

[0598] 或者或另外,本公开提供二聚scFv,即包含由非共价或共价键联(例如,通过亮氨酸拉链结构域(例如来源于Fos或Jun))连接的两个scFv分子的蛋白质(参见例如,Kruif和Logtenberg,1996)。或者,两个scFv由长度足以允许两个scFv形成并且结合至抗原的肽接头连接,例如像US20060263367中所述。

[0599] 对于scFv的综述,参见Ahmad ZA等人,(2012)Clinical and Developmental Immunology doi:10.1155/2012/980250。

[0600] 微型抗体

[0601] 熟练的技术人员将意识到,微型抗体包含与抗体的(CH2和/或(CH3结构域融合的抗体的VH和VL结构域。任选地,微型抗体包含在所述VH与VL之间的铰链区,这种构象有时被称为Flex微型抗体。微型抗体不包含CH1或CL。在一个实例中,所述VH和VL结构域与抗体的铰链区和CH3结构域融合。所述微型抗体的可变区中的至少一个以本公开的方式结合至PAR4。示例性微型抗体及其产生方法描述于例如W094/09817中。

[0602] 其它含抗体可变区的蛋白质

[0603] 本公开还考虑了其它含可变区的PAR4结合蛋白,如:

[0604] (i) 如US5,731,168中所述的“钥和孔”双特异性蛋白质;(ii) 异缀合物蛋白,例如,如US4,676,980中所述;

[0605] (iii) 使用化学交联剂产生的异缀合物蛋白,例如,如US4,676,中所述;

[0606] (iv) Fab'-SH片段,例如,如Shalaby(1992) J Exp Med 1;175(1):217-25中所述;

[0607] (v) 单链Fab;或

[0608] (vi) Fab3(例如,如EP 19930302894中所述)。

[0609] 含基于非抗体的抗原结合结构域的蛋白质

[0610] 免疫球蛋白和免疫球蛋白片段

[0611] 本公开的化合物的实例是包含免疫球蛋白,如T细胞受体或重链免疫球蛋白(例如,IgNA、骆驼科动物抗体)的可变区的蛋白质。

[0612] 术语“免疫球蛋白”应理解为包括包含免疫球蛋白结构域的任何抗原结合蛋白。示例性免疫球蛋白是抗体。由术语“免疫球蛋白”涵盖的另外蛋白质包括结构域抗体、骆驼化抗体和来自软骨鱼的抗体(即,免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR))。一般来说,骆驼抗体和IgNAR包含VH,然而缺乏VL且通常称为重链免疫球蛋白。其它“免疫球蛋白”包括T细胞受体。

[0613] 重链免疫球蛋白

[0614] 重链免疫球蛋白在结构上不同于许多其它形式的免疫球蛋白(例如抗体),只要它们包含重链但不包含轻链。因此,这些免疫球蛋白也被称为“仅重链抗体”。重链免疫球蛋白存在于例如骆驼科动物和软骨鱼(也称为IgNAR)中。

[0615] 天然存在的重链免疫球蛋白中存在的可变区通常被称为骆驼科动物Ig中的“VHH结构域”和IgNAR中的V-NAR,以便将它们与常规4链抗体中存在的重链可变区(其被称为“VH结构域”)和常规4链抗体中存在的轻链可变区(其被称为“VL结构域”)区分开来。

[0616] 重链免疫球蛋白不需要轻链的存在来以高亲和力和高特异性结合至相关抗原。这意味着单结构域结合片段可源自重链免疫球蛋白,所述重链免疫球蛋白易于表达并且通常稳定且可溶。来自骆驼科动物及其可变区的重链免疫球蛋白的一般描述及其产生和/或分离和/或使用的方法尤其在以下参考文献W094/04678、W097/49805和W097/49805中找到。

[0617] 来自软骨鱼及其可变区的重链免疫球蛋白的一般描述及其产生和/或分离和/或使用的方法尤其在W02005/118629中找到。

[0618] V样蛋白

[0619] 本公开的PAR4结合蛋白的实例是T细胞受体。T细胞受体具有两个V结构域,所述V结构域组合成类似于抗体的Fv模块的结构。Novotny等人,Proc Natl Acad Sci USA 88: 8646-8650,1991描述T细胞受体的两个V结构域(称为 α 和 β)如何可融合并表达为单链多肽,并且进一步如何类似于抗体scFv直接改变表面残基以降低疏水性。描述包含两个V- α 和V- β 结构域的单链T细胞受体或多聚T细胞受体的产生的其它公布包括W01999/045110或W02011/107595。

[0620] 包含抗原结合结构域的非抗体蛋白包括具有V样结构域的蛋白质,所述蛋白质通常为单体。包含此类V样结构域的蛋白质的实例包括CTLA-4、CD28和ICOS。包含此类V样结构域的蛋白质的进一步公开包括在W01999/045110中。

[0621] Adnectin

[0622] 在一个实例中,本公开的PAR4结合蛋白是adnectin。

[0623] Adnectin基于人纤连蛋白的第十纤连蛋白III型(10Fn3)结构域,其中环区被改变以赋予抗原结合。例如,可对10Fn3结构域的 β -夹心的一端的三个环进行工程化,以使Adnectin能够特异性地识别抗原。有关进一步细节,参见US20080139791或W02005/056764。

[0624] 抗运载蛋白

[0625] 在另一实例中,本公开的PAR4结合蛋白是抗运载蛋白。抗运载蛋白源自脂质运载蛋白,其是细胞外蛋白质的一个家族,所述脂质运载蛋白转运小的疏水性分子如类固醇、后胆色素(bilin)、类视黄醇以及脂质。脂质运载蛋白具有在圆锥形结构的开口端有多个环的

刚性 β -折叠二级结构,它们可被工程化以结合至抗原。此类工程化的脂质运载蛋白被称为抗运载蛋白。有关抗运载蛋白的进一步说明,参见US7250297B1或US20070224633。

[0626] 亲和体

[0627] 在另一实例中,本公开的PAR4结合蛋白是亲和体。亲和体是来源于金黄色葡萄球菌的蛋白A的Z结构域(抗原结合结构域),它可以被工程化以结合至抗原。所述Z结构域由大约58个氨基酸的三螺旋束组成。已经通过表面残基的随机化生成了文库。有关进一步细节,参见EP 1641818。

[0628] Avimer

[0629] 在另一实例中,本公开的PAR结合蛋白是Avimer。Avimer是来源于A-结构域支架家族的多结构域蛋白。约35个氨基酸的天然结构域采取限定的二硫化物键合结构。通过由A-结构域家族展示的天然变异的改组产生多样性。有关进一步细节,参见W02002088171。

[0630] DARPin

[0631] 在另一实例中,本公开的PAR4结合蛋白是设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)。DARPin来源于锚蛋白,锚蛋白是介导整合膜蛋白附接至细胞骨架的一种蛋白质家族。单个锚蛋白重复序列是由两个 α 螺旋和 β -转角组成的33个残基的基序。它们可通过随机化在每个重复序列的第一 α -螺旋和 β -转角中的残基而被工程化,以结合不同的靶抗原。可通过增加模块的数目来增加其结合界面(亲和力成熟的方法)。有关进一步细节,参见US20040132028。

[0632] 其它非抗体多肽

[0633] 包含结合结构域的非抗体蛋白包括基于人 γ -晶体蛋白和人泛素(affilins)、人蛋白酶抑制剂的kunitz型结构域、Ras结合蛋白AF-6的PDZ结构域、蝎子毒素(卡律蝎毒素)、C型凝集素结构域(四连接素)的那些。

[0634] 恒定区

[0635] 本公开涵盖包含可变区和恒定区或其一个或多个结构域(例如,Fc、CH2和/或CH3结构域)的PAR4结合蛋白。基于本文的公开内容和本文论述的参考文献,技术人员将了解术语恒定区和恒定结构域的含义。

[0636] 可用于产生本公开的PAR4结合蛋白的恒定区序列可从许多不同来源获得。在一些实例中,所述PAR4结合蛋白的恒定区或其部分来源于人抗体。此外,所述恒定结构域或其部分可来源于任何抗体类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE;和任何抗体同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一个实例中,使用人同种型IgG1。

[0637] 各种恒定区基因序列可以公开可获得的保藏物的形式获得,或者其序列可从公开可获得的数据库中获得。可选择具有特定效应子功能(或缺乏特定效应子功能)或具有特定修饰的恒定区以降低免疫原性。

[0638] 在一个实例中,本公开的蛋白质具有或展示效应子功能,所述效应子功能有助于表达PAR4的细胞或使得表达PAR4的细胞能够至少部分消滅、大致上消滅或消除。这种效应子功能可以是增强的与Fc受体的结合亲和力、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0639] 在一个实例中,所述PAR4结合蛋白能够诱导增强水平的效应子功能。

[0640] 在一个实例中,由恒定区诱导的效应子功能的水平相对于野生型IgG1抗体的Fc区

或野生型IgG3抗体的Fc区得到增强。

[0641] 在另一实例中,恒定区经修饰以与没有所述修饰的恒定区相比增强其所能够诱导的效应子功能的水平。此类修饰可位于氨基酸层面和/或二级结构层面和/或三级结构层面和/或Fc区的糖基化。

[0642] 本领域的技术人员将了解,较高效应子功能可以多种方式中的任一种表现,例如表现为较高作用水平、更持续作用或较快作用速率。示例性恒定区修饰包括氨基酸取代,如根据Kabat的EU索引编号的S239D/I332E或根据Kabat的EU索引编号的S239D/A330L/I332E。

[0643] 增强Fc区诱导效应子功能的能力的另外氨基酸取代在本领域中是已知的和/或描述于例如US6737056或US7317091中。

[0644] 在一个实例中,改变恒定区的糖基化以增强其诱导增强的效应子功能的能力。在一些实例中,根据本公开的Fc区包含缺乏衔接(直接或间接)至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构,即Fc区是“无岩藻糖基化”的。此类变体可具有提高的诱导ADCC的能力。用于产生无岩藻糖基化抗体的方法包括,在不能表达 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)的细胞系中表达Fn14结合蛋白(例如,如Yumane-Ohnuki等人,2004所述)。其它方法包括使用固有地产生能够诱导增强的效应子功能的抗体的细胞系(例如用于产生病毒疫苗的鸭胚来源的干细胞,WO2008/129058;在禽类**EBX**[®]细胞中产生重组蛋白,WO 2008/142124)。

[0645] PAR4结合蛋白还可包含能够诱导增强的CDC水平的Fc区。例如,IgG1和IgG3的杂合体产生具有增强的CDC活性的抗体(Natsume等人,2008)。

[0646] 用于确定抗体或其抗原结合片段诱导效应子功能的能力的方法是本领域已知和/或本文所述的。

[0647] 在另一个实例中,所述蛋白质包含增加PAR4结合蛋白的半衰期的一个或多个氨基酸取代。例如,所述PAR4结合蛋白包含恒定区,所述恒定区包含使所述恒定区对新生Fc区(FcRn)的亲和力增加的一个或多个氨基酸取代。例如,所述恒定区在较低pH,例如约pH 6.0下对FcRn具有增加的亲和力,以促进在核内体中的Fc/FcRn结合。在一个实例中,与在约pH 7.4下的亲和力相比,所述恒定区在约pH 6下对FcRn具有增加的亲和力,这促进在细胞循环之后将Fc再释放到血液中。这些氨基酸取代可用于通过减少自血液的清除率而延长蛋白质的半衰期。

[0648] 根据EU编号系统,示例性氨基酸取代包括T250Q和/或M428L或T252A、T254S和T266F或M252Y、S254T和T256E或H433K和N434F。另外的或替代的氨基酸取代例如描述在US20070135620或US7083784中。本公开的中和PAR4结合蛋白可包含IgG4恒定区或稳定的IgG4恒定区。术语“稳定的IgG4恒定区”将理解为指已经被修饰以减少Fab臂交换或经历Fab臂交换或形成半抗体的倾向或形成半抗体的倾向的IgG4恒定区。“Fab臂交换”是指对人IgG4的一类蛋白质修饰,其中IgG4重链和连接的轻链(半分子)交换成来自另一IgG4分子的重-轻链对。因此,IgG4分子可获得辨别两种不同的抗原的两个不同的Fab臂(产生双特异性分子)。Fab臂交换在体内自然地发生且可由纯化的血细胞或如被还原的谷胱甘肽的还原剂在体外诱导。“半抗体”在IgG4抗体分解以形成各自含有单一重链和单一轻链的两个分子时形成。

[0649] 在一个实例中,根据Kabat的系统,稳定的IgG4恒定区在铰链区的241位处包含脯氨酸。此位置对应于根据EU编号系统的铰链区的228位。在人IgG4中,所述残基通常为丝氨

酸。在丝氨酸取代脯氨酸之后，IgG4绞链区包含序列CPPC。在这方面，技术人员将知道“铰链区”为赋予抗体的两个Fab臂移动性的连接Fc区和Fab区的抗体重链恒定区的富脯氨酸部分。所述铰链区包括半胱氨酸残基，其在重链间双硫键中涉及到。根据Kabat的编号系统，其通常被定义为自人IgG1的Glu226至Pro243的一段。其它IgG同种型的绞链区可通过放置在相同位置形成重链间双硫(S-S)键的第一半胱氨酸残基和最后的半胱氨酸残基来与IgG11序列比对(参见，例如W02010/080538)。

[0650] 经修饰的蛋白质

[0651] 本公开提供了与本公开的序列具有至少80%同一性并且具有本文所述或要求的相同功能特征的PAR4结合蛋白。

[0652] 在一个实例中，本公开的PAR4结合蛋白包含与本文公开的VL序列，例如SEQ ID NO:11具有至少90%或91%或92%或93%或94%或95%或96%或97%或98%或99%同一性的序列。

[0653] 在另一个实例中，本公开的PAR4结合蛋白包含与本文所述的公开的VH，例如SEQ ID NO:12具有至少90%或91%或92%或93%或94%或95%或96%或97%或98%或99%同一性的序列。

[0654] 本公开还提供了编码前述蛋白质的核酸或在中等至高度严格条件下与其杂交的核酸。

[0655] 本公开还涵盖编码包含SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中列出的序列的蛋白质的核酸，所述序列由于遗传密码的简并性而与本文示例的序列不同。

[0656] 核酸或多肽的同一性%通过GAP (Needleman和Wunsch, 1970) 分析 (GCG程序) 在空位产生罚分=5和空位延长罚分=0.3下测定。查询序列的长度为至少50个残基，且GAP分析在至少50个残基的区域上比对这两个序列。例如，查询序列的长度为至少100个残基，且GAP分析在至少100个残基的区域上比对这两个序列。在一个实施例中，两个序列在其整个长度上比对。

[0657] 抗体的糖基化模式可从参考抗体的原始糖基化模式改变。改变是指缺失抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分，和/或添加不存在于抗体中的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分连接至天冬酰胺残基的侧链。其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸的三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是碳水化合物部分酶促连接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此，在多肽中存在这些三肽序列的任何一个产生一个潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟氨基酸连接，最常见的是丝氨酸或苏氨酸，不过也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。糖化位点至抗体的添加宜通过改变氨基酸序列以使得其含有上述三肽序列中的一个或多个来实现(对于经N连接的糖化位点)。改变也可通过对原始蛋白的序列的一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或取代来造成(对于O-连接的糖基化位点)。

[0658] 本发明抗体的修饰的糖型可用于多种目的，包括但不限于增强或降低效应子功能和/或改变抗体的半衰期(参见，例如，W0/2007/010401)。此类改变可导致C1q结合和CDC或Fc γ R结合和ADCC的减少或增加。例如，可在重链恒定区的一个或多个氨基酸残基中进行取代，从而与经修饰的抗体相比，引起效应子功能的改变、同时保留与抗原结合的能力，参见

US 5,624,821和US 5,648,260。经工程化的糖型可通过本领域的技术人员已知的任何方法来产生：例如，通过使用工程化的或变体表达菌株、通过与一种或多种酶（例如， $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶III (GnTIII 1)）进行共表达、通过在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达包含抗体或其片段，或通过所述抗体或其片段已经被表达之后修饰一种或多种碳水化合物。用于产生工程化的糖型的方法在本领域中是已知的，并且包括但不限于在以下文献中描述的那些：Umana等人，1999, Nat. Biotechnol 17:176-180；Davies等人，2007 Biotechnol Bioeng 74:288-294；Shields等人，2002, J Biol Chem 277:26733-26740；Shinkawa等人，2003, J Biol Chem 278:3466-3473；美国专利号6,602,684；美国序列号10/277,370；美国序列号10/113,929；PCT WO 00/61739A1；PCT WO 01/292246A1；PCT WO 02/311140A1；PCT WO 02/30954A1；Potelligent®技术 (Biowa, Inc. Princeton, N.J.)；GlycoMab™糖基化工程化技术 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)。参见，例如WO 00061739；EA01229125；US 20030115614；Okazaki等人，2004, JMB, 336:1239-49。

[0659] 就效应子功能而言，可能需要修饰本发明的抗体，例如，以便增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可通过在抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。另选地或除此之外，可将半胱氨酸残基引入Fc区中，从而允许在这个区中形成链间二硫键。由此产生的同二聚抗体可具有提高的内化能力和/或增强的补体介导的细胞杀死性和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见Caron等人, J. Exp Med. 176:1 191-1 195 (1992) 和Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体还可使用如在Wolff等人Cancer Research 53:2560-2565 (1993)中描述的异双功能交联剂来制备。或者，可工程化具有双Fc区的抗体且因此其可具有增强的补体溶解和ADCC能力。参见Stevenson等人Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。

[0660] 为了增加抗体的血清半衰期，可例如将补救受体结合表位并入到抗体（尤其是抗体片段）中，如在美国专利号5,739,277中所描述的。如本文使用的术语“补救受体结合表位”是指负责使一种IgG分子（例如，IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4）的体内血清半衰期延长的所述IgG分子的Fc区的表位。D. 或者，可通过聚乙二醇化来增加抗体的半衰期。

[0661] 亲和力成熟

[0662] 在另一个实例中，将本公开的现有PAR4结合蛋白亲和力成熟以产生能够以增加的亲和力结合PAR4的抗体。例如，分离编码VL和/或VH的序列，并且对CDR编码区（例如，编码VL和/或VH的CDR3的区域）进行突变，以使得引入一个或多个氨基酸取代。然后例如在竞争性测定中筛选所得的突变体PAR4-结合蛋白与PAR4的结合。

[0663] 根据本公开的PAR4结合蛋白可以是可溶性分泌蛋白且可呈现为细胞表面上的融合蛋白，或粒子（例如，噬菌体或其它病毒、核糖体或孢子）。示例性噬菌体展示方法描述于例如US5821047；US6248516和US6190908。然后筛选使用这些方法产生的噬菌体展示颗粒，以鉴定具有足以结合至靶抗原例如PAR4的构象的展示的PAR4-结合蛋白。

[0664] 蛋白质产生

[0665] 在一个实例中，通过在足以产生蛋白质的条件（例如，如本文所述和/或本领域已知）下培养细胞系（例如杂交瘤）来产生本公开的PAR4结合蛋白。

[0666] 重组表达

[0667] 在重组蛋白的情况下,将编码所述重组蛋白的核酸置于一种或多种表达构建体(例如表达载体)中,然后将所述一种或多种表达构建体转染到宿主细胞,如可产生二硫桥或键的细胞,如大肠杆菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞中。示例性的哺乳动物细胞包括否则不产生免疫球蛋白蛋白质的猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞。实现这些目的分子克隆技术是本领域已知的,并且描述于例如Ausubel或Sambrook中。多种克隆和体外扩增方法适用于构建重组核酸。产生重组抗体的方法在本领域中也是已知的。参见US4816567;US7923221和US7022500。

[0668] 在分离后,将编码本公开的蛋白质的核酸插入插入表达构建体或可复制载体中以供进一步克隆(扩增DNA)或在无细胞系统或细胞中表达。例如,所述核酸可操作地连接至启动子,如本文所用,术语“启动子”应以其最广泛情形理解且包括基因组基因的转录调控序列,包括精确转录起始所需的TATA盒或起始因子元件,有或没有改变核酸表达(例如响应于发育和/或外部刺激物,或以组织特异性方式)的其它调控元件(例如上游活化序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子)。在本公开的上下文中,术语“启动子”也用于描述重组、合成或融合核酸,或赋予、活化或增强其所可操作地连接的核酸的表达的衍生物。示例性启动子可含有一个或多个特定调控元件的额外拷贝以进一步增强表达和/或改变所述核酸的空间表达和/或时间表达。

[0669] 如本文所用,术语“可操作地连接至”意指相对于核酸定位启动子以使得所述核酸的表达受所述启动子控制。

[0670] 本公开还考虑了无细胞表达系统。例如,将编码本公开的Fn1-4结合蛋白的核酸可操作地连接至适合的启动子,例如T7启动子,并且使所得表达构建体暴露于足以进行转录和翻译的条件。已经描述了用于体外表达或无细胞表达的典型表达载体,包括但不限于TNT T7和TNT T3系统(Promega)、pEXP1-DEST和pEXP2-DEST载体(Invitrogen)。

[0671] 用于在细胞中表达的许多载体可获得。载体组分通常包括但不限于以下中的一种或多种:信号序列、编码本公开的Fn14结合蛋白的序列(例如由本文提供的信息得到)、增强子元件、启动子和转录终止序列。本领域的技术人员将了解适用于表达蛋白质的序列。例如,示例性信号序列包括原核分泌信号(例如pelB、碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定性肠毒素II)、酵母分泌信号(例如转化酶前导序列、a因子前导序列或酸性磷酸酶前导序列)或哺乳动物分泌信号(例如单纯疱疹gD信号)。

[0672] 示例性启动子包括在原核生物中具有活性的启动子(例如,phoA启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统和杂合体启动子,如tac启动子)。

[0673] 在哺乳动物细胞中具有活性的示例性启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子(CMV-IE)、人延伸因子1-oc启动子(EF1)、小核RNA启动子(U1a和U1b)、oc-肌球蛋白重链启动子、猿病毒40启动子(SV40)、劳斯肉瘤病毒启动子(RSV)、腺病毒主要晚期启动子、 β 肌动蛋白启动子;包含CMV增强子/ β 肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子或其活性片段的杂合调控元件。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是通过SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, AUSTRALIAN CELL BANK CRL 1651);人胚肾细胞系(293或亚克隆以用于悬浮培养生长的293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK, AUSTRALIAN CELL BANK CCL 10);或中国仓鼠卵巢细胞

(CHO)。

[0674] 适合在酵母细胞(例如像选自包含巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和粟酒裂殖酵母(*S.pombe*))中表达的典型启动子包括但不限于ADH1启动子、GAL1启动子、GAL4启动子、CUP1启动子、PH05启动子、nmt启动子、RPR1启动子或TEF1启动子。

[0675] 用于将分离的核酸分子或包含所述核酸的基因构建体引入细胞中用于表达的方式对于本领域的技术人员来说是已知的。用于给定细胞的技术取决于已知成功技术。用于将重组DNA引入细胞中的方式包括显微注射、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体(如使用lipofectamine(Gibco,MD,USA)和/或cellfectin(Gibco,MD,USA))介导的转染、PEG介导的DNA吸收、电穿孔、病毒转导(例如,使用慢病毒)和微粒轰击(如使用涂有DNA的钨粒子或金粒子(Agracetus Inc.,WI,USA))等。

[0676] 用于产生本公开的PAR4结合蛋白的宿主细胞可在多种培养基中培养,取决于所用细胞类型。可商购获得的培养基(如Ham's F10(Sigma)、最低必需培养基((MEM),(Sigma))、RPMI-1640(Sigma)和杜尔贝科氏改良的伊格尔氏培养基((DMEM),Sigma)适于培养哺乳动物细胞。用于培养本文所述的其它细胞类型的培养基在本领域中是已知的。

[0677] 蛋白质的分离

[0678] 可分离或纯化本公开的PAR4结合蛋白。

[0679] 用于纯化本公开的PAR4结合蛋白的方法是本领域已知的和/或本文所述的。

[0680] 在使用重组技术时,本公开的PAR4结合蛋白可在周质间隙中细胞内产生,或直接分泌到培养基之中。如果抗体在细胞内产生,则作为第一步,(例如)通过离心或超滤除去宿主细胞抑或溶解片段的微粒碎片。在所述蛋白质分泌到培养基中的情况下,首先使用可商购的蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)对来自此类表达系统的上清液进行浓缩。可在任何前述步骤中包括蛋白酶抑制剂(如PMSF)以抑制蛋白水解并且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0681] 可使用例如离子交换、羟磷灰石色谱法、疏水相互作用色谱法、凝胶电泳、透析、亲和色谱法(例如蛋白质A亲和色谱法或蛋白质G色谱法)或前述方法的任何组合来纯化从细胞中制备的蛋白质。这些方法是本领域已知的,并且描述于例如W099/57134或Zola(1997)中。

[0682] 熟练的技术人员还将了解,可对本公开的PAR4结合蛋白进行修饰以包括标签,以便促进纯化或检测,例如聚组氨酸标签,例如六聚组氨酸标签,或流感病毒血凝素(HA)标签,或猿病毒5(V5)标签,或FLAG标签,或谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签。例如,标签是hexa-his标签。接着使用本领域中已知的方法(如亲和纯化)对所得蛋白质进行纯化。例如,包含hexa-his标签的蛋白质通过使包含所述蛋白质的样品与固定在固体或半固体载体上的特异性地结合hexa-his标签的镍-氨基三乙酸(Ni-NTA)接触,洗涤样品以除去未结合的蛋白质并随后洗脱结合的蛋白质来纯化。或者或另外,在亲和纯化方法中使用结合至标签的配体或抗体。

[0683] 缀合物

[0684] 本公开还提供了根据任何实例的本文所述的PAR4结合蛋白的缀合物。蛋白质可缀合的化合物的实例选自由以下组成的组:放射性同位素、可检测的标记、治疗性化合物、胶

体、毒素、核酸、肽、蛋白质、增加蛋白质在受试者中的半衰期的化合物以及它们的混合物。示例性治疗剂包括但不限于抗血管生成剂、抗新血管形成和/或其它血管生成剂抗增殖剂、促凋亡剂、化学治疗剂或治疗性核酸。毒素包括对细胞有害(例如,杀伤)的任何剂。关于本领域已知的这些类别的药物及其作用机制的描述,参见Goodman等人,(1990)。与免疫球蛋白-免疫毒素缀合物的制备有关的另外技术在例如US5194594中提供。示例性毒素包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲菌素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(saponaia officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝裂吉菌素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯(tricothecene)。参见例如,W093/21232。

[0685] 在一个实例中,根据任何实例的如本文所述的PAR4结合蛋白缀合或连接至另一种蛋白,例如免疫调节剂或延长半衰期的蛋白质或与血清白蛋白结合的肽或其它蛋白质等。示例性血清白蛋白结合肽或蛋白质描述于US20060228364或US20080260757中。

[0686] 在另一实例中,所述蛋白质缀合至“受体”(如链霉亲和素)以用于细胞预靶向中,其中向患者施用所述缀合物,随后使用清除剂从循环除去未结合的缀合物且接着施用缀合至治疗剂(例如放射性核苷酸)的“配体”(例如抗生物素蛋白)。

[0687] 可修饰本公开的PAR4结合蛋白以含有本领域已知的且容易获得的另外非蛋白质部分。例如,适合于蛋白质衍生化的部分是生理上可接受的聚合物,例如水溶性聚合物。此类聚合物可用于增加稳定性和/或降低清除率(例如,通过肾脏)和/或降低本公开的Fn14结合蛋白的免疫原性。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)或丙二醇(PPG)。

[0688] 在一个实例中,根据任何实例的如本文所述的PAR4结合蛋白包含一种或多种可检测标记物以促进检测和/或分离。例如,所述化合物包含荧光标记,例如像荧光素(FITC)、5,6-羧甲基荧光素、德克萨斯红、硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑-4-基(NBD)、香豆素、丹磺酰氯、罗丹明、4'-6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)和花菁染料Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7、荧光素(5-羧基荧光素-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、罗丹明(5,6-四甲基罗丹明)。这些荧光体的吸收和发射最大值分别为:FITC(490nm;520nm),Cy3(554nm;568nm),Cy3.5(581nm;588nm),Cy5(652nm;672nm,Cy5.5(682nm;703nm)和Cy7(755nm;778nm)。替代地或另外地,用例如荧光半导体纳米晶体标记根据任何实例的如本文所述的Fn1-4结合蛋白(例如,如US6,306,610中所述)。

[0689] 替代地或另外,用例如磁性或顺磁性化合物,如铁、钢、镍、钴、稀土材料、钆-铁-硼、亚铁-铬-钴、镍-亚铁、钴-铂或铈铁氧体标记PAR4结合蛋白。

[0690] 固定的蛋白质

[0691] 在一个实例中,PAR4结合蛋白被固定在固体或半固体基质上。术语“固定”应理解为涉及将蛋白质固定到特定基质上的各种方法和技术,例如,如W099/56126或W002/26292中所述。例如,固定可起到稳定蛋白质的作用,使得其活性不会因生物学、化学或物理暴露而降低或不利地改变,尤其是在储存或单批使用过程中。用于将蛋白质固定在基质上的各

种方法是本领域已知的,包括交联、与载体结合、保留在半渗透基质内。示例性基质包括多孔凝胶、氧化铝、膨润土、琼脂糖、淀粉、尼龙或聚丙烯酰胺。

[0692] 测定本公开的结合蛋白的活性

[0693] 结合测定

[0694] 这种测定的一种形式是抗原结合测定,例如,如在Scopes (1994) Protein Purification:principles and practice Springer-Verlag中所述。这种方法通常涉及标记PAR4结合蛋白并使其与固定的抗原或其片段,例如,包含与生物素融合的PAR4的细胞外部分的蛋白(例如,如SEQ ID NO:6所示)接触。在洗涤以除去非特异地结合的蛋白质之后,检测标记的量,且因此检测结合的蛋白质的量。当然,所述PAR4结合蛋白可被固定且所述抗原可被标记。也可使用淘选型测定。本文的实例描述基于flag标记的PAR4的结合测定,所述flag标记的PAR4可在HEK细胞的表面上表达。在凝血酶存在下,PAR4结合蛋白对PAR4切割的抑制可通过流式细胞术进行测量。

[0695] 可使用本领域中已知的常规竞争结合测定法,例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)来筛选和鉴定竞争性地抑制本发明的PAR4抗体结合至表位的PAR4结合蛋白。

[0696] 竞争性结合测定

[0697] 用于测定竞争性地抑制本公开的抗体(例如mAb ARC3.H4b)的结合的PAR4结合蛋白的测定对于熟练的技术人员是显而易见的。例如,使本公开的抗体缀合至例如荧光标记或放射性标记的可检测标记。然后将标记的抗体和测试PAR4结合蛋白混合并与融合至抗体或包含其表位的肽的Fc区的PAR4或其胞外结构域接触。随后测定标记的抗体的水平且将其与在不存在PAR4结合蛋白的情况下使标记的抗体与PAR4或PAR4-Fc融合物或包含其表位的肽接触时测定的水平进行比较。如果与在不存在测试PAR4结合蛋白的情况下相比较,标记的抗体的水平在存在所述PAR4结合蛋白的情况下降低,则所述PAR4结合蛋白竞争性抑制所述抗体的结合。

[0698] 任选地,使测试PAR4结合蛋白缀合至除所述抗体以外的不同的标记。这容许检测测试PAR4结合蛋白与所述蛋白质或表位的结合的水平。

[0699] 在另一个实例中,在使PAR4或PAR4-Fc融合物或包含其表位的肽与本文所述的抗体接触之前,使测试PAR4结合蛋白与PAR4或PAR4-Fc融合物或包含其表位的肽结合。与在不存在所述PAR4结合蛋白的情况相比较,在存在所述PAR4结合蛋白的情况下结合的抗体的量减少表明所述PAR4结合蛋白竞争性地抑制所述抗体与PAR4的结合。也可使用标记的PAR4结合蛋白并首先允许所述抗体与PAR4或PAR4-Fc融合物或包含其表位的肽结合来进行相互测定。在这种情况下,与不存在抗体的情况相比,在存在所述抗体的情况下与PAR4或PAR4-Fc融合物或包含其表位的肽结合的标记的PAR4结合蛋白的量减少表明PAR4结合蛋白竞争性地抑制所述抗体与PAR4的结合。

[0700] 表位作图测定

[0701] 在另一实例中,将由本文所述的PAR4结合蛋白结合的表位作图。表位作图方法对于本领域的技术人员将是显而易见的。例如,产生一系列跨越包含目标表位的PAR4序列或其区域的重叠肽,例如,包含10-15个氨基酸的肽。随后使所述PAR4结合蛋白与各种肽或其组合接触且测定其所结合的肽。这容许测定包含所述PAR4结合蛋白结合的表位的肽。如果多个非邻近肽由PAR4结合蛋白结合,则所述PAR4结合蛋白可结合构象表位。

[0702] 在一个实例中,PAR4的随机片段在噬菌体的表面上表达,并且所述噬菌体与PAR4结合蛋白接触。然后可分离与由所述抗体结合的噬菌体,并通过噬菌体中所含的编码核酸推导所表达的肽的氨基酸序列。通过分离具有重叠肽的一系列噬菌体,鉴定了包含表位中所含的残基的PAR4区域的肽。

[0703] 替代地或另外,PAR4内的氨基酸残基例如通过丙氨酸扫描诱变而突变,且测定减少或防止PAR4结合蛋白结合的突变。减少或防止所述PAR4结合蛋白的结合的任何突变很可能在由所述PAR4结合蛋白所结合的表位内。

[0704] 另一方法包括使PAR4或其区域与本公开的固定的PAR4结合蛋白结合且用蛋白酶消化所得复合物。随后分离保持与固定的PAR4结合蛋白结合的肽且例如使用质谱分析以测定其序列。

[0705] 又一方法涉及将PAR4或其区域中的氢转化成氘原子且使所得蛋白质与本公开的固定的PAR4结合蛋白结合。随后使氘核转化回至氢,分离PAR4或其区域,用酶消化并例如使用质谱分析以鉴定包含氘核的那些区域,所述氘核可能已经通过本文所述的PAR4结合蛋白的结合而被保护免于转化成氢。

[0706] 在前述段落中,提及PAR4涵盖重组PAR4,包括其细胞外结构域。

[0707] 亲和力测定

[0708] 任选地,测定PAR4结合蛋白对于PAR4或其含表位肽的解离常数(Kd)或缔合常数(Ka)或结合常数(KD,即Ka/Kd)。在一个实例中,通过放射性标记的或荧光标记的PAR4结合测定来测量PAR4结合蛋白的这些常数。这种测定使得在存在滴定系列的未标记的PAR4的情况下PAR4结合蛋白与最低浓度的标记的PAR4平衡。在洗涤以除去未结合的PAR4之后,测定标记的量。根据另一个实例,通过使用表面等离子体共振测定,例如使用BIAcore表面等离子体共振(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)与固定的PAR4或其区域来测量常数。

[0709] 蛋白质检测测定

[0710] 本公开的一个实例检测PAR4或表达PAR4的细胞(例如血小板)的存在。使用熟练的技术人员已知的多种技术中的任一种来确定蛋白质或细胞的量、水平或存在,所述技术例如像选自以下组成的组的技术:流式细胞术、免疫组织化学、免疫荧光、免疫印迹、蛋白质印迹、斑点印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定、荧光共振能量转移(FRET)、基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)、电喷雾电离(ESI)、质谱(包括串联质谱,例如LC MS/MS)、生物传感器技术、渐消光纤技术或蛋白质芯片技术。

[0711] 在一个实例中,用于确定蛋白质的量或水平的测定是半定量测定。在另一个实例中,用于确定蛋白质的量或水平的测定是定量测定。

[0712] 例如,用免疫测定、例如使用选自以下组成的组的测定检测蛋白质:免疫组织化学、免疫荧光、酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光联免疫吸附测定(FLISA)、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)、生物传感器测定、蛋白质芯片测定和免疫染色测定(例如免疫荧光)。

[0713] 标准固相ELISA或FLISA形式对于确定来自各种样品的蛋白质的浓度特别有用。

[0714] 在一种形式中,ELISA或FLISA包括将本公开的PAR4结合蛋白或与PAR4的不同表位结合的蛋白质固定在固体基质(例如像膜、聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔、聚苯乙烯或聚碳酸酯试纸或玻璃载体)上。然后将样品与固定的蛋白质建立物理联系,PAR4被结合或“捕获”。然后使用与PAR4的不同表位结合的第二标记的化合物检测结合的PAR4。或者,可使用结合第

二(检测)抗体的第三标记的抗体。对于技术人员将显而易见的是,本文描述的测定形式适合于高通量形式,例如像筛选过程的自动化或微阵列形式。此外,上述测定的变化形式对于本领域技术人员将是显而易见的,例如像竞争性ELISA。

[0715] 在替代实例中,使用本领域中已知的方法,例如像免疫组织化学或免疫荧光在细胞内或细胞上检测多肽。使用免疫荧光的方法是示例性的,因为它们是按定量的或至少半定量的。定量染色细胞的荧光程度的方法是本领域已知的,并且描述于例如Cuello,1984中。

[0716] 生物传感器装置通常采用与电流或阻抗测量元件组合的电极表面,以与测定底物(例如在US5567301中描述的)组合整合到装置中。将本公开的PAR4结合蛋白并入生物传感器装置的表面上,并使生物样品与所述装置接触。生物传感器装置检测到的电流或阻抗的变化表明蛋白质与所述PAR4结合蛋白的结合。本领域中已知的一些形式的生物传感器还依赖于表面等离子体共振(SPR)来检测蛋白质相互作用,由此反射的表面等离子体共振表面的变化指示蛋白质与配体或抗体的结合(US5485277和US5492840)。

[0717] 由于易于使此类系统适应微米或纳米规模,生物传感器在高通量分析中特别有用。此外,此类系统方便地适于并入若干检测试剂,从而允许在单个生物传感器单元中多路复用诊断试剂。这允许同时检测少量体液中的若干蛋白质或肽。

[0718] 如本文实施例中所述,还可使用流式细胞术来检测蛋白质与PAR4的结合。

[0719] 抗PAR4抗体产生和选择

[0720] 用于产生或选择可用于本文的抗体的替代技术包括将淋巴细胞体外暴露于PAR4蛋白或PAR4肽(例如,如本文所述),以及在噬菌体或类似载体中选择抗体展示文库(例如,通过使用固定的或标记的PAR4蛋白或肽)。可通过筛选展示在噬菌体(噬菌体展示)或细菌(如大肠杆菌)上的随机肽文库来获得编码具有潜在PAR4多肽结合结构域的多肽的基因。编码多肽的核苷酸序列可以多种方式获得,如通过随机诱变和随机多核苷酸合成。这些随机肽展示文库可用于筛选与已知靶标相互作用的肽,所述靶标可以是蛋白质或多肽,如配体或受体、生物或合成大分子或有机或无机物质。用于产生和筛选这种随机肽展示文库的技术是本领域已知的(Ladner等人,美国专利号5,223,409;Ladner等人,美国专利号4,946,778;Ladner等人,美国专利号5,403,484和Ladner等人,美国专利号5,571,698),并且随机肽展示文库以及用于筛选此类文库的试剂盒例如可从Clontech(Palo Alto, Calif.)、Invitrogen Inc.(San Diego, Calif.)、New England Biolabs, Inc.(Beverly, Mass.)和Pharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway, N.J.)商购。可使用本文公开的PAR4序列筛选随机的肽展示文库,以鉴定结合至PAR4的蛋白质。这些与PAR4多肽相互作用的“结合蛋白”可用于标记细胞;通过亲和纯化分离同源多肽;它们可直接或间接地缀合至药物、毒素、放射性核素等。这些结合蛋白也可用于例如用于筛选表达文库和中和活性的分析方法中。结合蛋白还可用于诊断测定,以确定多肽的循环水平;用于检测或定量作为潜在病理或疾病的标记物的可溶性多肽。这些结合蛋白还可充当PAR4“拮抗剂”以在体外和体内阻断PAR4结合和信号转导。这些抗PAR4结合蛋白可用于抑制对蛋白酶活化的PAR4的细胞应答。

[0721] 可利用本领域技术人员已知的多种测定来检测特异性地结合至PAR4蛋白或肽的抗体。示例性测定详细描述于Antibodies:A Laboratory Manual, Harlow和Lane(Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988中。此类测定的代表性实例包括:并行免疫电泳、放射免疫测定、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、斑点印迹或蛋白质印迹测

定、抑制或竞争测定以及夹心测定。另外,可针对与野生型对比突变型PAR4蛋白、多肽或片段的结合来筛选抗体。

[0722] 测定PAR4结合蛋白的功能特征

[0723] PAR-4结合蛋白跨所有PAR4变体的抗血栓形成活性可使用来自基因分型为纯合子Ala120或Thr120或杂合子的人的血液在离体血小板聚集测定中进行检查以确认全变体功效。

[0724] 可通过在不存在和存在现有抗血小板药物途径抑制剂(阿司匹林(50 μ M)、P2Y₁₂抑制剂2-MeSAMP(50 μ M或100 μ M))的情况下确定其抗血栓形成作用来检查PAR4结合蛋白作为抗血栓形成剂的有用性,并且PAR1抑制剂沃拉帕沙(100mM)也用于离体血小板凝集测定中以与PAR4结合蛋白一起用于抗血栓形成作用的比较研究。当发明人已经证明血栓形成独立于这些机制而发生,将包括高剪切条件(3000s⁻¹) (Neeves KB等人2008) *J Thromb Haemost* 6:2193-2201)。

[0725] 另外或可替代地,小鼠体内血栓形成实验(Lee H等人(2012) *Brit J Pharmacol* 166:2188-2197;Mountford JK et al.(2015) *Nat Commun*6:6535)可用于检查PAR4结合蛋白的功能性。为了确保在这些小鼠实验中包含抗PAR4活性的阳性对照,可检查使用对应于小鼠和人受体序列的抗原产生的抗体(表2)的抗血栓形成作用,并且如上所述进行筛选。应注意,灵长类动物是唯一已知具有仅表达PAR1和PAR4的组合的血小板的物种。小鼠血小板表达PAR3和PAR4,并且只有PAR4具有功能性。因此,这些研究仅限于体内机制验证,但在人试验和非人类灵长类动物的临床前研究之外,是PAR4结合蛋白的抗血栓形成活性的最适当的体内检查。麻醉小鼠的颈动脉的电解损伤可用于检查PAR4结合蛋白对体内血栓形成和稳定性的影响(Lee H等人(2012) *Brit J Pharmacol* 166:2188-2197;Lee H等人(2012) *Thromb Haemost* 107)。使用多普勒流量探头记录血流。终点可评估血栓形成(至动脉闭塞的时间)和稳定性(闭塞后再通事件的数量和程度)以及通过损伤动脉的总血流量和通过石蜡包埋的动脉的横截面的Carstairs染色对血栓组织学的彻底检查。

[0726] 可通过确定蛋白酶刺激后的磷酸肌醇水解来研究PAR4活化。如本文所述的表位标记的PAR4测定也可用于检查PAR4结合蛋白对PAR4的切割和活化。

[0727] 用PAR4构建体或PAR4多态性变体转染的哺乳动物细胞(例如HEK293T细胞)是用于研究PAR4的拮抗剂的有用系统。PAR4转染的细胞用于筛选受体的配体以及天然配体的拮抗剂。为了概述这种方法,将编码受体的cDNA或基因与其表达所需的其它遗传元件(例如转录启动子)组合,并将所得表达载体插入宿主细胞中。选择表达DNA并产生功能性受体的细胞,并在多种筛选系统中使用。

[0728] 在筛选测定中使用表达功能性PAR4的细胞。多种适合的测定在本领域中是已知的。这些测定是基于对靶细胞中的生物应答的检测。新陈代谢增加至对照值以上指示调节PAR4活性或应答的测试化合物。一种这样的测定是细胞增殖测定。在存在或不存在测试化合物的情况下培养细胞,并通过例如测量氘化胸苷的掺入或通过基于3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑鎓(MTT)的代谢分解的比色测定法来检测细胞增殖(Mosman, J. *Immunol. Meth.* 65:55-63, 1983)。另一测定方法涉及测量测试化合物对在其细胞表面上含有目标受体的受体(+)细胞和不表达目标受体的受体(-)细胞的作用。可对这些细胞进行工程化改造以表达报告基因。报告基因与对受体连接途径有反应的启动子元件或应答元件

连接,并且所述测定检测报告基因的转录的活化。适合的应答元件包括环状AMP应答元件(CRE)、激素应答元件(HRE)、胰岛素应答元件(IRE)(Nasrin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:5273-77,1990)和血清应答元件(SRE)(Shaw等人,Cell 56:563-72,1989)。环状AMP应答元件综述于Roestler等人,J.Biol.Chem.263(19):9063-66;1988;和Habener,Molec.Endocrinol.4(8):1087-94;1990中。激素应答元件综述于Beato,Cell 56:335-44;1989中。在这方面,优选的启动子元件是血清应答元件或SRE(参见例如,Shaw等人,Cell 56:563-72,1989)。优选的这种报告基因是荧光素酶基因(de Wet等人,Mol.Cell.Biol.7:725,1987)。使用本领域已知的方法通过发光来检测荧光素酶基因的表达(例如,Baumgartner等人,J.Biol.Chem.269:29094-101,1994;Schenborn和Goiffin,Promega Notes 41:11,1993)。荧光素酶活性测定试剂盒可从例如Promega Corp.,Madison,Wis商购。这种类型的靶细胞系可用于筛选化学品、细胞条件培养基、真菌肉汤、土壤样品、水样品等的文库。这种类型的测定将检测直接阻断PAR4配体结合的化合物,以及阻断受体-配体结合后细胞途径中的过程的化合物。或者,可使用标记有可检测标记(例如¹²⁵I、生物素、辣根过氧化物酶、FITC等)的部分测试化合物或其它样品是否直接阻断PAR4结合。在这种类型的测定中,测试样品抑制PAR4活化的能力指示抑制活性,其可通过二次测定来确认。还可通过二次测定来确定和确认测试样品刺激PAR4活性的能力。

[0729] 可有利地采用使用配体结合受体或抗体或其结合片段的测定系统,以及可商购的生物传感器仪器(BIAcore,Pharmacia Biosensor,Piscataway,N.J.)。这样的受体、抗体或片段被固定到受体芯片的表面上。这种仪器的使用由Karlsson,J.Immunol.Methods 145:229-40,1991;和Cunningham和Wells,J.Mol.Biol.234:554-63,1993公开。使用胺或巯基化学品将受体、抗体或片段共价连接至葡聚糖纤维,所述葡聚糖纤维附接至流动池中的金膜。使测试样品通过所述池。如果样品中存在配体或表位,则它将分别结合至固定的受体或抗体,从而引起介质的折射率发生变化,所述变化被检测为金膜表面等离振子共振的变化。这种系统允许确定缔合和解离速率,由此可计算结合亲和力,并评估结合的化学计量。

[0730] 配体结合受体多肽也可在本领域已知的其它测定系统内使用。此类系统包括用于确定结合亲和力的Scatchard分析(参见Scatchard,Ann.NY Acad.Sci.51:660-72,1949)和量热测定(Cunningham等人,Science 253:545-48,1991;Cunningham等人,Science 245:821-25,1991)。

[0731] FLIPR测定是用于测量本发明的PAR4拮抗剂的活性的示例性体外测定。在这种测定中,通过PAR4激动剂在表达PAR4的细胞中诱导细胞内钙动员,并监测钙动员。

[0732] 可在体外测试本公开的PAR4结合蛋白抑制由 γ -凝血酶诱导的血小板聚集的能力。 γ -凝血酶(一种不再与PAR1相互作用的 α -凝血酶的蛋白水解产物)选择性地切割并活化PAR4(Soslau,G.等人,"Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein 1b",J.Biol.Chem.,276:21173-21183(2001))。可以96孔微孔板凝集测定形式或使用标准血小板凝集仪监测血小板凝集。聚集测定也可用于测试化合物抑制由PAR4激动剂肽、ADP或血栓烷类似物U46619诱导的血小板聚集的选择性。

[0733] 另一个实例是如在本文的实施例中所示的 α -凝血酶诱导的血小板聚集测定。 α -凝血酶活化PAR1和PAR4两者。选择性PAR4拮抗剂抑制血小板聚集的能力可使用标准光学凝集仪来测量。

[0734] 另一个实例是组织因子诱导的血小板聚集测定。这种测定中的条件模拟血栓形成期间的生理事件。在这种测定中,人PRP中的血小板聚集通过添加组织因子和CaCl₂引发。组织因子(外源性凝血级联的引发剂)在人动脉粥样硬化斑块中高度升高。将血液暴露于动脉粥样硬化部位的组织因子触发凝血酶的大量产生并诱导阻塞性血栓的形成。

[0735] 本发明的PAR4结合蛋白在预防血栓形成中的功效也可在多种体内测定中进行测量。可提供血栓形成和止血模型以测试本发明的PAR4拮抗剂作为抗血栓形成剂的有效性的示例性哺乳动物包括但不限于豚鼠和灵长类动物。相关功效模型包括但不限于电解损伤诱导的颈动脉血栓形成、FeCl₃诱导的颈动脉血栓形成和动静脉分流血栓形成。肾出血时间、肾脏出血时间和其它出血时间测量值模型可用来评估出血风险。

[0736] 可在猕猴的动脉血栓形成的体内模型中测试PAR4结合蛋白。可在这种模型中测试PAR4结合蛋白抑制颈动脉的电解损伤诱导的血栓形成的能力。

[0737] 血小板聚集测定

[0738] 基于微板的血小板光透射聚集法可用于测量血小板的聚集(French等人(2016) *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14:1642-1654)。

[0739] 这种测试(Born GV(1962) *Nature* 194:927-929)以糖蛋白(GP)IIb/IIIa依赖性方式在体外评估了血小板间的团块形成,即聚集,血小板的最重要功能。所述测定是基于添加外源性血小板激动剂后,通过富血小板血浆(PRP)或洗涤后的血小板的光学密度样品的光透射增加的测量值。在测定过程中,由于血小板聚集体的沉淀,添加激动剂后的PRP或洗涤的血小板制剂变得更清晰。这确定了穿过血浆样品的光透射的增加。所述装置通过光度计记录从0% (PRP或洗涤的血小板的最大光密度)至100% (无自体贫血小板血浆或Tyrodes缓冲液的光密度)的这种增加的速率和最大百分比。这种信号自动转换成图形曲线,所述曲线与血小板聚集过程中光透射的增加平行。可用的凝集计是易于使用的装置,所述装置配备有自动设置(100%和0%)、用于存储结果的软件以及带有搅拌棒的一次性比色皿。曲线的斜率、最大聚集程度(%)和潜伏时间(滞后阶段)是自动测量的参数,并且可通过图形方式查看形状变化以及一次和二次聚集。向PRP或洗涤的血小板样品中添加不同的激动剂以刺激不同的血小板活化途径,从而获得有关血小板功能的若干特征的信息。Born的血小板聚集法是用于检测血小板功能障碍和监测抗血小板疗法的最广泛采用的方法。

[0740] 可使用出血时间(BT)来确定施用PAR4结合蛋白后的血小板功能的体内分析(Duke WW等人(1910) *JAMA* 55:1185-1192)。BT通过记录血小板阻塞体内皮肤伤口以停止出血所需的时间来评估血小板形成止血栓的能力。

[0741] 阻抗全血凝集法(WBA)允许通过使用抗凝全血(WB)作为环境评估血小板功能,而无需任何样品加工(Mackie IJ,等人(1984) *J Clin Pathol.* 37:874-878)。它是基于以下原理:活化的血小板经由它们的表面受体粘附至在两个电极之间的确定距离处定位的WB样品内两个电极的人工表面。通过检测由固定至所述电极的其它血小板的聚集产生的电阻抗的增加来评估血小板聚集。因此,通过减小电流强度,电阻抗增加。阻抗的增加程度以欧姆记录。

[0742] Lumi聚集法可同时测量腺嘌呤核苷酸从血小板颗粒中的释放和血小板聚集(Holmsen H,等人(1966) *Anal Biochem.* 17:456-47)。所述方法是基于通过在PRP、洗涤的血小板(WP)或WB中使用发光技术对通过不同激动剂从活化的血小板释放的三磷酸腺苷(ATP)

的评价。所述测定是基于从血小板致密颗粒释放的ADP转换为与荧光素-荧光素酶试剂反应的ATP。与ATP浓度成比例的发射光通过lumi-凝集仪进行定量。

[0743] 其它血小板功能测试综述于Paniccia R等人(2015)Vasc Health Risk Manag.11:133-148中。

[0744] 钙信号传导测试

[0745] 钙通量可通过使用双染料比率计量的显微成像测定在分离的血小板中进行测量(Nesbitt WS等人(2012)Methods Mol Biol 788:73-89)。

[0746] 动物模型

[0747] 熟练的技术人员可利用血栓形成的体内动物模型来进一步或另外筛选、评估和/或验证本公开的抗体或其片段,包括进一步评估体内PAR4活化或抗血栓形成作用。此类动物模型包括但不限于经受颈动脉电解损伤、且由此血栓形成(动脉闭塞时间)的模型,并且检查稳定性(闭塞后再通事件的数量和程度)和流动通过受伤动脉的总血流。

[0748] 示例性或适合的小鼠模型是PAR4^{-/-}小鼠(Sambrano GR等人(2001)Nature 2000 407:258-64;Mao Y等人(2010)J Cereb Blood Flow Metab.30(5):1044-1052)。

[0749] 药物组合物

[0750] 本公开的PAR4结合蛋白(同义词:活性成分)可用于配制成用于胃肠外、局部、口服或局部施用、气雾剂施用或透皮施用、用于预防性或治疗性治疗的药物组合物。所述药物组合物可取决于施用方法以各种单位剂型施用。例如,适用于口服施用的单位剂型包括粉末、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。

[0751] 本公开的药物组合物可用于胃肠外施用,如静脉内施用或皮下施用。

[0752] 用于施用的组合物通常将包含溶解在药学上可接受的载体如水性载体中的本公开的PAR4结合蛋白的溶液。可使用多种水性载体,例如,缓冲盐水等。所述组合物可含有模拟生理条件所需要的药学上可接受的载体,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的本公开的PAR4结合蛋白的浓度可广泛地变化,并且将根据所选的特定施用方式和患者的需求,主要基于流体体积、粘度、体重等进行选择。示例性载体包括水、盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液以及5%人血清白蛋白。也可以使用非水性媒介物,如混合油和油酸乙酯。脂质体也可以用作载体。媒介物可含有少量的增强等渗性和化学稳定性的添加剂,例如缓冲剂和防腐剂。

[0753] 可将本公开的PAR4结合蛋白配制用于胃肠外施用,例如配制用于经由静脉内、肌内、皮下、透皮或其它此类途径注射,包括蠕动施用和直接滴入肿瘤或疾病部位(腔内施用)。含有本公开的化合物作为活性成分的水性组合物的制备是本领域技术人员已知的。

[0754] 根据本公开的合适的药物组合物通常将包含与可接受的药物载体(如无菌水溶液)共混的一定量的本公开的PAR4结合蛋白以得到最终浓度范围(取决于预期用途)。制备技术通常是本领域熟知的,如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版Mack Publishing Company,1980所例示。

[0755] 在配制后,本公开的化合物将以与剂量制剂相容的方式且以治疗/预防有效的这种量施用。本公开的化合物的适合剂量将根据具体化合物、待治疗的疾患和/或待治疗的受试者而变化。例如通过从次优剂量开始并逐渐改变剂量以确定最佳或有用剂量来确定适合的剂量在熟练医师的能力范围内。

[0756] 基于本文的公开内容,示例性的剂量和施用时间对本领域技术人员而言是显而易见的。PAR4拮抗剂的优选剂量是生物活性剂量。生物活性剂量是将抑制PAR4的切割和/或信号传导并具有抗血栓形成作用的剂量。理想地,PAR4拮抗剂具有将PAR4的活性降低未处理的对照水平以下至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%的能力。血小板中PAR4的水平通过本领域已知的任何方法来测量,所述方法包括例如受体结合测定、血小板聚集、血小板活化测定(例如,通过FACS的p-选择蛋白表达)、蛋白质印迹或ELISA分析。或者,通过评估由PAR4引发的细胞信号传导(例如,钙动员或其它第二信使测定)来测量PAR4的生物学活性。

[0757] 在一些实例中,治疗有效量的PAR4化合物优选为约小于100mg/kg、50mg/kg、10mg/kg、5mg/kg、1mg/kg或小于1mg/kg。在一个更优选的实施方案中,PAR4化合物的治疗有效量小于5mg/kg。在最优选的实施方案中,PAR4化合物的治疗有效量小于1mg/kg。如本领域技术人员所认识到,有效剂量根据施用途径和赋形剂使用而变化。

[0758] 在一些实例中,脂质体和/或纳米颗粒也可与PAR4结合蛋白一起使用。脂质体的形成和用途通常为本领域技术人员所已知。脂质体可由分散在水性介质中并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))的磷脂形成。MLV通常可具有25nm至4 μ m的直径。MLV的超声处理导致形成直径在200至500埃范围内的小单层囊泡(SUV),其核心中含有水溶液。当磷脂分散在水中时,根据脂质与水的摩尔比,磷脂可形成除脂质体以外的各种结构。在低比例下,脂质体是优选的结构。脂质体的物理特性取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。脂质体可显示对离子和极性物质的低渗透性,但在高温下会经历相变,所述相变显著改变其渗透性。相变涉及从紧密填充的有序结构(称为凝胶状态)至松散填充的无序结构(称为流体状态)的变化。

[0759] 所述组合物可单独或与其它治疗、治疗剂或剂组合同时或顺序施用,包括但不限于:

[0760] (i) 抗凝剂,例如FXa抑制剂、FXIa抑制剂(如阿哌沙班或利伐沙班)或凝血酶抑制剂(如达比加群);

[0761] (ii) 抗血小板剂,例如阿斯匹林或P2Y₁₂拮抗剂,如氯吡格雷、替卡格雷或普拉格雷;

[0762] (iii) 血管化剂,例如血管生成抑制剂。

[0763] 治疗方法

[0764] 如本文所讨论,本公开的PAR4结合蛋白可用于治疗、预防或改善受试者的血栓形成或血栓栓塞性病征。

[0765] 血栓形成是指在血管内形成或存在可导致血管供血的组织缺血或梗塞的血栓(thrombus)(复数血栓(thrombi))。

[0766] 血栓栓塞性病征的特征在于,已通过血流带到其驻留位点的凝块(例如栓塞)或异物突然阻塞动脉。“血栓栓塞”是指血管被血流从起源部位所携带的血栓物质阻塞而阻塞另一个血管。术语“血栓栓塞性病征”包括“血栓性”病症和“栓塞性”病症(上文定义)两者。

[0767] 血栓栓塞性病征包括动脉心血管血栓栓塞性病征、静脉心血管或脑血管血栓栓塞性病征以及心脏心室或外周循环中的血栓栓塞性病征。如本文所用的术语“血栓栓塞性病征”还包括选自但不限于以下的特定病症:不稳定型心绞痛或其它急性冠状动脉综合征、心

房纤颤、初次或复发性心肌梗死、缺血性猝死、短暂性缺血发作、中风、动脉粥样硬化、周围动脉闭塞性疾病、静脉血栓形成、深静脉血栓形成、血栓性静脉炎、动脉栓塞、冠状动脉血栓形成、脑动脉血栓形成、脑栓塞、肾栓塞、肺栓塞以及因医学植入物、装置或其中血液暴露于促进血栓形成的人工表面的程序所致的血栓形成。医学植入物或装置包括但不限于：人造瓣膜、人工瓣膜、留置导管、支架、血液氧合器、分流器、血管通路端口、心室辅助装置和人造心脏或心腔以及血管移植物。程序包括但不限于：心肺转流术、经皮冠状动脉介入治疗和血液透析。在另一个实施方案中，术语“血栓栓塞性疾病”包括急性冠状动脉综合征、中风、深静脉血栓形成和肺栓塞。

[0768] 如本文所用，术语“中风”是指由于颈总动脉、颈内动脉或脑内动脉中的闭塞性血栓形成而引起的栓塞性中风或动脉粥样硬化性中风。

[0769] 药盒

[0770] 本公开还提供了用于本发明的检测/诊断/预后/治疗/预防方法中的包括本公开的化合物的治疗/预防/诊断药盒。此类药盒通常将在适合的容器中包含本公开的PAR4结合蛋白。所述药盒还可含有例如用于检测/分离/诊断/成像或联合治疗的其它化合物。例如，此类药盒可含有一系列抗凝剂或抗血小板剂中的任何一种或多种。

[0771] 在一个实例中，所述药盒用于治疗或预防疾患。在此类药盒中，PAR4结合蛋白可以溶液或以冻干形式提供，任选地与用于重悬的溶液一起。PAR4结合蛋白可缀合至治疗性化合物，或者所述药盒可包括用于与其缀合的治疗性化合物。

[0772] 本领域技术人员应了解的是，可在不脱离如广泛描述的本发明的范围的情况下对如特定实施方案中所示的本发明做出众多变化和/或修改。因此，本实施方案视为在所有方面为说明性的而非限制性的。

[0773] 以下具体实施例仅被视为说明性的而不以任何方式来限定本公开的其余部分。无需进一步详细阐述，据信本领域的技术人员可基于本文描述在最大程度上利用本发明。

[0774] 本发明在以下非限制性实施例中进行进一步描述。

[0775] **【实施例】**

[0776] 方法

[0777] 抗体的产生

[0778] 通过用如以下表2所述的C-末端KLH(钥孔虫戚血蓝蛋白)缀合肽免疫HumAb小鼠(Regeneron Pharmaceuticals)来产生抗PAR4单克隆抗体。免疫肽对应于hPAR4(SEQ ID NO:2)的N-末端凝血酶切割和活化位点。切割位点由RG指示，如以下人PAR4序列中的下划线所示：

[0779] GDDSTPSILPAPRGYPGQVC(SEQ ID NO:2)

[0780] 针对裸肽(SEQ ID NO:3)进行筛选。

[0781] 用16 μ g抗原和免疫佐剂(Sigma Aldrich目录号S6322)的组合结合甲基化CpG以两周间隔三次腹膜内免疫小鼠。从经免疫的小鼠收集血清样品，并通过ELISA以1:250和1:1250的稀释度测试对抗原的反应性，并与免疫前样品进行比较。免疫前和免疫后在1:250和1:1250下的血清滴度差需要增加大于3倍。

[0782] 选择具有最高滴度的小鼠进行融合。

[0783] 免疫肽

[0784] 免疫肽和SKB标记的肽(如表2所示)由Auspep, Melbourne, Australia使用固相合成法合成。

[0785] 使用丝氨酸(S)和赖氨酸(K)接头(SK)在C-末端将生物素附接至肽(参见表2)。通过化学缀合将生物素添加至C-末端赖氨酸残基,从而产生SKB,如表2所示。

[0786] 用具有序列GDDSTPSILPAPRGYPGQVC-KLH的人PAR4钥孔虫戚血蓝蛋白(KLH)肽免疫小鼠。

[0787] 杂交瘤扩增

[0788] 为了产生杂交瘤细胞,切除小鼠脾脏,解离成单细胞悬浮液,并使用聚乙二醇融合至Sp2/0-Ag14骨髓瘤细胞。将所得的杂交瘤细胞在含重氮丝氨酸次黄嘌呤的培养基中于20x 96孔组织培养板中生长。

[0789] 使杂交瘤菌落生长10天,此时测定杂交瘤菌落的数目(表示为融合效率),并且再孵育3天后,取得等分的抗体上清液用于筛选。首先通过微阵列、然后通过任何IgG阳性克隆的ELISA测定上清液对抗原和任何筛选样品的反应性。

[0790] 然后将响应最高的ELISA阳性克隆扩增至24孔组织培养板中3-4天,此时将其扩增至6孔组织培养板。以1:5(上清液孔)和1:25(细胞孔)的比率接种细胞。一旦细胞孔达到80%汇合,就将细胞提取并在液氮中在10%DMSO中冷冻,并且汇集来自上清液孔的上清液并冷冻在-20°C。

[0791] 对选择用于亚克隆的克隆进行至少2轮连续稀释。在每个稀释阶段后,将细胞生长4-5天,并通过上清液ELISA确定对所述抗原呈阳性的产生抗体的单个菌落,并且将顶部克隆扩增其它轮次。将最终的单克隆细胞系扩增至6孔细胞培养板中4-5天,提取上清液并与细胞一起冷冻下来。

[0792] 将亚克隆细胞系的上清液通过可商购的测定药盒测试以确定所产生的单克隆抗体的同种型。

[0793] 微阵列测定

[0794] 根据标准技术通过微阵列进行杂交瘤上清液的筛选。

[0795] 单克隆抗体的ELISA筛选

[0796] 将96孔ELISA板用在包被缓冲液(0.1M碳酸氢钠(NaHCO_3)(Merck,#1.06329.0500))中稀释至浓度为4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的50 μl 抗原包被。将板在4°C下孵育过夜。

[0797] 然后用自动洗板器洗涤孔(300 μl 1xPBS,3次)。将孔用200 μl 封闭缓冲液(3%BSA/1XPBS(BSA:(Sigma,#1001647742)))室温下封闭1小时,然后如上所述洗涤。

[0798] 将50 μl 未稀释的杂交瘤细胞培养上清液添加至适当的孔中,并在室温下孵育1小时,然后如上所述洗涤。将二级抗体(碱性磷酸酶缀合的AffiniPure山羊抗小鼠IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.#115-055-003))以1:1000稀释在1X PBS(8%氯化钠(NaCl , Merck#1.06404.5000)、0.2%氯化钾(KCl , Merck#1.04936.0500)、1.44%磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , Merck#1.06586.0500)、0.24%正磷酸二氢钾(KH_2PO_4 , Merck#1.04873.0500))并向每个孔中添加50 μl 稀释的抗体,并在室温下孵育1小时。如上洗涤孔。通过在室温下在热混合器上剧烈振荡6分钟,将一组底物片剂(1x银,1x金)制成20ml ddH₂O。将50 μl 底物(SIGMAFAST™磷酸对硝基苯酯片剂(Sigma-Aldrich, N2770-50SET))添加到每个孔中,并在室温下孵育20-25分钟。将50 μl 终止溶液(2M氢氧化钠,固体(NaOH))

(Merck, 目录号1310-73-2)) 添加至每个孔中以终止反应。在添加终止溶液后, 立即使用“Rdr01e4”软件使用ELISA读取仪读取405nm处的吸光度。

[0799] 人血液样品

[0800] 在从过去10天内未服用抗血小板药物的健康成年人(男女年龄在21-50岁)获得知情同意后, 收集血液。用19号蝶形针从肘前静脉抽血到注射器中, 所述注射器含有七分之一的酸性柠檬酸右旋糖(ACD) (7:1v/v最终浓度) 用于血小板分离, 或十分之一的柠檬酸三钠(0.32%w/v最终浓度) 用于全血流实验, 如前所述(Mountford JK等人(2015)Nat Commun 6:6535)。

[0801] 小鼠

[0802] HumAb小鼠(Murphy AJ等人(2014)Proc Natl Acad Sci USA 111:5153-5158)从Regeneron Pharmaceuticals获得。HumAb小鼠已经遗传工程化以允许通过用其人类对应物替代小鼠重和κ轻可变Ig基因座的3Mb片段来产生人抗体应答(Murphy AJ等人(2014)Proc Natl Acad Sci USA 111:5153-5158)。HumAb小鼠表现出正常的可变区段重排、体细胞超突变和类别转换, 并且表现出稳健的体液应答, 从而产生多种多样的单克隆抗体, 并且是Regeneron用于产生针对一系列靶标的完全人单克隆抗体的平台。

[0803] 通过流式细胞术检测PAR4

[0804] 将人或小鼠洗涤的血小板(5×10^7 /mL)与抗PAR4抗体(0.1mg/ml)一起在37°C孵育30分钟, 且然后用1%v/v最终浓度的多聚甲醛固定)。然后将悬浮液以1000x g离心2分钟以获得血小板团块, 然后将所述血小板团块重悬于含有FITC缀合的抗兔IgG的1:50稀释液的改良的Tyrode缓冲液(12mM NaHCO₃、10mM HEPES pH 7.4、137mM NaCl、2.7mM KCl、5.5mM D-葡萄糖、1mM CaCl₂)中。在室温下30分钟后, 将样品再次离心, 且将血小板团块重新悬浮在改良的Tyrode缓冲液中, 并使用流式细胞仪(FACSCalibur, BD Biosciences)进行分析。

[0805] PAR4凝血酶切割测定

[0806] 在转染前24小时, 将 1×10^6 个HEK293T细胞(在杜尔贝科氏改良的伊格尔氏培养基+10%胎牛血清中)接种到12孔板上。在汇合时, 将它们用来自PAR4变体之一的1μg DNA(表达载体pBJ-FLAG-PAR4-120A-296F或pBJ-FLAG-PAR4-120T-296F; Edelstein等人(2014)Blood 124(23):3450-8)加4μL的Lipofectamine 2000按照制造商的说明书瞬时转染。在转染后48小时, 收获细胞并用PBS洗涤两次, 然后重悬至 1×10^6 /mL的计数。然后在37°C下将细胞(每种条件50μL测定/ 0.5×10^5 个细胞)用1、10或100μg/mL的5RC3或亚克隆5A.RC3.F10b.H4b或100μg/mL匹配的同种型对照(小鼠IgG1)预处理15分钟。然后用2U/mL凝血酶刺激细胞10分钟。通过添加4U/mL水蛭素终止反应。然后将细胞洗涤一次, 并用含有FITC抗FLAG抗体(Sigma, 克隆M2)的1:200稀释液的PBS重悬, 并在室温下在黑暗中孵育1小时。然后将细胞用1%多聚甲醛(最终浓度)固定, 并在FACSCalibur流式细胞仪上读数以确定FL1/FITC阳性事件的%。将数据针对静止样品(100%, 无凝血酶处理)归一化。

[0807] 表面等离子体共振(SPR)测定

[0808] 表面等离子体共振(SPR)是实现蛋白质-蛋白质相互作用的无标签和实时测量的生物传感器技术。使用Bio-Rad ProteOn XPR36阵列系统或Biacore T200(GE系统), 通过标准技术进行蛋白质和抗体的SPR结合分析。

[0809] 用于测定5A.RC3的动力学的方法

[0810] ProteOn是用于在单个注射步骤中分析达36种蛋白质相互作用的具有多通道模块和相互作用阵列传感器芯片的SPR生物传感器。使用ProteOn NLC生物传感器芯片进行分析,所述芯片含有由结合至藻酸盐聚合物以捕获生物素化的蛋白质和肽的中性抗生物素蛋白组成的表面。

[0811] 将NLC芯片用50mM NaOH、随后1M NaCl适应,流速均为30 μ l/分钟。在水平和垂直方向(通道)上进行适应。浓度为25 μ g/ml的生物素化肽(配体样品)在垂直通道中以30 μ l/min的流速捕获在芯片上(关于生物传感器芯片上设置的配体样品,参见表1)。将运行缓冲液(1X PBS,0.005% Tween, pH7.4)注入垂直通道中,以确保在注入分析物之前稳定捕获肽配体。然后将芯片水平旋转,并以100 μ l/分钟的流速将mAb5ARC3.F10b.H4b(分析物)的稀释系列注入通道A1-A6中(关于所测试的分析物浓度,参见表1)。注意:最终分析中忽略了6.25nM的mAb浓度,因为它的读数高于正常读数。

[0812] 表1在NLC生物传感器芯片上的样品设置

		分析物(mAb5RC3.H4b mAb)					
		A1	A2	A3	A4	A5	A6
泳道	配体	100 nM	50 nM	25 nM	12.5 nM	6.25 nM	0 nM
[0813]	L1	人 PAR1 肽*					
	L2	人 PAR2 肽*					
	L3	人 PAR3 肽*					
	L4	人 PAR4 肽*					
	L5	空白(运行缓冲液)					
	L6	不相关的肽*					

[0814] *所有肽均已生物素化

[0815] 用于确定针对hPAR4的经纯化的抗hPAR4mAb的动力学的方法

[0816] 使用两种不同的方法,即抗小鼠Fc捕获方法或采用使用ProteOn系统的如上所述的类似方法在Biacore T200上进行Biacore分析。

[0817] 抗体捕获方法

[0818] 使用制造商推荐的方案与山羊抗小鼠IgG Fc,使用标准EDC/NHS胺偶联化学活化SCM5系列传感器芯片。在流动池2(FC2)上以1-2 μ g/ml以10 μ l/分钟捕获抗hPAR4 mAb 2分钟,并将流动池1(FC1)用作参考通道。通常在1000、500、250、125、62.5nM的运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween 20与0.1% BSA)中制备hPAR4肽的稀释液,并以30 μ l/分钟流经FC1和2持续60-100秒,并监测解离80-120秒。还进行单独缓冲液的空白注入。所有注入均一式两份并以随机顺序进行。在每个捕获/注入/解离循环后,用30秒注入0.1M甘氨酸pH2.0再生芯片。

[0819] 链霉亲和素捕获方法

[0820] 使用制造商推荐的方案对S系列传感器芯片SA进行适应,并用1 μ g/ml的hPAR4-生物素化肽固定在FC2上,并将作为对照的hPAR1-生物素化肽固定在FC1上。在通常为10、5、2.5、1.25、6.25和0nM的运行缓冲液中制备抗hPAR4 mAb的稀释液,并以100 μ l/分钟的流速流经FC1和2持续60秒,并监测解离200秒。还进行单独缓冲液的空白注入。所有注入均一式两份并以随机顺序进行。在每个捕获/注入/解离循环后,用30秒注入0.1M甘氨酸pH2.0再生芯片。

[0821] 血小板聚集测定

[0822] 通过光透射聚集法以96孔板形式测量血小板聚集。在37℃下将人分离的血小板(2×10^8 /ml)用二甲亚砜(DMSO)(1% v/v)、PAR1拮抗剂沃拉帕沙(90nM)、抗PAR4抗体5RC3(20-100 μ g/ml)或沃拉帕沙与5RC3的组合预处理10分钟。用凝血酶(0.1U/ml)中的一种处理血小板,并在37℃下使用595nm激发滤光片在FLUOstar OPTIMA读板仪(BMG Labtech)中分析聚集,持续50分钟的时间段(10次读取循环,在每次读取之间具有5分钟双轨道振荡周期)。相对于空白(最大)和未刺激的血小板(最小)将光密度归一化,并表示为最大值%。

[0823] 全血血栓形成测定

[0824] 在37℃下将收集在柠檬酸盐(3.2%)中的人全血与PE缀合的抗CD9抗体(4 μ g/mL)和抗纤维蛋白抗体(5 μ g/ml)以及水蛭素(800U/ml)、DMSO(1% v/v)、PAR-1拮抗剂E5555(1 μ M)、抗PAR4抗体(0.2mg/ml)或两种PAR抑制剂的组合之一一起预孵育15分钟。用5-7.5mM CaCl₂(最终浓度)将全血重新钙化以开始凝结,并以0.06ml/min的固定流速在用牛1型胶原蛋白(250 μ g/ml)包被的玻璃微片(1x 0.1mm内径)上抽吸,从而产生600s⁻¹的壁剪切速率。在488和561nm激发下记录双色共焦荧光图像,通过40倍水浸物镜收集。连续记录共焦Z-堆叠2分钟,然后将修饰的无钙Tyrode缓冲液流过血栓,并在10分钟的时间段内记录涵盖血栓视野的整个高度的z-堆叠。使用抗CD9-PE定义血小板血栓,并使用血栓视野的平均荧光定量纤维蛋白体积。将数据针对水蛭素基线归一化,并表示为对照的百分比。

[0825] PAR4 SNP的基于PCR的SNP基因分型测定

[0826] 根据制造商的说明书,使用QIAamp Blood Kit-Mini从人全血的血沉棕黄层中提取基因组DNA(gDNA)。使用10ng DNA根据制造说明书,使用Taqman SNP基因分型测定(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)针对rs773902对DNA样品进行基因分型。使用以下热循环条件在Roche 96孔板光循环仪上进行PCR;95℃持续15秒,60℃持续60秒,重复40个循环。使用对在465-510nm(“A”等位基因)/533-580nm(“T”等位基因)处累积的相对荧光信号的比率计量分析,使用(Mygo Pro)软件的终点基因分型分析用来区分等位基因。

[0827] 统计分析

[0828] 使用GRAPHPAD PRISM(6.0版,La Jolla, CA, USA)进行统计分析。显著性被定义为P < 0.05,如通过未配对的双尾学生t检验或单向ANOVA与Fisher的LSD检验进行多重比较而确定。

[0829] 抗体的命名

[0830] 除非有相反的指示,否则以下命名将用于指本文所提及的抗体,如以下表2中所指示。除非有相反的指示,否则简称为例如5A.RC3是指单克隆抗体亚克隆5A.RC3.F10b.H4b。

[0831] 表2抗体命名

[0832]

单克隆抗体	克隆(全名)	同种型	SEQ ID No H链和L链
5A.RC3	5A.RC3.F10b.H4b	IgG2a/ κ	11和12
5D.RH4	5D.RH4.G7.E6.C7b.G7	IgG2a/ κ	89和90
5H.RA3	5H.RA3.D3b.A2b	IgG2a/ κ	97和98
5F.RF3	5F.RF3.A7b.C9	IgG2b/ κ	22和23
5G.RA1	5G.RA1.E10.G3	IgG2a/ κ	53和54
5I.RG1	5I.RG1.D6.C1b	IgG3/ κ	45和46

5H.RF2	5H.RF2.A5b.D3.C2	IgG2a/κ	107和108
5H.RD2	5H.RD2.A7b	IgG1/κ	32和33
5H.RH4	5H.RH4.C8b.A3.A6	IgG2b/κ	91和92
5G.RF6	5G.RF6.B10.E3	IgG2a/κ	93和94
5G.RD6	5G.RD6.D1.E11b	IgG2a/κ	95和96
5G.RG1	5G.RG1.D3.C2b	IgG1/κ	99和100
5F.RE6	5F.RE6.D3.E7	IgG2a/κ	105和106
5H.RG4	5H.RG4.H7b.F5b	IgG2a/κ	101和102
5G.RC5	5G.RC5.F2.H6	IgG3/κ	103和104

[0833] 实施例1针对人PAR4的拮抗剂单克隆抗体的开发

[0834] 本发明人试图开发靶向人PAR4的单克隆抗体。抗体产生和筛选在Monash抗体技术设施(MATF)由其董事Mark Sleeman教授使用Regeneron Pharmaceuticals的专有HumAb小鼠(VelocImmune®)进行以产生针对PAR4的高亲和力抗体,如下文进一步详细地描述。

[0835] (i) 免疫

[0836] 产生了人PAR4(hPAR4)的N-末端凝血酶切割和活化位点的KLH缀合肽,并且用于免疫HumAb小鼠,随后根据标准方案进行三次加强免疫。使用裸hPAR4肽(表3)通过ELISA测定血清滴度。

[0837] 使用所述肽对总计12只HumAb小鼠进行了三次独立的免疫程序。用于免疫的肽的序列显示在表3中,并且在一些情况下包含另外的C-末端半胱氨酸(如下划线所示)。所述肽在其C-末端缀合至钥孔虫凝血蓝蛋白(KLH),或经由半胱氨酸-赖氨酸缀合至生物素(SKB)。

[0838] 表3:用作免疫原且用于筛选和表面等离子体共振(SPR)的肽

名称	用途	序列
[0839] hPAR4 (KLH)	免疫原	GDDSTP SILPAPRGYP GQVC <u>KLH</u> (SEQ ID NO:4)
hPAR4 (裸)	+筛选	GDDSTP SILPAPRGYP GQVC (SEQ ID NO:2)
mPAR4 (KLH)	免疫原	LKEP KSSDKPNPRGYPGKFC <u>KLH</u> (SEQ ID NO:5)
mPAR4 (裸)	+筛选	LKEP KSSDKPNPRGYPGKFC (SEQ ID NO:3)
mPAR4 (生物素)	+筛选, SPR	LKEP KSSDKPNPRGYPGKFC-GGGGSKB (SEQ ID NO:6)
[0840] hPAR4 (生物素)	+筛选, SPR	GDDSTP SILPAPRGYP GQVC- <u>GGGGSKB</u> (SEQ ID NO:7)
hPAR3 (生物素)	-筛选, SPR	AKPTLPIKTF RGAPPNSF - <u>GGGGSKB</u> (SEQ ID NO:8)
hPAR2 (生物素)	-筛选, SPR	SCSGTIQGTN RSSKGRSL - <u>GGGGSKB</u> (SEQ ID NO:9)
hPAR1 (生物素)	-筛选, SPR	SKATNATLDP RSFLLRNP - <u>GGGGSKB</u> (SEQ ID NO:10)

[0841] 凝血酶切割位点(RG)的序列以粗体显示(无下划线)。

[0842] (ii) 杂交瘤产生

[0843] 使用标准融合方案(Yokoyama,W.Production of monoclonal antibodies.In: Coligan J,Kruisbeek A,Marguiles D,Shevach E M,Strober W.,编辑.Current Protocols in Immunology.第1卷.New York,N.Y:John Wiley&Sons;1994.第2.5.2-2.5.17.页)以SP2/0 Ag14作为融合配偶体进行融合并将其涂铺在20个96孔板上。使细胞在含有HAT作为选择标记物的培养基中生长。

[0844] 使杂交瘤在补充有10%胎牛血清、50 μ M β -巯基乙醇和1mM丙酮酸钠的RPMI-1640培养基中扩增。

[0845] (iii) 杂交瘤克隆的筛选

[0846] 本发明人针对高亲和力特异性抗原阳性品系筛选了数千种杂交瘤上清液。单克隆抗体包含与小鼠恒定区连接的人Ig可变区(因此在本文中指定为“mAb”来指此类嵌合抗体)。

[0847] 初始地通过抗原微阵列筛选杂交瘤上清液与免疫PAR4肽序列(GDDSTPSILPAPRGYPGQVC-KLH)的结合,其中结合通过背景上的荧光强度信号(来自仅培养基的信号)来确定。选择每种脾融合物排名最高的46个克隆用于进一步ELISA的筛选与PAR4抗原的结合(天然和KLH连接的;倍数结合,天然对比KLH连接的PAR4肽)。选择相对于KLH连接的PAR4肽表现出与天然PAR4肽的>3倍结合的克隆用于针对特异性的相似的基于ELISA的筛选(结合至天然PAR4肽对比对应于PAR1(SKATNATLDPRSFLLRNP)、PAR2(SCSGTIQGTNRSSKGRSL)和PAR3(SCSGTIQGTNRSSKGRSL)中的等效区域的肽;PAR4对比PAR1、2或3肽的倍数结合)。将相对于其它PAR肽表现出与PAR4肽的>3倍结合的克隆扩增并在功能性生物测定中进行测试(抑制PAR4切割和抑制PAR4诱导的血小板活化/聚集)(图2和12)。

[0848] 选择表现出结合和功能两者的克隆进行亚克隆和重新测试。在每一轮亚克隆之后,再次通过ELISA测试克隆与天然PAR4肽的结合(对比单独培养基),以确认克隆中结合抗体的维持。

[0849] 表3:PAR4克隆首次筛选

[0850]

系列	克隆	天然对比 KLH 连接的 PAR4 肽的倍数结合	亚克隆(第一)	天然对比 KLH 连接的 PAR4 肽的倍数结合	PAR4 对比 PAR 1、2 或 3 的倍数结合	亚克隆(第二)	天然对比 KLH 连接的 PAR4 肽的倍数结合	与 PAR4 结合比率	与 PAR3 结合比率	与 PAR2 结合比率	与 PAR1 结合比率	关于表现出结合的杂交瘤上清液的功能筛选#
MoB5AR	C3	19.9	A2b	17.6	19.8							是
			F2b	17.4	18.2							ND
			F3b	19.4	119.2							ND
			G3b	19.7	20.0							ND
			C6b	20.4	19.1							ND
			C8b	15.4	16.6							ND
			B9b	15.0	15.2							ND
			D9b	16.0	16.4							ND
			H9b	15.7	16.8							ND
			F10b	17.1	18.6	E1b	21.1	16.8	1.0	1.0	1.3	ND
						H1b	20.2	16.5	1.0	1.0	1.1	ND
						B2b	20.4	13.4	1.2	1.0	1.1	ND
						F2b	19.5	17.2	1.2	1.2	1.1	ND
						H2b	19.5	15.4	1.1	1.1	1.1	ND
						G3b	18.7	14.6	1.1	1.0	1.2	ND
						B4b	19.1	15.4	1.0	1.1	1.2	ND
						F4b	19.1	14.6	1.1	1.0	1.1	ND
						G4b	19.6	15.4	1.1	1.1	1.3	ND
						H4b^	19.3	15.2	1.1	1.0	1.0	ND
						B6b	20.1	15.4	1.1	1.0	1.1	ND
						C6b	17.6	16.6	1.1	1.1	1.2	ND
						G7b	17.4	15.5	1.1	1.0	1.1	ND
						H7b	16.4	16.0	1.0	1.1	1.1	ND
						G9b	18.8	15.2	1.0	1.0	1.2	ND
						F10b	17.7	15.1	1.1	1.0	1.2	ND
						G10b	19.0	15.4	1.0	1.0	1.1	ND
						C12b	18.0	15.4	1.1	1.0	1.1	ND
												ND
			C11b	16.4	17.4							ND
			D11b	15.0	17.0							ND
			E11b	16.0	16.9							ND
	E3	4.0										ND
MoB5B	C6	17.5										否
	H3	17.9										否

[0851]

	B4	3.0	E1b	2.4	4.4							否
			F5b	1.7	4.2							ND
			D7b	2.9	3.0	H9b	2.1	2.7	6.9	5.1	5.5	ND
						H10b	1.9	1.9	5.5	5.0	3.3	ND
						G1b	1.8	3.0	3.8	1.7	3.4	ND
						H4	2.4	3.8	6.3	4.3	4.4	ND
						G3	2.3	3.4	6.7	4.4	4.9	ND
MoB5C	C4	3.3										否

[0852] #通过测量在HEK293细胞上表达的未切割的PAR4肽的%来确定功能筛选。展示大于70%的未切割PAR4的杂交瘤上清液被认为是阳性。

[0853] ND=未测定

[0854] 表4:PAR4克隆第二次筛选

系列	克隆	天然对比 KLH 连接的 PAR4 肽的倍数结合	与小鼠 PAR4 结合比率	与 PAR3 结合比率	与 PAR2 结合比率	与 PAR1 结合比率	关于杂交瘤上清液的功能筛选 #		
[0855]	MoB5F	F3	17.3	15.7	1.0	1.2	1.2	是(++)	
		C2	15.5	14.7	1.0	1.1	1.1	是(++)	
		E6	12.0	12.2	0.8	1.3	1.1	是(+)	
		E3	10.6	10.6	1.0	1.3	1.1	否	
		A4	14.9	12.2	0.9	1.3	1.0	是(+)	
		D4	1.2	1.3	1.0	1.3	1.1	是(+)	
		MoB5G	A1	16.6	13.6	1.0	1.2	1.0	是(+)
		D6	15.0	13.4	1.0	1.2	1.0	否	
		A2	15.4	15.2	1.0	1.1	1.0	是(++=)	
		E6	15.0	12.3	1.0	1.3	1.2	是(+)	
	C5	10.6	9.1	1.1	1.1	1.2	是(+)		
	F6	16.5	11.9	1.0	1.1	1.0	ND		
	G1	11.1	8.6	0.8	1.0	1.1	是(+++)		
	C3	10.5	12.0	0.9	1.2	1.0	是(+)		
	B1	1.2	1.2	0.9	1.2	1.1	是(+)		
	E5	1.8	1.3	1.2	1.5	1.5	否		
	MoB5H	G4	11.6	12.5	1.0	1.2	1.2	否	
	A6	14.0	13.4	1.0	1.0	1.1	是(++)		
	C6	15.6	14.0	1.0	1.1	1.0	否		
	H4	16.6	13.6	0.9	1.0	1.0	是(+)		
	A3	15.6	11.2	0.9	1.1	1.1	是(+++)		
	F2	11.9	10.4	0.9	1.0	1.0	否		
	H1	7.1	10.5	0.9	1.1	1.0	是(+)		
	G2	10.3	9.5	0.9	0.9	0.9	是(+)		
	D4	10.6	11.1	1.0	1.0	1.1	否		
	F1	7.5	8.0	0.8	1.0	1.0	否		
	B6	9.6	10.4	0.9	1.0	0.9	是(+)		
	D2	6.0	6.2	0.9	1.0	1.0	否		
	D6	1.0	1.1	0.9	1.1	1.1	是(+)		
	MoB5I	G1	9.2	9.4	1.0	1.0	1.0	是(+)	

[0856] #通过血小板聚集测定进行的功能分析

[0857] +++聚集<对照的25%

[0858] ++=聚集<对照的50%

[0859] +=聚集在对照的50%-80%之间

[0860] 否=聚集>对照的80%

[0861] ND=未测定

[0862] 实施例2抗PAR4杂交瘤克隆阻断凝血酶诱导的PAR4切割

[0863] 筛选单克隆抗体杂交瘤上清液 (MoB5ARC3、MoB5BRB4、MoB5BRC6、MoB5BRH3和MoB5CRC4) 切割在用含有N-末端FLAG标签的人PAR4转染的HEK293细胞表面上存在的完整PAR4的能力。通过流式细胞术并且如图2所示定量切割。

[0864] 将转染的HEK293细胞与任一抗PAR4多克隆抗体(描述于French SL等人(2016) J Thromb Haemost 14, 1642-1654中, 用作阳性对照)或单克隆抗体克隆MoB5ARC3、MoB5BRB4、MoB5BRC6、MoB5BRH3或MoB5CRC4和未处理的阴性对照一起在室温下在存在凝血酶(0.1U/ml)的情况下孵育10分钟。使用流式细胞术通过FLAG标签从PAR4表达HEK293T细胞中损失来测量凝血酶对PAR4的切割。

[0865] 用凝血酶(2U/ml持续10分钟)处理细胞导致大约50%总PAR4的切割(-ve对照)。发

现用多克隆抗PAR4抗体进行预处理几乎完全阻断凝血酶诱导的切割(+ve对照)(图2)。对五种杂交瘤上清液的初步筛选显示,MoB5ARC3几乎完全阻断凝血酶诱导的PAR4切割,对来自四种其它杂交瘤(B5A.RC3、B5.BRB4、B5.BRC6、B5.BRH3和B5.CRC4)的上清液具有有限且可变的应答。

[0866] 克隆B5A.RC3将凝血酶诱导的PAR4切割阻断至少90%。克隆B5.BRB4将凝血酶诱导的切割阻断约60%,B5BRC6将凝血酶诱导的切割阻断约50%,B5BRH3将凝血酶诱导的切割阻断约65%,并且B5CRC4将凝血酶诱导的切割阻断约50%。

[0867] 根据标准方案,通过有限稀释对克隆5A.RC3进行进一步亚克隆,并测试其阻断凝血酶诱导的PAR4切割的能力,如图3所示,如通过流式细胞术所测量。以100 μ l上清液提供的来自5A.RC3(亚克隆H4b)和5A.RC3(亚克隆B6b)的两种杂交瘤上清液均将凝血酶诱导的HEK293T细胞(100 μ l细胞悬液)上PAR4的切割阻断至显著程度,超过90%。

[0868] 图4示出5A.RC3.H4b亚克隆以剂量依赖性方式有效抑制HEK293细胞表面上表达的PAR4的切割,并且所述切割对人PAR4受体的Ala120和Thr120变体均有效。

[0869] 实施例3mAb-5RC3的H4b和B6b亚克隆的结合特异性

[0870] 为了确定抗hPAR4克隆对PAR4的特异性,如上所述进行了ELISA筛选。图5A示出克隆mAb-5ARC3(5A.RC3)和mAb-5BRB4(5B.RB4)针对hPAR1、hPAR2、hPAR3和hPAR4的结合特异性的结果。

[0871] 5A.RC3展示对人PAR4肽超过PAR1、PAR2和PAR3的16倍选择性。与5A.RC3相比,mAb 5B.RB4类似地与所有四种人PAR肽结合,并且对PAR4的亲合力较低。

[0872] 本发明人利用Bio-Rad Proteon XPR36进行表面等离子体共振(SPR)分析,以深入了解5A.RC3.F10b.H4b的结合亲和力(缔合和解离速率)和特异性。利用链霉亲和素芯片,所有生物素偶联的人PAR肽(表1)被捕获在表面上,并且不同浓度的纯化的5A.RC3通过。通过SA芯片SPR观察到克隆5A.RC3.F10b.H4b具有约0.4nM的解离常数(KD)(图5B)。

[0873] 实施例4抗PAR4杂交瘤mAb-5RC3.F10b.H4b(下文5A.RC3)阻断凝血酶诱导的两种人PAR4变体的切割

[0874] 现有技术的PAR4抑制剂的局限性之一是它们对PAR4的特定变体具有特异性,并且因此只能成功地抑制具有相关PAR4受体变体的人的血小板聚集。

[0875] 为了确定抗PAR4克隆是否能够抑制凝血酶对PAR4切割的作用,进行了体外抑制测定。用PAR4-120Ala(A)或PAR4-120Thr(T)变体瞬时转染HEK293T细胞,所述变体包含在凝血酶切割位点上游的FLAG表位。使用流式细胞术通过Flag标签从表达PAR4的HEK293细胞中的损失来测量凝血酶对PAR4的切割。

[0876] 用增加剂量的凝血酶(0.1-2U/ml)刺激细胞,并且使用FITC缀合的抗FLAG抗体通过流式细胞术测量作为FLAG表位的损失的凝血酶切割的量。如图6A所示,抑制是剂量依赖性的。

[0877] 图6B示出,在凝血酶刺激之前用5A.RC3(100 μ g/ml)对转染的细胞进行预孵育提供凝血酶切割的几乎完全抑制,无论PAR4变体如何都达到了相同的程度。

[0878] 图6B示出与媒介物、同种型对照相比并与凝血酶(0.1U/ml)共孵育10分钟,5A.RC3(10 μ g/ml)对HEK293细胞的PAR4切割的结果。

[0879] 单克隆抗体5A.RC3显著抑制凝血酶诱导的PAR4对Ala120和Thr120变体的PAR4切

割以及人PAR4的活化。抗hPAR4抗体5A.RC3的这种功能性通过添加免疫肽而逆转。

[0880] 实施例5血小板凝集的抑制

[0881] 为了确定抗hPAR4抗体MoB5ARC3.H4b (5A.RC3) 是否能够抑制通过血小板凝集所观察到的凝血酶对PAR4的影响, 对人血小板进行了离体血小板聚集测定。评估了不同PAR4变体的人分离的血小板对PAR4激动剂的应答。如图7所示, 测试了三种不同的基因型(TT、AT和AA)。

[0882] 如图7A和7B所示, T等位基因的存在与响应于中等范围剂量的PAR4活化肽(AP) 和凝血酶的较高最大聚集相关。PAR4-AP是具有C-末端酰胺化肽序列AYPGKF-NH₂的选择性PAR4激动剂。

[0883] 图7C示出在存在用沃拉帕沙(90nm) 阻断PAR1的情况下的凝血酶刺激。

[0884] 图7D示出5A.RC3以剂量依赖性方式抑制血小板聚集。这种剂量依赖性抑制在所有基因型中均有效。

[0885] 图7E示出5A.RC3亚克隆的抑制浓度(IC₅₀)。

[0886] 实施例6MoB5ARC3.F10b.H4b(下文5A.RC3) 与人血小板上的PAR4结合

[0887] 测试了克隆5A.RC3在体外与分离的人血小板的结合。使用流式细胞术测定对结合的分析。将分离的血小板与小鼠IgG1(同种型对照) 或5A.RC3一起孵育, 并测试与PAR4的结合。作为在血小板上表达的标志物的CD41a用作阳性对照。如图8所示, 5A.RC3(10μg/ml) 结合分离的血小板中的人PAR4。

[0888] 实施例7通过MoB5ARC3.F10b.H4b(下文5A.RC3) 展示的对分离的血小板中促凝活性的抑制

[0889] 通过测量膜联蛋白V结合来测定血小板表面磷脂酰丝氨酸(PS) 暴露。将人分离的血小板(5x 10⁷/ml) 用所示浓度的5A.RC3预处理(5分钟), 并与Alexa Fluor 488缀合的膜联蛋白-V(1:100) 一起孵育, 然后用凝血酶刺激。在刺激后, 将血小板重悬于改良的Tyrode缓冲液中, 以进行流式细胞术分析(FACSCalibur, BD Biosciences)。

[0890] 通过测量响应于用PAR4-AP或凝血酶(1U/ml) 刺激的磷脂酰丝氨酸(PS) 暴露, 检测分离的人血小板中的促凝活性。测量了膜联蛋白V阳性细胞的百分比。将血小板与5A.RC3一起预孵育5分钟。使血液流动10分钟, 并实时收集数据。为简单起见, 示出10分钟(最终数据点)。

[0891] 图9示出响应于PAR4-AP刺激(A) 或凝血酶刺激(B) 的膜联蛋白V阳性细胞的百分比。Thr120变体导致PAR4-AP刺激的血小板中PS暴露增加, 在凝血酶刺激的血小板中观察到相似的趋势。

[0892] 图9C示出用5A.RC3预处理(5分钟) 以剂量依赖性方式抑制凝血酶诱导的磷脂酰丝氨酸暴露, 而与供体基因型无关。

[0893] 实施例8MoB5ARC3.F10b.H4b(下文5A.RC3) 的抗血栓形成作用

[0894] 如本文所述在凝结条件下, 在全血血栓形成测定中在10分钟的时间段内实时测量包括血小板沉积、凝血酶活性、纤维蛋白体积和每血栓的纤维蛋白比例在内的血栓形成参数。

[0895] 使用具有25倍镜头和2倍数字放大倍率的尼康A1r, 通过共聚焦显微术(以允许进行体积测量), 在10分钟终点时的血小板沉积(PE缀合的抗CD9)、凝血酶活性(基于FRET的凝

血酶探针)、纤维蛋白体积(Dylight650缀合的抗纤维蛋白抗体)和每个血栓的纤维蛋白比例在图10A中示出。

[0896] 尽管持续血小板沉积,但直接凝血酶抑制剂水蛭素(800U/mL)仍消除了凝血酶活性和纤维蛋白体积。图10B-E示出跨PAR4基因型未观察到上述参数的显著差异。如空心条所示,用5A.RC3(100 μ g/ml)进行预处理对血小板沉积(F)没有影响,但与对照(黑条)相比,显著抑制了凝血酶活性(G)、凝血酶活性(H)、纤维蛋白体积(H)和每血栓体积的纤维蛋白比例(I)。

[0897] 实施例9另外的克隆的进一步筛选

[0898] 通过功能性血小板凝集测定进一步检查从结合筛选中鉴定为对人PAR4具有合理亲和力和特异性的克隆。

[0899] 对于与人血小板结合的30种单克隆抗体上清液示出在PAR1拮抗剂存在下凝血酶诱导的血小板聚集(即PAR4依赖性聚集)。将抗体上清液与人血小板(2×10^8 个细胞)以1:1的比例混合。图11示出在50分钟时实现的最大聚集,表示为对照的百分比($n=3$ 个个个体供体)。

[0900] 实施例10两种抑制剂克隆和一种非抑制剂克隆的序列

[0901] 在莫纳什大学的莫纳什抗体技术实验室进行都是IgG1 κ 同种型的单克隆抗体的测序。

[0902] (i) 5A.RC3亚克隆

[0903] 确定了重链可变区和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列,并且提供在形成本公开的一部分的序列列表中且如图12所示。这种抗体是拮抗剂并且属于IgG2a同种型。

[0904] 互补决定区(CDR)的序列在以下示出:

[0905] 5A.RC3重链CDR:

[0906] CDR1:GFTLSNYG(SEQ ID NO:13)

[0907] CDR2:IWYDGSNK(SEQ ID NO:14)

[0908] CDR3:ARESIVEVLPPFDY(SEQ ID NO:15)

[0909] 5A.RC3轻链CDR:

[0910] CDR1:QVRNRY(SEQ ID NO:16)

[0911] CDR2:GAS(SEQ ID NO:17)

[0912] CDR3:QQYGNSYT(SEQ ID NO:18)

[0913] (ii) 5F.RF3亚克隆

[0914] 确定了重链可变区和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列,并且提供在形成本公开的一部分的序列列表中且如图14所示。这种抗体是拮抗剂。抗体同种型是IgG2b κ 。

[0915] 互补决定区(CDR)的序列在以下示出:

[0916] 5F.RF3重链CDR:

[0917] CDR1:AYTFTNYG(SEQ ID NO:24)

[0918] CDR2:ISPYNGNT(SEQ ID NO:25)

[0919] CDR3:AREYNRSSRGRYYYYGMDV(SEQ ID NO:26)

[0920] 5F.RF3轻链CDR:

[0921] CDR1:QSVSSNY(SEQ ID NO:27)

[0922] CDR2:GAS (SEQ ID NO:28)

[0923] CDR3:QQYGSSPWT (SEQ ID NO:29)

[0924] (iii)5H.RD2亚克隆

[0925] 确定了重链可变区和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列,并且提供在形成本公开的一部分的序列表中且如图13所示。即使它结合PAR4,这种抗体也不充当拮抗剂。这种抗体的同种型是IgG1 κ 。

[0926] 互补决定区(CDR)的序列在以下示出:

[0927] 5H.RD2重链CDR:

[0928] CDR1:GFTFFNTW (SEQ ID NO:34)

[0929] CDR2:VKSKNDGGTK (SEQ ID NO:35)

[0930] CDR3:TTDPHYDFWSAY (SEQ ID NO:36)

[0931] 5H.RD2轻链CDR:

[0932] CDR1:QSLVHSDGNT (SEQ ID NO:37)

[0933] CDR2:KIS (SEQ ID NO:38)

[0934] CDR3:LQATQFMYT (SEQ ID NO:39)

[0935] 使用IMGT/V-Quest程序确定CDR和框架区的名称。

[0936] 实施例11通过两种不同的表面等离子体共振测定(SPR)测量七种纯化的单克隆抗体克隆的结合动力学

[0937] 两种不同的方法用于测量以下表4中所述的七种纯化的抗hPAR4mAb的结合动力学。

[0938] 对于mAb捕获方法,尝试使用低水平的配体mAb和分析物hPAR4来产生1:1结合相互作用,这种方法已成功用于测量动力学和亲和力KD (Kamat V和Rafique A (2017) Analytical Biochemistry 530:75-86),尽管使用了完整IgG。对于链霉亲和素捕获方法,尽管使用非常低的分析物(mAb)水平,但由于在此分析中使用了完整抗体,因此可能存在大于1:1的相互作用。

[0939] 通过ELISA分析纯化的mAb与hPAR4的结合(图15),并且数据表示为ELISA阳性:阴性比率。使用表面等离子体共振(SPR;Biacore)通过两种不同的方法测量mAb与hPAR4之间的结合相互作用的动力学:1.抗小鼠Fc mAb捕获方法和2.链霉亲和素(SA)芯片来捕获生物素化的肽。测量了ka(缔合)速率和kd(解离)速率和KD,并使用Biacore评价软件将其拟合至Langmuir模型。

[0940] 表4纯化的抗hPAR4 mAb的表征

mAb	克隆(全名)	同种类型	ELISA 阳性: 阴性比率	mAb 捕获 SPR			SA 芯片生物素肽 SPR		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
[0941] 5A RC3	5A RC3.F10b.H4b	IgG2a/k	13.9	3.30E+05	4.87E-03	14.8	1.32E+06	4.17E-04	0.32
5D RH4	5D RH4.G7.E6.C7b.G7	IgG2a/k	13.3	1.78E+05	3.90E-03	22	4.28E+05	9.56E-05	0.23
5H RA3	5H RA3.D3b.A2b	IgG2a/k	14.8	6.95E+05	1.12E-03	16	2.57E+06	8.57E-04	0.34
5F RF3	5F RF3.A7b.C9	IgG2b/k	17	1.89E+04	4.27E-06	0.2	1.47E+07	1.50E-03	0.01
5G RA	5G RA1.E10.G3	IgG2a/k	11.5	8.23E+04	5.60E-03	68	4.61E+05	4.49E-04	0.97
[0942] 5I RG1	5I RG1.D6.C1b	IgG3/k	6.3	1.40E+04	1.46E-03	105	1.85E+06	6.67E-04	0.36
5H RF2	5H RF2.A5b.D3.C2	IgG2a/k	8.5	5.84E+04	2.27E-03	38	1.84E+06	1.11E-03	0.61

[0943] 实施例12抗hPAR4单克隆抗体与hPAR4肽的结合

[0944] 使用与实施例11中描述的ELISA筛选方法类似的方法来鉴定与hPAR4肽结合的纯化的mAb的反应性。用稀释于PBS中的纯化mAb代替杂交瘤上清液完成实验。

[0945] 通过ELISA分析了七种纯化的抗hPAR4 mAb的反应性(参见表4)。使mAb的稀释液与hPAR4肽包被的孔反应,并且结合曲线在图15中示出。对于mAb 5F RF3.A7b.C9(5F.RF3)观察到最强的结合,随后是三种具有非常相似的结合曲线的mAb:5H RA3.D3b.A2b(5H.RA3)、5A RC3.F10b.H4b(5A.RC3)、5D RH4.G7.E6.C7b.G7(5D.RH4)。

[0946] 5G RA1.E10.G3(5G.RA1)mAb的反应性略低,并且mAb与hPAR4肽的最低反应性是5H RF2.A5b.D3.C2(5H.RF2)和5I RG1.D6.C1b(5I.RG1)。此数据也表示为如表4所示的ELISA阳性:阴性比率。

[0947] 实施例13抗hPAR4单克隆抗体对人PAR4的特异性

[0948] 用洗涤缓冲液(含有0.05%TWEEN 20和0.1%牛血清白蛋白的PBS)洗涤链霉亲和素包被的板(用Superblock封闭的Thermo Scientific Pierce链霉亲和素高结合能力包被的板,编号#15500)的各孔3次。将生物素化的肽(hPAR1-4)在洗涤缓冲液中稀释,并允许在室温下在轻轻混合下与以10ug/ml(每孔100ul)封闭的链霉亲和素包被的孔结合1小时。如上将孔洗涤3次,并在室温下在轻轻混合下使在洗涤缓冲液中以10ug/ml制备的纯化的抗hPAR4 mAb结合(100ul/孔)1小时。如上将板洗涤3次,并将与碱性磷酸酶(AP)缀合的抗小鼠Fc以0.3ug/ml(100ul)如上添加至孔中1小时。如上将孔洗涤3次,并用碱性磷酸酶底物显影,如针对筛选上清液ELISA所述。

[0949] 为了进一步表征纯化的抗hPAR4 mAb,进行了mAb对hPAR1、hPAR2、hPAR3和hPAR4生物素化肽的特异性。结合数据清楚地表明,所有七种纯化的mAb都是高度特异性的,仅与

hPAR4结合,并且不与hPAR1、hPAR2和hPAR3肽反应。

[0950] 实施例14五种纯化的抗hPAR4单克隆抗体的结合和抑制特性

[0951] 通过流式细胞术检查了五种抗PAR4单克隆抗体与人血小板的结合。表5示出每种克隆的关于以下的结果:1)通过流式细胞术与人血小板的结合(表示为相对于同一浓度的同种型对照,在10 μ g/ml情况下观察到的几何平均荧光强度[GMFI])和2)响应于0.1U/ml凝血酶抑制人血小板聚集的IC₅₀值。

[0952] 表5纯化的抗HPAR4 mAb的结合和抑制特性的总结

mAb	克隆(全名)	在 10 ug/ml 下与人 plts FACS GMFI 的结合*	用于抑制血小板聚集的 IC50 (ug/ml)
[0953] 5A RC3	5A RC3.F10b.H4b	39	1.6
5D RH4	5D RH4.G7.E6.C7b.G7	33	2.2
5H RA3	5H RA3.D3b.A2b	100	
5F RF3	5F RF3.A7b.C9	53	
5G RA1	5G RA1.E10.G3	25	40

[0954] 图17中示出纯化的抗hPAR4 mAb与人分离的血小板的浓度依赖性结合。相对于相关的同种型对照,每种抗体表现出浓度依赖性结合。

[0955] 对于三种抗hPAR4 mAb克隆(5A.RC3、5D.RH4和5G.RA1),在图18中示出对由0.1U/ml凝血酶诱导的人血小板聚集的浓度依赖性抑制。在所测试的最高浓度下,对于每种克隆均观察到了接近最大的抑制。

[0956] 实施例15两种抗PAR4克隆(5D.RH4和5A.RC3)的抗血栓形成作用

[0957] 通过共聚焦显微术检查了mAb 5A.RC3和mAb 5D.RH4对人血栓形成的抑制。通过共聚焦显微镜在离体人全血血栓形成测定中定量3分钟后形成的人血栓的体积。用100 μ g/ml的任一种mAb对血液进行预处理减小了总血栓体积,如图19所示。

[0958] 实施例16纯化的抗hPAR4 mAb克隆的序列

[0959] 在莫纳什大学的莫纳什抗体技术实验室进行都是IgG1 κ 同种型的单克隆抗体的测序。使用IMGT/V-Quest程序确定CDR和框架区的名称。

[0960] 图20中示出针对人PAR4的纯化的mAb的可变重链的序列。互补决定区(CDR)在图中根据IMGT编号系统指示。

[0961] 图21中示出针对人PAR4的纯化的mAb的可变轻链的序列。互补决定区(CDR)在图中根据IMGT编号系统指示。

[0962] 抗体的互补决定区序列在以下表6中示出。

[0963] 表6纯化的抗PAR4 mAb的互补决定区序列

[0964]

抗体克隆	VH CDR1	VH CRD2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
5A.RC3	GFTLSNYG (SEQ ID NO:13)	IWYDGSNK (SEQ ID NO:14)	ARESIVEVLPPFDY (SEQ ID NO:15)	QRVRNNY (SEQ ID NO:16)	GAS (SEQ ID NO:17)	QQYGNSYT (SEQ ID NO:18)
5L.RG1	SGSFSTYF (SEQ ID NO:47)	IIHTGST (SEQ ID NO:48)	AFEYSSSGGYGMDV (SEQ ID NO:49)	QSISSY (SEQ ID NO:50)	AAS (SEQ ID NO:51)	QQTYSTPLT (SEQ ID NO:52)
5F.RF3	AYTFTNYG (SEQ ID NO:24)	ISPYNGNT (SEQ ID NO:25)	AREYNRSSRGRYYYYGMDV (SEQ ID NO:26)	QSVSSNY (SEQ ID NO:27)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGSSPW (SEQ ID NO:29)
5G.RA1	GFTFSSYG (SEQ ID NO:55)	IWYDGSNK (SEQ ID NO:14)	ARETALVRGVPPFDY (SEQ ID NO:56)	QSVRSSY (SEQ ID NO:57)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGSSYT (SEQ ID NO:58)
5H.RD2	GFTFFNTW (SEQ ID NO:34)	VKSKNDGGTK (SEQ ID NO:35)	TTDPHYDFWSAY (SEQ ID NO:36)	QSLVHSDGNT (SEQ ID NO:37)	KIS (SEQ ID NO:38)	LQATQFMYT (SEQ ID NO:39)
5D.RH4	GFTFSSDG (SEQ ID NO:59)	IWFDGRNK (SEQ ID NO:60)	ARESSISTRPPFDY (SEQ ID NO:61)	QSVRSSY (SEQ ID NO:57)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGRSYT (SEQ ID NO:62)
5H.RH4	GGSFSNY (SEQ ID NO:63)	INHSGST (SEQ ID NO:64)	KVEHSSSSGHYYYGMDV (SEQ ID NO:65)	QTISYY (SEQ ID NO:66)	AAS (SEQ ID NO:51)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:67)
5G.RF6	GFTFSNYG (SEQ ID NO:68)	IWYDGSNK (SEQ ID NO:14)	ARETIMVRGVPPFD (SEQ ID NO:69)	QSVRSSY (SEQ ID NO:57)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGSSYT (SEQ ID NO:58)
5G.RD	GFAFSSY	IWYDGSNR	ARETAMVRGVPPFDY (SEQ	QSVRSSY	GAS	QQYGSSYT

[0965]

6	G (SEQ ID NO:70)	(SEQ ID NO:71)	ID ID NO:72)	(SEQ ID NO:57)	ID (SEQ ID NO:28)	(SEQ ID NO:58)
5H.RA3	GFTFSSY G (SEQ ID NO:55)	IWYDGTCK (SEQ ID NO:73)	ARKGARGITGLDY (SEQ ID NO:74)	QSVRSSY (SEQ ID NO:57)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGSSYT (SEQ ID NO:58)
5G.RG1	GFTLSSY G (SEQ ID NO:75)	IWYDGSSK (SEQ ID NO:76)	ARETILIGGVPFDY (SEQ ID NO:77)	QSIRSNY (SEQ ID NO:78)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGRSYT (SEQ ID NO:62)
5H.RG4	GYTFTGH Y (SEQ ID NO:79)	INPNSGGT (SEQ ID NO:80)	ARGYYDTSGYYYAFEF (SEQ ID NO:81)	QSVRSSY (SEQ ID NO:57)	GAS (SEQ ID NO:28)	QQYGSSYT (SEQ ID NO:58)
5G.RC5	GYSFIDY Y (SEQ ID NO:82)	INPNSGGT (SEQ ID NO:80)	ARGHCGGDCYCFDDH (SEQ ID NO:83)	QSVRSSY (SEQ ID NO:57)	ASS (SEQ ID NO:51)	QQYGSSYT (SEQ ID NO:58)
5F.RE6	GFTFSSY G (SEQ ID NO:55)	IWYDGTCK (SEQ ID NO:73)	ARKGARGITGLDY (SEQ ID NO:74)	QSISNY (SEQ ID NO:84)	AAS (SEQ ID NO:51)	RQNYNTPL T (SEQ ID NO:85)
5H.RF2	GGSLSDY Y (SEQ ID NO:86)	INHSGTT (SEQ ID NO:87)	AIEYSNSRGYYYGMDV (SEQ ID NO:88)	QTISNY (SEQ ID NO:109)	AAS (SEQ ID NO:51)	RQNYNTPL T (SEQ ID NO:85)

[0966] 表7纯化的抗PAR4 mAb的VH和VL序列

[0967]

抗体克隆	VH	VL
5A.RC3	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTLS NYGMHWVRQA PGKGLEWVSV IWYDGSNKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARES IVEVLPPFDY WGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:11)	KIVLTQSPGT LSLSPGERVT LSCRASQVRV NNYLAWFQK PGQAPRLFIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFIFTISRLE PEDFAVYCYQ YGNSYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:12)
5I.RG1	QVQLQQWAG LLKPSETLSL ACAISSGSFS TYFWRWIRQP PGKGLEWIGE IIHTGSTTYN PSLKSRVTIS VDTSKNQLSL KLSSVTAADT AVYYCAFEYS SSGGYYYGMD VWGQGTITVTV SS (SEQ ID NO:45)	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQSI SYLNWYQQIP GKAPNLLIYA ASSLRSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSTPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:46)
5F.RF3	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSAYTFT NYGISWVRQA PGQGLEWGW ISPYNGNTNY AQLKQGRVTM TTDSTRTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREY NRSSRGYYY YGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:22)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYCYQ YGSSPWFQ QGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
5G.RA1	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARET ALVRGVPFDY WGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:53)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRTSQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYCYQ YGSSYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:54)

5H.RD2	EVQLVESGGD LVKPGGSLRL SCSASGFTFF NTWMNWVRQA PGKGLEWVGR VKSKNDGGTK DYAAPVTGRF TISRDDSKDT LYLQMNSLKT EDTAVYYCTT DPHYDFWSAY WGQGLTIVTS S (SEQ ID NO:32)	DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSDGNTYLSW LQQRPGQPPR LLIYKISNRF SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI SRVEAEDVGF YYCLQATQFM YTFGQGTKLE IK (SEQ ID NO:33)
5D.RH4	QIQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SDGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWFDRNKYY LDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARES SISTRPPFDY WGQGLTIVTS S (SEQ ID NO:89)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGRSYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:90)
5H.RH4	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF NYYWSWIHQPGKGLEWIGE INHSGSTNYN PSLSKRVITIS VDTSKKQFSL NLSSVTAADT AVYYCKVEHS SSSGHYYYGM DVWGQGTIVT VSS (SEQ ID NO:91)	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQTIS YYLNWYQKPK GKAPKLLIYA ASRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFTYYCQ SYSTPLTFGG GTKVGIK (SEQ ID NO:92)
5G.RF6	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVRGRFTI SRDNSKNTQY LQMNSLRAED TAVYYCARET IMVRGVPFDY WGQGLTIVTS S (SEQ ID NO:93)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:94)
5G.RD6	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGF SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNRY ADSVKGRFTI SRDTSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARET AMVRGVPFDY WGQGLTIVTS S (SEQ ID NO:95)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:96)
5H.RA3	QVQLVESGGG VVQPGRSLRV SCAASGFTFS SYGMLWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGTKKYY ADSLKGRFTI SRDNSKYTLY LQMNSLRADD TALYFCARKG ARGITGLDYW GQGLTIVTSS (SEQ ID NO:97)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:98)
5G.RG1	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCVASGFTLS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY TDSVKGRFDI SRDNSKNTLY LQMNILRAED TAVYYCARET ILIGVVPFDY WGQGLTIVTS S (SEQ ID NO:99)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCGASQSIR SNYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGTP DRFSGSGSGT DFTLTITRLE PEDFALYYCQ QYGRSYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:100)
5H.RG4	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GHYFHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNF AQRFGQGRVTM TRVTSISTAY MELSGLRSD TAVYYCARGY YDTSGYYYAF EFWGQGLTIV VSS (SEQ ID NO:101)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:102)
5G.RC5	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFI DYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AQRFGQGRVTM TRDTSISTAY MEMRRLRSD TAVYYCARGH CGGDCYCFD HWGQGLTIVIV SS (SEQ ID NO:103)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQK PGQAPRLLIY DASSRATGTP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:104)
5F.RE6	QVQLAESGGG VVQPGRSLRV SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGTKKYY ADSLKGRFTI SRDNSKYTLY LQMNSLRADD TALYFCARKG ARGITGLDYW GQGLTIVTSS (SEQ ID NO:105)	DIQMTQSPSS LSASAGDRIT ITCRASQSI NYLNWYQKPK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFASYCQ NYNTPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:106)
5H.RF2	QVQLQQWGAG LLKPSETLAL TCAVYGGSL DYYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGTNYN PSLSKRVITIS VDTSKKQFSL KLSSVTAADT AVYYCAIEYS NSRGYYYGMD VWGQGTIVTV SS (SEQ ID NO:107)	DIQMTQSPSS LSASAGDRIT ITCRASQTIS NYLNWYQKPK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFASYCQ NYNTPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:108)

[0969] 实施例17表位作图

[0970] 为了确定抗hPAR4单克隆抗体所结合的最小表位,合成了对应于hPAR4免疫肽的三种重叠肽,如下文和图22所示。

	G D D S T P S I L P A P <u>R G</u> Y P G Q V	hPAR4 肽
	G D D S T P S I L	hPAR4 1-9
[0971]	I L P A P <u>R G</u> Y	hPAR4 8-15
	A P <u>R G</u> Y P G Q V	hPAR4 11-20

[0972] 凝血酶切割位点RG的序列加下划线。除去C-末端半胱氨酸残基以防止多聚体形成,关于原始hPAR4肽(KLH和裸肽)参见表2。

[0973] 如实施例11中所述使用ELISA测定进行筛选,以鉴定mAb是否对跨越原始肽抗原的任何较短的重叠肽显示更高的反应性。简言之,将肽在包被缓冲液(0.1M碳酸钠pH8.0)中以10ug/ml包被到Nunc maxisorp ELISA板上过夜。于PBS中稀释的纯化的mAb代替上清液。

[0974] 如图23所示,纯化的mAb 5A.RC3、5G.RA1、5D.RH4和5F.RF3主要与含有凝血酶切割位点的核心肽氨基酸残基8-15反应,因此表明表位位于原始hPAR4肽的此区域内。

[0975] 如图23所示,与肽氨基酸残基11-20反应的纯化的mAb 5G.RA3也含有凝血酶切割位点,但是这表明5G.RA3与其它mAb相比识别hPAR4的略微不同的表位。

[0976] 本领域技术人员应理解,在不脱离本公开的广泛总体范围的情况下,可对上文所述的实施方案进行各种变更和/或修改。因此,本实施方案视为在所有方面为说明性的而非限制性的。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 莫纳什大学(Monash University)
- [0003] <120> 人凝血酶受体PAR4的结合蛋白
- [0004] <130> 525571PCT
- [0005] <140> AU2017903685
- [0006] <141> 2018-09-11
- [0007] <160> 109
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 6
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0013] <400> 1
- [0014] Pro Arg Gly Tyr Pro Gly
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 20
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0020] <400> 2
- [0021] Gly Asp Asp Ser Thr Pro Ser Ile Leu Pro Ala Pro Arg Gly Tyr Pro
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Gly Gln Val Cys
- [0024] 20
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 小家鼠(Mus musculus)
- [0029] <400> 3
- [0030] Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Pro Asn Pro Arg Gly Tyr Pro
- [0031] 1 5 10 15
- [0032] Gly Lys Phe Cys
- [0033] 20
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 21
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0038] <220>

[0078]	20	25	
[0079]	<210> 7		
[0080]	<211> 25		
[0081]	<212> PRT		
[0082]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0083]	<220>		
[0084]	<223> hPAR4生物素缀合物的序列		
[0085]	<220>		
[0086]	<221> 尚未归类的特征		
[0087]	<222> (25) .. (25)		
[0088]	<223> 链霉亲和素-k/生物素 (SKB)		
[0089]	<400> 7		
[0090]	Gly Asp Asp Ser Thr Pro Ser Ile Leu Pro Ala Pro Arg Gly Tyr Pro		
[0091]	1	5	10 15
[0092]	Gly Gln Val Cys Gly Gly Gly Gly Xaa		
[0093]	20	25	
[0094]	<210> 8		
[0095]	<211> 23		
[0096]	<212> PRT		
[0097]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0098]	<220>		
[0099]	<223> hPAR3生物素缀合物的序列		
[0100]	<220>		
[0101]	<221> 尚未归类的特征		
[0102]	<222> (23) .. (23)		
[0103]	<223> 链霉亲和素-k/生物素 (SKB)		
[0104]	<400> 8		
[0105]	Ala Lys Pro Thr Leu Pro Ile Lys Thr Phe Arg Gly Ala Pro Pro Asn		
[0106]	1	5	10 15
[0107]	Ser Phe Gly Gly Gly Gly Xaa		
[0108]	20		
[0109]	<210> 9		
[0110]	<211> 23		
[0111]	<212> PRT		
[0112]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0113]	<220>		
[0114]	<223> hPAR2生物素缀合物的序列		
[0115]	<220>		
[0116]	<221> 尚未归类的特征		

[0117] <222> (23) .. (34)
 [0118] <223> 链霉亲和素-k/生物素 (SKB)
 [0119] <220>
 [0120] <221> 尚未归类的特征
 [0121] <222> (23) .. (23)
 [0122] <223> 链霉亲和素-k/生物素 (SKB)
 [0123] <400> 9
 [0124] Ser Cys Ser Gly Thr Ile Gln Gly Thr Asn Arg Ser Ser Lys Gly Arg
 [0125] 1 5 10 15
 [0126] Ser Leu Gly Gly Gly Gly Xaa
 [0127] 20
 [0128] <210> 10
 [0129] <211> 23
 [0130] <212> PRT
 [0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0132] <220>
 [0133] <223> hPAR1生物素缀合物的序列
 [0134] <220>
 [0135] <221> 尚未归类的特征
 [0136] <222> (23) .. (23)
 [0137] <223> 链霉亲和素-k/生物素 (SKB)
 [0138] <400> 10
 [0139] Ser Lys Ala Thr Asn Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu Arg
 [0140] 1 5 10 15
 [0141] Asn Pro Gly Gly Gly Gly Xaa
 [0142] 20
 [0143] <210> 11
 [0144] <211> 121
 [0145] <212> PRT
 [0146] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0147] <220>
 [0148] <223> 5A.RC3的VH
 [0149] <400> 11
 [0150] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [0151] 1 5 10 15
 [0152] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr
 [0153] 20 25 30
 [0154] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0155] 35 40 45

[0156] Ser Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 [0157] 50 55 60
 [0158] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0159] 65 70 75 80
 [0160] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0161] 85 90 95
 [0162] Ala Arg Glu Ser Ile Val Glu Val Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0163] 100 105 110
 [0164] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0165] 115 120
 [0166] <210> 12
 [0167] <211> 107
 [0168] <212> PRT
 [0169] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0170] <220>
 [0171] <223> 5A.RC3的VL
 [0172] <400> 12
 [0173] Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0174] 1 5 10 15
 [0175] Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Arg Asn Asn
 [0176] 20 25 30
 [0177] Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe
 [0178] 35 40 45
 [0179] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0180] 50 55 60
 [0181] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Phe Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 [0182] 65 70 75 80
 [0183] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Tyr
 [0184] 85 90 95
 [0185] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0186] 100 105
 [0187] <210> 13
 [0188] <211> 8
 [0189] <212> PRT
 [0190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0191] <220>
 [0192] <223> 5A.RC3的VH CRD1
 [0193] <400> 13
 [0194] Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Gly

[0195]	1	5
[0196]	<210>	14
[0197]	<211>	8
[0198]	<212>	PRT
[0199]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0200]	<220>	
[0201]	<223>	5A.RC3、5G.RA1、5G.RF6的VH CRD2
[0202]	<400>	14
[0203]	Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys	
[0204]	1	5
[0205]	<210>	15
[0206]	<211>	14
[0207]	<212>	PRT
[0208]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0209]	<220>	
[0210]	<223>	5A.RC3的VH CDR3
[0211]	<400>	15
[0212]	Ala Arg Glu Ser Ile Val Glu Val Leu Pro Pro Phe Asp Tyr	
[0213]	1	5 10
[0214]	<210>	16
[0215]	<211>	7
[0216]	<212>	PRT
[0217]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0218]	<220>	
[0219]	<223>	5A.RC3的VL CDR1
[0220]	<400>	16
[0221]	Gln Arg Val Arg Asn Asn Tyr	
[0222]	1	5
[0223]	<210>	17
[0224]	<211>	3
[0225]	<212>	PRT
[0226]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0227]	<220>	
[0228]	<223>	5A.RC3的VL CDR2
[0229]	<400>	17
[0230]	Gly Ala Ser	
[0231]	1	
[0232]	<210>	18
[0233]	<211>	8

[0234] <212> PRT
 [0235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0236] <220>
 [0237] <223> 5A.RC3的VL CDR3
 [0238] <400> 18
 [0239] Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Tyr Thr
 [0240] 1 5
 [0241] <210> 19
 [0242] <211> 385
 [0243] <212> PRT
 [0244] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0245] <400> 19
 [0246] Met Trp Gly Arg Leu Leu Leu Trp Pro Leu Val Leu Gly Phe Ser Leu
 [0247] 1 5 10 15
 [0248] Ser Gly Gly Thr Gln Thr Pro Ser Val Tyr Asp Glu Ser Gly Ser Thr
 [0249] 20 25 30
 [0250] Gly Gly Gly Asp Asp Ser Thr Pro Ser Ile Leu Pro Ala Pro Arg Gly
 [0251] 35 40 45
 [0252] Tyr Pro Gly Gln Val Cys Ala Asn Asp Ser Asp Thr Leu Glu Leu Pro
 [0253] 50 55 60
 [0254] Asp Ser Ser Arg Ala Leu Leu Leu Gly Trp Val Pro Thr Arg Leu Val
 [0255] 65 70 75 80
 [0256] Pro Ala Leu Tyr Gly Leu Val Leu Val Val Gly Leu Pro Ala Asn Gly
 [0257] 85 90 95
 [0258] Leu Ala Leu Trp Val Leu Ala Thr Gln Ala Pro Arg Leu Pro Ser Thr
 [0259] 100 105 110
 [0260] Met Leu Leu Met Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Ala
 [0261] 115 120 125
 [0262] Leu Pro Pro Arg Ile Ala Tyr His Leu Arg Gly Gln Arg Trp Pro Phe
 [0263] 130 135 140
 [0264] Gly Glu Ala Ala Cys Arg Leu Ala Thr Ala Ala Leu Tyr Gly His Met
 [0265] 145 150 155 160
 [0266] Tyr Gly Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu
 [0267] 165 170 175
 [0268] Ala Leu Val His Pro Leu Arg Ala Arg Ala Leu Arg Gly Arg Arg Leu
 [0269] 180 185 190
 [0270] Ala Leu Gly Leu Cys Met Ala Ala Trp Leu Met Ala Ala Ala Leu Ala
 [0271] 195 200 205
 [0272] Leu Pro Leu Thr Leu Gln Arg Gln Thr Phe Arg Leu Ala Arg Ser Asp

[0273]	210	215	220
[0274]	Arg Val Leu Cys His Asp Ala Leu Pro Leu Asp Ala Gln Ala Ser His		
[0275]	225	230	235
[0276]	Trp Gln Pro Ala Phe Thr Cys Leu Ala Leu Leu Gly Cys Phe Leu Pro		
[0277]	245	250	255
[0278]	Leu Leu Ala Met Leu Leu Cys Tyr Gly Ala Thr Leu His Thr Leu Ala		
[0279]	260	265	270
[0280]	Ala Ser Gly Arg Arg Tyr Gly His Ala Leu Arg Leu Thr Ala Val Val		
[0281]	275	280	285
[0282]	Leu Ala Ser Ala Val Ala Phe Phe Val Pro Ser Asn Leu Leu Leu Leu		
[0283]	290	295	300
[0284]	Leu His Tyr Ser Asp Pro Ser Pro Ser Ala Trp Gly Asn Leu Tyr Gly		
[0285]	305	310	315
[0286]	Ala Tyr Val Pro Ser Leu Ala Leu Ser Thr Leu Asn Ser Cys Val Asp		
[0287]	325	330	335
[0288]	Pro Phe Ile Tyr Tyr Tyr Val Ser Ala Glu Phe Arg Asp Lys Val Arg		
[0289]	340	345	350
[0290]	Ala Gly Leu Phe Gln Arg Ser Pro Gly Asp Thr Val Ala Ser Lys Ala		
[0291]	355	360	365
[0292]	Ser Ala Glu Gly Gly Ser Arg Gly Met Gly Thr His Ser Ser Leu Leu		
[0293]	370	375	380
[0294]	Gln		
[0295]	385		
[0296]	<210> 20		
[0297]	<211> 363		
[0298]	<212> DNA		
[0299]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0300]	<220>		
[0301]	<223> 5A.RC3的VH		
[0302]	<400> 20		
[0303]	caggtgcagt tgggtggagtc ggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60		
[0304]	tcctgtgcag cgtctggatt caccctcagt aactatggca tgcactgggt ccgccagget 120		
[0305]	ccaggcaagg ggctggaatg ggtgtcagtt atctggtatg atggaagtaa taaacactat 180		
[0306]	gcagactccg tgaagggecg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctttat 240		
[0307]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat attattgtgc gagagagagt 300		
[0308]	attgtggagg tgcttctctc ttttgactat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360		
[0309]	tca 363		
[0310]	<210> 21		
[0311]	<211> 348		

- [0312] <212> DNA
- [0313] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0314] <220>
- [0315] <223> 5A.RC3的VL
- [0316] <400> 21
- [0317] aaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
- [0318] ctctcctgca gggccagtca gcgtgttagg aacaactact tagcctgggt ccaacagaaa 120
- [0319] cctggccagg ctcccaggct tttcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
- [0320] gacagttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcattt tcaccatcag cagactggag 240
- [0321] cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta actcgtacac ttttggccag 300
- [0322] gggaccaage tggagatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatcc 348
- [0323] <210> 22
- [0324] <211> 126
- [0325] <212> PRT
- [0326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0327] <220>
- [0328] <223> 5F.RF3的VH
- [0329] <400> 22
- [0330] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
- [0331] 1 5 10 15
- [0332] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Ala Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
- [0333] 20 25 30
- [0334] Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
- [0335] 35 40 45
- [0336] Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
- [0337] 50 55 60
- [0338] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
- [0339] 65 70 75 80
- [0340] Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0341] 85 90 95
- [0342] Ala Arg Glu Tyr Asn Arg Ser Ser Arg Gly Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
- [0343] 100 105 110
- [0344] Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
- [0345] 115 120 125
- [0346] <210> 23
- [0347] <211> 108
- [0348] <212> PRT
- [0349] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0350] <220>

[0351] <223> 5F.RF3的VL
 [0352] <400> 23
 [0353] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0354] 1 5 10 15
 [0355] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 [0356] 20 25 30
 [0357] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 [0358] 35 40 45
 [0359] Ile Ser Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0360] 50 55 60
 [0361] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 [0362] 65 70 75 80
 [0363] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 [0364] 85 90 95
 [0365] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0366] 100 105
 [0367] <210> 24
 [0368] <211> 8
 [0369] <212> PRT
 [0370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0371] <220>
 [0372] <223> 5F.RF3的VH CDR1
 [0373] <400> 24
 [0374] Ala Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 [0375] 1 5
 [0376] <210> 25
 [0377] <211> 8
 [0378] <212> PRT
 [0379] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0380] <220>
 [0381] <223> 5F.RF3的VH CDR2
 [0382] <400> 25
 [0383] Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asn Thr
 [0384] 1 5
 [0385] <210> 26
 [0386] <211> 19
 [0387] <212> PRT
 [0388] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0389] <220>

[0428] <400> 30
 [0429] caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 [0430] tcctgcaaga cttctgctta cacctttacc aactatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 [0431] cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagccctt acaacggcaa cacaaactat 180
 [0432] gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag gacagcgtac 240
 [0433] atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagtat 300
 [0434] aacaggtcgt cgaggggccc ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 [0435] acggtcaccg tctcctca 378
 [0436] <210> 31
 [0437] <211> 351
 [0438] <212> DNA
 [0439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0440] <220>
 [0441] <223> 5F.RF3的VL
 [0442] <400> 31
 [0443] gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 [0444] ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcaactact tagcctggta ccagaagaaa 120
 [0445] cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatcca gcaggccac tggcatcca 180
 [0446] gacagttca gcggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240
 [0447] cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctg gacgttcggc 300
 [0448] caagggacca aggtggaat caaacgggt gatgctgcac caactgtatc c 351
 [0449] <210> 32
 [0450] <211> 121
 [0451] <212> PRT
 [0452] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0453] <220>
 [0454] <223> 5H.RD2的VH
 [0455] <400> 32
 [0456] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [0457] 1 5 10 15
 [0458] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Asn Thr
 [0459] 20 25 30
 [0460] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0461] 35 40 45
 [0462] Gly Arg Val Lys Ser Lys Asn Asp Gly Gly Thr Lys Asp Tyr Ala Ala
 [0463] 50 55 60
 [0464] Pro Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asp Thr
 [0465] 65 70 75 80
 [0466] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0467] 85 90 95
 [0468] Tyr Cys Thr Thr Asp Pro His Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Trp Gly
 [0469] 100 105 110
 [0470] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0471] 115 120
 [0472] <210> 33
 [0473] <211> 112
 [0474] <212> PRT
 [0475] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0476] <220>
 [0477] <223> 5H.RD2的VL
 [0478] <400> 33
 [0479] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 [0480] 1 5 10 15
 [0481] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 [0482] 20 25 30
 [0483] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 [0484] 35 40 45
 [0485] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [0486] 50 55 60
 [0487] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0488] 65 70 75 80
 [0489] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
 [0490] 85 90 95
 [0491] Thr Gln Phe Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0492] 100 105 110
 [0493] <210> 34
 [0494] <211> 8
 [0495] <212> PRT
 [0496] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0497] <220>
 [0498] <223> 5H.RD2的VH CDR1
 [0499] <400> 34
 [0500] Gly Phe Thr Phe Phe Asn Thr Trp
 [0501] 1 5
 [0502] <210> 35
 [0503] <211> 10
 [0504] <212> PRT
 [0505] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0506] <220>
[0507] <223> 5H.RD2的VH CDR2
[0508] <400> 35
[0509] Val Lys Ser Lys Asn Asp Gly Gly Thr Lys
[0510] 1 5 10
[0511] <210> 36
[0512] <211> 12
[0513] <212> PRT
[0514] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0515] <220>
[0516] <223> 5H.RD2的VH CDR3
[0517] <400> 36
[0518] Thr Thr Asp Pro His Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Tyr
[0519] 1 5 10
[0520] <210> 37
[0521] <211> 10
[0522] <212> PRT
[0523] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0524] <220>
[0525] <223> 5H.RD2的VL CDR1
[0526] <400> 37
[0527] Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr
[0528] 1 5 10
[0529] <210> 38
[0530] <211> 3
[0531] <212> PRT
[0532] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0533] <220>
[0534] <223> 5H.RD2的VL CDR2
[0535] <400> 38
[0536] Lys Ile Ser
[0537] 1
[0538] <210> 39
[0539] <211> 9
[0540] <212> PRT
[0541] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0542] <220>
[0543] <223> 5H.RD2的VL CDR3
[0544] <400> 39

- [0545] Leu Gln Ala Thr Gln Phe Met Tyr Thr
 [0546] 1 5
 [0547] <210> 40
 [0548] <211> 363
 [0549] <212> DNA
 [0550] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0551] <220>
 [0552] <223> 5H.RD2的VH
 [0553] <400> 40
 [0554] gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttgggtcaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 [0555] tcctgttcag cctctggatt cactttcttt aacacctgga tgaactgggt ccgccaggt 120
 [0556] ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt gttaaagca aaaatgatgg tgggacaaaa 180
 [0557] gactacgctg caccctgac aggcagatc accatctcaa gagatgattc aaaagacacg 240
 [0558] ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
 [0559] gatccccact acgatttttg gagtgcctac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
 [0560] tca 363
 [0561] <210> 41
 [0562] <211> 363
 [0563] <212> DNA
 [0564] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0565] <220>
 [0566] <223> 5H.RD2的VL
 [0567] <400> 41
 [0568] gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 [0569] atctcctgca ggtctagtca aagcctcggt cacagtgatg gaaataccta cttgagttgg 120
 [0570] cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccggttc 180
 [0571] tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 [0572] agcagggtgg aggctgagga tgctggggtt tattactgcc tgcaagctac acaattcatg 300
 [0573] tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
 [0574] tcc 363
 [0575] <210> 42
 [0576] <211> 5
 [0577] <212> PRT
 [0578] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0579] <220>
 [0580] <223> 表位PAR4序列
 [0581] <400> 42
 [0582] Ala Pro Arg Gly Tyr
 [0583] 1 5

[0584] <210> 43
 [0585] <211> 8
 [0586] <212> PRT
 [0587] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0588] <220>
 [0589] <223> 表位PAR4序列
 [0590] <400> 43
 [0591] Ile Leu Pro Ala Pro Arg Gly Tyr
 [0592] 1 5
 [0593] <210> 44
 [0594] <211> 9
 [0595] <212> PRT
 [0596] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0597] <220>
 [0598] <223> 表位PAR4序列
 [0599] <400> 44
 [0600] Ala Pro Arg Gly Tyr Pro Gly Gln Val
 [0601] 1 5
 [0602] <210> 45
 [0603] <211> 122
 [0604] <212> PRT
 [0605] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0606] <220>
 [0607] <223> 5I.RG1的VH
 [0608] <400> 45
 [0609] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 [0610] 1 5 10 15
 [0611] Thr Leu Ser Leu Ala Cys Ala Ile Ser Ser Gly Ser Phe Ser Thr Tyr
 [0612] 20 25 30
 [0613] Phe Trp Arg Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0614] 35 40 45
 [0615] Gly Glu Ile Ile His Thr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [0616] 50 55 60
 [0617] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu
 [0618] 65 70 75 80
 [0619] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0620] 85 90 95
 [0621] Phe Glu Tyr Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 [0622] 100 105 110

[0623]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0624]	115 120
[0625]	<210> 46
[0626]	<211> 107
[0627]	<212> PRT
[0628]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0629]	<220>
[0630]	<223> 5I.RG1的VL
[0631]	<400> 46
[0632]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0633]	1 5 10 15
[0634]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[0635]	20 25 30
[0636]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
[0637]	35 40 45
[0638]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0639]	50 55 60
[0640]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0641]	65 70 75 80
[0642]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu
[0643]	85 90 95
[0644]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0645]	100 105
[0646]	<210> 47
[0647]	<211> 8
[0648]	<212> PRT
[0649]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0650]	<220>
[0651]	<223> 5I.RG1的VH CDR1
[0652]	<400> 47
[0653]	Ser Gly Ser Phe Ser Thr Tyr Phe
[0654]	1 5
[0655]	<210> 48
[0656]	<211> 7
[0657]	<212> PRT
[0658]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0659]	<220>
[0660]	<223> 5I.RG1的VH CDR2
[0661]	<400> 48

[0662] Ile Ile His Thr Gly Ser Thr
 [0663] 1 5
 [0664] <210> 49
 [0665] <211> 16
 [0666] <212> PRT
 [0667] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0668] <220>
 [0669] <223> 5I.RG1的VH CDR3
 [0670] <400> 49
 [0671] Ala Phe Glu Tyr Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 [0672] 1 5 10 15
 [0673] <210> 50
 [0674] <211> 6
 [0675] <212> PRT
 [0676] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0677] <220>
 [0678] <223> 5I.RG1的VL CDR1
 [0679] <400> 50
 [0680] Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 [0681] 1 5
 [0682] <210> 51
 [0683] <211> 3
 [0684] <212> PRT
 [0685] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0686] <220>
 [0687] <223> 5I.RG1、5H.RH4、5G.RC5、5F.RE6、5H.RF2的VL CDR2
 [0688] <400> 51
 [0689] Ala Ala Ser
 [0690] 1
 [0691] <210> 52
 [0692] <211> 9
 [0693] <212> PRT
 [0694] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0695] <220>
 [0696] <223> 5I.RG1的VL CDR3
 [0697] <400> 52
 [0698] Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 [0699] 1 5
 [0700] <210> 53

[0701] <211> 121
 [0702] <212> PRT
 [0703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0704] <220>
 [0705] <223> 5G.RA1的VH
 [0706] <400> 53
 [0707] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [0708] 1 5 10 15
 [0709] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0710] 20 25 30
 [0711] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0712] 35 40 45
 [0713] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0714] 50 55 60
 [0715] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0716] 65 70 75 80
 [0717] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0718] 85 90 95
 [0719] Ala Arg Glu Thr Ala Leu Val Arg Gly Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0720] 100 105 110
 [0721] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0722] 115 120
 [0723] <210> 54
 [0724] <211> 107
 [0725] <212> PRT
 [0726] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0727] <220>
 [0728] <223> 5G.RA1的VL
 [0729] <400> 54
 [0730] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0731] 1 5 10 15
 [0732] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 [0733] 20 25 30
 [0734] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 [0735] 35 40 45
 [0736] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0737] 50 55 60
 [0738] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 [0739] 65 70 75 80

[0740]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
[0741]	85 90 95
[0742]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0743]	100 105
[0744]	<210> 55
[0745]	<211> 8
[0746]	<212> PRT
[0747]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0748]	<220>
[0749]	<223> 5G.RA1、5H.RA3、5F.RE6的VH CDR1
[0750]	<400> 55
[0751]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
[0752]	1 5
[0753]	<210> 56
[0754]	<211> 14
[0755]	<212> PRT
[0756]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0757]	<220>
[0758]	<223> 5G.RA1的VH CDR3
[0759]	<400> 56
[0760]	Ala Arg Glu Thr Ala Leu Val Arg Gly Val Pro Phe Asp Tyr
[0761]	1 5 10
[0762]	<210> 57
[0763]	<211> 7
[0764]	<212> PRT
[0765]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0766]	<220>
[0767]	<223> 5G.RA1、5D.RH4、5G.RF6、5G.RD6、5H.RA3、5H.RG4、5G.RC5的VL CDR1
[0768]	<400> 57
[0769]	Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr
[0770]	1 5
[0771]	<210> 58
[0772]	<211> 8
[0773]	<212> PRT
[0774]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0775]	<220>
[0776]	<223> 5G.RA1、5G.RF6, 5G.RD6、5H.RA3、5H.RG4、5G.RC5的VL CDR3
[0777]	<400> 58
[0778]	Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr

[0779]	1	5	
[0780]	<210>	59	
[0781]	<211>	8	
[0782]	<212>	PRT	
[0783]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0784]	<220>		
[0785]	<223>	5D.RH4的VH CDR1	
[0786]	<400>	59	
[0787]		Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Gly	
[0788]	1	5	
[0789]	<210>	60	
[0790]	<211>	8	
[0791]	<212>	PRT	
[0792]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0793]	<220>		
[0794]	<223>	5D.RH4的VH CDR2	
[0795]	<400>	60	
[0796]		Ile Trp Phe Asp Gly Arg Asn Lys	
[0797]	1	5	
[0798]	<210>	61	
[0799]	<211>	14	
[0800]	<212>	PRT	
[0801]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0802]	<220>		
[0803]	<223>	5D.RH4的VH CDR3	
[0804]	<400>	61	
[0805]		Ala Arg Glu Ser Ser Ile Ser Thr Arg Pro Pro Phe Asp Tyr	
[0806]	1	5	10
[0807]	<210>	62	
[0808]	<211>	8	
[0809]	<212>	PRT	
[0810]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0811]	<220>		
[0812]	<223>	5D.RH4、5G.RG1的VL CDR3	
[0813]	<400>	62	
[0814]		Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Tyr Thr	
[0815]	1	5	
[0816]	<210>	63	
[0817]	<211>	8	

- [0818] <212> PRT
- [0819] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0820] <220>
- [0821] <223> 5H.RH4的VH CDR1
- [0822] <400> 63
- [0823] Gly Gly Ser Phe Ser Asn Tyr Tyr
- [0824] 1 5
- [0825] <210> 64
- [0826] <211> 7
- [0827] <212> PRT
- [0828] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0829] <220>
- [0830] <223> 5H.RH4的VH CDR2
- [0831] <400> 64
- [0832] Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
- [0833] 1 5
- [0834] <210> 65
- [0835] <211> 17
- [0836] <212> PRT
- [0837] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0838] <220>
- [0839] <223> 5H.RH4的VH CDR3
- [0840] <400> 65
- [0841] Lys Val Glu His Ser Ser Ser Ser Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
- [0842] 1 5 10 15
- [0843] Val
- [0844] <210> 66
- [0845] <211> 6
- [0846] <212> PRT
- [0847] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0848] <220>
- [0849] <223> 5H.RH4的VL CDR1
- [0850] <400> 66
- [0851] Gln Thr Ile Ser Tyr Tyr
- [0852] 1 5
- [0853] <210> 67
- [0854] <211> 9
- [0855] <212> PRT
- [0856] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0857] <220>
[0858] <223> 5H.RH4的VL CDR3
[0859] <400> 67
[0860] Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
[0861] 1 5
[0862] <210> 68
[0863] <211> 8
[0864] <212> PRT
[0865] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0866] <220>
[0867] <223> 5G.RF6的VH CDR1
[0868] <400> 68
[0869] Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
[0870] 1 5
[0871] <210> 69
[0872] <211> 13
[0873] <212> PRT
[0874] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0875] <220>
[0876] <223> 5G.RF6的VH CDR3
[0877] <400> 69
[0878] Ala Arg Glu Thr Ile Met Val Arg Gly Val Pro Phe Asp
[0879] 1 5 10
[0880] <210> 70
[0881] <211> 8
[0882] <212> PRT
[0883] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0884] <220>
[0885] <223> 5G.RD6的VH CDR1
[0886] <400> 70
[0887] Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly
[0888] 1 5
[0889] <210> 71
[0890] <211> 8
[0891] <212> PRT
[0892] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0893] <220>
[0894] <223> 5G.RD6的VH CDR2
[0895] <400> 71

- [0935] <211> 8
[0936] <212> PRT
[0937] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0938] <220>
[0939] <223> 5G.RG1的VH CDR2
[0940] <400> 76
[0941] Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ser Lys
[0942] 1 5
[0943] <210> 77
[0944] <211> 14
[0945] <212> PRT
[0946] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0947] <220>
[0948] <223> 5G.RG1的VH CDR3
[0949] <400> 77
[0950] Ala Arg Glu Thr Ile Leu Ile Gly Gly Val Pro Phe Asp Tyr
[0951] 1 5 10
[0952] <210> 78
[0953] <211> 7
[0954] <212> PRT
[0955] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0956] <220>
[0957] <223> 5G.RG1的VL CDR1
[0958] <400> 78
[0959] Gln Ser Ile Arg Ser Asn Tyr
[0960] 1 5
[0961] <210> 79
[0962] <211> 8
[0963] <212> PRT
[0964] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0965] <220>
[0966] <223> 5H.RG4的VH CDR1
[0967] <400> 79
[0968] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His Tyr
[0969] 1 5
[0970] <210> 80
[0971] <211> 8
[0972] <212> PRT
[0973] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0974] <220>
- [0975] <223> 5H.RG4、5G.RC5的VH CDR2
- [0976] <400> 80
- [0977] Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
- [0978] 1 5
- [0979] <210> 81
- [0980] <211> 16
- [0981] <212> PRT
- [0982] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0983] <220>
- [0984] <223> 5H.RG4的VH CDR3
- [0985] <400> 81
- [0986] Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Tyr Ala Phe Glu Phe
- [0987] 1 5 10 15
- [0988] <210> 82
- [0989] <211> 8
- [0990] <212> PRT
- [0991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0992] <220>
- [0993] <223> 5G.RC5的VH CDR1
- [0994] <400> 82
- [0995] Gly Tyr Ser Phe Ile Asp Tyr Tyr
- [0996] 1 5
- [0997] <210> 83
- [0998] <211> 15
- [0999] <212> PRT
- [1000] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1001] <220>
- [1002] <223> 5G.RC5的VH CDR3
- [1003] <400> 83
- [1004] Ala Arg Gly His Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Cys Phe Phe Asp His
- [1005] 1 5 10 15
- [1006] <210> 84
- [1007] <211> 6
- [1008] <212> PRT
- [1009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1010] <220>
- [1011] <223> 5F.RE6的VL CDR1
- [1012] <400> 84

[1052] <211> 121
 [1053] <212> PRT
 [1054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1055] <220>
 [1056] <223> 5D.RH4的VH
 [1057] <400> 89
 [1058] Gln Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1059] 1 5 10 15
 [1060] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp
 [1061] 20 25 30
 [1062] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1063] 35 40 45
 [1064] Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
 [1065] 50 55 60
 [1066] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1067] 65 70 75 80
 [1068] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1069] 85 90 95
 [1070] Ala Arg Glu Ser Ser Ile Ser Thr Arg Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 [1071] 100 105 110
 [1072] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1073] 115 120
 [1074] <210> 90
 [1075] <211> 107
 [1076] <212> PRT
 [1077] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1078] <220>
 [1079] <223> 5D.RH4的VL
 [1080] <400> 90
 [1081] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [1082] 1 5 10 15
 [1083] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 [1084] 20 25 30
 [1085] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 [1086] 35 40 45
 [1087] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [1088] 50 55 60
 [1089] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 [1090] 65 70 75 80

[1091]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Tyr
[1092]	85 90 95
[1093]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1094]	100 105
[1095]	<210> 91
[1096]	<211> 123
[1097]	<212> PRT
[1098]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1099]	<220>
[1100]	<223> 5H.RH4的VH
[1101]	<400> 91
[1102]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
[1103]	1 5 10 15
[1104]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asn Tyr
[1105]	20 25 30
[1106]	Tyr Trp Ser Trp Ile His Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1107]	35 40 45
[1108]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[1109]	50 55 60
[1110]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu
[1111]	65 70 75 80
[1112]	Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys
[1113]	85 90 95
[1114]	Val Glu His Ser Ser Ser Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
[1115]	100 105 110
[1116]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1117]	115 120
[1118]	<210> 92
[1119]	<211> 107
[1120]	<212> PRT
[1121]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1122]	<220>
[1123]	<223> 5H.RH4的VL
[1124]	<400> 92
[1125]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1126]	1 5 10 15
[1127]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Tyr Tyr
[1128]	20 25 30
[1129]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[1130]	35	40	45
[1131]	Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[1132]	50	55	60
[1133]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[1134]	65	70	75
[1135]	Glu Asp Phe Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu		
[1136]	85	90	95
[1137]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gly Ile Lys		
[1138]	100	105	
[1139]	<210> 93		
[1140]	<211> 121		
[1141]	<212> PRT		
[1142]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1143]	<220>		
[1144]	<223> 5G.RF6的VH		
[1145]	<400> 93		
[1146]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
[1147]	1	5	10
[1148]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
[1149]	20	25	30
[1150]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1151]	35	40	45
[1152]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1153]	50	55	60
[1154]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Gln Tyr		
[1155]	65	70	75
[1156]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1157]	85	90	95
[1158]	Ala Arg Glu Thr Ile Met Val Arg Gly Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly		
[1159]	100	105	110
[1160]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1161]	115	120	
[1162]	<210> 94		
[1163]	<211> 107		
[1164]	<212> PRT		
[1165]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1166]	<220>		
[1167]	<223> 5G.RF6的VL		
[1168]	<400> 94		

[1208] <212> PRT
 [1209] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1210] <220>
 [1211] <223> 5G.RD6的VL
 [1212] <400> 96
 [1213] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [1214] 1 5 10 15
 [1215] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 [1216] 20 25 30
 [1217] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 [1218] 35 40 45
 [1219] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [1220] 50 55 60
 [1221] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 [1222] 65 70 75 80
 [1223] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
 [1224] 85 90 95
 [1225] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1226] 100 105
 [1227] <210> 97
 [1228] <211> 120
 [1229] <212> PRT
 [1230] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1231] <220>
 [1232] <223> 5H.RA3的VH
 [1233] <400> 97
 [1234] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1235] 1 5 10 15
 [1236] Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [1237] 20 25 30
 [1238] Gly Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1239] 35 40 45
 [1240] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 [1241] 50 55 60
 [1242] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Tyr Thr Leu Tyr
 [1243] 65 70 75 80
 [1244] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
 [1245] 85 90 95
 [1246] Ala Arg Lys Gly Ala Arg Gly Ile Thr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

[1247]		100		105		110
[1248]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
[1249]		115		120		
[1250]	<210> 98					
[1251]	<211> 107					
[1252]	<212> PRT					
[1253]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[1254]	<220>					
[1255]	<223> 5H.RA3的VL					
[1256]	<400> 98					
[1257]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
[1258]	1	5		10		15
[1259]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser					
[1260]		20		25		30
[1261]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu					
[1262]		35		40		45
[1263]	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser					
[1264]		50		55		60
[1265]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu					
[1266]	65	70		75		80
[1267]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr					
[1268]		85		90		95
[1269]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[1270]		100		105		
[1271]	<210> 99					
[1272]	<211> 121					
[1273]	<212> PRT					
[1274]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[1275]	<220>					
[1276]	<223> 5G.RG1的VH					
[1277]	<400> 99					
[1278]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg					
[1279]	1	5		10		15
[1280]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr					
[1281]		20		25		30
[1282]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
[1283]		35		40		45
[1284]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val					
[1285]		50		55		60

[1325]		20		25		30													
[1326]	Tyr	Phe	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			
[1327]			35					40					45						
[1328]	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Ala	Gln	Arg	Phe			
[1329]			50					55					60						
[1330]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr			
[1331]			65					70					75						80
[1332]	Met	Glu	Leu	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[1333]					85					90						95			
[1334]	Ala	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Phe	Glu	Phe			
[1335]					100					105						110			
[1336]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Ser	Ser								
[1337]					115					120									
[1338]	<210>		102																
[1339]	<211>		107																
[1340]	<212>		PRT																
[1341]	<213>		人工序列(Artificial Sequence)																
[1342]	<220>																		
[1343]	<223>		5H.RG4的VL																
[1344]	<400>		102																
[1345]	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
[1346]			1				5						10			15			
[1347]	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Ser	Ser			
[1348]							20									25			30
[1349]	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu			
[1350]							35									40			45
[1351]	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser			
[1352]							50									55			60
[1353]	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu			
[1354]							65									70			75
[1355]	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr			
[1356]							85									90			95
[1357]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
[1358]							100									105			
[1359]	<210>		103																
[1360]	<211>		122																
[1361]	<212>		PRT																
[1362]	<213>		人工序列(Artificial Sequence)																
[1363]	<220>																		

[1364]	<223>	5G.RC5的VH
[1365]	<400>	103
[1366]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[1367]	1	5 10 15
[1368]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Asp Tyr	
[1369]		20 25 30
[1370]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[1371]		35 40 45
[1372]	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[1373]		50 55 60
[1374]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
[1375]		65 70 75 80
[1376]	Met Glu Met Arg Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1377]		85 90 95
[1378]	Ala Arg Gly His Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Cys Phe Phe Asp His Trp	
[1379]		100 105 110
[1380]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser	
[1381]		115 120
[1382]	<210>	104
[1383]	<211>	107
[1384]	<212>	PRT
[1385]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1386]	<220>	
[1387]	<223>	5G.RC5的VL
[1388]	<400>	104
[1389]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[1390]		1 5 10 15
[1391]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser	
[1392]		20 25 30
[1393]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu	
[1394]		35 40 45
[1395]	Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser	
[1396]		50 55 60
[1397]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu	
[1398]		65 70 75 80
[1399]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr	
[1400]		85 90 95
[1401]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1402]		100 105

[1403] <210> 105
 [1404] <211> 120
 [1405] <212> PRT
 [1406] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1407] <220>
 [1408] <223> 5F.RE6的VH
 [1409] <400> 105
 [1410] Gln Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1411] 1 5 10 15
 [1412] Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [1413] 20 25 30
 [1414] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1415] 35 40 45
 [1416] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 [1417] 50 55 60
 [1418] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Tyr Thr Leu Tyr
 [1419] 65 70 75 80
 [1420] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
 [1421] 85 90 95
 [1422] Ala Arg Lys Gly Ala Arg Gly Ile Thr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 [1423] 100 105 110
 [1424] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1425] 115 120
 [1426] <210> 106
 [1427] <211> 107
 [1428] <212> PRT
 [1429] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1430] <220>
 [1431] <223> 5F.RE6的VL
 [1432] <400> 106
 [1433] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ala Gly
 [1434] 1 5 10 15
 [1435] Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 [1436] 20 25 30
 [1437] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [1438] 35 40 45
 [1439] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [1440] 50 55 60
 [1441] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[1442]	65	70	75	80
[1443]	Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Arg Gln Asn Tyr Asn Thr Pro Leu			
[1444]		85	90	95
[1445]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[1446]		100	105	
[1447]	<210>	107		
[1448]	<211>	122		
[1449]	<212>	PRT		
[1450]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1451]	<220>			
[1452]	<223>	5H.RF2的VH		
[1453]	<400>	107		
[1454]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
[1455]	1	5	10	15
[1456]	Thr Leu Ala Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Asp Tyr			
[1457]		20	25	30
[1458]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[1459]		35	40	45
[1460]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
[1461]		50	55	60
[1462]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu			
[1463]	65	70	75	80
[1464]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[1465]		85	90	95
[1466]	Ile Glu Tyr Ser Asn Ser Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp			
[1467]		100	105	110
[1468]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[1469]		115	120	
[1470]	<210>	108		
[1471]	<211>	107		
[1472]	<212>	PRT		
[1473]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1474]	<220>			
[1475]	<223>	5H.RF2的VL		
[1476]	<400>	108		
[1477]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ala Gly			
[1478]	1	5	10	15
[1479]	Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Tyr			
[1480]		20	25	30

[1481] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [1482] 35 40 45
 [1483] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [1484] 50 55 60
 [1485] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [1486] 65 70 75 80
 [1487] Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Arg Gln Asn Tyr Asn Thr Pro Leu
 [1488] 85 90 95
 [1489] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [1490] 100 105
 [1491] <210> 109
 [1492] <211> 6
 [1493] <212> PRT
 [1494] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1495] <220>
 [1496] <223> 5H.RF2的VL CDR1
 [1497] <400> 109
 [1498] Gln Thr Ile Ser Asn Tyr
 [1499] 1 5

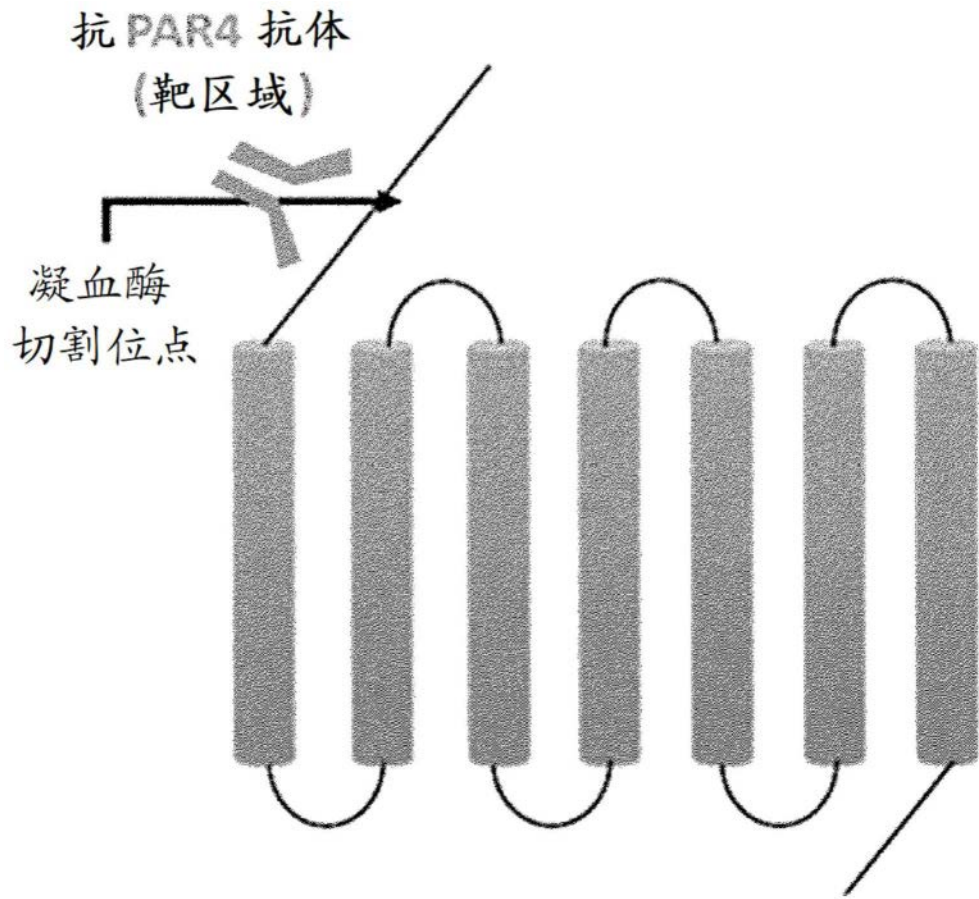


图1

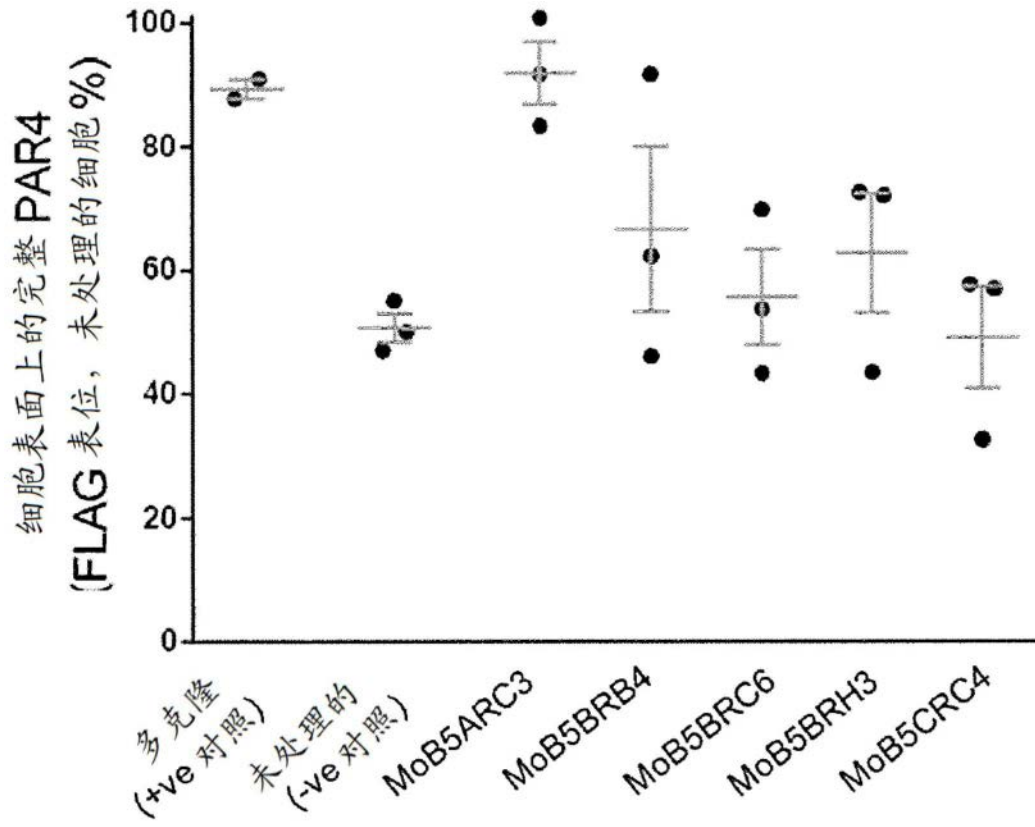


图2

ARC3 亚克隆筛选

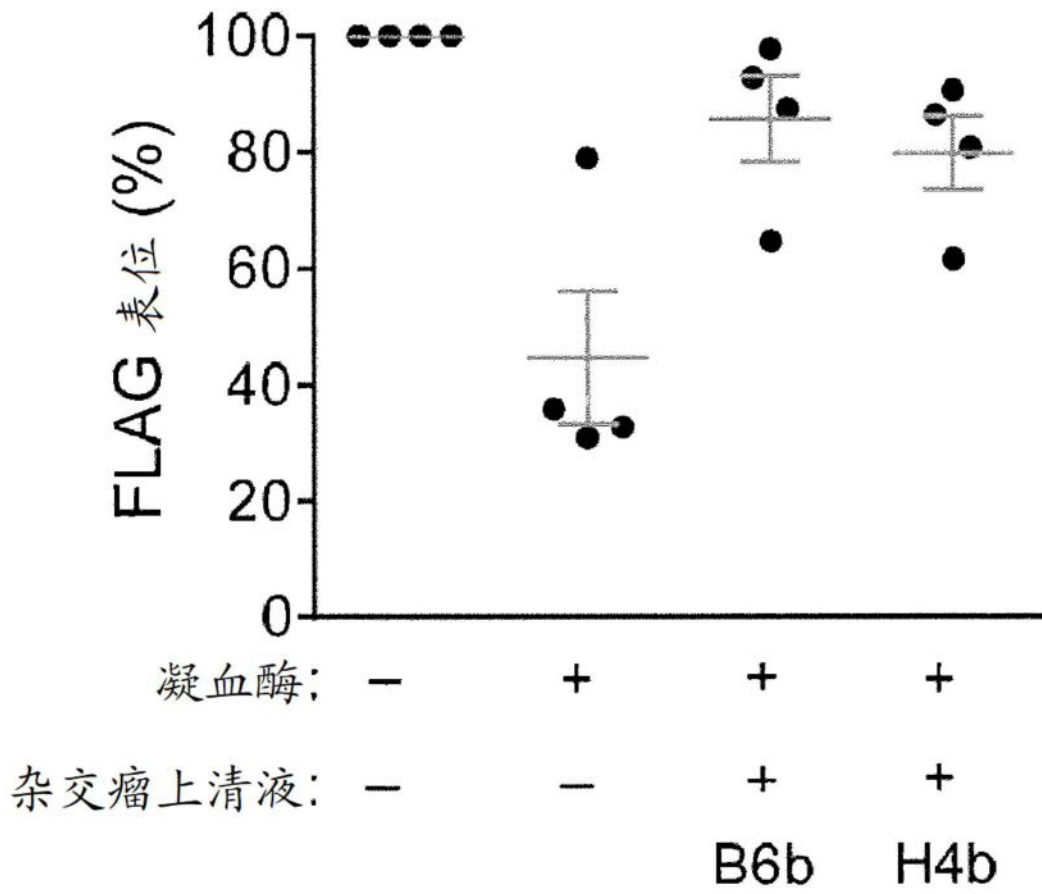


图3

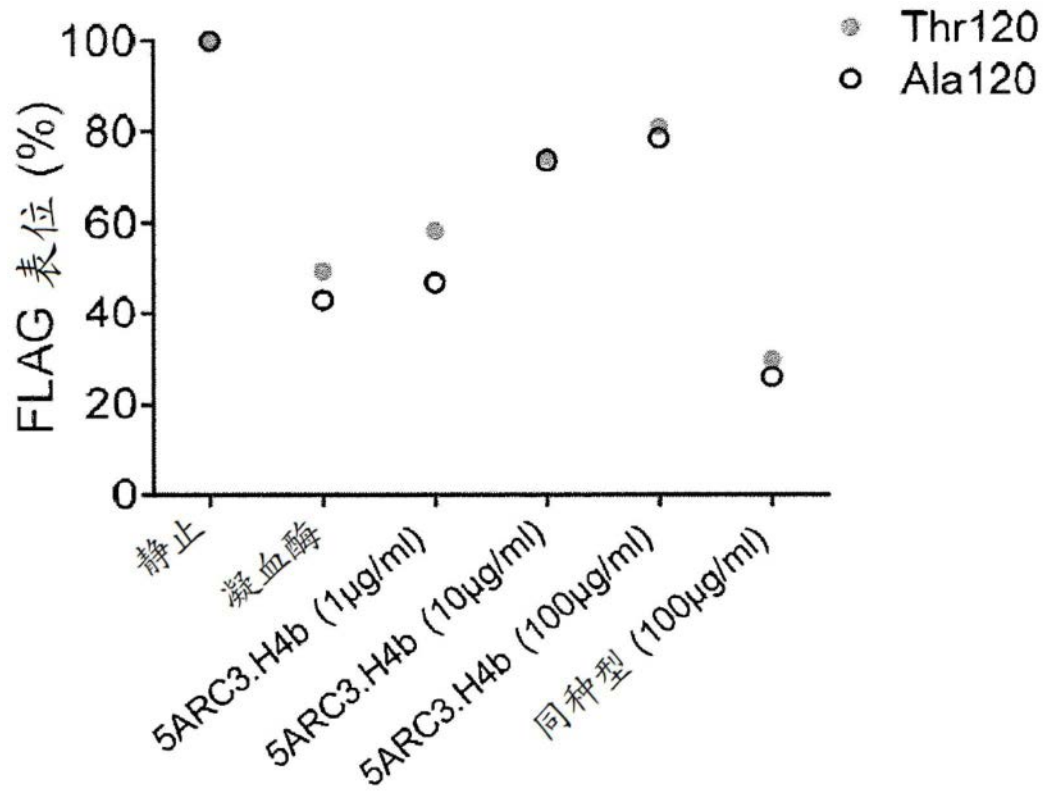


图4

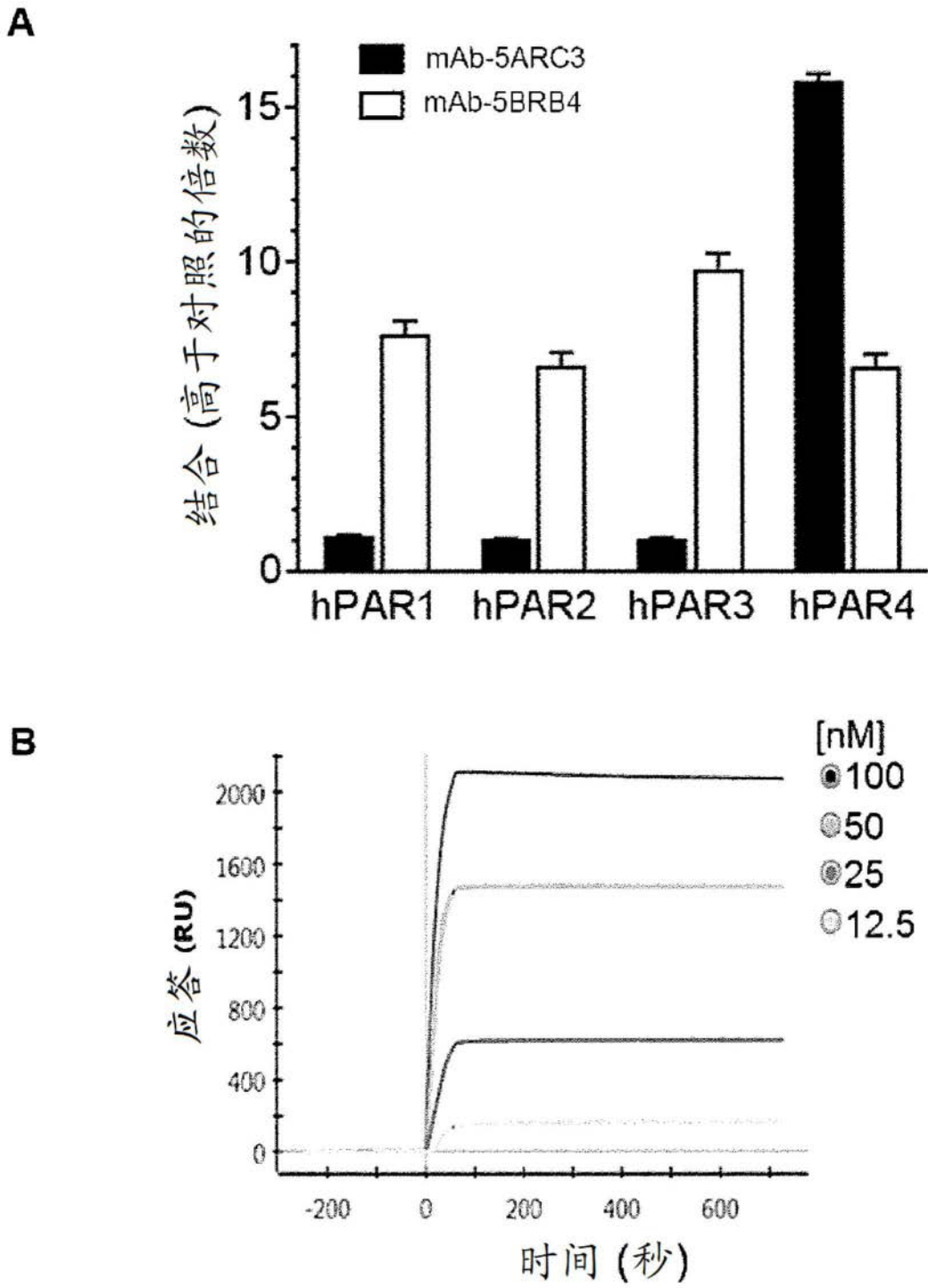


图5

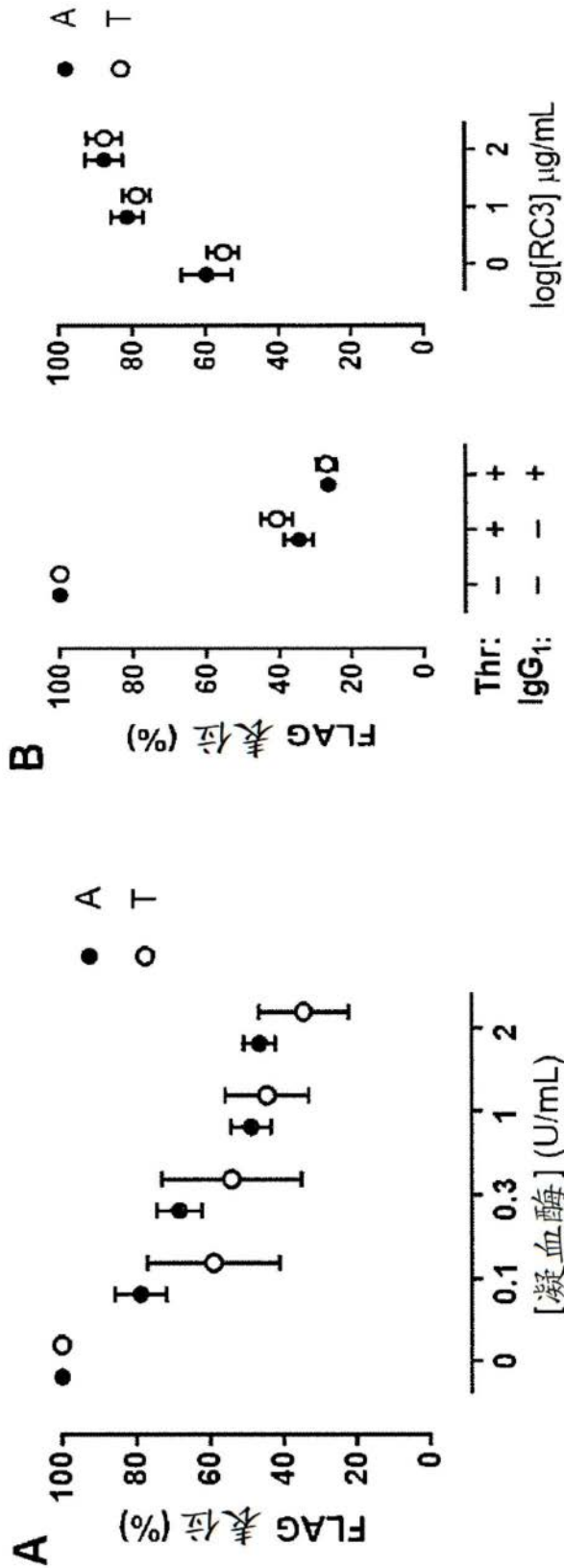


图6

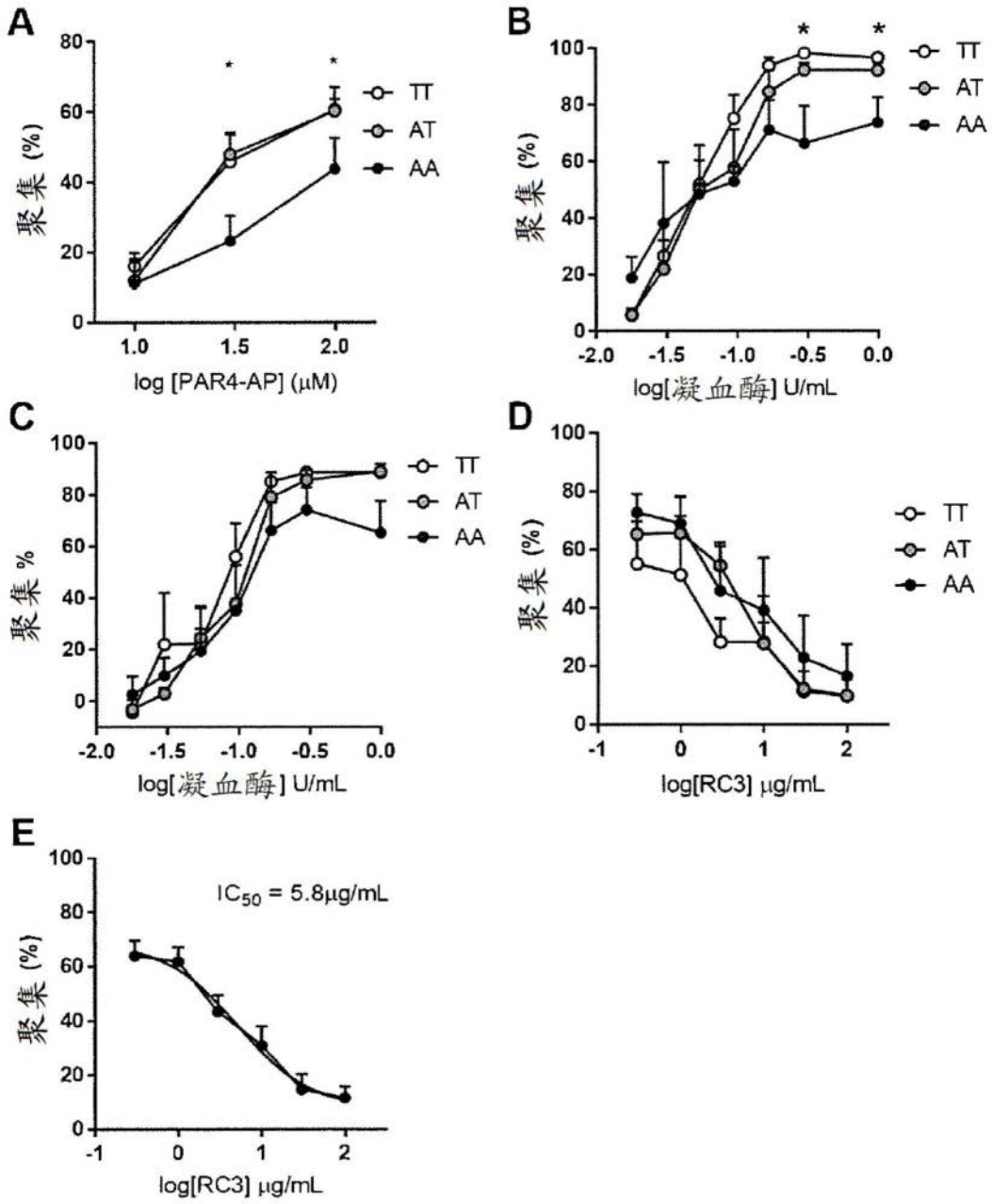


图7

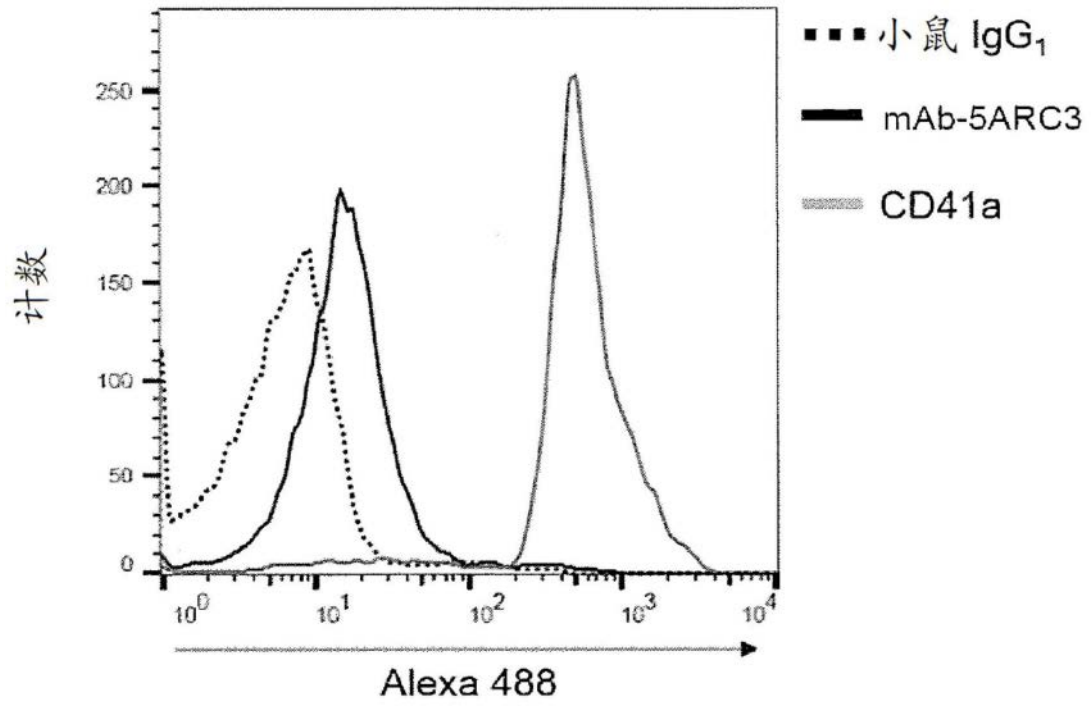


图8

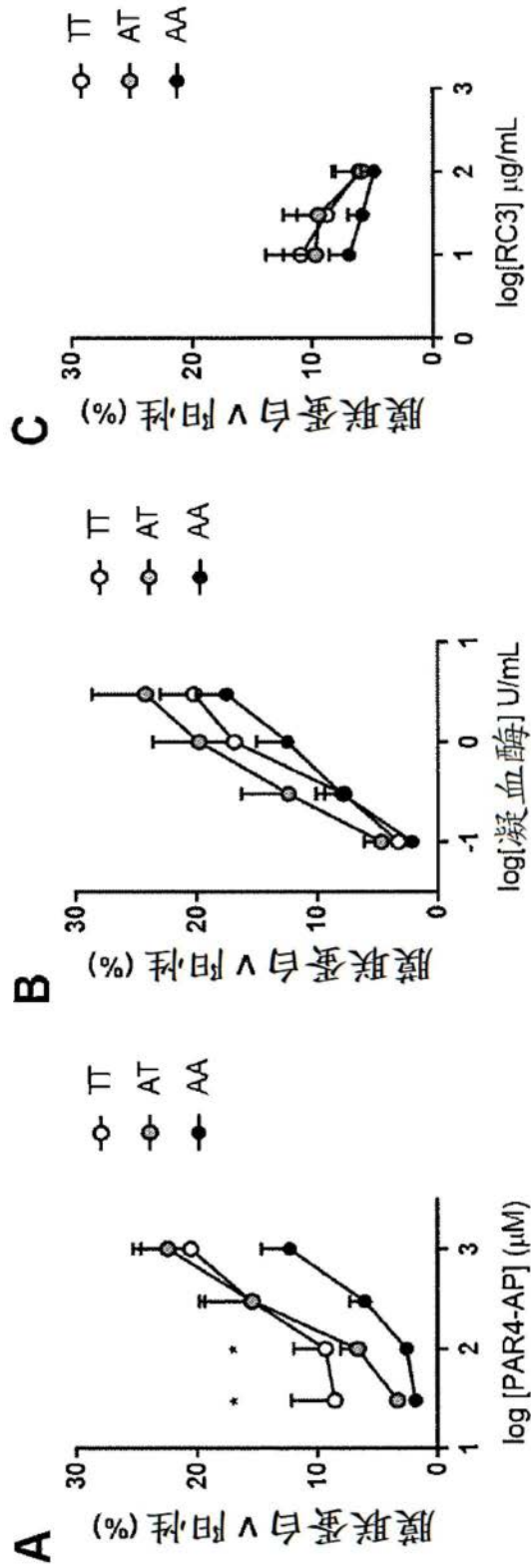


图9

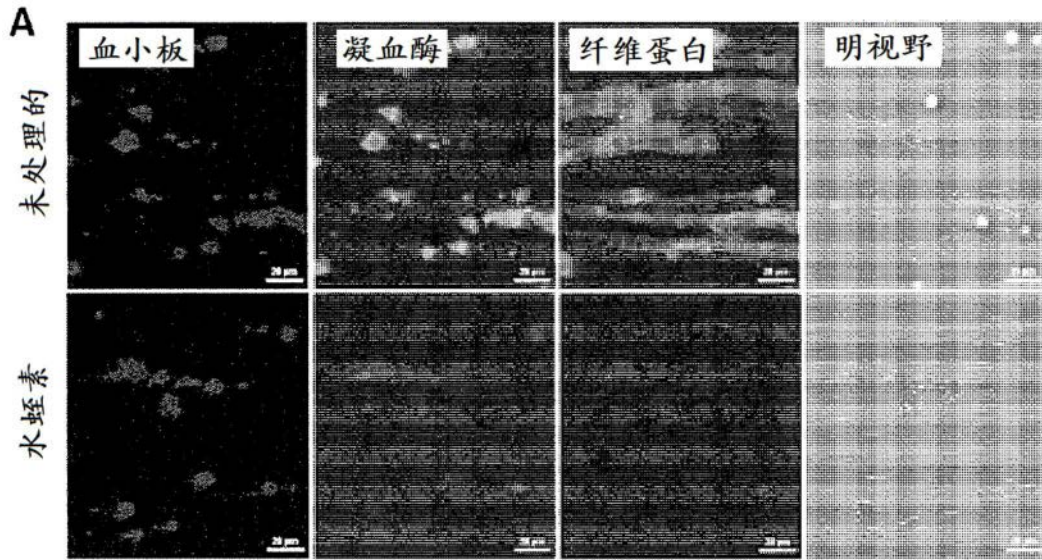


图10-1

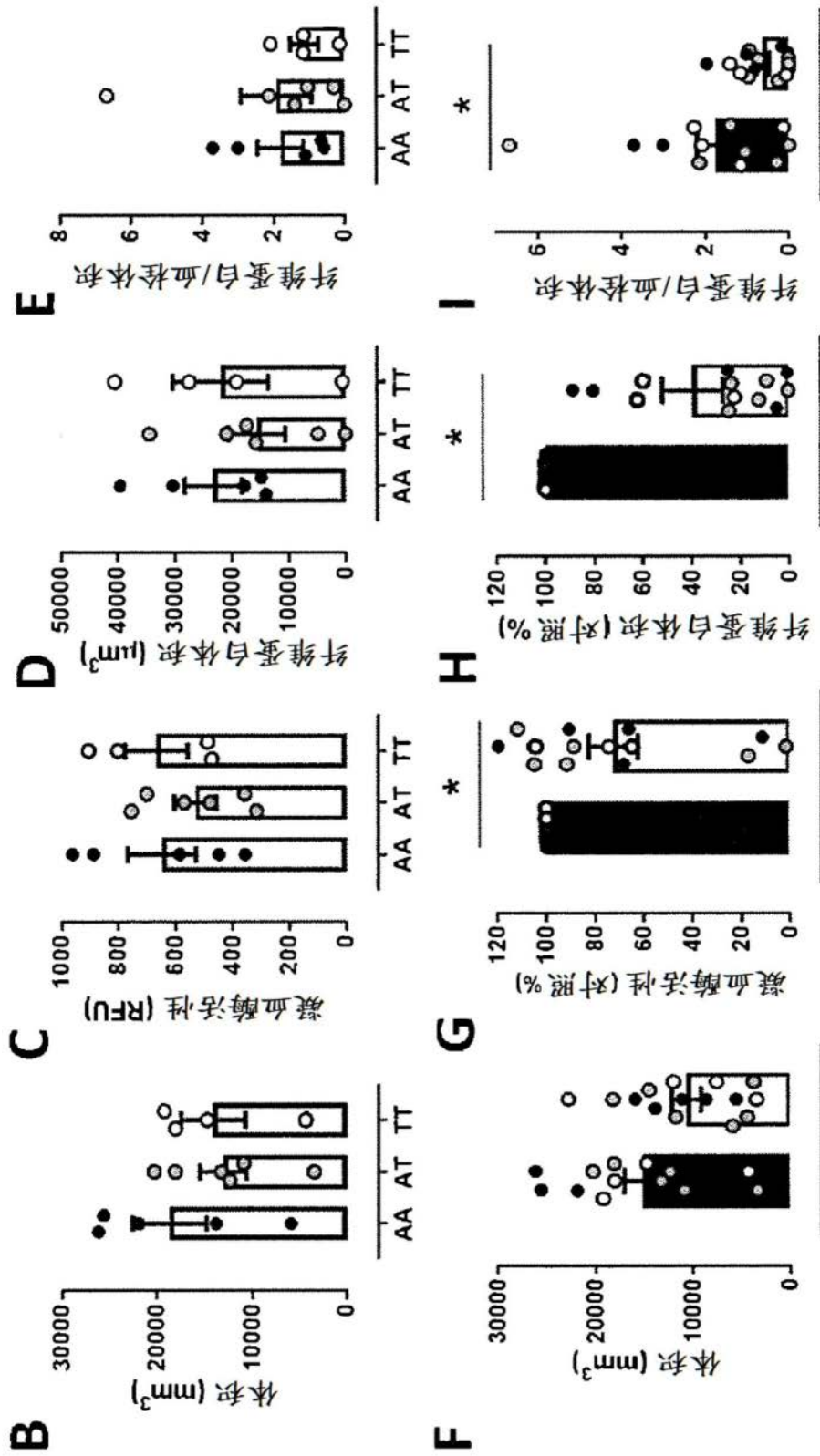


图10-2

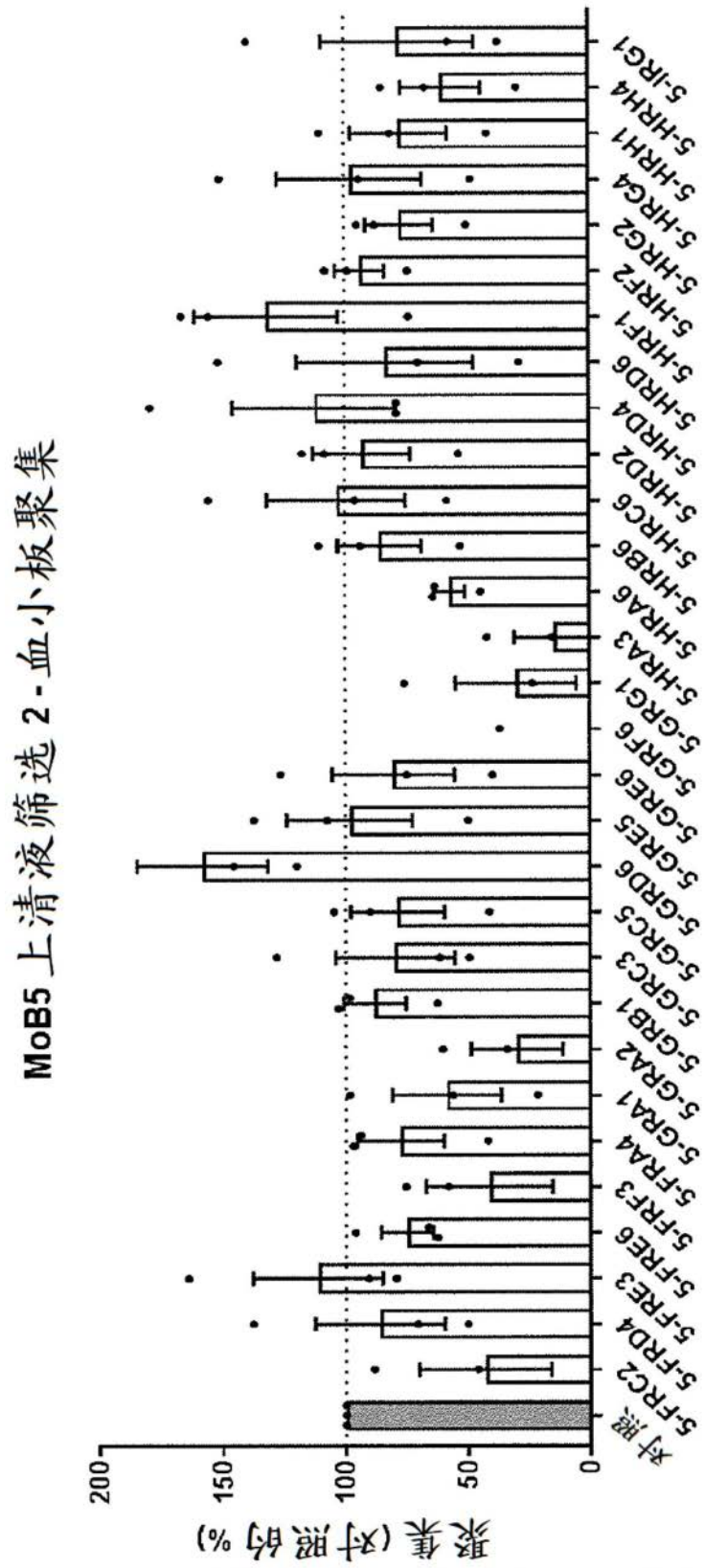
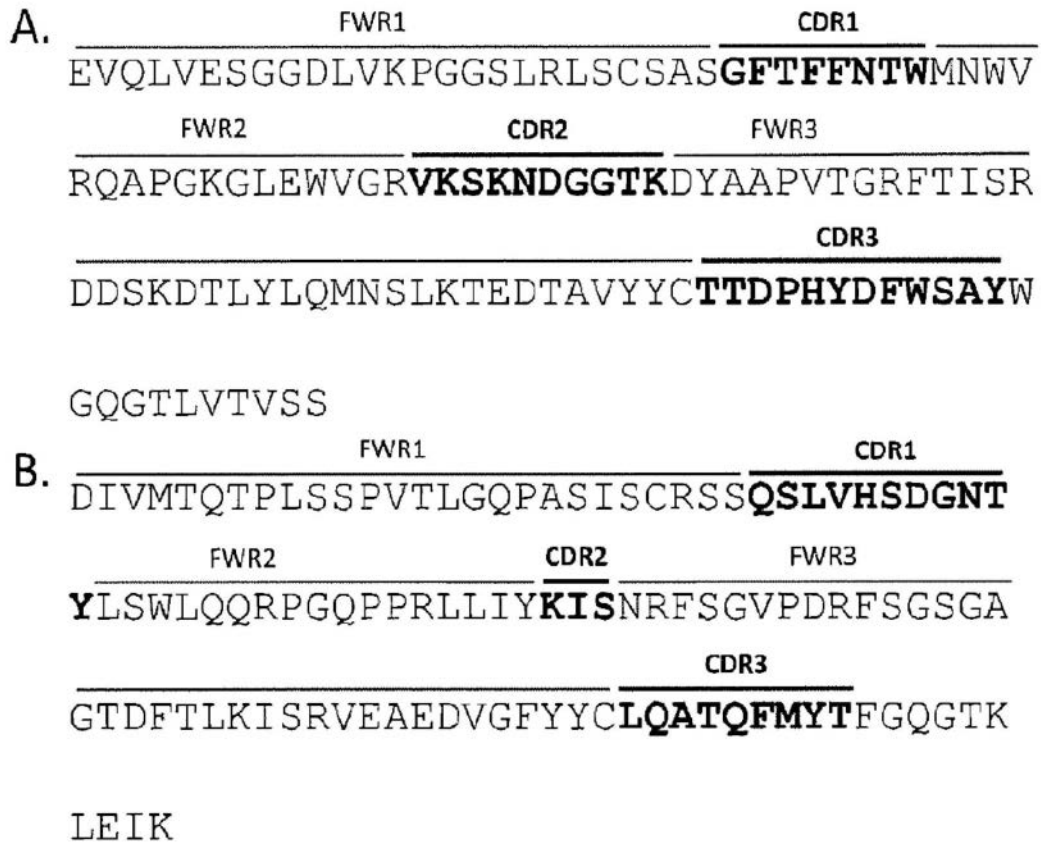


图11



抗体细胞系名称: MoB5H RD2.B10.A7b

图13

A. FWR1 CDR1 (SEQ ID NO: 24)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS**AYTFTNYG**ISWV
FWR2 CDR2 (SEQ ID NO: 25) FWR3
 RQAPGQGLEWMGW**ISPYNGNT**NYAQKLQGRVTMTTDT
CDR3 (SEQ ID NO: 26)
 STRTAYMELRSLRSDDTAVYYC**AREYNRSSRGRYYYY**

GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)

B. FWR1 CDR1 (SEQ ID NO: 27)
 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRAS**QSVSSNY**LAW
FWR2 CDR2 (SEQ ID NO: 27) FWR3
 YQKKPGQAPRL~~LI~~**S**GASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
CDR3 (SEQ ID NO: 29)
 TLTISRLEPEDFAVYYC**QQYGSSPWT**FGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 23)

抗体细胞系名称: MoB5F RF3.A7b.A1

图14

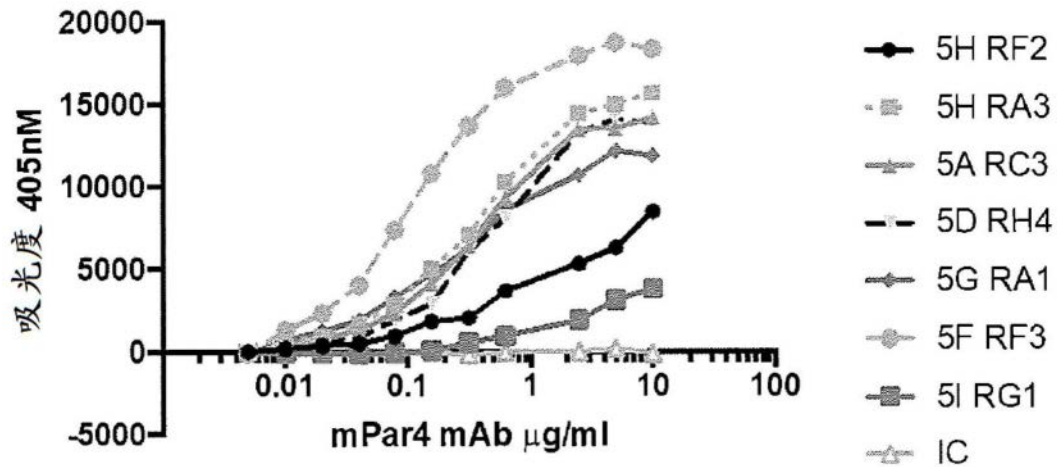


图15

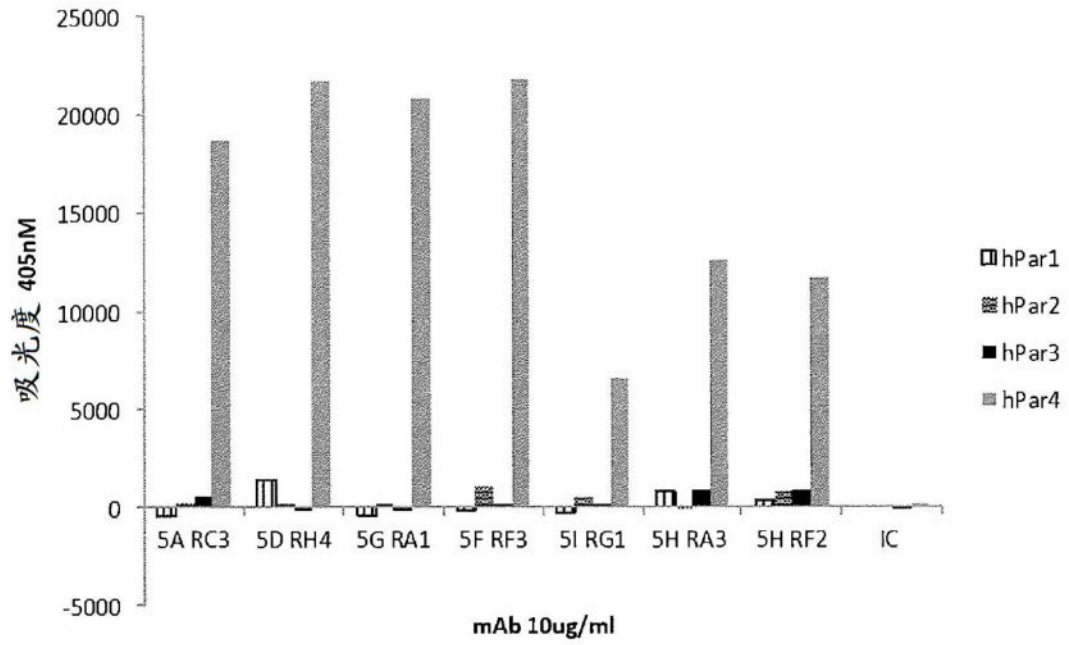


图16

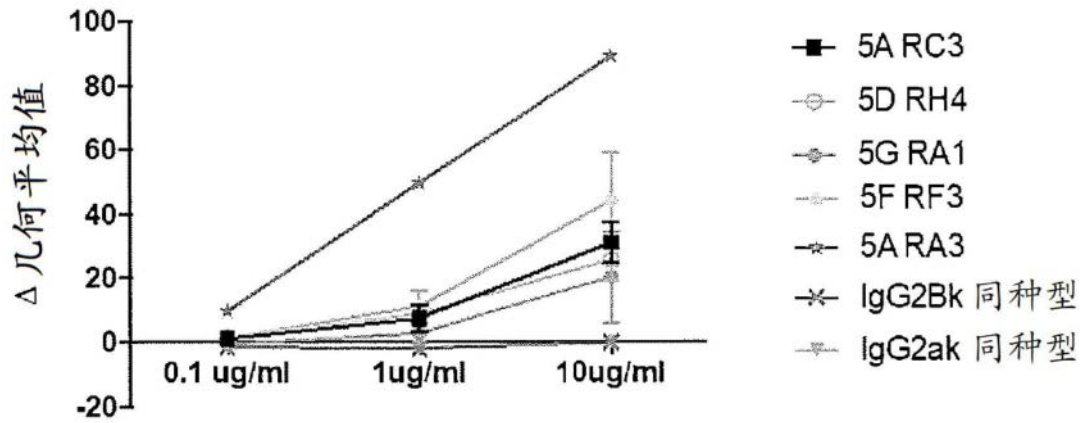


图17

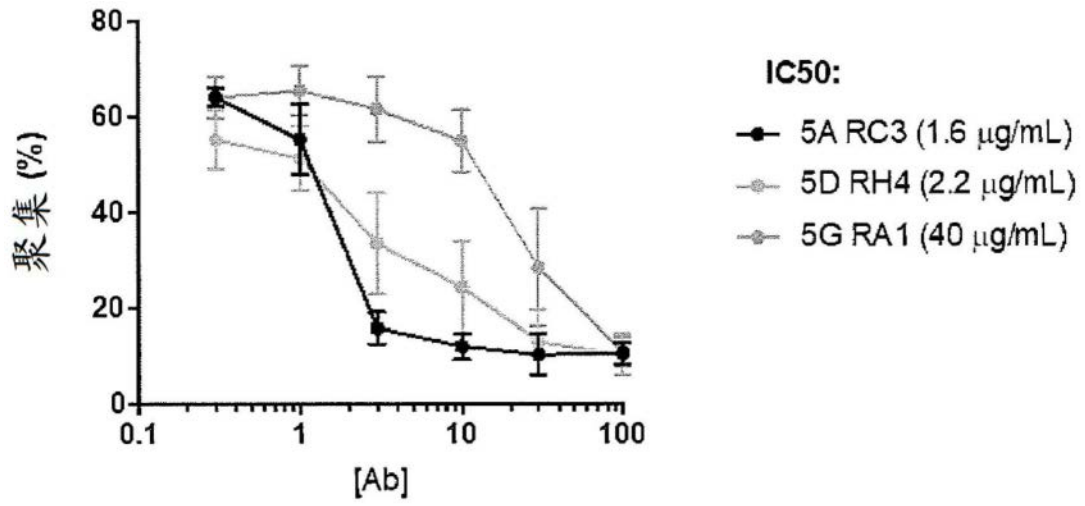
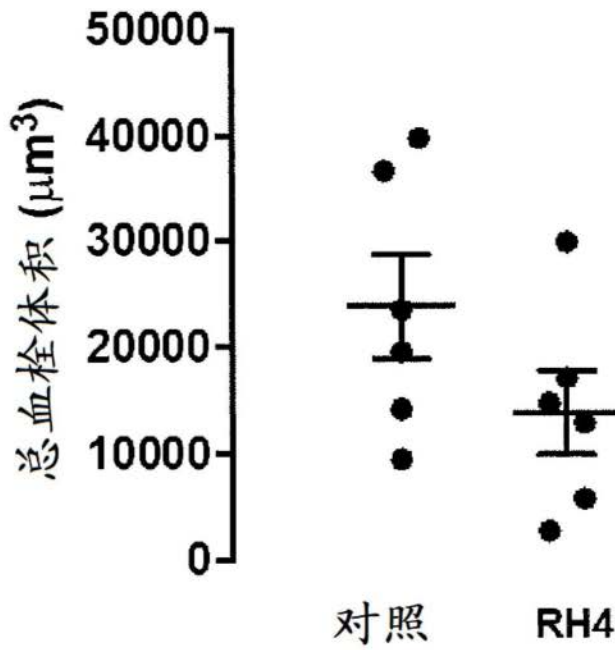


图18

A



B

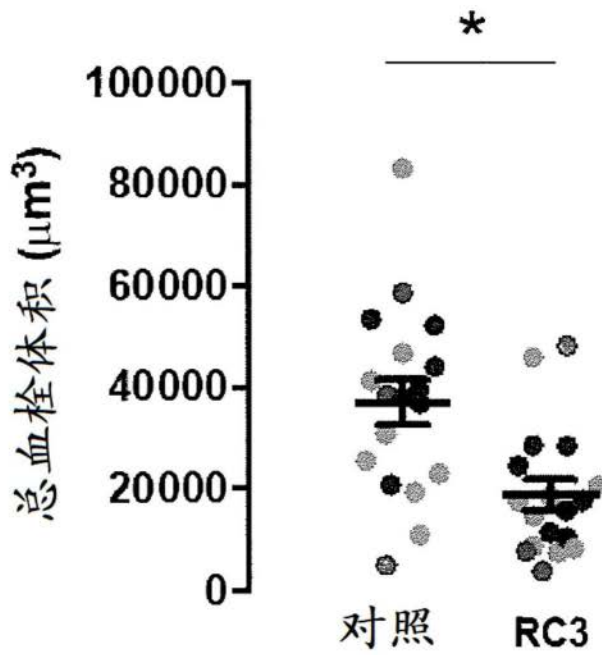


图19

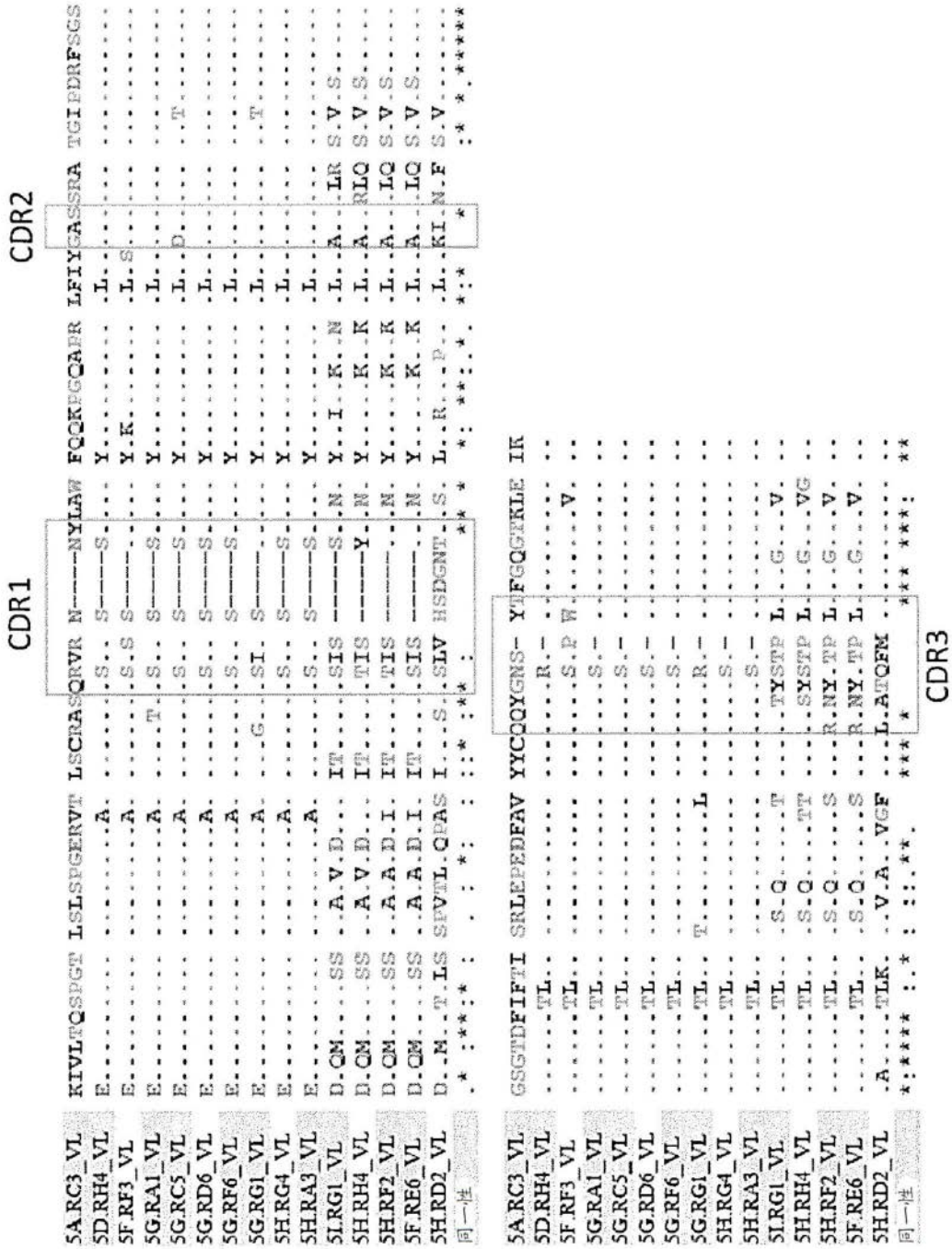


图21

G D D S T P S I L P A P R G Y P G Q V hPAR4 肽
 G D D S T P S I L hPAR4 1-9
 I L P A P R G Y hPAR4 8-15
 A P R G Y P G Q V hPAR4 11-20

图22

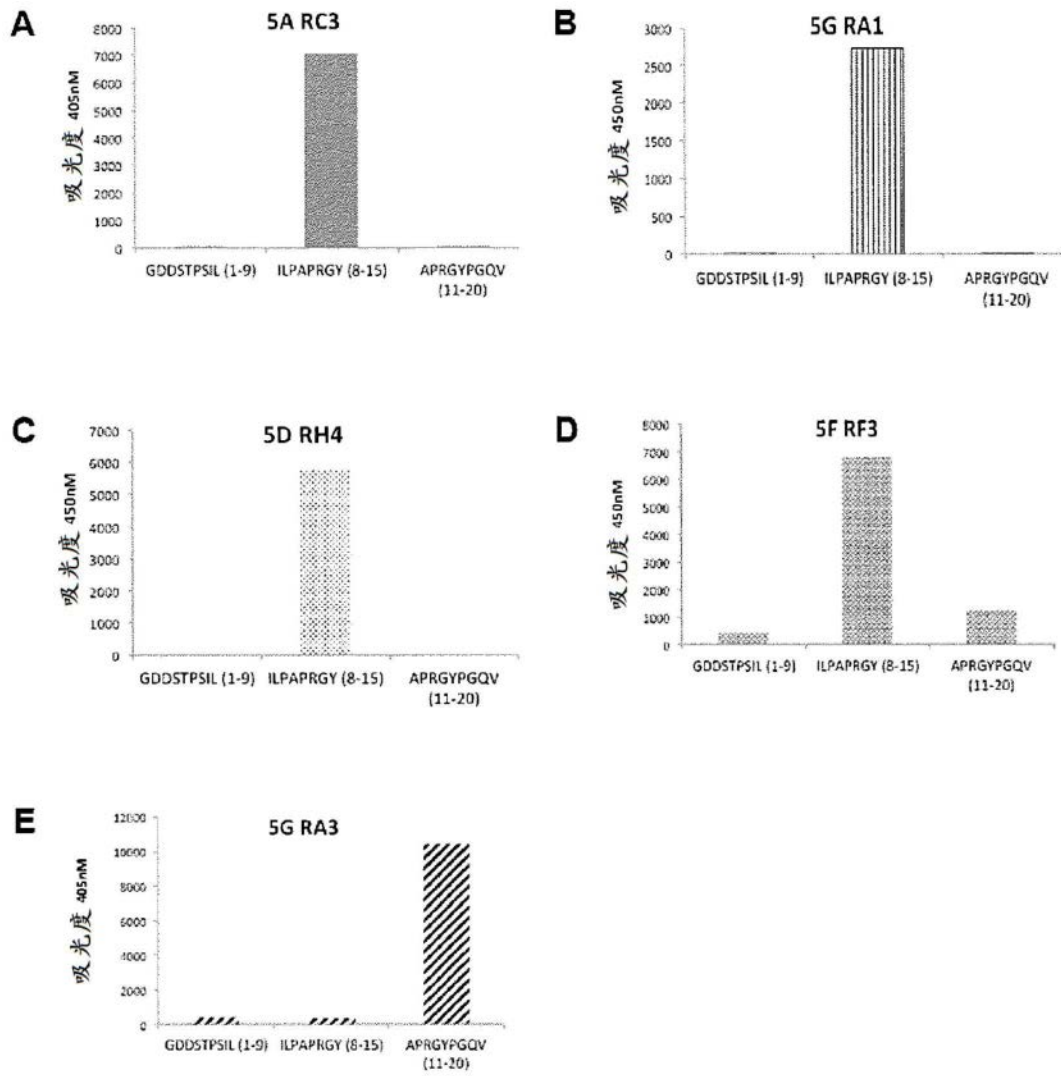


图23