



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101977936 A

(43) 申请公布日 2011.02.16

(21) 申请号 200880024824.5

(22) 申请日 2008.07.17

(30) 优先权数据

60/950,290 2007.07.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.01.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/070357 2008.07.17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/012401 EN 2009.01.22

(71) 申请人 IRM 责任有限公司

地址 英属百慕大群岛哈密尔顿

(72) 发明人 K·R·鲁尔森

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 刘金辉

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 25 页 序列表 40 页
附图 8 页

(54) 发明名称

蛋白酶激活受体 1 (PAR1) 的拮抗剂抗体

(57) 摘要

本发明提供特异性识别和拮抗 PAR1 受体的抗体或抗原结合分子。在本发明中还提供编码这类分子的多核苷酸和载体及包含该多核苷酸或载体的宿主细胞。

1. 结合蛋白酶激活受体-1 (PAR1) 的抗体, 其中该抗体包含
 - (a) 重链可变区, 其包含人重链 V- 区段、重链互补决定区 3 (CDR3)、和重链构架区 4 (FR4), 和
 - (b) 轻链可变区, 其包含人轻链 V- 区段、轻链 CDR3、和轻链 FR4, 其中
 - i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 $DDX_1X_2SX_3WX_4FDV$, 其中 X_1 是 G 或 I, X_2 是 P 或 Y, X_3 是 H、L、P、M、E、W、T、S、Q 或 A, X_4 是 Y 或 F (SEQ ID NO :10);
 - ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 $FQGX_5X_6VPFT$, 其中 X_5 是 S、D、A 或 V, X_6 是 H、R、T、S 或 K (SEQ ID NO :20);其中该抗体是 PAR1 拮抗剂。
2. 权利要求 1 的抗体, 其中重链 V- 区段与 SEQ ID NO :41 共有至少 90% 序列同一性, 其中轻链 V- 区段与 SEQ ID NO :46 共有至少 90% 序列同一性。
3. 权利要求 1 的抗体, 其中重链 V- 区段与选自 SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44 和 SEQ ID NO :45 的氨基酸共有至少 90% 序列同一性, 其中轻链 V- 区段与选自 SEQ ID NO :47、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :49 和 SEQ ID NO :50 的氨基酸共有至少 90% 序列同一性。
4. 权利要求 1 的抗体, 其中:
 - i) 重链 CDR 3 包含选自 SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列; 和
 - ii) 轻链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列。
5. 权利要求 1 的抗体, 其中重链 FR4 是人种系 FR4。
6. 权利要求 5 的抗体, 其中重链 FR4 是人种系 JH6 (WGQGT TTVTSS ; SEQ ID NO :32)。
7. 权利要求 5 的抗体, 其中重链 J- 区段包含人种系 JH6 部分序列 DVWGQGT TTVTSS (SEQ ID NO :66)。
8. 权利要求 1 的抗体, 其中轻链 FR4 是人种系 FR4。
9. 权利要求 8 的抗体, 其中轻链 FR4 是人种系 Jk2 (FGQGT KLEIK ; SEQ ID NO :40)。
10. 权利要求 8 的抗体, 其中轻链 J- 区段包含人种系 Jk2 部分序列 TFGQGT KLEIK (SEQ ID NO :67)。
11. 权利要求 1 的抗体, 其中重链 V- 区段和轻链 V- 区段各自包含互补决定区 1 (CDR1) 和互补决定区 2 (CDR2); 其中:
 - i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列;
 - ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列;
 - iii) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列; 和
 - iv) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列。
12. 权利要求 11 的抗体, 其中
 - i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :4;
 - ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :8;
 - iii) 重链 CDR3 包含 SEQ ID NO :11;
 - iv) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :16;
 - v) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :19; 和

vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO :22。

13. 权利要求 11 的抗体,其中

i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :4 ;

ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :8 ;

iii) 重链 CDR3 包含 SEQ ID NO :12 ;

iv) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :16 ;

v) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :19 ;和

vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO :23。

14. 权利要求 11 的抗体,其中

i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :5 ;

ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :9 ;

iii) 重链 CDR3 包含 SEQ ID NO :13 ;

iv) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :16 ;

v) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :19 ;和

vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO :23。

15. 权利要求 1 的抗体,其中重链可变区与 SEQ ID NO :51 的可变区共有至少 90%氨基酸序列同一性,轻链可变区与 SEQ ID NO :55 的可变区共有至少 90%氨基酸序列同一性。

16. 权利要求 1 的抗体,其中重链可变区与选自 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53 和 SEQ ID NO :54 的可变区共有至少 90%氨基酸序列同一性,轻链可变区与选自 SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58 和 SEQ ID NO :59 的可变区共有至少 90%氨基酸序列同一性。

17. 权利要求 1 的抗体,其中重链可变区与选自 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53 和 SEQ ID NO :54 的可变区共有至少 95%氨基酸序列同一性,轻链可变区与选自 SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58 和 SEQ ID NO :59 的可变区共有至少 95%氨基酸序列同一性。

18. 权利要求 1 的抗体,其中重链可变区包含选自 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53 和 SEQ ID NO :54 的氨基酸序列,轻链可变区包含选自 SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58 和 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列。

19. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体以小于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 的平衡解离常数 (K_D) 结合于 PAR1。

20. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体是 Fab' 片段。

21. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体是 IgG。

22. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体是单链抗体 (scFv)。

23. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体包含人恒定区。

24. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体包含包含 SEQ ID NO :52 的重链和包含 SEQ ID NO :57 的轻链。

25. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体包含包含 SEQ ID NO :53 的重链和包含 SEQ ID NO :58 的轻链。

26. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体包含包含 SEQ ID NO :54 的重链和包含 SEQ ID NO :59 的轻链。

27. 可药用组合物,其包含权利要求 1-26 的任一项的抗体和生理相容的赋形剂。

28. 改善由通过 PAR1 的细胞内信号传导介导的疾病症状的方法,包括向有需要的患者

施用权利要求 1-26 的任一项的抗体,其中该抗体是 PAR1 的拮抗剂。

29. 权利要求 28 的方法,其中由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是慢性肠炎。

30. 权利要求 28 的方法,其中由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是纤维变性病。

31. 权利要求 28 的方法,其中由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是过表达 PAR1 的癌症。

32. 权利要求 28 的方法,其中由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是局部缺血再灌注损伤。

33. 特异性结合 PAR1 的抗体,其中该抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区各自包含下列三个互补决定区 (CDR) :CDR1、CDR2 和 CDR3 ;其中 :

i) 重链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ IDNO :5 的氨基酸序列 ;

ii) 重链可变区的 CDR2 包含选自 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ IDNO :9 的氨基酸序列 ;

iii) 重链可变区的 CDR3 包含选自 SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列 ;

iv) 轻链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列 ;

v) 轻链可变区的 CDR2 包含选自 SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :19 的氨基酸序列 ;

vi) 轻链可变区的 CDR 3 包含选自 SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列。

蛋白酶激活受体 1 (PAR1) 的拮抗剂抗体

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求在 2007 年 7 月 17 日提交的美国临时专利申请号 60/950,290 的优先权。这一申请的全部公开在此以其整体和全部目的通过参考并入本文。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 本发明涉及蛋白酶激活受体 -1 (PAR1) 的抗体和抗原结合分子拮抗剂。

[0005] 蛋白酶激活受体 -1 (PAR1) 是属于 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 家族的凝血酶受体。PAR1 在多种组织中表达,例如,内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、神经元和人血小板。其涉及与止血、增殖和组织损伤有关的细胞应答。凝血酶介导的经由 PAR1 的血小板凝聚刺激是血管中血块形成和伤口愈合的重要步骤。凝血酶通过蛋白水解移去 PAR1 的细胞外 N- 末端结构域和暴露新的 PAR1 N- 末端来激活 PAR1。然后新的 PAR1 N- 末端的头几个氨基酸 (SFLLRN ;SEQ ID NO :68) 作为与该受体另一部分结合的系锁配体 (tetheredligand) 作用,通过结合的 G- 蛋白起始信号传导。PAR1 也可以由参与血液凝固的其它丝氨酸蛋白酶激活。

[0006] PAR1 介导的信号传导活动的调节有若干治疗应用。抑制 PAR1 有助于治疗血栓形成和血管增生的病症以及抑制癌症进展。见,例如, Darmoul 等人, Mol Cancer Res (2004) 2 (9) :514-22 和 Salah 等人, Mol Cancer Res (2007) 5 (3) :229-40。包括拮抗剂抗体或抗原结合分子的 PAR1 抑制剂在由 PAR1 细胞内信号传导介导的多种疾病的治疗中是有用的。例如,人们发现包括拮抗剂抗体或抗原结合分子的 PAR1 抑制剂在预防或抑制慢性肠炎 (包括炎症性肠病 (IBD)、肠激惹综合症 (IBS) 和溃疡性结肠炎) 和纤维变性病 (包括肝纤维化和肺纤维化) 中的用途。见,例如, Vergnolle 等人, J Clin Invest (2004) 114 (10) :1444 ;Yoshida 等 人, Aliment Pharmacol Ther (2006) 24 (Suppl 4) :249 ;Mercer 等人, Ann NY Acad Sci (2007) 1096 :86-88 ;Sokolova 和 Reiser, Pharmacol Ther (2007) PMID :17532472。人们还发现包括拮抗剂抗体或抗原结合分子的 PAR1 抑制剂在预防或抑制局部缺血再灌注损伤 (包括心肌、肾、大脑和肠的局部缺血再灌注损伤) 中有用。见,例如, Strande 等人, Basic Res. Cardiol (2007) 102 (4) :350-8 ;Sevastos 等人, Blood (2007) 109 (2) :577-583 ;Junge 等人, Proc Natl AcadSci U S A. (2003) 100 (22) :13019-24 和 Tsuboi 等 人, Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol (2007) 292 (2) :G678-83。抑制 PAR1 细胞内信号传导也可以被用于抑制单纯疱疹病毒 (HSV1 和 HSV2) 对细胞的感染。见, Sutherland 等人, J Thromb Haemost (2007) 5 (5) :1055-61。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供针对蛋白酶激活受体 -1 (PAR1) 的改良的拮抗剂抗体和其使用的方法。

[0009] 因此,在一方面,本发明提供结合蛋白酶激活受体 -1 (PAR1) 的抗体。在一些实施方案中,该抗体包含:

[0010] (a) 重链可变区,包含人重链 V- 区段、重链互补决定区 3 (CDR3)、和重链构架区

4(FR4),和

[0011] (b) 轻链可变区,包含人轻链 V 区段、轻链 CDR3、和轻链 FR4,其中

[0012] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 DDX₁X₂SX₃WX₄FDV,其中 X₁ 是 G 或 I,X₂ 是 P 或 Y,X₃ 是 H、L、P、M、E、W、T、S、Q 或 A,X₄ 是 Y 或 F(SEQ ID NO :10) ;

[0013] ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 FQGX₅X₆VPFT,其中 X₅ 是 S、D、A 或 V,X₆ 是 H、R、T、S 或 K(SEQ ID NO :20) ;

[0014] 其中该抗体是 PAR1 拮抗剂。

[0015] 在相关方面,本发明提供特异性结合 PAR1 的抗体。在一些实施方案中,该抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区各自包含下列三个互补决定区(CDR) :CDR1、CDR2 和 CDR3 ;其中

[0016] i) 重链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列 ;

[0017] ii) 重链可变区的 CDR 2 包含选自 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列 ;

[0018] iii) 重链可变区的 CDR 3 包含选自 SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列 ;

[0019] iv) 轻链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列 ;

[0020] v) 轻链可变区的 CDR 2 包含选自 SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :19 的氨基酸序列 ;

[0021] vi) 轻链可变区的 CDR 3 包含选自 SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,抗体是 PAR1 拮抗剂。

[0022] 在一个实施方案中,重链 V- 区段与 SEQ ID NO :41 共有至少 90% 的序列同一性,轻链 V 区段与 SEQ ID NO :46 共有至少 90% 的序列同一性。

[0023] 在一个实施方案中,重链 V- 区段与选自 SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44 和 SEQ ID NO :45 的氨基酸共有至少 90% 的序列同一性,轻链 V- 区段与选自 SEQ ID NO :47、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :49 和 SEQ ID NO :50 的氨基酸共有至少 90% 的序列同一性。

[0024] 在抗体的一个实施方案中 :

[0025] i) 重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列 ;和

[0026] ii) 轻链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,重链 FR4 是人种系 FR4。在一些实施方案中,重链 FR4 是人种系 JH6 (WGQGTTVTVSS ;SEQ ID NO :32)。在一些实施方案中,重链 J- 区段包含人种系 JH6 部分序列 DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO :66)。

[0028] 在一些实施方案中,轻链 FR4 是人种系 FR4。在一些实施方案中,轻链 FR4 是人种系 Jk2 (FGQGTKLEIK ;SEQ ID NO :40)。在一些实施方案中,轻链 J- 区段包含人种系 Jk2 部分序列 TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO :67)。

[0029] 在一些实施方案中,重链 V- 区段和轻链 V- 区段各自包含互补决定区 1 (CDR1) 和互补决定区 2 (CDR2) ;其中 :

[0030] i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列 ;

[0031] ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列 ;

- [0032] iii) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列 ;和
- [0033] iv) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列。
- [0034] 在抗体的一些实施方案中 :
- [0035] i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :4 ;
- [0036] ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :8 ;
- [0037] iii) 重链 CDR3 包含 SEQ ID NO :11 ;
- [0038] iv) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :16 ;
- [0039] v) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :19 ;和
- [0040] v i) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO :22。
- [0041] 在抗体的一些实施方案中 :
- [0042] i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :4 ;
- [0043] ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :8 ;
- [0044] iii) 重链 CDR3 包含 SEQ ID NO :12 ;
- [0045] iv) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :16 ;
- [0046] v) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :19 ;和
- [0047] vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO :23。
- [0048] 在抗体的一些实施方案中 :
- [0049] i) 重链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :5 ;
- [0050] ii) 重链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :9 ;
- [0051] iii) 重链 CDR3 包含 SEQ ID NO :13 ;
- [0052] iv) 轻链 V- 区段的 CDR1 包含 SEQ ID NO :16 ;
- [0053] v) 轻链 V- 区段的 CDR2 包含 SEQ ID NO :19 ;和
- [0054] vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO :23。
- [0055] 在一些实施方案中,重链可变区与 SEQ ID NO :51 的可变区共有至少 90%的氨基酸序列同一性,轻链可变区与 SEQ ID NO :55 的可变区共有至少 90%的氨基酸序列同一性。
- [0056] 在一些实施方案中,重链可变区与选自 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53 和 SEQ ID NO :54 的可变区共有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%或 99%的氨基酸序列同一性,轻链可变区与选自 SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58 和 SEQ ID NO :59 的可变区共有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%或 99%的,和轻链可变区与序列同一性。
- [0057] 在一些实施方案中,重链可变区包含选自 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53 和 SEQ ID NO :54 的氨基酸序列,轻链可变区包含选自 SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58 和 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列。
- [0058] 在一些实施方案中,该抗体以少于 1×10^{-8} M 的平衡解离常数 (KD) 结合于 PAR1。
- [0059] 在一些实施方案中,该抗体是 Fab' 片段。在一些实施方案中,该抗体是 IgG。在一些实施方案中,该抗体是单链抗体 (scFv)。在一些实施方案中,该抗体包含人恒定区。
- [0060] 在一些实施方案中,该抗体包含包括 SEQ ID NO :52 的重链和包括 SEQ ID NO :57 的轻链。
- [0061] 在一些实施方案中,该抗体包含包括 SEQ ID NO :53 的重链和包括 SEQ ID NO :58 的轻链。

[0062] 在一些实施方案中,该抗体包含包括SEQ ID NO :54的重链和包括SEQID NO :59的轻链。

[0063] 在另一方面,本发明提供包含本发明的抗体的可药用组合物。实施方案如本文所述。

[0064] 在另一方面,本发明提供改善通过 PAR1 的细胞内信号传导介导的疾病症状的方法,包括向有需要的受试者施用本发明的拮抗剂抗体。抗体的实施方案如这里所述。

[0065] 在方法的一些实施方案中,由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是慢性肠炎。

[0066] 在方法的一些实施方案中,由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是纤维变性病。

[0067] 在方法的一些实施方案中,由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是过表达 PAR1 的癌症。

[0068] 在方法的一些实施方案中,由通过 PAR1 的异常细胞内信号传导介导的疾病是局部缺血再灌注损伤。

[0069] 定义

[0070] “抗体”指免疫球蛋白家族的多肽或包含能够非共价的、可逆的并以特异性方式结合相应抗原的免疫球蛋白片段的多肽。示例性的抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体是由两个相同的多肽链对组成,每对具有一条“轻链”(约 25kD)和一条“重链”(约 50-70kD),通过二硫键相连。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其依次定义免疫球蛋白类别,分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。各个链的 N-末端定义主要负责抗原识别的约 100 至 110 个或更多氨基酸的可变区。术语可变轻链 (V_L) 和可变重链 (V_H) 分别指轻链和重链这些区域。如在本申请中使用的,“抗体”包括具有特异地对例如 PAR1 的特定结合性的抗体和其片段的全部变体。因此,在这一概念范围之内的是全长的抗体、嵌合抗体、单链抗体 (ScFv)、Fab、Fab' 和具有相同结合特异性的这些片段的多聚体的版本 (例如, $F(ab')_2$)。

[0071] “互补性决定区”或“互补决定区”(“CDR”)可互换的指 V_L 和 V_H 的高变区。CDR 是包含对这类靶标蛋白特异性的该抗体链的靶标蛋白结合位点。在每个人 V_L 或 V_H 中有三个 CDR (CDR1-3,从 N-末端顺序编号),构成约 15-20%的可变域。CDR 是与靶标蛋白的表位结构互补,因此结合特异性的直接原因。 V_L 或 V_H 剩下的区段,即所谓的构架区,在氨基酸序列上显示较少的变异 (Kuby, Immunology, 第四版,第 4 章 .W.H.Freeman & Co., NewYork, 2000)。

[0072] 使用本技术领域多种众所周知的定义,例如 Kabat, Chothia, 国际 ImMunoGeneTics 数据库 (IMGT) (互联网址 imgt.cines.fr/), 和 AbM (见,例如, Johnson 等人, Nucleic Acids Res., 29 :205-206 (2001); Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol., 196 :901-917 (1987); Chothia 等人, Nature, 342 :877-883 (1989); Chothia 等人, J. Mol. Biol., 227 :799-817 (1992); Al-Lazikani 等人, J. Mol. Biol., 273 :927-748 (1997)) 确定 CDR 和构架区的位置。抗原结合位点的定义也在以下文献中描述 :Ruiz 等人, Nucleic Acids Res., 28 :219221 (2000); 和 Lefranc, M. P., Nucleic Acids Res., 29 :207-209 (2001); MacCallum 等人, J. Mol. Biol.,

262:732-745(1996); 和 Martin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272(1989); Martin 等人, Methods Enzymol., 203:121153(1991); 和 Rees 等人, In Sternberg M. J. E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172(1996)。

[0073] 术语“结合特异性决定簇”或“BSD”可交换的指确定抗体结合特异性所需的、互补决定区之内的最小的连续或非连续的氨基酸序列。最小结合特异性决定簇可以在一个或多个 CDR 序列中。在一些实施方案中,最小结合特异性决定簇位于抗体重链和轻链的 CDR3 序列的部分或全长之内(即,由其单独的决定)。

[0074] 这里使用的“抗体轻链”或“抗体重链”指各自包含 V_L 或 V_H 的多肽。内源性 V_L 是由基因区段 V(可变的)和 J(连接)编码,内源性 V_H 由 V、D(多样性)和 J 编码。 V_L 或 V_H 各自包括 CDR 以及构架区。在本申请中,抗体轻链和 / 或抗体重链可以不时地共同被称为“抗体链”。这些术语包括含有本领域技术人员容易识别的、不破坏 V_L 或 V_H 基本结构的突变的抗体链。

[0075] 抗体作为完整的免疫球蛋白存在、或作为用不同肽酶消化产生的多个公知特征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区二硫键下消化抗体产生 $F(ab)'_2$, 即 Fab' 的二聚体,其自身是由二硫键连接于 V_H-C_H1 的轻链。 $F(ab)'_2$ 可以在温和条件下被还原以打开在铰链区的二硫键连接,由此将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本是具有部分铰链区的 Fab。Paul, Fundamental Immunology 第 3 版(1993)。尽管在完整抗体的消化方式下定义多种抗体片段,技术人员将理解这类片段可以被化学的或通过使用重组 DNA 方法学从头合成。因此,如这里使用的术语“抗体”也包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或使用重组 DNA 方法学从头合成的那些(例如,单链 Fv)或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(见,例如,McCafferty 等人, Nature 348:552-554(1990))。

[0076] 为了制备单克隆或多克隆抗体,可以使用本领域公知的任何技术(见,例如, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497(1975); Kozbor 等人, Immunology Today 4:72(1983); Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985)。产生单链抗体的技术(美国专利号 4,946,778)可以修改以用于产生本发明的多肽的抗体。也可以使用转基因小鼠或其它生物体,例如其它哺乳动物,来表达人化抗体。或者,可以使用噬菌体展示技术鉴定特异性结合于选择的抗原的抗体和异数(heteromeric) Fab 片段(见,例如,McCafferty 等人,同上; Marks 等人, Biotechnology, 10:779-783, (1992))。

[0077] 人源化或灵长化非人抗体的方法是本领域众所周知的。通常,人源化的抗体具有从非人来源引入其的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常涉及通常来自输入可变区(import variable domain)的输入残基(import residues)。人源化可以基本按照 Winter 和其合作者的方法进行(见,例如, Jones 等人, Nature 321:522-525(1986); Riechmann 等人, Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen 等人, Science 239:1534-1536(1988) 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)), 通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的对应的序列。因此,这类人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567), 其中基本上不完整的人可变区被非人物种的对应序列取代。在操作中,人源化抗体是典型的人抗体,其中一些互补决定区(“CDR”)残基、还可能有一些构架区

(“FR”) 残基被来自啮齿动物抗体的类似位点的残基取代。

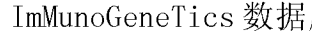
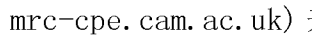
[0078] “嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替换或交换,从而抗原结合位点(可变区)被连接于不同或改变类型、效应子功能和/或物种的恒定区,或赋予嵌合抗体新特征的完全不同的分子(例如,酶、毒素、激素、生长因子和药物),或(b)可变区或其部分被改变、替代或交换为具有不同或改变的抗原特异性的可变区。

[0079] 术语“可变区”或“V-区”可交换的指包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的重链或轻链。见,图1。内源性可变区是由免疫球蛋白重链V-D-J基因或轻链V-J基因编码。V-区可以是天然存在、重组或合成的。

[0080] 如这里使用的,术语“可变区段”或“V-区段”可交换的指包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3的可变区的亚序列。见,图1。内源性V-区段是由免疫球蛋白V-基因编码。V-区段可以是天然存在、重组或合成的。

[0081] 如这里使用的,术语“J-区段”指包含CDR3和FR4的C-末端部分的可变区的亚序列。内源性J-区段由免疫球蛋白J-基因编码。见,图1。J-区段可以是天然存在、重组或合成的。

[0082] “人源化”抗体是保留了非人抗体反应性而在人中较少免疫原性的抗体。这可以例如,通过保留非人CDR区和用其在人中的对应部分代替该抗体的剩余部分而实现。见,例如,Morrison等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984);Morrison和Oi, Adv. Immunol., 44:65-92(1988);Verhoeyen等人, Science, 239:1534-1536(1988);Padlan, Molec. Immun., 28:489-498(1991);Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217(1994)。

[0083] 术语“对应的人种系序列”指这样的核酸序列,与由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的全部其它所评价的可变区氨基酸序列相比较,该核酸序列编码的人可变区氨基酸序列或亚序列与参考可变区氨基酸序列或亚序列共有最高的测定的氨基酸序列同一性。对应的人种系序列也可以指这样的人可变区氨基酸序列或亚序列,与全部其它所评价的可变区氨基酸序列比较,其与参考可变区氨基酸序列或亚序列共有最高的氨基酸序列同一性。对应的人种系序列可以是仅构架区、仅互补决定区、构架区和互补决定区、可变区段(如上定义)、或包含可变区的序列或亚序列的其它组合。可以使用这里所述的方法确定序列同一性,例如,使用BLAST、ALIGN或本领域公知的另一比对算法比对两条序列。对应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考的可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、92%、94%、96%、98%、99%的序列同一性。对应的人种系序列可以例如通过公共可获得的国际ImMunoGeneTics数据库(IMGt)(互联网址)和V-base(互联网址)来确定。

[0084] 短语“特异性(或选择性)结合”,当在描述抗原(例如,蛋白)与抗体或抗体衍生的结合物质之间相互作用的情况下,指在蛋白质和其它生物的异源群体中由抗原的存在决定的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合物质以至少两倍于背景结合于特定抗原,且基本不以显著的量结合样品中存在的其它抗原。在这样条件下特异性结合抗体或结合物质可能需要抗体或物质已针对特定蛋白质的特异性经过选择。可以通过除去与例如,来自其它物种(例如,小鼠)的PAR1分子或其它PAR亚型(例如,PAR2、PAR3、PAR4)交叉反应的抗体而实现选择。可以使用多种免疫测定形式来选择与特定蛋白质有特异性免疫反应的抗体。例如,可以常规的使用固相ELISA免疫测定

来选择与蛋白质有特异性免疫反应的抗体（见，例如，Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998)，描述可以用于测定特异免疫反应性的免疫形式和条件）。通常特异性或选择性的结合反应将产生高于背景至少两倍的信号，更通常的高于背景至少 10 至 100 倍的信号。

[0085] 术语“平衡解离常数 (K_D , M)”指解离速率常数 (k_d , 时间⁻¹) 除以结合速率常数 (k_a , 时间⁻¹, M⁻¹)。可以使用本领域任何公知的方法测量平衡解离常数。本发明的抗体通常具有少于约 10^{-8} M, 例如, 少于约 10^{-9} M 或 10^{-10} M, 在一些实施方案中少于约 10^{-11} M、 10^{-12} M 或 10^{-13} M 的平衡解离常数。

[0086] 如这里使用的, 术语“抗原结合区”指负责在分子和 PAR1 之间特异性结合的本发明的 PAR1- 结合分子的结构域。抗原结合区包括至少一个抗体重链可变区和至少一个抗体轻链可变区。在本发明的各个 PAR1- 结合分子中存在至少一个这类抗原结合区, 各个抗原结合区可以彼此相同或不同。在一些实施方案中, 本发明的 PAR1- 结合分子的至少一个抗原结合区作为 PAR1 的拮抗剂作用。

[0087] 如这里使用的, 术语“拮抗剂”指能够特异性结合和抑制通过受体的信号传导来完全阻断或可检测的抑制由受体介导的应答的物质。例如, PAR1 的拮抗剂特异性结合于受体并全部或部分抑制 PAR1- 介导的信号传导。在一些情况下, 可以通过其结合 PAR1 的能力、抑制继来自 PAR1 的细胞内信号传导之后的凝血酶诱导的钙流出或凝血酶诱导的 IL-8 产生（例如, 在 FlipR 测定中测量或通过 ELISA 测量）来鉴定 PAR1 拮抗剂。另外的测定由 Kawabata 等人, *J Pharmacol Exp Ther.* (1999) 288(1) :358-70 描述。当与来自未暴露于拮抗剂的对照 PAR1 的细胞内信号传导相比, 来自暴露于本发明拮抗剂的 PAR1 细胞内信号传导（例如通过钙流量或 IL-8 产生来测量）至少减少约 10%, 例如, 至少减少约 25%、50%、75%, 或完全被抑制时, 抑制发生。对照 PAR1 可以暴露于非抗体或抗原结合分子、特异性结合另一抗原的抗体或抗原结合分子、或已知不作为拮抗剂起作用的抗-PAR1 抗体或抗原结合分子。“抗体拮抗剂”指其中该拮抗剂是抑制性抗体的情况。

[0088] 术语“蛋白酶激活的受体-1”、“蛋白水解酶激活的受体-1”或“PAR1”可交换的指由凝血酶切割激活藉此暴露 N-末端系锁配体的 G 蛋白偶联受体。PAR1 也称为“凝血酶受体”和“凝血因子 II 受体前体”。见, 例如, Vu 等人, *Cell* (1991) 64(6) :1057-68; Coughlin 等人, *J Clin Invest* (1992) 89(2) :351-55; 和基因文库 (GenBank) 登录号 NM_001992。系锁配体与 PAR1 的细胞外结构域分子内结合引起细胞内信号传导和钙流出。见, 例如, Traynelis 和 Trejo, *Curr Opin Hematol* (2007) 14(3) :230-5; 和 Hollenberg 等人, *Can J Physiol Pharmacol.* (1997) 75(7) :832-41。PAR1 的核苷酸和氨基酸序列是本领域公知的。见, 例如, Vu 等人, *Cell* (1991) 64(6) :1057-68; Coughlin 等人, *J Clin Invest* (1992) 89(2) :351-55; 和基因库登录号 NM_001992。人 PAR1 核酸序列被公布为基因文库登录号 NM_001992 (又见, M62424.1 和 gi4503636)。人 PAR1 的氨基酸序列被公布为 NP_001983 和 AAA36743。如这里使用的, PAR1 多肽是功能上的 G 蛋白偶联受体, 由凝血酶激活, 结合 N-末端系锁配体时引起细胞内信号传导和钙流出。结构上, PAR1 氨基酸序列与基因文库登录号 NP_001983、AAA36743 或 M62424.1 的氨基酸共有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。结构上, PAR1 核酸序列与基因文库登录号 NM_001992 或 M62424.1 的氨基酸共有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0089] 术语“核酸”或“多核苷酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)和其聚合物。除非特别限制,术语涵盖含有已知天然核苷酸类似物的核酸,所述天然核苷酸与参考核酸具有相似的结合特性并与天然存在的核苷酸以相似方式代谢。除非另外指出,特定的核酸序列无疑也涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源体(ortholog)、SNP、和互补序列以及明确指出的序列。具体的,可以通过产生其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三个位置被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基替代的序列获得简并密码子取代(Batzer等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985);和 Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。

[0090] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在这里可以交换的使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语应用于其中一个或多个氨基酸残基是对应天然存在氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0091] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸相似方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和正-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构的化合物,即,结合于氢的 α -碳、羧基、氨基和R基团,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基磺(methionine methyl sulfonium)。这些类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但是保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的普通化学结构不同的结构,但是与天然存在的氨基酸以相似方式起作用的化学的化合物。

[0092] “保守修饰的变体”同时应用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体指其核酸编码与基本相同的序列相同或基本相同的氨基酸序列或其中该核酸不编码氨基酸序列的那些。因为遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何特定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU全部编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子指定为丙氨酸的每个位置,该密码子可以被改变为任意的所述对应密码子而不改变编码的多肽。这类核酸变体是“沉默变体”,其为保守修饰的变体的一种。这里编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的各个可能的沉默变体。技术人员应该认识到在核酸中的各个密码子(除了AUG,其一般为甲硫氨酸的唯一密码子,和TGG,其一般为色氨酸的唯一密码子)可以被修饰产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的各个沉默变体是在各个所述序列中暗含的。

[0093] 至于氨基酸序列,技术人员应该意识到对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单个的替代、缺失或加入(其在编码序列中改变、加入或缺失单个的氨基酸或小百分比的氨基酸)是“保守修饰的变体”,其中该改变的结果是用化学相似的氨基酸替代氨基酸。提供功能相似氨基酸的保守替代是本技术领域众所周知的。这样的保守修饰的变体还加上且不排除本发明的多态变异体、种间同系物和等位基因。

[0094] 下列八组各自含有彼此为保守替代的氨基酸:

[0095] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0096] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0097] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

- [0098] 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K) ;
- [0099] 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V) ;
- [0100] 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W) ;
- [0101] 7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) ;和
- [0102] 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M) (见,例如,Creighton, Proteins(1984)).

[0103] “序列同一性的百分数”是通过在比较窗口比较两个最佳比对的序列确定,其中为进行两条序列的最佳比对,在比较窗口中多核苷酸序列的部分可以与不包含添加或缺失的参考序列(例如,本发明的多肽)相比包含添加或缺失(即,空位(gap))。通过测定在两个序列中都存在的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数得到匹配的位置数,用匹配位置数除以在比较窗口中的总位置数,将结果乘以 100 产生序列同一性的百分数来计算百分数。

[0104] 在两个或更多核酸或多肽序列的背景下,术语“同一”或百分比“同一性”指其为相同序列的两个或更多序列或亚序列。当在比较窗或指定区使用下列序列比对算法之一或通过人工比对和目测进行比较和比对最大对应时,如果两个序列具有特定百分数的氨基酸残基或核苷酸相同(即,在特定区域,或当未指明时,在参考序列的整个序列上有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性),则两个序列是“基本相同的”。本发明提供多肽或多核苷酸,其分别与这里举例的多肽或多核苷酸(例如,在 SEQ ID NO :2-23 任一中举例的 CDR) 基本相同。任选的,在参考序列的长度至少约 15、25 或 50 个核苷酸的区域,或更优选在长度为 100-500 或 1000 或更多的区域,或在全长存在该同一性。关于氨基酸序列,可以在参考序列的长度为至少 5、10、15 或 20 个氨基酸,任选长度为至少约 25、30、35、40、50、75 或 100 个氨基酸,任选在长度为至少约 150、200 或 250 个氨基酸,或在全长的区域存在同一性或基本同一性。对于更短的氨基酸序列,例如,有 20 个或更少的氨基酸的氨基酸序列,根据这里定义的保守替换,当一个或两个氨基酸残基是保守替代时,则存在基本同一性。

[0105] 对于序列比较,通常一个序列作为参考序列,测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,测试和参考序列被输入计算机,如果需要,指定亚序列坐标,并选定序列算法程序参数。可以使用缺省程序参数,或可以指定备选的参数。然后基于程序参数,序列比较算法计算测试序列相对于参考序列的百分数序列同一性。

[0106] 如这里使用的,“比较窗”包括参考任一数目的连续位置的区段,所述连续位置的数目选自 20 至 600,通常约 50 至约 200,更通常约 100 至约 150 个(其中在两个序列被最佳比对之后序列可以与相同数目连续位置的参考序列比较)。比对序列用于比较的方法是本领域众所周知的。可以进行序列的最佳比对来比较,例如,通过 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法(1970)Adv. Appl. Math. 2 :482c,通过 Needleman 和 Wunsch 的同源性比对算法(1970)J. Mol. Biol. 48 :443,通过 Pearson 和 Lipman 的搜索相似性的方法(1988)Proc. Nat’ l. Acad. Sci. USA 85 :2444,通过这些算法(GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA,在 Wisconsin Genetics 软件包,Genetics Computer Group,575 Science Dr., Madison, WI)的计算机化实现,或通过人工比对和目测(见,例如, Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology(1995 supplement))。

[0107] 适合确定百分数序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,其被分别描述在 Altschul 等人(1977)Nuc. Acids Res. 25 :3389-3402 和

Altschul 等人 (1990) *J. Mol. Biol.* 215 :403-410。执行 BLAST 分析的软件是通过生物技术信息国家中心 (National Center for Biotechnology Information) 可公开获得的。这一算法涉及首先通过在查询序列中鉴定短字节的长度 W 鉴定高评分序列对 (HSP), 所述短字节的长度 W 当与数据库序列中相同长度字节比对时, 其匹配或满足一些正评价的阈值评分 T 。 T 被称为邻字节评分阈值 (Altschul 等人, 同上)。这些最初邻字节被作为寻找含有其的更长 HSP 的最初搜索击中的种子。只要可以增加累计的比对评分, 该字节击中沿着各个序列的两个方向延伸。对于核苷酸序列, 使用参数 M (对于一对匹配残基的奖励评分; 总是 > 0) 和 N (对于错配残基的处罚评分; 总是 < 0) 来计算累计评分。对于氨基酸序列, 使用评分矩阵来计算累计评分。当: 累计比对评分从其最大获得值减少数量 X ; 由于一个或多个负评分残基比对的累积, 该累计评分到达零或更低; 或到达序列的任意端时, 在各个方向的字节击中的延伸被停止。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定比对的敏感度和速度。BLASTN 程序 (用于核苷酸序列) 默认使用字长 (W) 为 11, 期望 (E) 为 10, $M = 5$, $N = -4$ 和两条链均进行比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序默认使用字长为 3, 期望 (E) 为 10, BLOSUM62 评分矩阵 (见 Henikoff 和 Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :10915) 比对 (B) 为 50, 期望 (E) 为 10, $M = 5$, $N = -4$, 比较两条链。

[0108] BLAST 算法也在两个序列之间执行相似性的统计分析 (见, 例如, Karlin 和 Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :5873-5877)。由 BLAST 算法提供的相似性的一个量度是最小总概率 ($P(N)$), 其通过在两个核苷酸或氨基酸序列之间可能偶然发生的匹配提供概率的指示。例如, 如果测试核酸与参考核酸的比较中最小总概率小于约 0.2, 更优选小于约 0.01, 最优选小于约 0.001, 核酸被认为相似于参考序列。

[0109] 两条核酸序列或多肽基本相同的指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体有免疫交叉反应, 如下所述。因此, 例如, 当两个肽仅保守取代不同时, 多肽与第二多肽通常是基本相同的。两条核酸序列基本相同的另一指示是, 如下所述, 在严格条件下两个分子或其互补链彼此杂交。而两条核酸序列基本相同的另一指示是可以使用相同的引物扩增该序列。

[0110] 当被使用在描述抗原结合区如何被连接在本发明的 PAR1- 结合分子内时, 术语“连接”涵盖物理结合该区域的全部可能的方式。多数抗原结合区通常由化学键, 例如共价键 (例如, 肽键或二硫键) 或非共价键连接, 其可以是直接的结合 (即, 在两个抗原结合区之间没有接头) 或间接的结合 (即, 在两个或多个抗原结合区之间具有至少一个接头分子的辅助)。

[0111] 术语“治疗可接受的量”指足以作用产生期望结果的量 (即, 靶标细胞的凋亡)。优选的, 治疗可接受的量不产生不期望的副作用。可以通过先施用低剂量, 然后渐增地增加剂量直至获得期望效果来确定治疗可接受的量。

[0112] 附图简述

[0113] 图 1 说明包含抗体 V- 区的结构单元的示意图。重链是由三个基因家族 (重-V、D 和 J) 编码, 轻链是由两个基因家族 (κ 或 λ 的 V 和 J) 编码。这些基因的重组产生完整的 V 区。CDR3 序列在重链情况下位于重 V、D 和 J 基因的重组位点, 在轻链情况下在 κ 或 λ 的 V 和 J 基因的重组位点。

[0114] 图 2 说明用人氨基酸序列替代参考抗体氨基酸序列的示意图。

[0115] 图 3 说明与对应的人种系可变区（例如，Vh1-46 (SEQ ID NO :42 和 32) ;VKII A3 (SEQ ID NO :56)) 比较，本发明的改良的可变区氨基酸序列（重链 V- 区，SEQ ID NO :52、53 和 54 ;轻链 V- 区，SEQ ID NO :57、58 和 59) 的比对。互补决定区 (CDR) 是有下划线的。粗体碱基表示与人种系的差异和斜体残基表示在 CDR3 中的改变。

[0116] 图 4 说明在 ELISA 测定中本发明的改良的抗体的高度结合特异性。改良的抗 -PAR1 抗体结合于 PAR1，但是不结合于密切相关的蛋白质人 PAR2 或小鼠 PAR1 或小鼠 PAR2。指示的抗体克隆被以 1 μ g/ml 的浓度加入。

[0117] 图 5 说明改良的抗体与短尾猴 (*Cynomolgus*) PAR1 具有反应活性。在短尾猴 (*Cyno*) 和人抗体结合表位的序列是相同的 (SFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGLTE ;SEQ ID NO :1)。

[0118] 图 6A-C 说明改良的抗 -PAR1 抗体以剂量依赖的方式抑制凝血酶介导的 PAR1 的激活。

[0119] 图 7 说明对本发明的三个改良拮抗剂 PAR1 抗体的比较。

[0120] 发明详述

[0121] 总述

[0122] 本发明的抗体特异性结合蛋白酶激活的受体 -1 (PAR1)。在这样做时，抗体可以阻断天然配体（例如，凝血酶）的结合，作为拮抗剂作用或作为激动剂作用。在一些实施方案中，本发明的抗 -PAR1 抗体作为 PAR1 受体的拮抗剂作用。PAR1 抗体拮抗剂是特异性结合 PAR1、并抑制或减少 PAR1- 介导的细胞内信号传导的抗体。抗 -PAR1 抗体任选的可以是多聚化的，根据本发明的方法使用。抗 -PAR1 抗体可以是全长的四聚体抗体（即，具有两个轻链和两个重链）、单链抗体（例如，ScFv）、或包含形成一个或多个抗原结合位点和赋予 PAR1 结合特异性的抗体片段（例如包含重链和轻链可变区（例如，Fab' 或其它相似片段））的分子。

[0123] 可以通过本领域公知的任何方式产生抗 -PAR1 抗体片段，包括但不限于，抗体四聚体的重组表达、化学合成和酶消化，而可以通过，例如，杂交瘤或重组生产获得全长的单克隆抗体。重组表达可以是来自本领域公知的任何合适的宿主细胞，例如，哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。当存在时，抗 -PAR1 抗体的恒定区可以是适当的任意类型或亚型，可以是选择来自通过当前方法处理的受试物种（例如，人、非人灵长类或其它哺乳动物，例如，农业哺乳动物（例如，马、绵羊、牛、猪、骆驼 (camelid)）、家养哺乳动物（例如，犬、猫）或啮齿类（例如，大鼠、小鼠、仓鼠、兔子）。

[0124] 本发明的抗 -PAR1 抗体或抗原结合分子也包括具有骆驼支架的单结构域抗原结合单元。骆驼家族动物包括骆驼、骆马 (llama) 和羊驼。骆驼产生缺乏轻链的功能抗体。重链可变 (VH) 结构域自主折叠，作为抗原结合单元独立的作用。与经典抗原结合分子 (Fab) 或单链可变片段 (scFv) 中的六个 CDR 相比，其结合表面包括仅三个 CDR。骆驼抗体能够获得与那些传统抗体可相比的结合亲和力。可以使用本领域众所周知的方法，例如，Dumoulin 等人，*Nature Struct. Biol.* 11 :500-515, 2002 ;Ghahroudi 等人，*FEBS Letters* 414 :521-526, 1997 ;和 Bond 等人，*J Mol Biol.* 332 :643-55, 2003, 产生具有这里举例的小鼠抗 -PAR1 抗体的结合专一性的基于骆驼支架的抗 -PAR1 分子。

[0125] a. 抗 -PAR1 抗体可变区

[0126] 本发明的抗 -PAR1 抗体的可变区衍生自已知以高亲和力结合 PAR1 的参考单克隆

抗体,并作为拮抗剂作用。通过减少对应于非人物种(例如,小鼠)的氨基酸序列区段和增加对应于人种系氨基酸序列的氨基酸序列区段来改良或优化抗体。以这一方式,能够在人宿主中诱导针对抗- α -PAR1 抗体的免疫应答的可能序列被减少、最小化或消除。已经描述了基因工程设计人抗体的方法。见,例如,美国专利公开号 2005/0255552 和美国专利公开号 2006/0134098,其二者的公开在此以其整体作为参考被并入用于全部目的。

[0127] 本发明的改良的抗- α -PAR1 抗体是基因工程设计的人抗体,其具有的 V- 区序列与人种系 V- 区序列有基本的氨基酸序列同一性,而保留了参考抗体的特异性和亲和力。见,美国专利公开号 2005/0255552 和美国专利公开号 2006/0134098。该改良操作鉴定了为确定来自参考抗体可变区的抗原结合特异性所需的最小序列信息,并转移该信息至人部分 V- 区基因序列的文库以产生人抗体 V- 区的表位集中的文库。可以使用基于微生物的分泌系统表达文库成员如抗体 Fab' 片段,并例如使用菌落转移结合测定法(colony-lift binding assay) 筛选文库的抗原结合 Fab'。见,例如,美国专利公开号 2007/0020685。阳性克隆可以进一步表征以鉴定具有最高亲和力的那些。产生的基因工程设计的人 Fab' 保留了亲本(参考抗- α -PAR1 抗体)的结合特异性,通常具有与亲本抗体相比相当的或更高的对抗原的亲和力,并具有与人种系抗体 V- 区相比具有高度序列同一性的 V- 区。

[0128] 为产生表位集中的文库所需的最小结合特异性决定簇(BSD) 通常是由重链 CDR3 中的序列(“CDRH3”)和轻链 CDR3 中的序列(“CDRL3”)呈现。BSD 可以包含 CDR3 的部分或全长。BSD 可以由连续的或非连续的氨基酸残基组成。在一些情况下,从人 V- 区段序列构建表位集中的文库,所述人 V- 区段序列连接于来自含有 BSD 和人种系 J- 区段序列的参考抗体的独特 CDR3-FR4 区(见,图 1 和美国专利公开号 2005/0255552)。或者,可以通过相继的表达盒替代产生人 V- 区段文库,其中仅部分的参考抗体 V- 区段一开始被人序列文库替代。在残留的参考抗体氨基酸序列的情况下支持结合的鉴定的人“表达盒”接着在第二次文库筛选中被重组以产生全人 V- 区段(见,美国专利公开号 2006/0134098)。

[0129] 在各个情况下,使用含有来自参考抗体特异性决定簇的成对重链和轻链 CDR3 区段、CDR3-FR4 区段或 J- 区段来限制结合特异性,从而从文库获得的抗原结合子保留了参考抗体的表位特异性。在文库构建期间在各个链的 CDR3 区中可以引入额外的成熟改变以鉴定具有最佳结合动力学的抗体。产生的基因工程设计的人抗体具有衍生自人种系文库的 V- 区段序列,保留了来自 CDR3 区内的短 BSD 序列并具有人种系骨架 4(FR4) 区。

[0130] 因此,在一些实施方案中,抗- α -PAR1 抗体含有衍生自原始单克隆抗体的重链和轻链的 CDR3 之中的最小结合序列决定簇(BSD)。重链和轻链可变区的保留序列(CDR 和 FR),例如, V- 区段和 J- 区段,是来自对应的人种系氨基酸序列。V- 区段可以选自人 V- 区段文库。可以通过亲和力成熟实现进一步的序列改进。

[0131] 在另一实施方案中,抗- α -PAR1 抗体的重链和轻链含有来自对应的人种系序列的人 V- 区段(FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3),例如,选自人 V- 区段文库,和来自原始单克隆抗体的 CDR3-FR4 序列区段。可以通过用相应的人种系序列替代序列区段和/或通过亲和力成熟进一步改进 CDR3-FR4 序列区段。例如,在 BSD 周围的 FR4 和/或 CDR3 序列可以用对应人种系序列替代,而来自原始单克隆抗体 CDR3 的 BSD 被保留。

[0132] 在一些实施方案中,重链 V- 区段的对应人种系序列是 Vh1-46。在一些实施方案中,重链 J- 区段的人种系序列是 JH6。在一些实施方案中,重链 J- 区段包含人种

系 JH6 部分序列 DVWQGTTVTVSS (SEQ ID NO :66)。来自人种系 JH6 的全长 J- 区段是 YYYYYGMDVWQGTTVTVSS。可变区基因参考免疫球蛋白可变区基因标准命名法提及。当前免疫球蛋白基因信息可以通过互联网获得,例如,在 ImMunoGeneTics (IMGT)、V-base 和 PubMed 数据库,又见, Lefranc, Exp Clin Immunogenet. 2001 ;18 (2) :100-16 ;Lefranc, Exp Clin Immunogenet. 2001 ;18 (3) :161-74 ;Exp Clin Immunogenet. 2001 ;18 (4) :242-54 ;和 Giudicelli 等人, Nucleic Acids Res. 2005 Jan1 ;33 (Database issue) :D256-61。

[0133] 在一些实施方案中,轻链 V- 区段的对应人种系序列是 VKII A3。在一些实施方案中,轻链 J- 区段的对应人种系序列是 Jk2。在一些实施方案中,轻链 J- 区段包含人种系 Jk2 部分序列 TFGQGTKLEIK。来自人种系 Jk2 的全长 J- 区段是 YTFGQGTKLEIK。

[0134] 在一些实施方案中,重链 V- 区段与氨基酸序列 (Q/E) VQLVQSGAEVKKPG (A/S) SVKVSCK (A/V) SG (Y/G) TF (N/S) (N/S) Y (Y/V) (M/F) (N/H) WVRQAPGQGLEWMG (V/I) I (N/D) P (S/H) GG (R/S) T (R/S) Y (A/N) QKFKGRVTMT (T/R) DTSTST (V/A) YMELSSL (R/T) S (D/E) DTAVYYCAR (SEQ ID NO :41) 共有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。在一些实施方案中,轻链 V- 区段与氨基酸序列 DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQ SLLH (R/S) NG (Y/N) NYL (D/E) WYLQKPGQSPQLLIY (K/L) (G/I) SNR (A/F) SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO :46) 共有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。

[0135] 在一些实施方案中,重链 V- 区段与选自以下的氨基酸序列共有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性 :QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNSY YMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO :42)、QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNSY YMNWVRQAPGQGLEWMGVIDPHGGRTRYNQKFKGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO :43)、QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNSY YMNWVRQAPGQGLEWMGVIDPHGGRTRYNQKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO :44) 和 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSGGTFNSY YFNWVRQAPGQGLEWMGV INPHSGRTRYNQKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO :45)。

[0136] 在一些实施方案中,轻链 V- 区段与选自以下的氨基酸序列共有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性 :DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQ SLLH S NGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASGV PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO :47)、DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQ SLLH R N G N N Y L E W Y L Q K P G Q S P R L L I Y K I S N R F S G V P D R F S G S G A G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C (SEQ ID NO :48)、DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQ SLLH R N G N N Y L E W Y L Q K P G Q S P R L L I Y K I S N R F S G V P D R F S G S G A G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C (SEQ ID NO :49) 和 DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQ SLLH R N G N N Y L E W Y L Q K P G Q S P R L L I Y K I S N R F S G V P D R F S G S G A G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C (SEQ ID NO :50)。

[0137] 在一些实施方案中 :

[0138] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列基序 $DDX_1X_2SX_3WX_4FDV$, 其中 X_1 是 G 或 I, X_2 是 P 或 Y, X_3 是 H、L、P、M、E、W、T、S、Q 或 A, X_4 是 Y 或 F (SEQ ID NO :10),

[0139] ii) 轻链 CDR3 包含氨基酸序列基序 $FQGX_5X_6VPFT$, 其中 X_5 是 S、D、A 或 V, X_6 是 H、R、T、S 或 K (SEQ ID NO :20)。

[0140] 在一些实施方案中 :

[0141] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 DDGPSMWYFDV (SEQ ID NO : 11)、DDGPSLWYFDV (SEQ ID NO :12) 和 DDGPSHWYFDV (SEQ IDNO :13);和

[0142] ii) 轻链 CDR3 包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 MQALQTP (SEQ ID NO :21)、FQGSSVPFT (SEQ ID NO :22) 和 FQGSHVPFT (SEQ ID NO :23)。

[0143] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含的重链可变区包含含有氨基酸序列 S/N) Y(Y/V) (M/F) (N/H) (SEQ ID NO :2) 的 CDR1 ;含有氨基酸序列 (I/V) I(N/D)P(S/H) (S/G)G(R/S)T(R/S)Y(A/N)QKF(K/Q)G (SEQ ID NO :6) 的 CDR2 ;和含有氨基酸序列 DDX₁X₂SX₃WX₄FDV 的 CDR3,其中 X₁ 是 G 或 I, X₂ 是 P 或 Y, X₃ 是 H、L、P、M、E、W、T、S、Q 或 A, X₄ 是 Y 或 F (SEQ ID NO :10)。

[0144] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含的轻链可变区包含含有氨基酸序列 RSSQSLH(R/S)NG(Y/N)NYL(D/E) (SEQ ID NO :14) 的 CDR1 ;含有氨基酸序列 (L/K) (G/I) SNR(A/F)S (SEQ ID NO :17) 的 CDR2 ;和含有氨基酸序列 FQGX₅X₆VPFT 的 CDR3,其中 X₅ 是 S、D、A 或 V, X₆ 是 H、R、T、S 或 K (SEQ ID NO :20)。

[0145] 在一些实施方案中,重链可变区包含含有氨基酸序列 (E/Q)VQLVQSGAEVKKPG(S/A)SVKVSCK(V/A)SG(G/Y)TF(S/N) (SEQ ID NO :24) 的 FR1 ;含有氨基酸序列 WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO :27) 的 FR2 ;含有氨基酸序列 RVTMT(R/T)DTSTST(V/A)YMEL(S/R)SL(R/T)S(E/D)DTAVYYCAR (SEQ ID NO :28) 的 FR3 ;和含有氨基酸序列 WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO :32) 的 FR4。鉴定的氨基酸序列可以具有一个或多个取代的氨基酸 (例如,来自亲和力成熟) 或一个或两个保守取代的氨基酸。

[0146] 在一些实施方案中,轻链可变区包含含有氨基酸序列 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAIS (SEQ ID NO :33) 的 FR1 ;含有氨基酸序列 WYLQKPGQSP(Q/R)LLIY (SEQ ID NO :34) 的 FR2 ;含有氨基酸序列 GVPDRFSGSG(S/A)GDTFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO :37) 的 FR3 ;和含有氨基酸序列 FGQGTKLEIK (SEQ ID NO :40) 的 FR4。鉴定的氨基酸序列可以具有一个或多个取代的氨基酸 (例如,来自亲和力成熟) 或一个或两个保守取代的氨基酸。

[0147] 在全长范围,本发明的抗 -PAR1 抗体的可变区通常具有总的可变区 (例如,FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) 与对应人种系可变区氨基酸序列共有至少约 90%,例如,至少约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性。例如,抗 -PAR1 抗体的重链与人种系可变区 Vh1-46/JH6 共有至少约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性。抗 -PAR1 抗体的轻链与人种系可变区 VKIIA3/Jk2 共有至少约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性。

[0148] 在一些实施方案中,本发明的抗 -PAR1 抗体包含具有与 SEQ ID NO :51 的重链可变区至少有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含具有与 SEQ ID NO :55 的轻链可变区至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0149] 在一些实施方案中,本发明的抗 -PAR1 抗体包含重链可变区,其与选自 SEQ ID NOS :52、53 和 54 的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性,并包含轻链可变区,其与选自 SEQ ID NOS :56、57、58

和 59 的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性。

[0150] 在一些实施方案中,本发明的抗 -PAR1 抗体包含与 SEQ ID NO :52 的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的重链可变区,并包含与 SEQ ID NO :57 (即,克隆 LDW653) 的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0151] 在一些实施方案中,本发明的抗 -PAR1 抗体包含与 SEQ ID NO :53 的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO :58 (即,克隆 LDS 900) 的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0152] 在一些实施方案中,本发明的抗 -PAR1 抗体包含与 SEQ ID NO :54 的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO :59 (即,克隆 LDS 896) 的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0153] 为了长度小于 20 个氨基酸的鉴定的氨基酸序列,可以容忍一个或两个保守氨基酸残基取代,而仍然保留期望的特异性结合和 / 或拮抗剂活性。

[0154] 本发明的抗 -PAR1 抗体通常以小于约 10^{-8} M 或 10^{-9} M,例如,小于约 10^{-10} M 或 10^{-11} M,在一些实施方案中小于约 10^{-12} M 或 10^{-13} M 的平衡解离常数 (K_D) 结合 PAR1。

[0155] b. PAR1 抗体拮抗剂和筛选方法

[0156] 可以根据本发明的方法使用任何类型的抗 -PAR1 抗体拮抗剂。通常,使用的抗体是单克隆抗体,其可以通过本领域公知的任一方法 (例如,杂交瘤和重组表达) 产生。在一些实施方案中,使用包含重链和轻链可变区的抗体片段而不是全长抗体来构建本发明的 PAR1- 结合分子。

[0157] 在一些实施方案中,PAR1- 结合分子的抗原结合区是单链抗体 (ScFv)。产生 ScFv 和抗体的有用的技术是本领域公知的,描述在例如,美国专利号 4,946,778 和 5,258,498 ;Huston 等人,Methods in Enzymology 203 :46-88 (1991) ;Shu 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :7995-7999 (1993) ;和 Skerra 等人,Science 240 :1038-1040 (1988)。

[0158] 可以使用本领域众所周知的技术鉴定特异性结合于 PAR1 的抗 -PAR1 抗体,例如,ELISA、表面等离子共振、干涉量度法 (例如,使用 ForteBio Octet 生物传感器系统)。可以通过检测抗体抑制或减少 PAR1- 介导的事件的能力,例如,在表达 PAR1 的细胞中的钙流出、凝血酶诱导的 IL-8 分泌的抑制等,来鉴定 PAR1 抗体拮抗剂。可以使用多种本领域公知的测定检测对 PAR1 介导的事件的存在和抑制的诱导。

[0159] 可以使用 PAR1- 依赖的钙流出测定筛选功能性 PAR1 拮抗剂抗体。已知凝血酶切割 PAR1 的 N- 末端结构域,除去约 15 个氨基酸。保留的 N- 末端结构域称为系锁配体,负责起始 PAR1 介导的信号传导。由凝血酶对 PAR-1 的这一切割产生细胞中快速和瞬时的钙流出,其可以使用可商购的试剂 (例如,可从 Molecular Devices 商购) 测量。具体的,可以

使用表达 PAR1 的细胞,例如,HT-29、HCT-116 或 DU145 细胞,评估抗体在凝血酶处理之后抑制钙流出的能力。可以使用本领域公知的任何方法测定钙流出。在一个实例中,在 FlipR 染料 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 中的细胞用抗体预孵育(例如,约 1 小时),用不同浓度的凝血酶诱导 Ca^{2+} 流出。在检测 PAR1 拮抗剂活性之前可以使用本领域公知的任何方法纯化抗体。对照细胞未用抗体预孵育,或用对 PAR1 之外的抗原特异的抗体预孵育,或用已知不作为拮抗剂作用的抗 -PAR1 抗体预孵育。与在对照细胞中凝血酶 - 诱导的钙流出相比,在用本发明的 PAR1 拮抗剂抗体预孵育的细胞中,凝血酶 - 诱导的钙流出可检测的被抑制或减少。例如,与对照细胞相比,暴露于 PAR1 拮抗剂抗体的细胞中,凝血酶 - 诱导的钙流出减少至少约 10%,例如,至少 30%、50%或 80%,或完全被抑制。

[0160] 也可以通过测量候选抗 -PAR1 拮抗剂抗体对来自合适靶标细胞(例如,HUVEC)的凝血酶介导的 IL-8 分泌的抑制来测定抗体的 PAR1 拮抗剂活性。可以使用本领域任何公知的方法测量来自靶标细胞的凝血酶 - 介导的 IL-8 分泌。在一个实例中,细胞被暴露于凝血酶过夜,产生分泌进入培养基的 IL-8 的升高。在检测样品中,在先于凝血酶处理之前约 1 小时加入抗体。可以通过 ELISA 测量培养基中的 IL-8。与对照细胞相比,抗 -PAR1 拮抗剂抗体抑制用凝血酶处理的靶标细胞的 IL-8 分泌的增加。对照细胞未用抗体预孵育,或用对 PAR1 之外的抗原特异的抗体预孵育,或用已知不作为拮抗剂作用的抗 -PAR1 抗体预孵育。与来自对照细胞的凝血酶诱导的 IL-8 分泌相比,在用本发明的 PAR1 拮抗剂抗体预孵育的细胞中,凝血酶 - 诱导的 IL-8 分泌可检测的被抑制或降低。例如,与对照细胞相比,在暴露于 PAR1 拮抗剂抗体的细胞中,凝血酶 - 诱导的 IL-8 分泌被减少至少约 10%,例如,至少 30%、50%或 80%,或完全被抑制。

[0161] c. 产生抗 -PAR1 抗体的多核苷酸、载体和宿主细胞

[0162] 本发明提供多核苷酸(DNA 或 RNA),其编码的多肽包含以上所述抗 -PAR1 抗体链或抗原结合分子的区段或结构域。在一些实施方案中,多核苷酸是基本纯化或分离的。本发明的一些多核苷酸包含编码重链可变区的多核苷酸序列,其选自 SEQ ID NO:51、52、53 和 54,和编码轻链可变区的多核苷酸序列,其选自 SEQ ID NO:55、56、57、58 和 59。本发明的一些多核苷酸包含重链可变区的核苷酸序列,其由选自 SEQ ID NO:60、61 和 62 的多核苷酸序列编码,和轻链可变区的核苷酸序列,其由选自 SEQ ID NO:63、64 和 65 的多核苷酸序列编码。本发明的一些其它的多核苷酸包含的核苷酸序列,其与在 SEQ ID NO:60-65 所述核苷酸序列之一是基本相同的(例如,至少 70%、80%、95%、96%、97%、98%或 99%)。当从合适的表达载体表达时,由这些多核苷酸编码的多肽能够显示抗原结合能力。

[0163] 在本发明中还提供多核苷酸,其编码在以下实施例所述小鼠抗 -PAR1 抗体的重链或轻链的至少一个 CDR 区和通常全部三个 CDR 区。一些其它的多核苷酸编码小鼠抗 -PAR1 抗体的重链和 / 或轻链的全部或基本全部可变区序列。例如,这些多核苷酸中的一些编码与在 SEQ ID NO:51、52、53 或 54 中所示重链可变区具有至少约 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的氨基酸序列,和 / 或与在 SEQ ID NO:55、56、57、58 和 59 中所示轻链可变区具有至少约 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的氨基酸序列。因为密码子简并性,许多核酸序列编码各个免疫球蛋白氨基酸序列。

[0164] 本发明的多核苷酸能够仅编码抗 -PAR1 抗体的可变区序列。它们也可以编码抗体的可变区和恒定区。一些本发明核酸的多核苷酸序列编码成熟的重链可变区序列,其与在

SEQ ID NO :5 或 7 所示成熟重链可变区序列是基本相同的(例如,至少 80%、90% 或 99%)。一些其它的多核苷酸序列编码成熟的轻链可变区,其与在 SEQ ID NO :6 或 8 所示成熟轻链可变区序列是基本相同的。一些多核苷酸序列编码多肽,该多肽包含示例小鼠抗 -PAR1 抗体之一的重链和轻链的可变区。一些其它的多核苷酸编码两个多肽区段,其分别与小鼠抗体之一的重链和轻链的可变区基本相同。

[0165] 可以通过从头固相 DNA 合成或通过编码抗 -PAR1 抗体或其结合片段的现存序列(例如,在以下实施例中所称序列)的 PCR 诱变产生多核苷酸序列。可以通过本领域公知的方法实现核酸的直接化学合成,例如 Narang 等人的磷酸三酯法, *Meth. Enzymol.* 68 :90, 1979 ;Brown 等人的磷酸二酯法, *Meth. Enzymol.* 68 :109, 1979 ;Beaucage 等人的二乙基磷酰胺法, *Tetra. Lett.* , 22 :1859, 1981 ;和美国专利号 4, 458, 066 的固相支持法。通过 PCR 向多核苷酸序列引入突变可以按照在例如, *PCR Technology :Principles and Applications for DNA Amplification*, H. A. Erlich (编), Freeman Press, NY, NY, 1992 ;*PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*, Innis 等人(编), Academic Press, San Diego, CA, 1990 ;Mattila 等人, *Nucleic Acids Res.* 19 :967, 1991 ;和 Eckert 等人, *PCR Methods and Applications* 1 :17, 1991 中所述执行。

[0166] 本发明还提供产生上述抗 -PAR1 抗体的表达载体和宿主细胞。可以使用多种表达载体表达编码抗 -PAR1 抗体链或结合片段的多核苷酸。可以使用基于病毒的和非病毒的表达载体在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括质粒、附加型载体(通常具有表达蛋白质或 RNA 的表达盒),和人工人类染色体(见,例如, Harrington 等人, *Nat Genet* 15 :345, 1997)。例如,对于在哺乳动物(例如,人)细胞中表达抗 -PAR1 多核苷酸和多肽有用的非病毒载体包括 pThioHis A、B 和 C、pcDNA3. 1/His、pEBVHis A、B 和 C(Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV 载体和本领域公知的表达其它蛋白质的多种其它的载体。有用的病毒载体包括基于反转录病毒的载体、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒,基于 SV40 的载体、乳头瘤病毒、HPV 非洲淋巴细胞瘤病毒、痘苗病毒载体和西门利克森林病毒(SFV)。见, Brent 等人, 如上 ;Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 :807, 1995 ;和 Rosenfeld 等人, *Cell* 68 :143, 1992。

[0167] 表达载体的选择依赖于载体待表达的预期宿主细胞。通常,表达载体含有能够被有效连接于编码抗 -PAR1 抗体链或片段的多核苷酸的启动子和其它调节序列(例如,增强子)。在一些实施方案中,使用诱导型启动子阻止在除诱导条件之外插入序列的表达。诱导型启动子包括,例如,阿拉伯糖、 β -半乳糖苷酶基因(lacZ)、金属硫蛋白启动子或热休克启动子。可以在非诱导条件下扩增转化生物体的培养物而不使种群偏向编码序列,编码序列的表达产物被宿主细胞更好地耐受。除了启动子,也可能需要或期望其它调节元件以有效表达抗 -PAR1 抗体链或片段。这些元件通常包括 ATG 起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其它序列。此外,可以通过包含对使用的细胞系统合适的增强子来提高表达效率(见,例如, Scharf 等人, *Results Probl. Cell Differ.* 20 :125, 1994 ;和 Bittner 等人, *Meth. Enzymol.* , 153 :516, 1987)。例如,可以使用 SV40 增强子或 CMV 增强子在哺乳动物宿主细胞中增加表达。

[0168] 表达载体也可能提供分泌信号序列位置以与由插入的抗 -PAR1 抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更多情况下,插入的抗 -PAR1 抗体序列在被包含在载体之前即连接于

信号序列。用来接受编码抗- α -PAR1 抗体轻链和重链可变域序列的载体有时也编码恒定区或其部分。这类载体使可变区能够与恒定区作为融合蛋白表达,藉此致使产生完整的抗体或其片段。通常,这类恒定区是人的。

[0169] 包含和表达抗- α -PAR1 抗体链的宿主细胞可以是原核或真核的。大肠杆菌是对于克隆和表达本发明的多核苷酸有用的一个原核宿主。适合使用的其它微生物宿主包括杆菌,例如枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*),和其它肠杆菌,例如,沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷菌属 (*Serratia*),和多种假单胞菌 (*Pseudomonas*) 物种。在这些原核宿主中,人们也可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞兼容的控制序列(例如,复制起始点)。此外,会存在任意数目的多种众所周知的启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常控制表达,任选通过操纵基因序列进行,并具有用于起始和完成转录和翻译的核糖体结合位点序列等。也可以使用其它微生物,例如,酵母,来表达本发明的抗- α -PAR1 多肽。也可以使用昆虫细胞与杆状病毒载体的组合。

[0170] 在一些优选的实施方案中,使用哺乳动物宿主细胞表达和产生本发明的抗- α -PAR1 多肽。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,在实施例中所述骨髓瘤杂交瘤克隆)或含有外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如,以下示例的 SP2/0 骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常必死的或正常或非正常永生的动物或人细胞。例如,已经发展了能够分泌完整免疫球蛋白的多种合适的宿主细胞系,包括 CHO 细胞系、多种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、转化的 B-细胞和杂交瘤。表达多肽的哺乳动物组织细胞培养物的使用被广泛讨论在,例如, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N. Y., N. Y., 1987。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如,复制起始点、启动子和增强子(见,例如, Queen 等人, *Immunol. Rev.* 89 :49-68, 1986),和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA 剪切位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可能是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的、和/或可调节或可调控的。有用的启动子包括,但不限于,金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导的 MMTV 启动子、SV40 启动子、MRP polIII 启动子、组成型 MPSV 启动子、四环素诱导的 CMV 启动子(例如,人即刻早期 CMV 启动子)、组成型 CMV 启动子、和本领域公知的启动子-增强子组合。

[0171] 引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法依赖于细胞宿主类型而改变。例如,氯化钙转染是通常用于原核细胞的方法,而磷酸钙处理或电穿孔可以被用于其它细胞宿主(通常见 Sambrook 等人, *supra*)。其它方法包括,例如,电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、生物弹法、病毒体、免疫脂质体、多聚阳离子、核酸缀合物、裸 DNA、人工病毒粒子、融合于疱疹病毒结构蛋白 VP22 (Elliot 和 O' Hare, *Cell* 88 :223, 1997)、试剂增强的 DNA 摄取和离体转导。为了长期、高产率的生产重组蛋白,通常希望稳定的表达。例如,可以使用本发明的表达载体制备稳定表达抗- α -PAR1 抗体链或结合片段的细胞系,所述本发明的表达载体含有病毒复制起始点或内源表达元件和可选择的标记基因。在引入载体之后,可使细胞在转入选择培养基之前在富集培养基中生长 1-2 天。可选择标记的目的是赋予选择抗性,其存在使成功表达引入序列的细胞在选择培养基中能够生长。使用适合细胞类型的组织培养技术可以增殖有抗性的、稳定转染的细胞。

[0172] 抗-PAR1 抗体或抗原结合分子的特性

[0173] 一旦从宿主细胞中的表达载体或在杂交瘤中内源性合成或表达上述抗-PAR1 抗体或抗原结合分子,它们可以从,例如,培养基和宿主细胞容易的被纯化。通常,抗体链表达时具有信号序列,因此释放至培养基。然而,如果抗体链不是由宿主细胞天然的分泌,可以通过用温和去污剂处理来释放抗体链。然后可以通过常规方法纯化抗体链,包括硫酸铵沉淀、对固定靶标的亲和色谱法、柱色谱法、凝胶电泳等。这些方法均是本领域众所周知和常规操作的,例如 Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 1982 ;和 Harlow & Lane, 同上。

[0174] 例如,表达本发明的抗-PAR1 抗体的选择的杂交瘤可以在转瓶中生长用于单克隆抗体纯化。可以过滤上清液并用蛋白质 A-琼脂糖或蛋白质 G-琼脂糖柱通过亲和色谱法浓缩。可以通过凝胶电泳和高效液相色谱法检查从柱洗脱的 IgG 分子以保证纯度。缓冲液可以被交换为 PBS,可以通过 OD280 读数确定浓度。单克隆抗体可以等分试样和贮存在 -80°C 。

[0175] 无论其制备方法,本发明的抗-PAR1 抗体或抗原结合分子特异性结合于 PAR1 或其抗原片段。当抗体结合 PAR1 或其抗原片段的解离常数 $\leq 1 \mu\text{M}$, 优选 $\leq 100\text{nM}$, 和最优选 $\leq 1\text{nM}$ 时,存在特异性结合。可以通过直接标记目标抗体检测抗体结合于 PAR1 的能力,或者抗体可以是未标记的,使用多种夹心式测定法间接的检测结合。见,例如, Harlow & Lane, 如上。具有这类结合特异性的抗体更可能享有由在以下实施例中讨论的小鼠或嵌合抗-PAR1 抗体呈现的有利的特性。通常,本发明的抗-PAR1 抗体或抗原结合分子以至少 $1 \times 10^7\text{M}^{-1}$ 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 或 10^{10}M^{-1} 的平衡缔合常数 (K_A) 结合于 PAR1 多肽或抗原片段。此外,它们还具有约 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或更低的动力学解离常数 (k_d), 和以至少大于其结合非特异性抗原(例如, BSA) 亲和力两倍的亲和力结合人 PAR1 (hPAR1)。

[0176] 在一些实施方案中,本发明的抗体相对来自其它哺乳动物物种,例如,来自啮齿动物物种,包括小鼠、大鼠、兔和仓鼠的 PAR1, 优选的结合人 PAR1。在一些实施方案中,本发明的抗体相对于其它 PAR 亚型,例如, PAR2、PAR3 或 PAR4, 优选的结合于 PAR1。

[0177] 在一些实施方案中,本发明的抗-PAR1 抗体或抗原结合分子阻断或与参考抗-PAR1 抗体竞争结合 PAR1 多肽。参考抗-PAR1 抗体能够特异性结合具有包含 SFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGLTE (SEQ ID NO :1) 氨基酸序列或其片段(例如,至少 8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸的片段)的 PAR1 表位。这些可以上述的全人抗-PAR1 抗体。它们也可以是与参考抗体结合相同表位的其它小鼠、嵌合或人源化的抗-PAR1 抗体。阻断或与参考抗体竞争结合 PAR1 的能力表明所测试的抗-PAR1 抗体或抗原结合分子结合于由参考抗体定义的同或相似表位,或与参考抗-PAR1 抗体结合的表位足够接近的表位。这类抗体尤其可能具有鉴定的参考抗体的有利特性。阻断或与参考抗体竞争的能力可以通过,例如,竞争结合测定来确定。使用竞争结合测定,在测试中检查该抗体抑制参考抗体特异性结合共同抗原(例如, PAR1 多肽)或抗原上的表位的能力。如果过量的检测抗体基本抑制参考抗体的结合,则检测抗体与参考抗体竞争对抗原或表位的特异性结合。基本抑制意指检测抗体通常以 10%、25%、50%、75% 或 90% 减少参考抗体的特异性结合。

[0178] 有多种公知的竞争结合测定可以被用于评估检测抗-PAR1 抗体或抗原结合分子与参考抗-PAR1 抗体对结合人 PAR1 (hPAR1) 的竞争。这些包括,例如,固相直接或间接放射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定 (EIA)、夹心竞争测定(见 Stahli 等人,

Methods in Enzymology 9:242-253,1983);固相直接生物素-亲和素 EIA(见 Kirkland 等人, J. Immunol. 137:3614-3619,1986);固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(见 Harlow & Lane, 如上);使用 I-125 标记的固相直接标记 RIA(见 Morel 等人, Molec. Immunol. 25:7-15,1988);固相直接生物素-亲和素 EIA(Cheung 等人, Virology 176:546-552,1990);和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等人, Scand. J. Immunol. 32:77-82,1990)。通常,这类测定涉及使用结合于固体表面的纯化的抗原或带有抗原的细胞、未标记的测试抗 -PAR1 抗体和标记的参考抗体。通过在测试抗体存在下测定结合固体表面或细胞的标记的量测量竞争抑制。通常测试抗体是过量存在的。通过竞争测定鉴定的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合于相同表位的抗体、和结合于与参考抗体结合的表位足够接近而发生位阻的邻近表位的抗体。

[0179] 为了确定是否测试抗 -PAR1 抗体或抗原结合分子和参考抗体结合唯一表位,可以使用可商购试剂(例如,来自 Pierce, Rockford, IL 的试剂)对各个抗体生物素化标记。使用 PAR1 多肽包被的 ELISA 平板可以进行用未标记单克隆抗体和生物素化的单克隆抗体的竞争研究。可以用链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶探针检测生物素化的 MAbs 的结合。为了确定纯化的抗 -PAR1 抗体的同种型,可以执行同种型 ELISA。例如,可以用 1 μ g/ml 的抗人 IgG 包被微孔板的孔,在 4 $^{\circ}$ C 过夜。在用 1% BSA 封闭之后,用 1 μ g/ml 或更少的单克隆抗 -PAR1 抗体或纯化的同种型对照与平板在室温反应 1 至 2 小时。然后将孔与人 IgG1 或人 IgM- 特异性碱性磷酸酶缀合探针反应。然后显影平板和分析,从而可以测定纯化抗体的同种型。

[0180] 为了证明单克隆抗 -PAR1 抗体或抗原结合分子对表达 PAR1 多肽的活细胞的结合,可以使用流式细胞计数仪。简言之,可以将表达 PAR1 的细胞系(在标准生长条件下生长)与多种浓度的抗 -PAR1 抗体在含有 0.1% BSA 和 10% 胎牛血清的 PBS 中混合,和在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗涤之后,在与一级抗体染色相同的条件下,细胞与荧光素标记的抗人 IgG 抗体反应。可以通过流式细胞计分析样品,使用光和侧散射特性门控单个细胞。可以使用荧光显微镜作为(另外或代替)流式细胞计数测定的备选测定。如上对细胞染色和通过荧光显微镜检测。

[0181] 还可以通过免疫印迹检测本发明的抗 -PAR1 抗体与 PAR1 多肽或抗原片段的反应性。简言之,可以制备纯化的 PAR1 多肽或融合蛋白质,或来自表达 PAR1 细胞的细胞提取物,进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳之后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜,用 10% 胎牛血清封闭,和用待检测的单克隆抗体作为探针检测。可以使用抗人 IgG 碱性磷酸酶和用 BCIP/NBT 底物片剂(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 显影来检测人 IgG 结合。

[0182] 治疗应用和药物组合物

[0183] 通过抑制 PAR1 信号传导活动,这里所述抗 -hPAR1 抗体或抗原结合分子可以用在许多治疗或预防应用。在治疗应用中,将包含抗 -hPAR1 拮抗剂抗体或抗原结合分子的组合物施用于已经患有由 PAR1 信号传导介导、引起或有关疾病或病症的受试者。该组合物含有足以抑制、部分阻碍或可检测的降低病情及其并发症发展的量的抗体或抗原结合分子。

[0184] 在预防应用中,将含有抗 -hPAR1 抗体或抗原结合分子的组合物施用于尚未患有 PAR1- 信号传导相关病症的患者。而将它们施用于具有发展这类病征风险或倾向的受试者。这类应用使受试者能够增加患者的抗性或者延缓由 PAR1 信号传导介导的病征的进程。

[0185] 多种疾病是由异常或反常地高的 PAR1- 介导的细胞内信号传导介导。异常高的 PAR1- 介导的细胞内信号传导可以由, 例如, 受体暴露于异常高浓度的激活蛋白酶 (例如, 凝血酶) 或异常高的细胞表面 PAR1 表达水平而引起。抑制 PAR1 对于治疗血栓形成和血管增生的病症以及抑制癌症 (cancer) 进程是有用的, 所述癌症, 例如, 癌 (carcinomas) 或上皮癌, 包括例如皮肤癌 (包括黑色素瘤)、胃肠癌 (包括结肠癌)、肺癌和乳腺癌 (包括乳房和导管癌)、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、腺癌等。见, 例如, Darmoul 等人, *Mol Cancer Res* (2004) 2(9) :514-22 和 Salah, 等人, *Mol Cancer Res* (2007) 5(3) :229-40。抑制 PAR1 还发现用于预防或抑制慢性肠炎, 包括炎性肠病 (IBD)、肠易激惹综合征 (IBS) 和溃疡性结肠炎; 和纤维变性病, 包括肝纤维化和肺纤维化。见, 例如, Vergnolle 等人, *J Clin Invest* (2004) 114(10) :1444; Yoshida, 等人, *Aliment Pharmacol Ther* (2006) 24(Suppl 4) :249; Mercer 等人, *Ann NY Acad Sci* (2007) 1096 :86-88; Sokolova 和 Reiser, *Pharmacol Ther* (2007) PMID :17532472。

[0186] 能够通过本发明的抗 -PAR1 抗体抑制或预防的癌症包括, 不限于, 上皮癌包括癌 (carcinomas); 神经胶质瘤、间皮瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌、和伯基特淋巴瘤、头颈癌、结肠癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、肝胆管癌、胆囊癌、小肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、阴茎癌、尿道癌、睾丸癌、宫颈癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、胰腺内分泌癌、类癌、骨癌、皮肤癌、视网膜母细胞瘤、多发骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、和非霍奇金淋巴瘤 (对于另外的癌症, 见, *CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE* (DeVita, V. T. 等人编辑 1997))。

[0187] 抑制 PAR1 还发现用于预防或抑制可能是或不是由异常或反常地高的 PAR1 表达或细胞内信号传导介导的疾病。例如, 抑制 PAR1 对于预防或抑制局部缺血再灌注损伤 (包括心肌、肾脏、大脑和肠内的局部缺血再灌注损伤) 是有用的。见, 例如, Strande 等人, *Basic Res. Cardiol* (2007) 102(4) :350-8; Sevastos 等人, *Blood* (2007) 109(2) :577-583; Junge 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) 100(22) :13019-24 和 Tsuboi 等人, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) 292(2) :G678-83。也可以将抑制 PAR1 细胞内信号传导用于抑制单纯疱疹病毒 (HSV1 和 HSV2) 对细胞的感染。见, Sutherland 等人, *J Thromb Haemost* (2007) 5(5) :1055-61。

[0188] 本发明提供药物组合物, 其包含与可药用载体一起配制的抗 -hPAR1 抗体或抗原结合分子。该组合物可以另外含有适合治疗或预防特定病征的其它治疗物质。制药载体提高或稳定该组合物, 或有利于组合物的制备。可药用载体包括生理可兼容的溶剂、分散剂、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0189] 可以通过本领域公知的多种方法施用本发明的药物组合物。施用的途径和 / 或方式可以根据期望效果而改变。优选施用是静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下的, 或施用于靶标位点附近。可药用载体应该适合静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮的施用 (例如, 通过注射或灌输)。由施用途径决定, 可以将有活性化合物 (即, 抗体、双特异性和多特异性分子) 包被在材料中, 以保护化合物免受可能灭活该化合物的酸和其它天然条件作用。

[0190] 在一些实施方案中, 组合物是无菌和液体的。可以例如, 通过使用包衣例如卵磷脂, 通过维持分散情况下所需颗粒大小和通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。在许

多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如,糖、多元醇诸如甘露醇或山梨醇、和氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的物质,例如,单硬脂酸铝或明胶带来可注射组合物的长效吸收。

[0191] 可以根据本领域众所周知的方法和常规操作制备本发明的药物组合物。见,例如, Remington :The Science and Practice of Pharmacy, MackPublishing Co., 20 版, 2000 ; 和 Sustained and Controlled Release DrugDelivery Systems, J. R. Robinson, 编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。药物组合物优选在 GMP 条件下制备。通常,在本发明的药物组合物中使用治疗有效剂量或有效剂量的抗 -hPAR1 抗体。通过本领域技术人员公知的常规方法将抗 -hPAR1 抗体配制成为可药用剂型。调整给药方案以提供最佳期望应答(例如,治疗反应)。例如,可以施用单个团注,可以在一段时间内施用数次分份剂量,或可以按照治疗情况紧急程度指示成比例的减少或增加剂量。以剂量单元形式配制胃肠道外的组合物对于容易的施用和均匀剂量是特别有利的。这里使用的剂量单元指对于要治疗的受试者适合作为单元剂量的物理分离的单元;各个单元含有结合了需要的治疗载体的、计算出的产生期望治疗效果的活性化合物的预定的量。

[0192] 可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平以获得对于特定患者、组合物和施用方式有效实现所期望治疗应答,而对患者没有毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物动力学因素,包括使用的本发明的特定组合物、或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,使用的特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与使用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或物质,所治疗患者的年龄、性别、体重、状态、整体健康和先前病史,等等因素。

[0193] 医生或兽医可以在药物组合物中以低于获得期望治疗效果所需水平开始使用本发明的抗体的剂量,逐渐增加剂量直至获得期望效果。通常,本发明组合物的有效剂量依据许多不同因素而改变,包括要治疗的特定疾病或病征、施用方式、靶标位点、患者的生理学状态、患者是人或动物、施用的其它药物、和治疗是预防还是治疗的。需要滴定治疗剂量以优化安全性和有效性。对于抗体施用,剂量范围从宿主体重的约 0.0001 至 100mg/kg, 和更通常从 0.01 至 5mg/kg。例如,剂量可以是 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1-10mg/kg 范围之内。示例性的治疗方案要求施用每两周一次或每月一次或每 3 至 6 个月一次。

[0194] 在其中该物质是核酸的实施方案中,典型剂量范围可以从约 0.1mg/kg 体重达并包括约 100mg/kg 体重,优选在约 1mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重之间。更优选约 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40 或 50mg/kg 体重。

[0195] 通常以多次施用抗体。在单剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过测量患者中抗 -hPAR1 抗体的血液水平所示,间隔也可以是不规律的。在一些方法中,调节剂量以获得血浆抗体浓度为 1-1000 μ g/ml 和在一些方法中 25-300 μ g/ml。或者,可以将抗体作为持续释放制剂施用,此种情况下需要施用的频率较少。依据在患者中抗体的半衰期改变剂量和频率。通常,人源化抗体显示比嵌合抗体和非人抗体更长的半衰期。施用的剂量和频率可以依据治疗是预防性或治疗性的而变化。在预防性应用中,在长时间以相对不频繁间隔施用相对低剂量。一些患者在余生中持续接受治疗。在治疗应用中,有时需要相对短时间间隔、相对高剂量直至减少或终止该疾病进展,优选直至患者显示疾病症状的部分或全部的改善。此后,患者可以被施用预防性方案。

实施例

[0196] 提供下列实施例以说明,而非限定要求的发明。

[0197] 实施例 1:下列实施例提供对在具有最小化免疫原性的抗-Par-1 抗体的构建和筛选。

[0198] 方法

[0199] 鼠 V- 区的亚克隆

[0200] 从鼠单克隆 4E7. J14 亚克隆鼠 V- 区。使用 PCR 扩增 V- 重链和 V- κ 区的 V- 基因和掺入适合克隆进入表达载体的限制性内切酶位点。在 pBR322 载体系统中, V- 区被克隆为带有人 IgG1 恒定区的 Fab' 片段。在大肠杆菌中从 pTAC 启动子表达 Fab'。在 ELISA 测定中,纯化的 Fab' 蛋白(克隆 PR15-5)显示结合 Par-1 抗原。

[0201] Fab' 和 Fab 纯化

[0202] 使用表达载体通过从大肠杆菌分泌表达 Fab' 和 Fab 片段。细胞在 2xYT 培养基中生长至在 600nm 波长测量光密度 (OD_{600}) 为 0.6。在 33°C 使用异丙基- β -D-半乳糖硫吡喃糖苷 (IPTG) 诱导表达 3 小时。从胞质部分获得装配的 Fab' 或 Fab 和根据标准方法使用链球菌蛋白质 G 通过亲和色谱法 (HiTrap 蛋白质 GHP 柱; GE Healthcare) 纯化。在 pH 2.0 缓冲液中洗脱 Fab' 和 Fab, 立即调节至 pH 7.0 和对 PBS pH7.4 透析 (PBS 是没有钙和镁的)。

[0203] ELISA

[0204] 通常,通过在 4°C 孵育过夜,50ng/孔的 Par-1 抗原结合于 96 孔微孔板。用在含有 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 ("PBST") 中 5% 牛奶的溶液在 33°C 封闭平板 1 小时。在 PBS 中稀释 Fab 或参考 Fab' (PR15-5) 和每孔加入 50 μ l。在 33°C 孵育 1 小时之后,用 PBST 洗平板 3 次。每孔加入 50 μ l 的抗-人- κ 链辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物 (Sigma; 在 PBST 中稀释至 0.1ng/ml) 和在 33°C 孵育平板 40 分钟。用 PBST 洗平板 3 次和用 PBS 洗一次。每孔加入 100 μ l 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Sigma) 和在室温孵育 ~ 5 分钟。为了终止反应,每孔加入 100 μ l 的 0.2N H_2SO_4 。在分光光度计于 450nm 读取平板。

[0205] 筛选

[0206] 对 Fab 片段文库的筛选按照在美国专利公开号 2005/0255552 和 2006/0134098 中所述使用重组 Par-1 抗原包被的硝化纤维素滤器进行。这些专利出版物的全部公开在此通过其整体参考被并入用于全部目的。

[0207] 亲和力测量

[0208] 使用 ForteBio Octet 生物传感器分析 Fab' 和 Fab 片段的结合动力学。根据厂商方法使用 EZ-link 生物素化作用试剂盒 (Pierce) 生物素化重组抗原。然后将抗原偶联于中和亲和素 (neutravidin) 包被的传感器 (ForteBio)。使用生物涂层干涉量度法分析和由厂商提供的软件实时监测 Fab' 和 Fab 结合。从测定的结合和解离常数计算亲和力。

[0209] 结果

[0210] V- 区的克隆和表达

[0211] ForteBio Octet 检测证实亚克隆的 V- 区的 Par-1 抗原结合活性。

[0212] 对鼠 V- 区克隆、测序和表达。V- 区被克隆为带有人 IgG1 恒定区的 Fab' 片段和在大肠杆菌中表达。在 Par-1 抗原结合的 ForteBio Octet 检测中,克隆的 Fab' PR15-5 产生

依赖于抗体浓度的结合曲线。见,表 1。

[0213] 表 1

[0214]

	PR15-5	PR15-5
摩尔浓度 [M]	5E-8	2.5E-8
$K_{\text{解离}}$ [1/s]	2.43E-4	2.61E-4
$K_{\text{结合}}$ [1/Ms]	2.97E5	2.97E5
K_D [M]	8.19E-10	8.77E-10

[0215] 文库构建和 V- 区表达盒

[0216] 从连接于参考 Fab' PR15-5 的独特 CDR3 区的人 V- 区段序列文库构建表位集中 (Epitope-focused) 的文库;FR4 区分别是重链和轻链的人种系 JH6 和 Jk2。这些“全长”文库被用作其中仅部分鼠 V- 区段是由人序列文库一开始替代的“表达盒”文库的构建基础。使用构架 2 (FR2) 区内重叠的共有序列通过桥式 PCR 制备 V- 重链和 V- κ 链的表达盒 (cassettes)。以这一方法构建人 V- 重链 1 和 V- κ III 亚类的“前-末端”和“中间”的人表达盒文库。通过菌落转移结合测定鉴定支持结合 Par-1- 抗原的人表达盒和根据在 ELISA 和 ForteBio Octet 生物传感器分析中的亲和力排序。然后在二级文库筛选中重组最高亲和力表达盒的集合以产生全人 V- 区段。以这一方式完成的表达盒筛选鉴定具有 Par-1 抗原结合活性的多种人 V- 轻链和人 V- 重链“前-末端”表达盒。

[0217] 在备选方法中,构建诱变文库,其中在此 CDR2 内的各个残基被突变为鼠序列或来自单个人种系序列的对应残基 (VH1-46 是对于鉴定的“前-末端”表达盒最接近的人种系序列) (见,图 3)。这一诱变文库被偶联于选择的“前-末端”和已知支持抗原结合的人构架 3 (FR3) 序列。这一文库的全部成员具有 PR15-5 参考 Fab' 的共同 CDR3 序列,连同人种系 FR4 序列。因此,通过菌落转移结合测定建立、筛选基因工程构建的人“中间”表达盒文库,通过 ELISA 和 ForteBio Octet 选择和进一步分析抗原结合克隆。以此方式,鉴定支持 Par-1 抗原结合的多种 CDR 序列接近人种系氨基酸序列 (见图 3)。

[0218] 在鉴定接近人种系序列的高亲和力 Fab 集合之后,建立亲和力成熟文库。使用退化性 PCR 引物突变一组最佳 Fab 克隆的共有 CDR3 序列以产生文库。使用菌落转移结合测定筛选诱变文库。使用 ELISA 和 ForteBio 分析,对选择的 Fab 亲和力排序。鉴定当与 PR15-5 参考 Fab' 相比时支持对抗原等同的或提高的亲亲和力的突变。见,表 2。

[0219] 使用 Forte Octet 分析 Fab' 和 Fab 对人 Par-1 抗原的亲和力

[0220] 通过与参考 Fab' PR15-5 的动力学比较,进一步表征由菌落转移结合测定和 ELISA 从表达盒和诱变文库筛选分离的完全优化的 Fab。使用 ForteBio Octet 系统的蛋白质-蛋白质相互作用的实时无标记监测分析结合动力学。计算的结合和解离和总亲和力常数显示于表 2。

[0221] 表 2

[0222]

	实验 1	实验 1		实验 2	实验 2	实验 2
	PR15-5	LDS896		PR15-5	LDS900	LDW653
摩尔浓度 [M]	1E-8	1E-8		5E-8	2.5E-8	2.5E-8
$k_{\text{解离}}$ [1/s]	3.08E-4	3.11E-4		3.50E-4	2.89E-4	2.93E-4
$K_{\text{结合}}$ [1/Ms]	3.95E5	2.65E5		3.29E5	1.96E5	2.59E5
K_{D} [M]	7.79E-10	1.18E-9		1.06E-9	1.47E-9	1.13E-9

[0223] 表 2 显示使用 ForteBio Octet 生物传感器技术通过生物涂层干涉量度法对 Fab' 和 Fab 结合于重组 Par-1 抗原的分析, 显示结合速率常数 (k_a)、解离速率常数 (k_d) 和计算的亲和力 (K_D)。改良的 Fab 克隆 LDS-896、LDS900 和 LDW653 和参考 Fab' 克隆 PR15-5 的动力学分析证明全部具有对 Par-1 抗原的高亲和力。

[0224] 图 3 显示与人种系序列相比, 优化的 Fab LDS-896、LDS900 和 LDW653 的 V- 区序列的氨基酸序列比对。参考和优化的 V- 区序列对于相应人种系氨基酸序列的百分数氨基酸序列同一性被显示在表 3。

[0225] 表 3

[0226]

抗体	Vh 同一性, 对于 Vh1-46/JH6	Vk 同一性, 对于 VkII A3/Jk2
4E7. J14	64%	80%
LDS896	81%	92%
LDS900	88%	92%
LDW653	92%	92%

[0227] 在表 3 中的全部百分数序列同一性代表对于除了 CDR3BSD 序列之外跨 V- 区的单个人种系序列的同一性。可见全部三个改良的 Fab 的大部分 V- 区极度接近于相应人种系序列, 具有约 90% 的百分数氨基酸序列同一性。

[0228] 尽管通过目的为清楚理解的图解和示例已经对上述发明进行了详细描述, 对于本领域普通技术人员显而易见的是在本发明的指导下可以对其进行某些改变和修饰而不背离所附权利要求书的精神和范围。

[0229] 在本说明书中引用的全部出版物、数据库、基因文库序列、专利和专利申请在此通过参考被并入, 如同其各自被明确和个别的表示为通过参考被并入。

序列表

<110>IRM 责任有限公司

<120> 蛋白酶激活受体 1 (PAR1) 的拮抗剂抗体

<130>P1311PC00

<140>

<141>

<150>60/950, 290

<151>2007-07-17

<160>70

<170>PatentIn Ver. 3.3

<210>1

<211>27

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>1

Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu

1

5

10

15

Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu Thr Glu

20

25

<210>2

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明:合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(1)

<223> 替换=" Asn"

<220>

<221> 变体

<222>(3)

<223> 替换=" Val"

<220>

<221> 变体

<222>(4)

<223> 替换=" Phe"

<220>

<221> 变体

<222>(5)

<223> 替换=" His"

<400>2

Ser Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210>3

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>3

Ser Tyr Tyr Met His

1 5

<210>4

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>4

Ser Tyr Tyr Met Asn

1

5

<210>5

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>5

Asn Tyr Val Phe Asn

1

5

<210>6

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(1)

<223> 替换=" Val "

<220>

<221> 变体

<222>(3)

<223> 替换=" Asp "

<220>

<221> 变体

<222> (5)

<223> 替换 = " His "

<220>

<221> 变体

<222> (6)

<223> 替换 = " Gly "

<220>

<221> 变体

<222> (8)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (10)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (12)

<223> 替换 = " Asn "

<220>

<221> 变体

<222> (16)

<223> 替换 = " Gln "

<400>6

Ile Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210>7

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>7

Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210>8

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>8

Val Ile Asp Pro His Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210>9

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>9

Val Ile Asn Pro His Ser Gly Arg Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210>10

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222> (3)

<223> 替换 = " Ile "

<220>

<221> 变体

<222> (4)

<223> 替换 = " Tyr "

<220>

<221> 变体

<222> (6)

<223> 替换 = " Leu " 或 " Pro " 或 " Met " 或 " Glu " 或 " Trp " 或 " Thr " 或 " Ser " 或 " Gln " 或 " Ala "

<220>

<221> 变体

<222> (8)

<223> 替换 = " Phe "

<400>10

Asp Asp Gly Pro Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210>11

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>11

Asp Asp Gly Pro Ser Met Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210>12

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>12

Asp Asp Gly Pro Ser Leu Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210>13

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>13

Asp Asp Gly Pro Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210>14

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222> (9)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222>(12)

<223> 替换=" Asn"

<220>

<221> 变体

<222>(16)

<223> 替换=" Glu"

<400>14

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
1				5					10					15	

<210>15

<211>16

<212>PRT

<213> 智人

<400>15

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
1				5					10					15	

<210>16

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>16

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg	Asn	Gly	Asn	Asn	Tyr	Leu	Glu
1				5					10					15	

<210>17

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(1)

<223> 替换 = " Lys "

<220>

<221> 变体

<222>(2)

<223> 替换 = " Ile "

<220>

<221> 变体

<222>(6)

<223> 替换 = " Phe "

<400>17

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1

5

<210>18

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>18

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1

5

<210>19

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>19

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210>20

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(4)

<223> 替换 = " Asp " 或 " Ala " 或 " Val "

<220>

<221> 变体

<222>(5)

<223> 替换 = " Arg " 或 " Thr " 或 " Ser " 或 " Lys "

<400>20

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1

5

<210>21

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>21

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro

1 5

<210>22

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>22

Phe Gln Gly Ser Ser Val Pro Phe Thr

1 5

<210>23

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>23

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210>24

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(1)

<223> 替换 = " Gln "

<220>

<221> 变体

<222> (16)

<223> 替换 = " Ala "

<220>

<221> 变体

<222> (24)

<223> 替换 = " Ala "

<220>

<221> 变体

<222> (27)

<223> 替换 = " Tyr "

<220>

<221> 变体

<222> (30)

<223> 替换 = " Asn "

<400>24

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser		
			20					25						30	

<210>25

<211>30

<212>PRT

<213> 智人

<400>25

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn		
			20					25						30	

<210>26

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>26

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser		
			20					25					30		

<210>27

<211>14

<212>PRT

<213> 智人

<400>27

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
1				5					10				

<210>28

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222> (6)

<223> 替换=" Thr"

<220>

<221> 变体

<222>(13)

<223> 替换=" Ala"

<220>

<221> 变体

<222>(18)

<223> 替换=" Arg"

<220>

<221> 变体

<222>(21)

<223> 替换=" Thr"

<220>

<221> 变体

<222>(23)

<223> 替换=" Asp"

<400>28

Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210>29

<211>32

<212>PRT

<213> 智人

<400>29

Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210>30

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>30

Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210>31

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>31

Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
				20				25					30		

<210>32

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>32

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210>33

<211>23

<212>PRT

<213> 智人

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>36

Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210>37

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(11)

<223> 替换=" Ala"

<400>37

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30	

<210>38

<211>32

<212>PRT

<213> 智人

<400>38

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30	

<210>39

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>39

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5				10					15		
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210>40

<211>10

<212>PRT

<213> 智人

<400>40

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1			5					10	

<210>41

<211>98

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :Synthetic polypeptide"

<220>

<221> 变体

<222> (1)

<223> 替换=" Glu"

<220>

<221> 变体

<222>(16)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222>(24)

<223> 替换 = " Val "

<220>

<221> 变体

<222>(27)

<223> 替换 = " Gly "

<220>

<221> 变体

<222>(30)..(31)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222>(33)

<223> 替换 = " Val "

<220>

<221> 变体

<222>(34)

<223> 替换 = " Phe "

<220>

<221> 变体

<222>(35)

<223> 替换 = " His "

<220>

<221> 变体

<222>(50)

<223> 替换 = " Ile "

<220>

<221> 变体

<222> (52)

<223> 替换 = " Asp "

<220>

<221> 变体

<222> (54)

<223> 替换 = " His "

<220>

<221> 变体

<222> (57)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (59)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (61)

<223> 替换 = " Asn "

<220>

<221> 变体

<222> (72)

<223> 替换 = " Arg "

<220>

<221> 变体

<222> (79)

<223> 替换 = " Ala "

<220>

<221> 变体

<222> (87)

<223> 替换 = " Thr "

<220>

<221> 变体

<222> (89)

<223> 替换=" Glu"

<400>41

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Asn	Tyr
			20				25						30		
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala Arg

<210>42

<211>98

<212>PRT

<213> 智人

<400>42

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr
			20				25						30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala Arg

<210>43

<211>98

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>43

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Val	Ile	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Thr	Arg	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
	65				70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	

Ala Arg

<210>44

<211>98

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>44

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

Gly Val Ile Asp Pro Hi s Gly Gly Arg Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210>45

<211>98

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<221>来源

<223>人工序列说明:合成肽

<400>45

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Val Phe Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro His Ser Gly Arg Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210>46

<211>93

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<221>来源

<223>人工序列说明:合成肽

<220>

<221> 变体

<222> (32)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (35)

<223> 替换 = " Asn "

<220>

<221> 变体

<222> (39)

<223> 替换 = " Glu "

<220>

<221> 变体

<222> (55)

<223> 替换 = " Leu "

<220>

<221> 变体

<222> (56)

<223> 替换 = " Ile "

<220>

<221> 变体

<222> (60)

<223> 替换 = " Phe "

<400>46

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg
			20					25					30		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro

50																		
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
65					70					75					80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys						
			85						90									

<210>47

<211>93

<212>PRT

<213> 智人

<400>47

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly			
1				5					10					15				
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser			
			20					25					30					
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser			
		35					40					45						
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro			
	50					55					60							
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
65					70					75					80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys						
			85						90									

<210>48

<211>93

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>48

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly			
1				5					10					15				
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg			
			20					25					30					

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90

<210>49

<211>93

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<221>来源

<223>人工序列说明:合成肽

<400>49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90

<210>50

<211>93

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<221>来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>50

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg
			20					25						30	
Asn	Gly	Asn	Asn	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40						45		
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys			
			85						90						

<210>51

<211>120

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222>(1)

<223> 替换=" Glu"

<220>

<221> 变体

<222>(16)

<223> 替换=" Ser"

<220>

<221> 变体

<222>(24)

<223> 替换=" Val"

<220>

<221> 变体

<222> (27)

<223> 替换 = " Gly "

<220>

<221> 变体

<222> (30).. (31)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (33)

<223> 替换 = " Val "

<220>

<221> 变体

<222> (34)

<223> 替换 = " Phe "

<220>

<221> 变体

<222> (35)

<223> 替换 = " His "

<220>

<221> 变体

<222> (50)

<223> 替换 = " Ile "

<220>

<221> 变体

<222> (52)

<223> 替换 = " Asp "

<220>

<221> 变体

<222> (54)

<223> 替换 = " His "

<220>

<221> 变体

<222> (57)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (59)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (61)

<223> 替换 = " Asn "

<220>

<221> 变体

<222> (72)

<223> 替换 = " Arg "

<220>

<221> 变体

<222> (79)

<223> 替换 = " Ala "

<220>

<221> 变体

<222> (87)

<223> 替换 = " Thr "

<220>

<221> 变体

<222> (89)

<223> 替换 = " Glu "

<220>

<221> 变体

<222>(104)

<223> 替换=" Leu" 或" His"

<400>51

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Asn	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Asp	Asp	Gly	Pro	Ser	Met	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210>52

<211>120

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>52

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Val	Ile	Asp	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Thr	Arg	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>54

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Val	Phe	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Arg	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75				80	
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Asp	Gly	Pro	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210>55

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<220>

<221> 变体

<222> (32)

<223> 替换 = " Ser "

<220>

<221> 变体

<222> (35)

<223> 替换 = " Asn "

<220>

<221> 变体

<222> (39)

<222> 替换 = " Glu "

<220>

<221> 变体

<222> (55)

<223> 替换 = " Leu "

<220>

<221> 变体

<222> (56)

<223> 替换 = " Ile "

<220>

<221> 变体

<222> (60)

<223> 替换 = " Phe "

<220>

<221> 变体

<222> (98)

<223> 替换 = " His "

<400>55

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg
			20					25						30	
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40						45		
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
		50				55							60		
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile

65		70		75		80									
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	
Ser	Ser	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210>56

<211>110

<212>PRT

<213> 智人

<400>56

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1			5					10						15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55				60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
					85					90				95	
Leu	Gln	Thr	Pro	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110		

<210>57

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>57

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Ser Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210>58

<211>112

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<221>来源

<223>人工序列说明:合成肽

<400>58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210>59

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>59

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
           20           25           30
Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
           65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
           85           90           95
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210>60

<211>360

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成多核苷酸

<400>60

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcaac agctactata tgaactgggt gcgacaggec 120
ccgggacaag ggcttgagtg gatgggagtt atcgatcctc atggtggtcg tactcgttac 180
aatcagaagt tcaagggcag agtcacgatg accacagaca catccacgag cacagtctac 240
atggagctga gtagcctgag atctgaagac acagccgtgt actactgcgc acgcgatgat 300

```

ggtccgagca tgtggtactt cgatgtgtgg ggtcagggtta ccaccgtgac cgtgagctcc 360

<210>61

<211>360

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成多核苷酸

<400>61

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcaac agctactata tgaactgggt gcgacaggcc 120
ccgggacaag ggcttgagtg gatgggagtt atcgatcctc atggtggctg tactcgttac 180
aatcagaagt tcaagggcag agtcacgatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgac atctgacgac acagccgtgt actactgcgc acgcgatgat 300
ggtccgagcc tgtggtactt cgatgtgtgg ggtcagggtta ccaccgtgac cgtgagctcc 360

<210>62

<211>360

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成多核苷酸

<400>62

gaggtccagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc cggggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg tctctggagg caccttcagc aactatgtct tcaattgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtt atcaatcctc atagtggctg tactcgttac 180
aatcagaagt tcaagggcag agtcacgatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgac atctgacgac acggctgtgt actactgcgc acgcgatgat 300
ggtccgagcc actggtactt cgatgtgtgg ggtcagggtta ccaccgtgac cgtgagctcc 360

<210>63

<211>336

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成多核苷酸

<400>63

```
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca ggcctcctg cataggaatg gaaacaacta tttggaatgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggc cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgttgggggt tactactgct ttcaaggttc ttcggttccg 300
ttcacatttg gcccaaggta gaaactggaa attaaa 336
```

<210>64

<211>336

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成多核苷酸

<400>64

```
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca ggcctcctg cataggaatg gaaacaacta tttggaatgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggc cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgttggagtt tactactgct ttcaaggttc tcatgttccg 300
ttcacgtttg gcccaaggta gaaactggaa attaaa 336
```

<210>65

<211>336

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成多核苷酸

<400>65

```

gatattgtga tgactcagtc tccactetcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca ggcctcctg cataggaatg gaaacaacta tttggaatgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccaaga ctctaatTT ataagatttc taaccggttc 180
tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgteggagtt tactactgct ttcaaggttc tcatgttccg 300
ttcacgtttg gccaaaggtac gaaactggaa attaaa 336

```

<210>66

<211>13

<212>PRT

<213> 智人

<400>66

```

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
  1           5           10

```

<210>67

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>67

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
  1           5           10

```

<210>68

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>68

```

Ser Phe Leu Leu Arg Asn
  1           5

```

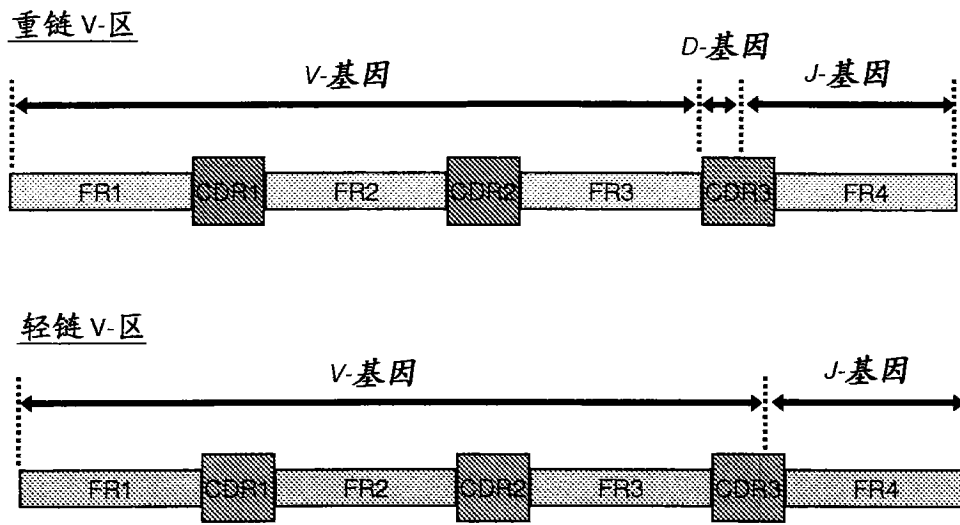



图 1

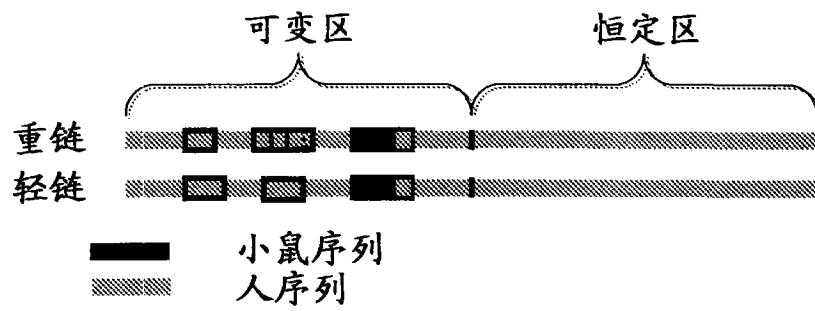


图 2

Vh1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNYSYMHWRQAPGGGLEWVGIINFSGGSTSYAOKFQGRVTMTREDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR-----WGQGTTVTVSS
LDM653	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNYSYNNWVRQAPGGGLEWVGVIDPHGGRTRYNOKFKGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGFSMMWYFDVWVGQGTTVTVSS
LDS900	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNYSYNNWVRQAPGGGLEWVGVIDPHGGRTRYNOKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCARDGFSLWYFDVWVGQGTTVTVSS
LDS896	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSGGTFSNYVFNWVRQAPGGGLEWVGVINPESGRTRYNOKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCARDGFSHWYFDVWVGQGTTVTVSS
VKII A3	DIVMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLLSHSNGYNYLDWYLOKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTFTTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTP--FGQGTKLEIK
LDM653	DIVMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLLSHRNGNYYLEWYLOKPGQSPRLLIYKISNRFSGVDPDRFSGSGACTDFTLTKISRVEAEDVGVYCFQGSVVPFTFGQGTKLEIK
LDS900	DIVMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLLSHRNGNYYLEWYLOKPGQSPRLLIYKISNRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLTKISRVEAEDVGVYCFQGSVVPFTFGQGTKLEIK
LDS896	DIVMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLLSHRNGNYYLEWYLOKPGQSPRLLIYKISNRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLTKISRVEAEDVGVYCFQGSVVPFTFGQGTKLEIK

粗体残基表示与人种系的差异，斜体残基表示在 CDR3 中的改变

图 3

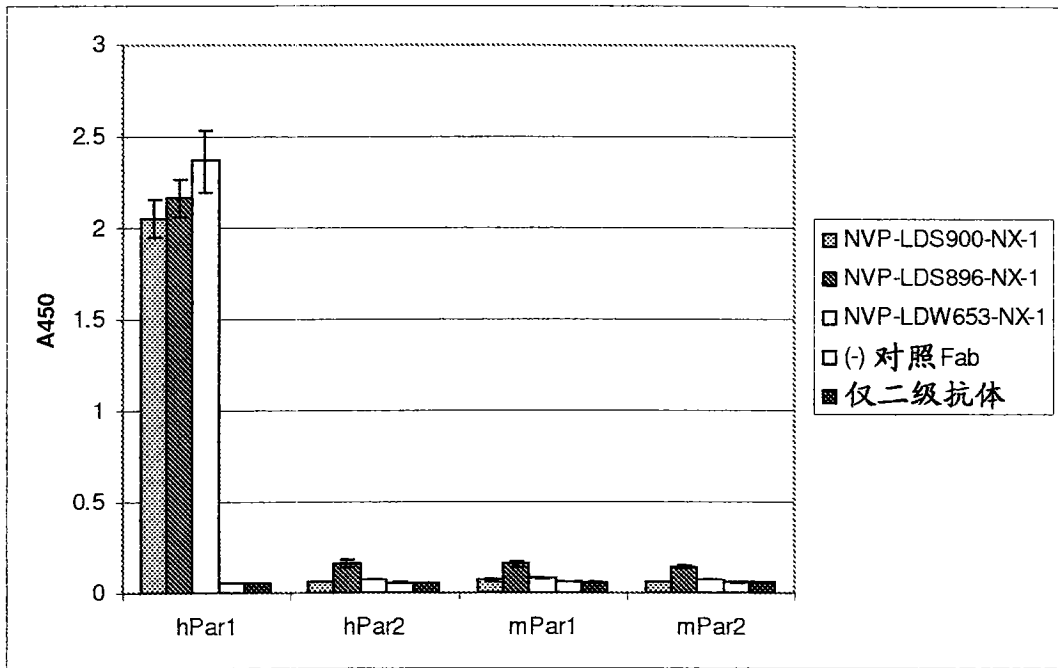


图 4

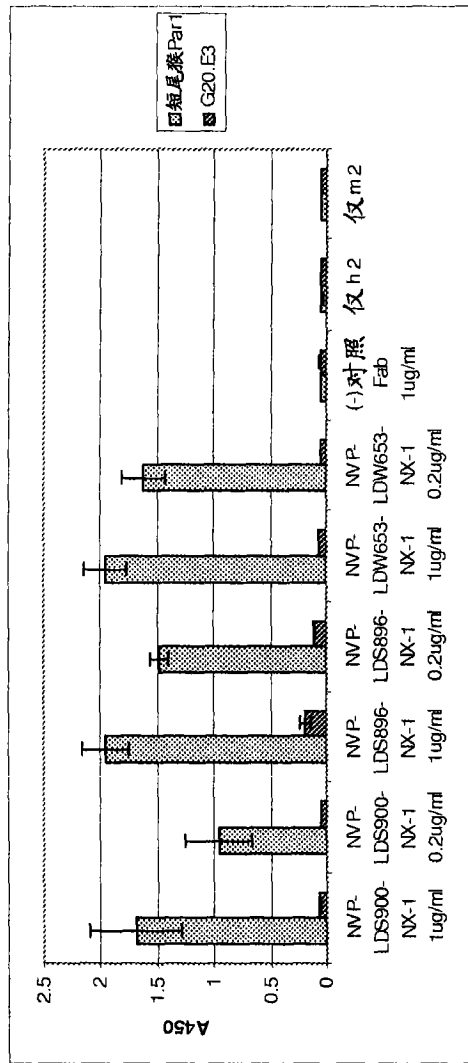


图 5

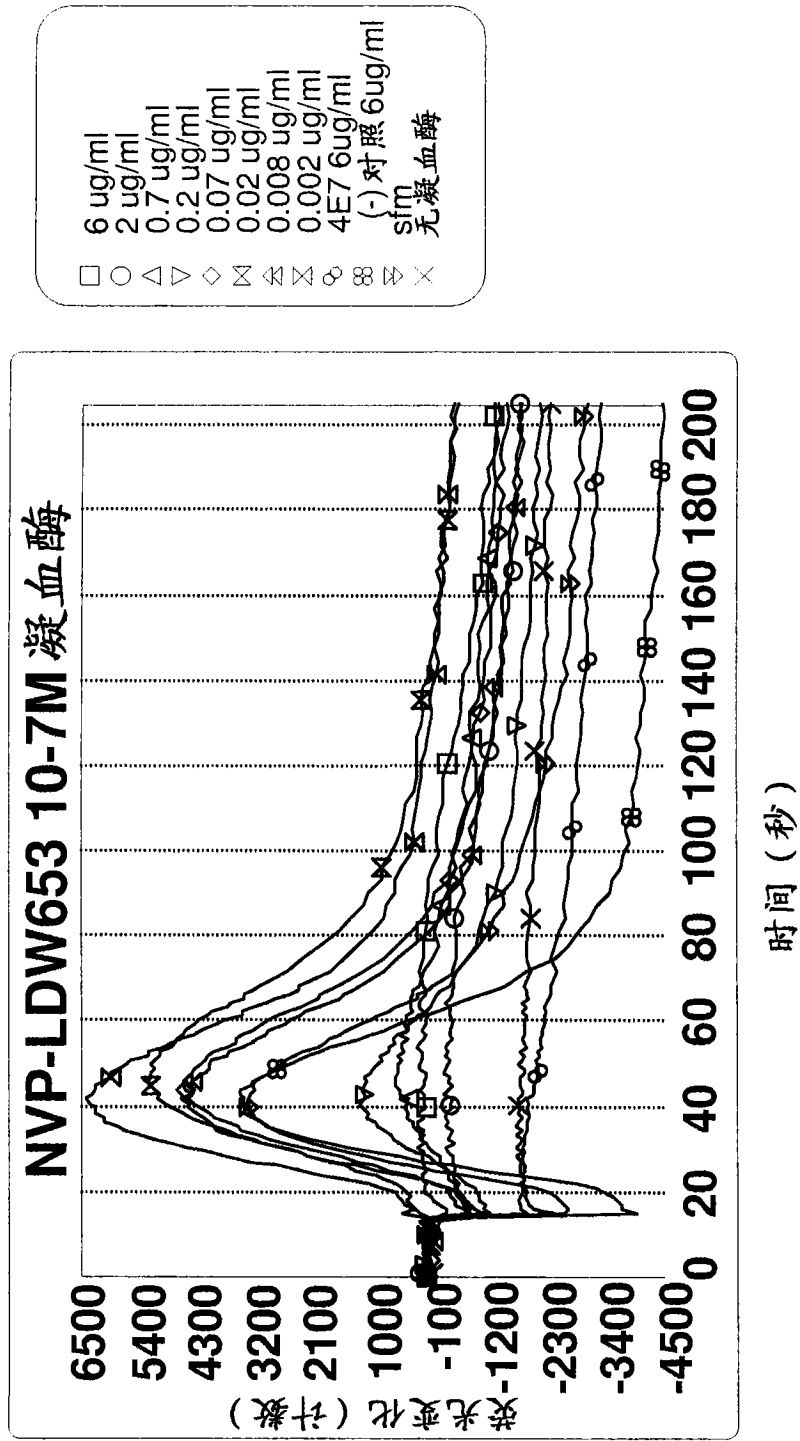


图 6A

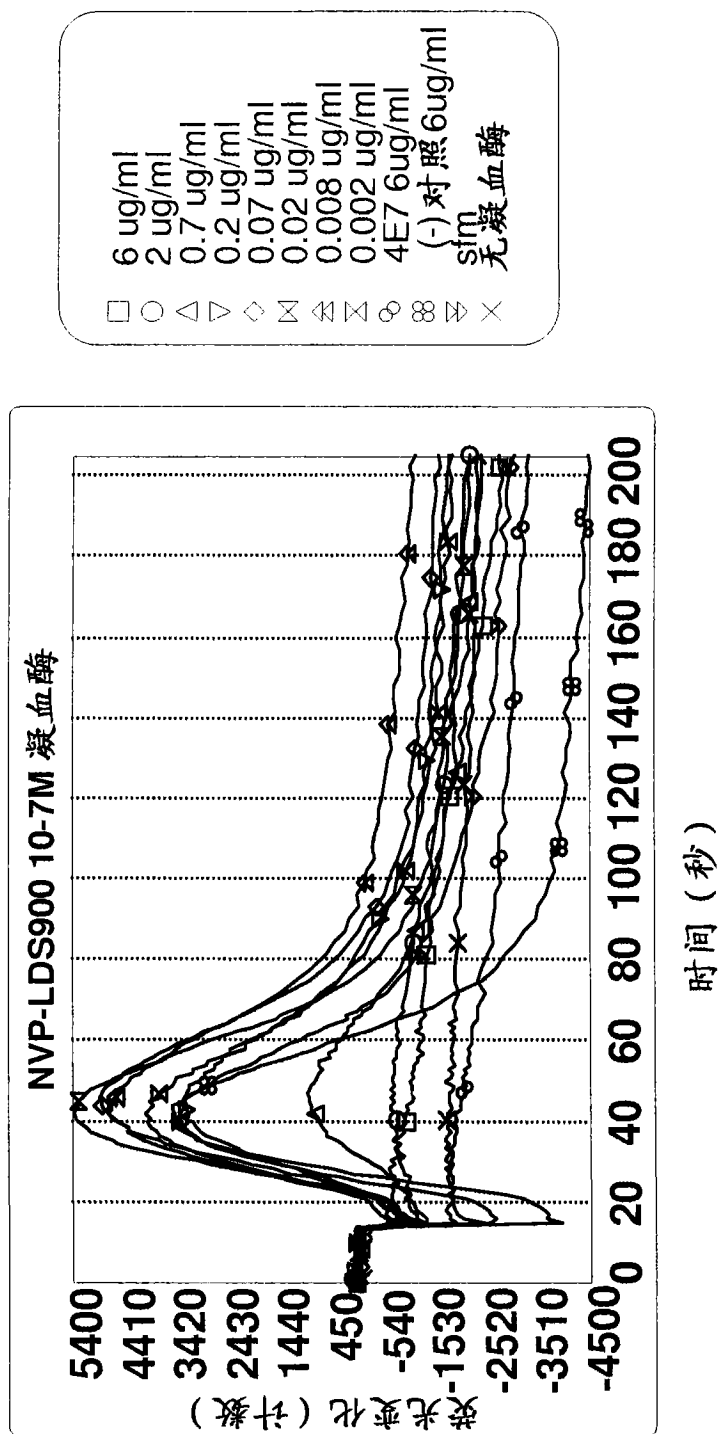


图 6B

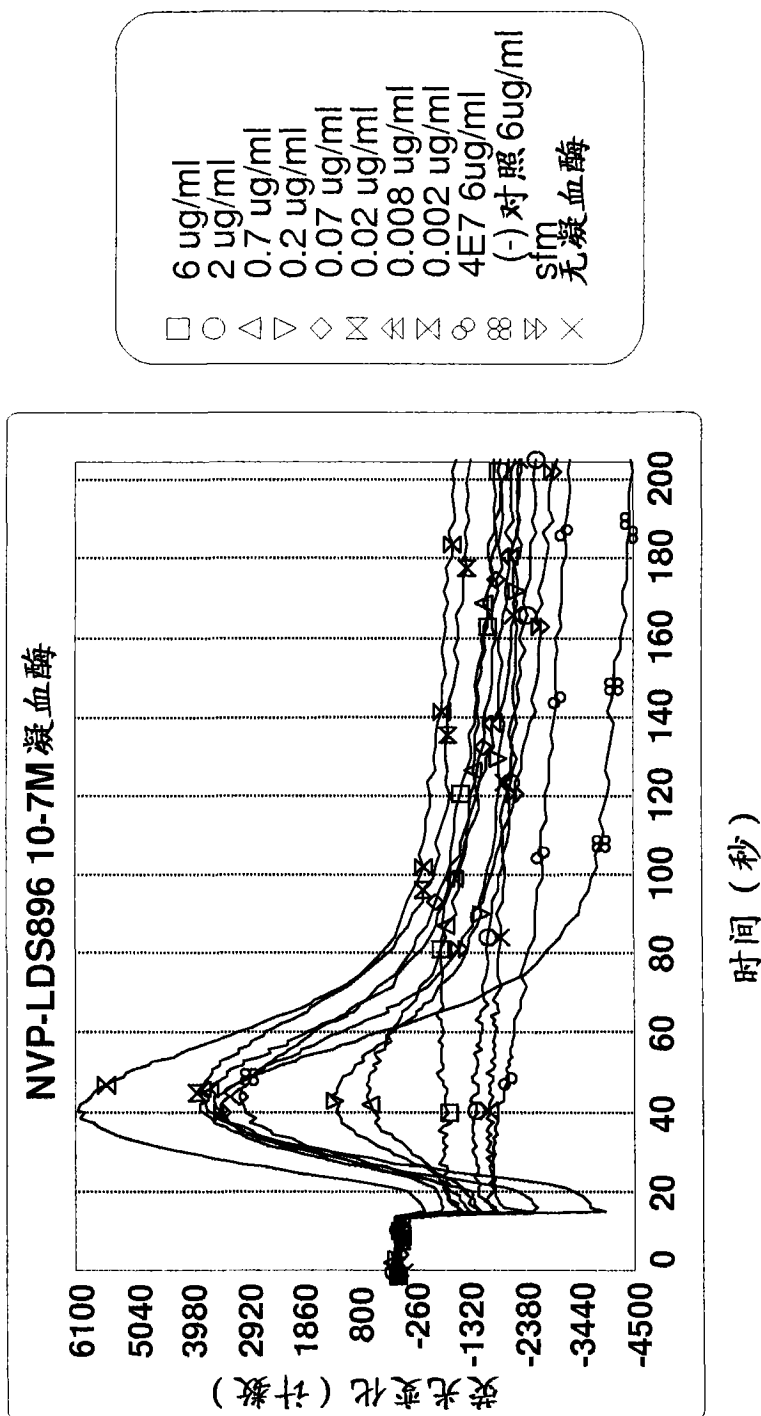


图 6C

	Kd [nM]	功能活性 (FlipR IC ₅₀ ng/ml)	短尾猴 结合	特异性 (对人 Par-2, 小鼠 Par-1)
<i>NVP- LDW653-NX-1</i>	1.1	~500	是	是
<i>NVP- LDS900-NX-1</i>	1.5	~500	是	是
<i>NVP- LDS896-NX-1</i>	4.2	~500	是	是

图 7