

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510815
(P2025-510815A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	4 H 0 4 5
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全119頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-556630(P2024-556630)		(71)出願人	524354270	
(86)(22)出願日	令和5年3月24日(2023.3.24)		(74)代理人	ネクスセラファーマ ユーケー リミテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年11月22日(2024.11.22)			イギリス国 ケンブリッジ シービー 2 1	
(86)国際出願番号	PCT/GB2023/050760			6 ディージー, グレイト アビントン,	
(87)国際公開番号	WO2023/180767			グランタ パーク	
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		(72)発明者	110001416	
(31)優先権主張番号	2204159.4			弁理士法人信栄事務所	
(32)優先日	令和4年3月24日(2022.3.24)			ハッチングス, キャサリン	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)			イギリス国 ケンブリッジ シービー 2 1	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		(72)発明者	6 ディージー, グレイト アビントン,	
				グランタ パーク, スタインメッツ ビル	
				ディング, ヘプタレス セラビューティ	
				ックス リミテッド内	
			(72)発明者	オズボーン, グレッグ	
				イギリス国 ケンブリッジ シービー 2 1	
				最終頁に続く	

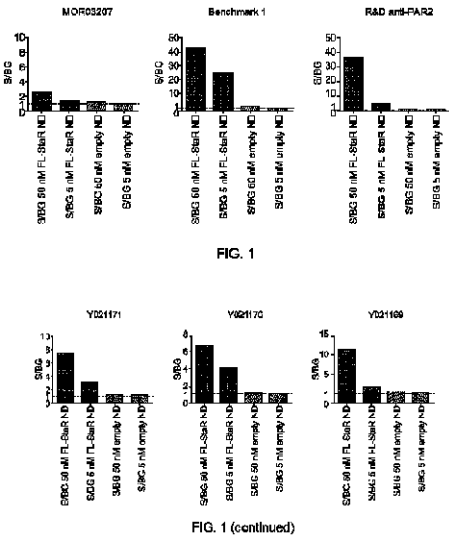
(54)【発明の名称】 抗 P A R 2 抗体

(57)【要約】

【課題】ヒト P A R 2 に結合可能な抗体及び抗原結合フラグメントを提供する。これには、P A R 2 の二重阻害剤として作用可能な抗体が含まれる。本開示はさらに、抗体及び抗原結合フラグメントの生産及び使用を提供する。

【解決手段】二重阻害剤抗体は、プロテアーゼ切断を介する P A R 2 活性化（例えばトリプシンによる）及びペプチド介在性 P A R 2 活性化（例えば P A R 2 - A P 又は P A R 1 - A P による）の両方を阻害することができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P A R 2 に特異的に結合し、その活性を阻害する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はそのフラグメントが、P A R 2 の E C L 3、セグメント 1 及びヘリックス 0 / 1 を含む不連続エピトープに結合する、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記抗体が、配列番号 1 に従って番号付けしたときの P A R 2 の V 5 5 - F 7 7 及び L 3 0 6 - Y 3 2 6 領域に結合する、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

P A R 2 に特異的に結合し、その活性を阻害する、任意に請求項 1 又は請求項 2 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

(a) 配列番号 5、22 若しくは 30；又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を有する配列番号 5、22 若しくは 30 のアミノ酸配列からなる又はこれを含む H C D R 3

(b) 配列番号 5、22 若しくは 30 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 若しくは 100% 同一のアミノ酸配列を含む H C D R 3、又は

(c) 配列番号 2、10、13、16、19 若しくは 27 から選択される V H ドメインに由来し、K a b a t 若しくは C h o t h i a によって定義される H C D R 3 アミノ酸配列

から選択される H C D R 3 を含む V H ドメインを含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

任意に請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記 V H ドメインが、

i) 任意に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を有する配列番号 3、11、14、17、20 若しくは 28 から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、及び／又は

i i) 任意に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を有する配列番号 4、12、15、18、21 若しくは 29 から選択される H C D R 2 アミノ酸配列

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、さらに V L ドメインを含み、任意に該 V L ドメインが、配列番号 6、23 若しくは 31 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 若しくは 100% 同一のアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体又はそのフラグメントであって、L C D R 3 を含み、

a) 前記 L C D R 3 アミノ酸配列が、任意に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を有する配列番号 9、26 若しくは 33 から選択され、又は

b) 前記 L C D R 3 アミノ酸配列が、C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、配列番号 6、23 若しくは 31 による V L ドメインに由来し、任意に前記 L C D R 3 配列が 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む

抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

請求項 5 又は請求項 6 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記 V L ドメインが、

a) i) 任意に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を有する配列番号 7、24 若しくは 32 の L C D R 1 アミノ酸配列、又は

10

20

30

40

50

i i) 任意に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号6、23若しくは31によるV Lドメインに由来し、C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義されるL C D R 1アミノ酸配列、及び／又は

b) i) 任意に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を有する配列番号8若しくは25のL C D R 2アミノ酸配列、又は

i i) 任意に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号6、23若しくは31によるV Lドメインに由来し、C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義されるL C D R 2アミノ酸配列

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項8】

10

P A R 2に特異的に結合する、任意に請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

配列番号2、10、13、16、19若しくは27から選択されるV H領域、又はこれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列、及び

配列番号6、23若しくは31によるV L領域、又はこれらに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項9】

20

前記V H領域が、配列番号2に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項10】

前記V H領域が、配列番号10に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項11】

前記V H領域が、配列番号13に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項12】

前記V H領域が、配列番号16に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項13】

前記V H領域が、配列番号19に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項14】

40

前記V H領域が、配列番号27に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

前記V L領域が、配列番号6に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項16】

前記V L領域が、配列番号23に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、

50

85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項17】

前記V L領域が、配列番号31に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項18】

前記V H領域が、配列番号2と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記V L領域が、配列番号6と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、任意に請求項1～17のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項19】

前記V H領域が、配列番号10と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記V L領域が、配列番号6と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、任意に請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項20】

前記V Hが、配列番号13と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記V L領域が、配列番号6と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、任意に請求項1～19のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項21】

前記V H領域が、配列番号16と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記V L領域が、配列番号6と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、任意に請求項1～20のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項22】

前記V H領域が、配列番号19と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記V L領域が、配列番号23と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、任意に請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項23】

前記V H領域が、配列番号27と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記V L領域が、配列番号31と同一又は少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、任意に請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項24】

任意に請求項1～23のいずれか一項に記載のPAR2に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、重鎖可変ドメイン（V H）及び軽鎖可変ドメイン（V L）を含み、前記V Hが、

（a） 配列番号3のアミノ酸配列、又は配列番号3に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むH C D R 1、

（b） 配列番号4のアミノ酸配列、又は配列番号4に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むH C D R 2、

（c） 配列番号5のアミノ酸配列、又は配列番号5に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むH C D R 3

40

を含み、前記V Lが、

（d） 配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むL C D R 1、

（e） 配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むL C D R 2、及び

（f） 配列番号9のアミノ酸配列、又は配列番号9に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むL C D R 3

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項25】

任意に請求項1～24のいずれか一項に記載のPAR2に特異的に結合する抗体又はそ

50

の抗原結合フラグメントであって、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含み、前記VHが、

（a） 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR1、

（b） 配列番号12のアミノ酸配列、又は配列番号12に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR2、及び

（c） 配列番号5のアミノ酸配列、又は配列番号5に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR3

を含み、前記VLが、

（d） 配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR1、

（e） 配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR2、及び

（f） 配列番号9のアミノ酸配列、又は配列番号9に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR3

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項26】

任意に請求項1～25のいずれか一項に記載のPAR2に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含み、前記VHが、

（a） 配列番号14のアミノ酸配列、又は配列番号14に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR1、

（b） 配列番号15のアミノ酸配列、又は配列番号15に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR2、

（c） 配列番号5のアミノ酸配列、又は配列番号5に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR3

を含み、前記VLが、

（d） 配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR1、

（e） 配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR2、及び

（f） 配列番号9のアミノ酸配列、又は配列番号9に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR3

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項27】

任意に請求項1～26のいずれか一項に記載のPAR2に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含み、前記VHが、

（a） 配列番号17のアミノ酸配列、又は配列番号17に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR1、

（b） 配列番号18のアミノ酸配列、又は配列番号18に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR2、

（c） 配列番号5のアミノ酸配列、又は配列番号5に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むHCDR3

を含み、前記VLが、

（d） 配列番号7のアミノ酸配列、又は配列番号7に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR1、

（e） 配列番号8のアミノ酸配列、又は配列番号8に3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含むLCDR2、及び

（f） 配列番号9のアミノ酸配列、又は配列番号9に3個、2個若しくは1個のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 3
を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 28】

任意に請求項 1～27 のいずれか一項に記載の P A R 2 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含み、前記 V H が、

(a) 配列番号 20 のアミノ酸配列、又は配列番号 20 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む H C D R 1、

(b) 配列番号 21 のアミノ酸配列、又は配列番号 21 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む H C D R 2、

(c) 配列番号 22 のアミノ酸配列、又は配列番号 22 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む H C D R 3

を含み、前記 V L が、

(d) 配列番号 24 のアミノ酸配列、又は配列番号 24 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 1、

(e) 配列番号 25 のアミノ酸配列、又は配列番号 25 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 2、及び

(f) 配列番号 26 のアミノ酸配列、又は配列番号 26 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 3

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 29】

任意に請求項 1～28 のいずれか一項に記載の P A R 2 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含み、前記 V H が、

(a) 配列番号 28 のアミノ酸配列、又は配列番号 28 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む H C D R 1、

(b) 配列番号 29 のアミノ酸配列、又は配列番号 29 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む H C D R 2、

(c) 配列番号 30 のアミノ酸配列、又は配列番号 30 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む H C D R 3

を含み、前記 V L が、

(d) 配列番号 32 のアミノ酸配列、又は配列番号 32 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 1、

(e) 配列番号 25 のアミノ酸配列、又は配列番号 25 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 2、及び

(f) 配列番号 33 のアミノ酸配列、又は配列番号 33 に 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む L C D R 3

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 30】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントが P A R 2 の P A R 2 ペプチド活性化を阻害する、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 31】

前記抗体が、配列番号 41、42、43 及び 44 のアミノ酸配列からなる又はこれを含むエピトープに結合する、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 32】

P A R 2 活性化の阻害が P A R 2 のテザーリガンド結合の阻害を含む、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 33】

P A R 2 に特異的に結合し、P A R 2 活性化ペプチドの P A R 2 への結合を阻害する、

10

20

30

40

50

任意に請求項 1～3 2 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3 4】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、クローン Y 0 2 2 0 6 5、Y 0 2 2 8 7 0、Y 0 2 2 8 7 7、Y 0 2 2 8 8 3、Y 0 2 2 0 5 4 及び／又は Y 0 2 1 1 7 1 から選択される抗体又はフラグメントが結合するエピトープと同一のエピトープに結合する、任意に請求項 1～3 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3 5】

前記抗体又はフラグメントが結合するエピトープが、水素－重水素交換（HDX）及び／又は部位特異的変異誘発及びフローサイトメトリーにより同定される、請求項 1～3 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 3 6】

任意に請求項 1～3 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、PAR2 に特異的に結合し、PAR2 活性化ペプチドの PAR2 への結合を阻害し、前記抗体又はフラグメントが、1～100 nM の IC50 で PAR2 活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（IP）の蓄積を阻害し、任意に PAR2 ペプチドを介する IP の蓄積が、PAR2 ペプチド刺激 IP シグナル伝達アッセイを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3 7】

任意に請求項 1～3 6 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントが、1～300 nM の IC50 でトリプシンを介する IP の蓄積を阻害し、任意にトリプシンを介する IP の蓄積がトリプシン刺激 IP シグナル伝達アッセイを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 3 8】

任意に請求項 1～3 7 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、1～100 nM の IC50 で PAR2 活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（IP）の蓄積を阻害し、任意に PAR2 ペプチド阻害が HTRF アッセイを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3 9】

任意に請求項 1～3 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、PAR2 に特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントが PAR2 活性化ペプチドを介するカルシウム動員を任意に 1～100 nM の IC50 で阻害し、任意にカルシウム動員は PAR2 活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 4 0】

任意に請求項 1～3 9 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントがトリプシンを介するカルシウム動員を任意に 1～200 nM の IC50 で阻害し、任意にカルシウム動員が PAR2 活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4 1】

任意に請求項 1～4 0 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントが、細胞表面上の PAR2 への結合時に細胞内に取り込まれず、任意に内在化が FAC を用いた抗体又はフラグメント結合の定量により決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 4 2】

任意に請求項 1～4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントが、リガンド SFLLR を介する PAR1 の活性化を阻害せず、PAR1 の活性化は、リガンド SFLLR 刺激 IP シグナル伝達アッセイを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4 3】

50

任意に請求項 1～42 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントが、600 pM～5 nM 以下の EC50 でカニクイザル PAR2 に結合し、任意にカニクイザル PAR2 結合はフローサイトメトリーを用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 44】

任意に請求項 1～43 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントが、100 pM～10 nM の KD でヒト PAR2 に結合し、任意に結合親和性は表面プラズモン共鳴 (SPR) 又は KinExA を用いて決定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 45】

前記抗体又はフラグメントの PAR2 への結合が pH 7.5～6.0 の間で pH 非依存である、任意に請求項 1～44 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 46】

PAR2 に特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントが PAR1 に結合せず、任意に PAR1 結合がフローサイトメトリー又は ELISA を用いて決定される、任意に請求項 1～45 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 47】

前記抗体又はフラグメントが PAR3 に結合せず、任意に PAR3 結合がフローサイトメトリー又は ELISA を用いて決定される、任意に請求項 1～46 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 48】

前記抗体又はフラグメントが PAR4 に結合せず、任意に PAR4 結合がフローサイトメトリー又は ELISA を用いて決定される、任意に請求項 1～47 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 49】

任意に請求項 1～48 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、3 mg/kg の抗体又はフラグメントが、30 日間にわたり、白血球における PAR2 刺激誘導応答を 95% 超抑制し、抑制が刺激誘導遺伝子シグネチャーを決定することにより測定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 50】

任意に請求項 1～49 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、1 mg/kg の抗体又はフラグメントが、30 日間にわたり、白血球における PAR2 ペプチド誘発応答を 90% 超抑制し、抑制が刺激誘導遺伝子シグネチャーを決定することにより測定される、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 51】

前記抗体又はフラグメントが PAR2 に結合し、PAR1 テザーリガンドによる PAR2 の交差活性化を阻害する、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 52】

治療における使用のための、請求項 1～51 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 53】

例えば、アトピー性皮膚炎、喘息、がん（乳がん、黒色腫、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（慢性、炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に関連した胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム病関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、及びリンパ脈管筋腫症などの PAR2 介在性疾患又は病態の治療における使用のための、請求項 1～52 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

例えば、アトピー性皮膚炎、喘息、がん（乳がん、黒色腫、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（慢性、炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に関連した胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム病関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、及びリンパ管筋腫症などの P A R 2 介在性疾患又は病態の治療用医薬品の製造における、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。

【請求項 5 5】

患者の P A R 2 介在性疾患又は病態（例えば、疼痛（任意に、疼痛は慢性疼痛、炎症性疼痛、術後疼痛、神経障害性疼痛、骨折関連疼痛、痛風関連疼痛、がん関連疼痛、炎症性腸疾患に関連した胃腸痛などから独立して選択される））を治療する方法であって、前記患者（例えば、ヒト）に、請求項 1 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントの治療有効量を投与することを含み、これにより P A R 2 介在性疾患又は病態を治療する方法。

10

【請求項 5 6】

請求項 5 3 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント、請求項 5 4 に記載の使用、又は請求項 5 5 に記載の方法であって、さらに追加の治療を施すことを含み、任意に追加の治療が、抗炎症薬、鎮痛薬、非ステロイド性抗炎症薬（N S A I D）、コルチコステロイド、ヒアルロン酸、アセトアミノフェン、コデイン、ロルセツト、ロルタブ、ピコジン、ヒドロコドン、モルヒネ、オキシコンチン、ロキシコドン、ペルコセツト、アスピリン、セレコキシブ、プレガバリン、アバタセプト、アダリムマブ、アナキンラ、セルトリズマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、トシリズマブ及びトファシチニブからなる群から独立して選択される 1 以上の追加の治療薬を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント、使用、又は方法。

20

【請求項 5 7】

請求項 1 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント及び薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体を含む医薬組成物であって、

任意に、鎮痛剤（例えば、抗炎症剤（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、ナプロキセンを含む N S A I D S）、パラセタモール、オピオイド（例えば、コデイン、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニール、ブプレノルフィン））、アミトリプチリン、ガバペンチン、抗がん剤（例えば、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタード、ニトロ尿素）、代謝拮抗薬（例えば、葉酸類似体、ピリミジン及びプリン類似体）、抗生物質及び酵素（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、レーアスパラギナーゼ）、天然物（例えば、ピンカアルカロイド、タキセン、テカン）、ホルモン及び拮抗薬（例えば、プロゲステロン、エストロゲン、G n R H、抗エストロゲン）、ヒドロキシ尿素、免疫調節薬、チロシンキナーゼ阻害剤、生物学的応答修飾剤、分子標的療法（例えば、抗体複合薬）、白金系療法（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン）からなる群から独立して選択される 1 種以上の追加の治療薬をさらに含む医薬組成物。

30

40

【請求項 5 8】

請求項 5 7 に記載の医薬組成物、又は請求項 5 7 に記載の医薬組成物を含むキットであって、該医薬組成物が、P A R 2 介在性疾患又は病態、例えばアトピー性皮膚炎、喘息、がん（乳がん、メラノーマ、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（慢性、炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に伴う胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎及びリンパ管筋腫症から選択される疾患又は病態の治療用である、医薬組成物又はキット。

【請求項 5 9】

50

患者の前記疾患若しくは病態の治療に使用するためのラベル若しくは説明書と組み合わせた請求項 5 7 若しくは請求項 5 8 に記載の医薬組成物、又は請求項 5 8 に記載のキットであって、任意にラベル又は説明書が、販売承認番号（例えば、FDA 又は EMA の承認番号）を含み、任意に前記キットが前記抗体又はフラグメントを含む IV もしくは注射デバイスを含む、医薬組成物又はキット。

【請求項 6 0】

前記 VH ドメインが以下を含む、請求項 1 ～ 5 3 及び 5 6 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント：

（a）配列番号 5 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）配列番号 3 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 3 の HCDR1 アミノ酸配列；及び／又は

ii）配列番号 4 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 4 の HCDR2 アミノ酸配列；

（b）配列番号 5 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）配列番号 11 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 11 の HCDR1 アミノ酸配列；及び／又は

ii）配列番号 12 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 12 の HCDR2 アミノ酸配列；

（c）配列番号 5 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）配列番号 14 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 14 の HCDR1 アミノ酸配列；及び／又は

ii）配列番号 15 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 15 の HCDR2 アミノ酸配列；

（d）配列番号 5 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）配列番号 17 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 17 の HCDR1 アミノ酸配列；及び／又は、

ii）配列番号 18 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 18 の HCDR2 アミノ酸配列；

（e）配列番号 22 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 22 の HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）配列番号 20 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 20 の HCDR1 アミノ酸配列；及び／又は

ii）配列番号 21 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 21 の HCDR2 アミノ酸配列；

（f）配列番号 30 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 30 の HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）配列番号 28 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 28 の HCDR1 アミノ酸配列；及び／又は

ii）配列番号 29 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 29 の HCDR2 アミノ酸配列；

（g）Chothia 又は Kabat によって定義され、配列番号 2 から選択される VH ドメインに由来する HCDR3 アミノ酸配列；又は Chothia 又は Kabat によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 2 から選択される VH ドメインに由来する HCDR3 アミノ酸配列；及び

i）Chothia 又は Kabat によって定義され、配列番号 2 から選択される VH ドメインに由来する HCDR1 アミノ酸配列；又は Chothia 又は Kabat によ

10

20

30

40

50

i i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 2 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 2 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；

10

i i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 10 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 10 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；

20

i i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 1 3 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 1 3 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；

30

i i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 16 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 16 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；

40

50

i i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 19 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 19 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；

(l) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 27 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 3 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 27 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 3 アミノ酸配列；及び

i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 27 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 1 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 27 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 1 アミノ酸配列；及び／又は

i i) C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、配列番号 27 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 又は K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 27 から選択される V H ドメインに由来する H C D R 2 アミノ酸配列。

【請求項 61】

前記 V L ドメインが以下を含む、請求項 1 ～ 53、56 及び 60 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント：

(a) 配列番号 9 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 9 の L C D R 3 アミノ酸配列；及び

i) 配列番号 7 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 7 の L C D R 1 アミノ酸配列；及び／又は

i i) 配列番号 8 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 8 の L C D R 2 アミノ酸配列；

(b) 配列番号 26 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 26 の L C D R 3 アミノ酸配列；及び

i) 配列番号 24 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 24 の L C D R 1 アミノ酸配列；及び／又は

i i) 配列番号 25 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 25 の L C D R 2 アミノ酸配列；

(c) 配列番号 33 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 33 の L C D R 3 アミノ酸配列；及び

i) 配列番号 32 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 32 の L C D R 1 アミノ酸配列；及び／又は

i i) 配列番号 25 又は 3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 25 の L C D R 2 アミノ酸配列；

(d) C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、配列番号 6 から選択される V L ドメインに由来する L C D R 3 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 6 から選択される V L ドメインに由来する L C D R 3 アミノ酸配列；及び

i) C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、配列番号 6 から選択される V L ドメインに由来する L C D R 1 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 6 から選択される V L ドメインに由来する L C D R 1 アミノ酸配列；及び／又は

i i) C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、配列番号 6 から選択される V L ドメインに由来する L C D R 2 アミノ酸配列；又は C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、3 個、2 個若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 6 から選択される V L ドメインに由来する L C D R 2 アミノ酸配列；

(e) C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、配列番号 23 から選択さ

10

20

30

40

50

れるVLDメインに由来するLCDR3アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabababによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号23から選択されるVLDメインに由来するLCDR3アミノ酸配列；及び

i) Chothia若しくはKabababによって定義され、配列番号23から選択されるVLDメインに由来するLCDR1アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabababによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号23から選択されるVLDメインに由来するLCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) Chothia若しくはKabababによって定義され、配列番号23から選択されるVLDメインに由来するLCDR2アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabababによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号23から選択されるVLDメインに由来するLCDR2アミノ酸配列；

10

(f) Chothia若しくはKabababによって定義され、配列番号31から選択されるVLDメインに由来するLCDR3アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabababによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号31から選択されるVLDメインに由来するLCDR3アミノ酸配列；及び

i) Chothia若しくはKabababによって定義され、配列番号31から選択されるVLDメインに由来するLCDR1アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabababによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号31から選択されるVLDメインに由来するLCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) Chothia若しくはKabababによって定義され、配列番号31から選択されるVLDメインに由来するLCDR2アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabababによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号31から選択されるVLDメインに由来し、LCDR2アミノ酸配列。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトPAR2に結合することができる抗体又はその抗原結合フラグメントに関する。

本発明はさらに、ヒトPAR2受容体のエピトープに特異的に結合し、ヒトPAR2の活性化を阻止、拮抗、抑制又は防止する抗体に関する。

30

本発明は、上記抗体の生産方法、使用方法及び医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

慢性疼痛と慢性炎症は、世界の健康に対する最大の脅威の2つである。慢性疼痛のみで、約5000万人のアメリカ人成人、あるいは人口の20%に影響を与えている。

【0003】

慢性疼痛は、6ヶ月以上の間、ほとんどの日又は毎日経験される持続性の疼痛として定義される衰弱性の病態である(<https://uspainfoundation.org/wp-content/uploads/2018/09/Chronic-pain-facts-infographic.pdf>)。

40

【0004】

慢性炎症は、がん、心血管疾患及び糖尿病を含む多くの死亡数をもたらす疾患において中心的な役割を果たす。

【0005】

2020年までに慢性疾患が世界の全死亡の約4分の3を占めるであろうことが予測されている(Helamo, Delil and Dileba, 2017)。

【0006】

慢性疼痛は世界的な負担であるにもかかわらず、現在利用可能な治療では、患者は30%の疼痛緩和しか得られない(Rice, Smith and Blyth, 2016)。

【0007】

50

プロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) は、プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) ファミリーに属する G タンパク質共役型受容体である。

【0008】

PAR2 は、プロテアーゼの上昇がみられる炎症、疼痛及びその他の病態生理学的応答において重要な役割を果たすとされている。

【0009】

PAR2 は、特に脾臓、肝臓、腎臓、小腸及び大腸で高いレベルで広く発現している。

【0010】

中等度の発現は、多数の上皮細胞及び内皮細胞並びに臓器で検出され、脳又は骨格筋での発現の証拠は限られている。

【0011】

さらに、PAR2 は、T 細胞、単球、マクロファージ、好中球、肥満細胞及び好酸球などの免疫細胞及び炎症細胞にも発現している。

【0012】

文献では、PAR2 の遮断が、アトピー性皮膚炎、喘息、がん（乳がん、黒色腫、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に関連した胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム病関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、リンパ脈管筋腫症、アレルギー性鼻結膜炎 (AR)、好酸球性食道炎 (EoE) 及び上皮バリア機能に関連する疾患において臨床的利益をもたらす可能性が高いことを示唆している (Yau et al., 2013; Heuberger and Schuepbach, 2019 の総説を参照)。

【0013】

したがって、PAR2 拮抗薬は、幅広い患者に利益をもたらす、疼痛及び／又は炎症関連の病態を軽減する可能性があると考えられている。

【0014】

したがって、PAR2 は、いくつかの疾患適応症を治療するための貴重な治療標的とみなされている。

【0015】

PAR2 を特異的に阻害することができる治療部分を同定する必要がある。

【0016】

そのような薬剤は、PAR2 の活性化のすべてのメカニズムを阻害することができれば特に望ましいものとなるであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本明細書では、PAR2 に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントが提供される。

本開示の抗体及び抗原結合フラグメントは、特に、PAR2 介在性シグナル伝達を阻害すること、並びに PAR2 活性及び／又はシグナル伝達によって引き起こされる又はそれに関連する疾患及び障害を治療することに有用である。

【0018】

本明細書で提供される抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2 に特異的に結合し、その活性を阻害する。ここで抗体又はそのフラグメントは、PAR2 の細胞外ループ (ECL) と N 末端セグメントを有する、ヘリックス 0 及び 1 を含むエピトープに結合する。

【0019】

これらの両方の領域に結合することにより、PAR2 活性の包括的な機能的阻害につながることができると考えられる。

【0020】

10

20

30

40

50

したがって、本明細書で提供される抗体は、プロテアーゼ切断を介する P A R 2 活性化（例えば、トリプシンによる）及びペプチド介在性 P A R 2 活性化（例えば、P A R 2 - A P 又は P A R 1 - A P による）の両方を阻害することができるという点で二重活性である。

【0021】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2 の不連続エピトープに特異的に結合する。エピトープは、ヘリックス 0 / 1 に先行する非ヘリックスセグメント 1、ヘリックス 0 / 1 領域及び E C L 3 の 1 つ以上の領域を含み、任意に、セグメント 1、ヘリックス 0 / 1 及び E C L 3 の領域は、配列番号 1 のヒト P A R 2 配列に従って番号付けした場合、P A R 2 の V 5 5 - F 7 7、L 3 0 6 - Y 3 1 1 及び F 3 1 2 - Y 3 2 6 から選択される。

10

【0022】

実施形態において、P A R 2 に特異的に結合し、その活性を阻害する抗体又はその抗原結合フラグメントは、以下の H C D R 3 を含む V H ドメインを含む：（a）配列番号 5、2 2 若しくは 3 0 のアミノ酸配列からなる若しくはそれを含む H C D R 3；又は配列番号 5、2 2 若しくは 3 0 に 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を有する配列；（b）配列番号 5、2 2 若しくは 3 0 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 3 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 若しくは 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む H C D R 3；又は d）配列番号 2、1 0、1 3、1 6、1 9 若しくは 2 7 から選択される V H ドメインからの K a b a t 若しくは C h o t h i a により定義される H C D R 3 アミノ酸配列。

20

【0023】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは V H ドメインを含み、V H ドメインは以下を含む：（i）配列番号 3、1 1、1 4、1 7、2 0 若しくは 2 8 から選択される H C D R 1 アミノ酸配列（任意に、3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）；及び／又は（i i）配列番号 4、1 2、1 5、1 8、2 1 又は 2 9 から選択される H C D R 2 アミノ酸配列（任意に、3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）。

【0024】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V L ドメインを含み、任意に、V L ドメインは、配列番号 6、2 3 又は 3 1 に対して少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 3 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。

30

【0025】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、L C D R 3 を含み、a）L C D R 3 アミノ酸配列は以下から選択される：配列番号 9、2 6 若しくは 3 3（任意に、3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）；又は b）L C D R 3 アミノ酸配列は、C h o t h i a 若しくは K a b a t により定義され、配列番号 6、2 3 若しくは 3 1 による V L ドメインからのものである。任意に、L C D R 3 配列は、3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む。

【0026】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V L ドメインを含み、V L ドメインは以下を含む：a）i）配列番号 7、2 4 若しくは 3 2 の L C D R 1 アミノ酸配列（任意に、3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）；又は i i）配列番号 6、2 3 若しくは 3 1 による V L ドメインからのものであり、C h o t h i a 若しくは K a b a t により定義される L C D R 1 アミノ酸配列（任意に、L C D R 1 配列は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）；及び／又は b）i）配列番号 8 若しくは 2 5 の L C D R 2 アミノ酸配列（任意に、3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）；又は i i）配列番号 6、2 3 若しくは 3 1 による V L ドメインからのものであり、C h o t h i a 若しくは K a b a t により定義される L C D R 2 アミノ酸配列（任意に、L C D R 2 配列は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む）。

40

【0027】

50

本明細書では、配列番号 2、10、13 及び 16、19 若しくは 27 から選択される V H 領域、又はそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 若しくは 100% 同一のアミノ酸配列；及び、配列番号 6、23 若しくは 31 による V L 領域、又はそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 若しくは 100% 同一のアミノ酸配列を含む、P A R 2 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。

【0028】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 2 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0029】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 10 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0030】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 13 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0031】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 16 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

20

【0032】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 19 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0033】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 27 に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

30

【0034】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V L 領域を含み、V L 領域は、配列番号 23 に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0035】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V L 領域を含み、V L 領域は、配列番号 31 に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

40

【0036】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 2 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、V L 領域は、配列番号 6 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0037】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 10 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、V L 領域は、配列番号 6 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0038】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域

50

は、配列番号 13 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、V L 領域は、配列番号 6 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0039】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 16 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、V L 領域は、配列番号 6 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0040】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 19 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、V L 領域は、配列番号 23 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0041】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、V H 領域を含み、V H 領域は、配列番号 27 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、V L 領域は、配列番号 31 と同一又は少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0042】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは P A R 2 に特異的に結合し、重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ここで、V H は以下を含む：(a) 配列番号 3 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 3 の配列を含む H C D R 1；(b) 配列番号 4 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 4 の配列を含む H C D R 2；(c) 配列番号 5 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の配列を含む H C D R 3。そして V L は以下を含む：(d) 配列番号 7 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 7 の配列を含む L C D R 1；(e) 配列番号 8 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 8 の配列を含む L C D R 2；及び (f) 配列番号 9 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 9 の配列を含む L C D R 3。

20

【0043】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2 に特異的に結合し、重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ここで、V H は以下を含む：(a) 配列番号 11 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 11 の配列を含む H C D R 1；(b) 配列番号 12 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 12 の配列を含む H C D R 2；及び (c) 配列番号 5 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の配列を含む H C D R 3。そして V L は以下を含む：(d) 配列番号 7 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 7 の配列を含む L C D R 1；(e) 配列番号 8 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 8 の配列を含む L C D R 2；及び (f) 配列番号 9 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 9 の配列を含む L C D R 3。

30

【0044】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2 に特異的に結合し、重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ここで、V H は以下を含む：(a) 配列番号 14 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 14 の配列を含む H C D R 1；(b) 配列番号 15 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 15 の配列を含む H C D R 2；(c) 配列番号 5 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の配列を含む H C D R 3。そして V L は以下を含む：(d) 配列番号 7 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 7 の配列を含む L C D R 1；(e) 配列番号 8 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 8 の配列を含む L C D R 2；及び (f) 配列番号 9 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 9 の配列を含む L C D R 3。

40

【0045】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2 に特異的に結合し、重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ここで、V H は以下

50

を含む：（a）配列番号 17 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 17 の配列を含む HCDR1；（b）配列番号 18 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 18 の配列を含む HCDR2；（c）配列番号 5 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 5 の配列を含む HCDR3。そして VL は以下を含む：（d）配列番号 7 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 7 の配列を含む LCDR1；（e）配列番号 8 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 8 の配列を含む LCDR2；及び（f）配列番号 9 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 9 の配列を含む LCDR3。

【0046】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2 に特異的に結合し、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。ここで、VH は以下を含む：（a）配列番号 20 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 20 の配列を含む HCDR1；（b）配列番号 21 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 21 の配列を含む HCDR2；（c）配列番号 22 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 22 の配列を含む HCDR3。そして VL は以下を含む：（d）配列番号 24 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 24 の配列を含む LCDR1；（e）配列番号 25 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 25 の配列を含む LCDR2；及び（f）配列番号 26 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 26 の配列を含む LCDR3。

【0047】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2 に特異的に結合し、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。ここで、VH は以下を含む：（a）配列番号 28 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 28 の配列を含む HCDR1；（b）配列番号 29 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 29 の配列を含む HCDR2；（c）配列番号 30 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 30 の配列を含む HCDR3。そして VL は以下を含む：（d）配列番号 32 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 32 の配列を含む LCDR1；（e）配列番号 25 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 25 の配列を含む LCDR2；及び（f）配列番号 33 又は 3、2 若しくは 1 個のアミノ酸置換を含む配列番号 33 の配列を含む LCDR3。

【0048】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 77 に対して少なくとも 80%、85%、90%、95% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0049】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 77 のアミノ酸配列を含む。

【0050】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 78 に対して少なくとも 80%、85%、90%、95% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0051】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む。

【0052】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 79 に対して少なくとも 80%、85%、90%、95% 又は 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0053】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 79 のアミノ酸配列を含む。

【0054】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 80 に対して少な

10

20

30

40

50

くとも 80%、85%、90%、95%又は100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0055】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号80のアミノ酸配列を含む。

【0056】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号83に対して少なくとも80%、85%、90%、95%又は100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0057】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号83のアミノ酸配列を含む。

【0058】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号84に対して少なくとも80%、85%、90%、95%又は100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0059】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号84のアミノ酸配列を含む。

【0060】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、VHドメインを含む。ここで、VHドメインは以下を含む：

(a) 配列番号5又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号5のHCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号3又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号3のHCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号4又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号4のHCDR2アミノ酸配列；

(b) 配列番号5又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号5のHCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号11又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号11のHCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号12又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号12のHCDR2アミノ酸配列；

(c) 配列番号5又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号5のHCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号14又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号14のHCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号15又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号15のHCDR2アミノ酸配列；

(d) 配列番号5又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号5のHCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号17又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号17のHCDR1アミノ酸配列；及び／又は、

ii) 配列番号18又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号18のHCDR2アミノ酸配列；

(e) 配列番号22又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号22のHCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号20又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号20のHCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号21又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号21のHCDR2アミノ酸配列；

(f) 配列番号30又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号30の

10

20

30

40

50

i j) C h o t h i a 若しくは K a b a t によって定義され、配列番号 16 から選択さ

50

れるVHドメインに由来するHCDR2アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号16から選択されるVHドメインに由来するHCDR2アミノ酸配列；

(k) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号19から選択されるVHドメインに由来するHCDR3アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号19から選択されるVHドメインに由来するHCDR3アミノ酸配列；及び

i) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号19から選択されるVHドメインに由来するHCDR1アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号19から選択されるVHドメインに由来するHCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号19から選択されるVHドメインに由来するHCDR2アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号19から選択されるVHドメインに由来するHCDR2アミノ酸配列；

(l) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号27から選択されるVHドメインに由来するHCDR3アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号27から選択されるVHドメインに由来するHCDR3アミノ酸配列；及び

i) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号27から選択されるVHドメインに由来するHCDR1アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号27から選択されるVHドメインに由来するHCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号27から選択されるVHドメインに由来するHCDR2アミノ酸配列；又はChothia若しくはKabattによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号27から選択されるVHドメインに由来するHCDR2アミノ酸配列。

【0061】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、VLドメインを含む。ここで、VLドメインは以下を含む：

(a) 配列番号9又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号9のLCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号7又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号7のLCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号8又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号8のLCDR2アミノ酸配列；

(b) 配列番号26又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号26のLCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号24又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号24のLCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号25又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号25のLCDR2アミノ酸配列；

(c) 配列番号33又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号33のLCDR3アミノ酸配列；及び

i) 配列番号32又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号32のLCDR1アミノ酸配列；及び／又は

ii) 配列番号25又は3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号25のLCDR2アミノ酸配列；

(d) Chothia若しくはKabattによって定義され、配列番号6から選択されるVLドメインに由来するLCDR3アミノ酸配列；又はChothia若しくはKab

a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号6から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 3アミノ酸配列；及び

i) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号6から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 1アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号6から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 1アミノ酸配列；及び／又は

i i) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号6から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 2アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号6から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 2アミノ酸配列；

10

(e) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号23から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 3アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号23から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 3アミノ酸配列；及び

i) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号23から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 1アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号23から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 1アミノ酸配列；及び／又は

i i) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号23から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 2アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号23から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 2アミノ酸配列；

20

(f) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号31から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 3アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号31から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 3アミノ酸配列；及び

i) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号31から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 1アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号31から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 1アミノ酸配列；及び／又は

30

i i) C h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、配列番号31から選択されるV Lドメインに由来するL C D R 2アミノ酸配列；又はC h o t h i a若しくはK a b a tによって定義され、3個、2個若しくは1個のアミノ酸置換を含む配列番号31から選択されるV Lドメインに由来し、L C D R 2アミノ酸配列。

【0062】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は単離又は精製される。

【0063】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2ペプチドの活性化を阻害する。

【0064】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2に特異的に結合し、P A R 2活性を阻害する。P A R 2活性の阻害は、P A R 2受容体のセグメント1、ヘリックス0／1、E C L 3への結合を含む。

40

【0065】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2に特異的に結合し、P A R 2活性化を阻害する。P A R 2活性化の阻害は、P A R 2テザーリガンド結合を阻害することを含む。

【0066】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2に特異的に結合し、P A R 2活性化を阻害する。P A R 2活性化の阻害は、P A R 1－P A R 2ヘテロ二量

50

体における P A R 1 テザーリガンドによる交差活性化を阻害することを含む。

【 0 0 6 7 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2 に特異的に結合し、P A R 2 活性化ペプチドの P A R 2 への結合を阻害する。

【 0 0 6 8 】

実施形態において、本明細書で提供される抗体は、P A R 2 のプロテアーゼ切断を介する活性化（例えば、トリプシンによる）及び P A R 2 のペプチド介在性活性化（例えば、P A R 2 - A P 又は P A R 1 - A P による）を阻害することができる。

【 0 0 6 9 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、Y 0 2 2 0 6 5、Y 0 2 2 8 7 0、Y 0 2 2 8 7 7、Y 0 2 2 8 8 3、Y 0 2 2 0 5 4 及び／又は Y 0 2 1 1 7 1 クローンから選択された抗体又はフラグメントが特異的に結合するエピトープと同一のエピトープに結合する。

10

【 0 0 7 0 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、抗体又はフラグメントが結合するエピトープに結合する。エピトープは、水素重水素交換（H D X）及び／又は部位特異的変異誘発及びフローサイトメトリーにより同定される。

【 0 0 7 1 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、P A R 2 に特異的に結合し、P A R 2 活性化ペプチドの P A R 2 への結合を阻害する。抗体又はフラグメントは、1 ~ 1 0 0 n M の I C 5 0 で P A R 2 活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（I P）の蓄積を阻害し、任意に P A R 2 ペプチドを介する I P の蓄積は、P A R 2 ペプチド刺激 I P シグナル伝達アッセイを用いて決定される。

20

【 0 0 7 2 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、トリプシン介在性 P A R 2 活性化を阻害する。

【 0 0 7 3 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、1 ~ 3 0 0 n M の I C 5 0 でトリプシンを介する I P の蓄積を阻害する；任意にトリプシンを介する I P の蓄積は、トリプシン刺激 I P シグナル伝達アッセイを用いて決定される。

30

【 0 0 7 4 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、1 ~ 1 0 0 n M の I C 5 0 で P A R 2 活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（I P）の蓄積を阻害し、任意に P A R 2 ペプチド阻害は、H T R F アッセイを用いて決定される。

【 0 0 7 5 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは P A R 2 に特異的に結合し、抗体又はフラグメントは、P A R 2 活性化ペプチドを介するカルシウム動員を阻害し、任意に 1 ~ 1 0 0 n M の I C 5 0 で阻害する。任意にカルシウム動員は、P A R 2 活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

【 0 0 7 6 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、トリプシンを介するカルシウム動員を阻害し、任意に 1 ~ 2 0 0 n M の I C 5 0 で阻害する。また任意にカルシウム動員は、P A R 2 活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

40

【 0 0 7 7 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、細胞表面上の P A R 2 への結合時に細胞内に取り込まれない。任意に、内在化は、F A C S を用いて抗体又はフラグメントの結合を定量することにより決定される。

【 0 0 7 8 】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、リガンド S F L L R を介する P A R 1 の活性化を阻害せず、P A R 1 の活性化は、リガンド S F L L R 刺激 I P シグ

50

ナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0079】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、600 pM～5 nM以下のEC50でカニクイザルPAR2に結合する。任意に、カニクイザルPAR2結合は、フローサイトメトリーを用いて決定される。

【0080】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、100 pM～10 nMのKDでヒトPAR2に結合する。任意に、結合親和性は、表面プラズモン共鳴（SPR）又はKinExAを用いて決定される。

【0081】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2に特異的に結合し、PAR2ペプチドのPAR2への結合を阻害する。抗体又はフラグメントのPAR2への結合は、pH7.5～6.0の間でpH非依存적である。

【0082】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR1に結合しない。任意に、PAR1結合は、フローサイトメトリー又はELISAを用いて決定される。

【0083】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR3に結合しない。任意に、PAR3結合は、フローサイトメトリー又はELISAを用いて決定される。

【0084】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR4に結合しない。任意に、PAR4結合は、フローサイトメトリー又はELISAを用いて決定される。

【0085】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2に特異的に結合し、PAR2ペプチドのPAR2への結合を阻害する。3 mg/kgの抗体又はフラグメントは、30日間にわたり、白血球におけるPAR2刺激誘導応答を95%超抑制し、抑制は、刺激誘導遺伝子シグネチャーを決定することにより測定される。

【0086】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2に特異的に結合し、PAR2ペプチドのPAR2への結合を阻害する。1 mg/kgの抗体又はフラグメントは、30日間にわたり、白血球におけるPAR2ペプチド誘発応答を90%超抑制し、抑制は、刺激誘導遺伝子シグネチャーを決定することにより測定される。

【0087】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2への結合において機能的リガンドAZ8838と競合する。

【0088】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2への結合においてAZ8838と直接競合する。

【0089】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2ホモ二量体に結合する。

【0090】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、PAR2-PAR1ヘテロ二量体に結合する。任意に結合は、PAR1テザーリガンドによるPAR2の交差活性化を阻害する。

【0091】

本明細書では、治療用のPAR2に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントが提供される。

【0092】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、アトピー性皮膚炎

10

20

30

40

50

、喘息、がん（乳がん、黒色腫、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（慢性、炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に関連した胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム病関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、リンパ脈管筋腫症などのP A R 2介在性疾患又は病態の治療に用いる。

【0093】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、アトピー性皮膚炎、喘息、がん（乳がん、黒色腫、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（慢性、炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に関連した胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム病関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、リンパ脈管筋腫症などのP A R 2介在性疾患又は病態の治療用医薬品の製造に用いる。

【0094】

本明細書では、患者のP A R 2介在性疾患又は病態（例えば、疼痛（任意に、疼痛は慢性疼痛、炎症性疼痛、術後疼痛、神経障害性疼痛、骨折関連疼痛、痛風関連疼痛、がん関連疼痛、炎症性腸疾患に関連した胃腸痛などから独立して選択される））を治療する方法が提供される。この方法は、前記患者（例えば、ヒト）に、本開示の抗体又はそのフラグメントの治療有効量を投与することを含み、これによりP A R 2介在性疾患又は病態が治療される。

【0095】

実施形態において、本開示の抗体は、さらなる療法と組み合わせること、又はそれと共に投与することができる。任意には、さらなる療法は、鎮痛剤（例えば、抗炎症剤（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、ナプロキセンを含むN S A I D S）、パラセタモール、オピオイド（例えば、コデイン、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニール、ブプレノルフィン））、アミトリプチリン、ガバペンチン、抗がん剤（例えば、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタード、ニトロ尿素）、代謝拮抗薬（例えば、葉酸類似体、ピリミジン及びプリン類似体）、抗生物質及び酵素（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、L-アスパラギナーゼ）、天然物（例えば、ビンカアルカロイド、タキセン、テカン）、ホルモン及び拮抗薬（例えば、プロゲステロン、エストロゲン、G n R H、抗エストロゲン）、ヒドロキシ尿素、免疫調節薬、チロシンキナーゼ阻害剤、生物学的応答修飾剤、分子標的療法（例えば、抗体複合薬）、白金系療法（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン）からなる群から独立して選択される1種以上のさらなる治療薬を含み；及び／又は任意には、さらなる療法は、放射線療法及び／又は腫瘍の外科的切除から選択される。

【0096】

本明細書では、本開示の抗体又はフラグメント及び薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体を含む医薬組成物が提供される。その医薬組成物は、任意に、鎮痛剤（例えば、抗炎症剤（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、ナプロキセンを含むN S A I D S）、パラセタモール、オピオイド（例えば、コデイン、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニール、ブプレノルフィン））、アミトリプチリン、ガバペンチン、抗がん剤（例えば、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタード、ニトロ尿素）、代謝拮抗薬（例えば、葉酸類似体、ピリミジン及びプリン類似体）、抗生物質及び酵素（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、L-アスパラギナーゼ）、天然物（例えば、ビンカアルカロイド、タキセン、テカン）、ホルモン及び拮抗薬（例えば、プロゲステロン、エストロゲン、G n R H、抗エストロゲン）、ヒドロキシ尿素、免疫調節薬、チロシンキナーゼ阻害剤、生物学的応答修飾剤、分子標的療法（例えば、抗体複合薬）、白金系療法（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン）からなる群から独立して選択される1種以上のさらなる治療薬をさらに含む。

【0097】

本明細書では、本開示の医薬組成物又は前記医薬組成物を含むキットが提供される。該組成物は、例えば、アトピー性皮膚炎、喘息、がん（乳がん、黒色腫、頭頸部がんなど様々ながん）、疼痛（慢性、炎症性、術後、神経障害性、骨折、痛風、がん、炎症性腸疾患に関連した胃腸管系）、関節リウマチ及び関連するブドウ膜炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、変形性関節症、リウマチ性多発筋痛症、強直性脊椎炎、ライター病、乾癬性関節炎、慢性ライム病関節炎、スティル病、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、及びリンパ脈管筋腫症から選択されるPAR2介在性疾患又は病態の治療のためのものである。

【0098】

本明細書では、本開示の医薬組成物又は患者の疾患若しくは病態の治療に使用するためのラベル又は説明書と組み合わせた本開示のキットが提供される。任意に、ラベル又は説明書は、販売承認番号（例えば、FDA又はEMAの承認番号）を含む；任意に、キットは、前記抗体又はフラグメントを含むIV又は注射デバイスを含む。

10

【0099】

実施形態において、アミノ酸置換は、相同置換を含む。

【0100】

これらのアミノ酸置換は、保存的置換であり得る。

【0101】

保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を指す。

20

【0102】

アミノ酸残基の側鎖が類似しているファミリーは、当技術分野で定義されている。

【0103】

これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、 β 分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。

30

【0104】

いくつかの態様では、抗PAR-2抗体において必須でないと予測されるアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基で置換される。

【0105】

抗原結合を排除しない保存的アミノ酸置換を同定する方法は、当該技術分野でよく知られている（例えば、Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 及びBurks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)を参照）。

【0106】

実施形態において、アミノ酸置換は、pH 7.4～7.6でのPAR2結合アッセイ（例えば、SPR又はKinexaアッセイ）で試験した場合、配列番号16のアミノ酸配列を有するVHと配列番号6のアミノ酸配列を有するVLを有する抗体又はその抗原結合フラグメントと比較して、ヒトPAR2に対する抗体又はその抗原結合フラグメントの結合親和性を1000倍、800倍、700倍、500倍、400倍、300倍、200倍、100倍、50倍又は10倍以下に低下させる。

40

【0107】

本明細書で提供される抗体は、ヒトであり得る。

【0108】

実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。

50

【0109】

実施形態において、抗体は I g G 抗体である。

【0110】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、抗原結合フラグメントである。

【0111】

実施形態において、抗原結合フラグメントは、s c F v である。

【0112】

実施形態において、抗原結合フラグメントは、F a b である。

【0113】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントはヒト化されている。

【0114】

本明細書で提供される抗体は、ヒト P A R 2 に結合し、カニクイザル P A R 2 とアカゲザル P A R 2 に結合することもできるが、マウス及び／又はラット P A R 2 には結合しない。

【0115】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、トリプシン、トリプターゼ及び／又はマトリプターゼが P A R 2 と相互作用することを阻止する。

【0116】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、トリプシンによる P A R 2 の活性化を阻害する。

【0117】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、テザーリガンドの露出を阻害する。

【0118】

実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、テザーリガンドが P A R 2 と相互作用することを阻止する。

【0119】

実施形態において、本明細書では、抗体又はその抗原結合フラグメントを発現することができる核酸が提供される。

【0120】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 4、7 0 及び 7 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を含む。

【0121】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 4、7 0 及び 7 2 のいずれかに対して少なくとも 9 5 % 同一の核酸配列を含む。

【0122】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 4、7 0 及び 7 2 のいずれかの核酸配列を含む。

【0123】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 5、3 6、3 7、3 8、7 1 及び 7 3 のいずれかに対して少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を含む。

【0124】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 5、3 6、3 7、3 8、7 1 及び 7 3 のいずれかに対して少なくとも 9 5 % 同一の核酸配列を含む。

【0125】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 5、3 6、3 7、3 8、7 1 及び 7 3 のいずれかの核酸配列を含む。

【0126】

実施形態において、核酸は、配列番号 3 4 に対して少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を

10

20

30

40

50

含む。

【0127】

実施形態において、核酸は、配列番号34に対して少なくとも95%同一の核酸配列を含む。

【0128】

実施形態において、核酸は、配列番号34の核酸配列を含む。

【0129】

実施形態において、核酸は、配列番号38に対して少なくとも90%同一の核酸配列を含む。

【0130】

実施形態において、核酸は、配列番号38に対して少なくとも95%同一の核酸配列を含む。

【0131】

実施形態において、核酸は、配列番号38の核酸配列を含む。

【0132】

好ましい実施形態において、本発明の核酸は単離又は精製される。

【0133】

実施形態において、本開示は、本明細書で開示される核酸のいずれかを含むベクターを提供する。

【0134】

実施形態において、本開示は、本明細書で開示される核酸の1つ以上を含むベクターのセットを提供する。

【0135】

実施形態において、本開示は、本明細書で開示されるベクターの1つ以上を含む宿主細胞を提供する。

【0136】

実施形態において、本開示は、薬学的に許容される担体及び本明細書で開示される抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかを含む組成物を提供する。

【0137】

実施形態において、本開示は、本明細書で開示される抗体又はその抗原結合フラグメントのいずれかを含む凍結乾燥組成物を提供する。

【0138】

実施形態において、本開示は、本明細書で開示される抗体又はその抗原結合フラグメントのいずれかを含む再構成された凍結乾燥組成物を提供する。

【0139】

実施形態において、組成物は、ロゼンジ剤、スプレー剤、経口投与剤、徐放性若しくは持続性放出剤、経粘膜投与剤、シロップ剤、粘膜付着剤、口腔内錠剤、粘膜付着錠剤、局所投与剤、非経口投与剤、注射剤、皮下投与剤、経口溶液剤、直腸投与剤、口腔内投与剤又は経皮投与剤による投与のために製剤化される。

【0140】

実施形態において、本開示は、本明細書で開示される抗体若しくはその抗原結合フラグメントのいずれか又は本明細書で開示される組成物のいずれかを含むキットを提供する。

【0141】

実施形態において、本開示は、それを必要とする被験体の疼痛を治療する方法を提供する。該方法は、被験体に本明細書で開示される組成物のいずれかの薬学的有効量を投与することを含む。

【0142】

一部の実施形態では、疼痛は、侵害受容性、神経障害性及び混合型疼痛からなる群から選択される。

【0143】

一部の実施形態では、疼痛は、頭痛、慢性頭痛、片頭痛、がん、ウイルス感染症、関節リウマチ、変形性関節症、クローン病、肝疾患、多発性硬化症、脊髄損傷、帯状疱疹後神経痛、糖尿病性神経障害、腰痛、炎症性心疾患、腎臓病、胃炎、歯肉炎、歯周病、喘息、慢性閉塞性肺疾患、自己免疫疾患、過敏性腸症候群、線維筋痛症、下肢痛、むずむず脚症候群、糖尿病性神経障害、アレルギー性病態、外科的処置、急性若しくは慢性の身体的外傷、骨折又は圧挫傷、脊髄損傷、炎症性疾患、非炎症性神経障害性若しくは機能障害性疼痛病態、又はそれらの組合せに関連する。

【0144】

一部の実施形態では、疼痛は変形性関節症の疼痛である。

【0145】

一部の実施形態では、被験体はヒトである。

【0146】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書で開示される抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかを生産する方法を提供する。該方法は、以下の工程を含む：本明細書で開示される核酸のいずれかを培養細胞に発現させること、抗体又は抗原結合フラグメントを精製すること。

【発明を実施するための形態】

【0147】

本発明は、ヒトPAR2受容体に結合する抗体又は抗原結合フラグメントを提供する。

【0148】

本発明の抗体は、PAR2及びその下流のシグナル伝達カスケードを阻害するのに有用である。

【0149】

本開示について記載する前に、本開示が、本明細書で記載される特定の方法及び実験条件に限定されないこと、そのような方法及び条件は変更可能であることが理解されるべきである。

【0150】

また本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、限定することを意図するものではないことも理解される。

【0151】

PAR2又はGPR11 (PAR2; ヒトPAR2 UniProtタンパク質ID: P55085) は、プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) ファミリーに属する44 kDaのGタンパク質共役受容体である。

【0152】

それは、F2RL1遺伝子 (凝固因子IIレセプター様1) によってコードされる。

【0153】

PAR2は、細胞外N末端のタンパク質分解切断によって活性化されるプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) ファミリーに属する。

【0154】

このファミリーは、異なるプロテアーゼによって活性化されるPAR1~PAR4の4つのメンバーを含む。

【0155】

PAR2は、主にセリンプロテアーゼであるトリプターゼとトリプシンによって活性化され、他のPARファミリーメンバーは主にトロンビンによって活性化されるが、プロテイナーゼ3、第VIIa因子及び第Xa因子もPARの活性化に関与すると報告されている。

【0156】

総説については、Yau et al., 2016; Mrozko et al., 2016; Hamilton and Trejo, 2017; Kagota et al., 2016を参照。

10

20

30

40

50

【0157】

PAR2は、3つの主なメカニズムによって活性化される。

【0158】

そのメカニズムの1つは、プロテアーゼによるN末端細胞外ドメインの切断である。

【0159】

受容体の細胞外ループ2上の保存領域に結合するテザーリガンドが露出し、細胞内シグナル伝達が引き起こされる。

【0160】

あるいは、PAR2は、テザーリガンドのN末端の最初の6つのアミノ酸を模倣する活性化ペプチド(PAR2-AP)として知られる合成短ペプチドによって活性化され得る。

10

【0161】

さらに、PAR2は、PAR1-PAR2ヘテロ二量体化におけるPAR1テザーリガンドによる交差活性化によっても活性化され得る。

【0162】

PAR2の活性化により、Gaq及びGiタンパク質が活性化され、これにより、カルシウムの流入、MAPKシグナル伝達及び下流の炎症シグナル伝達が誘導される。

【0163】

これにより、増殖又はIL-6、IL-8(CXCL8としても知られる)及びGM-CSFなどの炎症性サイトカインの分泌など、その後の生物学的応答がもたらされる。

20

【0164】

PAR2発現は、ヒト関節リウマチ及び関節炎の動物モデルにおいて、滑膜内層、軟骨細胞及び組織で増加することが示されている(Amiabile et al 2009)。

【0165】

PAR2はまた、炎症性疼痛に関与するリガンド依存性イオンチャネルであるTRPV1(Dai et al 2007)等のチャネルを介するシグナル伝達も増強する。

【0166】

PAR2シグナル伝達は、in vivoでTRPV1を感作し、その結果、温熱性痛覚過敏をもたらすことも知られている(Amadesi et al., 2006)。

【0167】

PAR2の活性化は、様々な炎症シグナル伝達経路の原因であることが示されている。

30

【0168】

PAR2受容体を欠損するマウスでは、炎症性メディエーターに応答した炎症の発症が遅れる(Lindner et al, 2000)。

【0169】

他のげっ歯類のPAR2ノックアウト研究により、PAR2は、疼痛、変形性関節症を含む筋骨格系炎症、神経炎症性疾患、気道炎症、そう痒、皮膚炎、大腸炎及び関連病態など、多くの疾患病態の病態生理において重要な役割を果たすことが示されている(Yau et al 2013)。

【0170】

GB88などのPAR2受容体拮抗薬は、ラットにおけるコラーゲン誘発性関節炎モデルを含むin vivoでの炎症応答を阻止することも示されている(Lohman et al 2012)。

40

【0171】

既知の低分子PAR2拮抗薬は、わずかな効果と広範な特異性のために理想的な治療薬ではない。

【0172】

PAR2が重要であると考えられている疾患の範囲を考慮すると、強力で特異的なPAR2拮抗薬を同定する必要がある。

【0173】

50

本発明の抗体は、N末端ドメインの切断を介するPAR2の活性化を阻害する強力で特異的なPAR2拮抗薬である。

【0174】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

【0175】

本明細書に記載されたものと類似又は同等の任意の方法及び材料を本開示の実施又は試験に使用することができるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。

【0176】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数の指示対象を含む。

10

【0177】

ここで、本明細書で使用される「及び／又は」は、2つの特定された特徴又は構成要素の各々を、他方の有無にかかわらず、具体的に開示するものと解釈されることを指摘しても差し支えない。

【0178】

例えば、「A及び／又はB」は、(i) A、(ii) B、及び(iii) AとB、の各々の具体的な開示として解釈され、あたかも個別に本明細書に記載されているとみなされる。

【0179】

アミノ酸は、本明細書において、それらの一般的に知られている3文字記号又はIUPAC-IUB生化学命名法委員会が推奨する1文字記号のいずれかで言及されることがある。

20

【0180】

同様に、ヌクレオチドは、それらの一般的に受け入れられている単一文字コードで言及されることがある。

【0181】

全ての数値的表示、例えば、pH、温度、時間、濃度、及び分子量は、範囲を含めて近似値である。

【0182】

明示的に述べられていない場合でも、全ての数値的表示の前には用語「約」が付されていると理解されるべきである。

30

【0183】

また、明示的に述べられていない場合でも、本明細書に記載の試薬は単なる例示であり、その等価物が当業者に知られていることも理解されるべきである。

【0184】

本明細書で使用される「ヒトプロテアーゼ活性化受容体2」又は「ヒトPAR2」又は「PAR2」などの用語は、UniProtID番号：P55085を有するヒトPAR2（野生型又はwt）を指し、本明細書において配列番号1として再現されている。

【0185】

ヒトPAR2には、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも99%又は100%同一であるあらゆる配列、又はその生物学的に活性なフラグメントが含まれる。

40

【0186】

本明細書で使用される「テザーリガンド」という用語は、プロテアーゼ（例えば、トリプシン）によるタンパク質分解切断後に露出するPAR2のN末端部分の領域を指し、一度切断されると、PAR2受容体上の近位結合部位に結合してそれを活性化する。

【0187】

ヒトPAR2受容体のN末端のテザーリガンドは、配列番号39を含む。

【0188】

「PAR2-AP」、「PAR2活性化ペプチド」又は「PAR2活性化ペプチド」と

50

は、切断されたテザリガンドN末端を模倣する合成短鎖ペプチドを意味する。

【0189】

ヒトペプチドは配列番号39であり、マウスペプチドは配列番号40を含む。

【0190】

本明細書で使用される「抗体」、「PAR2に対する抗体」又は「抗PAR2」という用語は、完全長抗体又は抗原結合フラグメントを指す。

【0191】

本明細書で使用される抗体は、PAR2と相互作用し（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布によって）、PAR2の活性化を阻害する。

【0192】

天然に存在する「抗体」は、ジスルフィド結合で相互連結された少なくとも2本の重鎖（H）と2本の軽鎖（L）を含む糖タンパク質である。

【0193】

重鎖は可変領域（VH）と定常領域を含み、軽鎖は可変領域（VL）と定常領域を含む。

【0194】

VH及びVL領域は、さらに超可変（HV）領域とフレームワーク（FR）領域に分けることができる。

【0195】

各VH及びVLは、3つの相補性決定領域（CDR）と4つのFRから構成される。

【0196】

「抗体」という用語は、例えば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、サメ抗体、ラクダ抗体、又はキメラ抗体を指すことがある。

【0197】

軽鎖と重鎖の両方が、構造的及び機能的に相同性のある領域に分けられる。

【0198】

「定常」及び「可変」という用語は、機能的に使用される。

【0199】

この点において、重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインが抗原認識及び特異性を決定することが理解されるであろう。

【0200】

反対に、軽鎖の定常ドメイン（CL）及び重鎖の定常ドメイン（CH1、CH2又はCH3）は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。

【0201】

慣例により、定常領域ドメインの番号付けは、抗体のアミノ末端又は抗原結合部位から離れるにつれて増加する。

【0202】

N末端は可変領域であり、C末端は定常領域である。CH3及びCLドメインは、実際には重鎖及び軽鎖のそれぞれのカルボキシ末端を含む。

【0203】

抗体（免疫グロブリン）は、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、様々なクラスに分類することができる。

【0204】

ヒトには5つの主要なクラス（アイソタイプ）の免疫グロブリンがある：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMであり、これらのいくつかはさらにサブクラスに分けられることがある（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）。

【0205】

異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、

10

20

30

40

50

γ 、及び μ と呼ばれる。

【0206】

異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構造は周知であり、例えば *Abbas et al.* (2000) に一般的に記載されている。

【0207】

抗体は、抗体と1つ以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合又は非共有結合によって形成されるより大きな融合分子の一部の場合がある。

【0208】

「相補性決定領域」(「CDR」)は、表1に示すように「Kabat」及び「Chothia」番号付け方式など、多数のよく知られた方式を用いて決定された境界を持つアミノ酸配列である。

【0209】

例えば、Kabat方式では、重鎖のCDRアミノ酸残基、重鎖可変ドメイン(VH)のCDRアミノ酸残基は31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)、及び95-102(HCDR3)と番号付けされる。一方、Chothia方式では、VHのCDRアミノ酸は26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)、及び95-102(HCDR3)と番号付けされる。

【0210】

表1：CDRの定義(番号付けはKabat命名法に従う)

【表1】

	Chothia	Kabat
CDR-L1	L26 - L32	L24 - L34
CDR-L2	L50 - L52	L50 - L56
CDR-L3	L91 - L96	L89 - L97
CDR-H1	H26 - H32	H31 - H35
CDR-H2	H52 - H56	H50 - H65
CDR-H3	H95 - H102	H95 - H102

【0211】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合フラグメント」又は「エピトープ結合フラグメント」等の用語は、複合体を形成するために抗原に特異的に結合する、天然に存在する、酵素的に得られる、合成された、又は遺伝子工学的に作製されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。

【0212】

抗体の抗原結合フラグメントは、例えば、タンパク質分解消化又は抗体の可変ドメイン及び任意に定常ドメインをコードするDNAの操作及び発現を伴う組換え遺伝子工学技術などの任意の適切な標準技術を用いて、完全な抗体分子から誘導することができる。

【0213】

そのようなDNAは既知であり、及び／又は例えば商業的供給源、DNAライブラリー(例えば、ファージ抗体ライブラリーを含む)から容易に入手可能であり、又は合成する

ことができる。

【0214】

DNAは、化学的に又は分子生物学的技術を用いて配列決定され、操作することができる。これにより、例えば、1つ以上の可変及び／又は定常ドメインを適切な構成に配置したり、コドンを導入したり、システイン残基を作製したり、アミノ酸を修飾、追加又は削除したりする。

【0215】

2つのフラグメント可変(Fv)ドメインであるVLとVHは、別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いて合成リンカーによって結合することができる。これによりVL及びVH領域が対になって一価分子を形成する単一のタンパク質鎖を作製することができる(単鎖Fv(scFv)として知られる;例えば、Bird et al., 1988; 及びHouston et al., 1988を参照)。

10

【0216】

このような単鎖抗体も、「フラグメント」、「エピトープ結合フラグメント」又は「抗体フラグメント」という用語に包含されることを意図している。

【0217】

これらのフラグメントは、当業者に知られている従来の技術を用いて得られ、当該フラグメントはインタクト抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

【0218】

抗原結合フラグメントのさらなる非限定的な例には以下が含まれる:(i) Fabフラグメント;(ii) Fab'フラグメント;(iii) F(ab')₂フラグメント;(iv) Fdフラグメント;(v) Fvフラグメント;(vi) dAbフラグメント;及び(vii) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位(例えば、単離された相補性決定領域(CDR)、例えばCDR3ペプチド)、又は拘束されたFR3-CDR3-FR4ペプチド。

20

【0219】

ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ラクダ抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ(例えば一価ナノボディ、二価ナノボディなど)、アドネクチン、小型モジュール型免疫医薬品(SMIP)、及びサメ可変IgNARDドメインなどの他の工学的に設計された分子も、本明細書で使用する「抗原結合フラグメント」という表現に包含される。

30

【0220】

抗体の抗原結合フラグメントは、典型的に少なくとも1つの可変ドメイン(例えば、少なくともVH又はVLの1つ)を含むであろう。

【0221】

可変ドメインは、任意のサイズ又はアミノ酸組成であってよく、通常、少なくとも1つのCDRを含み、それは1つ以上のフレームワーク配列に隣接しているか、又はフレーム内にある。

【0222】

VLドメインと会合しているVHドメインを有する抗原結合フラグメントでは、VHとVLドメインは、任意の適切な配置で相対的に位置することができる。

40

【0223】

例えば、可変領域は二量体であり、VH-VH、VH-VL、又はVL-VL二量体を含んでいてもよい。

【0224】

あるいは、抗体の抗原結合フラグメントは、単量体VH又はVLドメインを含んでいてもよい。

【0225】

本開示の特定の実施形態では、抗体の抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの定常ドメインが共有結合している少なくとも1つの可変ドメインを含むことができる。

50

【0226】

本開示の抗体の抗原結合フラグメント内に見出される可能性のある可変及び定常ドメインの非限定的な例示的構成には以下が含まれる：(i) V_H-C_H1；(ii) V_H-C_H2；(iii) V_H-C_H3；(iv) V_H-C_H1-C_H2；(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(vi) V_H-C_H2-C_H3；(vii) V_H-C_L；(viii) V_L-C_H1；(ix) V_L-C_H2；(x) V_L-C_H3；(xi) V_L-C_H1-C_H2；(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3；(xiii) V_L-C_H2-C_H3；及び(xiv) V_L-C_L。

【0227】

可変及び定常ドメインの任意の構成において、上記の例示的構成のいずれかを含む、可変及び定常ドメインは、互いに直接連結されていてもよく、又は全長若しくは部分的なヒンジ領域又はリンカー領域によって連結されていてもよい。

【0228】

ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子内の隣接する可変及び／又は定常ドメイン間に柔軟又は半柔軟な連結をもたらす少なくとも2個（例えば、5、10、15、20、40、60個以上）のアミノ酸から構成されていてもよい。

【0229】

一部の実施形態では、ヒンジ領域はグリシン-セリンリンカーを含む。

【0230】

さらに、本開示の抗体の抗原結合フラグメントは、上記の可変及び定常ドメイン構成のいずれかのホモ二量体又はヘテロ二量体（又は他の多量体）を含んでいてもよい。これらは互いに非共有結合で会合し、及び／又は1つ以上の単量体V_H又はV_Lドメインと（例えばジスルフィド結合によって）会合している。

【0231】

完全な抗体分子と同様に、抗原結合フラグメントは単特異的又は多重特異的（例えば二重特異的）であってもよい。

【0232】

抗体の多重特異的抗原結合フラグメントは、典型的に少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、各可変ドメインは別個の抗原、又は同一抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。

【0233】

任意の多重特異的抗体フォーマットを、当該技術分野で利用可能な日常的な技術を用いて、本開示の抗体の抗原結合フラグメントの環境で使用するよう適合させることができる。

【0234】

本明細書で使用される「バイパラトピック抗体」という用語は、単一のPAR2標的上の2つの異なるエピトープに結合する二重特異的抗体を指す。

【0235】

本明細書で使用される「一価抗体」という用語は、1つのエピトープ結合部位を含む抗体を指す。

【0236】

本明細書で使用される「二価抗体」という用語は、2つのエピトープ結合部位を含む抗体を指す。

【0237】

「多価抗体」という用語は、1つを超える価数を持つ単一の結合分子を指し、ここで「価数」は抗体構築物の1分子あたりに存在する抗原結合部位の数として記述される。

【0238】

そのため、単一の結合分子は標的分子上の1つを超える結合部位に結合することができる。

【0239】

10

20

30

40

50

多価抗体の例には、二価抗体、三価抗体、四価抗体、五価抗体などが含まれるが、これらに限定されず、また多重特異的抗体やバイパラトピック抗体も含まれる。

【0240】

例えば、PAR2の場合、多価抗体（例えばPAR2バイパラトピック抗体）は、PAR2の2つの異なるエピトープに対してそれぞれ2つの異なる結合部位を有する。

【0241】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」又は「mAb」という用語は、実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は同一の遺伝子源に由来する抗体、二重特異的抗体などを含むポリペプチドを指す。

【0242】

この用語には、単一の分子組成の抗体分子の調製物も含まれる。

【0243】

モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性と親和性を示す。

【0244】

本明細書で使用される「フラグメント結晶化可能領域」又は「Fc領域」という用語は、抗体の定常ドメインのCH3、CH2、及び少なくともヒンジ領域の一部を含むポリペプチドを指す。

【0245】

任意には、Fc領域は、一部の抗体クラスに存在するCH4ドメインを含んでいてもよい。

【0246】

Fc領域は、抗体の定常ドメインの全ヒンジ領域を含んでいてもよい。

【0247】

一実施形態では、定常領域は野生型定常領域と比較して修飾されている。

【0248】

すなわち、本明細書に開示される本発明のポリペプチドは、3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2又はCH3）の1つ以上及び／又は軽鎖定常領域ドメイン（CL）に対する変更又は修飾を含んでいてもよい。

【0249】

修飾の例には、1つ以上のドメインにおける1つ以上のアミノ酸の付加、欠失又は置換が含まれる。

【0250】

このような変更は、エフェクター機能、半減期などを最適化するために含まれていてもよい。

【0251】

本明細書で使用される「二重活性の」、「二重活性」又は「二重活性抗体」という用語は、本明細書に記載の抗体であって、プロテアーゼ切断を介するPAR2活性化（例えばトリプシンによる）とペプチド介在性PAR2活性化（例えばPAR2-AP又はPAR1-APによる）の両方を阻害することができるものを指す。

【0252】

本明細書で使用される「参照抗体」、「参照mAb」、「参照Ab」、「ベンチマーク」又は「ベンチマーク抗体」という用語は、本発明の抗PAR2抗体に対する参照として本開示の実験中に使用される任意の抗体を指す（例えば、陽性又は陰性対照及びアッセイ条件の設定のために）。

【0253】

本明細書の実験で使用されたベンチマーク抗体には以下が含まれる：PAR2のN末端エピトープに結合するベンチマーク1（Giblin et al 2011）；ベンチマーク2（WO2018167322A1）、R001053又はPaB670129とも呼ばれる；Regeneron抗体であるベンチマーク3、R001044又はH4H

10

20

30

40

50

581Pとも呼ばれる；Amgen抗体であるベンチマーク4、R001048又は1A1とも呼ばれる；マウスR&D systems mAbであるMAB3949；及びベンチマーク6（Giblin et al 2011）。

【0254】

「エピトープ」という用語は、抗体分子の可変領域内の特定の抗原結合部位（パルトープとして知られる）と相互作用する抗原決定基を指す。

【0255】

単一の抗原は1つを超えるエピトープを有する可能性がある。

【0256】

したがって、異なる抗体は抗原上の異なる領域に結合し、異なる生物学的効果を有する可能性がある。 10

【0257】

エピトープはコンホメーション型（例えば不連続）又は直線的のいずれでもよい。

【0258】

コンホメーション型エピトープは、直鎖ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に近接したアミノ酸によって生成される。

【0259】

直線的エピトープは、ポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基によって生成されるものである。

【0260】

特定の状況では、エピトープは抗原上の糖類、リン酸基、又はスルホニル基の部分を含む場合がある。 20

【0261】

本明細書で使用される「結合部位」という用語は、抗体又は抗原結合フラグメントが選択的に結合するPAR2標的分子上の領域を含む。

【0262】

一般に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、タンパク質及び／又はマクロ分子の複合混合物中の標的抗原上のエピトープに結合する。

【0263】

本明細書で使用される「親和性」という用語は、単一の抗原部位における抗体と抗原との間の相互作用の強さを指す。 30

【0264】

各抗原部位内で、抗体「アーム」の可変領域は弱い非共有結合力を通じて抗原上の多数の部位と相互作用する；相互作用が多いほど、親和性は強くなる。

【0265】

本明細書で使用されるIgG抗体又はそのフラグメント（例えばFabフラグメント）についての「高親和性」という用語は、標的抗原に対してKDが 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、又は 10^{-10} M、又は 10^{-11} M以下、又は 10^{-12} M以下、又は 10^{-13} M以下の抗体を指す。

【0266】

ただし、高親和性結合は他の抗体アイソタイプで異なる場合がある。

【0267】

例えば、IgMアイソタイプの高親和性結合は、KDが 10^{-7} M以下、又は 10^{-8} M以下の抗体を指す。

【0268】

本明細書で使用される「結合活性」という用語は、抗体-抗原複合体の全体的な安定性又は強度の情動的尺度を指す。

【0269】

これは以下の3つの主要な要因によって制御される：抗体エピトープ親和性；抗原と抗体の両方の価数；及び相互作用する部分の構造的配置。 50

【0270】

最終的に、これらの要因は抗体の特異性、すなわち特定の抗体が正確な抗原エピトープに結合する可能性を定義する。

【0271】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、任意の長さのデオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそのアナログのポリマー形態を指す。

【0272】

ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を有し、任意の機能を果たすことができる。

【0273】

以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子又は遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、EST又はSAGEタグ）、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、siRNA、shRNA、RNAi剤、及びプライマー。

【0274】

ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の、又は当該技術分野で知られている様々な修飾又は置換のいずれかにより、1つ以上の塩基、糖及び／又はリン酸において修飾又は置換されていてもよい。

【0275】

ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログなどの修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0276】

存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾はポリマーの組み立て前又は後に付与することができる。

【0277】

ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されていてもよい。

【0278】

ポリヌクレオチドは、重合後にさらに修飾することができ、例えば標識成分との結合などがある。

【0279】

この用語は、二本鎖及び一本鎖分子の両方を指す。

【0280】

特に規定又は要求されない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが知られているか予測される2つの相補的な一本鎖形態のそれぞれの両方を包含する。

【0281】

「遺伝子」は、転写及び翻訳後に特定のポリペプチド又はタンパク質をコードすることができる少なくとも1つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含むポリヌクレオチドを指す。

【0282】

ポリヌクレオチド配列は、それらが関連付けられている遺伝子のより大きなフラグメント又は全長コード配列を同定するために使用することができる。

【0283】

より大きなフラグメント配列を単離する方法は、当業者に知られている。

【0284】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然及び／又は非天然又は合成アミノ酸、任意のアミノ酸のD及びL光学異性体、及びアミノ酸アナログを指す。

【0285】

10

20

30

40

50

3つ以上のアミノ酸からなるペプチドは、ペプチド鎖が短い場合、一般的にオリゴペプチドと呼ばれる。

【0286】

ペプチド鎖が長い場合、ペプチドは一般的にポリペプチド又はタンパク質と呼ばれる。

【0287】

「バイオマーカー」又は「マーカー」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【0288】

バイオマーカーは、ヒトで発現される核酸、ポリペプチド、又は他の有機若しくは無機分子であり、バイオマーカーの変異の有無、又は発現の違いは、本発明による抗P A R 2抗体を含む任意の治療に対する感受性を決定するために使用される。

10

【0289】

例えば、タンパク質は、正常（非がん）細胞又は対照細胞における同じタンパク質と比較して、欠乏している、変異している、欠失している、又は翻訳後修飾、産生、発現、レベル、安定性及び／又は活性が低下している場合、がん細胞のバイオマーカーとなる。

【0290】

本明細書で「ポリペプチド」、「ペプチド」、「ペプチド模倣体」及び「タンパク質」という用語は互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。

【0291】

これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的模倣物であるアミノ酸ポリマー、並びに天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。

20

【0292】

残基は、ペプチド結合又は他の結合、例えばエステル結合、エーテル結合などによって連結されていてもよい。

【0293】

ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド領域（又はポリペプチド又はポリペプチド領域）が、別の配列に対して特定の割合（例えば、80%、85%、90%、95%、98%又は99%）の「配列同一性」を有するということは、アラインメントを行った際に、2つの配列を比較してその割合の塩基（又はアミノ酸）が同一であることを意味する。

30

【0294】

このアラインメント及び相同性又は配列同一性の割合は、当該技術分野で知られているソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。例えば、A u s u b e l e t a l . (1 9 8 7) に記載されているものなどである。

【0295】

好ましくは、アラインメントにはデフォルトパラメータが使用される。

【0296】

好ましいアラインメントツールは、欧州分子生物学研究所－欧州バイオインフォマティクス研究所（E M B L － E B I）のウェブページで提供されており、デフォルトパラメータを使用する。

40

【0297】

他のプログラムには、B L A S T、B L A S T N、及びB L A S T Pがあり、以下のデフォルトパラメータを使用する：遺伝コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；期待値＝10；マトリックス＝B L O S U M 6 2；説明＝50配列；ソート基準＝高スコア；データベース＝非冗長。

【0298】

本明細書で使用される「発現産物」又は「遺伝子産物」という用語は、遺伝子が転写及び翻訳されたときに生成される核酸又はアミノ酸（例えば、ペプチド又はポリペプチド）を指す。

【0299】

50

本明細書で使用される「発現」は、DNAがmRNAに転写されるプロセス、及び／又は転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。

【0300】

ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現には真核細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれる場合がある。

【0301】

遺伝子に適用される「差次的に発現する」とは、遺伝子から転写されるmRNA又は遺伝子によってコードされるタンパク質産物の差次的産生を指す。

【0302】

差次的に発現する遺伝子は、正常又は対照細胞の発現レベルと比較して過剰発現又は発現低下している可能性がある。

【0303】

ただし、本明細書で使用される過剰発現は、遺伝子発現の増加であり、一般的に正常又は対照の対応する細胞又は組織で検出されるものと比較して少なくとも1.25倍、又は代替的に少なくとも1.5倍、又は代替的に少なくとも2倍、又は代替的に少なくとも3倍、又は代替的に少なくとも4倍の発現である。

【0304】

本明細書で使用される発現低下は、遺伝子発現の減少であり、一般的に正常又は対照の対応する細胞又は組織で検出されるものと比較して少なくとも1.25倍、又は代替的に少なくとも1.5倍、又は代替的に少なくとも2倍、又は代替的に少なくとも3倍、又は代替的に少なくとも4倍の発現低下である。

【0305】

「差次的に発現する」という用語はまた、がん細胞又はがん組織での発現が検出されるが、対照細胞又は正常組織（例えば非がん細胞又は組織）での発現が検出できない場合を指す。

【0306】

遺伝子の高発現レベルは、遺伝子の過剰発現又は遺伝子コピー数の増加によって生じる可能性がある。

【0307】

遺伝子はまた、負の調節因子の調節解除又は不在により、増加したタンパク質レベルに転写及び翻訳される可能性がある。

【0308】

最後に、遺伝子の高発現は、タンパク質の安定化の増加又は分解の減少によって生じる可能性があり、その結果タンパク質が蓄積する。

【0309】

本明細書で使用される「阻害する」又は「阻害」などの用語は、PAR2受容体の活性化を妨害、拮抗、又は阻止することを指す。

【0310】

このような用語は、2つの状態間の定量的な違いを示し、例えば2つの状態間の統計的に有意な違いを指す。

【0311】

例えば、「PAR2活性化を阻害するのに有効な量」とは、アゴニスト及びPAR2ブロッキング抗体によるPAR2の活性化が、アゴニスト単独で処理された細胞とは少なくとも統計的に有意に異なることを意味する。

【0312】

本明細書で使用される「治療」、「治療する」、「軽減」などの用語は、一般に望ましい薬理学的及び／又は生理学的効果を得ることを意味し、また治療される病態の1つ以上の症状の改善、軽減、及び／又は重症度の低下を指すために使用される場合がある。

【0313】

10

20

30

40

50

効果は、その疾患、病態若しくは症状の発症又は再発を完全に又は部分的に遅らせるという点で予防的であってもよく、及び／又は疾患若しくは病態、及び／又は疾患若しくは病態に起因する有害作用の部分的又は完全な治癒という点で治療的であってもよい。

【0314】

本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物、特にヒトの疾患又は病態の任意の治療を包含し、以下の1つ以上を含む：（a）疾患又は病態にかかりやすい可能性はあるが、まだそれを有すると診断されていない被験者において、疾患又は病態の発生を防止すること；（b）疾患又は病態を阻害すること（例えば、その進行を阻止すること）；又は（c）疾患又は病態を緩和すること（例えば、疾患又は病態の退行を引き起こすこと、1つ以上の症状の改善をもたらすこと）。

【0315】

例えば、疼痛（例えば慢性疼痛又は神経障害性疼痛）の「治療」には、治療を受けた被験者における疼痛症状の軽減、阻止、緩和、又は除去が含まれる。

【0316】

疾患の方法によって治療される被験者の集団には、望ましくない状態又は疾患に罹患している被験者、並びにその状態又は疾患の発症のリスクがある被験者が含まれる。

【0317】

「治療的に有効な用量」という用語は、投与される目的の効果を生み出す用量を意味する。

【0318】

正確な用量は治療の目的によって異なり、当業者は知られている技術を用いて確認することができる（例えば、The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding, 3rd Edition, 2008を参照）。

【0319】

このような抗体をコードするヌクレオチド配列が決定されると、キメラ抗体を組換え法によって生産することができる。

【0320】

抗体をコードする核酸は宿主細胞に導入され、一般に当該技術分野で知られている材料及び手順、並びに本明細書に開示される材料及び手順を用いて発現される。

【0321】

「単離された」又は「精製された」抗体又はタンパク質は、その生産環境（例えば天然又は組換え）の成分から同定、分離及び／又は回収されたものである。

【0322】

例えば、抗体又はタンパク質は、抗体が由来する細胞又は組織源からの細胞物質若しくは他の汚染タンパク質から実質的に遊離しているか、又は化学的に合成された場合は他の化学前駆体若しくは他の化学物質から実質的に遊離している。

【0323】

「細胞物質から実質的に遊離している」という表現には、抗体が単離又は組換え生産される細胞の細胞成分から分離されている抗体調製物が含まれる。

【0324】

したがって、細胞物質から実質的に遊離している抗体には、異種タンパク質（本明細書では「汚染タンパク質」とも呼ばれる）を約30%、20%、10%、又は5%未満（乾燥重量）有する抗体調製物が含まれる。

【0325】

抗体が組換えで生産される場合、培地からも実質的に遊離していることが好ましい。すなわち、培地がタンパク質調製物の体積の約20%、10%、又は5%未満を占める。

【0326】

抗体が化学合成によって生産される場合、化学前駆体又は他の化学物質から実質的に遊離していることが好ましい。すなわち、タンパク質の合成に関与する化学前駆体又は他の

10

20

30

40

50

化学物質から分離されている。

【0327】

したがって、このような抗体調製物には、目的の抗体以外の化学前駆体又は化合物が約30%、20%、10%、又は5%未満（乾燥重量）含まれる。

【0328】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は単離又は精製される。

【0329】

本明細書では、PAR2に結合するPAR2指向性抗体及びその抗原結合フラグメントが提供される。

【0330】

実施形態では、抗体は拮抗、中和及び／又はブロッキング抗PAR2抗体又は抗原結合フラグメントである。

【0331】

本明細書で使用される「拮抗」、「中和」又は「ブロッキング」抗体又は抗原結合フラグメントは、PAR2への結合が：(i) PAR2活性化ペプチドのPAR2への結合を阻害するか、又はPAR2活性化ペプチドによるPAR2の活性化を阻害する；及び／又は(ii) PAR2の露出したテザーリガンドとPAR2との相互作用を妨げる；及び／又は(iii) PAR2とプロテアーゼ（例えば、トリプシン、トリプターゼ、マトリプターゼ、レグメイン）との相互作用を妨げる；及び／又は(iv) PAR2シグナリングを阻害する（例えば、PAR2を介するIPの蓄積又は細胞内Ca²⁺動員を阻害する）；及び／又は(vi) PAR2活性化を阻害する；及び／又は(vii) PAR2の少なくとも1つの生物学的機能の阻害をもたらす（例えば、PAR2介在性炎症反応）；及び／又は(viii) ドミナントGαqシグナリングパートナーの活性化を介して駆動されるPAR2二次メッセンジャーシグナル伝達を阻害する、抗体又は抗原結合フラグメントを指すことを意図している。

【0332】

実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合フラグメントは、PAR2の活性化を阻害する。

【0333】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、テザーリガンドの露出を阻害する。

【0334】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、露出したテザーリガンドによるPAR2受容体の活性化を阻害する。

【0335】

実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、PAR2の露出したテザーリガンドによる活性化を阻害する。

【0336】

実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、露出したテザーリガンドのPAR2の第2細胞外ループ（ECL2）への結合を阻害する。

【0337】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは不連続エピトープに結合し、前記エピトープへの結合が立体障害を介してECL2への露出したテザーリガンドの結合を閉塞する。

【0338】

抗PAR2中和、ブロッキング又は拮抗抗体による阻害は、適切なアッセイを用いて検出可能である限り、完全である必要はない。

【0339】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、阻害されていない活性PAR2と比較して、PAR2活性を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60

10

20

30

40

50

%、70%、80%、90%又は100%阻害する。

【0340】

代表的な抗PAR2抗体又は抗原結合フラグメントの活性を検出するためのアッセイの一部の例は、実施例のセクションに記載されている。当業者は追加の抗PAR2抗体活性アッセイを認識するであろう。

【0341】

当業者はさらなる抗PAR2抗体活性アッセイを認識している。

【0342】

実施形態では、本明細書では、PAR2とプロテアーゼとの相互作用を妨げる抗体又は抗原結合フラグメントが提供される。

【0343】

実施形態では、プロテアーゼはトリプシンである。

【0344】

実施形態では、プロテアーゼは好中球エラスターゼである。

【0345】

実施形態では、プロテアーゼは好中球プロテイナーゼ3である。

【0346】

実施形態では、プロテアーゼは肥満細胞トリプターゼである。

【0347】

実施形態では、プロテアーゼは組織因子／因子Vila／因子Xaである。

【0348】

実施形態では、プロテアーゼはカリクレイン関連ペプチダーゼである。

【0349】

実施形態では、プロテアーゼは膜結合型セリンプロテイナーゼ-1／マトリプターゼ1である。

【0350】

実施形態では、プロテアーゼは寄生虫システインプロテイナーゼである。

【0351】

実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは炎症誘発性疼痛を阻害／軽減する。

【0352】

本明細書には、生理的な細胞外pH（すなわちpH7.5）において高親和性でPAR2分子に結合するPAR2指向性抗体及びその抗原結合フラグメントが提供される。

【0353】

本開示の抗体又は抗原結合フラグメントは、前述の生物学的特性の1つ以上、又はその任意の組み合わせを有していてもよい。

【0354】

本開示の抗体の他の生物学的特性は、本明細書に提供される実施例セクションを含む本開示の検討から当業者に明らかであろう。

【0355】

本開示の実施形態では、本開示の抗PAR2抗体はヒト抗体である。

【0356】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことを意図している。

【0357】

本開示のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、*in vitro*でのランダム又は部位特異的変異誘発、又は*in vivo*での体細胞変異によって導入された変異）を、例えばCDRにおいて、実施形態ではCDR3において含んでいてもよい。

【0358】

ただし、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの他の哺乳動物

10

20

30

40

50

種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトのフレームワーク配列に移植された抗体を含むことを意図していない。

【0359】

本開示の抗体は、実施形態では組換えヒト抗体であってもよい。

【0360】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換えによって調製、発現、作製又は単離されたすべてのヒト抗体を含むことを意図しており、例えば宿主細胞に形質導入された組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニック動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor et al., 1992を参照）、又はヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを含む他の任意の手段によって調製、発現、作製又は単離された抗体などがある。

【0361】

このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する。

【0362】

ただし、実施形態では、このような組換えヒト抗体は*in vitro*変異誘発（又は、ヒトIg配列のトランスジェニック動物が使用される場合は、*in vivo*体細胞変異誘発）に供される。したがって、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH及びVL配列に由来し、関連しているものの、*in vivo*のヒト抗体生殖系列レパートリー内に自然に存在しない可能性のある配列である。

【0363】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは特異的にPAR2に結合し、PAR2活性化ペプチドのPAR2への結合を阻害する。任意で、抗体又はフラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（IP）の蓄積をIC50値約50 pM、100 pM、200 pM、400 pM、800 pM、1 nM、5 nM、10 nM、20 nM、40 nM、80 nM、100 nM、200 nM又は300 nM未満で阻害する。任意で、PAR2ペプチドを介するIPの蓄積は、PAR2ペプチド刺激IPシグナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0364】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは特異的にPAR2に結合し、PAR2活性化ペプチドのPAR2への結合を阻害する。抗体又はフラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（IP）の蓄積をIC50値約40 nM、50 nM、60 nM、70 nM又は80 nM未満で阻害する。任意で、PAR2ペプチドを介するIPの蓄積は、PAR2ペプチド刺激IPシグナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0365】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは特異的にPAR2に結合し、PAR2活性化ペプチドのPAR2への結合を阻害する。抗体又はフラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（IP）の蓄積をIC50値40 nM以下で阻害する。任意で、PAR2ペプチドを介するIPの蓄積は、PAR2ペプチド刺激IPシグナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0366】

実施形態では、IPシグナル伝達アッセイはCisbio IP-One HTRFアッセイである。

【0367】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはトリプシンを介するIPの蓄積をIC50値約50 pM、100 pM、200 pM、400 pM、800 pM、1 nM、5 nM、10 nM、20 nM、40 nM、80 nM、100 nM、200 nM又は300 nM未満で阻害する。任意で、トリプシンを介するIPの蓄積は、トリプシン刺激IPシグ

ナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0368】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはトリプシンを介するIPの蓄積をIC50値約60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM、190nM、200nM、210nM、220nM、230nM、240nM、250nM、260nM、270nM、280nM、290nM又は300nM未満で阻害する。任意で、トリプシンを介するIPの蓄積は、トリプシン刺激IPシグナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0369】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはトリプシンを介するIPの蓄積をIC50値70nM以下で阻害する。任意で、トリプシンを介するIPの蓄積は、トリプシン刺激IPシグナル伝達アッセイを用いて決定される。

【0370】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するイノシトールリン酸（IP）の蓄積をIC50値約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM又は300nM未満で阻害する。任意で、PAR2ペプチド阻害はHTRFアッセイを用いて決定される。

【0371】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは特異的にPAR2に結合し、抗体又はフラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するカルシウム動員を阻害する。任意で、IC50値は約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM又は300nM未満である。任意で、カルシウム動員はPAR2活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

【0372】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは特異的にPAR2に結合し、抗体又はフラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するカルシウム動員を阻害する。任意で、IC50値は約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM又は160nM未満である。任意で、カルシウム動員はPAR2活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

【0373】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは特異的にPAR2に結合し、抗体又はフラグメントはPAR2活性化ペプチドを介するカルシウム動員を阻害する。任意で、IC50値は140nM以下である。任意で、カルシウム動員はPAR2活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

【0374】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはトリプシンを介するカルシウム動員を阻害する。任意で、IC50値は約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM又は300nM未満である。任意で、カルシウム動員はPAR2活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

【0375】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはトリプシンを介するカルシウム動員を阻害する。任意で、IC50値は約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM又は250nM未満である。任意で、カルシウム動員はPAR2活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

10

20

30

40

50

【0376】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはトリプシンを介するカルシウム動員を阻害する。任意で、IC50値は200nM以下である。任意で、カルシウム動員はPAR2活性化ペプチド刺激カルシウム動員アッセイを用いて決定される。

【0377】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはカニクイザルPAR2にEC50約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM又は300nM未満で結合する。任意で、カニクイザルPAR2結合はフローサイトメトリーを用いて決定される。

10

【0378】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはカニクイザルPAR2にEC50約400pM、800pM、1nM、5nM又は10nM未満で結合する。任意で、カニクイザルPAR2結合はフローサイトメトリーを用いて決定される。

【0379】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはヒトPAR2にKD約50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM又は300nM未満で結合する。任意で、結合親和性は表面プラズモン共鳴（SPR）又はKinExAを用いて決定される。

【0380】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはヒトPAR2にKD約100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM又は20nM未満で結合する。任意で、結合親和性は表面プラズモン共鳴（SPR）又はKinExAを用いて決定される。

20

【0381】

実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントはヒトPAR2にKD10nM以下で結合する。任意で、結合親和性は表面プラズモン共鳴（SPR）又はKinExAを用いて決定される。

【図面の簡単な説明】

【0382】

30

【図1】陽性対照mAb「ベンチマーク1」及び市販のPAR2mAb「R&D anti-huPAR2 mAb (MAB3949)」による特異的PAR2ナノディスク（FL-STAR ND）と空ナノディスク（empty ND）の結合の例、並びにこれらと示されている3つのPAR2ファージ由来抗体クローンで観察された用量依存的な結合を示す。抗体は、5μg/mLでプレートに直接コーティングした。陰性対照であるMOR03207（抗リゾチーム抗体）では、有意なバックグラウンド結合は観察されなかった。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値（S/BG）で示す。

【図2】完全長PAR2 STARナノディスクを用いたPAR2mAb（Ylanthiaファージ抗体ライブラリー由来）のパネル上での市販の陽性対照mAb「MAB3949」（R&D anti-huPAR2）との競合の程度（完全競合、部分競合、非競合）を例示し、それにより多様性を示す。50nM候補mAbを、完全長STARナノディスクに対する競合において、R&D anti-huPAR2（MAB3949）の用量反応に対して滴定した。完全競合と部分競合の両方が用量依存的な結合効果を示す。「ベンチマーク1」（N末端結合抗体）又は「MOR03207」（陰性対照として使用した抗リゾチーム抗体）の参照抗体では、用量依存的な結合効果、若しくはMAB3949との競合は観察されなかった。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値（S/BG）で示す。

40

【図3A】以下の用量依存的結合をFACSで測定したものである：A）アッセイ系の検証を示すための、CHO_V5HIS-huPAR2細胞上の細胞表面に発現したPAR2及びCHO親株細胞に対するベンチマーク1mAbとMAB3949の結合。BG＝バ

50

ックグラウンド；

【図3B】CHO__V5HIS-huPAR2細胞上の組換え発現したPAR2及びCHO親株細胞に対するクローンY022065の結合

【図3C】ヒトPAR2を内因的に発現するA549細胞及びマウスPAR2発現CHO細胞に対するクローンY022065の結合。BG=バックグラウンド。データは相対発光量(RLU)で示す。

【図4】フローサイトメトリーによる、完全長huPAR2(FL-N、2行目)及びN末端切断huPAR2(truncate、1行目)に対する抗体クローンの結合能力の把握。得られたデータは、N末端に優先的に結合する抗体クローン(完全長受容体、例えばY022066)だけでなく、エピトープが細胞外ドメインの一部も含む切断型及び完全長受容体の両方に結合する他の抗体クローン(例えばY022065、Y022071)、及び切断型には結合するが完全長受容体には結合しないクローン(Y022075)も同定できる能力を実証している。

【図5】IntelliCytを用いたマルチプレックスプロファイリング。グラフは、ヒトPAR2発現細胞上の精製IgG1f__AEASSの結合を示す。データはクローン「Y022065」(機能的候補)の例である。上段)HEK Flp-In TRex 293__huPAR2発現誘導型、HEK Flp-In TRex 293__huPAR2非誘導型、Flp-In CHO__V5His__huPAR2、親株Flp-In CHO細胞及びFlp-In CHO__huPAR1。下段)HEK293F感染Bac Mam WT FL-huPAR2及びHEK293F非感染。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値(S/BG)で示す。

【図6】2つ濃度の反復で、Cisbio(商標)IP-One Gαqアッセイを用いたペプチド阻害アッセイにおけるY021171、Y022063及びY022054並びにY022065 hIgG1f__AEASSの機能的特性評価。4つのクローンについて、6.28nMアゴニスト単独の反応に対して、17~43%の範囲で、試験した最高濃度における活性化ペプチド誘導アゴニスト活性のヒトPAR2に対する統計学的に有意な阻害が観察された。Y022065が最も活性の高い候補として同定された。データは、単回実行された2つの独立した実験による標準偏差を伴う平均応答として示す。

【図7】ナノディスク埋め込みヒトPAR2 StaR(商標)と精製可溶性StaR(商標)タンパク質を用いたKoffランキングELISA。親候補は、機能的に二重活性であると同定された22の成熟IgG候補の系統を表す。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値(S/BG)で示す。

【図8】FlpIn CHO-V5His-huPar2とFlpIn CHO親株細胞の親系統によって示される親和性成熟クローンの結合特異性。

【図9】Fabフラグメントとしてフォーマットした親和性成熟クローンは、フローサイトメトリーで評価したようにヒトPAR2発現CHO細胞に結合する。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値(S/BG)で示す。

【図10】IgG又はfabとしてフォーマットした親和性成熟クローンは、フローサイトメトリーで評価したようにカニクイザル(IgG)及びヒトPAR2(fab)Bac Mam感染HEK293細胞に結合する。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値(S/BG)で示す。

【図11】Fabフラグメント及びIgGとしての親和性成熟リードmAbパネルについての、ベンチマークmAbとの比較におけるヒト及びカニクイザルPAR2発現細胞への結合の確認。抗体は、ヒトPAR-2及びカニクイザルPAR-2過剰発現細胞とアジ化ナトリウム存在下で約5℃で一晩インキュベートした。全ての抗体が、Fabフラグメント及び完全IgGの両方として、カニクイザルPAR-2及びヒトPAR-2への明確な結合を示す。データは、シグナルをバックグラウンドで割った値(S/BG)で示す。

【図12】PAR2活性化ペプチドに対する阻害アッセイにおけるリード最適化クローンの機能的特性評価。IP-Oneアッセイは、In vitroでのGαq活性化及びヒトPAR2活性の機能としてのIP蓄積を測定するために使用される。各値は、個々のリ

10

20

30

40

50

ードクローンについて反復試験した最高濃度の $10 \mu\text{M}$ MAB3949 に対して標準化した阻害率 (%) を表す。リードクローンは親 IgG とアライメントされている。全ての親 IgG から成熟したリードクローンについて活性化ペプチドの阻害が観察された。阻害率は、R & D システムズ抗ヒト PAR2 MAB3949 と比較して、試験したクローン全体で 0 から約 250 % の範囲である。これにより、同等の濃度では MAB3949 と比較して、多数のリードクローンが、ヒト PAR2 の活性化ペプチドアゴニスト活性をより大きく阻害することが示唆された。親和性成熟により親 IgG Y021171 及び Y022065 から得られたリードクローンが、最大の活性の割合を示す。

【図 13】ウシトリプシンに対する阻害アッセイにおけるリード最適化クローンの機能的特性評価 IP-One アッセイは、In vitro での Gαq 活性化及びヒト PAR2 活性の機能としての IP 蓄積を測定するために使用される。各値は、個々のリードクローンについて反復試験した最高濃度の $1 \mu\text{M}$ ベンチマーク 1 に対して標準化した阻害率 (%) を表す。リードクローンは親 IgG とアライメントされている。全ての親 IgG から成熟したリードクローンについてウシトリプシンの阻害が観察された。阻害率は、ベンチマーク 1 と比較して、試験したクローン全体で 0 から約 130 % の範囲である。IgG Y022065 の成熟から同定されたリードクローンが、ウシトリプシンチャレンジに対する活性の割合が最大である。Y021171 由来の 2 つの代表物が最大の阻害率を示す。

【図 14】内因性 PAR2 を活性化するためのウシトリプシンによる HT-29 チャレンジに対する反応についてのカルシウム動員アッセイでの測定において、親クローン (Y022065) 及び親和性成熟リード代表物 (Y022870、Y022877、Y022883) のベンチマーク 1 及びベンチマーク 2 と比較した用量反応阻害曲線のグラフ表示。データは、重複ウェルとして実施した 3 つの独立した実験から標準偏差を伴う平均反応で示す。

【図 15】Y022883 の PAR2 への結合に及ぼす pH の影響を決定するための Biacore による SPR 評価。

【図 16】HEK-293F-ヒト PAR2 発現細胞上のリード候補 Y022870 及び Y022883 の KinExA による親和性決定。

【図 17】親ファミリー由来の親和性成熟クローンのエピトープマッピングマトリックス。Anti-hu PAR2 は MAB3949 である。

【図 18】PAR2 の背面図 (ECL3、セグメント 1 及びヘリックス 0 / 1)。HDX により得られた、Y022883 と相互作用する PAR2 の領域をハッチング領域として示す。

【図 19】PAR2 の上面図 (ECL3、セグメント 1 及びヘリックス 0 / 1) を示す。HDX により得られた、Y022883 と相互作用する PAR2 の領域をハッチング領域として示す。

【図 20】PAR2 の側面図 (ECL3、セグメント 1 及びヘリックス 0 / 1) を示す。HDX により得られた、Y022883 と相互作用する PAR2 の領域をハッチング領域として示す。

【図 21】ベンチマーク 1 (N 末端結合抗体) 又は Y022883 で染色した BacMam 感染 HEK293F 細胞をフローサイトメトリーを用いて検出した WT 及び変異 (S60W、D62F、G318F、D62G 及び E63G) ヒト PAR2 の発現プロファイル。2 次抗体のみ：二次 FACS 抗体のみ；n.i.：非感染

【図 22】 10 mg/kg の Y022883 の単回静脈内投与後のラットの血清 mAb 濃度と時間の関係。BLOQ (5 ng/mL) 以下で検出可能な mAb 濃度は BLOQ / 2 (破線) として報告する。データは、3 頭の雄の成体動物から得られた平均値 (白丸) と 95 % 信頼区間 (実線バー) で示す。個々の動物データも示す (黒丸)。BLOQ (5 ng/mL) 以下の検出可能な mAb 濃度は、BLOQ / 2 (破線) として報告する。

【図 23】10、3 又は 1 mg/kg の Y022883 の単回静脈内投与後のカニクイザルの血清 mAb 濃度と時間の関係。データは、3 頭の雄の成体動物から得られた平均値 (

10

20

30

40

50

10 mg/kg：白丸、3 mg/kg：黒四角、1 mg/kg：黒三角）と95%信頼区間（実線のバー）で示す。個々の動物データも示す（10 mg/kg：黒丸、3 mg/kg：白四角、1 mg/kg：黒三角）。BLOQ（5 ng/mL）以下の検出可能なmAb濃度はBLOQ/2（破線）として報告する。

【図24】10 mg/kgのY022883の単回投与後のカニクイザルのex vivo薬力学。データは、投与前の刺激誘導（PAR2-APを円、トリプシンを四角、LPSを三角として）遺伝子シグネチャーの割合として示す。

【図25】3 mg/kgのY022883の単回投与後のカニクイザルのex vivo薬力学。データは、投与前の刺激誘導（PAR2-APを円、トリプシンを四角、LPSを三角として）遺伝子シグネチャーの割合として示す。

【図26】1 mg/kgのY022883の単回投与後のカニクイザルのex vivo薬力学。データは、投与前の刺激誘導（PAR2-APを円、トリプシンを四角、LPSを黒三角として）遺伝子シグネチャーの割合として示す。

【図27】T84細胞におけるトリプシン誘導性のp38-MAPK及びpERKのリン酸化に対するY022883（SH-C）及びベンチマークII（SH-D）の阻害。データは、媒体処理と比較した相対レベルを示し、全ERK又はp38-MAPKで標準化した。

【図28】T84細胞におけるPAR2-AP誘導性のp38-MAPK及びpERKのリン酸化に対するY022883（SH-C）及びベンチマークII（SH-D）の阻害。データは、媒体処理と比較した相対レベルを示し、全ERK又はp38-MAPKで標準化した。

【図29】T84細胞におけるトリプシン及びPAR2-AP誘導性のpERK（左）及びp38-MAPK（右）のリン酸化に対するY022883（SH-C）及びベンチマークII（SH-D）の阻害。データは、媒体と陽性対照との差の割合として示す。

【実施例】

【0383】

本発明の特定の態様及び実施形態を、上記の図面を参照しながら、実施例により以下に説明する。

【0384】

実施例1 ー 完全長及びN末端切断ヒトPAR2構築物の作製

〔PAR2構築物の設計〕

ヒトプロテアーゼ活性化受容体2（PAR2）の遺伝子を、9つの点変異の導入により受容体をアンタゴニスト構造で安定化するために、標準的な部位特異的変異誘発戦略（Hutchison et al., 1978に基づく）を用いて編集した（Cheng et al., 2017）。

【0385】

安定化受容体は、N末端の54アミノ酸（コードされた構築物の最初の残基はV55）が遺伝的に切断されているか、又は当技術分野で広く知られているポリメラーゼ連鎖反応（PCR、Saiki et al., 1985に基づく）を用いて完全長（FL-N）を維持している。

【0386】

全ての4つのPAR2タンパク質は、安定化受容体プロセスの一部として、C末端でも20アミノ酸が遺伝的に切断されている（最後の残基はK377）。

【0387】

以下の構築物を作製した：

PAR2-1：P151：55-377、グリコシル化、pFastBacHisStreptII、切断型

PAR2-2：P166：1-377、脱グリコシル化：N30Q、N222Q、pFastBacHisStreptII、完全長

PAR2-3：P157：1-377、グリコシル化、pBacMamHisStreptII、完全長

p I I、完全長

P A R 2 - 4 : P 1 5 5 : 5 5 - 3 7 7、グリコシル化、p B a c M a m H i s S t r e p I I、切断型

抗原として使用するために十分に安定なN末端切断型P A R 2受容体を作製した理論的根拠は、N末端以外の受容体の他の領域に結合する抗体の発見及び同定を可能にし、それにより新規抗体を生成するためである。

【0388】

F L - Nタンパク質P A R 2 - 2において、潜在的グリコシル化部位N 3 0及びN 2 2は、部位特異的変異誘発によりグルタミン残基に置換された。

【0389】

S t r e p I I及びd e c a - ヒスチジンタグは、アフィニティー精製及びE L I S A アッセイにおける特異的な選択を可能にするために、当業者に知られているP C R及びエンドヌクレアーゼクローニング戦略によりC末端に付加された。

【0390】

P A R 2 - 1及びP A R 2 - 2遺伝子を、p F a s t B a c 1ベクター (T h e r m o f i s h e r、# 1 0 3 6 0 0 1 4) にクローニングした。

【0391】

ベクターの多重クローニング部位は、N h e Iを制限エンドヌクレアーゼとして使用して遺伝子の挿入を可能にするように改変した。

【0392】

p F a s t B a c 1ベクターは、昆虫細胞用の市販のB a c - t o - B a c発現系 (S m i t h e t a l. 1 9 8 3、T h e r m o f i s h e r、# 1 0 3 5 9 0 1 6) の一部であり、当技術分野で知られ広く使用されている。

【0393】

メーカーの指示に従った。

【0394】

P A R 2 - 1及び- 2タンパク質にはB a c - t o - B a c発現系を使用した。

【0395】

p F a s t B a c 1ベクターは、ポリヘドリンプロモーターに続いてヒトサイトメガロウイルスプロモーター3'を導入することによりp B a c M a mベクターを生成するように改変され、哺乳動物細胞におけるタンパク質P A R 2 - 3及びP A R 2 - 4タンパク質のタンパク質発現を可能した。

【0396】

p B a c M a mウイルス生成にもB a c - t o - B a c発現系の指示を適用した。

【0397】

[発現]

タンパク質P A R 2 - 3及びP A R 2 - 4は、10%ウシ胎児血清アルブミン (F B S、S i g m a - A l d r i c h、# F 9 6 6 5) を含むL o n z a P r o 2 9 3 s C D M培地 (# B E 0 2 - 0 2 5 Q) に5mM酪酸ナトリウム (S i g m a - A l d r i c h、# 3 0 3 4 1 0) を補充した培地中で、ヒト胚性腎臓293F細胞 (G i b c o 2 9 3 F細胞、T h e r m o f i s h e r S c i e n t i f i c、# 1 1 6 2 5 0 1 9) において、 2.5×10^6 個/mLの細胞密度で48時間2.7%のウイルス感染により発現させた。

【0398】

細胞を回収し、以下に述べるS f 9細胞発現について処理した。

【0399】

哺乳動物細胞株は、哺乳動物様のグリコシル化パターンを含む抗原を利用する選択肢を提供するために構築物の発現に使用した。

【0400】

タンパク質P A R 2 - 1及び2は、10% F B S (S i g m a - A l d r i c h、# F

10

20

30

40

50

9665)を含むExpression Systems ES921培地(#96-001-01)中でSpodoptera frugiperda(Sf9)細胞(The rmofisher、#89070101)において発現させた。

【0401】

細胞は 3.5×10^6 / mLの細胞密度で、2の感染多重度(MOI)で感染させた。

【0402】

細胞は48時間後に遠心分離により回収し、Roche EDTAフリー完全プロテアーゼ阻害剤(PI、Sigma-Aldrich、#5056489001)を添加した50mM HEPES pH7.5、250mM NaCl(PAR2バッファー)で洗浄し、-80℃で保存した。

【0403】

細胞膜を調製するために、細胞を、PI錠剤(PAR2/PI)を添加したPAR2バッファー中に再懸濁し、Microfluidics Microfluidizer Processorを1回通過させることにより均質化した。

【0404】

膜は、Beckman45 Tiローターで、135,000gで1時間超遠心分離することにより回収し、PAR2/PIバッファー中に均質化し、-80℃で保存した。

【0405】

後続の全ての精製工程は4℃で行った。

【0406】

〔精製〕

解凍した膜は、1%(w/v) LMNG(Anatrace、#NG310)/0.1%(w/v)コレステリルヘミコハク酸(CHS、Anatrace、#210)混合物の添加により1時間可溶化した。

【0407】

不溶性物質は、Beckman45 Tiローターで、205,000gで30分間超遠心分離することにより除去した。

【0408】

タンパク質は、8mMイミダゾールの存在下で、8mL NiNTA Superflow樹脂(Qiagen、#30430)に2時間バッチ結合させた。

【0409】

樹脂をXK16/20カラム(GE Healthcare、#GE28-9889-37)に充填し、15カラム体積(CV)の高塩バッファーA1(50mM HEPES pH7.5、500mM NaCl、0.02% LMNG、0.002% CHS、75mMイミダゾール)及び3CVのバッファーA2(50mM HEPES pH7.5、250mM NaCl、0.02% LMNG、0.002% CHS、75mMイミダゾール)で洗浄した。

【0410】

タンパク質は、300mMイミダゾールを加えたバッファーA2で溶出し、分子量100kDaカットオフのAmicon Ultra-15再生セルロース濃縮器(ミリポア、#UFC900308)を用いて0.5mLに濃縮した。

【0411】

凝集物質は、TLA-100.2ローターを用いたベックマンコールター卓上遠心機で220,000g、10分間の超遠心分離により除去した。

【0412】

次に、サンプルは、50mM HEPES pH7.5、150mM NaCl、0.02% LMNG、0.002% CHS中のSuperdex 200 10/300 GLカラム(GE Healthcare、#17-5175-01)上でサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。

【0413】

10

20

30

40

50

モノマー種に対応する画分をプールし、分子量カットオフ100 kDaのVivaSpin 500濃縮器(Vivaproducts、#VS0242)を用いて6~8 mg/mLまで濃縮した。

【0414】

サンプルの純度及び単分散性は、SDS-PAGE及び分析ゲルろ過により分析した。

【0415】

タンパク質濃度は、Nanodrop分光光度計(ThermoFisher Scientific)を用いて、分子量、減衰係数及び280 nmでのタンパク質吸光度を用いて決定した。

【0416】

タンパク質は、目的のタンパク質であることを確認するために質量分析により確認した。

【0417】

【ナノディスク埋め込みヒトPAR2 StARタンパク質の調製】

ナノディスクの調製は当技術分野で知られており、N末端にヘキサヒスチジンタグを有するゼブラフィッシュアポリポタンパク質-1(ZAP1)を足場タンパク質として用いるBanerjee et al., 2008に基づく。

【0418】

タンパク質PAR2-1及び-2は、100~200 µMでナノディスクに再構成され、Fab選択のための抗原として使用した。

【0419】

ナノディスクを再構成するために、まず以下の脂質を200 mMデオキシコール酸ナトリウム(Sigma-Aldrich、#6750)水溶液中に再懸濁した：POPC(1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、Anatrace、#P616)、POPG(1-ヘキサデカノイル-2-(9Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール、Anatrace、#P516)及びコレステロール(Anatrace、#CH200)を3:2:0.5の比で混合した。

【0420】

最終モル比は、PAR2:POPC:POPG:コレステロール:デオキシコール酸ナトリウムについて、それぞれ1:72:48:12:264であった。

【0421】

最終デオキシコール酸ナトリウム濃度は15 mM超に維持し、10 mM HEPES 7.4、150 mM NaClバッファーで調整した。

【0422】

氷上で30分間インキュベートした後、ゼブラフィッシュアポリポタンパク質1(ZAP1)をPAR2:ZAP1のモル比1:2で添加した。

【0423】

混合物を氷上で1時間インキュベートした。

【0424】

次いで、タンパク質溶液と乾燥Bio-Beadの重量を1:1の比率(例えば、900 µLのタンパク質に対して900 µgのBio-Beads)として、サンプルをBio-Beads SM-2(Bio-Rad、#1528920)と共に一晩攪拌することにより、界面活性剤を除去した。

【0425】

ナノディスクは上清として回収し、ビーズを50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaClで、ビーズ重量の2倍の体積相当で洗浄した(例えば900 µgのビーズに対して1.8 mL)。

【0426】

タンパク質溶液を1 mL未満に濃縮し、卓上遠心機で、13,500 gで15分間遠心分離し、上清を50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl中、上記で使

10

20

30

40

50

用したSuperdex 200 10/300 GLカラム (GE Healthcare) で、サイズ排除クロマトグラフィーにかけた。

【0427】

ナノディスクピークを示す画分をプールし、Amicon Ultra-4再生セルロース濃縮器 (分子量カットオフ100 kDa、ミリポア、#UFC810096) 中で1~2 mg/mLに濃縮し、アリコートで、-80℃で凍結した。

【0428】

実施例2 - スクリーニング

本開示の抗体又は抗原結合フラグメントは、ファージディスプレイライブラリーから同定した。

【0429】

所望の結合特性を有する抗体について、ファージディスプレイライブラリーを生成しそのようなライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が当技術分野で知られている。

【0430】

本明細書で提供される抗体を同定するために使用したファージディスプレイライブラリーは、Ylanchia (Tiller et al., 2013) の概念に基づくYlanchia (商標) ファージミドであり、Fabをファージ表面に提示するためにCys Display (商標) 技術を採用している (Lohnning et al., 2000)。

【0431】

完全長又はN末端切断ナノディスク埋め込みヒトPAR2 StaRタンパク質を用いる固相パニングに重点を置いて、10のパニング戦略 (当技術分野で知られている技術を用いた固相パニング、捕捉パニング、及び全細胞パニングを含む) を設計した。

【0432】

ナノディスク埋め込みPAR2 StaRの完全性及び安定性を保証し、パニング過程中に、他の望ましくないエピトープに対する特異的な候補の濃縮のリスクを低下させるために、様々な抗原提示技術を実施した。

【0433】

ナノディスク埋め込みヒトPAR2 StaR変異体をパニング抗原 (すなわち、界面活性剤フリーの状態) として使用した。

【0434】

ほとんどのパニング戦略について、ナノディスク埋め込みヒトPAR2 StaRタンパク質は、タグ特異的捕捉抗体を介して提示された。

【0435】

捕捉抗体ベンチマーク1 (Giblin et al., 2011)、抗ヒスチジン-A b IgG1 (StreptMAB-Imm) 又は試薬 (NiNTA) に特異的な候補の濃縮のリスクを低下させるために、捕捉モードの交互化を行った。

【0436】

一部の戦略では、ヒトPAR2発現Flp-In CHO及びBacMam感染HEK 293F細胞で差次的な全細胞パニングを実施した。

【0437】

他の細胞標的に特異的な候補 (オフターゲット結合) の濃縮のリスクを低下させるために、StaRでのパニングに続いて細胞パニングの交互化を採用した。

【0438】

ヒトPAR2の機能的に活性なリガンドと競合するファージ抗体を増幅するために、市販の低分子リガンドAZ8838及びAZ3451 (Cheng et al., 2017) で飽和させたナノディスク埋め込みヒトPAR2 StaR変異体PAR2-2 P166:1-377、脱グリコシル化:N30Q、N222Q、pFastBacHis StreptII又はhPAR2 (55-377_10xH_Sx2 (切断型) PAR2-1:P151:55-377、グリコシル化、pFastBacHis StreptII)

10

20

30

40

50

を用いてパニングを実施した。

【0439】

これらのパニングにより、多くの様々な細胞背景で発現するヒトP A R 2受容体に対してほとんどが良好な特異性を有する多数のY l a n t h i a（商標）候補が同定された。

【0440】

より厳密な非特異的に結合したファージの選択除外のために、固相パニングの各ラウンドの前に無関係な抗原成分で事前吸着を行った。

【0441】

無関係な抗原成分には、N i - N T A、空のナノディスク、並びに捕捉抗体抗S t r e p I I m A b（S t r e p M A B - I m m o）及び抗ポリ6×ヒスチジン-A b I g G 1（R & D M A B 0 5 0）又はナノディスク埋め込み代替G P C R（成熟パニングで排他的に使用）が含まれた。

【0442】

〔ファージ調製〕

F a b提示ファージ粒子の生産：各選択ラウンドについて、表面にF a bフラグメントを提示する新しいファージ粒子を生産した。

【0443】

それにより、大腸菌T G 1培養物を前の選択ラウンドに由来するファージで感染させた。

【0444】

遠心分離により、細菌ペレットを新鮮培地中に再懸濁し、寒天プレートに播種した。

【0445】

増殖後、コロニーをプレートからかき取り、ファージレスキュー、選択クローンのポリクローナル増幅及びファージ生産に使用した。

【0446】

精製ファージを用いて、次のパニングラウンドを開始した。

【0447】

最後のパニングラウンドの後、単一クローンを寒天プレートから、培地を予め充填した滅菌マイクロタイタープレートのウェルに採取した。

【0448】

増殖の際、グリセロールを含む培地を各マスタープレートのウェルに添加した。プレートはアルミホイルで密封し、- 8 0 ° Cで保存した。

【0449】

実施例3 - E L I S Aによるヒットの同定及びF A C SとI n t e l l i C y tスクリーニングによる全細胞結合の同定

〔E L I S A〕

E L I S A技術は、標的抗原のパニング出力から同定された単一F a bクローンのスクリーニング並びに精製抗体の特性評価の両方に使用した。

【0450】

最適な抗原及び抗体濃度並びにブロッキング条件は、最先端の方法に従って決定した。

【0451】

〔抗原の直接コーティング〕

抗原をマイクロタイタープレートに固定化した。

【0452】

プレートをブロッキングし、F a bを含む粗大腸菌溶解物又は精製F a b若しくはI g Gサンプルなどの抗体とインキュベートした。

【0453】

結合した抗体は、「A t t o P h o s」蛍光基質と組み合わせたアルカリホスファターゼ（A P）共役二次抗体を用いて検出した。

【0454】

10

20

30

40

50

個々のアッセイ工程間で複数の洗浄工程を行った。

【0455】

〔抗原捕捉〕

他のELISA設定では、抗原をマイクロタイタープレートにコートしたタグ特異的抗体（例えば、抗Strept II、抗His又はベンチマーク1参照mAb）を介してプレートに捕捉した。

【0456】

結合した抗体は、「AttoPhos」蛍光基質と組み合わせた各アルカリホスファターゼ（AP）共役二次抗体を用いて検出した。

【0457】

個々のアッセイ工程間で複数の洗浄工程を行った。

【0458】

〔抗F d ELISAによるFab発現チェック〕

粗細菌溶解物中のFab発現を検証するために、プレートをF dフラグメント特異的抗体でコートした。

【0459】

結合したFabは、「AttoPhos」蛍光基質と組み合わせた各アルカリホスファターゼ（AP）共役抗Fab特異的抗体を用いて検出した。

【0460】

個々のアッセイ工程間で複数の洗浄工程を行った。

【0461】

〔KoffランキングELISA〕

Koffの推定のために、初回の読み出しの際に、ELISAプレートを頻繁にかつ厳密に洗浄し、kdの遅い候補を同定するために2回目の検出を行った。

【0462】

洗浄は以下の条件で行った：10分間のインキュベーションで5回洗浄し、一晚インキュベートした後、10分間のインキュベーションで5回洗浄し、1時間インキュベートした後、5分間のインキュベーションで5回洗浄し、その後検出した。

【0463】

結合した抗体は、「AttoPhos」蛍光基質と組み合わせた各アルカリホスファターゼ（AP）共役二次抗体を用いて検出した。

【0464】

〔ELISA法の実施〕

ELISA技術は、標的抗原のパニング出力から同定された単一Fabクローンのスクリーニング並びに精製抗体の特性評価の両方に使用した。

【0465】

最適な抗原及び抗体濃度並びにブロッキング条件を評価し、設定を調整した。

【0466】

パニング選択後、各第3パニングラウンド出力からの368クローンを細菌溶解物として一次スクリーニングで処理した。

【0467】

固相パニングからのパニング出力は、StaRコート磁気ビーズ上のFACSにより又はタグ付きStaR変異体若しくはナノディスク埋め込みStaRを用いてELISAでスクリーニングした。

【0468】

スクリーニングは主にPAR2-1 P151変異体（55-377、グリコシル化、pFastBacHisStrept II）で行った。

【0469】

カウンタースクリーニングには主に空のナノディスクが含まれ、また抗F d抗体及びマウスガンマグロブリンも含まれた。

10

20

30

40

50

【0470】

二次スクリーニングは主にELISAで行った。

【0471】

抗原パネルには、PAR2-1:P151:55-377、グリコシル化、pFast BacHisStrepII、並びにリガンドAZ8838及びAZ3451で飽和させたナノディスク埋め込みPAR2-2:P166:1-377、脱グリコシル化:N30Q、N222Q、pFastBacHisStrepIIが含まれた。

【0472】

同様に、カウンタースクリーニングは捕捉抗体StrepMAB-ImmobilizedHisStrepII及びbRI

10

L-His-StrepIIに拡張した。

【0473】

細胞上の結合シグナルは低かったが、対象のクローンの全ては、組換えナノディスク埋め込みStaR材料上で得られた結合プロファイルと細胞結合との間の良好な相関を示した。

【0474】

これらを配列決定のために選択し、サイレントh-IgG1f-AEASS形式(IgG1L234AL235EG237AA330SP331S)へのIgG変換を行った。

【0475】

この形式はNovo Nordiskの第2世代抗C5aR抗体NNC0215-0384(Wagner et al., 2014))において臨床的に検証されており、特性評価用に高度なマイクロスケール及び／又は探索スケールとして発現および精製された。

20

【0476】

機能的特性評価の前に、IgGをELISA(図1及び2)及びIntelliCytによる細胞結合について再スクリーニングして、結合特異性を再確認した。

【0477】

[FACS及びIntelliCyt]

[FACS及びIntelliCytによる細胞結合を用いたPAR2バインダーの陽性同定のためのスクリーニング]

細胞表面発現抗原への結合事象は、パニング出力からの粗大腸菌溶解物又は精製抗体を用いてフローサイトメトリーにより同定した。

30

【0478】

ディファレンシャル全細胞パニング(DWCP)からのパニング出力の高スループット一次スクリーニングは、主にヒト野生型PAR2発現Flp-In CHO細胞(Flp-In CHO-huPAR2)、GNTI BacMam野生型PAR2細胞及びGNTI BacMam切断型PAR2StaRと、親株Flp-In CHO細胞(PAR2陰性)又は非感染HEK293GNTI細胞を用いて行った。

【0479】

親株Flp-In CHO細胞への上昇したバックグラウンド結合を示す候補は、非特異的結合体又はオフターゲット結合体のいずれかであるとみなした。

40

【0480】

全ての工程は、潜在的な受容体の内在化を防ぐためにFCS及びアジ化ナトリウムを含むFACSバッファー中で行った。

【0481】

細胞懸濁液をマイクロタイタープレートに移し、抗体サンプルを添加し、その後プレートを4℃でインキュベートした。

【0482】

サンプル量及び細胞数は、使用したプレートの種類に応じて調整した。

【0483】

インキュベーション後、細胞をスピンドウンし、FACSバッファーで洗浄した。

50

【0484】

蛍光標識二次試薬を結合抗体の検出に使用した。

【0485】

プレートをBD FACSアレイ又はIntelliCyt HTFC/iQueシステムで測定し、データをFlowJo、ForeCyt又は独自のソフトウェアツールを用いて分析した（図3）。

【0486】

〔全細胞結合／特異性の性質の評価（FACS、IntelliCyt）〕

〔ヒトPAR2発現Sf9細胞に対するフローサイトメトリーによる結合特異性の評価〕

10

初期PAR2候補のFACSベースの分析は、PAR2発現Sf9昆虫細胞を用いて行った。

【0487】

抗体がN末端又はその他の細胞外に露出した受容体の部分に優先的に結合するかどうかを理解するために、細胞は完全長N末端発現PAR-2 Star（PAR2-3、1-377、ここではFL-N Starと表記）又はN末端切断型受容体（PAR2-4、55-377、ここではNΔ53 Starと表記。若しくは図4及び7では「切断型」と表記。）のいずれかで感染させた。

【0488】

200 μLのSf9細胞を4×10⁶個/mLでFACSバッファー（PBS（Sigma、#F9665）、1% BSA（Sigma、#A9647）及びRoche Completeプロテアーゼ阻害剤（#11836145001））中で、室温で1時間20 nMの対象の抗体と共にインキュベートした。

20

【0489】

細胞をペレット化し、200 μLのFACSバッファーで3回洗浄した。

【0490】

引き続き、細胞を200 μLの二次アロフィコシアニン（APC）結合抗ヒトIgGと共に、20 nMで1時間インキュベートし、再度200 μLのFACSバッファーで3回洗浄した。

【0491】

読み出し値はBD FACS Canto II FACS装置を用いてモニターした。

30

【0492】

フローサイトメトリーにより決定したように、異なる結合プロファイルを有する一連の結合抗体が生成された。ここでY022075は優先的に切断型受容体に結合し、Y022065は切断型受容体及び完全長受容体の両方に結合する。

【0493】

対照的に、抗体クローンY22066はほぼ排他的にFL-N構築物に結合する。

【0494】

これらの観察結果は、エピトープの多様性を反映している（図4）。

【0495】

40

〔IntelliCytにより決定した結合特異性〕

結合特異性は精製IgGについて確認し、n=2の実験としてヒトPAR2発現細胞上で重複した16点滴定として行った。

【0496】

以下の細胞株を分析に含めた：

- － Flp-In CHO_V5His_huPAR2と親株Flp-In CHO細胞
- － Flp-In CHO_huPAR1と親株Flp-In CHO細胞
- － HEK Flp-In TRex 293_huPAR2発現誘導と非誘導細胞
- － HEK293F感染BacMam WT FL-huPAR2と非感染細胞
- － HEK293F感染BacMam WT FL-マーモセットPAR2と非感染細胞。

50

【0497】

対象の全てのクローンはPAR2ナノディスクパニング戦略に由来し、これはタグ付き受容体及び／又はナノディスク足場を介した抗体捕捉により方向付けられた提示を可能にし、異なる細胞背景で発現したPAR2に対する選択的結合を示した。

【0498】

PAR2 StaRナノディスクの調製は、細胞上で発現した天然受容体に匹敵する、界面活性剤フリーの環境にある高品質のPAR2受容体を提示し、高度に有望な機能的活性候補の同定につながった。

【0499】

さらに、StaRナノディスクなどの組換え材料を用いて、パニングストリンジェンシーを容易に制御できる。

【0500】

[IntelliCytによるマルチプレックス化]

種の交差反応性及び／又は望ましくない対抗標的への結合を同時に評価するために、IntelliCytのHTFC／iQueスクリーニングプラットフォームを用いて384ウェルプレート形式でスクリーニングを行った。

【0501】

HTFC／iQueスクリーニングシステムは、複数の標的細胞株への結合又は望ましくない／非特異的結合の並行評価、言い換えればマルチプレックス化にも使用した。

【0502】

異なる細胞集団を、Calcein又はCell-Tracker Greenなどの蛍光色素の異なる量で予め標識することにより区別し、各細胞集団に対して蛍光強度の固有のシグネチャーを確立し、それにより蛍光コード化システムを作った。

【0503】

色分けされた細胞株を物理的に混合し、試験対象抗体と一緒に混合した。

【0504】

個々の細胞株は、予め標識された各細胞株の蛍光を介して同定できた。

【0505】

粗細菌細胞溶解物を細胞と混合し、室温で1時間、暗所で、穏やかに振とうしながらインキュベートした。

【0506】

蛍光測定はIntelliCyt HTFC／iQue装置で行った。

【0507】

インキュベーション工程間で洗浄は不要であった。

【0508】

生データは「ForeCyt」ソフトウェアを用いて評価した。

【0509】

データ取得後、各サンプルの細胞株をそれらの蛍光シグネチャーに従って同定し、抗体結合について個別に評価した。

【0510】

各細胞株の染色条件を最適化して、異なる細胞株の分離を可能にするアッセイ設定を見出した(図5)。

【0511】

最終リードセットの親であるY022065は、捕捉されたナノディスク埋め込み脱グリコシル化完全長hPAR2(PAR2-2、1-377、N30Q、N222Q) __10xH__Sx2を採用するパニング戦略から得られた。

【0512】

第1ラウンド及び第3ラウンドでは、抗原を抗Strept II抗体で捕捉した。

【0513】

第2ラウンドでは、抗原をベンチマーク1で捕捉するかNi-NTAプレートにコート

10

20

30

40

50

した。

【0514】

要約すると、特異性は以下により評価した：リガンド A Z 8 8 3 8 及び A Z 3 4 5 1 の存在下又は非存在下での F L - S t a R ナノディスク及び切断型 S t a R ナノディスクへの結合の E L I S A ベースの評価；空のナノディスク、b R I L - H i s - S t r e p I I、S t r e p M A B - I m m o（捕捉抗体）及びマウスガンマグロブリンを含む対抗標的への結合の E L I S A ベースの評価；P A R 2 発現細胞株（n > 2）：C H O V 5 H i s _ _ h u P A R 2、誘導 H E K F l p - I n T R e x 2 9 3 _ _ h u P A R 2、H E K 2 9 3 F 感染 B a c M a m W T F L - h u P A R 2、A 5 4 9、F l p - I n C H O _ _ m a P A R 2（アカゲザル、M a c a c a m u l a t t a）、F l p - I n C H O _ _ m o P A R 2（マウス）並びに P A R 2 陰性細胞株（親株 F l p - I n C H O、J u r k a t、F l p - I n C H O _ _ h u P A R 1）への結合の評価。

10

【0515】

実施例 4 - F a b フラグメント及び I g G の発現と精製

〔F a b 発現ベクターへのサブクロニング〕

必要に応じ、かつ大腸菌中での可溶性 F a b の迅速な発現を促進するために、選択した Y l a n t h i a（商標）ファージの F a b コード化インサートを、p Y P d i s 1 0 デisplayベクターから所望の特徴を含む F a b 発現ベクター（p Y B e x 1 0 _ _ h _ _ F a b - F H）にサブクロニングした。

【0516】

サブクロニングは、X b a I | E c o R I - H F | P s t I - H F を介した三重消化により行った。

20

【0517】

H K B 1 1 細胞での完全長 F a b C y s 発現のために、選択した候補を p Y M e x 1 0 _ _ h _ _ F a b C y s - A v i H 発現ベクターにもクロニングした。

【0518】

サブクロニングは、p Y M e x _ _ h _ _ I g G 1 f _ _ A E A S S 供給ベクターから制限酵素 N d e I | X h o I を用いて抗体コード化フラグメントを切り出し、標的ベクター p Y M e x 1 0 _ _ h _ _ F a b C y s - A v i - H i s にライゲーションすることにより行った。

30

【0519】

〔I g G 発現ベクターへのサブクロニング〕

H K B 1 1 細胞での完全長 I g G 発現のために、選択した候補を p Y M e x 1 0 _ _ h _ _ I g G 1 f _ _ A E A S S 発現ベクターにクロニングした。

【0520】

サブクロニングは、大量の配列固有の F a b クローンを I g G 形式に便利かつ効率的に変換する方法を用いて行った。

【0521】

要約すると、V H コード化フラグメント（制限部位 N h e I | X h o I で挟まれる）、V L コード化フラグメント（制限部位 N d e I | K p n I で挟まれる）及びカップ又はラムダ特異的真核生物 p Y M i n 発現カセット（制限部位 K p n I | N h e I で挟まれる）を、哺乳動物細胞での発現用のアクセプターベクター（N d e I | X h o I で消化）に一段階又は二段階のクロニングでクロニングした。

40

【0522】

大腸菌 X L - 1 b l u e 細胞の形質転換後、コロニー P C R 及び全挿入領域の配列決定により単クローンの品質管理を行った。

【0523】

H K B 1 1 細胞での大規模発現のために、選択した候補を、安定したプールの作製用のゼオシン耐性遺伝子を含む p C M e x 0 0 3 / 0 0 4 _ _ k a n _ _ h _ _ I g G 1 f _ _ A E A S S 発現ベクターにクロニングした。

50

【0524】

要約すると、V Hコード化DNAフラグメント、V Lコード化DNAフラグメント及びラムダ特異的眞核生物p Y M i n発現カセットを、アクセプターベクターp C M e x 0 0 3 / 0 0 4 _ k a n _ h _ I g G 1 f _ A E A S Sにクローニングした。

【0525】

[F a bフラグメントを含む細菌溶解物の生成]

増殖培地（クロラムフェニコール、I P T G及び0.1%グルコースを含む2 x Y T）で予め充填した96ウェル／384ウェルマイクロタイタープレートに、マスタープレートからのグリセロールのストックを用いて接種した。

【0526】

プレートを37℃でインキュベートして細菌を増殖させ、22℃でF a b発現のために一晩振とうした。

【0527】

翌日、発現培養物をホウ酸バッファー、E D T A及びリゾチームを含むB E Lバッファ-の添加により溶解した。

【0528】

選択したプレート形式及び適用に応じて容量を調整し、ブロッキングのプロトコルをそれに応じて適合させた。

【0529】

溶解物を感受性の高い細胞スクリーニング（例えば機能アッセイ）に使用する場合、E D T Aは省略した。

【0530】

[F a bフラグメントの探索的スケールの生産]

大腸菌T G 1 F-細胞における細菌発現ベクターにコードされたF a bフラグメントの発現は、0.1%グルコース及び34 µg / mLクロラムフェニコールを添加した500 mLの2 x Y T培地を用いてシェイクフラスコ培養で行った。

【0531】

OD 600が0.5に達するまで培養物を振とうした。

【0532】

I P T G（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）を添加し、さらに20時間培養することによりF a b発現を誘導した。

【0533】

細胞を回収し、リゾチームを用いて破碎した。

【0534】

H i s 6標識F a bフラグメントを、I M A C（B i o - R a d | G e r m a n y）を介して単離し、イミダゾールを用いて溶出した。

【0535】

「P D 1 0」カラム（G E H e a l t h c a r e | G e r m a n y）を用いて1 x D u l b e c c o ' s P B S（p H 7.2）にバッファー置換した。

【0536】

サンプルを滅菌ろ過（0.2 µm）した。

【0537】

タンパク質濃度はUV分光光度計により測定した。

【0538】

サンプルの純度は、変性非還元15% S D S - P A G Eで分析した。

【0539】

F a b調製物の均一性は、検量標準を用いるサイズ排除クロマトグラフィー（H P - S E C）により天然状態で決定した。

【0540】

[哺乳動物細胞におけるI g Gのマイクロスケール生産]

10

20

30

40

50

真核生物HKB11又はHEK293-6E細胞に、IgGの重鎖及び軽鎖の両方をコードする哺乳動物発現ベクターDNAを形質導入した。

【0541】

細胞培養上清を形質導入7日後に回収し、液体ハンドリングステーションを用いてプロテインAアフィニティークロマトグラフィー(MabSelect SURE | GE Healthcare)にかけた。

【0542】

特に記載のない限り、サンプルは中和溶出バッファー(NaPS: 137mM Naリン酸、81mM NaCl、pH7)中に維持した。

【0543】

サンプルを滅菌ろ過(0.2µmの孔径)した。

【0544】

タンパク質濃度はUV分光光度計により測定し、IgGの純度はCE-SDS(LabChip GXII | Perkin Elmer | USA)を用いて変性還元条件下で分析した。

【0545】

HP-SECを行ってIgG調製物を天然状態で分析した。

【0546】

[IgGの探索的スケールの生産]

真核生物HKB11又はHEK293-6E細胞に、IgGの重鎖及び軽鎖の両方をコードする哺乳動物発現ベクターDNAを形質導入した。

【0547】

形質導入後3日目又は6日目に細胞培養上清を回収し、標準的なプロテインAアフィニティークロマトグラフィー(MabSelect SURE | GE Healthcare)に供した。

【0548】

特に記載のない限り、1x Dulbecco's PBS (pH7.2 | Invitrogen)へのバッファー交換を行い、サンプルを滅菌ろ過(0.2µmの孔径)した。

【0549】

タンパク質濃度はUV分光光度法により測定し、IgGの純度は、変性、還元及び非還元条件下でCE-SDS(LabChip GXII | Perkin Elmer | USA)を用いて分析した。

【0550】

HP-SECを行ってIgG調製物を天然状態で分析した。

【0551】

[AviHisタグ付きFabCysの探索的スケールの生産]

真核生物のHKB11細胞又はHEK293-6E細胞に、ジスルフィド架橋FabCysAviHisの重鎖と軽鎖の両方をコードする哺乳類発現ベクターDNAを形質導入した。

【0552】

形質導入後3日目又は7日目に細胞培養上清を回収し、金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(Protino Ni-NTA | Macherey Nagel)に供した。

【0553】

特に記載のない限り、1x Dulbecco's PBS (pH7.2 | Invitrogen)へのバッファー交換を行い、サンプルを滅菌ろ過(0.2µmの孔径)した。

【0554】

タンパク質濃度はUV分光光度法により測定し、FabCysAviHisの純度は変

10

20

30

40

50

性、還元及び非還元条件下でCE-SDS (LabChip GXII | Perkin Elmer | USA) を用いて分析した。

【0555】

HP-SECを行い、FabCysAviHis調製物を天然状態で分析した。

【0556】

[in vivoでの特性評価のためのIgG生産]

安定したHKB11細胞プールを確立することにより、材料生産を行った。

【0557】

真核生物HKB11細胞に、IgGの重鎖と軽鎖の両方をコードする哺乳動物発現ベクターDNAを形質導入した。

【0558】

安定した発現細胞プールの作製のため、各ベクターはさらにゼオシン耐性遺伝子を含む。

【0559】

形質導入の3日後、160 µg/mLのゼオシンを細胞懸濁液に添加して選択を開始した。

【0560】

選択の間、細胞数及び生存率は、最初は低下した。

【0561】

形質導入の20～30日後、細胞は回復し始めた。

【0562】

生存率が約80%に達したとき、安定したプールを所望の容量までスケールアップした。

【0563】

形質導入後6日目に細胞培養上清を回収し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー (MabSelect SURE | GE Healthcare) に供した。

【0564】

必要に応じて、凝集体を除去するために第2の精製工程 (分取SEC | Superdex 200 | GE Healthcare) を行った。

【0565】

1x Dulbecco's PBS (pH 7.2 | Invitrogen) へのバッファー交換を行い、サンプルを滅菌ろ過 (0.2 µmの孔径) した。

【0566】

タンパク質濃度はUV分光光度法により測定し、IgGの純度は変性、還元及び非還元条件下で、CE-SDS (LabChip GXII | Perkin Elmer | USA) を用いて分析した。

【0567】

HP-SECを行い、IgG調製物を天然状態で分析した。

【0568】

エンドキシンレベルはKQCLアッセイ (Lonza) により測定した。

【0569】

タンパク質の同一性は質量分析 (100MDL43) を用いて確認した。

【0570】

実施例5 - リード分離クローンのプロファイリング

[ヒトPAR2における機能的一次ヒットの同定のための細胞ベースのIP-One Gαqアッセイ]

クローンのELISA及びIntelliCytでの完全な検証によるPAR2結合状態の確認後、機能的特性評価を行った。

【0571】

探索的スケールで精製したIgG1f__AEASSクローンについて、Cisbio (

10

20

30

40

50

商標) I P - O n e G α q アッセイを用いて、合成アゴニストである活性化ペプチド (2 - F u r y o l - L I G R O) による P A R 2 受容体の活性化を阻害する能力を 2 つの濃度で反復試験した。

【 0 5 7 2 】

H E K 2 9 3 F 細胞を、懸濁培養形式で、3 7 ° C 、 5 % C O 2 雰囲気に加湿インキュベーター内で、増殖培地 (P r o 2 9 3 、 5 % F B S 、 1 % G l u t a m a x 、 0 . 4 % ペニシリン / ストレプトマイシン) 中、0 . 5 m M の酪酸ナトリウム存在下、2 % v / v のヒト P A R 2 B a c M a m ウイルスで 2 4 時間感染させた。

【 0 5 7 3 】

実験日に、細胞を回収し、0 . 5 % ウシ血清アルブミン (B S A 、 S i g m a) を含む L i C l を含むアッセイバッファー (1 部の刺激バッファー (C i s b i o) : 5 部の d H 2 O) 中で 1 x 1 0 6 個 / m L の密度に再懸濁した。

【 0 5 7 4 】

抗体はストックの濃度又は最初に P B S で 1 : 2 に希釈して試験した。

【 0 5 7 5 】

抗体のいずれかの濃度の 5 μ L のサンプルを反復して白色 9 6 ウェルプレート (C o r n i n g) の半分の面積に添加し、続いて 2 5 μ L の P A R 2 細胞懸濁液を添加した。

【 0 5 7 6 】

プレートを 3 7 ° C で 3 0 分間インキュベートした後、5 μ L / ウェルの活性化ペプチドを添加し、最終アゴニスト惹起濃度を 6 . 2 8 n M とした。

【 0 5 7 7 】

最終アッセイ抗体スクリーニングは、A b ストックから 1 : 7 又は 1 : 1 4 の希釈で行った。

【 0 5 7 8 】

プレートを 3 7 ° C でさらに 3 0 分間再インキュベートした後、溶解バッファー中の 1 0 μ L の I P - O n e 検出キット (C i s b i o) を添加した。

【 0 5 7 9 】

細胞プレートを室温 (R T) で 1 時間プレートシェーカー上に置いた後、標準的な H T R F プロトコルを用いて P H E R A s t a r F S マイクロプレートリーダー (B M G L a b t e c h) でプレートを読み取った。励起は 3 3 5 n m で、発光は 6 2 0 n m 及び 6 6 5 n m の両方で読み取った。

【 0 5 8 0 】

H T R F の比は式 1 のように計算した。

【 0 5 8 1 】

応答は、最終アッセイ濃度 6 . 2 8 n M (E C 8 0) の活性化ペプチド I P - O n e 応答の阻害 % について標準化した (図 6) 。

【 0 5 8 2 】

式 1 : H T R F 比の計算

【 数 1 】

$$\text{HTRF 比} = \frac{665\text{nm での発光}}{662\text{nm での発光}} \times 10,000$$

【 0 5 8 3 】

表 2 : ヒト P A R 2 のペプチド誘導アゴニスト活性の阻害

C i s b i o (商標) I P - O n e G α q アッセイを用いて、ペプチド阻害アッセイにおける最高濃度の反復での Y 0 2 1 1 7 1 、 Y 0 2 2 0 6 3 、 Y 0 2 2 0 5 4 及び Y 0 2 2 0 6 5 h I g G 1 f _ A E A S S の機能的特性評価。図 6 にも示す。

【表 2】

抗体クローン ID	最大阻害 AP $\pm$ SD (%)	繰り返し数
Y022054	17 $\pm$ 10	2
Y021171	32 $\pm$ 4	2
Y022063	27 $\pm$ 5	2
Y022065	43 $\pm$ 1	2

10

【0584】

【親和性の決定】

【SPRによる抗体キャプチャーセットアップによるKD、ka及びkdの決定】

KD決定のため、抗体タンパク質（Fabフラグメント又はIgG）のモノマー画分を使用した（分析用SECにより、90%以上モノマー含量であると分析された）。

【0585】

以下に述べるように、Biacore（Biacore T200）又はOctet（QK384又はHTX）装置のいずれかを用いて動力学的特性評価により親和性を決定した。

【0586】

抗体を抗ヒトIgGチップ表面に捕捉し、続いて100nMのPAR2を注入した。

【0587】

データは、「Y021160」クローンの場合は比較のために不均一リガンドモデルを使用して解離の遅い成分を使用したことを除いて、1:1相互作用モデルに当てはめた。

【0588】

表3：リード分離クローンのBiacore

【表 3】

抗体クローン ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
Y022065	3.0E+04	1.6E+04	5.3E-09
Y021172	3.5E+09	2.7E+02	7.7E-08
Y021194	4.6E+04	1.4E-03	3.0E-08
Y021160	2.0E+05	6.3E-04	3.1E-09
Y021171	4.1E+05	2.9E-02	7.0E-08

30

【0589】

適切な高容量捕捉表面を、例えばEDC/NHS化学を用いて適切な捕捉リガンドをCM5チップ（Biacore、GE Healthcare）又はAR2Gセンサー（forteBIO、Pall Corp.）に共有結合で固定化すること、又はビオチン化捕捉試薬でSAセンサーをロードすることにより調製した。

40

【0590】

適切な捕捉系の例としては、抗ヒトFc抗体（Biacore、GE Healthcare）、プロテインAセンサー（forteBIO、Pall Corp.）、Mab Select Sureリガンド（GE Healthcare）、抗Hisタグ抗体（Genscript）などが挙げられる。

【0591】

動力学の実験の際の分析には、6～8種の異なる被分析物濃度（2n倍の連続希釈）を使用した。

【0592】

各サイクル後、捕捉された抗体／抗原複合体を除去し、同時に捕捉表面の完全性を維持

50

するために、センサー表面を再生した。

【0593】

参照のために、ランニングバッファのブランク注入を使用した。

【0594】

すべての実験において、アッセイバッファは、PAR2タンパク質の処方、すなわちバッファ及び界面活性剤に適合させた。

【0595】

IgGはFcフラグメントを介して捕捉し、界面活性剤(LMNG/CHS)可溶化FL-N PAR2 Star(PAR2-3)を溶液中の被分析物として使用した。

【0596】

アッセイバッファとして50mM HEPES pH7.5、150mM NaCl、0.02% LMNGを使用した。

【0597】

CM3センサーチップを基材として、高密度の抗hu-Fc捕捉抗体(BR-1008-39、GE Healthcare)を固定化した。

【0598】

IgGは比較的高いレベルの約500RUで捕捉し、特異的結合と非特異的結合との比を高めた(同時に、動力学的特性評価に適した条件は維持した)。

【0599】

センサグラムは、対応する装置の評価ソフトウェア、すなわちBiacore T200 Evaluation Software 3.x(Biacore、GE Healthcare)又はforteBIO Octet Data Analysis(forteBIO、Pall Corp.)で評価した。

【0600】

すべてのセンサグラムを1:1結合モデルに当てはめ、 k_a 及び k_D の速度定数を決定し、これらを用いてKDを計算した。

【0601】

Y021160では、不均一リガンドモデルを適用し、解離の遅い成分を用いて k_a 、 k_D 及びKDを計算した。

【0602】

精製した3つのIgG1f_AEASSクローン、Y021171、Y022054及びY022063について、ヒトPAR2-3バリエーション(P157:1-377、グリコシル化、pBacMamHisStrepII、完全長)に対する親和性を、IgGを固定化し、界面活性剤(LMNG/CHS)可溶化FL-N PAR2 StarでプローブするSPRにより決定した。

【0603】

Y022063及びY021171の親和性は、それぞれ22nM及び20nMであった。

【0604】

Y022054は他の候補と比較して10倍高い2.5nMの親和性を示した。

【0605】

Y021171は速い会合(k_a)を示したが、非常に速い解離(k_D)も示した。

【0606】

結合親和性を基に機能的阻害を外挿すると、拮抗性抗PAR2抗体に必要な親和性は、 $<100\text{pM}$ の範囲であると想定された。

【0607】

親和性成熟キャンペーンの間、特にY021171についてはKD特性を改善するために「オフレート選択」戦略(Hawkins et al., 1992)を実施した。

【0608】

PAR2と抗PAR2抗体との相互作用のアッセイは、Biacore T200装置

10

20

30

40

50

(GE Healthcare) を用いて行った。

【0609】

抗ヒトIgG抗体 (Human Antibody Capture Kit、GE Healthcare) を、センサーチップCM3 (GE Healthcare) に3500～4500共鳴単位 (RU) の表面密度でアミンカップリングにより固定化した。

【0610】

固定化は、25℃でHBS-EP+バッファー (GE Healthcare) 中で行った。

【0611】

続いて、バッファーを50 mM HEPES、pH 7.5、150 mM NaCl、0.02% LMNG、0.002% CHSに変更した。

【0612】

PAR2-抗体相互作用アッセイの各サイクルは、抗体捕捉 (100 nMの抗体を5 μ L/分の流速で2分間注入)、PAR2注入 (ブランク又は250 nM、20 μ L/分の流速で接触時間及び解離時間がそれぞれ2分及び3分)、及びチップ表面の再生 (Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare) からの再生液を用いて20 μ L/分で30秒間) からなる。

【0613】

ブランク差し引きデータを1:1相互作用モデルに当てはめ、会合速度定数及び解離速度定数、 k_a (kon) 及び k_d (koff)、並びに親和性定数KDを得た。

【0614】

各実験データセットの間の測定値は、この方法論の許容範囲内であった。

【0615】

表4: SPRによる機能的候補Y021171、Y022063及びY022054の親和性決定

抗体を抗ヒトIgGチップ表面に捕捉し、続いて250 nMのPAR2を注入した。

【0616】

データは1:1相互作用モデルに当てはめた。

【表4】

クローン	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Y022054	1.2E+05	2.9E-04	2.5E-09
Y021171	5.3E+05	1.1E-02	2.0E-08
Y022063	1.8E+05	3.8E-03	2.2E-08

【0617】

実施例6 - 親和性の成熟/リードの最適化及びファージ選択

いくつかのIgGクローン (Y021171、Y022054、Y022063及びY022065を含む) が、IP Oneアッセイにおいて、PAR2-APの活性化を部分的に阻害した。

【0618】

他のいくつかのクローンは、非ヒト霊長類 (NHP) PAR2と交差反応性を示したが、4つの機能的候補はいずれも示さなかった。ヒトとアカゲザルのPAR2配列は細胞外ドメインにおいて高度に同一であるにもかかわらず、親和性成熟前には、クローンはいずれもFlpIn CHO_{ma}PAR2 (アカゲザル、Macaca mulatta) 及びFlpIn CHO_{mo}PAR2 (マウス) に対して明確な交差反応性を示さなかった。

【0619】

[成熟ライブラリー]

ファージ成熟ライブラリーの作製：成熟ライブラリーのクローニングは、親 F a b フラグメントをコードする C y s D i s p l a y (商標) ベクターにて行った。

【0620】

C y s D i s p l a y ベクターにまだ存在していない場合、ライブラリークローニングの前に、親 F a b フラグメントをコードする DNA 配列を、それぞれのベクターに制限酵素消化及びライゲーションにより移した。

【0621】

選択した抗体候補の親和性及び生物学的活性を増大させ、非特異性を低減させるために、C D R - L 3 及び C D R H - 1 / C D R - H 2 領域を並行して最適化した。

【0622】

そのモジュール構造のため、M o r p h o S y s の抗体ライブラリーは C D R 交換による親和性最適化のために設計されており、抗体の単一 C D R を切り出し、大規模な C D R ライブラリーの個々のメンバーで置換する (P r a s s l e r e t a l . 2 0 0 9) 。

【0623】

Y l a n t h i a (商標) 成熟モジュール (Y M M) は、Y l a n t h i a ライブラリーの設計に基づいており、S l o n o m i c s (商標) テクノロジーであらかじめ構築されていた (v a n d e n B r u l l e e t a l . 2 0 0 8) 。

【0624】

成熟ライブラリーの作製は、各成熟候補について個別に行った。

【0625】

クローニング効率をモニターするため、親 C D R - L 3 を、多様化 L C D R - L 3 Y M M を挿入する前に、Y l a n t h i a M a t u r a t i o n S t u f f e r (Y M S) で置換した。

【0626】

消化したベクターフラグメントを、多様化 C D R - L 3 を含む挿入フラグメントと 2 倍モル過剰でライゲーションした。

【0627】

同じ手順を C D R H - 1 及び C D R - H 2 の多様化にも適用した。

【0628】

ライゲーション混合物を E . c o l i M C 1 0 6 1 F ' 細胞にエレクトロポレーションし、> 1 0 8 の独立コロニーが得られた。

【0629】

ライブラリーの増幅は、文献 (T i l l e r e t a l . 2 0 1 3) の記載通りに行った。

【0630】

品質管理のため、ライブラリーごとに約 1 0 個の単一クローンをランダムにピックアップし、サンガーシーケンスを行った。

【0631】

成熟候補は、以下の理論的根拠及び基準に従って選択した：

1

以下に対する結合の増大によるオフターゲット結合のリスクが高まった候補の選択解除：

・ P A R 2 陰性抗原 (E L I S A) ：空ナノディスク、マウス I g G、抗 S t r e p I I、b R I L

・ P A R 2 陰性細胞株 (F A C S) ：親 F l p - I n C H O 細胞、F l p - I n C H O _ h u P A R 1 及び J u r k a t 細胞

2

N 末端の膜遠位部分に優先的に結合する候補の選択解除 (F L - S t a R ナノディスクと切断型 S t a R ナノディスクでの比較 E L I S A による評価)

10

20

30

40

50

【0632】

ヒトPAR2特異的IgG1f__AEASS候補は、以下のようにランク付けした：

1

機能的に活性な候補

2

機能性評価の前提条件として、WT FL-huPAR2 BacMamに感染した機能的に活性なHEK293F細胞株を中心とした細胞表面に発現したヒトPAR2への結合。

3

機能的に活性な候補Y021171及び／又は機能的に活性なR&D抗PAR2試薬mAb MAB3949との結合競合。発表されたPAR2構造（Cheng et al. , 2017）が、この試薬抗体が細胞外ループと相互作用することを示したためである。

10

表5：成熟候補の概要

【表5】

抗体 クローン ID	VH/VL	R&D mAb との競合	Y021171 との競合	ヒト PAR2 結合	アカゲザル PAR2 結合
Y021171	VH3-21/Vκ1-12	未定	参照	有	無
Y022054	VH3-07/Vκ1-12	無	有	有	無
Y022063	VH3-23/Vλ2-23	有	無	有	無
Y022065	VH3-23/Vλ2-23	有	有	有	無

20

【0633】

親和性成熟の主な目的は既存の特性の改善であり、通常、標的エピトープの置換にはつながらない。

【0634】

IgG特性評価において、機能的候補はアカゲザルPAR2と交差反応しないのに対し、非機能的候補はこの種に結合することが観察された。

30

【0635】

組換えアカゲザルPAR2 St a R抗原物質が不足していたため、差次的全細胞パニング戦略（DWCP）を実施した。

【0636】

SPRデータは、Y021171の速いオフレート（kD（1／s）0.01）を示した。

【0637】

したがって、第3回成熟パニングラウンドの間に、改善されたオフレートを有する候補を濃縮するために、いわゆる「オフレート選択」手順（Hawkins et al. , 1992）を実施した。

40

【0638】

SPRデータがすべての成熟候補について得られていなかったため、この方法は機能的候補のみを含むパニング戦略に限定した。

【0639】

成熟の間、洗浄ストリンジェンシーは、例えば洗浄工程の回数及び期間を増やすことによって（例えば、一晚洗浄）、パニングラウンド全体にわたって増加した。

【0640】

長時間又は一晚の洗浄は、固定化抗原への抗体ファージの再結合を防止するために、可溶性抗原を洗浄バッファーに添加することと組み合わせてオフレート選択戦略で使用した。

50

【0641】

9つの親クローンを利用可能なすべての結合プロファイル及び潜在的な作用様式を網羅する親和性成熟キャンペーンに進めた。

【0642】

以前に選択した抗体フラグメントの親和性及び生物学的活性を増大させるため、CDR-L3又はCDR-H1及びCDR-H2領域を並行して多様化モジュールと交換した (Prassler et al., 2009)。

【0643】

クロスクローン又は追加のフレームワークの組合せの出現を避けるために、特定のYlanthia (商標) 成熟モジュール (YMM) を使用して固定のVH/VLヒト生殖細胞系フレームワークのペアを保存した。

10

【0644】

親Fabフラグメントを、親和性成熟のためのライブラリークローニングの前に、対応する発現ベクターからCysDisplayベクターに移した。

【0645】

CDR-L3及びCDR-H1及びCDR-H2ライブラリーを各成熟候補について別々にクローニングし、プールした。

【0646】

親和性成熟は、6個の個々の候補について、すなわち、すべての機能的候補 (Y021171、Y022054、Y022063、Y022065) 並びに、Y022059及びY022069について個別に設計した。

20

【0647】

より弱い候補はプールで成熟させた (Y021160、Y022075及びY022079)。

【0648】

成熟ライブラリーは、CDR-L3及びCDR-H1及びCDR-H2の個別の多様化のために生成した。

【0649】

成熟パニングは、完全長又はN末端切断ナノディスク埋め込みPAR2 StARSを用いた高ストリンジェンシーの固相パニング、並びにアカゲザルPAR2交差反応性の生成又は改善に重点を置いて設計した。

30

【0650】

親和性成熟及びスクリーニングの後、プロジェクトチームは、高度に特異的なYlanthia (商標) 抗体候補の大規模なセットの同定に成功した。

【0651】

クローンはIgG変換及び詳細な特性評価に進めた。

【0652】

[親和性成熟のパニング選択]

以前に選択した抗体フラグメントの親和性及び生物学的活性を増大させるため、CDR-L3及びCDR-H2領域を並行して多様化モジュールと交換した (Prassler et al., 2009)。

40

【0653】

親Fabフラグメントを、親和性成熟のためのライブラリークローニングの前に、対応する発現ベクターからCysDisplayベクターに移した。

【0654】

親和性が改善された候補の選択のため、成熟ライブラリー由来のファージを3ラウンドの成熟パニングに供した。

【0655】

各パニングラウンドで抗原濃度を下げることにより、パニングストリンジェンシーを高めた (Low et al., 1996)。

50

【0656】

抗原量の減少に加えて、選択した戦略についてオフレート選択を行った（Hawkins et al. 1992）。

【0657】

これらの戦略を、抗体ファージの固定化抗原への再結合を防止するために、可溶性抗原を洗浄バッファーに添加することと組み合わせた洗浄工程の長時間化と組み合わせた。

【0658】

親和性成熟後、修飾された可変領域をコードするDNAフラグメントを、親IgGをコードするpYMex10__h__IgG1f__AEASS発現ベクターに直接置換した。

【0659】

要約すると、親VH又はVLをコードするベクター成分を適切な制限酵素（VHについてはNheI | XhoI、VLについてはNdeI | KpnI）で除去し、親和性成熟した可変領域をコードするフラグメントを挿入し、前述のように発現及び精製して完全長IgGを生成した。

【0660】

実施例7 リードの最適化及びクローンプロファイリング

精製したYlanthia（商標）IgGのプロファイリングには、ヒト、マウス、アカゲザル及びマーモセットのPAR2発現細胞に対する結合特異性及び交差反応性の評価、並びにナノディスク埋め込みStarsに対するELISA及びPAR2発現細胞に対するフローサイトメトリーによるPAR2への結合の再確認が含まれた。

【0661】

親和性成熟後、主に機能的に活性な親IgG Y022065由来のいくつかのIgGクローンが、ヒトPAR2受容体の活性化を完全に阻害する能力により拮抗活性を有することが確認され、機能的に関連性するエピトープに対する特異性が強調された。

【0662】

ELISAにおける切断型又はFL PAR2 Starナノディスクの一次スクリーニングにより、親抗体と比較して結合の優れた改善が明らかになった。

【0663】

すべてのパニングサブコードについてkd-ランキングELISAを行った。

【0664】

古典的ELISAの設定とKoffランキングELISAの設定で得られたデータをプロットすると、シグナルの明確な直線的相関が示され、成熟候補の大部分が遅いKoff値を有することが示された。

【0665】

解析では、古典的ELISA設定のバックグラウンドに対するシグナル（S/BG）とKoffランキングELISAのS/BGの比として結合シグナルの減少を計算した：[切断型/FL PAR2 StarナノディスクS/BG] / [Koff ELISA切断型/FL PAR2 StarナノディスクS/BG]。

【0666】

ELISAランキングによるKoff推定値が低いことは、古典的ELISA設定での低シグナルと相関した。

【0667】

シグナルの減少が2倍を超えた候補は、潜在的に速いオフレートを有する候補として分類した。

【0668】

成熟候補の94%がシグナルの変化なし又は低変化（<2倍）を示し、その67%が親候補Y021171の派生物であった。

【0669】

親Y021171は、KoffランキングELISAで最大の結合シグナルの減少を示したのに対し、他の親抗体候補はシグナルの変化なし又は低変化を示した。この結果は、

10

20

30

40

50

Y021171について以前に生成したSPRデータと一致しており、この候補は速いオフレート $k_d(1/s) = 0.01058$ を示すとされていた。成熟候補の6%は、シグナルの上昇した変化(2~4.5倍)を示し、速いオフレートを示唆した。

【0670】

その92%がY021171の成熟派生物であった(Y021171候補の総数の約33%) (図7)。

【0671】

[Intellicytによって決定されたPAR2に対する全細胞結合]

IntellicytでのFlpIn CHO-V5His-huPAR2とFlpIn CHO親株細胞における2200の一次候補のスクリーニングにより、それぞれの親抗体と比較してほとんどの成熟派生物で結合の改善が明らかになった。

【0672】

最良の改善は、Y021171、Y022065、Y022069及びプールで成熟させた親の成熟パニングで達成され、Y022079の派生物が優勢なファミリーであると予想された。

【0673】

すべての候補は、FlpIn CHO親株細胞に低結合($S/BG < 1.5$)を示した。

【0674】

800を超える候補が、FlpIn CHO-V5His-huPAR2に対する良好又は優れた結合を示し、FlpIn CHO親株細胞に対して2~5倍、5~10倍又は>10倍(シグナル/親シグナル)の結合の改善を示した(図8~11)。

【0675】

[PAR2特異性のためのタンパク質パネルプロファイリング(3P)]

タンパク質パネルプロファイリング(Frese et al., 2013)のため、32種の異なるタンパク質及び対照を2枚の384ウェルMSDスタンダードプレート(Meso Scale Discovery, MTP 384ウェルMA6000、#L21XA)上に、 $1.0 \mu g/mL$ の濃度で、 $4^\circ C$ で一晩コーティングした。

【0676】

コーティング溶液を廃棄し、マイクロタイタープレートシェーカー(約500rpm)上で、室温で1時間、プレートを3%(w/v)BSA又は3%(w/v)スキムミルクパウダーを含むPBS 50 μL でブロッキングし、続いて50 μL の洗浄バッファー(0.05%(v/v)Tween20を含むPBS)で3回洗浄工程を行った。

【0677】

抗体サンプル(Fabフラグメント又はIgG)を、アッセイバッファー(0.5%(w/v)BSA、0.05%(v/v)Tween20を含むPBS)中で100nM及び10nMに希釈した。

【0678】

対照として、MOR参照mAb抗リゾチームMOR03207 Fab又はIgG(サンプル形式に応じて)及びアッセイバッファーを使用した。

【0679】

サンプル及び対照を添加し(30 μL /ウェル)、マイクロタイタープレートシェーカー上で、室温で3時間インキュベートした。

【0680】

プレートを3回洗浄し、検出抗体(ELで標識した抗ヒトFab、1:2000希釈)を各ウェルに30 μL 添加し、マイクロタイタープレートシェーカー上(約500rpm)で1時間インキュベートした。

【0681】

MSDプレートを洗浄し、界面活性剤を含むMSD Read Buffer Tを35 μL /ウェル添加した後、Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery | Gaithersburg | MD | USA)を用いて電気化

10

20

30

40

50

学発光シグナルを検出した。

【0682】

評価のため、特定のタンパク質上の抗体サンプルのシグナルを抗リゾチーム参照mAb MOR03207のそれぞれのシグナルで割り、結合比を得た。

【0683】

すべての後の成熟クローンを含むほとんどのクローンが、非特異的結合傾向がないか低いことを示した。

【0684】

実施例8 リード最適化クロンの機能特性評価

[機能アッセイ：細胞ベースIP-One Gαqアッセイ]

10

アッセイ方法は実施例5に従う。

【0685】

IC50値を決定するため、抗体のストックを10ポイントの濃度曲線にわたって1:2で連続希釈した。

【0686】

リード最適化抗体クローンを、別々の実験で活性化ペプチド(2-Furyol-LIGRO、6.28nM、表6)、ウシトリプシン(2nM、表7)又はPAR1活性化ペプチド(SFLLR-NH2、632nM、表8)に対するチャレンジで試験した。

【0687】

IP-One HTRFの結果は、親抗体クローンのスクリーニング時に活性化ペプチドに対するチャレンジでMAB3949の10μMの効果について標準化した(図12)

20

IP-One HTRFの結果は、親抗体クローンのスクリーニング時にウシトリプシンに対するチャレンジでベンチマーク1の1μMの効果について標準化した(図13)

IP-One HTRFの結果は、PAR1ペプチドSFLLR-NH2トリプシンに対するチャレンジでのスクリーニング時にMAB3949の10μMの効果について標準化した(表8)

標準化データを、GraphPad Prism version 7.04において4パラメータシグモイド用量反応曲線(式2)に当てはめた。

【0688】

表8のデータは、Y022883抗体がPAR1活性化ペプチドによるPAR2の活性化を阻止できることを示している。

30

【0689】

式2：4パラメータのシグモイド用量反応への当てはめ

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + ((X^{\text{HillSlope}}) / (\text{IC50}^{\text{HillSlope}})))$$

式中、IC50は、AP/トリプシン応答を50%阻害する濃度(nM)であり、%最大阻害値は、AP/トリプシンの最大阻害(曲線の最小漸近線、すなわち「Bottom」から取った値)である。

【0690】

表6：活性化ペプチドに対して、Cisbio(商標)IP-One Gαqキットを用いたIP-OneヒトPAR2アンタゴニストアッセイで反復して活性を示し、ウシトリプシンチャレンジアッセイでも活性を共有するリード最適化クロンの機能的特性評価

40

【表 6】

親 クローン	リード クローン	ヒト PAR2 AP IC ₅₀ (nM) ± SD	最大阻害 AP ± SD (%)	繰り返し数
ベンチマーク 1		不活性	3 ± 1	2
MAB3949		241 ± 60	100 ± 6	2
Y021171	Y022931	56 ± 22	155 ± 64	2
Y021171	Y022930	113 ± 48	116 ± 48	2
Y021171	Y021171	4254 ± 360	163 ± 124	2
Y022063	Y022063	2392 ± 1717	61 ± 56	2
Y022065	Y022883	57 ± 11	149 ± 8	2
Y022065	Y022885	56 ± 3	142 ± 2	2
Y022065	Y022884	51 ± 7	150 ± 12	2
Y022065	Y022889	57 ± 11	131 ± 7	2
Y022065	Y022870	55 ± 7	203 ± 76	2
Y022065	Y022876	62 ± 0	156 ± 4	2
Y022065	Y022860	57 ± 1	155 ± 2	2
Y022065	Y022879	61 ± 0	161 ± 6	2
Y022065	Y022857	63 ± 3	186 ± 50	2
Y022065	Y022887	58 ± 5	143 ± 15	2
Y022065	Y022858	73 ± 11	161 ± 25	2
Y022065	Y022881	58 ± 3	158 ± 10	2
Y022065	Y022882	49 ± 8	124 ± 28	2
Y022065	Y022877	63 ± 12	167 ± 1	2
Y022065	Y022880	61 ± 0	178 ± 39	2
Y022079	Y022878	119 ± 32	102 ± 67	2

10

20

30

【0691】

表 7：ウシトリプシンに対して、C i s b i o（商標）I P - O n e G α q キットを用いた I P - O n e ヒト P A R 2 アンタゴニストアッセイで活性を示し、活性化ペプチドチャレンジアッセイでも活性を共有するリード最適化クローンの機能的特性評価
活性が 1 反復でのみ確認できた場合は、「反復数」の列に示した。

40

50

【表 7】

親 クローン	リード クローン	ヒト PAR2 AP IC ₅₀ (nM) ± SD	最大阻害 AP ± SD (%)	繰り返し数
ベンチマーク 1		不活性	3 ± 1	2
MAB3949		241 ± 60	100 ± 6	2
Y021171	Y022931	56 ± 22	155 ± 64	2
Y021171	Y022930	113 ± 48	116 ± 48	2
Y021171	Y021171	4254 ± 360	163 ± 124	2
Y022063	Y022063	2392 ± 1717	61 ± 56	2
Y022065	Y022883	57 ± 11	149 ± 8	2
Y022065	Y022885	56 ± 3	142 ± 2	2
Y022065	Y022884	51 ± 7	150 ± 12	2
Y022065	Y022889	57 ± 11	131 ± 7	2
Y022065	Y022870	55 ± 7	203 ± 76	2
Y022065	Y022876	62 ± 0	156 ± 4	2
Y022065	Y022860	57 ± 1	155 ± 2	2
Y022065	Y022879	61 ± 0	161 ± 6	2
Y022065	Y022857	63 ± 3	186 ± 50	2
Y022065	Y022887	58 ± 5	143 ± 15	2
Y022065	Y022858	73 ± 11	161 ± 25	2
Y022065	Y022881	58 ± 3	158 ± 10	2
Y022065	Y022882	49 ± 8	124 ± 28	2
Y022065	Y022877	63 ± 12	167 ± 1	2
Y022065	Y022880	61 ± 0	178 ± 39	2
Y022079	Y022878	119 ± 32	102 ± 67	2

10

20

30

【0692】

親 IgG Y022065 に由来する親和性成熟リードクローンが、活性化ペプチド及びトリプシンの両方に対して活性を示す活性リードクローンの最大の割合を示した。

【0693】

表 6 及び 7 は、活性化ペプチド及びウシトリプシンの両方に対して $n \geq 1$ の IC₅₀ 値を示す機能的 IgG 活性物質をリストする。

【0694】

表 8：IP-One HTRF の結果は、PAR1 ペプチド SFFLR-NH₂ トリプシンに対するチャレンジでスクリーニングした場合、10 μM の MAB3949 の効果に対して標準化されている。

40

【表 8】

親 クローン	リード クローン	ヒト PAR2 SFFLR IC ₅₀ (nM) ± SD	最大阻害 AP ± SD (%)	繰り返し数
ベンチマーク 2		不活性	3 ± 1	2
Y022065	Y022883	13.5 ± 12.5	100 ± 5	2

【0695】

【機能アッセイ：HT-29 細胞株を用いた細胞ベースの FLIPR カルシウム動員 Gαq アッセイ】

50

不死化ヒト結腸腺がん細胞株（HT-29、PAR2受容体を内因性発現している）での活性の確認は、IP-One組換えヒトPAR2 in vitroアッセイでのリードクロンのIC50確認後に行った。

【0696】

HT-29細胞（ATCC HTB-38）を、37℃、5%CO₂雰囲気加湿インキュベーター内で、高グルコース（25mM）、ピルビン酸ナトリウム不含、Glutamax含有DMEM培地（Gibco、Paisley、UK）、10%の熱不活性化ウシ胎仔血清及びペニシリン／ストレプトマイシン（100単位／mLのペニシリン及び100μg／mLのストレプトマイシン）を用いて継続的に培養した。

【0697】

培養培地は、播種後2日目から2日ごとに交換し、細胞は、0.05%トリプシン／EDTAにより80-90%コンフルエントに達した後、対数増殖期に回収した。

【0698】

細胞を、384ウェルブラックウォールプレート（Corning）に、培養培地中、ウェルあたり50μL、細胞密度5,000細胞／ウェルで播種し、加湿インキュベーター（37℃、5%CO₂雰囲気）内で24時間インキュベートした。

【0699】

実験日に、細胞培地を除去し、ストックの1:20希釈のCalcium 5色素（Molecular Devices）を含むアッセイバッファー（HBSS 20mM HEPES pH7.4バッファー、0.1%BSA含有）50μLを添加した。

【0700】

プレートを37℃で45分間再インキュベートした後、室温でさらに15分間平衡化した。

【0701】

IgGリードクロンをアッセイバッファーで調製し、10ポイントの曲線を生成するために連続希釈した。

【0702】

IgG用量反応曲線をFLIPR Tetra（Molecular Devices）ピペッター（10μL）を用いてオンラインで添加し、カルシウム応答を5分間測定した。

【0703】

プレートを37℃でさらに60分間再インキュベートした後、活性化ペプチド（630nM）又はウシトリプシン（63nM）を10μL／ウェルオンラインで添加し、カルシウム動員で活性化されたヒトPAR2をさらに5分間測定した。

【0704】

データは、Max-Min生データファイルを抽出し、式2により解析した。

【0705】

データは、活性化ペプチド及びウシトリプシンアッセイについて、それぞれMAB3949又はベンチマーク1に対して標準化した。

【0706】

表9：対応する抗体対照に対して標準化したHT-29 FLIPRカルシウム動員アッセイで、完全な用量依存的阻害 $n \geq 3$ を示すウシトリプシン又は活性化ペプチド（AP）に対するリードクロンの機能的特性評価

10

20

30

40

50

【表 9】

親 クローン	リード クローン	トリプシン IC ₅₀ (nM) ± SD	AP IC ₅₀ (nM) ± SD
Y022059	Y022856	60 ± 38	76.2 ± 55
Y022065	Y022857	51 ± 58	20.5 ± 55
Y022065	Y022858	104 ± 58	62.8 ± 60
Y022065	Y022860	138 ± 44	62.6 ± 60
Y022065	Y022861	159 ± 38	70.7 ± 53
Y022065	Y022867	171 ± 41	87.5 ± 47
Y022065	Y022870	40 ± 46	17.8 ± 51
Y022065	Y022877	49 ± 77	44.3 ± 71
Y022065	Y022879	42 ± 64	34.6 ± 75
Y022065	Y022880	107 ± 61	67.9 ± 60
Y022065	Y022881	35 ± 64	23 ± 56.8
Y022065	Y022882	67 ± 59	38.2 ± 78
Y022065	Y022883	47 ± 41	42 ± 79
Y022065	Y022884	116 ± 39	39.4 ± 73
Y022065	Y022885	65 ± 69	76.7 ± 58
Y022065	Y022887	192 ± 48	51.5 ± 35
Y022065	Y022889	94 ± 48	64.1 ± 61

10

20

30

40

50

【0707】

【機能アッセイ：カニクイザルPAR2及びアカゲザルPAR2に対する細胞ベースのIP-One Gαqアッセイ】

合成アゴニストSLIGKVに対するチャレンジにおいて、カニクイザルおよびアカゲザルPAR2受容体に対するリードクローンの異種間アンタゴニスト活性を試験するため、2つの濃度で反復して、Cisbio（商標）IP-One Gαqアッセイを用いて機能特性評価を実施した。

【0708】

HEK293f細胞を、懸濁培養形式で、37℃、5%CO2雰囲気に加湿インキュベーター内で、増殖培地（Pro293、5%FBS、1%Glutamax、0.4%ペニシリン／ストレプトマイシン）中、0.5mMの酪酸ナトリウム存在下、2.5%v／vのカニクイザルPAR2 BacMamウイルス又は2.5%v／vのアカゲザルPAR2 BacMamウイルスで24時間培養して感染させた。

【0709】

実験日に、細胞を回収し、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA、Sigma）を含むLICLを含むアッセイバッファー（1部の刺激バッファー（Cisbio）：5部のddH2O）中で1x10⁶個／mLの密度に再懸濁した。

【0710】

抗体のストックを10ポイントの濃度曲線にわたって1：2で連続希釈し、IC50値を決定した。

【0711】

抗体リードクローンを、SLIGKV（1μM）に対するチャレンジで試験した。

【0712】

抗体のいずれかの濃度の5μLアリコート反復して白色96ウェルプレート（Corning）の半分の面積に添加し、続いて25μLのPAR2細胞懸濁液を添加した。

【0713】

プレートを37℃で30分間インキュベートした後、5 μL／ウェルのSLIGKVを添加し、最終アゴニスト惹起濃度を1 μMとした。

【0714】

プレートを37℃でさらに30分間再インキュベートした後、溶解バッファー中の10 μLのIP-One検出キット(Cisbio)を添加した。

【0715】

細胞プレートを室温(RT)で1時間プレートシェーカー上に置いた後、標準的なHTRFプロトコルを用いてPHERAstar FSマイクロプレートリーダー(BMG Labtech)でプレートを読み取った。励起は335 nmで行い、620 nm及び665 nmの両方で発光を読み取った。

10

【0716】

HTRFの比は式1のように計算した。

【0717】

応答は、最終アッセイ濃度1 μMのSLIGKV単独に対する阻害率について標準化し、結果をGraphPad Prism version 7.04で4パラメータシグモイド用量反応曲線(式2)に当てはめた。

【0718】

表10: Cisbio IP-OneカニクイザルPAR2又はアカゲザルPAR2受容体アッセイでの反復においてアンタゴニスト活性を示すSLIGKVに対するリードクロンの機能的特性評価

20

30

40

50

【表 10】

親 クローン	リード クローン	カニクイザル PAR2 SLIGKV IC ₅₀ (nM) ± SD	SLIGKV フォールド阻害
Y022059	Y022856	>3162	0
Y022065	Y022858	300	2.1
Y022065	Y022870	25	2.2
Y022065	Y022877	37	2.3
Y022065	Y022879	63	2.2
Y022065	Y022882	96	2.2
Y022065	Y022883	25	2.4
Y022065	Y022884	385	2.1
Y022065	Y022885	>3162	0
Y022065	Y022889	>3162	0
Y022065	Y022881	41	2.0
Y021171	Y022916	>3162	0
ベンチマーク 1		>759	0
ベンチマーク 2		NA	0
MAB3949		>1000	0

10

20

親 クローン	リード クローン	アカゲザル PAR2 SLIGKV IC ₅₀ (nM) ± SD	SLIGKV フォールド阻害
Y022065	-	>2000	0
Y022065	Y022870	51	1.9
Y022065	Y022877	47	2.0
Y022065	Y022883	43	1.8
ベンチマーク 1		>398	0

30

【0719】

【機能アッセイ：ヒトPAR1に対する細胞ベースのIP-One Gαq細胞アッセイ】

合成アゴニストSFLLRに対するチャレンジにおいて、ヒトPAR1受容体に対するリードクローンの異種間アンタゴニスト活性を試験するため、2つの濃度で反復して、Cisbio（商標）IP-One Gαqアッセイを用いて機能特性評価を実施した。

【0720】

HEK293f細胞を、懸濁培養形式で、37℃、5%CO₂雰囲気加湿インキュベーター内で、増殖培地（Pro293、5%FBS、1%Glutamax、0.4%ペニシリン／ストレプトマイシン）中、0.5mMの酪酸ナトリウム存在下、5%v／vのヒトPAR1 BacMamウイルスで24時間感染させた。

40

【0721】

実験日に、細胞を回収し、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA、Sigma）を含むLICLを含むアッセイバッファー（1部の刺激バッファー（Cisbio）：5部のddH₂O）中で1×10⁶個／mLの密度に再懸濁した。

【0722】

抗体のストックを10ポイントの濃度曲線にわたって1：2で連続希釈し、IC₅₀値を決定した。

【0723】

50

抗体リードクローンを、S F L L R (1 0 0 n M) に対するチャレンジで試験した。

【 0 7 2 4 】

抗体のいずれかの濃度の 5 μ L アリコートを反復して白色 9 6 ウェルプレート (C o r n i n g) の半分の面積に添加し、続いて 2 5 μ L の P A R 2 細胞懸濁液を添加した。

【 0 7 2 5 】

プレートを 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間インキュベートした後、5 μ L / ウェルの S F L L R を添加し、最終アゴニスト惹起濃度を 1 0 0 n M とした。

【 0 7 2 6 】

プレートを 3 7 $^{\circ}$ C でさらに 3 0 分間再インキュベートした後、溶解バッファー中の 1 0 μ L の I P - O n e 検出キット (C i s b i o) を添加した。

【 0 7 2 7 】

細胞プレートを室温 (R T) で 1 時間プレートシェーカー上に置いた後、標準的な H T R F プロトコルを用いて P H E R A s t a r F S マイクロプレートリーダー (B M G L a b t e c h) でプレートを読み取った。励起は 3 3 5 n m で行い、6 2 0 n m 及び 6 6 5 n m の両方で発光を読み取った。

【 0 7 2 8 】

H T R F の比は式 1 のように計算した。

【 0 7 2 9 】

応答は、最終アッセイ濃度 1 0 0 n M の S F L L R 単独に対する阻害率について標準化し、結果を G r a p h P a d P r i s m v e r s i o n 7 . 0 4 で 4 パラメータシグモイド用量反応曲線 (式 2) に当てはめた。

【 0 7 3 0 】

P A R 1 ヒト i n v i t r o アッセイの陽性アンタゴニスト対照として、用量反応曲線のための小分子 P A R 1 アンタゴニストである V o r a p a x a r (A x o n M e d c h e m C a t 1 7 5 5) を 3 倍希釈系列で最終アッセイ濃度 1 0 μ M として試験し、インキュベートして I C 5 0 を決定した。

【 0 7 3 1 】

表 1 1 : C i s b i o I P - O n e ヒト P A R 1 選択性アッセイにおける S F L L R に対するリードクローンの機能的特性評価

10

20

30

40

50

【表 1 1】

親 クローン	リード クローン	ヒト PAR1 SFLLR IC ₅₀ (nM) ± SD	SFLLR フォールド阻害
Y022059	Y022856	>3162	0
Y022065	Y022858	>3162	0
Y022065	Y022870	>3162	0
Y022065	Y022877	>3162	0
Y022065	Y022879	>3162	0
Y022065	Y022882	>3162	0
Y022065	Y022883	>3162	0
Y022065	Y022884	>3162	0
Y022065	Y022885	>3162	0
Y022065	Y022889	>3162	0
Y022065	Y022881	>3162	0
Y021171	Y022916	>3162	0
ベンチマーク 1		>759	0
MAB3949		>1000	0
Vorapaxar		51	2.5

【0 7 3 2】

〔リードパネル – 機能アッセイ：HT-29細胞株を用いた細胞ベースのFLIP Rカルシウム動員Gαqアッセイ〕

スケールアップ後、HT-29細胞でリードクローンを特性評価し（実施例8の方法に従う）、内因的に発現したPAR2に対する0.1 nMウシトリプシンチャレンジに対するアンタゴニスト活性を確認した（図14）。

【0 7 3 3】

それ以外に、トリプシンによる細胞外N末端内のタンパク質分解切断及びPAR2-A P活性化の阻害において二重活性を示した。

【0 7 3 4】

3 P特異性アッセイでの分析により、非特異的抗原への結合傾向の増大したいくつかのクローンが明らかとなり、それにより治療用候補としてのさらに検討すべき二重活性Ig Gの数が減少した。

【0 7 3 5】

標的エピトープを絞り込み、予備的エピトープの評価のために、3 PアッセイQCを合格したこれらのIg Gクローンを、ELISAベースのエピトープビニング実験で分析した。

【0 7 3 6】

すべての候補は、互いに競合し、ベンチマーク1のN末端エピトープとは異なる近位結合領域を標的とする可能性が高いことを示した。

【0 7 3 7】

最終候補選択の詳細な特性評価には、SPRによる親和性測定も含まれた。

【0738】

機能アッセイ、配列の多様性及び結合プロファイルに基づいて、残りのクローン数をさらに減らした。

【0739】

これらの候補を一価の FabCys-AviH 形式で生産し、カニクイザル PAR2 に対する交差機能性について試験した。

【0740】

それに加えて、最適化した設定で親和性決定を改良した。

【0741】

Y022870、Y022877 及び Y022883 (Y022065 の 3 つの派生物) を、主に機能アッセイでの性能、SPR 親和性データ、生産 QC 及びタンパク質パネルプロファイリング (3P) アッセイでの 32 種の異なるタンパク質に対する非特異的結合に基づいて、最終候補として選択し「リードパネル」又は「リードセット」として定義した。

【0742】

これら 3 つの候補を最終的に 6 つの競合抗体のセットと比較して特性評価した。

【0743】

詳細な特性評価により、リードセットが精製された細胞表面発現 PAR2 に競合抗体の範囲内の親和性で結合することが示された。

【0744】

関連タンパク質 PAR1、PAR3 及び PAR4 に対するオフターゲット結合は検出されなかった。

【0745】

すべての競合 (ベンチマーク) 抗体とは対照的に、本明細書で提供するリードセットの抗体は、プロテアーゼ活性化だけでなく PAR2 のペプチド活性化も阻害することができ、PAR2 活性化の二重阻害剤として作用する。

【0746】

表 12: SLIGKV アゴニストチャレンジにおける *in vitro* の異種間の要約
【表 12】

クローン ID および IC50 (nM)	Y022065	Y022870	Y022877	Y022883
ヒト	264	61	52	54
アカゲザル	>1995	50	47	43
カニクイザル	>1995	88	74	68

【0747】

実施例 9 - 親和性成熟抗体クローンの親和性及び速度論の決定

[Biacore 及び Octet のためのラベルフリー法を用いた KD 及び koff の決定]

IgG の高スループット速度論的評価のため、Biacore T200 又は Octet (QK384 又は HTX) 装置のいずれかを用いて解離速度定数 (koff) を決定した。

【0748】

完全な動力学的特性評価について記載した基本的な前提条件、原理及び考慮事項と同じものを、単量体抗原物質 (PAR2 StAR) を用いて適用した。

【0749】

精製した 88 の IgG すべてについて koff を Octet により決定し、親抗体に比べて正味の改善を示した。切断型 huPAR2 StAR 及び FL-huPAR2 StAR で評価すると、kd [1/s] の範囲は、 $1.1 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ の範囲であ

った。

【0750】

一般に、 k_{off} 決定には1つの被分析物濃度のみを使用した。

【0751】

IgG上清又は細菌溶解物（Fabフラグメント）から直接評価したサンプルは、抗体捕捉形式でOctetを用いて k_{off} 決定に供した。

【0752】

前提条件として、単量体抗原を被分析物として使用した。

【0753】

IgGサンプルを、高密度で捕捉リガンド（ビオチン化MabSelect Sureリガンド）をロードしたストレプトアビジンセンサー上に中程度の捕捉レベル（0.4 nM）で捕捉した。

【0754】

単量体抗原タンパク質ヒトPAR2-1バリエーション（P151 55-377、切断型）及びヒトPAR2-2バリエーション（P166:1-377、完全長）を溶液中の被分析物として使用した。

【0755】

解離を最長1500秒間モニターした。

【0756】

記録したセンサグラムを、対応する装置特異的評価ソフトウェア（Biacore T200 Evaluation Software 2.x若しくは3.x | Octet Data Analysis 9.x若しくは10.x）を用いて1:1結合モデルに当てはめた。

【0757】

11のIgG1f__AEASSすべてについて、SPRによりヒトPAR2に対する親和性を決定した。

【0758】

IgGをそのFcフラグメントを介して捕捉し、界面活性剤（LMNG/CHS）可溶化FL-N PAR2 Starを溶液中の被分析物として使用した。

【0759】

アッセイバッファーとして50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、0.02% LMNGを使用した。

【0760】

FL-N PAR2 Starとセンサーとの非特異的相互作用に起因するアーチファクトを最小限に抑えるため、CM3センサーを基材として、高密度の抗-hu-Fc捕捉抗体（BR-1008-39、GE Healthcare）を固定化した。

【0761】

IgGは比較的高いレベルの約500 RUで捕捉し、非特異的結合に対する特異的結合の比を高めた（同時に、動力学的特性評価に適した条件をそのまま維持した）。

【0762】

親和性は6.5 nM~130 pMの範囲であった。

【0763】

最良の候補の k_{off} 値はアッセイ下限であった。

【0764】

報告された最小の k_{off} は $2.00 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ であった（1500秒間で3%の解離に相当）。

【0765】

KD値が6.5 nM~130 pMの範囲の親和性が観察され、その大部分は予想されるように親和性成熟プロセスに続いて親クローンY022065（KD=5.3 nM）に対する改善を示した。

10

20

30

40

50

【 0 7 6 6 】

表 1 3 : O c t e t システムと可溶性 P A R 2 S t a R (商 標) を用いて決定した親和性成熟クローンの S P R 速度論

【 表 1 3 】

クローン	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (nM)
Y022916	3.9E+4	2.5E-4	6.5
Y022856	1.2E+5	2.5E-4	2.5
Y022858	5.2E+4	7.3E-5	1.4
Y022870	9.6E+4	2.0E-5	0.21
Y022877	6.8E+4	2.0E-5	0.29
Y022879	5.9E+4	3.2E-5	0.5
Y022882	1.1E+5	2.0E-5	0.18
Y022883	1.4E+5	2.0E-5	0.14
Y022884	7.1E+4	8.4E-5	1.2
Y022885	1.5E+5	2.0E-5	0.14
Y022889	1.6E+5	2.0E-5	0.13
ベンチマーク 1	1.2E+6	8.8E-4	0.76

10

20

【 0 7 6 7 】

表 1 4 : B i a c o r e システムと可溶性 P A R 2 S t a R (商 標) を用いて決定した S P R 速度論及び対象の親和性成熟クローン上位 3 つの解析

【 表 1 4 】

クローン	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
22870	3.4E+04	7.0E-06	2.1E-10
22883	3.0E+04	1.2E-05	4.0E-10
22877	2.7E+04	8.0E-06	3.0E-10

30

【 0 7 6 8 】

表 1 5 : ヒト P A R 2 S t a R (商 標) を組み込んだナノディスクを用いた B i a c o r e システムを用いて決定した S P R 速度論 - 3 つの親和性成熟クローンと非親和性成熟クローン (Y 0 2 1 1 7 1) との比較

【 表 1 5 】

クローン	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
Y021171	1.2E+06	3.7E-02	3.1E-08
Y022870	9.3E+04	2.5E-04	2.7E-09
Y022877	7.3E+04	2.1E-04	2.8E-09
Y022881	1.3E+05	8.3E-04	6.3E-09

40

【 0 7 6 9 】

【組換え P A R 2 S t a R (商 標) タンパク質を用いた S P R 親和性測定と、結合に対する温度の影響の評価 : 2 5 ° C と 3 7 ° C における固定化 m A b に対するヒト P A R 2 の結合】

P A R 2 と抗 P A R 2 抗体との相互作用のアッセイは、B i a c o r e T 2 0 0 装置

50

(GE Healthcare) を用いて行った。

【0770】

抗ヒトIgG抗体 (Human Antibody Capture Kit、GE Healthcare) を、ターゲット及びリファレンスフローセルのセンサーチップCM3 (GE Healthcare) に2700～3000共鳴単位 (RU) の表面密度でアミンカップリングにより固定化した。

【0771】

固定化は、25℃でHBS-EP+バッファー (GE Healthcare) 中で行った。

【0772】

続いて、PAR2-抗体相互作用アッセイのため、バッファーを50 mM HEPES、pH 7.5、150 mM NaCl、0.02% LMNG、0.002% CHSに変更し、25℃又は37℃のいずれかでを行った。

【0773】

アッセイの各サイクルは、ターゲットフローセルで抗体を400～450 RUのレベルまで捕捉することから開始した。

【0774】

次いで、PAR2をターゲット及びリファレンスフローセル上に3つの濃度で、各5分間注入し、続いて30分間の解離を行った。

【0775】

その後、表面を、キット (Human Antibody Capture Kit、GE Healthcare) から提供された溶液で再生した。

【0776】

試験した各抗体について、最初のサイクルはブランク (ランニングバッファーの3回注入) とし、2番目は一連の50、100及び200 nMのPAR2注入とした。

【0777】

ブランク差し引きデータを1:1相互作用モデルに当てはめ、会合速度定数及び解離速度定数、 k_a 及び k_d 、並びに親和性定数 K_D を得た。

【0778】

表16: 25℃と37℃における親和性成熟後のリードクローンの結合の要約

【表16】

クローン	温度 (°C)	解離時間 (分)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (h)
Y22870	25	90	3.4E+04	7.0E-06	2.1E-10	27.6
Y22870	25	30	2.8E+04	1.2E-05	4.3E-10	16.1
Y22870	37	30	4.1E+04	1.9E-05	4.5E-10	10.3
Y22877	25	90	2.7E+04	8.0E-06	3.0E-10	24.1
Y22877	25	30	2.2E+04	5.1E-06	2.3E-10	37.9
Y22877	37	30	3.1E+04	1.7E-05	5.5E-10	11.5
Y22883	25	90	3.0E+04	1.2E-05	4.0E-10	16.2
Y22883	25	30	4.0E+04	8.1E-06	2.0E-10	23.7
Y22883	37	30	3.6E+04	2.3E-05	6.5E-10	8.3

【0779】

[リードクローンがpH感受性結合を示すか否かを判定するための評価]

Y22883を280～320 RUに捕捉し、100 nMのPAR2を2分間注入した。

【0780】

注入停止後約400秒で、pH6.0のバッファを5分間注入し、より速い解離を引き起こすかを確認した。

【0781】

実験は、解離速度定数の数値評価ができないように設計した。

【0782】

それにもかかわらず、pH6.0の条件では解離が加速しないことは明らかである（図15）。

【0783】

〔KinExAによる全細胞上の見かけのKD決定〕

「ネイティブ」PAR2（すなわち、細胞表面に発現したPAR2）を用いた見かけのKDの決定のため、リードクローンのサブセット、すなわちY022870及びY02283の評価にKinExA法を適用した。

【0784】

表面発現抗原に対する平衡KDを決定するため、可溶性抗原の代わりに、野生型完全長ヒトPAR2を発現するBacMam感染HEK-293F細胞を滴定に使用した。

【0785】

細胞を、インキュベーションバッファ（Gibco製D-PBS、0.5%（w/v）BSA、0.02%（v/v）アジ化ナトリウム）中で滴定した。

【0786】

実験は、低及び高の2つの固定IgG濃度での2つの滴定からなる。

【0787】

両方の滴定実験（量論制御条件及び親和性制御条件）において、細胞の最大量は、IgGを完全に飽和させるのに十分高い有効リガンド濃度を含まなければならない。

【0788】

IgG及び細胞の混合物を、非常に穏やかな攪拌下、室温で一晩インキュベートし、平衡形成を可能にした。

【0789】

その後、形成された細胞-抗体複合体を遠心分離により除去した。

【0790】

上清の遊離IgG量を、PMMA（ポリメチルメタクリレート）ビーズ上にコートしたヤギ抗ヒトF（ab'）2フラグメント特異的抗体（Jackson ImmunoResearch、#109-005-097）及び抗ヒトF（ab'）2フラグメント特異的Alexa Fluor 647抗体（Jackson ImmunoResearch、#109-605-097）による蛍光検出により測定した。

【0791】

KinExA実験ではIgG分子を使用したため、得られた値には「見かけのKD」とラベル付けし、抗原提示細胞上の二価結合を除外できないこと、及び結合が結合活性の寄与により強化される可能性があることを指摘した。

【0792】

記録した滴定曲線を、「平衡、全細胞」モデルを適用してn-曲線解析ツールを用いてKinExAソフトウェア4.1.11で解析した。

【0793】

Y022870は、全細胞上に発現した野生型ヒトPAR2に約370pMの親和性で結合し、一方Y022883は約260pMの親和性を有する（図16）。

【0794】

値は、PAR2ナノディスクを用いて決定したSPRと一致している（それぞれ210及び140pM）。

【0795】

実施例10 - HDX及び受容体変異のフローサイトメトリー解析による親和性成熟クローンのエピトープマッピング及び解析

10

20

30

40

50

〔抗体競合によるELISAベースのエピトープビニング〕

エピトープビニングは、ELISAベースのアッセイにより行った。

【0796】

抗ヒトPAR2 IgG1 f サンプルIgGを、100 nMの濃度でマイクロタイタープレートに直接コートした。

【0797】

並行して、タグ付き抗原（例えば、ナノディスク埋め込みStaR）を一定濃度（12.5 nM～25 nM）で、2番目の抗ヒトPAR2 IgG1 fの25倍モル過剰と1時間インキュベートし、すべてのエピトープを飽和させ（最大濃度312.5 nM～625 nM、7点滴定、1：4）、複合体を形成させた。

【0798】

評価した各サンプルIgGについて、内部陽性対照（自己競合）を含めた。

【0799】

抗原-IgG複合体をIgGコートプレートに30分間添加した。コートしたIgGに結合した抗原-IgG複合体を、適切なアルカリホスファターゼ（AP）結合二次抗体と「AttoPhos」蛍光基質を組み合わせて検出したタグ特異的抗体（例えば、抗Strept II又は抗His）を介して検出した。

【0800】

個々のアッセイ工程間で複数の洗浄工程を行った。

【0801】

同じエピトープに対して競合する場合、抗原-IgG複合体はIgGコートプレートに結合できず、これは低シグナルとして現れる。

【0802】

異なるエピトープを標的とすることにより、抗原-IgG複合体は、コートしたIgG及び溶液中のIgGに同時に結合することができ、陽性の検出シグナルにつながる。

【0803】

この競合ELISA設定を用いて、利用可能な候補の標的エピトープ及びエピトープの多様性をエピトープビニングにより特性評価した。

【0804】

16の二重機能PAR2特異的候補を、互いに及びMAB3949（R&D Systems）やベンチマーク1などの参照抗体に対する結合競合について試験した。

【0805】

この16の抗体のセットには、5つの親ファミリーのそれぞれ（すなわち、親クローンY022079、Y022069、Y022065、Y021171、Y022059から親和性成熟により派生したクローン）の少なくとも1つの派生物が含まれた。

【0806】

すべての親和性成熟ファミリーは、互いに及び抗ヒトPAR2（MAB3949 R&D Systems）と競合した。

【0807】

このことは、これらの抗体すべてが近位結合領域（すなわち、N末端以外の細胞外ドメイン）を標的とすることを示している。

【0808】

候補はいずれもベンチマークmAb1と競合しなかった。

【0809】

ベンチマークmAb1は、試験したパネル中で完全長PAR2のみに結合する、すなわち直線的N末端エピトープに結合する唯一の抗体である。これらの結果は、親和性成熟候補が、細胞外ループ領域により密接に関連する又は細胞外ループ領域を直接標的とする明らかに異なるエピトープに結合することを示している（図17）。

【0810】

それに加えて、StaR変性条件下での結合を評価し、直線的エピトープ認識か、コン

10

20

30

40

50

ホメーション型エピトープ認識かに分類するのを助けた。

【0811】

試験したIgG候補の97%が結合の減少を示し、したがってコンホメーション型エピトープに結合すると判定された。

【0812】

〔水素／重水素交換〕

水素／重水素交換（HDX）は、結合界面の調査及び同定に使用できる方法の1つである。

【0813】

タンパク質間相互作用部位は、タンパク質骨格中のアミド水素の水素／重水素交換速度を一覧化することにより調べる。

【0814】

この交換がどれだけ速く又は遅く起こるかは、溶媒に対するこれらのアミド水素のアクセス性により決まる。

【0815】

したがって、露出領域中のアミドは、タンパク質間界面内に埋もれたアミドよりも溶媒環境に対するアクセス性が高いため、速い交換速度を有するはずである。

【0816】

以下の機器及び材料を本実施例で使用した。

【0817】

液体クロマトグラフィー分離を、2つの温度制御カラムコンパートメントを備えたThermo Vanquish UHPLC（Thermo Scientific）で行った。

【0818】

オンライン消化を、15℃で、酵素化BEHペプシンカラム2.1x50mm（Waters）で行い、得られたペプチドを4℃でKinetex Evo C18 2.6μm 50x2.1mm（Phenomenex）で分離した。

【0819】

ペプチドの分離のための移動相は、アセトニトリル／0.1%ギ酸（FA）及び水／0.1%FA（Fisher Chemical）であった。

【0820】

分離は、アセトニトリル／0.1%FAの0%から40%までの17.5分間のグラジエントを用いて達成した。

【0821】

得られたペプチドのMS1及びMS／MS分析を、Orbitrap Fusion装置（Thermo Scientific）で行った。

【0822】

ペプチド分析は、Byonic node（Thermo Scientific）を用いたProteome Discoverer 2.4を使用して行い、HDX処理は、HDXaminer 2.4（Sierra Analytics）を使用して行った。

【0823】

遺伝子改変PAR2-2 1-377（グリコシル化部位除去）PAR2タンパク質をLMNG／CHSで精製した。

【0824】

抗原結合フラグメント（Fab）Y022883を直接発現させ（実施例4参照）、参照FabはR&D IgG MAB3949のパパイン消化物に由来した。

【0825】

HDXのための典型的なボトムアップHDX質量分析（MS）手順は、タンパク質-Fabのインキュベーション、重水素化バッファーによる同位体標識、クエンチ、タンパク

10

20

30

40

50

質分解消化、脱塩／分離、MS分析を含む。

【0826】

PAR2-2構築物を50 μMに希釈し、等モル濃度のFab Y022883（又はFab MAB3949）と22℃で30分間インキュベートした。

【0827】

HDXは、タンパク質混合物を重水素化バッファー（10 mMリン酸バッファー pH 7.5、150 mM NaCl）で希釈し、22℃で1分、10分、30分、2時間の各時間（連続標識）を開始した。

【0828】

溶媒アクセス可能な水素の90～95%のD標識を達成するために20倍の希釈を選択した（通常、2 μlのタンパク質混合物を38 μlの重水素化バッファーと混合）。10

【0829】

所望の時間の後、0.8%ギ酸を添加して溶液のpHを約2.5に下げて交換をクエンチし、溶液をドライアイス上で急速凍結し、逆交換を減少させた。

【0830】

次にサンプルを解凍した後、ペプシンカラム上で酵素的オンライン消化を行い、続いてLC-MSで分析した。

【0831】

その後、同じプロトコルを、PAR2-2構築物のみ、及びFab Y022883（又はFab MAB3949）のみについて実施し、非複合体タンパク質中の溶媒／重水素アクセス可能な水素を同定した。20

【0832】

PAR2-2／Fab Y022883（又はPAR2-2／Fab MAB3949）複合体の重水素化レベルを均一なタンパク質（Fab Y022883、Fab MAB3949又はPAR2-2）の重水素化レベルと比較することにより、溶媒アクセス可能な水素の周辺環境の変化を示し、その後そのような「マッピング」を用いてPAR2-2／Fab Y022883（又はPAR2-2／Fab MAB3949）相互作用部位を決定することができる。

【0833】

この方法論を検証するために、PAR2／MAB3949 Fabについて得られたHDX結果を、PAR2とMAB3949 Fabの複合体の公開された共結晶構造（Cheng et al., Nature, 2017）上にマッピングした。30

【0834】

HDXから推定される相互作用は、結晶共構造で観察されるものとよく一致した。

【0835】

次に、PAR2-2／Fab Y022883 HDXを調べると、データはFab MAB3949について観察されたもの（Cheng et al., Nature, 2017）とは異なる相互作用を示した（図18-20）。

【0836】

PAR2のN末端領域は特徴的な重水素-水素交換パターンを示しており、この領域が結合に関与していることを示唆していると考えられる。40

【0837】

表17：HDXによって同定され、相互作用領域に位置し、したがってY022883抗体エピトープを含むと決定されたPAR2-2ペプチドのリスト。

【0838】

【表 17】

ペプチド	PAR2-2 内の位置
配列番号 41 - 55-59 VETVF	セグメント 1
配列番号 42 - 60-77 SVDEFS ASVLTGKLTTVF	セグメント 1/ヘリックス 0/1
配列番号 43 - 306-311 LLVVHY	ECL3
配列番号 44 - 312-326 FLIK SQGQSHVYALY	ECL3

10

【0839】

これらのHDXデータは、PAR2のECL1又はECL2がY022883 PAR2抗体との直接的な相互作用に参与する可能性はかなり低いことを示唆している。この方法を用いて観察された直接的な相互作用は、セグメント1、ヘリックス0/1の領域（膜貫通ドメインに近接しており、受容体の比較的遠位の領域に結合する他のPAR2標的抗体とは対照的）及びECL3に位置している。

【0840】

〔フローサイトメトリーを用いた変異解析〕

20

PAR2結合エピトープ変異をヒトPAR2発現HEK293F細胞上でフローサイトメトリーにより以下のように評価した。

【0841】

発現レベルのモニタリングは、ベンチマーク1抗体を用いて行った。

【0842】

WT PAR2のバックグラウンドに導入した変異は、セグメント1、ヘリックス0/1（単一変異F59A、S60W、D62G、D62F、E63K、E63A及び二重変異D62G/E63G）又はECL3（単一変異Q317A、G318F、Q319A、Q319I）を標的とした。

【0843】

PAR2のさまざまなバージョンは、BacMam感染によりHEK293F細胞に導入した。

【0844】

FACSバッファー（PBS（Sigma、#F9665）、1%BSA（Sigma、#A9647）及びRoche Completeプロテアーゼ阻害剤（#11836145001））中の4×10⁶細胞/mLのHEK293F細胞200μLを、20nMのベンチマーク1又はY022883と4℃で1時間攪拌した。

【0845】

細胞をペレット化し、200μLのFACSバッファーで3回洗浄した。

【0846】

引き続き、細胞を200μLの二次アロフィコシアニン（APC）結合抗ヒトIgG抗体（20nM）と共に4℃で1時間攪拌し、再度FACSバッファー200μLで3回洗浄した。

40

【0847】

変異PAR2及びWT PAR2は、ベンチマーク1で検出した場合、D62Fを除いて非常に類似した発現プロファイルを示し、D62Fは部分的に発現レベルが低下したのに対し、S60W、D62F、G318F及び二重変異D62G/E63Gは全て、Y022883で検出した場合、WTと比較して発現プロファイルが低下し、HDX分析により同定された領域がY022883のヒトPAR2への結合に参与していることを示した。

50

【0848】

選択した変異により観察された結合の減少は、ECL3よりもセグメント1／ヘリックス0／1の方が強い（図21）。

【0849】

これらの変異の影響は、抗体エピトープを変化させる構造変化をもたらし、受容体の機能活性にも変化を引き起こす可能性がある。

【0850】

実施例11 － ラットの薬物動態

Y022883の薬物動態を成体雄性Sprague Dawleyラットで検討した。

【0851】

3頭のラットにY022883を10mg/kg静脈内投与し、2週間までの様々な時点で採血した。

【0852】

血液サンプルを用いて血清を調製し、これらの血清をGyrolabプラットフォーム上の認定非GLP ELISA法（汎用PKキット）で分析し、Phoenix™ WinNonlinを用いた非コンパートメント解析（NCA）によりPKパラメータを算出した。

【0853】

要約データを図22及び表18に示す。

【0854】

これらのデータは、Y022883がラットPAR2に結合しないことから予想される、有意な抗原シンクを持たないヒトmAbの期待値と一致している。

【0855】

表18：ラット（n=3）におけるY022883の群PKパラメータ。

【0856】

データは平均値で示し、括弧内は標準偏差である。

【0857】

【表18】

群	半減期 (h)	Cmax (ng. mL ⁻¹)	AUC _{all} (hr. ng. mL ⁻¹)
10mg/kg Y022883	146.7 (15.0)	109136 (4502)	6937883 (496973)

【0858】

実施例12 － カニクイザルの薬物動態と薬力学

Y022883の薬物動態を成体雄性カニクイザルで検討した。

【0859】

3群の雄性成体カニクイザル3頭に、10mg/kg、3mg/kg、又は1mg/kgのY022883を静脈内投与し、4週間までの様々な時点で採血した。

【0860】

血液サンプルを用いて薬力学を評価するか（図24～26を含む）、薬物動態用の血清を調製した（図23参照）。

【0861】

血清をGyrolabプラットフォーム上の認定非GLP ELISA法（汎用PKキット）で分析し、Phoenix™ WinNonlinを用いた非コンパートメント解析（NCA）によりPKパラメータを算出した。

【0862】

要約データを図23及び表19に示す。

【0863】

これらのデータは、有意な抗原シンクを持たないヒトmAbの期待値と一致する。

【0864】

表19：カニクイザル（ $n=3$ ）におけるY022883の群PKパラメータ。

【0865】

データは平均値で示し、括弧内は標準偏差である。

【0866】

【表19】

群	半減期 (h)	Cmax (ng. mL ⁻¹)	AUC _{all} (hr. ng. mL ⁻¹)
10mg/kg Y022883	182.3 (66.3)	463117 (85204)	45635218 (5182962)
3mg/kg Y022883	174.5 (132.5)	150540 (35878)	12188113 (2805691)
1mg/kg Y022883	150.8 (97.3)	34523 (2255)	3588673 (168372)

10

【0867】

薬力学は無菌条件下で4つの時点（投与前、投与後1日目、13日目及び29日目）で評価した。

【0868】

1容量のPBSを各血液サンプルに添加し、最終濃度が2%となるようにデキストランT-500を6%添加した。

【0869】

25～40分間のインキュベーション後（白血球に富む相と赤血球に富む相の2相が50%ずつになったときに反応を停止した）、白血球を含む上清を除去し、PBSで洗浄し、培養培地（RPMI-1640、2% FCS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% L-グルタミン、1% 非必須アミノ酸）中に元の血液量で再懸濁した。

20

【0870】

次に、1mLの細胞サンプルをPBS、100mM 2f-LIGRLO、100nMトリプシン又は100pg/mL LPSでチャレンジし、37℃で6時間インキュベートした。

【0871】

その後、サンプルをペレット化（306g、5分間、室温）し、ペレットを再懸濁し、0.48mLのRNA laterと混合した後、-70℃で凍結した。

30

【0872】

次に、標準的な方法を用いてサンプルRNAを抽出し、50xのリードデプスでゲノムベースのリードマッピングを用いてトランスクリプトームを評価した。

【0873】

シーケンスリード（FASTQファイル）を参照ゲノムにアラインメントし、各遺伝子にマップされたリード数をカウントし、これにより遺伝子カウントテーブルを作成した。

【0874】

次に、各用量群の各時点における各刺激間で遺伝子発現の差の解析を行った（例えば、1mg/kg投与前PBS対1mg/kg投与前PAR2AP、1mg/kg投与前PBS対1mg/kg投与前トリプシン、1mg/kg投与前PBS対1mg/kg投与前LPS）。

40

【0875】

次に、遺伝子発現の倍率変化と統計的有意性（P値）の散布図であるボルケーノプロットを作成することにより、遺伝子発現の差を決定した。

【0876】

2倍以上の発現量増加又は減少を示し、有意水準が0.05以下である遺伝子を差次的発現遺伝子とみなした。

【0877】

したがって、各刺激について（投与前サンプルから）差次的発現遺伝子セットが生成さ

50

れた。m A b 処置の効果は、各刺激の投与前差次発現遺伝子セットが各時点でまだ差次的発現しているかどうかを決定することにより評価した。

【0878】

例えば、1 m g / k g 投与群の投与前時点で L P S により 1 8 1 6 個の遺伝子が差次的に制御された（投与前 P B S との比較）。2 4 時間後、これらの遺伝子のうち 1 3 7 9 個がまだ L P S により差次的に制御されていた（2 4 時間 P B S との比較）。したがって、1 m g / k g の L P S 投与群では、投与前 L P S 遺伝子シグネチャーの 7 6 % が、投与 2 4 時間後に存在していた。

【0879】

この方法論を用いると、1 0 m g / k g の Y 0 2 2 8 8 3 の単回 I V 注射では、P A R 2 A P 誘導及びトリプシン誘導遺伝子シグネチャーがすべての時点で抑制されたのに対し、L P S 遺伝子シグネチャーは 2 4 時間後に 3 6 % 抑制された後、2 9 日目までには 2 3 % の抑制に回復した（図 2 4）。

【0880】

3 m g / k g の Y 0 2 2 8 8 3 投与後に類似の一連の観察が行われた（図 2 5）が、1 m g / k g の Y 0 2 2 8 8 3 では、トリプシン遺伝子シグネチャーは 2 9 日目までに回復し始めた（2 4 時間、1 3 日目、2 9 日目で 9 6 %、9 2 %、9 1 % の抑制；図 2 6）。

【0881】

これらのデータは、Y 0 2 2 8 8 3 が（少なくとも T L R 4 に対して）P A R 2 を特異的に拮抗し、少なくとも 1 m g / k g の単回注射後 1 ヶ月間、末梢血白血球上の P A R 2 を遮断することと一致する。

【0882】

P A R 2 拮抗作用による L P S 誘導遺伝子シグネチャーの部分的抑制は、T L R 4 及び P A R 2 シグナル伝達カスケードを関連付ける文献報告と一致する（Y a m a g u c h i e t a l 2 0 1 6）。

【0883】

実施例 1 3 T 8 4 細胞株におけるトリプシン及び P a r 2 - A P 誘導 p 3 8 M A P K 及び p E R K リン酸化に対する S H - C 及びベンチマーク I I の効果

T 8 4 細胞を増殖培地中でトリプシン（1 μ M）又は P A R 2 - A P（2 f u - L I G R L O）（1 0 μ M）で処理した。

【0884】

抗体 Y 0 2 2 8 8 3（S H - C）及びベンチマーク 2（S H - D）を 1 0 n M から 3 μ M の濃度範囲でテストした。

【0885】

細胞を処理後 5 分又は 3 0 分に溶解バッファー（P B S + 1 % T r i t o n X - 1 0 0、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤）中で溶解した。

【0886】

総タンパク質濃度を B C A で評価した後、リン酸化タンパク質を分析した。

【0887】

タンパク質濃度を 0 . 3 m g / m L に調整し、サンプルを 1 2 - 2 3 0 k D a W e s 分離モジュール 8 $\times$ 2 5 キャピラリーカートリッジ（P r o t e i n S i m p l e）にロードした。

【0888】

ウサギ抗体を用いて、p E R K 及び E R K（p E R K、C e l l S i g n a l i n g、c a t : 9 1 0 1 S；E R K、C e l l S i g n a l i n g、c a t : 4 6 9 5 S）並びにリン酸化 p 3 8 M A P K 及び p 3 8 M A P K（C e l l S i g n a l i n g、c a t : 9 2 1 1 L；p 3 8、C e l l S i g n a l i n g、c a t : 9 2 1 2 S）を検出した。

【0889】

二次抗体として抗ウサギ検出モジュール（P r o t e i n S i m p l e、c a t : D

10

20

30

40

50

M-001)を使用した。

【0890】

リン酸化ERK又はリン酸化p38のデータは、総ERK又は総p38のデータで標準化した。生物学的重複を分析した。

【0891】

プレート間で標準化するために最大比のパーセンテージを使用した(図27-29)。

【0892】

トリプシン又はPAP2-AP処理により、pERKが8倍超、リン酸化p38-MAPKが3倍超増加した。

【0893】

SH-CとベンチマークIIはいずれも、トリプシン処理細胞におけるERK及びp38-MAPKのリン酸化阻害を示した。

【0894】

SH-Cのみが、PAR2-AP処理細胞におけるリン酸化の有意な阻害を示した。

【0895】

配列

表20-23: クローンY022065、Y022870、Y022877及びY022883の抗体クローン配列。CDRはKabatに従って同定した。

10

20

30

40

50

【表 20】

可変領域ペア名 Y022065		
フレームワーク Vh	YLAN_VH3-23	
フレームワーク VI	YLAN_VL2-23	
HCDR1 (配列番号 3)	SYAMS	
HCDR2 (配列番号 4)	ATSGSGGSTYYADSVKG	
HCDR3 (配列番号 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI	
LCDR1 (配列番号 7)	TGTSSDVGSYNLVS	
LCDR2 (配列番号 8)	EGSKRPS	
LCDR3 (配列番号 9)	SQYATFIAFAV	
タンパク質配列 (VH) (配列番号 2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGGGTLVTSS	
タンパク質配列 (VL) (配列番号 6)	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGG	
Ppt フォーマット	h_IgG1f_AEASS	
LC タンパク (配列番号 70)	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAMK ADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
LC DNA (配列番号 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCAT AGTGCACCG GCACACAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCGCAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAACGCGCC GAGCGGCGTT AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCTG CAAGCCGAAG ACGAAGCGA TTATTACTGC TCCAGTAGC CTACTTTTCAT CGCTTTTCGT GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAGCGCG CCCTAGCGTG ACCCTGTTCC CCCAAGCAG CGAGGAAGTC CAGGCCAACA AGGCCACCT CGTGTGCTG ATCAGCGACT TCTACCCTGG CGCGTGACC GTGGCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG AAGGCCGGG TGGAACACAC CACCCCGAGC AAGCAGAGCA ACAACAAATA GCGCGCCAGC AGCTACCTGA GCCTGACCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCTACAG CTGCCAGGTG ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC GTGGCCCCCA CCGAGTGCAG C	
HC タンパク (配列番号 71)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGGGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK	
HC DNA (配列番号 35)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGCAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG AGCTGTGCCG CAAGCGGCTT TACCTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT GCGCCAAGCA CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGCGCC ATTAGCGGCA GCGGTGGCAG CACCTATTAT GCGGATAGCG TGAAAGGTGG CTTTACCAT AGTCGCGATA ACAGCAAAAA CACCCTGTAT CTGCAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATTC CACTACACTC ACTCCGGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG CCAGGGCACC CTGTTACTG TCTCGAGCGC GTCGACCAA GGCCTCCTCT GGCCCCCAGC AGCAAGAGCA CCTCTGGCG AACAGCGCC CTGGGTGCC TGGTCAAGGA CTAATTCCC GAGCCCGTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCCGTGACCA GCGCGTGCA CACCTTTCCA GCGGTGCTCC AGAGCAGCGG CCTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCGCAGCAGC AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACCACA AGCCAGCAA CACAAAGGTG GACAAGCGGG TGAACCCAA GAGCTGCGAC AAGACCCACA CCTGTCCCC CTGCCCTGCC CCTGAAGCGG AGGAGGCCCC CTCGTGTTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCTG ATGATCAGC GGACCCCGA AGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACGTGTCCA CGAGGACCT GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGGACGGC GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCCG TGCTGACCGT GCTGCACCA GACTGGCTGA ACGGCAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGG CAGCCCGCG AGCCCGAGG GTACACACTG CCCCCTAGCC GGGAAAGAGT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT CGTGAAGGGC TTCTACCCCA GCGACATTG CGTGGAAATG GAGAGCAACG GCCAGCCCGA GAACAACAC AAGACACCC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACC GTGGACAAGA GCCGTGGCA GCAGGGCAAC GTGTTGAGCT GCTCCGTGAT GCAGGAGGCC CTGCACAACC ACTACACCA GAAGTCCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG	

10

20

30

40

50

【表 2 1】

可変領域ペア名 Y022870	
フレームワーク Vh	YLAN_VH3-23
フレームワーク VI	YLAN_VL2-23
HCDR1 (配列番号 11)	RYAIT
HCDR2 (配列番号 12)	TISALGLEYAESVRG
HCDR3 (配列番号 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI
LCDR1 (配列番号 7)	TGTSSDVGSYNLVS
LCDR2 (配列番号 8)	EGSKRPS
LCDR3 (配列番号 9)	SQYATFIAFAV
タンパク質配列 (VH) (配列番号 10)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYAITWVRQAPGKGLEWVSTISALGLEYAESVRGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGGGLTVTVSS
タンパク質配列 (VL) (配列番号 6)	QSAITQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASL TISGLQAEDADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGG
Ppt フォーマット	h_LgG1f_AEASS
LC タンパク (配列番号 70)	QSAITQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASL TISGLQAEDADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGGPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VANKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC DNA (配列番号 34)	CAGAGCGCCG TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT AGCTGCACCG GCACCGAGCAG CGACGTGGCG AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCGGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAAAGCCG GAGCGCGGTT AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCGCTG CAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGCT GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAGCCGC CCCTAGCGTG ACCCTGTTC CCCCAGCAG CGAGGAATC CAGGCCAACA AGGCCACCGT CGTGTGCCTG ATCAGCGACT TCTACCTGG CGCCGTGACC GTGGCGTGA AGGCCGATAG CAGCCGTGTG AAGCCGGCG TGGAAACCAC CACCCCGAGC AAGCAGAGCA ACAACAAATA CGCCGCCAGC AGCTACCTGA GCCTGACCCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTC ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC GTGGCCCCCA CCGAGTGCAG C
HC タンパク (配列番号 72)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYAITWVRQAPGKGLEWVSTISALGLEYAESVRGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV PKSCDKHTHTCPPCPAEEAGAPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
HC DNA (配列番号 36)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGCAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG AGCTGTGCCG CAAGCGGGTT TTCTTTCTCC AGATACGCAA TCACCTGGGT GCGCCAAGCA CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGCACC ATTTCCGCAC TGGGTCTGGA GACATATTAC GCGGAGTCCG TCCGCGGCGG CTTTACCATT AGTCGCGATA ACAGCAAAAA CACCCTGTAT TCGCAAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATTG CACTACACTC ACTCCGGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG CCAGGGGACC CTGGTACTG TCTCGAGCGC GTCGACCAA GGGCCGAGCG TGTTCCTCTG GGGCCCGAGC AGCAAGAGCA CCTCTGGCG AACAGCCGCG CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCC GAGCCCGTGA CCGTGTCCCTG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTTCCA GCGGTGCTCC AGAGCAGCGG CCTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCAGCAGC AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACCACA AGCCAGCAA CACAAAGGTG GACAAGCGGG TGAACCCAA GAGCTGCGAC AAGACCCACA CCTGTCCCCC CTGCCCTGCC CCTGAAGCGG AGGGAGCCCG CTCGTGTTG CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCCGT ATGATCAGCC GGACCCCGCA AGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACGTGTCCCA CGAGGACCC GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGGACGGC GTGGAAGTG ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCCG TGTGACCGT GCTGCACCA GACTGGCTGA ACGGCAAGA GTACAAGTG AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCGCGG AGCCCAAGGT GTACACACTG CCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCTG CGTGAAGGGC TTCTACCCCA GCGACATTGC CGTGAATGG GAGAGCAACG GCCAGCCCGA GAACAACACT AAGACCAACC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC GGCTATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACC GTGGACAAGA GCGGTGGCA GCAGGGCAAC GTGTTAGCT GCTCCGTGAT GCAGGAGGCC CTGCACAACC ACTACACCA GAAGTCCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG

10

20

30

40

50

【表 2 2】

可変領域ペア名 Y022877	
フレームワーク Vh	YLAN_VH3-23
フレームワーク Vl	YLAN_VL2-23
HCDR1 (配列番号 14)	RYAMT
HCDR2 (配列番号 15)	TISGLQGEAYYAGSVKG
HCDR3 (配列番号 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI
LCDR1 (配列番号 7)	TGTSSDVGSYNLVS
LCDR2 (配列番号 8)	EGSKRPS
LCDR3 (配列番号 9)	SQYATFIAFAV
タンパク質配列 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKGLEWVSTISGLQGEAYYAGSVKGRFTISRDN
タンパク質配列 (VL)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSKSGNTASL
(配列番号 6)	TISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ
Ppt フォーマット	h_IgG1f_AEASS
LC タンパク (配列番号 70)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSKSGNTASL
	TISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT
	VAWKADSSPVKAGVETTPSKSQSNNKYAASSYLSLTPEQWWSKRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC DNA (配列番号 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT AGCTGCACCG
	GCACCCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCGGAA
	ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAACGCCG GAGCGGCGTT AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC
	AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCGCT CAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTAGC
	CTACTTTTCAT CGCTTTTCGT GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAGCCGC
	CCCTAGCGTG ACCCTGTTCC CCCCAGCAGC CGAGGAACTC CAGGCCAACA AGGCCACCGT CGTGTGCGTG
	ATCAGCGACT TCTACCTGG CGCGTGACG GTGGCCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG AAGGCCGGCG
	TGGAACCCAC CACCCCGAGC AAGCAGAGCA ACAACAAATA CGCCGCCAGC AGCTACCTGA GCCTGACCCC
	CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTC ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC
	GTGGCCCCCA CCGAGTGACG C
HC タンパク (配列番号 73)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKGLEWVSTISGLQGEAYYAGSVKGRFTISRDN
	KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
	LGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTPKVDKRV
	PKSCDKHTHTCPPCPAPEAGAPSVLFPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
	REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
	CLVKGFFYPSDIAVEWESNGPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSL
	SLSPGK
HC DNA (配列番号 37)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGCAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG AGCTGTGCCG
	CAAGCGGCTT TACCTTCAGC AGATATGCAA TGAATTGGGT GCGCCAAGCA CCAGGCAAAG GCCTGGAATG
	GGTGAGTACC ATAAGCGGGC TGGGACAAGA GGCTTACTAC GCAGGCTCCG TCAAAGGCGG CTTTACCATT
	AGTCGCGATA ACAGCAAAAA CACCCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT
	ATTATTGCGC GCGAGGATTC CACTACACTC ACTCCGGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG
	CCAGGGCACC CTGGTTACTG TCTCGAGCGC GTCGACCAAA GGCCCCAGCG TGTTCCCTCT GGCCCCCAGC
	AGCAAGAGCA CCTCTGGCGG AACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTAATTCCCG GAGCCCGTGA
	CCGTGTCTCG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTTCCA GCGGTGCTCC AGAGCAGCGG
	CCTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCCAGCAGC AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC
	GTGAACCACA AGCCCAGCAA CACAAGGTG GACAAGCGGG TGAACCCAA GAGCTGCGAC AAGACCACA
	CCTGTCCCC CTGCCCTGCC CCTGAAGCGG AGGGAGCCCC CTCCGTGTTCT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA
	GGACACCCCT ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACGTGTCCA CGAGGACCCCT
	GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGGACGGC GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC
	AGTACAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCCG TGCTGACCGT GCTGCACCG GACTGGCTGA ACGGCAAGA
	GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC
	CAGCCCCCGG AGCCCCAGGT GTACACACTG CCCCCTAGCC GGGAAAGAGT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC
	TGACCTGCCT CGTGAAGGGC TTCTACCCCA GCGACATTGC CGTGAATGG GAGAGCAACG GCCAGCCCGA
	GAACAACCTAC AAGACCACCC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACC
	GTGGACAAGA GCGGTGGCA GCAGGGCAAC GTGTTCAAGT GCTCCGTGAT GCACGAGGCC CTGCACAAGC
	ACTACACCCA GAAGTCCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG

10

20

30

40

50

【表 2 3】

可変領域ペア名 Y022883	
フレームワーク Vh	YLAN_VH3-23
フレームワーク VI	YLAN_VL2-23
HCDR1 (配列番号 17)	RYAIS
HCDR2 (配列番号 18)	VISGHGSEANYAESVKG
HCDR3 (配列番号 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI
LCDR1 (配列番号 7)	TGTSSDVGSYNLVS
LCDR2 (配列番号 8)	EGSKRPS
LCDR3 (配列番号 9)	SQYATFIAFAV
タンパク質配列 (VH) (配列番号 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTRYAISWVRQAPGKLEWVSVISGHGSEANYAESVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQGLTVTVSS
タンパク質配列 (VL) (配列番号 6)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ
Ppt フォーマット	h_IgGif_AEASS
LC タンパク (配列番 号 70)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAMKADSSPVKAGVETTPSKSQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC DNA (配列番号 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT AGCTGCACCG GCACCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAACGCCC GAGCGGCGTT AGCAACCGCT TTAGTGCCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCGTG CAAGCCGAGG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGCT GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAGGCGC CCCTAGCGTG ACCCTGTTCC CCCAAGCAG CGAGGAAGCT CAGGCCAACA AGGCCACCT CGTGTGCGTG ATCAGCGACT TCTACCCTGG CGCCGTGACC GTGGCCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG AAGGCCGCGG TGGAAACCA CACCCCGAGC AAGCAGAGCA ACAACAAATA CGCCGCCAGC AGCTACCTGA GCCTGACCCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCTACAG CTGCCAGGTC ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGAGC C
HC タンパク (配列番号 74)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTRYAISWVRQAPGKLEWVSVISGHGSEANYAESVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV PKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
HC DNA (配列番号 38)	GAAGTGACAG TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGACG CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG AGCTGTGCCG CAAGCGGGT CTCCTTCAC AGATATGCAA TTCTCTGGT GCGCCAAGCA CAGGCCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGTGTG ATAAGCGGGC ATGGTTCCGA GGCTAACTAC GCCGAGAGCG TCAAGGGTCG CTTTACCATT AGTCGCGATA ACAGCAAAAA CACCCTGTAT CTGCAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATT CACTACACT ACTCCGGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTG ACATTITGGG CCAGGGCACC CTGGTTACTG TCTCGAGCGC TCGACCAAA GGCCCCAGCG TGTTCCCTCT GGCCCCAGC AGCAAGAGCA CCTCTGGCG AACAGCCGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC GAGCCGCTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTTCCA GCGGTGCTCC AGAGCAGCGG CCTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCAGCAGC AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACCACA AGCCAGCAA CACAAAGGTG GACAAGCGGG TGGAAACCAA GAGCTGCGAC AAGACCCACA CCTGTCCCC CTGCGCTGCC CCTGAAGCG AGGGAGCCCC CTCCGTGTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCCTG ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTGACCTGC GTGGTGGTG ACGTGTCCCA CGAGGACCCT GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGGACGGC GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCCG TGCTGACCGT GCTGCACCA GACTGGCTGA ACGGCAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCGCG AGCCCCAGGT GTACACACTG CCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCC CTGGAAGGGC TTCTACCCCA GCGACATTGC CGTGAATGG GAGAGCAACG GCCAGCCCGA GAACAACACT AAGACCAACC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACC GTGGACAAGA GCCGGTGGA GCAGGGCAAC GTGTTCACT GCTCCGTGAT GCAGGAGGCC CTGCACAACC ACTACACCA GAAGTCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG

10

20

30

40

【0 8 9 6】

表 2 4 : 配列リストのキー

【表 2 4 - 1】

配列番号	記述子	配列
1	Wildtype ヒト PAR2	MRSPSAAWLLGAAILLAASLSCSGTIQGTNRSSKGRSLIGKVDGTSHTGKGV VETVFSVDEFSASVLTGKLTTFVLPVYTVFVGLPSNGMALWVFLFRTKKKH PAVIYMANLALADLLSVIWFPLKIAYHIHGNNWIYGEALCNVLIGFFYGNMYCS ILFMTCLSVQRYWVIVNPMGHSRKKANIAIGISLAIWLLILLVTIPLYVVKQTI FIPALNITTCDDVLPQQLLVGDMFNFLSLAIGVFLPFAFLTASAYVLMIRMLR SSAMDENSEKKRKRAIKLIVTVLAMYLICFTPSNLLL VVHYFLIKSQGGSHVYA LYIVALCLSTLNSCIDPFVYVFSHDFRDHAKNALLCRSVRTVKQMQLVSLTSKK HSRKSSSYSSSTTVKTSY
2	クローン Y022065 の VH 領域	表 20 参照
3	Kabat によるクローン Y022065 の HCDR1 領域	表 20 を参照
4	Kabat によるクローン Y022065 の HCDR2 領域	表 20 を参照
5	Kabat によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の HCDR3 領域	表 20-23 を参照
6	クローン Y022065、Y022870、Y022877、Y022883 の VL 領域	表 20-23 を参照
7	Kabat によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の LCDR1 領域	表 20-23 を参照
8	Kabat によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の LCDR2 領域	表 20-23 を参照
9	Kabat によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の LCDR3 領域	表 20-23 を参照
10	クローン Y022870 の VH 領域	表 21 を参照
11	Kabat によるクローン Y022870 の HCDR1 領域	表 21 を参照
12	Kabat によるクローン Y022870 の HCDR2 領域	表 22 を参照
13	クローン Y022877 の VH 領域	表 22 を参照
14	Kabat によるクローン Y022877 の HCDR1 領域	表 22 を参照
15	Kabat によるクローン Y022877 の HCDR2 領域	表 23 を参照
16	クローン Y022883 の VH 領域	表 23 を参照
17	Kabat によるクローン Y022883 の HCDR1 領域	表 20 を参照
18	Kabat によるクローン Y022883 の HCDR2 領域	表 20 を参照
19	クローン Y022054 の VH 領域	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAI SWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARGYAEFGVWGQ GTLVTVSS
20	Kabat によるクローン Y022054 の HCDR1 領域	SYAIS
21	Kabat によるクローン Y022054 の HCDR2 領域	AISGSGGSTYYAESVKG
22	Kabat によるクローン Y022054 の HCDR3 領域	GYAEFGV
23	クローン Y022054 の VL 領域	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTWGGPQTFGQGTKEIKR T
24	Kabat によるクローン Y022054 の LCDR1 領域	RASQSISSYLN
25	Kabat によるクローン Y022054 および Y021171 の LCDR2 領域	AASSLQS
26	Kabat によるクローン Y022054 の LCDR3 領域	QQTWGGPQT
27	クローン Y021171 の VH 領域	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSINWVRQAPGKGLEWVSSISS SSYTYAESVKGRFTISRDNKNSLYQMNSLRAEDTAVYYCARAASGFAIFDY WGQGTLVTVSS
28	Kabat によるクローン Y021171 の HCDR1 領域	SYSIN

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

配列番号	記述子	配列
29	Kabat によるクローン Y021171 の HCDR2 領域 Kabat	SISSSSYTYAESVKG
30	Kabat によるクローン Y021171 の HCDR3 領域	AASGFAIFDY
31	クローン Y021171 の VL 領域	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQKPKGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGDTFTLTISLQPEDFATYYCQQTHYVPL TFGQGTKEIKRT
32	Kabat によるクローン Y021171 の LCDR1 領域	RASQGISWLA
33	Kabat によるクローン Y021171 の LCDR3 領域	QQTHYVPLT
34	Y022065、Y022870、Y022877、および Y022883 の LC ヌクレオチド配列	表 20-23 を参照
35	Y022065 の HC ヌクレオチド配列	表 20 を参照
36	Y022870 の HC ヌクレオチド配列	表 21 を参照
37	Y022877 の HC ヌクレオチド配列	表 22 を参照
38	Y022883 の HC ヌクレオチド配列	表 23 を参照
39	ヒト PAR2 活性化ペプチド	SLIGKV
40	マウス PAR2 活性化ペプチド	SLIGRL
41	N 末端を含む PAR2 エピトープ配列 1	VETVF
42	Helix0/1 を含む PAR2 エピトープ配列 2	SVDEFSASVLTGKLTVF
43	ECL3 を含む PAR2 エピトープ配列 3	LLVVHY
44	ECL3 を含む PAR2 エピトープ配列 4	FLIKSQGQSHVYALY
45	PAR2 N 末端領域	VTVETVFSVDEFSASVLTGKLTV
46	HCDR1 領域 Chothia によるクローン Y022065 の HCDR2 領域	GFTFSSY
47	Chothia によるクローン Y022065 の HCDR3 領域	SGSGGS
48	Chothia によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の HCDR1 領域	GFHYTHSGKRYYPFDI
49	Chothia によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の LCDR1 領域	TSSDVGSYNL
50	Chothia によるクローン Y022065、Y022870、 Y022877、Y022883 の LCDR3 領域	YATFIAFA
51	Chothia によるクローン Y022870 の HCDR1 領域	GFSFSRY
52	Chothia によるクローン Y022870 の HCDR2 領域	SALGLE
53	Chothia によるクローン Y022877 の HCDR1 領域	GFTFSRY
54	Chothia によるクローン Y022877 の HCDR2 領域	SGLGQE
55	HCDR1 Chothia によるクローン Y022883 の領域	GFSFTRY
56	Chothia によるクローン Y022883 の HCDR2 領域	SGHGSE
57	Chothia によるクローン Y022054 の HCDR1 領域	GFTFSSY
58	Chothia によるクローン Y022054 の HCDR2 領域	SGSGGS
59	Chothia によるクローン Y022054 の HCDR3 領域	GYAEFGV
60	Chothia によるクローン Y022054 の LCDR1 領域	SQSISSY
61	Chothia によるクローン Y022054 の LCDR3 領域	WGGPQ
62	Chothia によるクローン Y021171 の HCDR1 領域	GFTFSSY
63	Chothia によるクローン Y021171 の HCDR2 領域	SSSSSY
64	Chothia によるクローン Y021171 の HCDR3 領域	AASGFAIFDY
65	Chothia によるクローン Y021171 の LCDR1 領域	SQGISSW
66	Chothia によるクローン Y021171 の LCDR3 領域	HYVPL

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 3】

配列番号	記述子	配列
67	野生型ヒト PAR 1	MGPRRLLLVAACFSLCGPLLSARTRARRPESKATNATLDPRSFLLRNPNDKYEP FWEDEEKNESGLTEYRLVSIKSSPQKQLPAFISEDASGYLTSSWLTFLVPSV YTGVFVVSPLNIMAVVFILKMKVKKPAVVYMLHLATADLVFVSVLPFKISYY FSGSDWQFSGELCRFVTAIFYCNMYASILLMTVVISIDRF LAVVYPMQSLSWRTL GRASFTCLAIWALAIAGVVPDLLKEQTIQVPGLNITTC HDV LNETLLEGYYAYY FSAFSAVFFVPLIISTVCYVSIIRCLSSSAVANRSKSRALFLSAAVFCIFII CFGPTNVLLIAHYSFLSHTSTTEAAYFAYLLCVCVSSI SCCIDPLIYYASSEC QRYVYSILCKE SSDPSSYNSSGQLMASKMDTCSSNLNNSIYKLLT
68	野生型ヒト PAR 3	MKALIFAAAGLLLLLPTFCQSGMENDTNLAKPTLPKTRFGAPPNSFEFPFS ALEGWTGATITVKIKPEESASHLVKNATMGYLTSSLSTKLIPAIYLLVFVVG VPANAVTLWMLFFRTRSICTTVFYTNLAIDFLFCVTLPFKIAHYLNGNNWVFG EVLCRATTVIIFYGNMYCSILLACISINRYLAIVHPFTYRGLPKHTYALVTGCL VWATVFLYMLPFFILKQEYLVQPDITTC HDV HNTCESSPFQLYYFISLAFFG FLIPFVLIIYCYAAIIRTLNAYDHRWLWYVKASLLILVIFTICFAPSNIILIIH HANYYYNNTDGLYFIYLIJALCLGSLNSCLDPFLYFLMSKTRNHSTAYLTK
69	野生型ヒト PAR 4	MWGRLLWLVLGFSLSGGTQTPSVYDESGTGGGDDSTPSILPAPRGYPGQVC ANDSDTELPDSSRALLLGWVPTRLVPALYGLVLVGLPANGALWVLTQAPR LPSTMLLMNLAADLLALALPPRIAYHLRGQRWPFGEACRLATAALYGHMYG SVLLAAVSLDRYLALVHPLRARALRGRRALGLCMAAWLMAAALALPLTLQRO TFRLARSDRVLCHDALPLDAQASHWQPAFTCLALLGCFPLLAMLLCYGATLHT LAASGRRYGHARLTAVVLASAVAFFVPSNLLLLHYSDPSPSAWGNLYGAYVP SLALSTLNSCVDPFIYYVYSAEFRDKVRAGLFORSPGDTVASKASAEGGSRGMG THSSLLQ
70	Y022065、Y022870、Y022877、Y022883 の LC アミノ酸配列	表 20-23 を参照
71	Y022065 の HC アミノ酸配列	表 20 を参照
72	Y022870 の HC アミノ酸配列	表 21 を参照
73	Y022877 の HC アミノ酸配列	表 22 を参照
74	Y022883 の HC アミノ酸配列	表 23 を参照

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0897】

【非特許文献1】Abbas, A., Lichtman, A. and Pillai, S., 2000. Cellular and molecular immunology. 4th ed.

【非特許文献2】Allen L.V. 2008. The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding, Third Edition.

【非特許文献3】Amadesi, S., Cottrell, G.S., Divino, L., Chapman, K., Grady, E.F., Bautista, F., Karanjia, R., Barajas-Lopez, C., Vanner, S., Vergnolle, N. and Bunnett, N.W. 2006. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C ϵ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. J.Physiol, 575(2), pp.555-571.

【非特許文献4】Amiable, N., Tat, S., Lajeunesse, D., Duval, N., Pelletier, J., Martel-Pelletier, J. and Boileau, C., 2009. Proteinase-activated receptor (PAR)-2 activation impacts bone resorptive properties of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. Bone, 44(6), pp.1143-1150.

【非特許文献5】Ausubel, F., 1987. Current protocols in molecular biology.

【非特許文献6】Banerjee, S., Huber, T. and Sakmar, T., 2008. Rapid Incorporation of Functional Rhodopsin into Nanoscale Apolipoprotein Bound Bilayer (NABB) Particles. Journal of Molecular Biology, 377(4), pp.1067-1081.

【非特許文献7】Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M.Science. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. Science, 242(4877), pp. 423-6.

【非特許文献8】Cheng, R., Fiez-Vandal, C., Schlenker, O., Edman, K., Aggeler, B., Brown, D., Brown, G., Cooke, R., Dumelin, C., Dore, A., Geschwin

dner, S., Grebner, C., Hermansson, N., Jazayeri, A., Johansson, P., Leon g, L., Prihandoko, R., Rappas, M., Soutter, H., Snijder, A., Sundstrom, L., Tehan, B., Thornton, P., Troast, D., Wiggin, G., Zhukov, A., Marshall, F. and Dekker, N., 2017. Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2. *Nature*, 545(7652), pp.112-115.

【非特許文献 9】 Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. 2007. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest*. 117(7), pp 1979-87.

【非特許文献 10】 Frese, K., Eisenmann, M.; Ostendorp, R.; Brocks, B.; Pabst, S. 2013. An automated immunoassay for early specificity profiling of antibodies. *mAbs* 5(2), pp. 279-287

【非特許文献 11】 Gawinowicz, M. A., Merlini, G., Birken, S., Osserman, E. F., Kabat, E. A. 1991. Amino acid sequence of the FV region of a human monoclonal IgM (NOV) with specificity for the capsular polysaccharide of the group B meningococcus and of *Escherichia coli* K1, which cross-reacts with polynucleotides and with denatured DNA. *J Immunol* 147(3), pp. 915-920.

【非特許文献 12】 Giblin P, Boxhammer R, Desai S, Kroe-Barrett R, Hansen G, Ksiazek J, Panzenbeck M, Ralph K, Schwartz R, Zimmitti C, Pracht C, Miller S, Magram J, Litzenburger T. 2011. Fully human antibodies against the Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) with anti-inflammatory activity. *Hum Antibodies*. 20(3-4):83-94.

【非特許文献 13】 Hamilton JR, Trejo J. 2017. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 57, pp. 349-373.

【非特許文献 14】 Hawkins, R. E.; Russell, S. J.; Winter, G. 1992: Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J.Mol.Biol*. 226(3), pp.889-896.

【非特許文献 15】 Helamo, D., Delil, R. and Dileba, T. 2017. Trends of diabetes mellitus and hypertension at Nigist Eleni Mohammed General Hospital, Hossana, Ethiopia (December 2010-January 2014): a five year longitudinal study. *Safety in Health*, 3(1).

【非特許文献 16】 Heuberger, D. and Schuepbach, R., 2019. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis Journal*, 17(4).

【非特許文献 17】 Huston, J., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M., Novotny, J., Margolies, M., Ridge, R., Brucoleri, R., Haber, E. and Crea, R., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(16), pp.5879-5883.

【非特許文献 18】 Hutchison, C., Phillips, S., Edgell, M., Gillam, S., Jahnke, P. and Smith, M., 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 253(18), pp.6551-6560.

【非特許文献 19】 Kagota S, Maruyama K, McGuire JJ. 2016. Characterization and Functions of Protease-Activated Receptor 2 in Obesity, Diabetes, and Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2016: 3130496

10

20

30

40

50

【非特許文献 2 0】Lindner, J., Kahn, M., Coughlin, S., Sambrano, G., Schauble, E., Bernstein, D., Foy, D., Hafezi-Moghadam, A. and Ley, K., 2000. Delayed Onset of Inflammation in Protease-Activated Receptor-2-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 165(11), pp.6504-6510.

【非特許文献 2 1】Lohman RJ, Cotterell AJ, Barry GD, Liu L, Suen JY, Vesely DA, Fairlie DP. 2012. An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. *FASEB J.* 26(7), pp. 2877-87.

【非特許文献 2 2】Lohning, C. Novel methods for displaying (poly)peptides/ proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. Applied for by MorphoSys AG. Patent no. WO 01/05950 A2

【非特許文献 2 3】Low, N. M.; Hollinger, P.; Winter, G. (1996): Mimicking Somatic Hypermutation: Affinity maturation of Antibodies Displayed on Bacteriophage Using a Bacterial Mutator Strain. *J.Mol.Biol.* 260(3), pp. 359-368.

【非特許文献 2 4】Mrozkova P, Palecek J, Spicarova D. 2016. The role of protease-activated receptor type 2 in nociceptive signaling and pain. *P hysiol Res.* 65(3), pp. 357-67.

【非特許文献 2 5】Prassler, J., Steidl, S., Urlinger, S. 2009. In vitro affinity maturation of HuCAL antibodies: complementarity determining region exchange and RapMAT technology. *Immunotherapy* 1 (4), pp. 571-583.

【非特許文献 2 6】Rice, A.S.C., Smith, B.H. and Blyth, F.M. 2016. Pain and the global burden of disease. *PAIN*, 157(4), pp.791-796.

【非特許文献 2 7】Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. and Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), pp.1350-1354.

【非特許文献 2 8】Smith, G., Summers, M. and Fraser, M., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, 3(12), pp.2156-2165.

【非特許文献 2 9】Taylor, L., Carmack, C., Schramm, S., Mashayekh, R., Higgins, K., Kuo, C., Woodhouse, C., Kay, R. and Lonberg, N., 1992. A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Research*, 20(23), pp.6287-6295.

【非特許文献 3 0】Tiller T, Schuster I, Deppe D, Siegers K, Strohner R, Herrmann T, Berenguer M, Poujol D, Stehle J, Stark Y, Hessling M, Daubert D, Felderer K, Kaden S, Kolln J, Enzelberger M, Urlinger S. 2013. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MAbs.* 5(3), pp. 445-70.

【非特許文献 3 1】Van den Brulle J, Fischer M, Langmann T, Horn G, Waldmann T, Arnold S, Fuhrmann M, Schatz O, O'Connell T, O'Connell D, Auckenthaler A, Schwer H. 2008. A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques.* 45(3), pp.340-3.

【非特許文献 3 2】Wagner F, Lange CF, Nowak M, Ignatenko S. 2014. FRI0315 First Human Dose of the Anti-C5a Receptor-Targeting, Human Monoclonal Antibody NNC0215-0384 in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Phase 1, Randomised, Double-Blind, Single-Dose, Dose-Escalation Trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(Supplement 2), abstract FRI03

10

20

30

40

50

15. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-eular.2156>

【非特許文献 3 3】 Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, Narahara S, Suguchi H, Yamaguchi Y. 2016. Neutrophil elastase enhances IL-12p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via transactivation of the PAR-2/EGFR/TLR4 signaling pathway. Blood Cells Mol Dis. 59, pp.1-7.

【非特許文献 3 4】 Yau MK, Liu L, Fairlie DP. 2013. Toward drugs for protease-activated receptor 2 (PAR2). J Med Chem. 56(19), pp. 7477-97.

【非特許文献 3 5】 Yau MK, Lim J, Liu L, Fairlie DP. 2016. Protease activated receptor 2 (PAR2) modulators: a patent review (2010-2015). Expert Opin Ther. Pat. 26(4), pp. 471-83.

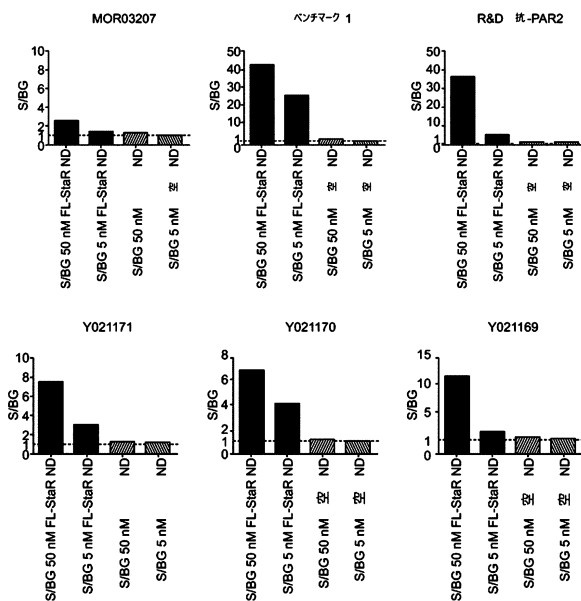
10

【0898】

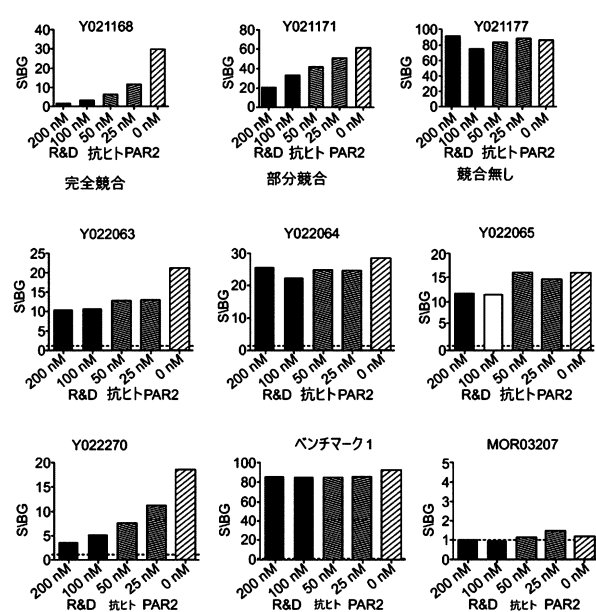
本発明は、本明細書に記載された特定の態様によって範囲が限定されるものではない。実際に記載されたものに加えて、本発明の様々な変更は、前述の説明および添付の図面から当業者に明らかである。このような変更は、添付の特許請求の範囲内に収まることを意図している。本明細書で引用されている出版物、特許、特許出願など、すべての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図 1】



【図 2】



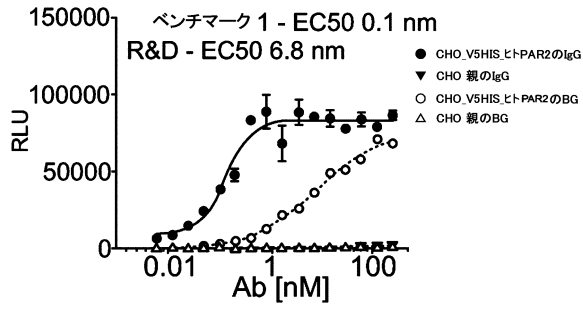
20

30

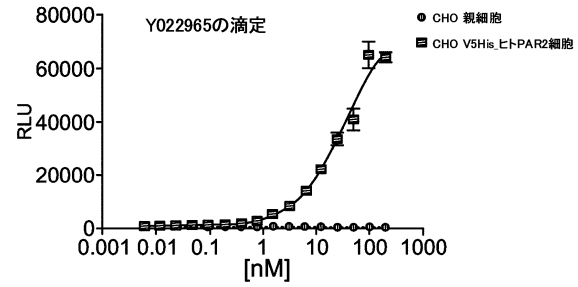
40

50

【図 3 A】

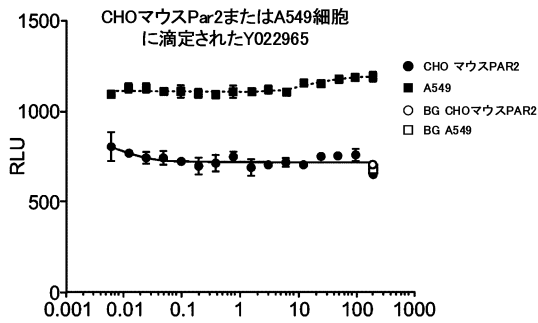


【図 3 B】

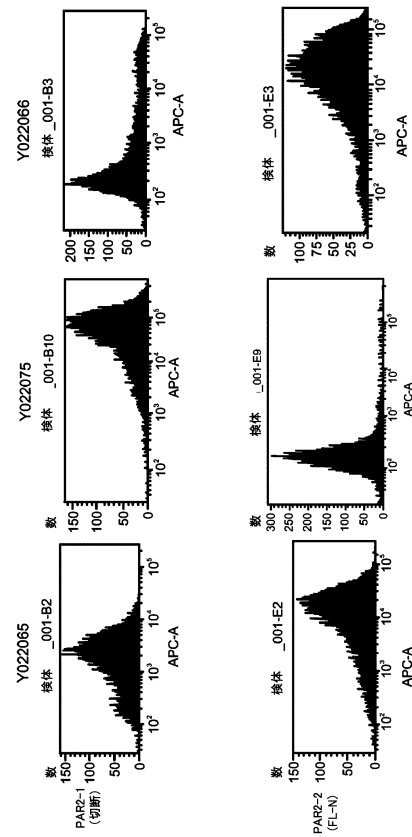


10

【図 3 C】



【図 4 - 1】



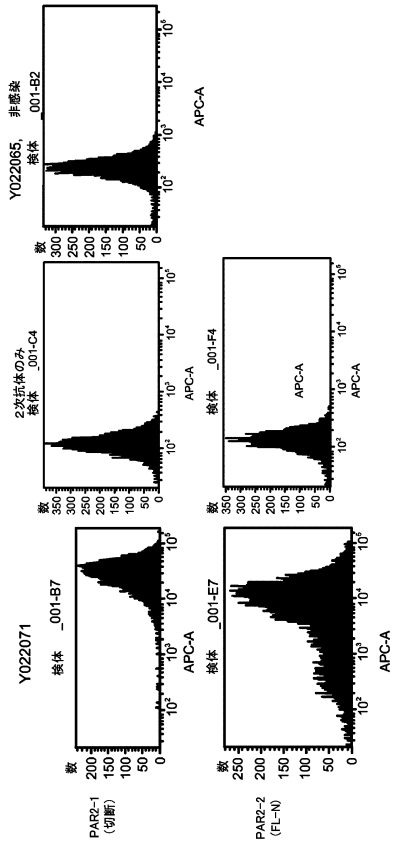
20

30

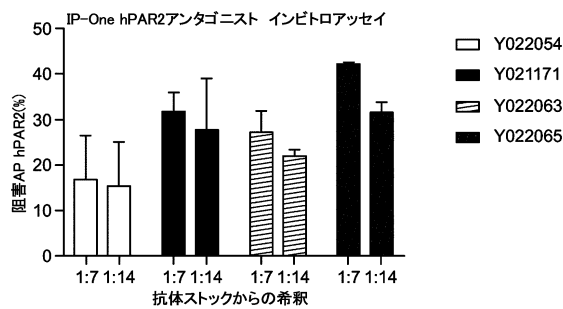
40

50

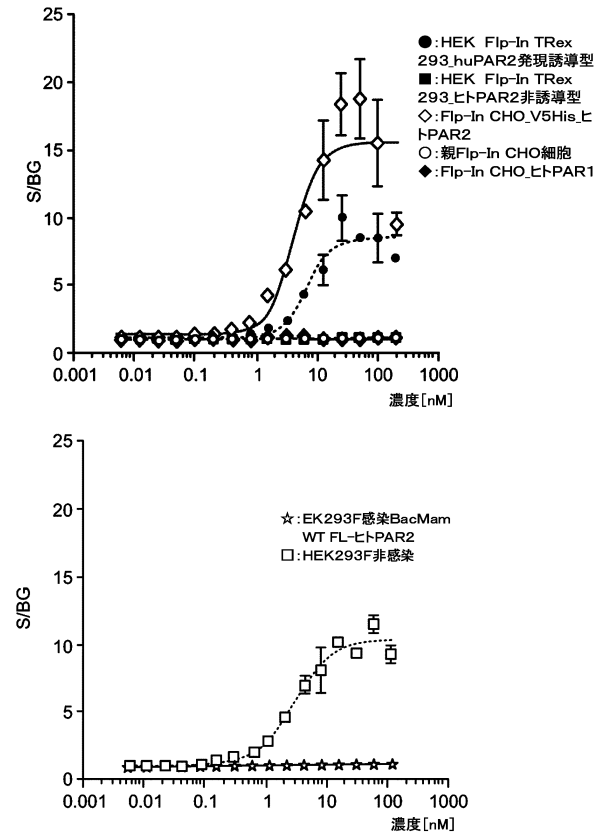
【図 4 - 2】



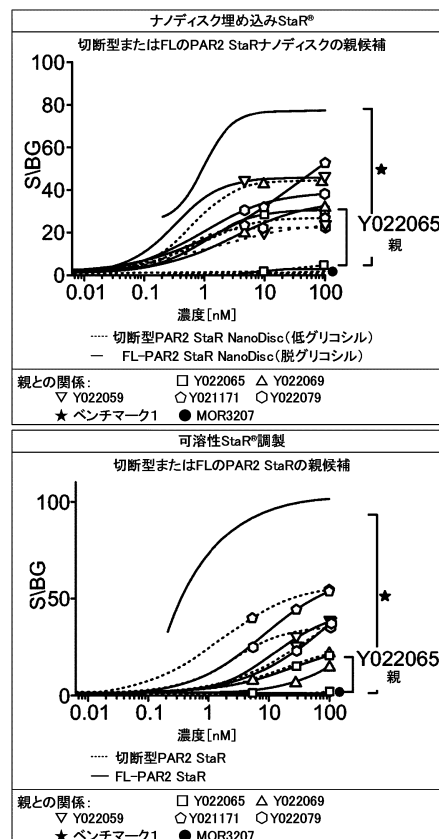
【図 6】



【図 5】



【図 7】



10

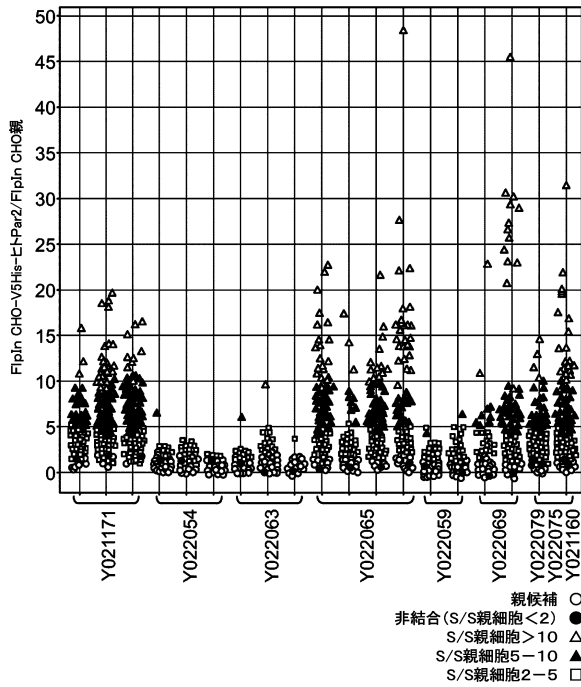
20

30

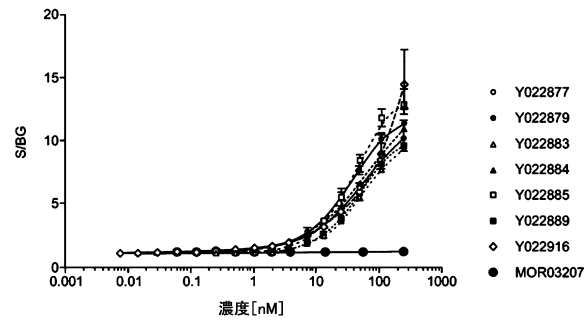
40

50

【図 8】



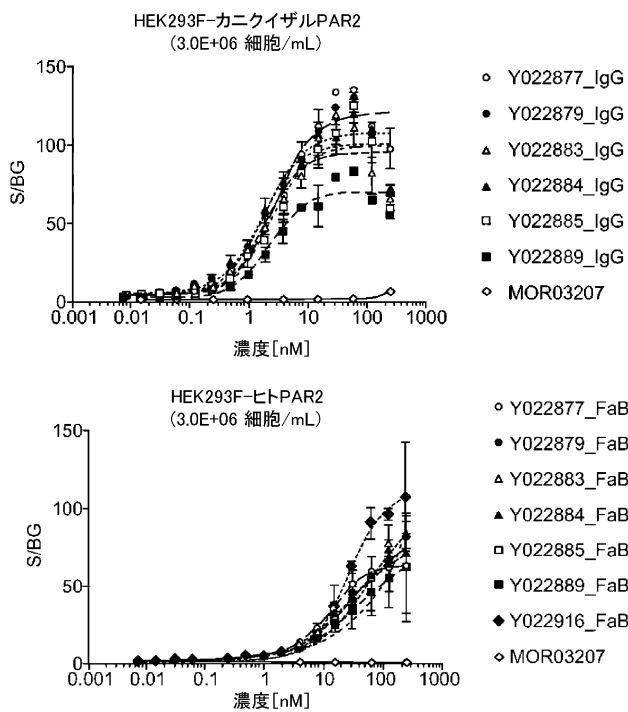
【図 9】



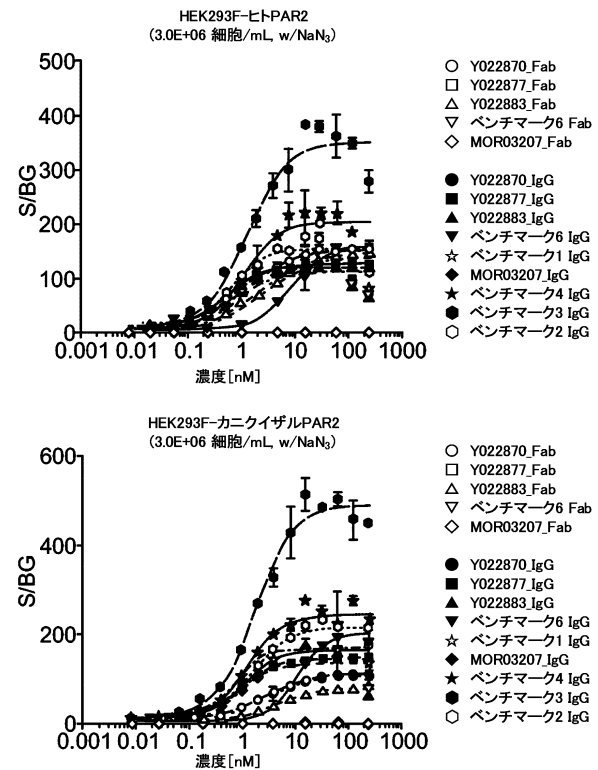
10

20

【図 10】



【図 11】

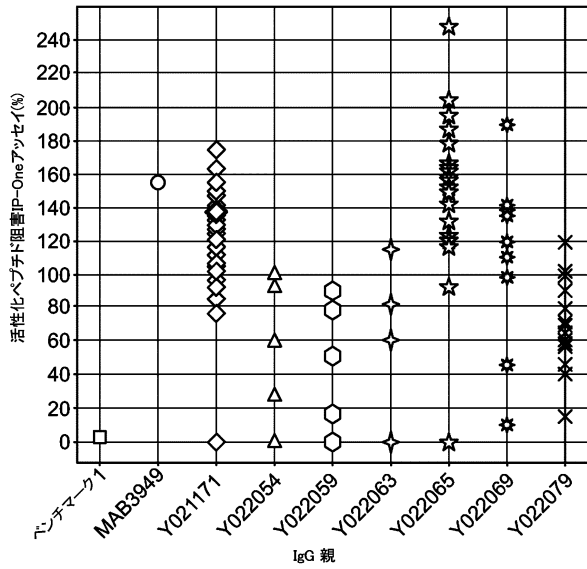


30

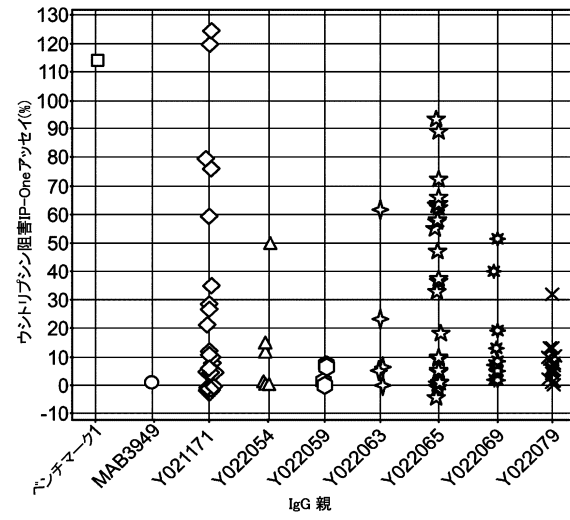
40

50

【図 1 2】

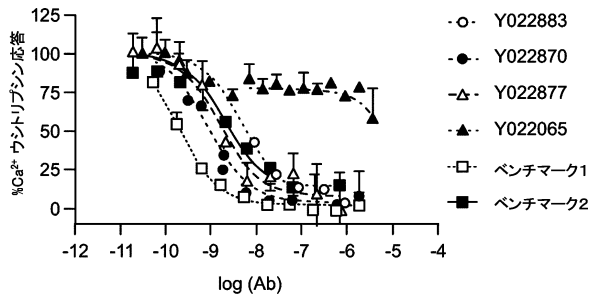


【図 1 3】

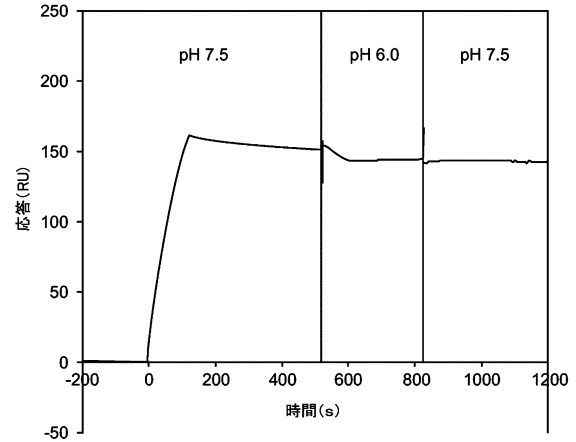


10

【図 1 4】



【図 1 5】



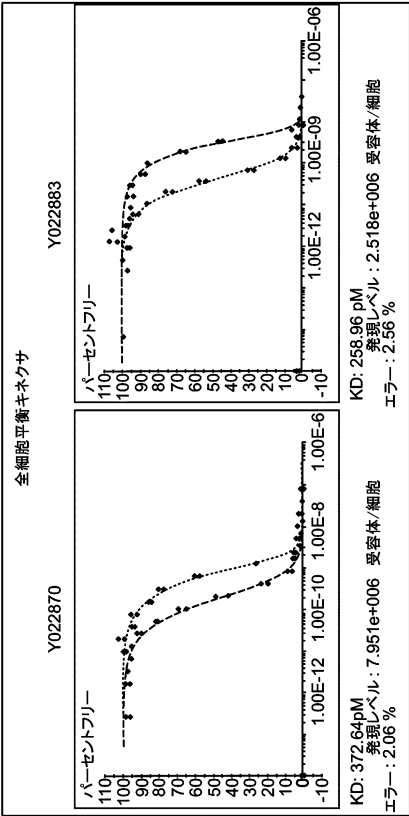
20

30

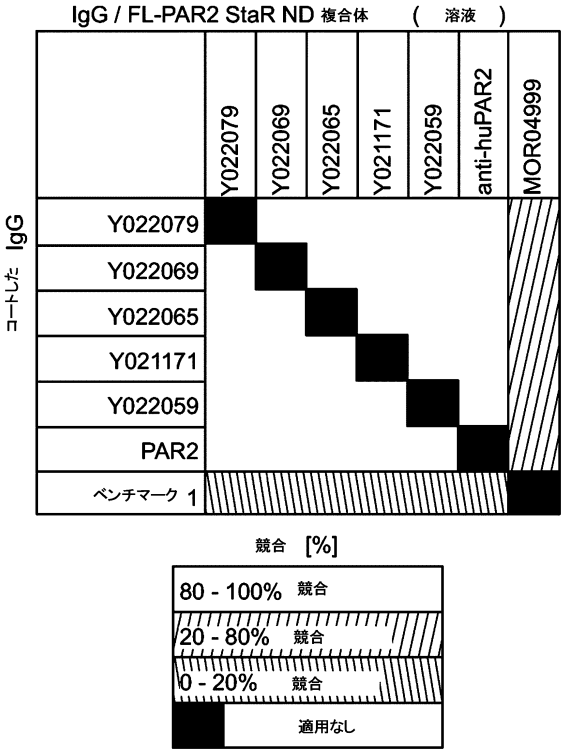
40

50

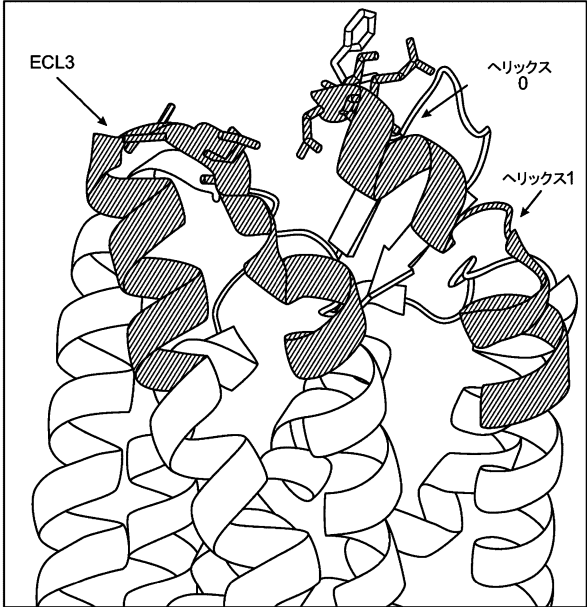
【図 1 6】



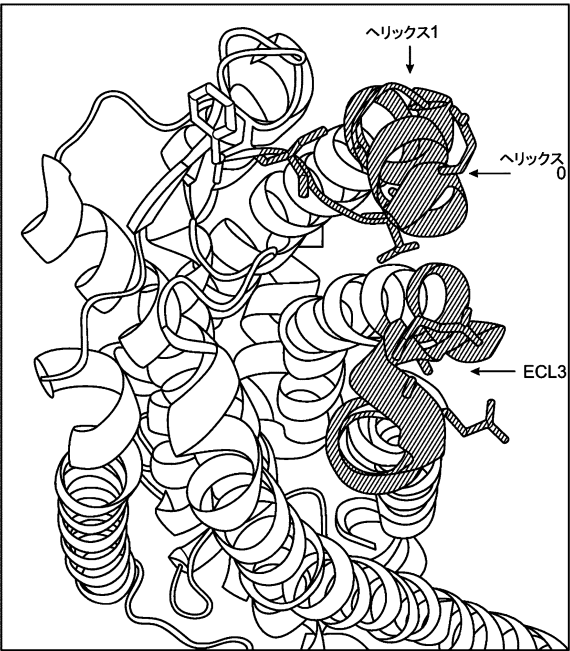
【図 1 7】



【図 1 8】



【図 1 9】



10

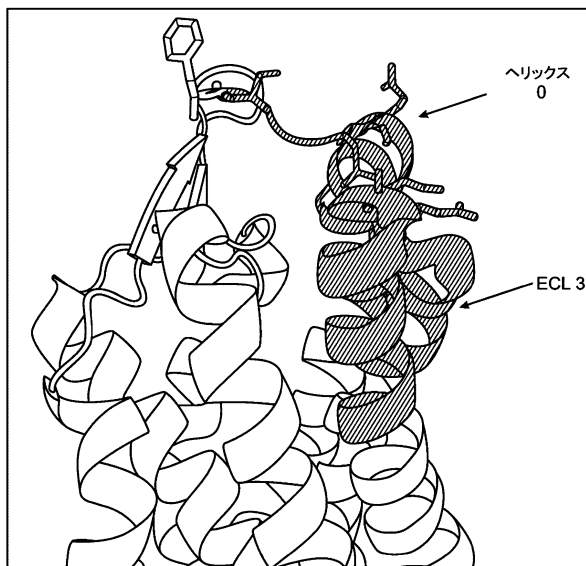
20

30

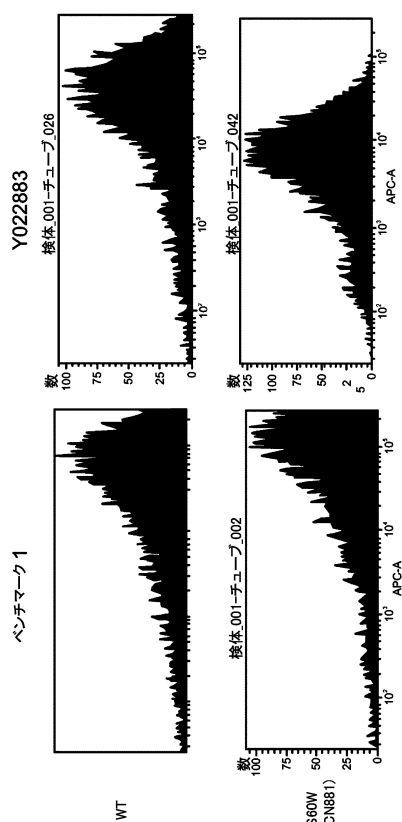
40

50

【図 20】



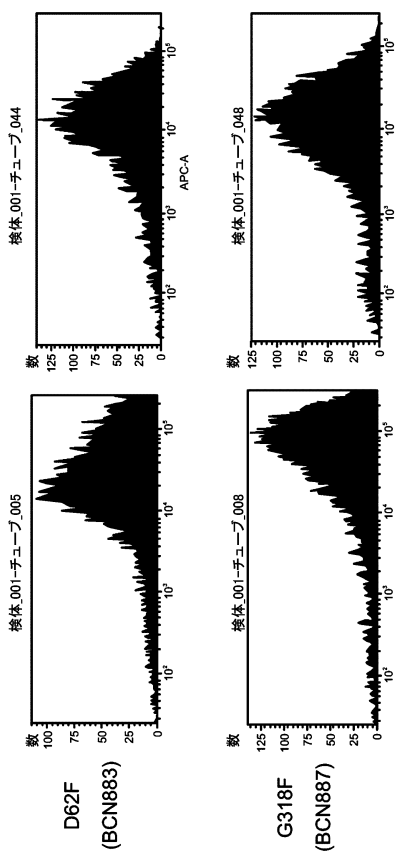
【図 21-1】



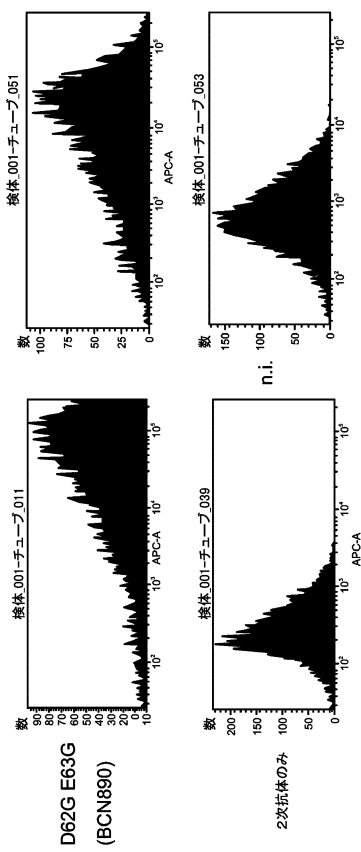
10

20

【図 21-2】



【図 21-3】

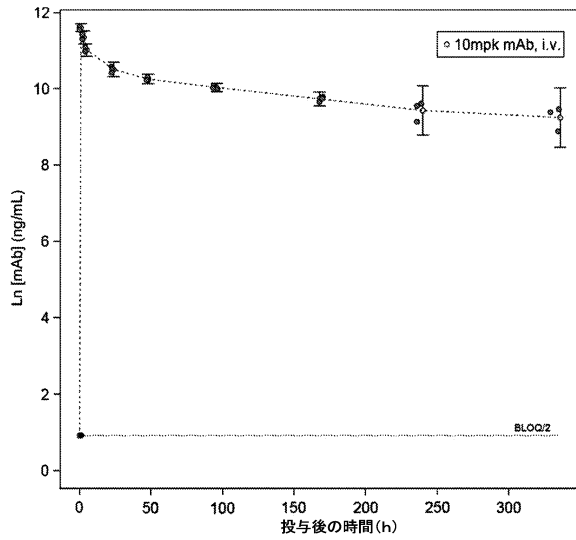


30

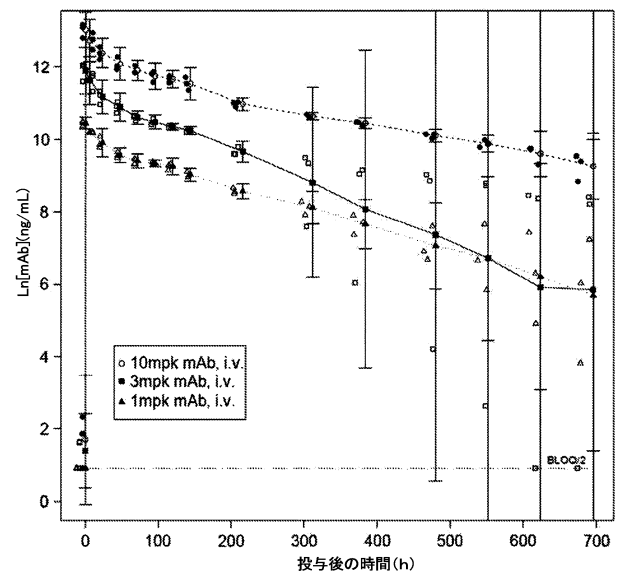
40

50

【図 2 2】

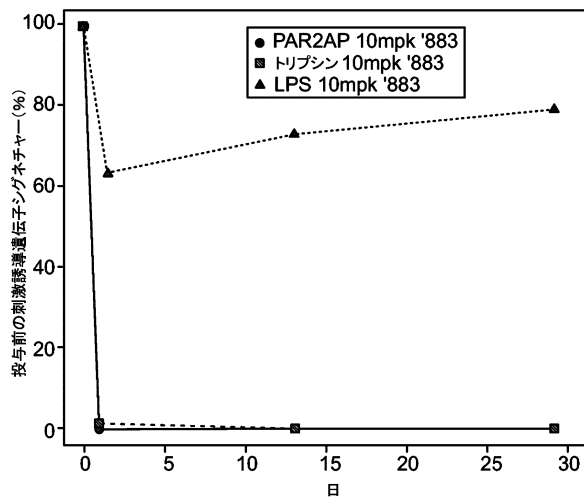


【図 2 3】

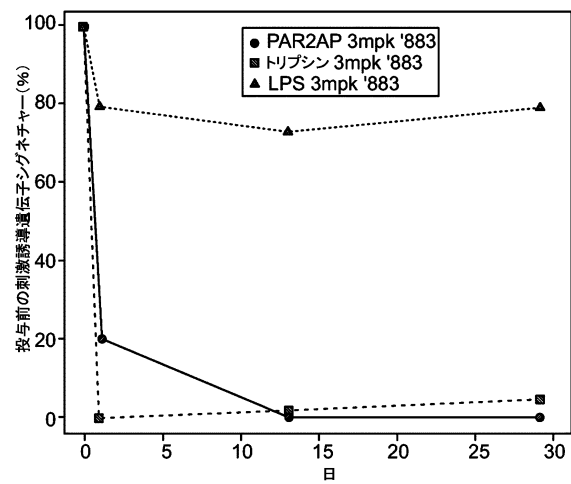


10

【図 2 4】



【図 2 5】



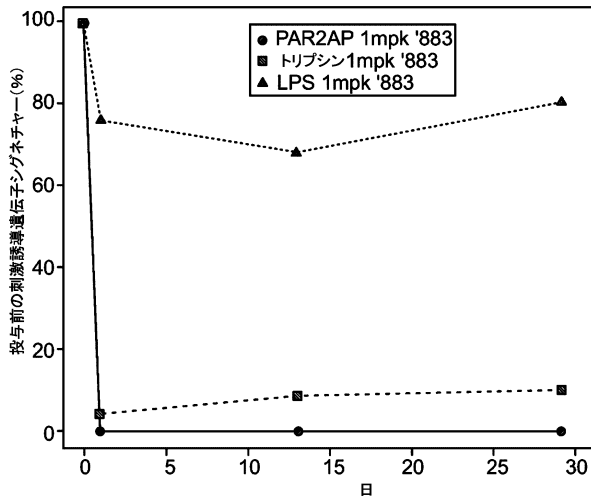
20

30

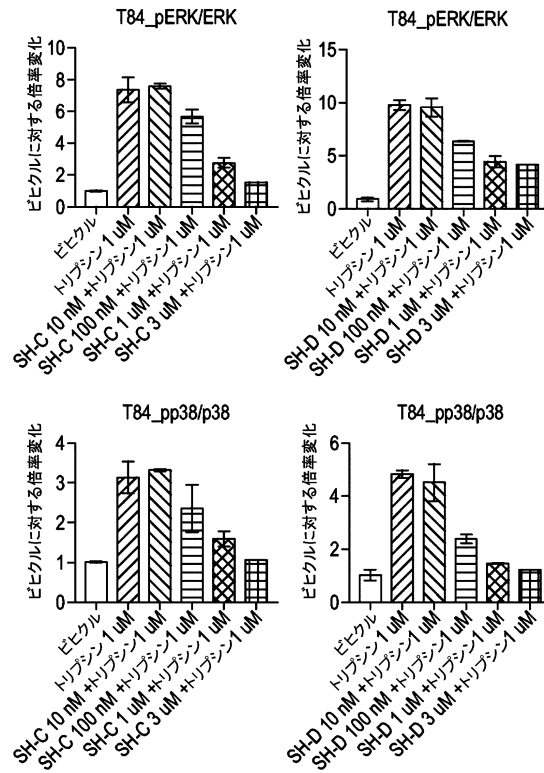
40

50

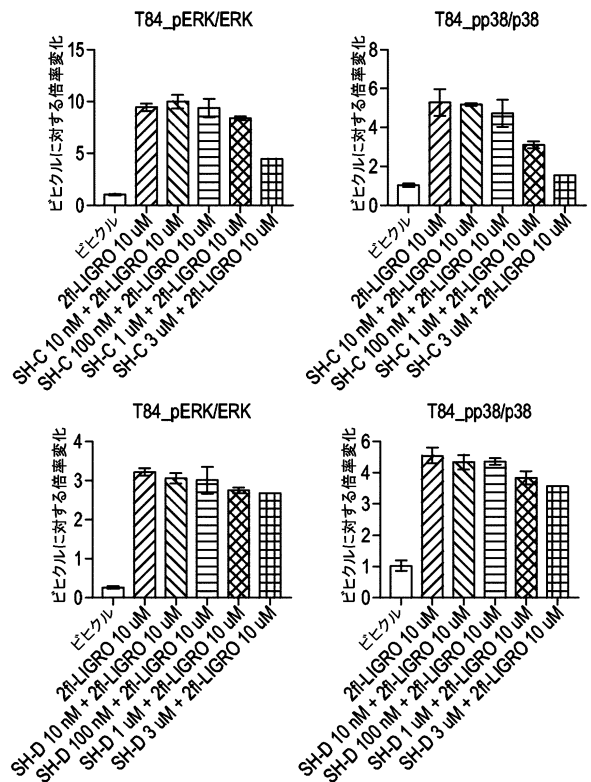
【図 26】



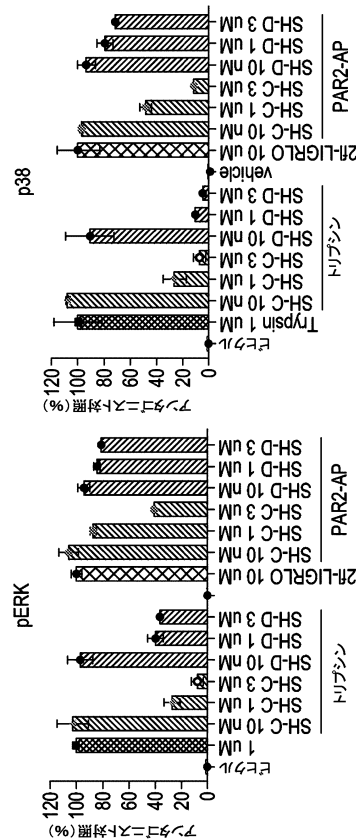
【図 27】



【図 28】



【図 29】



10

20

30

40

50

【配列表】

2025510815000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2023/050760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROBERT K. Y. CHENG ET AL: "Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2", NATURE, vol. 545, no. 7652, 4 May 2017 (2017-05-04), pages 112-115, XP055389810, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature22309 the whole document	1, 2, 31
A	-----	9-29, 52-59
A	WO 2007/092640 A2 (AMGEN INC [US]; VIRCA GEORGE DUKE [US]; HU SHAW-FEN SYLVIA [US]) 16 August 2007 (2007-08-16) ----- -/--	9-29, 52-59

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2023

Date of mailing of the international search report

30/06/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, Ivo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2023/050760

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2023/050760**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2023 /050760

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 3-8, 30, 32-51, 60, 61(completely); 1, 2, 9-29, 31, 52-59(partially)

See WOISA, ITEM III.

Aside from problems of novelty and unity of invention, the claims so lack conciseness, clarity, support and disclosure that a meaningful search is not possible. In view of this, the search is restricted to:

- Claims 1, 2, 31 (not novel, see ITEM V)
- Claims 24-29, restricted to the precise CDRs, without mutations.
- Claims 9-23, deemed dependent on claims 24-29 restricted as per above
- Claims 52-59, dependent on claims 24-29 // 9-23

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2023/050760

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/031695 A1 (REGENERON PHARMA [US]; MACDONALD LYNN [US] ET AL.) 17 March 2011 (2011-03-17) -----	9-29, 52-59
A	WO 2022/040345 A1 (CEPHALON INC [US]) 24 February 2022 (2022-02-24) -----	9-29, 52-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2023/050760

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007092640 A2	16-08-2007	AU 2007212195 A1	16-08-2007
		CA 2638849 A1	16-08-2007
		EP 1981913 A2	22-10-2008
		ES 2476892 T3	15-07-2014
		JP 5255453 B2	07-08-2013
		JP 2009525758 A	16-07-2009
		US 2007237759 A1	11-10-2007
		US 2011165171 A1	07-07-2011
		US 2013189281 A1	25-07-2013
		WO 2007092640 A2	16-08-2007
WO 2011031695 A1	17-03-2011	AR 078346 A1	02-11-2011
		AU 2010292342 A1	03-05-2012
		BR 112012005338 A2	22-11-2016
		CA 2773541 A1	17-03-2011
		CN 102574923 A	11-07-2012
		CY 1118714 T1	12-07-2017
		DK 2475684 T3	06-03-2017
		EP 2475684 A1	18-07-2012
		ES 2609780 T3	24-04-2017
		HK 1166509 A1	02-11-2012
		HR P20170324 T1	21-04-2017
		HU E031725 T2	28-08-2017
		IL 218501 A	30-03-2017
		JO 3246 B1	08-03-2018
		JP 5832435 B2	16-12-2015
		JP 6055055 B2	27-12-2016
		JP 2013504577 A	07-02-2013
		JP 2015227381 A	17-12-2015
		KR 20120059611 A	08-06-2012
		LT 2475684 T	25-01-2017
		MY 159551 A	13-01-2017
		NZ 599204 A	30-05-2014
		PL 2475684 T3	28-04-2017
		PT 2475684 T	10-02-2017
		SG 178976 A1	27-04-2012
		SM T201700102 B	08-03-2017
		TW 201121565 A	01-07-2011
		US 2011059095 A1	10-03-2011
		US 2012093824 A1	19-04-2012
		US 2014179903 A1	26-06-2014
		UY 32883 A	31-03-2011
		WO 2011031695 A1	17-03-2011
		ZA 201201730 B	28-11-2012
WO 2022040345 A1	24-02-2022	AU 2021328375 A1	13-04-2023
		CA 3192208 A1	24-02-2022
		CO 2023003208 A2	17-03-2023
		EP 4200018 A1	28-06-2023
		KR 20230048439 A	11-04-2023
		TW 202227489 A	16-07-2022
		US 2022056125 A1	24-02-2022
		WO 2022040345 A1	24-02-2022

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
			A 6 1 P	19/00	
			A 6 1 K	45/00	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW ,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL ,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

6ディージー, グレイト アビントン, グランタ パーク, スタインメッツ ビルディング, ヘプタレス セラピューティックス リミテッド内

(72)発明者 シュレンカー, オリバー

イギリス国 ケンブリッジ シービー2 1 6ディージー, グレイト アビントン, グランタ パーク, スタインメッツ ビルディング, ヘプタレス セラピューティックス リミテッド内

(72)発明者 オクラザ, クシシトフ

イギリス国 ケンブリッジ シービー2 1 6ディージー, グレイト アビントン, グランタ パーク, スタインメッツ ビルディング, ヘプタレス セラピューティックス リミテッド内

(72)発明者 ジューコフ, アンドレイ

イギリス国 ケンブリッジ シービー2 1 6ディージー, グレイト アビントン, グランタ パーク, スタインメッツ ビルディング, ヘプタレス セラピューティックス リミテッド内

(72)発明者 シュミット, アニカ

ドイツ 8 2 1 5 2 プラネック ゼンメルヴァイシュトラセ7, モルフォシス・アーゲー内

(72)発明者 クラウス, アレクサンドラ

ドイツ 8 2 1 5 2 プラネック ゼンメルヴァイシュトラセ7, モルフォシス・アーゲー内

(72)発明者 リューレ, ドロティー

ドイツ 8 2 1 5 2 プラネック ゼンメルヴァイシュトラセ7, モルフォシス・アーゲー内

F ターム (参考) 4C084 AA19 MA02 NA05 ZA081 ZA082 ZA211 ZA212 ZA331 ZA332 ZA591

ZA592 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZA961 ZA962 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112
ZB131 ZB132 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZC75

4C085 AA13 AA14 BB11 CC01 DD62 EE01 EE03 GG02

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74