

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7248588号
(P7248588)

(45)発行日 令和5年3月29日(2023.3.29)

(24)登録日 令和5年3月20日(2023.3.20)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	38/16 (2006.01)	F I	A 6 1 K	38/16	Z N A
A 6 1 K	38/55 (2006.01)		A 6 1 K	38/55	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)		A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)		A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 1 1

請求項の数 10 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-556809(P2019-556809)
 (86)(22)出願日 平成30年4月20日(2018.4.20)
 (65)公表番号 特表2020-517628(P2020-517628
 A)
 (43)公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/028637
 (87)国際公開番号 WO2018/195472
 (87)国際公開日 平成30年10月25日(2018.10.25)
 審査請求日 令和3年4月20日(2021.4.20)
 (31)優先権主張番号 62/488,515
 (32)優先日 平成29年4月21日(2017.4.21)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウエイ 1
 (74)代理人 110002077
 園田・小林弁理士法人
 ドレッセン, エイミー
 (72)発明者 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウエイ 1, シー/オー
 ジェネンテック インコーポレイテッド
 イーアエア, デーヴィッド ピー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 疾患の治療のためのK L K 5 アンタゴニストの使用

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

喘息を治療するための医薬であって、K L K 5 アンタゴニストを含み、前記K L K 5 アンタゴニストがS P I N K F c 融合ポリペプチドであり、前記S P I N K F c 融合ポリペプチドが、S P I N K 5 またはS P I N K 9 からの1つ以上のドメインを含み、S P I N K 5 からの前記1つ以上のドメインが、配列番号15、17、及び20からなる群から選択される配列を含み、S P I N K 9 からの前記1つ以上のドメインが、配列番号28の配列を含む、医薬。

【請求項2】

喘息を治療するための医薬であって、K L K 5 の活性を阻害するS P I N K F c 融合ポリペプチドを含み、前記S P I N K F c 融合ポリペプチドが、S P I N K 5 またはS P I N K 9 からの1つ以上のドメインを含み、S P I N K 5 からの前記1つ以上のドメインが、配列番号15、17、及び20からなる群から選択される配列を含み、S P I N K 9 からの前記1つ以上のドメインが、配列番号28の配列を含む、医薬。

【請求項3】

喘息を治療するための薬学的製剤であって、薬学的に活性な量のS P I N K F c 融合ポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含み、前記S P I N K F c 融合ポリペプチドが、K L K 5 の活性を阻害し、前記S P I N K F c 融合ポリペプチドが、S P I N K 5 またはS P I N K 9 からの1つ以上のドメインを含み、S P I N K 5 からの前記1つ以上のドメインが、配列番号15、17、及び20からなる群から選択される配列を含み、S

PINK9からの前記1つ以上のドメインが、配列番号28の配列を含む、薬学的製剤。

【請求項4】

前記SINKFc融合ポリペプチドが、SINK5からの前記1つ以上のドメインを含む、請求項1若しくは2に記載の医薬または請求項3に記載の薬学的製剤。

【請求項5】

SINK5からの前記1つ以上のドメインが、配列番号15及び20からなる群から選択される配列を含む、請求項4に記載の医薬または薬学的製剤。

【請求項6】

SINK5からの前記1つ以上のドメインが、配列番号13、14、18、及び19からなる群から選択される配列を含む、請求項5に記載の医薬または薬学的製剤。

10

【請求項7】

前記SINKFc融合ポリペプチドが、SINK9からの前記1つ以上のドメインを含む、請求項1若しくは2に記載の医薬または請求項3に記載の薬学的製剤。

【請求項8】

SINK9からの前記1つ以上のドメインが、配列番号26及び27からなる群から選択される配列を含む、請求項7に記載の医薬または薬学的製剤。

【請求項9】

前記1つ以上のドメインが、マウスまたはヒト由来である、請求項1、2及び4～8のいずれか1項に記載の医薬または請求項3～8のいずれか1項に記載の薬学的製剤。

【請求項10】

KLK5の活性を少なくとも約50%阻害する、請求項1、2及び4～9のいずれか1項に記載の医薬または請求項3～9のいずれか1項に記載の薬学的製剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年4月21日に出願された米国仮特許出願第62/488,515号の優先権を主張し、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

30

本出願には、ASCI形式にて電子的に提出されており、その全体が参考することにより本明細書に組み込まれる配列表を含む。2018年4月11日に作成された上記ASCIコピーは、P34247-WO_SL.txtという名称であり、93キロバイトのサイズである。

【0003】

本明細書に提供されるものは、対象を治療する方法、対象の応答を予測する方法、及び喘息またはネザートン症候群などのKLK5と関連する疾患に罹患している対象を選択する方法である。特に、本明細書に提供されるものは、喘息またはネザートン症候群の治療または診断のためのKLK5アンタゴニスト、例えば、抗体または結合ポリペプチド、ならびにそれを含む薬学的製剤の使用である。

40

【背景技術】

【0004】

喘息は、遺伝的及び環境リスク因子の両方と関連する臨床的に異質の障害である。喘息双生児研究からの遺伝率の推定値は、35%から80%まで変動し、遺伝的リスクの重要な役割を示す。例えば、Ullemar et al., Allergy 71, 230-238 (2016) を参照されたい。喘息及び喘息関連表現型についていくつかの大規模GWASが行われ、ORMDL3、IL13、IL1RL1、及びTSLP遺伝子の近くのものなど特定された遺伝子座の多くが複数の研究集団において確認された。例えば、Bonnelykke et al., Nat Genet 46, 51-55 (2014) を参照されたい。これらの研究は、疾患の遺伝的基礎及び喘息の病態生理の両方を補足し

50

たが、公開 G W A S によって特定される一般的な変異型は、全体的な遺伝的リスクをほとんど説明しない。「失われた遺伝率」のこの概念は、深く議論及び討論され、遺伝子間相互作用を検出する能力の低さ、制限された構造変異分析、及び珍しい変異の潜在的な貢献を含むいくつかの因子ためであると仮定されている。Manolio et al., Nature 461, 747 - 753 (2009) を参照されたい。一般的な疾患に対する遺伝的素因を解明するための別の戦略は、表現型的に類似する下位群の選択によるものであり、我々は喘息の遺伝的構造をより包括的に理解することを目指しているので、この戦略は有用であることが示されている。Bonneleykke and Ober, J Allergy Clin Immunol 137, 667 - 679 (2016) を参照されたい。喘息患者における全体的なリスクに影響を及ぼす遺伝子は、別個の独立した生物学的プロセスに寄与し得、これらはまとめる疾患転帰に影響を及ぼす。亜表現型決定による研究集団の均質化は、試料サイズを低減しながら、その患者サブセットにおいて改良される変異型を明らかにし得る。

【0005】

2型炎症のいくつかのバイオマーカーは、疾患が2型炎症によって誘導される喘息患者を定義するのに有効であることが示された。Wan, and Woodruff. Immunol Allergy Clin North Am 36, 547 - 557 (2016) を参照されたい。これらのバイオマーカーから得られた知識は、2型炎症誘導疾患有する喘息患者において改善された有効性を示す新規治療の特定をもたらした。Corren et al., N Engl J Med 365, 1088 - 1098 (2011) を参照されたい。しかしながら、低2型喘息の周辺の知識が不足しており、これらの患者は、進行する重度喘息における満たされていない医学的必要性の大部分を含む可能性が高い。例えば、Arron et al., Clin Immunol 161, 11 - 22 (2015) を参照されたい。

【0006】

下流2型バイオマーカーのうちの1つ、ペリオスチンは、気管支上皮細胞及び肺線維芽細胞から分泌され、IL-13を含む、Th2サイトカインによって誘導可能である。Takayama et al., J Allergy Clin Immunol 118, 98 - 104 (2006) を参照されたい。ペリオスチンは、高レベルの治療前血清ペリオスチンを有する患者について改良された抗IL-13（レブリキズマブ）臨床応答の予測バイオマーカーであり、反対に、低レベルの治療前血清ペリオスチンを有する患者は、顕著に低い臨床的有益性を得た。Corren et al., N Engl J Med 365, 1088 - 1098 (2011) を参照されたい。末梢ペリオスチンレベルは異なる治療応答を有する喘息患者の部分集団を定義するのに有効であるので、我々は、このバイオマーカーは異質の喘息研究集団を層化し、遺伝的研究における能力を増加させることもできると仮定した。ほとんどの喘息 G W A S は、2型炎症状態を問わず喘息患者集団に注目した。

【0007】

喘息は、可逆性気道閉塞、気管支過敏症、及び気道炎症によって特徴付けられる広範囲の呼吸器関連症状を特定する。喘息重症度は患者間で大きく変動し、患者間の疾患分子異質性は十分に文書化されている。喘息、特に低レベルの2型気道炎症を伴う中等度～重度喘息の改善した治療の必要性がある。

【発明の概要】

【0008】

本明細書に提供されるものは、対象における喘息を治療するための方法であり、有効量のK L K 5 アンタゴニストを対象に投与することを含む。

【0009】

本明細書にさらに提供されるものは、喘息に罹患している対象のK L K 5 アンタゴニストを含む治療への応答を予測する方法であり、方法は、(a) 対象からの生物学的試料中のK L K 5 レベルを測定することと、(b) 試料中で検出されたK L K 5 レベルを参照レ

10

20

30

40

50

ベルと比較することと、(c)試料中で測定されたK L K 5 レベルが参照レベルと比較して上昇している場合に対象が治療に応答するであろうと予測し、試料中で測定されたK L K 5 レベルが参照レベルと比較して低減している場合に対象が治療に応答しないであろうと予測することと、を含む。

【0010】

本明細書にさらに提供されるものは、K L K 5 アンタゴニストを含む治療について喘息に罹患している対象を選択する方法であり、対象からの生物学的試料中のK L K 5 ゲノム配列中に位置する遺伝的変異の存在または不在を決定することを含み、遺伝的変異の存在は、対象がK L K 5 アンタゴニストでの治療に適していることを示す。

【0011】

本明細書にさらに提供されるものは、喘息に罹患している対象がK L K 5 アンタゴニストでの治療に適していることを示すK L K 5 ゲノム配列中の遺伝的変異の存在または不在を検出するための方法であり、(a)対象からの試料を、K L K 5 ゲノム配列中に位置する遺伝的変異の存在または不在を検出することができる試薬と接触させることと、(b)遺伝的変異の存在または不在を決定することと、を含み、遺伝的変異の存在は、対象がK L K 5 アンタゴニストでの治療に適していることを示す。

【0012】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、K L K 5 の上昇したレベルと関連している。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、好中球の上昇したレベルと関連している。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、低2型喘息、低ペリオストン喘息、及び低好酸球喘息からなる群から選択される。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、ネザートン症候群と関連していない。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、S P I N K 5 の低減した活性と関連している。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、S P I N K 5 をコードする遺伝子またはその遺伝子産物における1つ以上の遺伝的変異と関連していない。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息のための対象の治療は、遺伝的変異の存在または不在に基づく。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、K L K 5 ゲノム配列中に位置する遺伝的変異と関連している。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、S N P である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、S N P r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 である。

【0013】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 の活性部位に結合することによってK L K 5 を阻害する。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、完全長のプロセシングされていないK L K 5 の108、147、150、153、168、及び245位のアミノ酸残基からなる群から選択される、すなわち、シグナルペプチドを含む、K L K 5 のアミノ酸残基のうちの1つ以上を含む結合領域に結合することによってK L K 5 を阻害する。方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 のセリンプロテアーゼ活性を阻害する。

【0014】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体、結合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及び小分子からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、完全長Ig G 1 抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、約50 μM ~ 1 μM未満、約1 μM ~ 500 nM未満、約500 nM ~ 1000 nM未満、約1000 nM ~ 10 nM未満、約10 nM ~ 1 nM未満、または約1000 pM ~ 100 pM未満のI C 50 を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、約10 nM ~ 1 nM未満のI C 50 を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、約2 nM ~ 1 nM未満のI C 50 を有する。いくつかの実施形態では、I C 50 は、本明細書に記載される直接アッセイまたは結合アッセイによって決定

10

20

30

40

50

される。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、結合ポリペプチドは、K L K 5 結合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、K L K 5 結合ポリペプチドは、融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、融合ポリペプチドは、S P I N K 融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、融合ポリペプチドは、S P I N K F c 融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、融合ポリペプチドは、S P I N K F c 融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、S P I N K F c 融合ポリペプチドは、S P I N K 5 の 1 つ以上のドメインを含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の 1 つ以上のドメインは、配列番号 17 (E 4 2 1 - A 6 9 5) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、配列番号 22 (M 2 9 3 - R 3 5 5) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、マウス由来である。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の 1 つ以上のドメインは、配列番号 15 (E 4 9 0 - Y 7 5 7) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、配列番号 20 (R 2 9 1 - R 3 5 2) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、ヒト由来である。いくつかの実施形態では、S P I N K F c 融合ポリペプチドは、S P I N K 9 の 1 つのドメインを含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 の 1 つのドメインは、配列番号 28 (I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 の 1 つのドメインは、ヒト由来である。

10

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、小分子は、プロテアーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ阻害剤は、ロイペプチドである。

【 0 0 1 7 】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、試料は、気管支肺胞洗浄、肺実質、気管支上皮下、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗からなる群から選択される。

【 0 0 1 8 】

本明細書にさらに提供されるものは、喘息の療法及び／または治療を含む医学的治療または診断における使用のためのK L K 5 アンタゴニストである。

20

【 0 0 1 9 】

本明細書にさらに提供されるものは、S P I N K 融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、S P I N K 融合ポリペプチドは、S P I N K F c 融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、S P I N K F c 融合ポリペプチドは、K L K 5 の活性を阻害する。いくつかの実施形態では、S P I N K F c 融合ポリペプチドは、S P I N K 5 の 1 つ以上のドメインを含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の 1 つ以上のドメインは、配列番号 17 (E 4 2 1 - A 6 9 5) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、配列番号 22 (M 2 9 3 - R 3 5 5) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、マウス由来である。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の 1 つ以上のドメインは、配列番号 15 (E 4 9 0 - Y 7 5 7) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、配列番号 20 (R 2 9 1 - R 3 5 2) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 からの 1 つ以上のドメインは、ヒト由来である。いくつかの実施形態では、S P I N K F c 融合ポリペプチドは、S P I N K 9 の 1 つのドメインを含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 の 1 つのドメインは、配列番号 28 (I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E) を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 の 1 つのドメインは、ヒト由来である。

40

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、S P I N K 融合ポリペプチドは、約 5 0 μM ~ 1 μM 未満、約 1 μM ~ 5 0 0 nM 未満、約 5 0 0 nM ~ 1 0 0 nM 未満、約 1 0 0 nM ~ 1 0 nM 未

50

満、約 10 nM ~ 1 nM 未満、または約 1000 pM ~ 100 pM 未満の I C₅₀ を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 融合ポリペプチドは、約 10 nM ~ 1 nM 未満の I C₅₀ を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 融合ポリペプチドは、約 3 nM ~ 1 nM 未満の I C₅₀ を有する。いくつかの実施形態では、I C₅₀ は、本明細書に記載される直接アッセイまたは結合アッセイによって決定される。

【0021】

本明細書にさらに提供されるものは、K L K 5 と関連する疾患の療法及び／または治療を含む医学的治療または診断における使用のための本明細書に記載される S P I N K 融合ポリペプチドである。

【0022】

本明細書にさらに提供されるものは、薬学的に活性な量の本明細書に記載される S P I N K 融合ポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的製剤である。

【0023】

本明細書にさらに提供されるものは、有効量の本明細書に記載される S P I N K 融合ポリペプチドを対象に投与することを含む、対象において K L K 5 と関連する疾患を治療するための方法である。

【0024】

S P I N K 融合ポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 と関連する疾患は、対象の試料中の K L K 5 の上昇したレベルと関連している。いくつかの実施形態では、K L K 5 と関連する疾患は、対象の試料中の好中球の上昇した数と関連している。いくつかの実施形態では、K L K 5 と関連する疾患は、ネザートン症候群である。いくつかの実施形態では、試料は、気管支肺胞洗浄、肺実質、及び気管支上皮下からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】高ペリオスチン（図1A）及び低ペリオスチン（図1B）下位群の対照との比較。遺伝子座を改良コホートによってプロットした。8つの遺伝子座は、識別可能な差異を示さず、図示されない。各遺伝子座について、O R をプロットし、対照比較の場合におけるP値を挙げた。

【図2】マンハッタンプロットの形態のメタ分析におけるゲノムワイド関連結果の要約を示す。667人の成人非2型炎症喘息患者及び1,887人の対照におけるゲノムワイド単一変異型分析を行った。P < 5 × 10⁻⁸ のゲノムワイド有意水準は、上の線（「X」の印をつけた）によって示され、示唆的有意性（P < 1 × 10⁻⁵）は、下の線（「XX」の印をつけた）によって示された。

【図3】19番染色体上のK L K 遺伝子座の結果をまとめた L o c u s Z o o m 3 9 プロット。変異型を、それらの間の連鎖不平衡の程度及び r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 、領域における最も強い関連の S N P によって色コードで区別した。

【図4】ペリオスチンレベルとは関係なく喘息気管支肺胞洗浄において増加したK L K 5 。図4A）健常ボランティアまたは重度の喘息患者の気管支肺胞洗浄におけるK L K 5 結合ポリペプチドのレベル、図4B）重度の喘息患者におけるK L K 5 のレベルと予測 F E V 1 値との関連。

【図5A】組換えK L K 5 は、肺好中球溢出及び肺上皮サイトカイン産出を誘導する。W T または S A 变異体 K L K 5 （マウスあたり 2 μg）をマウスに鼻腔内送達し、（L y 6 G + C D 1 1 b + 細胞によって定量化される）好中球数をフローサイトメトリー分析によって定量化した。

【図5B】組換えK L K 5 は、肺好中球溢出及び肺上皮サイトカイン産出を誘導する。肺上皮細胞を、2 μg / ml の S A 变異体もしくは W T で、または 10 μg の S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドの存在下で処理した。T s 1 p 、T n f a 、I L - 8 、及び I c a m 1 の転写物を、リアルタイム R T - P C R によって定量化した。

【図6 - 1】組換えK L K 5 活性は、S P I N K F c 融合ポリペプチドによって直接ア

10

20

30

40

50

ッセイにおいて阻害される。K L K 5を、蛍光基質、B o c - V P R - A M Cの添加前に、S P I N K 5 M 2 9 3 - R 3 5 5(図6A)、S P I N K 5 E 4 2 1 - A 6 9 5(図6B)、またはS P I N K 9(I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E) - F c(本明細書ではS P I N K 9 . S R E . F cとも呼ばれる)(図6C)と30分間プレインキュベートした。反応を、P H E R A s t a r(登録商標)P l u sリーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C 5 0パラメータを、それらのそれぞれの曲線の4パラメータフィットから決定した。

【図6 - 2】組換えK L K 5活性は、S P I N K F c融合ポリペプチドによって直接アッセイにおいて阻害される。K L K 5を、蛍光基質、B o c - V P R - A M Cの添加前に、S P I N K 5 M 2 9 3 - R 3 5 5(図6A)、S P I N K 5 E 4 2 1 - A 6 9 5(図6B)、またはS P I N K 9(I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E) - F c(本明細書ではS P I N K 9 . S R E . F cとも呼ばれる)(図6C)と30分間プレインキュベートした。反応を、P H E R A s t a r(登録商標)P l u sリーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C 5 0パラメータを、それらのそれぞれの曲線の4パラメータフィットから決定した。10

【図7】組換えK L K 5活性は、S P I N K F c融合ポリペプチドによってp r o - K L K 7結合アッセイにおいて阻害される。K L K 5を、p r o - K L K 7及び蛍光基質、S u c - L L V Y - A M C(配列番号29)の添加前に、S P I N K 5 M 2 9 3 - R 3 5 5(図7A)、S P I N K 5 E 4 2 1 - A 6 9 5(図7B)、またはS P I N K 9 . S R E . F c(図7C)と30分間プレインキュベートした。反応を、P H E R A s t a r(登録商標)P l u sリーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C 5 0パラメータを、それらのそれぞれの曲線の4パラメータフィットから決定した。20

【図8】組換えK L K 7活性は、S P I N K 9 . S R E . F cまたはm A b 1 1 0 8ではなく、S P I N K F c融合ポリペプチドによって部分的に阻害される。K L K 5を、p r o - K L K 7及び蛍光基質、S u c - L L V Y - A M C(配列番号29)の添加前に、S P I N K 5 M 2 9 3 - R 3 5 5(図8A)、S P I N K 5 E 4 2 1 - A 6 9 5(図8B)、S P I N K 9 . S R E . F c(図8C)、またはm A b 1 1 0 8(図8D)と50分間プレインキュベートした。反応を、P H E R A s t a r(登録商標)P l u sリーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C 5 0パラメータを、それらのそれぞれの曲線の4パラメータフィットから決定した。30

【図9】市販の抗体、m A b 1 1 0 8は、ヒトK L K 5の部分阻害剤である。2 0 n M(図9A)、1 0 n M(図9B)、5 n M(図9C)、及び2 . 5 n M(図9D)のK L K 5を、蛍光基質、B o c - V P R - A M Cの添加前に、m A b 1 1 0 8と30分間インキュベートした。反応を、P H E R A s t a r(登録商標)P l u sリーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C 5 0値を、それらの曲線の4パラメータフィットから決定した。40

【図10】S P I N K 9 . S R E . F c融合タンパク質は、直接アッセイにおけるK L K 5の強力な阻害剤である。K L K 5を、蛍光基質、B o c - V P R - A M Cの添加前に、S P I N K 9 . S R E . F c融合(図10A)またはm A b 1 1 0 8(図10B)と30分間インキュベートした。反応を、P H E R A s t a r(登録商標)P l u sリーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C 5 0パラメータを、それらのそれぞれの曲線の4パラメータフィットから決定した。

【図11】S P I N K 9 . S R E . F c融合タンパク質は、p r o - K L K 7結合アッセイにおけるK L K 5の強力な阻害剤である。p r o - K L K 7結合アッセイでは、K L K 5を、p r o - K L K 7及び蛍光基質、S u c - L L V Y - A M C(配列番号29)の添50

加前に、S P I N K 9 . S R E . F c 融合（図 11 A）または m A b 1 1 0 8（図 11 B）と 30 分間インキュベートした。反応を、P H E R A s t a r（登録商標）P l u s リーダーを使用して監視した。R F U / 秒の反応速度を、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。I C₅₀ 値を、それぞれの曲線の 4 パラメータフィットから決定した。

【図 12 - 1】S P I N K 9 . S R E . F c（図 12 A 及び 12 C）及び m A b 1 1 0 8（図 12 B 及び 12 D）は、p r o - K L K 7（図 12 A 及び 12 B）及び p r o - K L K 1（図 12 C 及び 12 D）からのシグナルペプチドの組換え K L K 5 開裂を用量依存的に阻害する。K L K 7 及び K L K 1 シグナルペプチドを L C / M S によって検出した。S P I N K 9 . S R E . F c または m A b 1 1 0 8 及び K L K 5 のプレインキュベーションを、5 nM の K L K 5 と 15 nM の p r o - K L K 7 との 2 時間のインキュベーションまたは 0 . 5 nM の K L K 5 と 3 0 0 nM（図 12 C）もしくは 3 5 5 nM（図 12 D）の p r o - K L K 1 との 20 分のインキュベーションに先立って行った。10

【図 12 - 2】S P I N K 9 . S R E . F c（図 12 A 及び 12 C）及び m A b 1 1 0 8（図 12 B 及び 12 D）は、p r o - K L K 7（図 12 A 及び 12 B）及び p r o - K L K 1（図 12 C 及び 12 D）からのシグナルペプチドの組換え K L K 5 開裂を用量依存的に阻害する。K L K 7 及び K L K 1 シグナルペプチドを L C / M S によって検出した。S P I N K 9 . S R E . F c または m A b 1 1 0 8 及び K L K 5 のプレインキュベーションを、5 nM の K L K 5 と 15 nM の p r o - K L K 7 との 2 時間のインキュベーションまたは 0 . 5 nM の K L K 5 と 3 0 0 nM（図 12 C）もしくは 3 5 5 nM（図 12 D）の p r o - K L K 1 との 20 分のインキュベーションに先立って行った。20

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書に提供されるものは、K L K 5 アンタゴニストを使用して治療する方法である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるものは、K L K 5 アンタゴニストを使用して喘息を治療する方法である。特に、本明細書に提供されるものは、有効量の K L K 5 アンタゴニストを対象に投与することによって喘息を治療する方法である。また本明細書に提供されるものは、対象の応答を予測する方法または K L K 5 における遺伝的変異の存在もしくは不在を検出することに基づいて K L K 5 アンタゴニストでの治療について喘息を有する対象を選択する方法である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるものは、K L K 5 アンタゴニストを使用してネザートン症候群を治療する方法である。特に、本明細書に提供されるものは、K L K 5 アンタゴニストを使用してネザートン症候群を治療する方法であり、K L K 5 アンタゴニストは、S P I N K 融合ポリペプチド（例えば、S P I N K F c 融合ポリペプチド）である。また本明細書に提供されるものは、喘息の治療または診断における使用のための K L K 5 アンタゴニスト及びそれを含む薬学的製剤である。30

【0027】

I . 定義

本明細書で使用される「K L K 5」及び「カリクレイン - 5」という用語は、別途示されない限り、靈長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源に由来する任意の天然 K L K 5 を指す。用語は、「完全長」のプロセシングされていない K L K 5、及び細胞におけるプロセシングから生じる K L K 5 の任意の形態を包含する。用語はまた、K L K 5 の天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。いくつかの実施形態では、例示的なヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 9 Y 3 3 7 である。いくつかの実施形態では、例示的なヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、配列番号 1、配列番号 3 (N 1 5 3 D 変異型)、配列番号 5 (G 5 5 R 変異型)、及び配列番号 7 (G 5 5 R、N 1 5 3 D 変異型) からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、例示的なヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 9 Y 3 3 7 のアミノ酸残基 2 3 - 2 9 3 (マイナスシグナルペプチド) であり、配列番号 2 に示される。いくつかの実施形態では、例40

10

20

30

40

50

示的なヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、配列番号 4 に示される N 1 5 3 D 変異型のアミノ酸残基 2 3 - 2 9 3 (マイナスシグナルペプチド) である。いくつかの実施形態では、例示的なヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、配列番号 6 に示される G 5 5 R 変異型のアミノ酸残基 2 3 - 2 9 3 (マイナスシグナルペプチド) である。いくつかの実施形態では、例示的なヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、配列番号 8 に示される G 5 5 R, N 1 5 3 D 変異型のアミノ酸残基 2 3 - 2 9 3 (マイナスシグナルペプチド) である。

【 0 0 2 8 】

以下のこの段落における番号付けは、完全長のプロセシングされていない K L K 5 に関する。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、1 5 3 位のアミノ酸 N を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、1 5 3 位のアミノ酸 D を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、5 5 位のアミノ酸 G を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、5 5 位のアミノ酸 R を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、5 5 位のアミノ酸 G 及び 1 5 3 位のアミノ酸 N を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、5 5 位のアミノ酸 G 及び 1 5 3 位のアミノ酸 D を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、5 5 位のアミノ酸 R 及び 1 5 3 位のアミノ酸 N を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 のアミノ酸配列は、5 5 位のアミノ酸 R 及び 1 5 3 位のアミノ酸 D を含む。

10

【 0 0 2 9 】

以下のこの段落における番号付けは、完全長のプロセシングされていない K L K 5 に関する。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、1 5 3 位の N をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、1 5 3 位の D をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、5 5 位の G をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、5 5 位の R をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、5 5 位の G 及び 1 5 3 位の N をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、5 5 位の G 及び 1 5 3 位の D をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、5 5 位の R 及び 1 5 3 位の N をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト K L K 5 の核酸配列は、5 5 位の R 及び 1 5 3 位の D をコードする配列を含む。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される「S P I N K 5」及び「セリンプロテアーゼ阻害剤カザール型 5」という用語は、別途示されない限り、靈長類(例えば、ヒト)及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源に由来する任意の S P I N K 5 を指す。用語は、「完全長」のプロセシングされていない S P I N K 5、及び細胞におけるプロセシングから生じる S P I N K 5 の任意の形態を包含する。用語はまた、S P I N K 5 の天然に存在する変異型、例えば、スライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。いくつかの実施形態では、例示的なヒト S P I N K 5 のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 9 N Q 3 8 であり、配列番号 9 に示される。いくつかの実施形態では、例示的なヒト S P I N K 5 のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 9 N Q 3 8 のアミノ酸残基 2 3 - 1 0 6 4 (マイナスシグナルペプチド) であり、配列番号 1 0 に示される。いくつかの実施形態では、例示的なマウス S P I N K 5 のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 5 K 5 D 4 であり、配列番号 1 1 に示される。いくつかの実施形態では、例示的なマウス S P I N K 5 のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 5 K 5 D 4 のアミノ酸残基 2 3 - 1 0 6 4 (マイナスシグナルペプチド) であり、配列番号 1 2 に示される。

30

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される「S P I N K 9」及び「セリンプロテアーゼ阻害剤カザール型 9」という用語は、別途示されない限り、靈長類(例えば、ヒト)及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源に由来する任意の S P I N K 9 を指す。用語は、「完全長」のプロセシングされていない S P I N K 9、及び細胞

40

50

におけるプロセシングから生じるS P I N K 9の任意の形態を包含する。用語はまた、S P I N K 9の天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。いくつかの実施形態では、例示的なヒトS P I N K 9のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 5 D T 2 1であり、配列番号23に示される。いくつかの実施形態では、例示的なヒトS P I N K 9のアミノ酸配列は、U N I P R O T Q 5 D T 2 1のアミノ酸残基20 - 86(マイナスシグナルペプチド)であり、配列番号24に示される。

【0032】

「K L K 5のアンタゴニスト」、「K L K 5アンタゴニスト」、「K L K 5の阻害剤」、または「K L K 5阻害剤」は、K L K 5の活性化または機能に干渉する、例えば、K L K 5によって媒介される生物活性を部分的にまたは完全に遮断、阻害、または中和する薬剤である。例えば、K L K 5のアンタゴニストは、K L K 5によって媒介される生物活性を部分的にまたは完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子を指し得る。K L K 5アンタゴニストの例には、抗体(例えば、抗K L K 5抗体)、結合ポリペプチド(例えば、S P I N K F c融合ポリペプチドなどのK L K 5結合ポリペプチド)、ポリヌクレオチド(例えば、短干渉R N A(s i R N A)またはクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートR N A(c r R N A及びt r a c r R N A配列を有するシングルガイドR N A(s g R N A)を含む、C R I S P R - R N Aまたはc r R N A)などのK L K 5ポリヌクレオチドアンタゴニスト)、及び小分子(例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などのK L K 5小分子アンタゴニスト)が含まれる。いくつかの実施形態では、アンタゴニストは、K L K 5に結合する抗体または小分子である。

10

【0033】

本明細書で同義に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、D N A及びR N Aを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、及び/またはそれらの類似体であっても、あるいはD N AもしくはR N Aポリメラーゼによってまたは合成反応によってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であってもよい。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体などの修飾されたヌクレオチドを含んでもよい。存在する場合には、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組立ての前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって遮られ得る。ポリヌクレオチドは、標識との抱合などによって、合成後にさらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上を類似体と置換する「キャップ」、ヌクレオチド間修飾、例えば、非電荷性結合(例えば、メチルホスホン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど)によるもの、及び電荷性結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)によるもの、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシンなど)の懸垂部分を含むもの、挿入剤(例えば、アクリジン、プソラーレンなど)によるもの、キレート剤(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾結合(例えば、アノマー核酸など)によるもの、ならびにポリヌクレオチド(複数可)の未修飾形態が含まれる。さらに、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基により代置されるか、標準的な保護基により保護されるか、もしくは活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を準備してもよく、または固体もしくは半固体支持体に抱合されてもよい。

20

5 及び3 末端O Hをリン酸化するか、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分と置換することができる。他のヒドロキシルもまた、標準的な保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドには、一般に当該技術分野において既知のリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むことができ、例えば、2-O-メチル、-2-O-アリル、2-O-フルオロ-または2-O-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、-O-アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、またはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び脱塩基ヌクレオシド類似体、例えば、メチルリボシドも含まれる。1つ以上のホスホジエステ

30

40

50

ル結合は、代替的な連結基によって代置されてもよい。これらの代替連結基には、限定されないが、リン酸塩がP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、「(O)NR₂(「アミデート」)、P(OR)、P(O)OR、CO、またはCH₂(「ホルムアセタール」)に置き換えられる実施形態が含まれ、各RまたはR'は、独立してHであるか、または任意にエーテル(-O-)結合を含む置換もしくは非置換アルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、もしくはアラルジルである。ポリヌクレオチド内の全ての結合が同一である必要はない。前述の説明は、RNA及びDNAを含む本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0034】

10

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、別途示されない限り、靈長類(例えば、ヒト)及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の目的の任意の天然ポリペプチド(例えば、KLK5、SPINK5、またはSPINK9)を指す。この用語は、「完全長」のプロセシングされていないポリペプチド、ならびに細胞内のプロセシングから生じるポリペプチドの任意の形態を包含する。この用語は、ポリペプチドの天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。

【0035】

本明細書で使用される「SPINK融合ポリペプチド」という用語は、SPINKポリペプチドまたはその断片(例えば、SPINKポリペプチドの特定のドメイン(例えば、SPINK5及び/またはSPINK9))が、別のポリペプチド(例えば、非SPINKポリペプチド)に直接的または間接的に結合している融合ポリペプチドを指す。

20

【0036】

本明細書で使用される「SPINKFc融合ポリペプチド」という用語は、SPINKポリペプチドまたはその断片(例えば、SPINKポリペプチドの特定のドメイン(例えば、SPINK5及び/またはSPINK9))がFc領域に直接的または間接的に結合している融合ポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、Fc領域は、IgG1Fc領域、IgG2aFc領域、及びIgG4Fc領域からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Fc領域は、IgG2aFc領域である。いくつかの実施形態では、IgG2aFc領域は、マウスIgG2aFc領域である。いくつかの実施形態では、Fc領域は、IgG1Fc領域は、ヒトIgG1Fc領域である。いくつかの実施形態では、Fc領域は、IgG4Fc領域である。いくつかの実施形態では、SPINKポリペプチドまたはその断片は、ヒトSPINKポリペプチドまたはその断片である。いくつかの実施形態では、SPINKポリペプチドまたはその断片は、マウスSPINKポリペプチドまたはその断片である。挿入、欠失、置換、特にSPINKポリペプチド、SPINKドメイン、またはSPINKFc融合ポリペプチドの機能及び/または活性に影響を及ぼさないSPINKポリペプチド、SPINKドメイン、またはFcの保存アミノ酸置換などのわずかな配列変化が本明細書に提供されることが理解される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるSPINKFc融合ポリペプチドは、KLK5に結合することができ、これはKLK5の阻害をもたらし得る。いくつかの実施形態では、SPINKポリペプチドまたはその断片は、SPINK5である。いくつかの実施形態では、SPINKポリペプチドまたはその断片は、SPINK9である。SPINKFc融合ポリペプチドの機能及び/または活性は、限定なしに、ELISA、リガンド-受容体結合アッセイ、及びStat3ルシフェラーゼアッセイを含む、当該技術分野で知られている方法によってアッセイができる。

30

【0037】

いくつかの実施形態では、SPINKFc融合ポリペプチドのFc領域は、エフェクター活性を有さない(例えば、FcIIIIRに結合しない)か、または全IgG抗体よ

40

50

りも実質的に低いエフェクター活性を示す。いくつかの実施形態では、S P I N K F c 融合ポリペプチドのF c 領域は、抗体依存性細胞傷害（A D C C）または補体依存性細胞傷害（C D C）などの細胞傷害を誘発しない。別途特定されない限り、「S P I N K F c 融合」、「S P I N K I g 融合ポリペプチド」、「S P I N K F c 融合ポリペプチド」、または「S P I N K F c」は、本出願全体を通して同義に使用される。

【0038】

「小分子」という用語は、約2000ダルトン以下、好ましくは約500ダルトン以下の分子量を有する任意の分子を指す。

【0039】

「親和性」または「結合親和性」は、分子（例えば、抗体、結合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小分子）とその結合パートナー（例えば、抗原）との単一結合部位の間の非共有結合相互作用の合計の強度を指す。別途指示されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体、結合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小分子、及び抗原のいずれか）間の1：1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。パートナーヨに対する分子Xの親和性は、一般に解離定数（K d）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている一般的な方法（例えば、ペプチド基質アッセイ、直接アッセイ、または結合アッセイ）によって測定することができる。

10

【0040】

本明細書の「抗体」という用語は、最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を含むがこれらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。

20

【0041】

「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体の一部分を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、F v、F a b、F a b - S H、F (a b)₂；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、s c F v）；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0042】

30

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」または「同じ結合領域に結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体のその結合パートナー（例えば、抗原）への結合を50%以上遮断する抗体、及び逆に、競合アッセイにおいて、抗体のその結合パートナーへの結合を50%以上遮断する参照抗体を指す。

【0043】

「抗K L K 5抗体」及び「K L K 5に結合する抗体」という用語は、抗体がK L K 5を標的とする際に診断剤及び/または治療剤として有用であるように、K L K 5に十分な親和性で結合可能である抗体を指す。いくつかの実施形態では、抗K L K 5抗体が非関連ポリペプチド（K L K 5以外のポリペプチド）に結合する程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）によって測定される、抗体のK L K 5への結合の約10%未満である。いくつかの実施形態では、K L K 5に結合する抗体は、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、または0.001 nM（例えば、10⁻⁸ M以下、例えば、10⁻⁸ M ~ 10⁻¹³ M、例えば、10⁻⁹ M ~ 10⁻¹³ M）の解離定数（K d）を有する。いくつかの実施形態では、抗K L K 5抗体は、K L K 5ポリペプチドの異なる種の間で保存されるK L K 5の結合領域（例えば、エピトープ）に結合する。

40

【0044】

「遮断抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する。

50

【 0 0 4 5 】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部分が、特定の源または種に由来する一方で、重鎖及び／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【 0 0 4 6 】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が所有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。5つの主要なクラスの抗体、つまり：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、「サブクラス」（アイソタイプ）、例えば、IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4、IgA 1、及びIgA 2にさらに分けられ得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 、 、 、 、 及びμと呼ばれる。10

【 0 0 4 7 】

「結合領域」は、KLK5アンタゴニスト（例えば、抗体、結合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小分子）が選択的に結合する結合パートナー（例えば、抗原）の部分である。結合ポリペプチド結合パートナーについて、線状結合領域は、約4～15個（例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個）のアミノ酸残基のペプチド部分であり得る。非線形、立体配座結合領域は、結合ポリペプチド結合パートナーの三次元（3D）構造のすぐ近くに提供されるポリペプチド配列の残基を含み得る。10

【 0 0 4 8 】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書において、天然抗体構造と実質的に類似する構造を有するか、またはFc領域を含む重鎖を有する抗体（例えば、抗KLK5抗体）を指すために同義に使用される。20

【 0 0 4 9 】

「ヒト抗体」とは、ヒトもしくはヒト細胞により産生された抗体、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的には除外する。

【 0 0 5 0 】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そこではHVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を指す。30

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が超可変であり（「相補性決定領域」または「CDR」）、及び／または構造的に規定されたループを形成し（「超可変ループ」）、及び／または抗原接触残基を含む（「抗原接触体」）、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、3つがVH（H1、H2、H3）にあり、3つがVL（L1、L2、L3）にある。本明細書における例示的なHVRは、40

(a) アミノ酸残基26～32(L1)、50～52(L2)、91～96(L3)、26～32(H1)、53～55(H2)、及び96～101(H3)で生じる超可変ループ(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))と、

(b) アミノ酸残基24～34(L1)、50～56(L2)、89～97(L3)、31～35b(H1)、50～65(H2)、及び95～102(H3)で生じるCDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health

10

20

30

40

50

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))と、

(c) アミノ酸残基 27c ~ 36 (L1)、46 ~ 55 (L2)、89 ~ 96 (L3)、30 ~ 35b (H1)、47 ~ 58 (H2)、及び 93 ~ 101 (H3) で生じる抗原接觸体 (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996)) と、

(d) HVR アミノ酸残基 46 ~ 56 (L2)、47 ~ 56 (L2)、48 ~ 56 (L2)、49 ~ 56 (L2)、26 ~ 35 (H1)、26 ~ 35b (H1)、49 ~ 65 (H2)、93 ~ 102 (H3)、及び 94 ~ 102 (H3) を含む、(a)、(b)、及び / または (c) の組み合わせと、を含む。

別途示されない限り、可変ドメイン中の HVR 残基及び他の残基 (例えば、FR 残基) は、本明細書において、Kabat et al.、上記に従って番号付けされる。

【0052】

抗体、結合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または小分子を参照して使用される「単離された」という用語は、その天然環境の成分から分離されたものである。いくつかの実施形態では、抗体、結合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または小分子は、例えば、電気泳動 (例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動法 (IEF)、キャピラリー電気泳動法) またはクロマトグラフ (例えば、イオン交換もしくは逆相 HPLC) によって決定される、95% または 99% を超える純度に精製される。

【0053】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団に含まれる個々の抗体は、同一であり、及び / または同じ結合領域 (例えば、エピトープ) に結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の產生中に生じる、起こり得る変異型抗体は例外であり、かかる変異型は一般的に少量で存在する。異なる決定基 (エピトープ) に対して指向された異なる抗体を典型的に含むモノクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本明細書に記載されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法、例えば、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよい。

【0054】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン (それぞれ、VH 及び VL) は一般に、類似の構造を有し、各ドメインが 4 つの保存フレームワーク領域 (FR) 及び 3 つの超可変領域 (HVR) を含む。(例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。) 単一の VH ドメインまたは VL ドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、VH ドメインまたは VL ドメインを使用して抗原に結合する抗体から単離されて、それぞれ相補的 VL ドメインまたは VH ドメインのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150: 880 - 887 (1993)、Clarkson et al., Nature 352: 624 - 628 (1991) を参照されたい。

【0055】

「相關する」または「相關すること」は、任意の方法で、第 1 の分析またはプロトコルの性能及び / または結果を第 2 の分析またはプロトコルの性能及び / または結果と比較す

10

20

30

40

50

ることを意味する。例えば、第 2 のプロトコルを実行する上で第 1 の分析もしくはプロトコルの結果を使用してもよいし、及び／または第 1 の分析もしくはプロトコルの結果を使用して、第 2 の分析もしくはプロトコルが実行されるべきかを決定してもよい。ポリヌクレオチド分析またはプロトコルの実施形態に関して、ポリヌクレオチド発現分析またはプロトコルの結果を使用して、特定の治療レジメンが実行されるべきかを決定してもよい。

【 0 0 5 6 】

「上昇した発現」、「上昇した発現レベル」、または「上昇したレベル」とは、疾患もしくは障害（例えば、喘息）に罹患していない対象（複数可）または内部対照（例えば、ハウスキーピングバイオマーカー）などの対照と比較した対象におけるバイオマーカーの発現の増加またはそのレベルの増加を指す。

10

【 0 0 5 7 】

「ハウスキーピングバイオマーカー」という用語は、典型的には全ての細胞型に同様に存在するバイオマーカーまたはバイオマーカーの群（例えば、ポリヌクレオチド及び／またはポリペプチド）を指す。いくつかの実施形態において、ハウスキーピングバイオマーカーは、「ハウスキーピング遺伝子」である。「ハウスキーピング遺伝子」は、本明細書において、その活性が細胞機能の維持に必須であるタンパク質をコードし、かつ全ての細胞型において典型的には同様に存在する遺伝子または遺伝子の群を指す。

【 0 0 5 8 】

本明細書で使用される「K L K 5 ゲノム配列」という用語は、K L K 5 遺伝子の c D N A 及び／またはゲノム形態のいずれかを指し、これはイントロンならびに上流及び下流調節配列を含み得る。

20

【 0 0 5 9 】

「発現のレベル」または「発現レベル」という用語は、一般に、同義に使用され、一般に、生物学的試料中のバイオマーカーの量を指す。「発現」とは、一般に、情報（例えば、遺伝子コード情報及び／またはエピジェネティック情報）が、細胞中に存在しつつそこで機能する構造に変換されるプロセスを指す。したがって、本明細書で使用されるとき、「発現」とは、ポリヌクレオチドへの転写、ポリペプチドへの翻訳、またはさらにはポリヌクレオチド及び／またはポリペプチド修飾（例えば、ポリペプチドの翻訳後修飾）を指し得る。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたポリペプチド、またはポリヌクレオチド及び／またはポリペプチド修飾（例えば、ポリペプチドの翻訳後修飾）の断片も、それらが選択的スプライシングによって生成された転写物もしくは分解された転写物に由来するかどうかにかかわらず、発現されたものと見なされるべきである。「発現遺伝子」は、m R N A としてポリヌクレオチドに転写され、その後、ポリペプチドに翻訳される遺伝子を含み、R N A に転写されるが、ポリペプチドに翻訳されない遺伝子（例えば、トランスファーR N A 及びリボソームR N A）も含む。

30

【 0 0 6 0 】

対象への臨床的利益の増加に関連するバイオマーカーの「存在」、「量」、または「レベル」は、生物学的試料中で検出可能なレベルである。これらは、当業者にとって既知であり、かつ本明細書にも開示される方法によって測定され得る。評価されるバイオマーカーの発現レベルまたは量を使用して、治療に対する応答を決定することができる。

40

【 0 0 6 1 】

「低減した発現」、「低減した発現レベル」、または「低減したレベル」とは、疾患もしくは障害（例えば、喘息）に罹患していない対象（複数可）または内部対照（例えば、ハウスキーピングバイオマーカー）などの対照と比較した対象におけるバイオマーカーの発現の低減またはそのレベルの低減を指す。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される「参照試料」、「参照細胞」、「参照組織」、「対照試料」、「対照細胞」、または「対照組織」とは、比較目的のために使用される試料、細胞、組織、標準物、またはレベルを指す。一実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試

50

料、対照細胞、または対照組織は、同じ対象の身体の健常及び／または非罹患部分（例えば、組織または細胞）から得られる。例えば、罹患細胞または組織に隣接する健常及び／または非罹患細胞または組織（例えば、腫瘍に隣接する細胞または組織）。別の実施形態では、参照試料は、同じ対象の身体の未治療組織及び／または細胞から得られる。また別の実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織は、別の対象の身体の健常及び／または非罹患部分（例えば、組織または細胞）から得られる。さらに別の実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織は、別の対象の身体の未治療組織及び／または細胞から得られる。

【0063】

本明細書で使用される「試料」という用語は、例えば、物理的、生化学的、化学的、及び／または生理的特徴に基づいて特徴付け及び／または特定されることになる、細胞及び／または他の分子実体を含有する、目的の対象から得られるか、またはそれに由来する、製剤を指す。例えば、「疾患試料」という表現及びその変形は、特徴付けられる細胞及び／または分子実体を含有することが予期されるか、または含有することが既知である、目的の対象から得られた任意の試料を指す。試料としては、初代または培養細胞または細胞株、細胞上清、細胞溶解物、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、全血、血液由来の細胞、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、汗、粘液、腫瘍溶解物、及び組織培養培地、組織抽出物、例えば、均質化組織、腫瘍組織、細胞抽出物、ならびにそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0064】

「組織試料」または「細胞試料」とは、対象の組織から得られる同様の細胞の集合を意味する。組織または細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結した、及び／または保存された器官、組織試料、生検、及び／または吸引液からなどの固形組織；血漿などの血液または任意の血液構成物；脳脊髄液、羊膜液、腹水、または間質液などの体液；対象の妊娠または発育における任意の時期の細胞であってもよい。組織試料はまた、初代または培養細胞または細胞株であってもよい。任意で、組織または細胞試料は、疾患組織／器官から得られる。組織試料は、保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定剤、栄養剤、または抗生物質などの天然の組織と天然では混合しない化合物を含有し得る。

20

【0065】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療結果を実現するために必要な投薬量及び期間での有効な量を指す。

30

【0066】

「対象」とは、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、靈長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト靈長類）、ウサギ、ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【0067】

本明細書で使用される「患者」という用語は、哺乳動物などの動物を指す。一実施形態では、患者は、ヒトを指す。

【0068】

「薬学的製剤」という用語は、調製物中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒である追加の成分を全く含有しない調製物を指す。

40

【0069】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0070】

本明細書で使用される「高T_h2喘息」という用語は、高レベルの1つ以上のT_h2細胞関連サイトカイン、例えば、IL13、IL4、IL9、IL5を示すか、またはT_h

50

2サイトカイン関連炎症を示す喘息を指す。いくつかの実施形態では、高T_h2喘息という用語は、高好酸球喘息と同義に使用され得る。いくつかの実施形態では、高T_h2喘息は、T_h2誘導性喘息である。いくつかの実施形態では、喘息患者は、好酸球性炎症陽性（EIP）であると判定された。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 2015 / 061441号を参照されたい。いくつかの実施形態では、対象は、対照または参照レベルと比較して上昇したレベルの好酸球シグネチャー遺伝子のうちの少なくとも1つを有すると判定された。WO 2015 / 061441を参考されたい。いくつかの実施形態では、高T_h2喘息は、高ペリオスチン喘息である。いくつかの実施形態では、対象は、高血清ペリオスチンを有する。いくつかの実施形態では、対象は、18歳以上である。いくつかの実施形態では、対象は、対照または参照レベルと比較して上昇したレベルの血清ペリオスチンを有すると判定された。いくつかの実施形態では、対照または参照レベルは、集団におけるペリオスチンの中央値レベルである。いくつかの実施形態では、対象は、20 ng / ml以上の血清ペリオスチンを有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、25 ng / ml以上の血清ペリオスチンを有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、50 ng / ml以上の血清ペリオスチンを有すると判定された。いくつかの実施形態では、血清ペリオスチンの対照または参照レベルは、20 ng / ml、25 ng / ml、または50 ng / mlである。いくつかの実施形態では、喘息は、高好酸球喘息である。いくつかの実施形態では、対象は、対照または参照レベルと比較して上昇した好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対照または参照レベルは、集団の中央値レベルである。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり150以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり200以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり250以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり300以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり350以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり400以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり450以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり500以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり300以上の好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、好酸球とは、末梢血好酸球である。いくつかの実施形態では、好酸球とは、喀痰好酸球である。いくつかの実施形態では、対象は、上昇したレベルのFeNO（呼気中硝酸）及び/または上昇したレベルのIgEを示す。例えば、いくつかの例では、対象は、約5 ppb（十億分率）、10 ppb、15 ppb、20 ppb、25 ppb、30 ppb、35 ppb、40 ppb、45 ppb、50 ppb、60 ppb、70 ppb、80 ppb、90 ppb、及び100 ppbのうちのいずれも上回るFeNOレベルを示す。いくつかの例では、対象は、50 IU / mlを上回るIgEレベルを有する。

【0071】

本明細書で使用される「低T_h2喘息」、「非高T_h2喘息」、「低2型喘息」、「低T₂喘息」、「非好酸球性喘息」、「微量顆粒球喘息」、または「微量炎症喘息」という用語は、低レベルの1つ以上のT_h2細胞関連サイトカイン、例えば、IL13、IL4、IL9、IL5を示すか、または非T_h2サイトカイン関連炎症を示す喘息を指す。いくつかの実施形態では、低T_h2喘息という用語は、低好酸球喘息と同義に使用され得る。いくつかの実施形態では、喘息患者は、好酸球性炎症陰性（EIN）であると判定された。例えば、WO 2015 / 061441を参考されたい。いくつかの実施形態では、低T_h2喘息は、T_h17誘導性喘息である。いくつかの実施形態では、低T_h2喘息は、低ペリオスチン喘息である。いくつかの実施形態では、対象は、18歳以上である。いくつかの実施形態では、対象は、対照または参照レベルと比較して低減したレベルの血清ペリオスチンを有すると判定された。いくつかの実施形態では、対照または参照レベルは、

10

20

30

40

50

集団におけるペリオスチンの中央値レベルである。いくつかの実施形態では、対象は、20 ng / ml 未満の血清ペリオスチンを有すると判定された。いくつかの実施形態では、喘息は、低好酸球喘息である。いくつかの実施形態では、対象は、対照または参照レベルと比較して低減した好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対照または参照レベルは、集団の中央値レベルである。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり150未満的好酸球数を有すると判定された。いくつかの実施形態では、対象は、血液1 μlあたり100未満的好酸球数を有すると判定された。特定の好ましい実施形態では、対象は、血液1 μlあたり300未満的好酸球数を有すると判定された。

【0072】

「治療」（及び「治療する」または「治療すること」などの変形）は、治療される対象または細胞の自然の経過を改変する試みにおける臨床介入を指す。治療の望ましい効果としては、疾患の発生または再発の防止、症状の緩和、疾患の何らかの直接的または間接的な病理学的帰結の減少、安定した（すなわち、悪化しない）疾患の状態、疾患進行の速度の低下、病態の回復または軽減、治療を受けない場合の予想生存率と比較した生存率の延長、及び予後の改善のうちの1つ以上が挙げられる。

10

【0073】

本明細書における実施形態を説明する文脈における「a」及び「an」及び「the」という用語ならびに同様の用語の使用は、本明細書において別途示されない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の両方を網羅すると解釈されるものである。「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、及び「含む（containing）」という用語は、別途特筆されない限り、オープンエンド用語（すなわち、「～を含むが、これらに限定されない」を意味する）として解釈されるものである。本明細書に提供される態様及び実施形態は、態様及び実施形態「からなる」及び／または「から本質的になる」を含むことが理解される。

20

【0074】

当業者によって理解されるように、本明細書における「約」の値またはパラメータに対する言及は、その値またはパラメータ自体に向けられる実施形態を含む（及び説明する）。例えば、「約X」に言及する記述には「X」の記述が含まれる。

30

【0075】

「実質的に異なる」という表現は、2つの数値（概して、一方はある分子に関連し、他方は参照／比較用分子に関連する）間の十分に高い度合いの差異を指し、これは、当業者が、2つの値の間の差異を、該値（例えば、Kd値）によって測定される生物学的特徴の文脈において統計的有意性があるものと見なすようなものである。その2つの値の間の差異は、参照／比較用分子に対する値の関数として、例えば、約10%超、約20%超、約30%超、約40%超、及び／または約50%超であり得る。

40

【0076】

「実質的に同様」という表現は、本明細書で使用されるとき、2つの数値（概して、一方はある分子に関連し、他方は参照／比較用分子に関連する）間の十分に高い度合いの類似を指し、これは、当業者が、2つの値の間の差異を、該値（例えば、Kd値）によって測定される生物学的特徴の文脈において統計的有意性がないものと見なすようなものである。その2つの値の間の差異は、参照／比較値の関数として、例えば、約20%未満、約10%未満、及び／または約5%未満であり得る。「実質的に正常」という表現は、参照（例えば、正常参照）と実質的に同様を指す。

40

【0077】

I I . K L K 5 アンタゴニストの使用方法

本明細書に提供されるものは、K L K 5 の阻害のためにK L K 5 アンタゴニストを使用する方法である。例えば、本明細書に提供されるものは、対象における喘息を治療するための方法であり、有効量のK L K 5 アンタゴニストを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 のセリンプロテアーゼ活性を阻

50

害する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、抗 K L K 5 抗体）、結合ポリペプチド（例えば、S P I N K F c 融合ポリペプチドなどの K L K 5 結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、C R I S P R - R N A 及び t r a c r R N A 配列を有する s g R N A を含む、s i R N A または C R I S P R - R N A などの K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などの K L K 5 小分子アンタゴニスト）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。

【 0 0 7 8 】

本明細書にさらに提供されるものは、喘息に罹患している対象の K L K 5 アンタゴニストを含む治療への応答を予測する方法であり、(a) 対象からの生物学的試料中の K L K 5 レベルを測定することと、(b) 試料中で検出された K L K 5 レベルを参照レベルと比較することと、(c) 試料中で測定された K L K 5 レベルが参照レベルと比較して上昇している場合に対象が治療に応答するであろうと予測し、試料中で測定された K L K 5 レベルが参照レベルと比較して低減している場合に対象が治療に応答しないであろうと予測することと、を含む。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 のセリンプロテアーゼ活性を阻害する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、抗 K L K 5 抗体）、結合ポリペプチド（例えば、S P I N K F c 融合ポリペプチドなどの K L K 5 結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、C R I S P R - R N A 及び t r a c r R N A 配列を有する s g R N A を含む、s i R N A または C R I S P R - R N A などの K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などの K L K 5 小分子アンタゴニスト）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。

【 0 0 7 9 】

本明細書にさらに提供されるものは、K L K 5 アンタゴニストを含む治療について喘息に罹患している対象を選択する方法であり、対象からの生物学的試料中の K L K 5 ゲノム配列中に位置する遺伝的変異の存在または不在を決定することを含み、遺伝的変異の存在は、対象が K L K 5 アンタゴニストでの治療に適していることを示す。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 のセリンプロテアーゼ活性を阻害する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、抗 K L K 5 抗体）、結合ポリペプチド（例えば、S P I N K F c 融合ポリペプチドなどの K L K 5 結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、C R I S P R - R N A 及び t r a c r R N A 配列を有する s g R N A を含む、s i R N A または C R I S P R - R N A などの K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などの K L K 5 小分子アンタゴニスト）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。

【 0 0 8 0 】

本明細書にさらに提供されるものは、喘息に罹患している対象が K L K 5 アンタゴニストでの治療に適していることを示す K L K 5 ゲノム配列中の遺伝的変異の存在または不在を検出するための方法であり、(a) 対象からの試料を、K L K 5 ゲノム配列中に位置する遺伝的変異の存在または不在を検出することができる試薬と接触させることと、(b) 遺伝的変異の存在または不在を決定することと、を含み、遺伝的変異の存在は、対象が K L K 5 アンタゴニストでの治療に適していることを示す。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 のセリンプロテアーゼ活性を阻害する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、抗体（例えば、抗 K L K 5 抗体）、結合ポリペプチド（例えば、S P I N K F c 融合ポリペプチドなどの K L K 5 結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、C R I S P R - R N A 及び t r a c r R N A 配列を有する s g R N A を含む、s i R N A または C R I S P R - R N A などの K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などの K L K 5 小分子アンタゴニスト）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、K L K 5 ア

10

20

30

40

50

ンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。いくつかの実施形態では、試薬は、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、及びリボザイムから選択される。いくつかの実施形態では、試薬は標識される。

【0081】

本明細書にさらに提供されるものは、KLK5と関連する疾患を治療するための化合物を選択するための方法であり、試験化合物がKLK5アンタゴニストであるかを決定することを含み、KLK5アンタゴニストである試験化合物は、KLK5と関連する疾患を治療するための化合物として適している。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、KLK5のセリンプロテアーゼ活性を阻害する。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、抗体（例えば、抗KLK5抗体）、結合ポリペプチド（例えば、S P I N K F c 融合ポリペプチドなどのKLK5結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、C R I S P R - RNA 及び t r a c r RNA 配列を有する s g RNA を含む、s i RNA または C R I S P R - RNA などのKLK5ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などのKLK5小分子アンタゴニスト）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。

【0082】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、対象からの試料中のKLK5の上昇したレベルと関連している。いくつかの実施形態では、喘息は、対象からの試料中のS P I N K 5 の低減した活性と関連している。いくつかの実施形態では、喘息は、対象からの試料中の好中球の上昇したレベルと関連している。いくつかの実施形態では、喘息は、低2型喘息、低ペリオスチン喘息、及び低好酸球喘息からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、喘息は、ネザートン症候群と関連していない。いくつかの実施形態では、喘息は、S P I N K 5 をコードする遺伝子またはその遺伝子産物における1つ以上の遺伝的変異と関連していない。いくつかの実施形態では、喘息は、KLK5ゲノム配列中に位置する遺伝的変異と関連している。いくつかの実施形態では、方法は、遺伝的変異の存在に基づいて喘息について対象を治療することをさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、S N P である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、S N P r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 である。

【0083】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、喘息は、致死的であり得る症状の悪化させる急性事象（増悪及び再発）を伴う持続的な慢性重度喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、アトピー性（別名アレルギー性）喘息、非アレルギー性喘息である（例えば、多くの場合は呼吸器ウイルス（例えば、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、及び呼吸器合胞体ウイルス）の感染または刺激因子（大気汚染物質、スモッグ、ディーゼル粒子、屋内もしくは屋外の揮発性化学物質及びガス、または冷たく乾燥した空気）の吸入によって誘発される）。いくつかの実施形態では、喘息は、断続的または運動誘発性喘息、「喫煙」（典型的には、シガレット、シガー、パイプ）への急性もしくは慢性一次もしくは二次曝露、吸入もしくは「ベーピング」（タバコ、マリファナ、または他のかかる物質）による喘息、またはアスピリンもしくは関連N S A I D S の最近の摂取によって誘発される喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、軽度、またはコルチコステロイド無感作喘息、新たに診断された未治療の喘息、または症状（咳、呼気性喘鳴、息切れ、または胸部痛）を制御するために吸入された局所もしくは全身ステロイドの慢性使用を以前に必要としないものである。いくつかの実施形態では、喘息は、慢性、コルチコステロイド抵抗性喘息、コルチコステロイド難治性喘息、コルチコステロイドまたは他の慢性喘息制御剤医薬品で制御されていない喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、中等度～重度喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、高T h 2 喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、重度喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、アトピー性喘息、アレルギー性喘息、非アレルギー性喘息（例えば、感染及び／または呼吸器合胞体ウイルス（R S V ）による）、運動誘発

10

20

30

40

50

性喘息、アスピリン感受性 / 増悪性喘息、軽度喘息、中等度 ~ 重度喘息、コルチコステロイド無感作喘息、慢性喘息、コルチコステロイド抵抗性喘息、コルチコステロイド難治性喘息、新たに診断された未治療の喘息、喫煙に起因する喘息、コルチコステロイドで制御されていない喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、Tヘルパーリンパ球 2型 (Th2) もしくは高2型 (Th2) 、または2型 (T2) 誘導性喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、好酸球性喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、アレルギー性喘息である。いくつかの実施形態では、対象は、好酸球性炎症陽性 (EIP) であると判定された。WO 2015 / 061441 を参照されたい。いくつかの実施形態では、喘息は、高ペリオスチン喘息である (例えば、血清 1 mLあたり少なくとも約 20 ng 、 25 ng 、または 50 ng のいずれかのペリオスチンレベルを有する)。いくつかの実施形態では、喘息は、高好酸球喘息 (例えば、血液 1 mLあたり少なくとも約 150 、 200 、 250 、 300 、 350 、 400 の好酸球数のいずれか) である。いくつかの実施形態では、喘息は、低 Th2 喘息または非 Th2 誘導性喘息である。いくつかの実施形態では、対象は、好酸球性炎症陰性 (EIN) であると判定された。WO 2015 / 061441 を参照されたい。いくつかの実施形態では、喘息は、低ペリオスチン喘息である (例えば、血清 1 mLあたり約 20 ng 未満のペリオスチンレベルを有する)。いくつかの実施形態では、喘息は、低好酸球喘息 (例えば、血液 1 μLあたり約 150 未満の好酸球数または血液 1 μLあたり約 100 未満の好酸球数) である。

【0084】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、試料は、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、及び汗からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、試料は、気管支肺胞洗浄、肺実質、及び気管支上皮下からなる群から選択される。

【0085】

バイオマーカーの存在及び / または発現レベル / 量は、DNA、mRNA、cDNA、ポリペプチド、ポリペプチド断片、及び / または遺伝子コピー数を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の任意の好適な基準に基づいて、定性的かつ / または定量的に判定され得る。いくつかの実施形態では、第1の試料中のバイオマーカーの存在及び / または発現レベル / 量が、第2の試料中の存在 / 不在及び / または発現レベル / 量と比較して増加する。いくつかの実施形態では、第1の試料中のバイオマーカーの存在 / 不在及び / または発現レベル / 量は、第2の試料中の存在及び / または発現レベル / 量と比較して減少する。いくつかの実施形態では、第2の試料は、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織である。遺伝子の存在 / 不在及び / または発現レベル / 量を決定するためのさらなる開示が本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、KLK5 は、バイオマーカーとして使用することができる。いくつかの実施形態では、SPINK5 は、バイオマーカーとして使用することができる。

【0086】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KLK5 アンタゴニストは、追加の治療剤と組み合わせて対象に投与される。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、IL-13 軸結合アンタゴニスト、IL-5 軸結合アンタゴニスト、IL-33 軸結合アンタゴニスト、M1 プライムアンタゴニスト、IgE アンタゴニスト、TRPA1 アンタゴニスト、CRTTH2 アンタゴニスト、気管支拡張剤もしくは喘息症状制御剤医薬品、免疫調節剤、コルチコステロイド、Th2 経路阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、またはホスホジエステラーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、IL-13 軸結合アンタゴニストは、抗 IL-13 抗体である。いくつかの実施形態では、抗 IL-13 抗体は、レブリキズマブである。いくつかの実施形態では、IL-5 軸結合アンタゴニストは、IL-5 結合アンタゴニストまたは IL-5 受容体結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、IL-33 軸結合アンタゴニストは、IL-33 結合アンタゴニストまたは ST2 結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、IL-33 結合アンタゴニストは、抗 IL-33 抗体である。いくつかの実施形態では、M1 プライムアンタゴニスト

10

20

30

40

50

は、キリズマブである。

【 0 0 8 7 】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、皮下、静脈内、筋肉内、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植による、吸入による、髄腔内、脳室内、または鼻腔内投与のためのものである。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、皮下投与のためのものである。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、ヒト対象における使用のためのものである。

【 0 0 8 8 】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、上昇した発現とは、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織と比較した、本明細書に記載の方法などの標準の当該技術分野で既知の方法によって検出される、バイオマーカー（例えば、ポリペプチドまたは核酸（例えば、遺伝子またはm R N A））のレベルの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上のうちのいずれかの全体的な増加を指す。いくつかの実施形態では、上昇した発現とは、試料におけるバイオマーカーの発現レベル／量の増加を指し、増加は、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織におけるそれぞれのバイオマーカーの発現レベル／量の少なくとも約1.5倍、1.75倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、25倍、50倍、75倍、または100倍のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、上昇した発現とは、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、対照組織、または内部対照（例えば、ハウスキーピング遺伝子）と比較した、約1.5倍、約1.75倍、約2倍、約2.25倍、約2.5倍、約2.75倍、約3.0倍、または約3.25倍を超える全体的な増加を指す。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、K L K 5 経路に関与する分子である。いくつかの実施形態では、分子は、S P I N K 5 である。いくつかの実施形態では、分子は、K L K 5 である。いくつかの実施形態では、分子は、K L K 5 の生物学的基質である。いくつかの実施形態では、生物学的基質は、K L K 7、K L K 8、K L K 1 4、P A R 2、及びインテグリン／組織マトリックスタンパク質からなる群から選択される。

【 0 0 8 9 】

方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、低減した発現とは、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織と比較した、本明細書に記載の方法などの標準の当該技術分野で既知の方法によって検出される、バイオマーカー（例えば、ポリペプチドまたは核酸（例えば、遺伝子またはm R N A））のレベルの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上のうちのいずれかの全体的な低減を指す。いくつかの実施形態では、低減した発現とは、試料におけるバイオマーカーの発現レベル／量の減少を指し、減少は、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織におけるそれぞれのバイオマーカーの発現レベル／量の少なくとも約0.9倍、0.8倍、0.7倍、0.6倍、0.5倍、0.4倍、0.3倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、または0.01倍のうちのいずれかである。

【 0 0 9 0 】

試料中の様々なバイオマーカーの存在及び／または発現レベル／量は、いくつかの方法論によって分析され得、これらの多くは、当該技術分野で既知であり、当業者に理解されており、免疫組織化学（「I H C」）、ウエスタンプロット分析、免疫沈降、分子結合アッセイ、E L I S A、E L I F A、蛍光活性化細胞選別（「F A C S」）、M a s s A R R A Y、プロテオミクス、定量的血液ベースのアッセイ（例えば、血清E L I S A）、生化学的酵素活性アッセイ、インサイツハイブリダイゼーション、サザン分析、ノーザン分析、全ゲノム配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応（「P C R」）、例えば、定量的リアルタイムP C R（「q R T - P C R」）及び他の增幅型検出方法、例えば、分岐状D N A、S I S B A、T M Aなど）、R N A - S e q、F I S H、マイクロアレイ分析、遺伝子発現

10

20

30

40

50

プロファイリング、及び／または遺伝子発現連続分析（「SAGE」）、ならびにポリペプチド、遺伝子、及び／または組織アレイ分析によって行われ得る多種多様なアッセイのうちのいずれか1つを含むが、これらに限定されない。遺伝子及び遺伝子産物の状態を評価するための典型的なプロトコルは、例えば、Ausubel et al., eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 (ノーザンプロットティング)、4 (サザンプロットティング)、15 (イムノプロットティング)、及び18 (PCR分析)において見出される。Rules Based MedicineまたはMeso Scale Discovery（「MSD」）から入手可能なものなどの多重化イムノアッセイもまた、使用されてもよい。

【0091】

10

III. KLK5アンタゴニスト

本明細書に提供されるものは、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、例えば、喘息またはネザートン症候群を治療または診断する方法における使用のためのKLK5アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、抗体（例えば、抗KLK5抗体）、結合ポリペプチド（例えば、SPINK Fc融合ポリペプチドなどのKLK5結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、CRISP-RNA及びtracer RNA配列を有するsgRNAを含む、siRNAまたはCRISP-RNAなどのKLK5ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などのKLK5小分子アンタゴニスト）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、完全長IgG1抗体である。KLK5アンタゴニストの詳細な説明は、以下の本明細書におけるセクションA.～E.に見出すことができる。

【0092】

20

例えば、上記実施形態のいずれかによるKLK5アンタゴニストは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、及び配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列のいずれかの1つ以上の残基に結合する。KLK5アンタゴニストのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、及び配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列のいずれかに結合する。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列（UniProt番号Q9Y337のアミノ酸残基1-293）の1つ以上の残基に結合する。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列（UniProt番号Q9Y337のアミノ酸残基1-293）に結合する。いくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、KLK5上の特異的結合領域に結合する。いくつかの実施形態では、結合領域は、KLK5の活性部位内に位置する。いくつかの実施形態では、結合領域は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び／または10個のいずれかのKLK5のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、結合領域は、完全長のプロセシングされていないKLK5の108、147、150、153、168、及び245位のアミノ酸残基からなる群から選択される、すなわち、シグナルペプチドを含む、KLK5のアミノ酸残基のうちの1つ以上を含む。

30

【0093】

40

いくつかの実施形態では、結合領域は、KLK5アンタゴニストの任意の原子の約10、9、8、7、6、5、4、3、2、及び／または1オングストローム()のいずれか以内であるアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、結合領域は、KLK5アンタゴニストの任意の原子の10、9、8、7、6、5、4、3、2、及び／または1のいずれか未満であるアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、結合領域は、KLK5アンタゴニストの任意の原子の10～9、9～8、8～7、7～6、6～5、5～4、4～3、3～2、及び／または2～1のいずれか以内であるアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、結合領域は、KLK5アンタゴニストの任意の原子の約9.5、9

50

、 8 . 5 、 8 、 7 . 5 、 7 、 6 . 5 、 6 、 5 . 5 、 5 、 4 . 5 、 4
 、 3 . 5 、 3 、 2 . 5 、 2 、 1 . 5 、 及び / または 1 のいずれか以内であるアミノ酸残基を含む。結合領域（すなわち、パラトープ）と接触する K L K 5 アンタゴニストのアミノ酸残基は、例えば、結合領域と複合した K L K 5 アンタゴニストの結晶構造を決定することによって、または水素 / 重水素交換を行うことによって決定され得る。

【 0 0 9 4 】

さらに、上記実施形態のいずれかによる K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 の生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、セリンプロテアーゼ活性である。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、トリプシン様セリンプロテアーゼ活性である。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、K L K 5 促進ヒト平滑筋細胞増殖及び収縮である。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、炎症性サイトカイン、ケモカイン、及び接着分子の K L K 5 誘導上皮発現である。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、好中球走化性サイトカインの K L K 5 誘導上皮産生及び肺組織への好中球流入である。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、少なくとも約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び / またはそれ以上のいずれかで阻害される。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び / またはそれ以上のいずれかで阻害される。いくつかの実施形態では、K L K 5 の生物学的活性は、20 ~ 30 %、30 ~ 40 %、40 ~ 50 %、50 ~ 60 %、60 ~ 70 %、70 ~ 80 %、80 ~ 90 %、及び / または 90 ~ 100 % のいずれかで阻害される。

【 0 0 9 5 】

K L K 5 アンタゴニストのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、S P I N K 5 の K L K 5 への結合を実質的にまたは完全に阻害する。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の K L K 5 への結合は、少なくとも約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び / またはそれ以上のいずれかで阻害される。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の K L K 5 への結合は、約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び / またはそれ以上のいずれかで阻害される。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 の K L K 5 への結合は、20 ~ 30 %、30 ~ 40 %、40 ~ 50 %、50 ~ 60 %、60 ~ 70 %、70 ~ 80 %、80 ~ 90 %、及び / または 90 ~ 100 % のいずれかで阻害される。

【 0 0 9 6 】

K L K 5 アンタゴニストのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、約 10^{-7} nM、 10^{-8} nM、 10^{-9} nM、 10^{-10} nM、 10^{-11} nM、 10^{-12} nM、及び / または 10^{-13} nM のいずれか未満の K L K 5 に対する結合親和性（解離定数）を有する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、 10^{-7} nM、 10^{-8} nM、 10^{-9} nM、 10^{-10} nM、 10^{-11} nM、 10^{-12} nM、及び / または 10^{-13} nM のいずれか未満の K L K 5 に対する結合親和性を有する。

【 0 0 9 7 】

K L K 5 アンタゴニストのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、約 1000 nM、500 nM、100 nM、50 nM、10 nM、5 nM、1 pM、500 pM、100 pM、50 pM、10 pM、5 pM、及び / または 1 pM のいずれか未満の I C₅₀ を有する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、1000 nM、500 nM、100 nM、50 nM、10 nM、5 nM、1 pM、500 pM、100 pM、50 pM、10 pM、5 pM、及び / または 1 pM のいずれか未満の I C₅₀ を有する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、約 50 μM ~ 1 μM、1 μM ~ 500 nM、500 nM ~ 100 nM、100 nM ~ 10 nM、10 nM ~ 1 nM、1000 pM ~ 500 pM、500 pM ~ 200 pM、200 pM ~ 150 pM、150 pM ~ 100 pM、100 pM ~ 10 pM、及び / または 10 pM ~ 1 pM のいずれかの I C₅₀ を有する。

10

20

30

40

50

【0098】

A. 抗体

本明細書に提供されるものは、本明細書に記載される方法における使用のための単離された抗 K L K 5 抗体である。上記の実施形態のいずれにおいても、抗 K L K 5 抗体は、ヒト化されている。さらに、上記の実施形態のいずれかによる抗 K L K 5 抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗 K L K 5 抗体は、抗体断片、例えば、F v 断片、F a b 断片、F a b' 断片、s c F v 断片、ダイアボディ断片、または F (a b')₂ 断片である。いくつかの実施形態では、抗 K L K 5 抗体は、完全長 I g G 1 抗体である。いくつかの実施形態では、抗 K L K 5 抗体は、モノクローナルマウス I g G 2 B 抗体である。いくつかの実施形態では、モノクローナルマウス I g G 2 B 抗体は、m A b 1 1 0 8 (クローン番号 1 9 3 3 1 8 、 R & D Systems, Minneapolis, MN) である。

10

【0099】

さらなる態様では、上記実施形態のいずれかによる抗 K L K 5 抗体は、以下のセクションに記載されるように、特徴のうちのいずれかを、単独または組み合わせて組み込み得る。

【0100】

1. 親和性

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体は、1 μM、10 0 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、及び/または0.001 nM (例えば、10⁻⁸ M 以下、例えば、10⁻⁸ M ~ 10⁻¹³ M、例えば、10⁻⁹ M ~ 10⁻¹³ M) の解離定数 (K d) を有する。一実施形態では、K d は、放射性標識抗原結合アッセイ (R I A) によって測定される。一実施形態では、R I A は、抗 K L K 5 抗体及びその抗原の F a b バージョンで行われる。例えば、抗原に対する F a b の溶液結合親和性は、F a b を、未標識抗原の一連の滴定の存在下で最小濃度の (¹²⁵ I) 標識抗原と平衡化させ、次いで抗 F a b 抗体コーティングプレートで結合した抗原を捕捉することによって、測定される (例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293 : 865 - 881 (1999) を参照されたい) 。アッセイのための条件を確立するために、MICROTRITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を、50 mM の炭酸塩 (pH 9.6) 中 5 μg / ml の捕捉用抗 F a b 抗体 (Cappel Labs) で一晩コーティングし、続いて、室温 (約 23) で 2 ~ 5 時間、PBS 中 2 % (w / v) のウシ血清アルブミンによってプロッキングする。非吸着性プレート (Nunc 番号 269620) において、100 pM または 26 pM の [¹²⁵ I] - 抗原を、目的とする F a b の段階希釈物と混合する (例えば、Presta et al., Cancer Res. 57 : 4593 - 4599 (1997) における抗 VEGF 抗体、F a b - 12 の評価と一貫する) 。次に、目的とする F a b を一晩インキュベートするが、このインキュベーションは、平衡が達成されることを確実にするために、より長い期間 (例えば、約 6.5 時間) 継続し得る。その後、混合物を、室温でのインキュベーション (例えば、1 時間) のため、捕捉プレートに移す。次に、溶液を除去し、プレートを、PBS 中 0.1 % のポリソルベート 20 (Tween - 20 (登録商標)) で 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μl / ウェルのシンチラント (MICROSCINT - 20 (商標) ; Packard) を添加し、プレートを 10 分間 TOP COUNT (商標) ガンマカウンター (Packard) で計数する。20 % 以下の最大結合を付与する各 F a b の濃度を競合結合アッセイにおける使用のために選択する。

20

30

30

40

【0101】

別の実施形態に従うと、K d は、BIACORE (登録商標) 表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、BIACORE (登録商標) - 2000 または BIACORE (登録商標) - 3000 (BIACore, Inc., Piscataway, NJ) を使用するアッセイは、約 10 の応答単位 (RU) で固定化抗原 CM5 チップを用いて 25 で実施される。一実施形態では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ (CM5, BIACORE, Inc.) は、供給者の指示に従って、N - エチ

50

ル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (E D C) 及び N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) を用いて活性化される。抗原を pH 4 . 8 の 1 0 mM の酢酸ナトリウムによって 5 μg / ml (約 0 . 2 μM) に希釈した後、 5 μl / 分の流量で注射し、結合ポリペプチドの約 10 応答単位 (R U) を達成する。抗原の注射に続いて、 1 M のエタノールアミンを注射して、未反応基を遮断する。動態測定のために、 F a b の 2 倍段階希釈物 (0 . 7 8 n M ~ 5 0 0 n M) を、 0 . 0 5 % ポリソルベート 2 0 (T W E E N - 2 0 (商標)) 界面活性剤を含む P B S (P B S T) 中、 2 5 で、 約 2 5 μl / 分の流量で注射する。会合速度 (k o n) 及び解離速度 (k o f f) を、 会合及び解離センサグラムを同時にあてはめることによって、 単純な 1 対 1 の Langmuir 結合モデル (B I A C O R E (登録商標) E v a l u a t i o n S o f t w a r e バージョン 3 . 2) を用いて計算する。平衡解離定数 (K d) を k o f f / k o n 比として計算する。例えば、 Chen et al . , J . M o l . B i o l . 2 9 3 : 8 6 5 - 8 8 1 (1 9 9 9) を参照されたい。上記表面プラズモン共鳴アッセイによりオンレートが 1 0 6 M - 1 s - 1 を超える場合、 オンレートは、 ストップトフローを備えた分光計 (A v i v I n s t r u m e n t s) 、 または攪拌キュベットを備えた 8 0 0 0 シリーズ S L M - A M I N C O (商標) 分光光度計 (T h e r m o S p e c t r o n i c) などの分光計で測定されるように、 増加する抗原濃度の存在下で、 2 5 で、 P B S 中 2 0 n M の抗抗原抗体 (F a b 型) (pH 7 . 2) の蛍光発光強度 (励起 = 2 9 5 n m 、 発光 = 3 4 0 n m 、 1 6 n m 帯域通過) の増加または減少を測定する蛍光消光技法を使用して決定することができる。

【 0 1 0 2 】

2 . 抗体断片

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体は、抗体断片である。抗体断片には、 F a b 、 F a b ' 、 F a b ' - S H 、 F (a b ') 2 F v 、 及び s c F v 断片、 ならびに以下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の概説については、 Hudson et al . N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 (2 0 0 3) を参照されたい。 s c F v 断片の概説については、 例えば、 Pl u c k t h u n , i n The Pharmacology of Monoclonal Antibodies , vol . 1 1 3 , Rosenburg and Moore eds . , (Springer - Verlag , New York) , pp . 2 6 9 - 3 1 5 (1 9 9 4) を参照されたく、 また、 WO 9 3 / 1 6 1 8 5 、 ならびに米国特許第 5 , 5 7 1 , 8 9 4 号及び同第 5 , 5 8 7 , 4 5 8 号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、 増加したインビボ半減期を有する、 F a b 及び F (a b ') 2 断片の考察については、 米国特許第 5 , 8 6 9 , 0 4 6 号を参照されたい。

【 0 1 0 3 】

ダイアボディは、二価であってもまたは二重特異性であってもよい、 2 つの抗原結合部位を有する抗体断片である。 例えば、 E P 4 0 4 , 0 9 7 、 WO 1 9 9 3 / 0 1 1 6 1 、 Hudson et al . , N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 (2 0 0 3) 、 及び Hollinger et al . , Proc . Natl . Acad . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) を参照されたい。トリアボディ (T r i a b o d i e s) 及びテトラボディ (t e t r a b o d i e s) はまた、 Hudson et al . , N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 (2 0 0 3) にも記載される。

【 0 1 0 4 】

單一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部、 または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む、 抗体断片である。 いくつかの実施形態では、 単一ドメイン抗体は、ヒト單一ドメイン抗体である (Domantis , Inc . , Waltham , MA 、 例えば、 米国特許第 6 , 2 4 8 , 5 1 6 号を参照されたい) 。

【 0 1 0 5 】

抗体断片は、本明細書に記載される、 インタクトな抗体のタンパク分解、 ならびに組換え宿主細胞 (例えば、 E . c o l i またはファージ) の產生を含むが、 これらに限定され

10

20

30

40

50

ない、様々な技法によって作製され得る。

【0106】

3. キメラ抗体及びヒト化抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrisone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または非ヒト靈長類、例えばサルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変化した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合断片が含まれる。

10

【0107】

いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減させるために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはその一部）が非ヒト抗体に由来し、及びFR（またはその一部）がヒト抗体配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むことになる。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元または改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

20

【0108】

ヒト化抗体及びそれを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に概説され、さらに例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、及び同第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)（特異性決定領域（SDR）グラフティングを記載）、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)（「リサーフェイシング（resurfacing）」を記載）、Dallal'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)（「FRシャーフリング」を記載）、ならびOsbourne et al., Methods 36:61-68 (2005) 及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)（FRシャーフリングへの「誘導選択」アプローチを記載）に記載される。

30

【0109】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、これらに限定されないが、「最良適合（best-fit）」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993) を参照されたい）、軽鎖または重鎖可変領域の特定の下位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)、及びPresta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993) を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞突然変異）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) を参照されたい）、及びFRライブラリをスクリーニングすることから誘導されるフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 及びRosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) を参照されたい）が含まれる。

40

50

【0110】

4. ヒト抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で知られている様々な技法を用いて产生することができる。ヒト抗体は、概して、van Dijk et al., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368 - 74 (2001) 及び Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450 - 459 (2008) に記載されている。

【0111】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を有するインタクトな抗体を产生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製され得る。かかる動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するかもしくは動物の染色体内にランダムに組み込まれているヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23: 1117 - 1125 (2005) を参考のこと。例えば、米国特許第 6,075,181 号及び同第 6,150,584 号 (XENOMOUSE (商標) 技術について記載)、米国特許第 5,770,429 号 (Human Mab (登録商標) 技術について記載)、米国特許第 7,041,870 号 (K-Mouse (登録商標) 技術について記載)、ならびに米国特許出願公開第 US 2007/0061900 号 (VelociMouse (登録商標) 技術について記載) も参考されたい。かかる動物により生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによりさらに修飾されてもよい。

10

20

30

40

【0112】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によっても作製され得る。ヒトモノクローナル抗体の產生のためのヒト骨髄腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及び Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991) を参考されたい。) ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体についても、Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557 - 3562 (2006) に記載されている。さらなる方法としては、例えば、米国特許第 7,189,826 号 (ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト IgM 抗体の产生について記載) 及び Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4): 265 - 268 (2006) (ヒト - ヒトハイブリドーマについて記載) に記載の方法が挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術 (トリオーマ技術) もまた、Vollmers and Brandlein, *Hist. & Histopath.*, 20(3): 927 - 937 (2005) 及び Vollmers and Brandlein, *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(3): 185 - 91 (2005) に記載される。

【0113】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライプラリから選択される Fv クローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。次いで、かかる可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わされてもよい。抗体ライプラリからヒト抗体を選択するための技術は、以下に記載される。

【0114】

5. ライプラリ由来抗体

抗 K L K 5 抗体は、コンビナトリアルライプラリを、所望の活性 (複数可) を有する抗体についてスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージディスプレ

50

イライブラリを生成し、所望の結合特性を保有する抗体に関してかかるライブラリをスクリーニングするための様々な方法が当該技術分野で公知である。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. Methods Mol. Biol. 178: 1 - 37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) に概説され、さらに、例えば、McCafferty et al., Nature 352: 624 - 628 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1992)、Marks and Bradbury, Methods Mol. Biol. 248: 161 - 175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338 (2): 299 - 310 (2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340 (5): 1073 - 1093 (2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467 - 12472 (2004)、及びLee et al., J. Immunol. Methods 284 (1 - 2): 119 - 132 (2004) に記載される。

【0115】

ある特定のファージ提示法において、VH 及び VL 遺伝子のレパートリーが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により別個にクローニングされ、ファージライブラリ内で無作為に組換えられ、これがその後、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433 - 455 (1994) に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは典型的には、一本鎖 Fv (scFv) 断片または Fab 断片のいずれかとして抗体断片をディスプレイする。免疫化供給源由来のライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、高親和性抗体を免疫原に提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J., 12: 725 - 734 (1993) によって記載されるように、ナイープレパートリーは、(例えば、ヒトから) クローニングされて、いかなる免疫化も伴わずに、幅広い非自己抗原及び自己抗原に対する抗体の単一源を提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 - 388 (1992) に記載されるように、幹細胞からの再編成されていない V 遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有する PCR プライマーを使用して高度に可変的な CDR3 領域をコードし、インビトロでの再編成を達成することによってナイープライブラリを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリについて記載する特許公報としては、例えば：米国特許第 5,750,373 号、ならびに米国特許公開第 2005/0079574 号、同第 2005/0119455 号、同第 2005/0266000 号、同第 2007/0117126 号、同第 2007/0160598 号、同第 2007/0237764 号、同第 2007/0292936 号、及び同第 2009/0002360 号が挙げられる。

【0116】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

【0117】

6. 多重特異性抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗 KLK5 抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、結合特異性の一方は、KLK5 であり、他方は、任意の他の抗原へのものである。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、KLK5 の 2 つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体を使用して、KLK5 を発現する細胞に細胞傷害性剤を局所化することもできる。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製され得る。

【0118】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、異なる特異性を有する 2 つの免疫グロ

10

20

30

40

50

プリン重鎖 - 軽鎖対の組換え同時発現 (M il s t e i n and C u e l l o , N a t u r e 3 0 5 : 5 3 7 (1 9 8 3)) 、 W O 9 3 / 0 8 8 2 9 、 及び T r a u n e c k e r et al . , E M B O J . 1 0 : 3 6 5 5 (1 9 9 1) を参照されたい) 、 及び「ノブ・イン・ホール (k n o b - i n - h o l e) 」操作 (例えば、 米国特許第 5 , 7 3 1 , 1 6 8 号を参照されたい) が挙げられるが、 これらに限定されない。 多重特異性抗体はまた、 静電的ステアリング (e l e c t r o s t a t i c s t e e r i n g) 効果を操作して抗体 F c - ヘテロ二量体分子を作製すること (W O 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 A 1) 、 2 つ以上の抗体または断片を架橋すること (例えば、 米国特許第 4 , 6 7 6 , 9 8 0 号、 及び B r e n n a n et al . , S c i e n c e , 2 2 9 : 8 1 (1 9 8 5) を参考されたい) 、 ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を產生すること (例えば、 K o s t e l n y et al . , J . I m m u n o l . , 1 4 8 (5) : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 (1 9 9 2) を参考されたい) 、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること (例えば、 H o l l i n g e r et al . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) を参考されたい) 、 及び 1 本鎖 F v (s F v) 二量体を使用すること (例えば、 G r u b e r et al . , J . I m m u n o l . , 1 5 2 : 5 3 6 8 (1 9 9 4) を参考されたい) 、 ならびに例えば、 T u t t et al . , J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1) に記載される三重特異性抗体を調製することによって、 作製されてもよい。

【 0 1 1 9 】

「オクトパス抗体」を含む 3 つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体も、 本明細書に含まれる (例えば、 U S 2 0 0 6 / 0 0 2 5 5 7 6 A 1 を参考されたい) 。

【 0 1 2 0 】

本明細書の抗体または断片には、 K L K 5 及び別の異なる抗原などの目的のポリペプチドに結合する抗原結合部位を含む「二重作用 (D u a l A c t i n g) F A b 」または「 D A F 」も含まれる (例えば、 U S 2 0 0 8 / 0 0 6 9 8 2 0 を参考されたい) 。

【 0 1 2 1 】

B . K L K 5 結合ポリペプチド

本明細書に記載される方法における使用のための K L K 5 に結合する結合ポリペプチド (K L K 5 結合ポリペプチド) も提供される。 いくつかの実施形態では、 K L K 5 結合ポリペプチドは、 K L K 5 アンタゴニストである。 いくつかの実施形態では、 K L K 5 結合ポリペプチドは、 融合ポリペプチドである。 いくつかの実施形態では、 融合ポリペプチドは、 S P I N K 融合ポリペプチドである。 いくつかの実施形態では、 S P I N K 融合ポリペプチドは、 S P I N K F c 融合ポリペプチドである。 いくつかの実施形態では、 S P I N K F c 融合ポリペプチドは、 2 S P I N K ポリペプチドまたはそれらの断片を含む。 結合ポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、 2 S P I N K ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、 S P I N K 5 の 1 つ以上ドメインを含む。 いくつかの実施形態では、 2 S P I N K 5 ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 及び / または 8 カザールドメインを含む。 いくつかの実施形態では、 2 S P I N K 5 ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、 1 カザールドメイン (すなわち、 S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドあたり 2 カザールドメイン) を含む。 いくつかの実施形態では、 2 S P I N K 5 ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、 4 カザールドメイン (すなわち、 S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドあたり 8 カザールドメイン) を含む。 いくつかの実施形態では、 4 カザールドメインは、 カザールドメイン 6 、 7 、 8 、 及び / または 9 である。 いくつかの実施形態では、 カザールドメイン 6 、 7 、 8 、 及び / または 9 は、 マウス S P I N K 5 (U N I P R O T Q 5 K 5 D 4) 由来である。 いくつかの実施形態では、 カザールドメイン 6 、 7 、 8 、 及び / または 9 は、 マウス S P I N K 5 (U N I P R O T Q 5 K 5 D 4) からのアミノ酸残基 E 4 2 1 - A 6 9 5 を含む。 いくつかの実施形態では、 S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、 配列番号 1 7 の S P I N K 5 アミノ酸配列を含む。 いくつかの実施形態では、 S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドの F c 領域は、 I g G 1 F c 領域、 I g G 2 a F c 領域、 及び I g G 4

10

20

30

40

50

F c 領域からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、I g G 2 a F c 領域は、I g G 2 a F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 2 a F c 領域は、マウス I g G 2 a F c 領域である。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、2 S P I N K 5 ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、1 カザールドメイン（すなわち、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドあたり 2 カザールドメイン）を含む。いくつかの実施形態では、1 カザールドメインは、カザールドメイン 4 である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 4 は、マウス S P I N K 5 (UNIPROT Q5K5D4) 由来である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 4 は、マウス S P I N K 5 (UNIPROT Q5K5D4) からのアミノ酸残基 M293 - R355 を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドの F c 領域は、I g G 1 F c 領域、I g G 2 a F c 領域、及び I g G 4 F c 領域からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 2 a F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 2 a F c 領域は、マウス I g G 2 a F c 領域である。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 22 の S P I N K 5 アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、4 カザールドメインは、カザールドメイン 8、9、10、及び / または 11 である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 8、9、10、及び / または 11 は、ヒト S P I N K 5 (UNIPROT Q9NQ38) 由来である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 8、9、10、及び / または 11 は、ヒト S P I N K 5 (UNIPROT Q9NQ38) からのアミノ酸残基 E490 - Y757 を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 15 の S P I N K 5 アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドの F c 領域は、I g G 1 F c 領域、I g G 2 a F c 領域、及び I g G 4 F c 領域からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 1 F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 1 F c 領域は、ヒト I g G 1 F c 領域である。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 1 F c 領域は、356 位のアミノ酸 E を有する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 1 F c 領域は、358 位のアミノ酸 M を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 4 F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 4 F c 領域は、ヒト I g G 4 F c 領域である。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 4 F c 領域は、228 位のアミノ酸 S を有する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 4 F c 領域は、228 位のアミノ酸 P を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、2 S P I N K 5 ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、1 カザールドメイン（すなわち、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドあたり 2 カザールドメイン）を含む。いくつかの実施形態では、1 カザールドメインは、カザールドメイン 5 である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 5 は、ヒト S P I N K 5 (UNIPROT Q9NQ38) 由来である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 5 は、ヒト S P I N K 5 (UNIPROT Q9NQ38) からのアミノ酸残基 R291 - R352 を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドの F c 領域は、I g G 1 F c 領域、I g G 2 a F c 領域、及び I g G 4 F c 領域からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 1 F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 1 F c 領域は、ヒト I g G 1 F c 領域である。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 1 F c 領域は、356 位のアミノ酸 E を有する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 1 F c 領域は、358 位のアミノ酸 M を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 20 の S P I N K 5 アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 4 F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 4 F c 領域は、ヒト I g G 4 F c 領域である。
10
20
30
40
50

F c 領域である。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 4 F c 領域は、228位のアミノ酸 S を有する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 4 F c 領域は、228位のアミノ酸 P を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む。

【0122】

結合ポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、2 S P I N K ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、S P I N K 9 の 1 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、2 S P I N K 9 ポリペプチドまたはそれらの断片の各々は、1 カザールドメイン（すなわち、S P I N K 9 F c 融合ポリペプチドあたり 2 カザールドメイン）を含む。いくつかの実施形態では、1 カザールドメインは、カザールドメイン 1 である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 1 は、ヒト S P I N K 9 (UNIPROT Q5DT21) 由来である。いくつかの実施形態では、カザールドメイン 1 は、ヒト S P I N K 9 (UNIPROT Q5DT21) からのアミノ酸残基 I 20 - C 86 を含む。いくつかの実施形態では、ヒト S P I N K 9 からの I 20 - C 86 は、22位のアミノ酸 C を含む。いくつかの実施形態では、ヒト S P I N K 9 からの I 20 - C 86 は、22位のアミノ酸 S を含む。いくつかの実施形態では、ヒト S P I N K 9 からの I 20 - C 86 は、48位のアミノ酸 H を含む。いくつかの実施形態では、ヒト S P I N K 9 からの I 20 - C 86 は、配列番号 28 の S P I N K 9 アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 F c 融合ポリペプチドのヒト F c 領域は、I g G 1 F c 領域、I g G 2 a F c 領域、及び I g G 4 F c 領域からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 1 F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 1 F c 領域は、ヒト I g G 1 F c 領域である。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 1 F c 領域は、356位のアミノ酸 E を有する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 1 F c 領域は、358位のアミノ酸 M を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 2 a F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 2 a F c 領域は、ヒト I g G 2 a F c 領域である。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 4 F c 領域である。いくつかの実施形態では、I g G 4 F c 領域は、ヒト I g G 4 F c 領域である。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 4 F c 領域は、228位のアミノ酸 S を有する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 4 F c 領域は、228位のアミノ酸 P を有する。いくつかの実施形態では、S P I N K 9 F c 融合ポリペプチドは、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む。

【0123】

K L K 5 結合ポリペプチドは、既知のポリペプチド合成方法を使用して化学合成されてもよく、または組換え技術を使用して調製及び精製されてもよい。K L K 5 結合ポリペプチドは、通常、少なくとも約 5 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、及び / または 100 アミノ酸長、及び / またはそれ以上であるが、かかる K L K 5 結合ポリペプチドは、K L K 5 に、好ましくは特異的に、結合することができる。

【0124】

K L K 5 結合ポリペプチドは、過度の実験なしに周知の技法を使用して特定され得る。これに関して、ポリペプチドライブラリを K L K 5 に特異的に結合することができる結合ポリペプチドについてスクリーニングするための技法は、当該技術分野で周知であることが留意される（例えば、米国特許第 5,556,762 号、同第 5,750,373 号、同第 4,708,871 号、同第 4,833,092 号、同第 5,223,409 号、同第 5,403,484 号、同第 5,571,689 号、同第 5,663,143 号、P C

10

20

30

40

50

T公開第WO 84 / 03506号及び第WO 84 / 03564号、Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81: 3998 - 4002 (1984)、Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82: 178 - 182 (1985)、Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130 - 149 (1986)、Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259 - 274 (1987)、Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611 - 616 (1988)、Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378、Lowman, H. B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832、Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624、Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581、Kang, A. S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363、及びSmith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668を参照されたい)。

【0125】

ペプチドライブリを生成する方法及びこれらのライブリをスクリーニングする方法は、米国特許第5,723,286号、同第5,432,018号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,498,530号、同第5,770,434号、同第5,734,018号、同第5,698,426号、同第5,763,192号、及び同第5,723,323号にも開示される。

【0126】

C. K L K 5 小分子アンタゴニスト

本明細書に提供されるものは、上に記載される方法における使用のためのK L K 5 小分子アンタゴニストとしての使用のための小分子である。いくつかの実施形態では、小分子アンタゴニストは、K L K 5 生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する。いくつかの実施形態では、生物学的活性は、セリンプロテアーゼ活性である。いくつかの実施形態では、生物学的活性は、トリプシン様セリンプロテアーゼ活性である。いくつかの実施形態では、K L K 5 小分子アンタゴニストは、プロテアーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ阻害剤は、ロイペプチドである。

【0127】

小分子は、好ましくは、本明細書に記載されるK L K 5 に、好ましくは特異的に、結合する、本明細書に定義される結合ポリペプチドまたは抗体以外の有機分子である。結合有機小分子は、既知の方法論を用いて特定または化学合成され得る（例えば、PCT公開第WO 00 / 00823号及び同第WO 00 / 39585号を参照されたい）。結合有機小分子は、通常、約2000ダルトン未満の大きさであり、あるいは約1500、750、500、250、または200ダルトン未満の大きさであり、本明細書に記載されるポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合することができる、かかる有機小分子は、周知の技法を用いて過度な実験なしに特定され得る。これに関して、有機小分子ライブリを目的のポリペプチドに結合することができる分子についてスクリーニングするための技法は、当該技術分野で周知であることが留意される（例えば、PCT公開第WO 00 / 00823号及び同第WO 00 / 39585号を参照されたい）。結合有機小分子は、例えば、アルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、ウレア、カルバメート、カルボネート、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、スルホン酸アリール、ハロゲン化アルキル、スルホン酸アルキル、芳香族化合物、複素環式化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアネート、スルホニルクロリド、ジアゾ化合

10

20

30

40

50

物、酸クロリドなどであり得る。

【0128】

D. K L K 5 アンタゴニストポリヌクレオチド

本明細書に提供されるものはまた、本明細書に記載される方法における使用のための K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニストである。K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニストは、アンチセンス核酸及び / またはリボザイムであり得る。アンチセンス核酸は、K L K 5 の R N A 転写物の少なくとも一部分に相補的な配列を含む。しかしながら、絶対相補性は、好ましいが、必要ではない。

【0129】

K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニストは、K L K 5 核酸配列（例えば、C R I S P R - R N A 及び t r a c r R N A 配列を有する s g R N A を含む、s i R N A 及び C R I S P R - R N A ）にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸であり得る。M a l i e t a l . , S c i e n c e . 3 3 9 : 8 2 3 - 2 6 , (2 0 1 3) を参照されたい。

10

【0130】

本明細書において言及される「R N A の少なくとも一部分に相補的な」配列とは、R N A とハイブリダイズすることができ、安定な三本鎖を形成する十分な相補性を有する配列を意味し、二本鎖アンチセンス核酸の場合、二本鎖D N A の一本鎖がよって試験され得るか、または三本鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度及びアンチセンス核酸の長さの両方に依存するであろう。一般的には、ハイブリダイズ核酸が大きいほど、R N A との塩基ミスマッチが多く、安定な二本鎖（または場合によっては三本鎖）を含有し、依然として形成し得る。当業者は、ハイブリダイズされた複合体の融点を決定するための標準的な手順の使用によって許容可能な程度のミスマッチを確認することができる。

20

【0131】

メッセージの5'末端、例えば、A U G 開始コドンまで及びこれを含む5'未翻訳配列に相補的であるポリヌクレオチドは、翻訳を阻害するのに最も効率的に機能すべきである。しかしながら、m R N A の3'未翻訳配列に相補的な配列は、m R N A の翻訳を阻害するのに有効であることも示された。一般的には、W a g n e r , R . , 1 9 9 4 , N a t u r e 3 7 2 : 3 3 3 - 3 3 5 を参照されたい。よって、遺伝子の5' - または3' - 非翻訳、非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内在性m R N A の翻訳を阻害するためのアンチセンスアプローチにおいて使用することができる。m R N A の5'未翻訳領域に相補的なポリヌクレオチドは、A U G 開始コドンの補体を含むべきである。m R N A コード領域に相補的なアンチセンスポリヌクレオチドは、翻訳の効率的でない阻害剤である。m R N A の5' - 、3' - 、またはコード領域にハイブリダイズするように設計されるかにかかわらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6個のヌクレオチドの長さであるべきであり、好ましくは6 ~ 約50個の範囲のヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドである。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも50ヌクレオチドである。

30

【0132】

E. 本明細書に記載される抗体及び結合ポリペプチドの変異型

1. グリコシル化変異型

上記実施形態のいずれかでは、本明細書に提供される抗体（例えば、抗K L K 5 抗体）または結合ポリペプチド（例えば、K L K 5 結合ポリペプチド）は、抗体または結合ポリペプチドがグリコシル化される程度を増加または減少させるように改変される。グリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作製または除去されるようアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成され得る。

40

【0133】

抗体または結合ポリペプチドがF c 領域を含む場合、それに結合した炭水化物が改変さ

50

れ得る。哺乳動物細胞によって産生された天然抗体は、典型的には、N結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に一般に結合される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26-32(1997)を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体または結合ポリペプチドにおけるオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を有する変異型を作製するために行われ得る。

【0134】

一実施形態では、Fc領域に(直接的にまたは間接的に)結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体または結合ポリペプチド変異型が提供される。例えば、かかる抗体またはFc融合ポリペプチド中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であり得る。フコースの量は、例えば、WO2008/077546で説明されているMALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に結合した全ての糖構造(例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造)の合計に対する、Asn297での糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域内の約297位(Fc領域残基のEU番号付け)に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体または結合ポリペプチドにおける小規模な配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸の上流または下流、すなわち、294~300位の間に位置してもよい。かかるフコシル化変異型は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許公開第US2003/0157108号(Presta, L.)、同第US2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異型に関する刊行物の例としては: US2003/0157108、WO2000/61739、WO2001/29246、US2003/0115614、US2002/0164328、US2004/0093621、US2004/0132140、US2004/0110704、US2004/0110282、US2004/0109865、WO2003/085119、WO2003/084570、WO2005/035586、WO2005/035778、WO2005/053742、WO2002/031140、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004)、Yamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng. 87:614(2004)が挙げられる。脱フコシル化抗体を產生することができる細胞株の例としては、ポリペプチドフコシル化が不足したLec13 CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986)、米国特許出願第US2003/0157108A1号、Presta, L. 及びWO2004/056312A1、Adams et al.、特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、例えば、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614(2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006)、及びWO2003/085107を参照されたい)が挙げられる。

【0135】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分オリゴ糖を有する抗体変異型がさらに提供される。かかる抗体変異型は、低減されたフコシル化機能を有しても、及び/または改善されたADCC機能を有してもよい。かかる抗体変異型の例は、例えば、WO2003/011878(Jean-Mairet et al.)、米国特許第6,602,684号(Umana et al.)、及びUS2005/0123546号(Umana et al.)に記載されている。Fc領域に付着しているオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を含む抗体変異型も

10

20

30

40

50

提供される。かかる抗体変異型は、改善されたCDC機能を有し得る。かかる抗体変異型は、例えば、WO 1997/30087 (Patel et al.)、WO 1998/58964 (Raju, S.)、及びWO 1999/22764 (Raju, S.)に記載されている。

【0136】

2. Fc領域変異型

いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ酸修飾は、抗体（例えば、抗KLK5抗体）または結合ポリペプチド（例えば、KLK5結合ポリペプチド）のFc領域に導入され得る。Fc領域変異型は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4Fc領域）を含み得る。

【0137】

いくつかの実施形態では、提供されるものは、全てではないがいくつかのエフェクター機能を有し、そのためインビボでの抗体または結合ポリペプチドの半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能（補体及びADCCなど）が不要または有害である用途に望ましい候補である抗体変異型または結合ポリペプチドである。インビトロ及び/またはインビボ細胞傷害アッセイを行って、CDC及び/またはADCC活性の低減/欠乏を確認してもよい。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実行して、抗体または結合ポリペプチドがFcR結合を欠く（故にADCC活性を欠く可能性が高い）が、FcRn結合能力を保持していることを確実にし得る。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞がFc(RIII)のみを発現する一方で、単球は、Fc(RI)、Fc(RII)、及びFc(RIII)を発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)の464頁の表3に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照されたい）及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)、同第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照されたい）に記載される。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞傷害アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、及びCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞傷害アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照のこと）。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは、または加えて、目的とする分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)に開示される動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができないためにCDC活性を欠くことを確認してもよい。例えば、WO 2006/029879及びWO 2005/100402におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照されたい）。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の決定は、当該技術分野で既知の方法を使用して行うこともできる（例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照されたい）。

【0138】

10

20

30

40

50

低減したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有するものが挙げられる（米国特許第6,737,056号）。かかるFc変異体としては、アミノ酸265、269、270、297、及び327位のうちの2つ以上での置換を有するFc変異体、例えば、残基265及び297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体が挙げられる（米国特許第7,332,581号）。

【0139】

FcRへの結合が改善または減少した特定の抗体または結合ポリペプチド変異型が記載されている。（例えば、米国特許第6,737,056号、WO 2004/056312、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい。）いくつかの実施形態では、抗体変異型または結合ポリペプチド変異型は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、及び/または334位（残基のEU番号付け）での置換を有するFc領域を含む。いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、WO 99/51642、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184(2000)に記載されるように、変化した（すなわち、改善されたかまたは減少したかのいずれかの）C1q結合及び/または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす変化が、Fc領域において行われる。

10

【0140】

母体IgGの胎児への移入の原因である、増加した半減期及び新生児型Fc受容体（FcRn）への改善された結合を有する抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117:587(1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249(1994)）は、US 2005/0014934A1（Hinton et al.）に記載される。それらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する、1つ以上の置換を内部に有するFc領域を含む。かかるFc変異型は、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434のうちの1つ以上の置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものを含む（米国特許第7,371,826号）。Fc領域変異型の他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322:738-40(1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及びWO 94/29351も参照されたい。

20

30

【0141】

3. システイン操作変異型

いくつかの実施形態では、1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体（例えば、抗KLK5抗体）または結合ポリペプチド（例えば、KLK5結合ポリペプチド）を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換された残基は、抗体または結合ポリペプチドのアクセス可能な部位で生じる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それにより抗体のアクセス可能な部位に位置付けられ、抗体または結合ポリペプチドを薬物部分またはリンカー-薬物部分などの他の部分に抱合して、本明細書にさらに記載される免疫抱合体を作製するために使用され得る。いくつかの実施形態では、以下の残基のうちの任意の1つ以上を、システインで置換してもよい：軽鎖のV205（Kabat番号付け）；重鎖のA118（EU番号付け）；及び重鎖Fc領域のS400（EU番号付け）。システイン操作された抗体またはFc融合ポリペプチドは、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように生成され得る。

40

【0142】

4. アミノ酸変異型抗体変異型

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体（例えば、抗KLK5抗体）または結合ポリペプチド（例えば、KLK5結合ポリペプチド）のアミノ酸配列変異型が企図

50

される。例えば、抗体または結合ポリペプチドの結合親和性及び / または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体または結合ポリペプチドのアミノ酸配列変異型は、抗体もしくは結合ポリペプチドをコードするスクレオチド配列中に適切な修飾を導入することによるか、またはペプチド合成により調製され得る。かかる修飾としては、例えば、抗体または結合ポリペプチドのアミノ酸配列内における、残基からの欠失、及び / または残基への挿入、及び / または残基の置換が挙げられる。最終構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを行うことができるが、最終構築物が所望の特性、例えば、抗原結合を保有することを条件とする。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異型または結合ポリペプチド変異型が提供される。置換変異原性のための目的の部位は、H V R 及び F R を含む。保存的置換は、表1において「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表1において「例示的な置換」の見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラスを参照してさらに以下に記載される。アミノ酸置換は、抗体または結合ポリペプチドに導入され得、生成物は、所望の活性、例えば、保持 / 改善された抗原結合、減少した免疫原性、または改善された A D C C もしくは C D C についてスクリーニングされ得る。

表 1

10

20

30

40

50

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン	L e u

10

20

30

40

【0144】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って分類してもよい：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；
- (3) 酸性：A s p、G l u；
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎮の配向性に影響を与える残基：G l y、P r o；
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0145】

50

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0146】

5. 誘導体

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体（例えば、抗K L K 5抗体）または結合ポリペプチド（例えば、K L K 5結合ポリペプチド）は、当該技術分野で既知であり、容易に利用可能である追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾することができる。抗体または結合ポリペプチドの誘導体化に適した部分としては、限定するものではないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、及びデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造時に有利であり得る。ポリマーは、いずれの分子量のものであってもよく、分岐状であっても非分岐状であってもよい。抗体及び／または結合ポリペプチドに結合したポリマーの数は異なつてもよく、2つ以上のポリマーが結合している場合、それらは同じまたは異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／または種類は、改善される抗体及び／または結合ポリペプチドの特定の特性または機能、抗体誘導体及び／または結合ポリペプチドが定義された条件下である療法に使用されるなどを含むが、これらに限定されない、考慮すべき事項に基づいて決定され得る。

【0147】

別の実施形態では、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体及び／または結合ポリペプチドの非タンパク質性部分との抱合体が提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである（Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)）。放射線は、いずれの波長のものであってもよく、これには、限定するものではないが、通常の細胞を傷つけないが、抗体及び／または結合ポリペプチド-非タンパク質性部分に近接する細胞が殺滅される温度まで非タンパク質性部分を加熱する波長が含まれる。

【0148】

I V . 薬学的製剤及び投与方法

本明細書に記載されるK L K 5アンタゴニストの薬学的製剤は、所望の純度を有するかかるアンタゴニストを、凍結乾燥した製剤または水溶液の形態にある1つ以上の任意の薬学的に許容される担体と混合することによって調製される。Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)を参照されたい。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるK L K 5アンタゴニストは、抗体（例えば、抗K L K 5抗体）、結合ポリペプチド（例えば、K L K 5結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、CRISPR-RNA及びtracrRNA配列を有するsgRNAを含む、siRNAまたはCRISPR-RNAなどのK L K 5ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤）である。

【0149】

薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量及び濃度ではレシピエントに非毒性であり、それらとしては、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化物質；防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニ

10

20

30

40

50

ウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；单糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及び/またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(SHASEGP)、例えば、rHuPH20(HYLENEX(登録商標))、Baxter International, Inc.)などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質などの介在性薬物分散剤をさらに含む。rHuPH20を含む、ある特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0150】

例示的な凍結乾燥製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤には、米国特許第6,171,586号及びWO2006/044908号に記載されるものが含まれ、後者の製剤は、ヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0151】

本明細書における製剤はまた、治療される特定の適応症に必要な2つ以上の活性成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有してもよい。かかる活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせて好適に存在する。

【0152】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル)内、またはマクロ乳濁液中にも取り込まれ得る。Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)を参照されたい。

【0153】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性調製物の好適な例としては、KLK5アンタゴニストを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【0154】

インビオ投与に使用される製剤は一般に、滅菌される。滅菌性は、例えば、滅菌ろ過膜を通したろ過によって容易に達成され得る。

【0155】

本明細書にさらに提供されるものは、本明細書に記載される方法における使用のためのKLK5アンタゴニストを含む薬学的製剤である。いくつかの実施形態では、製剤は、薬学的に許容される担体、アジュバント、またはビヒクルを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、KLK5プロテアーゼ活性を測定可能な程度に阻害するのに有効な量の化合物を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、それを必要とする対象への投与のために製剤化される。

【0156】

KLK5アンタゴニストを含む製剤は、経口、非経口、吸入スプレーにより、局所、経

10

20

30

40

50

皮、直腸、経鼻、口腔内、舌下、経膣、腹腔内、肺内、皮内、硬膜外、または移植リザーバーを介して投与され得る。本明細書で使用される場合、「非経口」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液内、胸骨内、髄腔内、肝内、病巣内及び頭蓋内注射または注入技術を含む。

【0157】

任意の特定の対象に対する特定の投薬量及び治療レジメンは、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、治療する医師の判断、及び治療される特定の疾患の重症度を含む、様々な因子に依存するであろう。製剤中の提供されるKLK5アンタゴニストの量も、製剤中の特定の化合物に依存するであろう。

【0158】

一実施形態では、用量あたり投与されるKLK5アンタゴニストの有効量は、1日あたり対象体重の約0.01～100mg/kg、代替的に約0.1～20mg/kgの範囲であり、使用される化合物の典型的な初期範囲は、0.3～15mg/kg/日である。

10

【0159】

KLK5アンタゴニストは、単独でまたは上述の治療のための他の薬剤と組み合わせて使用され得る。例えば、薬学的併用製剤または投与計画の第2の薬剤は、それらが互いに悪影響を及ぼさないように、KLK5アンタゴニストに対して相補的な活性を有し得る。化合物は、単位薬学的製剤において共に、または別々に投与され得る。

【0160】

「同時投与する」という用語は、KLK5アンタゴニストと、さらなる活性薬学的成分（複数可）との、同時投与、または別個の連続投与の任意の方法のいずれかを指す。投与が同時ではない場合、化合物は、互いに近い時間で投与される。さらに、化合物が同じ剤形で投与されるかは問題ではなく、例えば、1つの化合物は局所投与され得、別の化合物は経口投与され得る。

20

【0161】

典型的には、治療される疾患または状態に対する活性を有する任意の薬剤は、同時投与され得る。かかる薬剤の例は、Cancer Principles and Practice of Oncology by V.T. DeVita and S. Hellmann (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishersにおいて見出すことができる。当業者であれば、関与する薬物及び疾患の特定の特徴に基づいて、薬剤のどの組み合わせが有用であるか識別することができるであろう。

30

【0162】

V. 所望の機能を有するKLK5アンタゴニストをスクリーニング及び/または特定する方法

抗体（例えば、抗KLK5抗体）、結合ポリペプチド（例えば、KLK5結合ポリペプチド）、ポリヌクレオチド（例えば、CRISPR-RNA及びtracrRNA配列を有するsgRNAを含む、siRNAまたはCRISPR-RNAなどのKLK5ポリヌクレオチドアンタゴニスト）、及び小分子（例えば、小分子プロテアーゼ阻害剤などのKLK5小分子アンタゴニスト）を含む、本明細書に記載される方法における使用のための追加のKLK5アンタゴニストは、それらの物理的/化学的特性及び/または生物学的活性について、当該技術分野で既知の様々なアッセイによって、特定され得るか、スクリーニングされ得るか、または特徴付けられ得る。

40

【0163】

候補KLK5アンタゴニストは、化学実体または断片がKLK5上の個別の結合標的部位と関連するそれらの能力についてスクリーニング及び選択される、一連のステップの手段によって計算的に評価及び設計され得る。当業者は、KLK5、及びより具体的にはKLK5上の標的部位と関連するそれらの能力について化学実体または断片をスクリーニングするいくつかの方法のうちの1つを使用し得る。プロセスは、例えば、コンピュータ画面上の標的部位の、KLK5座標、または当該技術分野で既知のそれらの座標のサブセッ

50

トに基づく、目視検査によって開始し得る。

【0164】

スクリーニング及び／または特定する方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、候補 K L K 5 アンタゴニストは、抗 K L K 5 抗体、K L K 5 結合ポリペプチド（例えば、S P I N K 5 F c 融合ポリペプチドまたは S P I N K 9 F c 融合ポリペプチド）、K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト、または K L K 5 小分子アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 の生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する。いくつかの実施形態では、生物学的活性は、セリンプロテアーゼ活性である。いくつかの実施形態では、生物学的活性は、トリプシン様セリンプロテアーゼ活性である。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 上の特異的結合領域に結合する。いくつかの実施形態では、K L K 5 アンタゴニストは、K L K 5 の活性部位に結合する。

【0165】

本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体、K L K 5 結合ポリペプチド、K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト、及び／または K L K 5 小分子アンタゴニストは、それらの物理的／化学的特性及び／または生物学的活性について、当該技術分野で既知の様々なアッセイによって、特定され得るか、スクリーニングされ得るか、または特徴付けられ得る。

【0166】

一態様では、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体、K L K 5 結合ポリペプチド、K L K 5 ポリヌクレオチドアンタゴニスト、及び／または K L K 5 小分子アンタゴニストは、その K L K 5 結合活性について、例えば、E L I S A、ウエスタンプロットティング分析、スキャッチャードによる細胞表面結合、または表面プラズモン共鳴などの既知の方法によって試験される。別の態様では、K L K 5 への結合について本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体または K L K 5 結合ポリペプチドと競合する抗体を特定するために、競合アッセイが使用され得る。さらなる態様では、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体または K L K 5 結合ポリペプチドは、生物学的試料中に存在する K L K 5 の存在または量を検出するために使用することができる。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、試料中の任意の F c 受容体を飽和するために、まず非特異的アイソタイプ対照抗体で遮断される。

【0167】

一態様では、アッセイは、本明細書に提供される抗 K L K 5 抗体または K L K 5 結合ポリペプチドの生物学的活性を特定するために提供される。いくつかの実施形態では、生物学的活性を特定するためのかかるアッセイは、例えば、ペプチド基質アッセイまたは結合アッセイである。抗 K L K 5 抗体または K L K 5 結合ポリペプチドの生物学的活性は、例えば、K L K 5 に結合すること、及びそれによって K L K 5 の生物学的活性を低減することを含み得る。いくつかの実施形態では、抗 K L K 5 抗体または K L K 5 結合ポリペプチドの生物学的活性は、K L K 5 ポリペプチド（例えば、K L K 7、K L K 8、及び K L K 14）の他の種に結合すること、及びそれによってそれらの生物学的活性を低減することを含み得る。

【0168】

V I . 製造物品

別の態様では、上述の障害の治療、予防、及び／または診断に有用な材料を含有する製造物品が提供される。製造物品は、容器と、容器上のもしくは容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、I V 溶液バッグなどが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成され得る。容器は、それ自体で、または別の製剤との組み合わせで、状態の治療、予防、及び／または診断に有効な製剤を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって穿孔可能な栓を有するバイアルであり得る）。製剤中の少なくとも 1 つの活性剤は、本明細書に記載される K L K 5 アンタゴニストである。ラベルまたは添付文書は、製剤が、選択される状態を治療するために使用されることを示す。また、製造物品は、(a) K L K 5 アンタゴニストを含む製剤を内部に

10

20

30

40

50

収容した第1の容器と、(b)喘息療法剤を含む製剤を内部に収容した第2の容器とを含み得る。

【0169】

いくつかの実施形態では、製造物品は、容器、その容器上のラベル、及びその容器内に収容される製剤を含み、製剤は、1つ以上の試薬（例えば、1つ以上のバイオマーカーまたは本明細書に記載されるバイオマーカーのうちの1つ以上に対するプローブ及び／またはプライマーに結合する一次抗体）を含み、容器上のラベルは、製剤が試料中の1つ以上のバイオマーカーの存在を評価するために使用され得ること、及び試料中の1つ以上のバイオマーカーの存在を評価するために試薬を使用するための説明を示す。製造物品は、試料の調製及び試薬の利用のための説明及び材料のセットをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、製造物品は、一次抗体及び二次抗体の両方などの試薬を含んでもよく、二次抗体は、標識、例えば、酵素標識に抱合される。いくつかの実施形態では、製造物品は、本明細書に記載されるバイオマーカーのうちの1つ以上に対する1つ以上のプローブ及び／またはプライマーを含む。

10

【0170】

製造物品のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KLK5アンタゴニストは、本明細書に提供される抗KLK5抗体、KLK5結合ポリペプチド、KLK5ポリヌクレオチドアンタゴニスト、及び／またはKLK5小分子アンタゴニストである。

【0171】

この実施形態における製造物品は、製剤が特定の状態を治療するために使用され得ることを示す添付文書をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、添付文書は、KLK5アンタゴニストを喘息療法剤として投与するための説明を含む。あるいは、または加えて、製造物品は、注射用静菌水(BWFⅠ)、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、及びデキストロース溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2の(または第3の)容器をさらに含み得る。これは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及びユーザー観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

20

【0172】

製造物品における他の任意の成分としては、1つ以上の緩衝液（例えば、ロック緩衝液、洗浄緩衝液、基質緩衝液など）、酵素標識により化学的に変化する基質（例えば、クロモゲン）などの他の試薬、エピトープ抽出溶液、対照試料（正及び／または負の対照）、対照スライド（複数可）などが挙げられる。

30

【実施例】

【0173】

以下は、方法及び製剤の例である。上述の概要を考慮すると、様々な他の実施形態が実施され得ることが理解される。本明細書に提供される任意及び全ての例または例示的な言語（例えば、「～など」）の使用は、単に実施形態を良好に解明することを意図しており、特許請求の範囲において特に具体的に列挙されない限り、必ずしも任意の制限を課すものではない。本明細書に引用される全ての文書は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【0174】

40

実施例1

材料及び方法

全ての施設内研究は、地方施設内審査委員会によって審査及び承認された。加えて、全ての対象は、遺伝子型判定前にインフォームドコンセントを与えた。遺伝子型判定は、表2にまとめる様々な異なるプラットフォーム上で行われた。

表2

50

データセット_名	ゲノムワイド_SNP_アレイ_ID
A 1	不明
A 2	不明
A 3	HumanOmni2.5M-8v1-1_B.bpm
C 1	不明
C 2	HumanOmni2.5M-8v1-1_B.bpm
C 3	不明
E	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
B	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
M I	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
V	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
MO	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
L	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
CG	HumanHap550v3
NY	HumanHap550v3

10

20

30

40

【0175】

試料QCを、この順序(1)コールレート<95%(N=84除去)(2)ヘテロ接合性(N=82除去)(3)関連性/重複/IBD(N=22除去)(4)祖先外れ値(N=262除去)で行った。各別個のデータセットについて、EIGENSTRAT分析をHapMap試料で行い、ヨーロッパ(CEPH及びTSI)群に関して外れ値であった場合に試料を除外した(N=383)。

【0176】

SNP QCを行い、(1)コールレート<95%を有した場合、(2)単型であった場合、及び(3)ハーディー-ワインベルグ平衡($P < 1 \times 10^{-7}$)から強く逸脱した場合、SNPを除外した。そのビルトにアラインされていないデータセットについてhg19へのリフトオーバーを行った。加えて、代入バイオラインは、HapMapデータがプラス鎖上にあったので、全てのデータセットがプラスにアラインされることを必要とする。Shapeitを使用して鎖の問題を確認し、可能な場合はプラス鎖にひっくり返した。最後に、代入についてchr1-chr22におけるSNPを選択した。合わせた発見データセットは、喘息症例データセット及び集団に基づくデータセットに重複する299,784個のSNPを有した。複製データセットを構成する8つの異なる症例及び対照データセットに重複する230,853個のSNPがあった。

【0177】

ゲノムワイド代入を、HapMap参照ハプロタイプ及び品質管理を通る遺伝子型データを推論として用いて行った。代入後遺伝子型隔離をSNPTESTv2においてロジスティック回帰モデルに使用した。加えて、発見データセットを、重要な主成分について調

50

節することによって集団層化及び複製データセットのために調節し、分散の > 1 % を説明する P C を選択した（以下参照）。代入情報 < 0 . 6 を有する S N P を分析から除外した。追加の分析後 Q C は、対照において M A F < 2 % を有する任意の S N P ならびに組み合わされた症例及び対照において H W E p 値 < 1 E - 1 0 を有する S N P の除去を含む。次いで P L I N K を用いて、発見及び複製結果についてメタ分析を行った。0 . 1 の異質性 p 値カットオフを用いて、メタ分析には固定効果またはランダム効果モデルが使用されるべきかを決定した。

【 0 1 7 8 】

この分析において使用される G T E x データは、オンライン G T E x Portal (<http://www.gtexportal.org/home/testyourown>) から得た。検索は、2016年11月11日に行われ、K L K 5 について入力されたコマンドは、r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 , K L K 5 , E s o p h a g u s _ G a s t r o e s o p h a g e a l _ J u n c t i o n ; r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 , K L K 5 , E s o p h a g u s _ M u s c u l a r i s ; r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 , K L K 5 , S k i n _ N o t _ S u n _ E x p o s e d _ S u p r a p u b i c ; r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 , K L K 5 , S k i n _ S u n _ E x p o s e d _ L o w e r _ l e g であった。K L K 4 について入力されたコマンドは、r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 , K L K 4 , P r o s t a t e ; r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 , K L K 4 , U t e r u s であった。

【 0 1 7 9 】

K L K 5 に対する S P I N K 9 の結合親和性を、B I A c o r e (商標) - T 2 0 0 装置を使用する表面プラズモン共鳴 (S R P) によって測定した。インハウスで発現したマウス I g G 2 a 断片結晶化可能領域 (F c) を有する S P I N K 9 を、タンパク質 A バイオセンサーチップ (G E H e a l t h c a r e 、カタログ番号 2 9 1 2 7 5 5 7) によって捕捉して約 1 0 0 応答単位 (R U) を達成した。動態測定のために、ヒト K L K 5 結合ポリペプチドの4倍段階希釈物 (2 0 0 n M ~ 0 . 1 9 5 3 n M) を、3 0 μ l / 分で H B S - T 緩衝液に 2 5 で注入した。会合速度 (k o n) 及び解離速度 (k o f f) を、単純な 1 対 1 の L a n g m u i r 結合モデル (B I A c o r e E v a l u a t i o n T 2 0 0 S o f t w a r e バージョン 2 . 0) を用いて計算した。平衡解離定数 (K D) を k o f f / k o n 比として計算した。

【 0 1 8 0 】

メタ分析において使用される対象

合計 1 , 3 5 0 人の成人喘息患者及び 3 , 6 9 0 人の対照をメタ分析に使用した。これらのうち、品質管理手段後、6 6 7 人の喘息患者は低 2 型喘息（低ペリオスチンと呼ばれる）群に、6 2 6 人は 2 型炎症（高ペリオスチンと呼ばれる）群に含まれた。症例の平均年齢は 4 5 歳 (S D = 1 5) であり、対照について 4 1 歳 (S D = 1 5) であった。全ての対象はヨーロッパコーカソイド系であった。対象の大部分 (5 7 . 8 %) は女性であった。予測された平均 F E V 1 % は、症例において 7 2 . 9 (S D = 1 7) 及び対照において 1 0 1 . 6 (S D = 8) であった。症例及び対照は 2 つのコホートに分けられた。コホート 1 は、レブリキズマブ (抗 I L - 1 3) 及び X o l a i r (抗 I g E) についての G e n e n t e c h 觀察及び臨床試験から得られた喘息患者の D N A 試料を含んだ (合計 N = 5 2 0)。コホート 2 は、レブリキズマブ (N = 2 3 4) についての G e n e n t e c h 臨床試験から、ならびに Q u e e n s l a n d I n s t i t u t e f o r M e d i c a l R e s e a r c h (N = 7 7 4) 及び U n i v e r s i t y o f C h i c a g o (N = 2 2 6) で確認された成人喘息患者から得られた D N A 試料の完全に独立したセットを含んだ。試料は、遺伝的に決定された祖先に基づいて選択された対照と比較され (コホート 1, N = 3 , 1 2 0)、喘息について陰性であることが呼吸器科医によってスクリーニングされた (コホート 2, N = 1 , 1 4 6)。全ての症例、及びコホート 2 からの対照を血清ペリオスチンレベルについてアッセイし、ペリオスチンレベル中央値を使用して、対象を低ペリオスチン及び高ペリオスチン下位群に分けた。各コホートの特徴を表 3 に示した。表は、Q C を通り、分析に含まれた試料のみを含む。

10

20

30

40

50

表 3

	コホート1		コホート2	
	症例	対照	症例	対照
N	468	2808	882	882
年齢、平均 (SD)	43.95 (13.1)	*	46.08 (15.2)	40.20 (14.9)
性別、N (%) 女性	299 (63.9%)	1437 (47.9%)	585 (66.3%)	580 (65.7%)
予測されるFEV ₁ %、平均 (SD)	70.8 (13.4)	—	75.1 (20.4)	101.6 (7.7)

*) 年齢データは、69～54歳、489=55～59歳、761=60～64歳、810=65～69歳、503=70～74歳、153=75歳の範囲内である。

【0181】

既知の喘息リスクアレル分析

現在、2型炎症及び低2型喘息患者の間の遺伝的異質性は不明である。研究集団を、記載されるように、ペリオスチンレベルに基づいて層化した。Corren et al., N Engl J Med 365, 1088-1098 (2011) を参照されたい。既知の喘息リスクアレルのアレル頻度をまず、高ペリオスチン症例 (N = 626) と対照 (N = 1,696)、及び低ペリオスチン症例 (N = 667) と対照 (N = 1,887) との間で比較した。高ペリオスチン及び低ペリオスチン下位群について対照と比較した効果サイズの改良を決定した。結果を図1及び表4に示す。既知の喘息遺伝子（例えば、TSLP、IL4、IL4R、IL6R）のうちのいくつかは、下位群間で差異を示さなかった。いくつかのTh2関連遺伝子座（例えば、GATA3及びIL33）のオッズ比(OR)は、高ペリオスチン下位群において改良された。PDE4D遺伝子座は、高ペリオスチン下位群において本質的にゼロのOR(OR = 0.96)及び低ペリオスチン下位群において強力な改良(P = 6.0 × 10⁻⁴, OR = 1.3)を示した。これは、直接的に低及び高ペリオスチン症例の間に統計的に異なるアレル頻度を示す唯一の遺伝子座であった(P = 0.02)。よって、観察された公開喘息遺伝子座の多くは全喘息遺伝子座であり、これは、これらの研究が2型炎症状態に基づいて対象を区別しなかったとする、直感的である。しかしながら、他の遺伝子座は下位群間で異なり、新規遺伝子座が喘息集団をペリオスチン状態によって分けるとき明らかになるであろうことを示した。前述の知識不足及びこの患者集団の周りの予測される満たされていない医学的必要性を考慮して、低ペリオスチン喘息下位群に注目した。

10

20

30

40

50

SNP	遺伝子	CHR	BP	ALLE-LES	リスクアレル	ペリオスチン高		ペリオスチン低	
						OR	P	OR	P
rs1800629	TNF	6	31543031	G/A	A	1.246	0.021	0.937	0.485
rs1775551	GATA3	10	9053043	C/A	C	1.471	2.75E-05	1.189	0.051
rs2073643	SLC22A5	5	131723288	T/C	C	0.946	0.752	0.800	0.002
rs72699186	IL33	9	6175855	A/T	T	1.212	0.048	1.078	0.412
rs3771166	IL18R/IL1A1	2	102986222	G/A	A	0.883	0.098	0.764	0.031
rs2305480	GDSMB	17	38062196	G/A	A	0.906	0.169	0.791	0.001
rs2378383	TLE4	9	82039362	A/G	G	0.972	0.795	0.859	0.185
rs1540339	VDR	12	48257326	C/T	C	1.059	0.452	0.954	0.511
rs17294280	SMAD3	15	67468285	A/G	G	1.265	0.009	1.190	0.047
rs2284033	IL2RB	22	37534034	G/A	A	0.948	0.470	0.884	0.092
rs1837253	TSLP	5	110401872	T/C	C	1.310	0.001	1.265	0.004
rs1295686	IL13	5	131995843	T/C	T	1.153	0.410	1.116	0.209
rs2057768	IL4R	16	27322095	C/T	T	1.127	0.139	1.122	0.140
rs11071557	RORA	15	61068954	T/C	C	0.892	0.296	0.902	0.327
rs2243300	IL4	5	132004086	G/T	T	1.095	0.523	1.109	0.719
rs1063355	HLA-DQ	6	32627714	T/G	T	0.738	3.42E-05	0.810	0.003
rs4129267	IL6R	1	154426264	C/T	T	0.934	0.347	1.054	0.447
rs2786098	DENND1B	1	197325908	T/G	T	0.953	0.576	1.080	0.366
rs4795405	ORMDL3	17	38088417	T/C	T	1.096	0.207	1.243	0.002
rs1588265	PDE4D	5	59369794	A/G	G	0.956	0.566	1.292	0.001

表4

【 0 1 8 2 】

低ペリオスチン喘息対照 G W A S

血清ペリオスチンレベル測定値を有する健常対照 (N = 790) を使用して、ペリオスチンを連続形質として使用する G W A S を行い、ゲノムワイド有意性に到達する遺伝子座がないことを見出した。これは、正常対照におけるペリオスチンレベルが強い遺伝的影響下になかったことを示した。したがって、低ペリオスチン喘息 (N = 667) 対対照 (N = 1,887) G W A S における全体的な対照集団を使用した。対照におけるペリオスチンレベルとの関連についてこの分析においてゲノムワイド有意性に到達する全ての興味深い S N P は、 S N P (複数可) が、単純に末梢ペリオスチンのレベルとではなく、低 2 型

炎症喘息と特異的に関連していたことを決定するために試験した。合計で、S N P r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 の1つの関連は、ゲノムワイド有意性の閾値を超えることが観察された ($P = 2.75 \times 10^{-8}$ 、 $OR = 0.33$ 、図2)。 $P < 1 \times 10^{-5}$ (LDブルーン)を有するS N Pの完全リストを表5に示す。S N P r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 の詳細情報を表6に示す。r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 S N Pは、ペリオスチン測定値を有する対照のサブセットにおける末梢ペリオスチンレベルと関連付けられなかった ($P = 0.99$)。加えて、集団はまた、低ペリオスチン喘息患者における関連が低E O S喘息患者においても見られたかを確認するために、好酸球(E O S)レベル(低E O Sのレベル<300 ng/mL)について層化した。両方は、2型活性の指標であったが、完璧には相関しなかった ($= 0.23$)。Arron et al., Ann Am Thorac Soc 10 Suppl, S 206 - 213 (2013) を参照されたい。S N P r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 を、対照 ($N = 1,768$) と比較して低E O Sを有する喘息症例 ($N = 390$) における関連について試験し、低ペリオスチン分析 ($P = 0.008$ 、 $OR = 0.51$) において見られるものと同様の方向の効果を見出した。S N P r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 は、DNAの500 kbストレッチ以内に11個のK L Kを含有する大カリクレイン(K L K)遺伝子クラスター遺伝子座に位置した(図3)。このS N Pは、K L K 5遺伝的配列に位置した。関連は、P値が高2型炎症患者において有意でなかったように、低2型喘息に特異的であると思われた(表6:r s 1 1 7 6 3 9 5 1 2 の詳細関連分析、 $P = 0.63$ 、 $OR = 1.11$)。

10

20

30

40

50

C H R	BP	SNP	発見				複製				X ₂	遺伝子 (候補)
			症例 MAF	対照 MAF	OR	P	症例 MAF	対照 MAF	OR	P		
19	51423324	rs117639512	0.014	0.032	0.44	2.81E-02	0.014	0.034	0.25	4.64E-06	0.33	2.75E-08 KLLK4, KLLKS
5	167534930	rs34004678	0.004	0.021	0.19	9.40E-03	0.013	0.036	0.36	1.23E-03	0.27	1.39E-07 ODZ2
15	46672408	rs114540406	0.889	0.818	1.79	1.15E-04	0.857	0.807	1.43	2.29E-03	1.60	3.00E-07 SNORD11
13	105897823	rs16966163	0.009	0.033	0.26	3.58E-03	0.017	0.035	0.49	2.83E-02	0.35	8.69E-07 DAOA
11	1118068100	rs1793161	0.802	0.717	1.59	8.99E-05	0.773	0.719	1.33	1.24E-02	1.46	1.93E-06 AMICA1
22	33315675	rs13053593	0.027	0.064	0.40	1.29E-03	0.039	0.062	0.62	2.65E-02	0.49	3.66E-06 SYN3
1	218103570	rs72732806	0.028	0.063	0.43	1.94E-03	0.042	0.068	0.60	1.66E-02	0.50	4.55E-06 IQCH
4	2799465	rs114353093	0.006	0.027	0.22	2.96E-03	0.013	0.027	0.47	1.17E-02	0.30	5.24E-06 SH3BP2
3	13330622	rs749573	0.084	0.129	0.62	3.55E-03	0.094	0.149	0.60	3.48E-04	0.61	6.56E-06 IQSEC1, NUP210, HDAC1
14	25140803	rs150036235	0.005	0.021	0.25	1.32E-02	0.009	0.027	0.32	2.96E-03	0.28	7.13E-06 GZMH, GZMB, CTSG, CMAL, STXBPF6
9	16529849	rs7862214	0.033	0.062	0.52	1.06E-02	0.032	0.065	0.48	3.52E-03	0.50	7.27E-06 MGCC24103, BNC2
4	100942653	rs7680070	0.965	0.936	1.92	1.14E-02	0.956	0.918	1.94	5.01E-04	1.93	7.50E-06 RP11-15B17.1
5	15918482	rs5004535	0.216	0.164	1.41	4.22E-03	0.200	0.135	1.60	3.99E-04	1.50	8.54E-06 ACVR8691.1
3	56916581	rs113804724	0.076	0.128	0.56	9.28E-04	0.105	0.142	0.71	2.19E-02	0.63	8.79E-06 ARHGEEF3
5	110503301	rs654354	0.559	0.633	0.73	1.87E-03	0.563	0.638	0.73	1.81E-03	0.73	9.07E-06 ISLP
13	73030348	rs10507803	0.009	0.021	0.41	5.74E-02	0.011	0.035	0.29	2.53E-04	0.34	9.92E-06 SNORD17, SNORA68, RPL18AP17

表 5

表現型	発見				複製				χ^2	P
	症例MAF	対照MAF	OR	P	症例MAF	対照MAF	OR	P		
PERI-LO CTRL	0.014	0.032	0.44	0.03	0.014	0.054	0.25	4.64x10^-6	0.33	2.75x10^-8
PERI-HI CTRL	0.031	0.029	1.05	0.86	0.038	0.033	1.15	0.60	1.11	0.6328
ALL CTRL	0.022	0.031	0.69	0.11	0.026	0.043	0.59	3.94x10^-3	0.63	1.17x10^-3
Peri hi	Peri low	OR	P	Peri hi	Peri low	OR	P	OR	P	
PERI-HI PERI-LO	0.031	0.014	2.16	0.07	0.038	0.014	2.76	1.58x10^-3	2.57	3.72x10^-4

表6

10

20

30

40

【 0 1 8 3 】

KLK5は、この遺伝子座の候補遺伝子である

この遺伝子座における関連遺伝子を特定するために、mRNA発現パターンをまず調査した。公表されているデータベースを使用して、KLK4は主に前立腺及び子宮内膜において発現し、KLK5は主に食道及び皮膚において発現した。Wu et al., Nucleic Acids Res 44, D313 - 316 (2016)を参照されたい。GTEXポータルデータベース(Consortium, Science 348, 648 - 660 (2015) 参照)をクエリして、主に発現した組織におけるKLK4及びKLK5 mRNAレベルに対するrs117639512の考えられる機能的効果を調査し

50

た。K L K 4に対するrs117639512の効果は、G T E xデータベースでは両方の組織において単型であったように、前立腺または子宮において評価することができなかった。G T E xは、食道及び皮膚（食道 - 胃食道接合部及び筋層、皮膚 - 日光曝露及び日光非曝露）について合計4つの組織を含有する。K L K 5 e Q T Lは、少なくとも部分的にS N Pの低マイナーアレル頻度（ヨーロッパコーカソイド集団において0.01~0.05、Genomes Project, Auton et al., Nature 526, 68-74 (2015) 参照）のために、これらの組織のうちのいずれにおいても統計的有意性（日光曝露皮膚において最低P = 0.051）に到達しなかった。ヒト遺伝的変異の汎用参照。食道 - G E 接合部を除く全ての組織は、メジャーアレルホモ接合体と比較してヘテロ接合体においてK L K 5 のより低いm R N A レベルを示した。比較のためのデータベースには、マイナーアレルホモ接合体は存在しなかった。よって、rs117639512のマイナーアレルは、より低いK L K 5 m R N A レベルと関連していたと思われるが、rs117639512の低マイナーアレル頻度のために、この仮説を確認するのにより大きなデータベースが必要である。目的の、ネザートン症候群は、遺伝子S P I N K 5における突然変異によって引き起こされる。Descargues et al., Nat Genet 37, 56-65 (2005) を参照されたい。S P I N K 5はL E K T Iをコードし、これはK L K 5及びK L K 7のセリンプロテアーゼ阻害剤である。S chechter et al., Biol Chem 386, 1173-1184 (2005) を参照されたい。S P I N K 5における突然変異は、高度に上方調節されたK L K 5発現をもたらし、これはひいてはP A R 2（プロテアーゼ活性化受容体2）依存性及び非依存性経路によって炎症を誘発する。Hovnanian, A., Cell Tissue Res 351, 289-300 (2013) を参照されたい。ネザートン症候群は最も一般的には皮膚障害と関連付けられたが、喘息はいくつかの症例における併存症である。Judge et al., Br J Dermatol 131, 615-621 (1994) を参照されたい。よって、連鎖不平衡、発現パターン、及び症候性併存症に基づき、K L K 5は、この遺伝子座の最適な候補遺伝子である。さらに、e Q T L 分析からの効果の方向は、このS N Pの保護O Rと一貫しており、より低いK L K 5 レベルは、喘息リスクから保護すると思われる。

【0184】

K L K 5 阻害の決定のためのアッセイ

組換えK L K 5直接活性アッセイを使用して、S P I N K F c融合ポリペプチド及びm A b 1 1 0 8などのK L K 5阻害剤によってヒトカリクレイン5（K L K 5）の阻害を測定した。組換えヒトK L K 5（Genentech）を、直接アッセイ緩衝液（75 mMのトリス（p H 8.0）、150 mMのN a C l、及び0.01%T w e e n 2 0）に5 n Mまで希釈し、384ウェルアッセイプレート（384ウェルローボリューム、黒色、丸底、C o r n i n g、カタログ番号4514）において抗K L K 5抗体と組み合わせた。抗体は、リン酸試料緩衝液（70 mMのリン酸ナトリウム（p H 6）、200 mMのN a C l、及び0.01%T w e e n - 2 0）またはクエン酸/トリス試料緩衝液（10 mMのクエン酸、30 mMのトリス（p H 6）、及び0.01%T w e e n 2 0）のいずれかにおいて供給された。抗体希釈物を、適切な試料緩衝液中または直接アッセイ緩衝液中で作製した。プレートを30分間周囲温度でインキュベートした。蛍光ペプチド基質、B o c - V P R - A M C (Bachem, Part No. I - 1 1 2 0)をアッセイプレートに直接添加した。最終ウェル中濃度は、50 μ MのB o c - V P R - A M C、5 n Mの組換えヒトK L K 5、及び0.19~100 n Mの抗K L K 5抗体であった。プレートを、340 nm励起 / 460 nm発光モジュールを使用するP H E R A s t a r (登録商標) P l u sリーダーを用いて30~60分間にわたって102秒毎に調査した。R F U / 秒の反応速度を、典型的には204秒で開始し、アッセイ終了まで継続する、線形範囲における読み取り値の線形回帰によって計算した。緩衝液単独及び100 n Mの最終S P I N K 9 . S R E . F c (Genentech)を、それぞれ、100%及び0%の活性対照として使用した。抗K L K 5抗体のI C 5 0は、それらのそれぞれの曲線の4パラ

10

20

30

40

50

メータフィットから決定した。

【0185】

結合 pro - K L K 7 蛍光ペプチドアッセイを使用して、抗 K L K 5 抗体によってヒトカリクレイン 5 (K L K 5) の阻害を測定した。組換えヒト K L K 5 (Genentech) を、抗体試料がクエン酸 / トリス試料緩衝液中にある場合、 pro - K L K 7 クエン酸 / トリス結合緩衝液 (5 0 mM のトリス (pH 7 . 5) 、 1 5 0 mM の NaCl 、及び 0 . 0 1 % Tween 20) 、または抗体試料がリン酸試料緩衝液中にある場合、 pro - K L K 7 リン酸結合緩衝液 (5 0 mM のトリス (pH 8 . 0) 、 1 5 0 mM の NaCl 、及び 0 . 0 1 % Tween 20) に 5 nM まで希釈した。希釈した K L K 5 を次いで、 384 ウエルアッセイプレート (384 ウエルロー・ボリューム、黒色、丸底、 Corning 、カタログ番号 4514) において抗 K L K 5 抗体と組み合わせた。抗体希釈物を、直接 K L K 5 アッセイについて記載されるように作製した。プレートを 30 分間周囲温度でインキュベートした。蛍光ペプチド基質、 suc - LLVY - AMC (Bachem 、 Part No . I - 1395) 及び pro - K L K 7 (Genentech) を、アッセイプレートに直接添加し、周囲温度でインキュベートした。最終ウェル中濃度は、 1 0 0 μM の suc - LLVY - AMC 、 1 2 5 nM の pro - K L K 7 、 5 nM の組換えヒト K L K 5 、及び 0 . 1 9 ~ 1 0 0 nM の抗 K L K 5 抗体であった。 24 時間後、蛍光読み取りを 30 ~ 60 分間にわたって 102 秒毎に行い、最後の 5 つの読み取り値を平均することによって RFU エンドポイント値を計算した。緩衝液単独及び 1 0 0 nM の最終 S PINK9 . SRE . Fc (Genentech) を、それぞれ、 1 0 0 % 及び 0 % の活性対照として使用した。抗 K L K 5 抗体の IC₅₀ は、それらのそれぞれの曲線の 4 パラメータフィットから決定した。
10

【0186】

組換え K L K 7 蛍光ペプチドアッセイを使用して、 K L K 5 阻害剤の選択性を決定した。組換えヒト K L K 7 (Genentech) を、 pro - K L K 7 リン酸結合緩衝液 (5 0 mM のトリス (pH 8 . 0) 、 1 5 0 mM の NaCl 、及び 0 . 0 1 % Tween 20) 中の K L K 5 で活性化した。希釈した K L K 7 を次いで、 384 ウエルアッセイプレート (384 ウエルロー・ボリューム、黒色、丸底、 Corning 、カタログ番号 4514) において K L K 5 阻害剤と組み合わせた。阻害剤希釈物を、直接 K L K 5 アッセイについて記載されるように作製した。プレートを 50 分間周囲温度でインキュベートした。蛍光ペプチド基質、 suc - LLVY - AMC (Bachem 、 Part No . I - 1395) 及び pro - K L K 7 (Genentech) を、アッセイプレートに直接添加し、周囲温度でインキュベートした。最終ウェル中濃度は、 1 0 0 μM の suc - LLVY - AMC 、 1 2 5 nM の pro - K L K 7 、 5 nM の組換えヒト K L K 5 、及び 0 . 1 9 ~ 1 0 0 nM の K L K 5 阻害剤であった。 24 時間後、蛍光読み取りを 30 ~ 60 分間にわたって 102 秒毎に行い、最後の 5 つの読み取り値を平均することによって RFU エンドポイント値を計算した。緩衝液単独及び 1 0 0 nM の最終 S PINK9 . SRE . Fc (Genentech) を、それぞれ、 1 0 0 % 及び 0 % の活性対照として使用した。 K L K 5 阻害剤の IC₅₀ は、それらのそれぞれの曲線の 4 パラメータフィットから決定した。
20

【0187】

pro - K L K 7 アッセイを、 IC₅₀ 決定のための LC / MS による K L K 5 誘導開裂ペプチド検出を用いて行った。 pro - K L K 7 アッセイを行うために、酵素 K L K 5 と基質 pro - K L K 7 との間の反応からの生成物ペプチド EEAQGDK (配列番号 30) を、液体クロマトグラフィーと結合した質量分析法によって検出した。全ての化合物を、 5 0 mM の重炭酸アンモニウム緩衝液 (粉末 / 認定、 Fisher Chemical 、 A643 - 500) で希釈し、 5 nM の K L K 5 (Genentech) 及び 0 . 0 1 ~ 1 2 nM の範囲の阻害剤でのアッセイにおける最終濃度で、 96 ウエルプレート (Biologad 、 Hard - Shell 96 - Well PCR Plates 、低プロファイル、薄肉、スカート状、青 / 透明 # HSP9631) において希釈した。使用された阻
30

害剤は、SPINK9 . SRE . Fc (Genentech) 及びmAb1108 (Monoclonal Mouse IgG2b Clone #193318、R&D Systems、Minneapolis、MN) であった。プレートを30分間室温でインキュベートした。その後、15nMの基質pro-KLK7 (Genentech) を酵素及び阻害剤に添加した。2時間後、反応物を、0.5uLのギ酸(99.5+%、Optima (商標) LC/MSグレード、Fisher Chemical、A117-10X1AMP) を用いて反応停止させた。ペプチドを、以下の質量の組み合わせを用いて検出した：QTRAP 6500 LC-MS/MS質量分析計 (Sciex、Framingham、MA)においてQ1、388.7m/z 及びQ3、319.0m/z。生成されたペプチドの定量を、合成KLK7ペプチド較正曲線を用いて測定した。IC₅₀値は、Prism 6ソフトウェア (GraphPad Software、La Jolla、CA) を用いて決定した。

【0188】

pro-KLK1アッセイを、IC₅₀決定のためのLC/MSによるKLK5誘導開裂ペプチド検出を用いて行った。pro-KLK1アッセイを行うために、酵素KLK5と基質pro-KLK1との間の反応からの生成物ペプチドAPPIQSR (配列番号31)を、液体クロマトグラフィーと結合した質量分析法によって検出した。全ての化合物を、50mMの重炭酸アンモニウム緩衝液 (粉末 / 認定、Fisher Chemical、A643-500) で希釈し、0.5nMのKLK5 (Genentech) 及び0.01~12nMの範囲の阻害剤でのアッセイにおける最終濃度で、96ウェルプレート (Biorad、Hard-Shell 96-Well PCR Plates、低プロファイル、薄肉、スカート状、青 / 透明 # HSP9631)において希釈した。使用された阻害剤は、SPINK9 . SRE . Fc (Genentech) 及びmAb1108 (Monoclonal Mouse IgG2b Clone #193318、R&D Systems、Minneapolis、MN) であった。プレートを60分間室温でインキュベートした。その後、300nMの基質pro-KLK1 (Genentech) を酵素及び阻害剤に添加した。20分後、反応物を、0.5uLのギ酸(99.5+%、Optima (商標) LC/MSグレード、Fisher Chemical、A117-10X1AMP) を用いて反応停止させた。ペプチドを、以下の質量の組み合わせを用いて検出した：QTRAP 6500 LC-MS/MS質量分析計 (Sciex、Framingham、MA)においてQ1、384.7m/z 及びQ3、600.3m/z。IC₅₀値は、ピーク面積及びPrism 6ソフトウェア (GraphPad Software、La Jolla、CA) を用いて決定した。

【0189】

実施例2 - 喘息におけるKLK5の特徴付け

KLK5は、喘息患者の肺組織において発現及び上昇した。

肺組織におけるKLK5発現を調査した。高感度イムノアッセイを開発して、健常ドナー (MAST-Aコホート) 及びコルチコステロイド難治性喘息患者 (BOBCATコホート) の気管支肺胞洗浄 (BAL) においてKLK5を測定した。Jia et al. , J Allergy Clin Immunol 130, 647-654 e610 (2012) 及びSun et al. , Sci Signal 8, ra122 (2015) を参照されたい。KLK5の平均レベルは、健常ボランティアと比較して喘息患者において約4倍上昇した (図4)。加えて、喘息患者のBALにおけるKLK5のレベルは、予測される努力呼気肺活量1 (FEV1) とマイナスに相関し ($P < 0.05$)、増加したKLK5を有する患者がより重度の気管支閉塞及び気道疾患有し得ることを示した。肺におけるKLK5のレベルは、血清Th2バイオマーカー (ペリオスチン及び血中好酸球) と関連付けられず、高及び低ペリオスチン喘息患者の両方は、同様のレベルのBAL KLK5を有した。KLK5の細胞源を理解するために、KLK5転写物レベルを様々な初代肺常在細胞において比較した。KLK5 mRNAは、気管支上皮細胞によって強く発現し、肺平滑筋、線維芽、内皮細胞、または単核細胞において検出不能であった。KL

10

20

30

40

50

K5 発現をインサイトで調査するために、その発現を、KLK5 プロモーターのオープンリーディングフレームにおいて LacZ を有する KLK5 - LacZ レポーターマウス株を使用することによって調査した。LacZ 陽性細胞を、主に気管支上皮細胞に制限した。まとめると、これらのデータは、気管支上皮細胞が、肺における KLK5 の主な細胞源であり、気管支肺胞洗浄における KLK5 に寄与する可能性があることを示す。

【0190】

組換え KLK5 誘導肺好中球溢出及び肺上皮サイトカイン産出

次に組換え KLK5 を生成し、その生化学機能を特徴付けた。C 末端 his タグを有する組換え完全長 KLK5 を 293 個の細胞において発現した。分泌 KLK5 は、pro - 配列 (aa 23 - 66) が除去され、67 位の N 末端イソロイシンで開始した。245 位のセリン - アラニン突然変異 (S245A) は、KLK5 触媒活性を無効にし、S245A KLK5 変異体は、インタクトな N 末端 pro - 配列を有した。結果は、自動活性化及びシグナルペプチド除去が、KLK5 に対して自己内因性であった可能性があることを示す。

10

【0191】

肺における KLK5 の効果を調査するために、組換え KLK5 をマウスに鼻腔内投与した。KLK5 投与の 24 時間後、気管支肺胞洗浄液中の好中球の数における 10 倍超の増加が観察された（図 5 A）。好酸球、マクロファージ、またはリンパ球の数における有意な変化はなかった。好中球の選択的動員もまた肺実質の組織切片において増加し、これらの顆粒球を気管支上皮下に局在化した。触媒変異体 KLK5 の鼻腔内投与は、好中球溢出をもたらさなかった。よって、好中球を肺コンパートメントに動員する KLK5 の能力は、プロテアーゼの酵素活性に高度に依存した。

20

【0192】

どのように KLK5 が好中球動員に影響を及ぼすかを理解するために、組換え KLK5 を A549 肺上皮細胞株に添加し、定量的 PCR によって炎症サイトカイン及びケモカインの発現を調査した。その触媒的に不活性な変異体ではなく、KLK5 は、Tslp、Tnfa、IL8、及び ICAM1 を含む、炎症誘発遺伝子転写物を急速に誘導した（図 5 B）。Tslp、Tnfa、IL8、及び ICAM1 の誘導は、初代単離気管支上皮細胞でも見られた。さらに、SPINK5Fc 融合ポリペプチドは、KLK5 刺激炎症サイトカイン及びケモカイン産生を阻害した。

30

【0193】

実施例 3 - 直接アッセイ及び結合アッセイにおける KLK5 の阻害

SPINK Fc 融合ポリペプチドの阻害プロファイルを評価するために、KLK5 によって蛍光ペプチド基質の開裂を監視するインビトロアッセイを開発した。簡潔に、KLK5 は、基質、Boc - VPR - AMC の末端アルギニン間のペプチド結合を開裂し、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC) を放出し、蛍光の増加をもたらす。蛍光基質の添加前の SPINK5 M293 - R355 (図 6 A)、SPINK5 E421 - A695 (図 6 B)、または SPINK9 . SRE . Fc (図 6 C) との KLK5 のインキュベーションは、KLK5 の不活性化によって低減した蛍光シグナルをもたらす。よって、SPINK Fc 融合ポリペプチドは、Boc - VPR - AMC 開裂によって監視されるように KLK5 の強力な阻害剤である。

40

【0194】

図 6 において示されるように、SPINK Fc 融合ポリペプチドは、小ペプチド基質の開裂によって監視されるように KLK5 の強力な阻害剤である。これらの SPINK Fc 融合ポリペプチドの阻害プロファイルをさらに評価するために、結合アッセイを、pro - KLK7 及び特異的 KLK7 蛍光ペプチド基質、Suc - LLVY - AMC を利用して開発した（図 7）。手短に、KLK5 は、pro - KLK7 とインキュベートし、KLK7 pro - ドメインの開裂及び除去をもたらす。pro - ドメインの除去は、次いで蛍光基質に作用して AMC フルオロフォアを放出することができる KLK7 を活性化する。小ペプチド基質を用いるデータ（図 6）と同様に、SPINK5 M293 - R35

50

5 (図7A)、SPINK5 E421-A695 (図7B)、またはSPINK9.SRE.Fc (図7C)とのKLK5のインキュベーションは、pro-KLK7の活性化及びKLK7特異的ペプチド基質のその後の開裂の強力な阻害をもたらした。まとめると、図6及び7は、SPINK Fc融合ポリペプチドがペプチドまたは高分子 (pro-KLK7) 基質のいずれかを用いるKLK5の強力な阻害剤であることを示す。

【0195】

SPINK Fc融合ポリペプチドの特異性を評価するために、阻害剤を活性化KLK7に対してアッセイし、蛍光ペプチド基質、Suc-LLVY-AMCの開裂を監視した (図8)。KLK特異性の対照として、市販の抗KLK5抗体、mAb1108もアッセイした。この抗体はKLK5に特異的であるので、KLK7または基質の開裂を阻害するはずがないと予想された。図8において見られるように、SPINK5 M293-R355 (図8A) 及びSPINK5 E421-A695 (図8B) の両方はKLK7を部分的に阻害したが、SPINK9.SRE.Fc (図8C) 及びmAb1108 (図8D) は阻害を示さなかった。これは、SPINK9.SRE.Fc及びmAb1108がKLK5を特異的に相互作用及び阻害し、SPINK5 M293-R355及びSPINK5 E421-A695が無差別のKLK阻害剤であり得ることを示した。

10

【0196】

抗KLK5抗体、mAb1108の阻害プロファイルを特徴付けるために、IC₅₀値を直接アッセイ (図6)において様々なKLK5濃度 (図9)で決定した。SPINK Fc融合ポリペプチドとは異なり、mAb1108は、KLK5の部分阻害剤であり、蛍光ペプチド基質の開裂において約30%の低減をもたらす (図9)。加えて、mAb1108のIC₅₀値は、KLK5濃度への依存性を示し、抗体がKLK5の強固結合型阻害剤である可能性が高いことを示す。

20

【0197】

mAb1108の阻害プロファイルをさらに評価するために、市販の抗体を、直接 (図6) 及びpro-KLK7結合 (図7) アッセイの両方においてSPINK9 Fc融合ポリペプチドに対してアッセイした。直接アッセイ (図10) では、SPINK9 Fc融合ポリペプチドは、蛍光ペプチド基質のKLK5開裂の強力な阻害剤であったが、mAb1108は部分阻害を示した。高分子基質、pro-KLK7を使用するため、結合アッセイ (図11) では、SPINK9 Fc融合ポリペプチド及びmAb1108の両方は、KLK5活性の強力な阻害剤であった。まとめると、これらのデータは、mAb1108が直接アッセイ (図8及び9)においてKLK5の部分阻害、ならびに結合アッセイ (図11B)において完全阻害を示し、SPINK9 Fc融合ポリペプチドが直接 (図6及び10) 及び結合アッセイ (図7及び11) の両方においてKLK5の強力な阻害剤であることを示す。

30

【0198】

実施例4 - IC₅₀決定のためのLC/MSによるKLK5誘導開裂ペプチド検出

組換えKLK5によってpro-KLK7またはpro-KLK1のタンパク質分解を阻害するSPINK9.SRE.Fc及びmAb1108の能力を、KLK5誘導開裂産物ペプチドを監視するLC/MSアッセイを使用して評価した。KLK7アッセイでは、SPINK9.SRE.Fc及びmAb1108は、それぞれ、1.13nM (図12A) または1.86nM (図12B) のIC₅₀値でpro-KLK7のKLK5 (5nM) 開裂を完全に阻害する。一方でKLK1アッセイでは、SPINK9.SRE.Fc及びmAb1108は共にpro-KLK1のKLK5 (0.5nM) 開裂を阻害するが、SPINK9.SRE.Fcのみが0.58nMのIC₅₀でKLK5を完全に阻害し (図12C)、mAb1108は0.34nMのIC₅₀の最大約40%のKLK5阻害を示す (図12D)。

40

【0199】

結論

まとめると、これらのデータは、KLK5が好中球走化性サイトカインの上皮産生及び

50

肺組織への好中球流入を誘導することを示した。本明細書では、低ペリオスチン、または低2型炎症喘息患者に特に注目する第1のG W A Sからの結果が提供される。K L K 4 / 5 遺伝子座のS N Pは、低ペリオスチン喘息集団において喘息リスクを保護したことが特定された。この所見は、低好酸球喘息患者においても見られた。19q13のカリクレイン遺伝子座は以前に、連鎖研究及びG W A Sによって喘息と関連付けられた。M y e r s et al . , J Allergy Clin Immunol 130, 1294 - 1301 (2012) を参照されたい。G W A Sによって特定されたS N P、rs1061477は、S N P rs117639512の約63kb3'に位置したK L K 3のイントロン2中に存在する。これらのS N Pは、互いとの連鎖不均衡ではなかった($r^2 = 0.004$ 、D' = 0.293)。好酸球レベルの遺伝学を考察したものもある。G u d b j a r tsson et al . , Nat Genet 41, 342 - 347 (2009) を参照されたい。I L 13及びI L 33遺伝子座のS N Pは、好酸球レベルと関連することが見出された。十分に複製された喘息リスク遺伝子座もあった。しかしながら、K L K 4 / 5領域の1MB以内のS N Pは、いずれの研究においても示唆的な有意性に到達するものとして特定された。これは、この遺伝子座が低ペリオスチン、または低2型喘息に特異的であり得ることを示す。

【0200】

S N P rs117639512は、遺伝子内であり、K L K 4とK L K 5との間に位置した。このS N Pの比較的に低い頻度によって、K L K 4に対する作用は、オンラインデータベースにおいて試験することができず、K L K 5の異なるm R N A レベルに関して統計的有意性を観察することができなかった。しかしながら、試験された組織の大部分において、マイナーアレルのキャリアについてK L K 5のより低いm R N A レベルをもたらす同様の方向の効果が見られた。これは、S N Pについて見られる保護O Rと組み合わせて、より低いレベルのK L K 5が喘息リスクから保護したことを示す。これは、K L K 5の重度に上方調節されたレベルが、喘息を含む、多くのアトピー性表現型をもたらす、ネザートン症候群患者からの所見と一貫している。ネザートン症候群を、K L K 5調節因子S P I N K 5における機能喪失突然変異と関連付けた。S P I N K 5のm R N A レベルに影響を及ぼすS N PのG T E ×データベースを評価した。S N P rs1363727での、最も強いヒットを、交互のアレルキャリアについてのG T E ×データベースにおける有意により低いS P I N K 5 m R N A レベル(10個の組織において $P < 1.2 \times 10^{-8}$)と関連付けた。このS N Pは、低ペリオスチン喘息集団において試験され、喘息リスクの統計的有意性($P = 0.063$ 、O R = 1.14)に到達しなかったが、K L K 4 / K L K 5 遺伝子座S N Pと比較して反対方向の効果を有した。これは、S P I N K 5のより低いレベルが、喘息を発症するリスクを増加し得ることを示す。S P I N K 5の低減した機能及びK L K 5の増加した活性は、ネザートン症候群からの所見と一貫している。よって、遺伝的証拠は、K L K 5レベルを低下させることが、ネザートン症候群の文脈外の喘息を保護し得ることを示す。

【0201】

K L K 5結合ポリペプチドレベルは、重度の喘息患者の気管支肺胞洗浄液において上昇し、予測F E V 1 ($p < 0.05$)とマイナスに相関し、K L K 5が気管支閉塞及び喘息病因において病因的役割を果たし得るという仮説を支持する。喘息及び他のアレルギー性疾患におけるK L K 5の調節は、不明のままである。K L K 5と2型炎症バイオマーカー(例えば、ペリオスチン、F e N O、及び血中好酸球数)との間に相関はなかった。K L K 5は、主に肺上皮によって発現した。喘息患者は、上皮性閑門の頻繁な傷害及び喪失を有し、これは誘導成長因子、修復プロセシング、及び組織リモデリングを含む再生プロセスと関連付けられる。重度の喘息における調節不全の上皮細胞活性化、再生プロセス、及び組織リモデリングは、喘息患者肺コンパートメントにおける異常K L K 5レベルに起因し得る。

【0202】

S P I N K 5は、その触媒活性部位への直接結合によるK L K 5の天然の可逆的阻害剤

10

20

30

40

50

である。S P I N K 5 は、皮膚、肺、食道、及び胃腸管を含む、多くの粘膜組織によって発現する。ネザートン症候群において、S P I N K 5 の欠損は、増加したK L K 5 活性、皮膚炎症、及びアレルギー症状をもたらす。B r i o t et al . , J E x p M e d 2 0 6 , 1 1 3 5 - 1 1 4 7 (2 0 0 9) を参照されたい。S P I N K 5 は、炎症性サイトカイン、特にインターロイキンI L - 1 3 によって直接誘導されることが見出された（データ示さず）。この観察と一致して、S P I N K 5 轉写物は、高T h 2 喘息患者と比較して低T h 2 喘息患者において低減した。主に低減したS P I N K 5 発現によって誘導された、K L K 5 / S P I N K 5 のより高い比は、低T h 2 喘息患者において喘息病理に寄与し得る。

【 0 2 0 3 】

K L K 5 の組換え形態が生成され、酵素的に活性のある少量のK L K 5 が気管支肺胞洗浄及び肺組織への好中球流入を強く誘導したことが見出された。好中球は、動物の肺に所定の触媒不活性K L K 5 （または熱不活性化K L K 5 、データ示さず）を溢出させないので、触媒活性は、好中球動員に必須である。これは、K L K 5 トランスジェニックマウスが皮膚病変において大きな好中球浸潤を有するという報告と一貫していた。F u r i o et al . , J E x p M e d 2 1 1 , 4 9 9 - 5 1 3 (2 0 1 4) を参照されたい。K L K 5 は、炎症サイトカイン、ケモカイン、及び接着分子の上皮発現を誘導する。特に、I L - 8 は、重要な好中球走化性サイトカインである。I C A M - 1 は、C D 1 1 b / C D 1 8 インテグリンとのその相互作用を通じた好中球接着のための重要な接着分子であった。T N F - は、血管漏出を誘導し、末梢組織への細胞溢出を促進する。K L K 5 によって誘導される炎症性サイトカイン、ケモカイン、及び接着分子は、共働して局所組織への好中球流入を促進し得る。炎症性ケモカイン／サイトカインの急速誘導は、細胞表面受容体（複数可）が存在して細胞シグナル伝達事象を媒介し得ることを示す。

【 0 2 0 4 】

要約すると、本明細書に提供されるものは、低ペリオスチン、または低2型炎症喘息症例に特異的であった喘息リスクを有するK L K 5 遺伝子座でのS N P との遺伝的関連を示すデータである。さらに、提示されるデータは、喘息症状及び亜表現型に対するK L K 5 の効果を説明する。本明細書に提示される結果は、K L K 5 活性を低減することが喘息に対して保護効果を有し得ることを示す。

配列番号1 > s p | Q 9 Y 3 3 7 | K L K 5 _ H U M A N カリクレイン - 5 0 S = ホモ・
サピエンスG N = K L K 5 P E = 1 S V = 2 、（下線のシグナルペプチドアミノ酸1 -
2 2 を含む完全長K L K 5 ）

MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANN DVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDAR
SDDSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLRPNQLYCGAVLVHPQWLTAACRKKVFRVRLG
HYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPH PGYSHPGHSNNMLIKLNRRIRPTKDV RPINVSSHCP SA
GTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKV LQCLNISVLSQKR CEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSC
QGDGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

配列番号2 K L K 5 （マイナスシグナルペプチドアミノ酸1 - 2 2 ）の成熟形態

VTEHVLANN DVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDAR SDDSSRIINGSDCDMHTQPWQA
ALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLTAACRKKVFRVRLGHYS LSPVYESGQQMFQGVKSIPH
PGYSHPGHSNNMLIKLNRRIRPTKDV RPINVSSHCP SAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKV L
QCLNISVLSQKR CEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSCQGDGGPVVCNGSLQGLVSWGD
YPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

10

20

30

40

50

配列番号 3 | K L K 5 _ H U M A N カリクレイン - 5 (下線のシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2 を含む完全長 K L K 5 の N 1 5 3 D 変異型)

MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDAR
SDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLRPNQLYCGAVL VHPQWLTAHCRKKVFRVRLG
HYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPH PGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIRPTKDV RPINVSSHCP SA
GTKCLVSGWGTTKSPQVHF PKVLQCLNISVLSQKR CEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSC
QGDGGPVVCNGSLQGLVSWGD YPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

10

配列番号 4 K L K 5 (N 1 5 3 D 変異型、マイナスシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2) の成熟形態

VTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAGEDAR SDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQA
ALLLRPNQLYCGAVL VHPQWLTAHCRKKVFRVRLGHYS LSPVYESGQQMFQGVKSIPH
PGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIRPTKDV RPINVSSHCP SA GTKCLVSGWGTTKSPQVHF PKVL
QCLNISVLSQKR CEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSCQGDGGPVVCNGSLQGLVSWGD
YPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

20

配列番号 5 | K L K 5 _ H U M A N カリクレイン - 5 (下線のシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2 を含む完全長 K L K 5 の G 5 5 R 変異型)

MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAREDAR
SDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLRPNQLYCGAVL VHPQWLTAHCRKKVFRVRLG
HYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPH PGYSHPGHSNNLMLIKLNRRIRPTKDV RPINVSSHCP SA
GTKCLVSGWGTTKSPQVHF PKVLQCLNISVLSQKR CEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSC
QGDGGPVVCNGSLQGLVSWGD YPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

30

配列番号 6 K L K 5 (G 5 5 R 変異型、マイナスシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2) の成熟形態

VTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAREDAR SDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQA
ALLLRPNQLYCGAVL VHPQWLTAHCRKKVFRVRLGHYS LSPVYESGQQMFQGVKSIPH
PGYSHPGHSNNLMLIKLNRRIRPTKDV RPINVSSHCP SA GTKCLVSGWGTTKSPQVHF PKVL
QCLNISVLSQKR CEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSCQGDGGPVVCNGSLQGLVSWGD
YPCARP NRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

40

配列番号 7 | K L K 5 _ H U M A N カリクレイン - 5 (下線のシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2 を含む完全長 K L K 5 の G 5 5 R 、 N 1 5 3 D 変異型)

50

MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAREDAR
 SDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLPNQLYCGAVLVHPQWLTAHCRKKVFRVRLG
 HYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPH PGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIRPTKDVRPINVSSHCP SA
 GTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKV LQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSC
 QGDGGPVVCNGSLQGLVSWGDYP CARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

配列番号 8 K L K 5 (G 5 5 R 、 N 1 5 3 D 変異型、マイナスシグナルペプチドアミノ酸
 1 - 2 2) の成熟形態

VTEHVLANNDVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAREDARSDDSSRIINGSDCDMHTQPWQA
 ALLLPNQLYCGAVL VHPQWLTAHCRKKVFRVRLGHYSLSLVYESGQQMFQGVKSIPH
 PGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIRPTKDVRPINVSSHCP SAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKV L
 QCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGR DSCQGDGGPVVCNGSLQGLVSWGD
 YPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

配列番号 9 > s p | Q 9 N Q 3 8 | I S K 5 _ H U M A N セリンプロテアーゼ阻害剤カザ
 ル 5 型 O S = ホモ・サピエンス G N = S P I N K 5 P E = 1 S V = 2 (下線のシグナ
 ルペプチドアミノ酸 1 - 2 2 を含む完全長ヒト S P I N K 5)

10

20

30

40

50

MKIATSVLLPLALCLIQDAASKNEDQEMCHEFQAFMNGKLFCPQDKFFQSLDGIMFI
 NKCATCKMILEKEAKSQKRARHLRAPKATAPTELNCDDFKGERDGFICPDYYEAVCG
 TDGKYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGECKSSNPEQDVCSAFRPVRDGRGLGCTREND
 PVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRNAEKDFCKEYEKQRNGRLFCT
 RESDPVRGPDRMHGNKCALCAEIFKQRFSEENSQTDQNLGKAEEKTKVKREIVKLCSQY
 QNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEKKKAEARARNKRESGK

A

10

TSYAEJCSEYRKLVNRNGKLACTRENDPIQGPDKVHGNTCSMCEVFFQAEEEEKKKEGK
 SRNKRSKSTASFEELCSEYRKSRKNGRLFCTRENDPIQGPDKMHGNTCMCEAFFQQE
 ERARAKAKREAACEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDKMHGNKCAMCASVFKLEE
 EEEKNDKEEKGVVEAEVKREAQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTC
 SMCEAFFQQEAKEKERAEPRAVKREAECETCDEFRRLLQNGKLFCTRENDPVRGPDKT
 HGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGNTQDECAEYREQMKNGR

LS

20

CTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEYSRSRSNGTGSESGKDTCDFRSQ
 MKNGKLICTRESDPVRGPDKTHGNKCTMCKEKLERAEEKKKEDEDRSNTGERSNTG
 E

RSNDKEDLCREFRSMQRNGKLICTRENNPVRGPYGMHINKCAMCQSIFDREANERKKKD
 EEKSSSKPSNNAKDECSEFRNYIRNNELICPRENDPVHGADGKFYTNKCYMCRNFLTEA
 LERAKLQEKPSSHVRAHQEEEDSPDSFSSLDSEMCKDYRVLPRIGYLCPKDLKPVCVGDDGQT
 YNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPPSDE

30

配列番号 10 ヒト S P I N K 5 (マイナスシグナルペプチドアミノ酸 1 - 22) の成熟形態
 KNEDQEMCHEFQAFMNGKLFCPQDKFFQSLDGIMFINKCATCKMILEKEAKSQKRARH
 LARAPKATAPTELNCDDFKGERDGFICPDYYEAVCGTDGKYDNRCALCAENAKTGSQ
 IGVKSEGECKSSNPEQDVCSAFRPVRDGRGLGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFL
 KEAENAKREGETRIRRNAEKDFCKEYEKQRNGRLFCTRESDPVRGPDRMHGNKCALC
 AEIFKQRFSEENSQTDQNLGKAEEKTKVKREIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDG
 KMHGNLCSMCQAYFQAENEKKKAEARARNKRESGKATSYAEJCSEYRKLVNRNGKLACT
 RENDPIQGPDKVHGNTCSMCEVFFQAEEEEKKKEGKSRNKRSKSTASFEELCSEYRKS
 RKNGRLFCTRENDPIQGPDKMHGNTCMCEAFFQQE

40

50

ERARAKAKREAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEE
 EEKNDKEEKGKVEAEVKREAQELCSEYRHYVRNGLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTC
 SMCEAFFQQEAKEKERAEPRAKVKREAETCDEFRRLLQNGKLFTRENDPVRGPDGKT
 HGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGNTQDECAEYREQMKNGR
 LSCTRESPVADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEYSRSRSNGTGESGKDTCDER
 SQMKNGKLICTRESPVADGKTHGNKCTMCCKLEREAAEKKKEDEDRSNTGERSNT
 GERSNDKEDLCREFRSMQRNGKLICTRENNPVRGPYGMHINKCAMCQSIFDREANERKK
 KDEEKSSSKPSNNAKDECSEFRNYIRNNELICPRENDPVHGADGKFYTNKCYMCRAVFLTE
 ALERAKLQEKPSPHRASQEEDSPDSFSSLSEMCKDYRVLPRIGYLCPKDLKPVCVGDDGQT
 YNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPPSDE

配列番号 1 1 > t r | Q 5 K 5 D 4 | Q 5 K 5 D 4 _ M O U S E S p i n k 5 タンパク質 O S = ハツカネズミ G N = S p i n k 5 P E = 2 S V = 1 (下線のシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2 を含む完全長マウス S P I N K 5)

MKTATVPMLLTAFYLTQDAAGEKGNQDPCMFKQAQMNGTLTCPKGNNSSQLNDIIFQ
 SECILCKRALEQGAPTKIMNVKVLRSANRATDPAKLNCESFQRRKDGFICPSDTSSVCGT
 DGKTYRGRCELCAENAKSQNHVDVKSEGECKSSHLETDMCSDFRANVQDGRLGCTRES
 PILGPDRTHGNRCAMCAELFLKEAKENATRNRESRIRRDAEKELCFENQVRNGRLFCT
 RESDPIRDGKMHGNKCALCAEIFMRQFTEEGKAENQKDAEERAKAKMEIQKRCSEF
 QDRARNGTLFCTRENDPIRGLDGKTHGNLCSMCQAFFKTEAEKKAEAGSRNRRGSEESET
 YAKLCDEYRKARKNGQLYCTRENAPIRGPDGKIHGNTCSMCQAFFIQEDKARAKVKREAA
 KEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDGKRHSNKCAMCASVFLLEEEKKDDKTE
 KVDAGKAKKEAVQELCRKYHTQLRNGPLRCTRRNNPIEGLDGKMYKNACFCMCWAFFQQ
 EAKKSGAGFRPKVKREVKVDCEYLALSKRGEIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKA
 VFKKENEERKRKEGENQRITSGESSSSGGNPKAKDECAQYRESMKHGQLSCTRESPVRGV
 DGEHYNNKVMCKELLQKEMEETNKSASRSNGTGSATGKDVCDFRSQMKNGKLLCT
 RESDPTRGPDGAMHGNKCAMCKERLEKEAAEKKKEDEEKRNTETNSDKEDKCHEYRS
 MQLDGRILCTRENDPVRDADGKMHVNKCAMCQMMFEREANERKMREENSRSQPTNEAK
 DQCGEVHSVEDAKPRPARSSLPSIRGISKDECSEFQNLMKNEKLTCPETDDPVRGADGT
 YQNKHCMCRDVLKNEAMKRSGLQEKSSTKEGDPEFSSSRDSDMCKNYRILPRMGY
 LCPKNLNPVCVGDDGQTYSNPCMLCHENLMRQTNTRIHNPGACEESSNLKTVSTGTPASEK
 MMQ

配列番号 1 2 マウス S P I N K 5 (マイナスシグナルペプチドアミノ酸 1 - 2 2) の成熟形態

10

20

30

40

50

EKGNDPCMFKQAQMKGNTLTCPKGNSSQLNDIIFQSECILCKRALEQGAPTKIMNVKV
LSRANRATDPAKLNCESFKQRRKDGDFICPSDTSSVCGTDGKTYRGRCCELCAENAKSQNH
VDVKSEGEKGSSHLETDMCSDFRANVQDGRLGCTRESDPILGPDRTHGNRCAMCAELFL
KEAKENATRNRESRIRRDAEKELCKEFENQVRNGRLFCTRESDPIRGPDGKMHGNKCALC
AEIFMRQFTEEKGKAENQKDAEERAKAKMEIQKRCSEFQDRARNGTLFCTRENDPIRGLD
GKTHGNLCSMCQAFFKTEAEEKKAEAGSRNRRGSEESETYAKLCDEYRKARKNGQLYCT
RENAPIRGPDGKIHGNTCSMCQAFFIQEDKARAKVKREAACEMCSEFRNQARNGMLMCTR
ENDPVVGPDGKRHSNKCAMCASVFLLEEEKKDDKTEKVDAKGAKKEAVQELCRKYH
TQLRNGPLRCTRRNNPIEGLDGKMYKNACFMCW AFFQQEAKKSGAGFRPKVKREVKVDC
SEYLALSKRGEIFCTRENDPVRGPDKTHGNKCAMCKAVFKKENEERKRKEGENQRITSG
ESSSGGNPKAKDECAQYRESMKHQLSCTRESDPVRGVGDGEHYNNKCVMCHELLQKEME
ETNKNSASRSNGTGSATGKDVCDFRSQMKNGKLLCTRESDPTRGPDGAMHGNKCAMCK
ERLEKEAAEKKKEDEEKRNTETNKSDKEDKCHEYRSMQLDGRЛИCTRENDPVRDADGK
MHVNKCAMCQMMFEREANERKMREENSRSQPTNEAKDQC GEVHNSVEDAKPRPARSSL
SIRGISKDECSEFQNLMKNEKLCPETDDPVRGADGTFYQN KCHMCRDVLKNEAMKRSGL
QEKS SDIRSTKEGDPEFSSSRDSDMCKNYRILPRMGYLCPKNLNPVC GDDGQTYSNPCML
CHENLMRQTNTRIHNPGACEESSNLKT VSTGTPASEKMMQ

配列番号 13 (Hu S P I N K 5 (E 4 9 0 - Y 7 5 7、カザールドメイン D 8 - D 1
1、二重下線：リンカー、下線：F c ヒト I g G 1 E 3 5 6 . M 3 5 8)

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEEEEKNDKEE
KGKVEAEVKREAVQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQ
EAKEKERAEPRAVKREAEKETCDEFRLLLQNGKLFCRENDPVRGPDGKTHGNKCAMC
KAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGNTQDECAEYREQMKNGRLSCTRESP
VRDADGKSYNQCTMCKAKLERAERKNEYGNSVTDKTHCPPCPAELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 14 ; (H u S P I N K 5 (E 4 9 0 - Y 7 5 7 、 カザールドメイン D 8 - D
1 1 、 二重下線 : リンカー、 下線 : F c ヒト I g G 4 . S 2 2 8 P)

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEEEEKKNDKEE
 KGKVEAEVKREAQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQ
 EAKEKERAEPRAVKREAETCDEFRRLLQNGKLFC TRENDPVRGPDGKTHGNKCAMC
 KAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGNTQDECAEYREQMKNGRLSCTRESDP
VRDADGKSNNQCTMCKAKLERAERKNEYGNSVTSKYGPPCPAFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

配列番号 15 (Hu S P I N K 5 (E 4 9 0 - Y 7 5 7 、 カザールドメイン D 8 - D 1
 1))

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEEEEKKNDKEE
 KGKVEAEVKREAQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQ
 EAKEKERAEPRAVKREAETCDEFRRLLQNGKLFC TRENDPVRGPDGKTHGNKCAMC
 KAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGNTQDECAEYREQMKNGRLSCTRESDP
VRDADGKSNNQCTMCKAKLERAERKNEY

配列番号 16 (Mu S P I N K 5 (E 4 2 1 - A 6 9 5) - F c 、 (カザールドメイン
 D 6 - D 9 、 二重下線 : リンカー、下線 : F c マウス I g G 2 a)

EAAKEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDGKRHSNKCAMCASVFLLEEEEKKDD
 KTEKVDAKGAKKEAVQELCRKYHTQLRNGPLRCTRRNNPIEGLDGKMYKNACFMCWAF
 FQQEAKKSGAGFRPKVKREVKVDCEYLALSKRGEIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMC
 KAVFKKENEERKRKEGENQRITSSESSGGNPKA KDECAQYRESMKHGQLSCTRESDPVR
GVDGEHYNNKVMCKELLQKEMEETNKNSASRSNGTGSAGNSRAQVTDKIEPRGPTIKP
CPPCKCPAPNLGGPSVIFPPKIKDVLMISSPIVCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHT
AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ
VYVLPPPEEMTKQVLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM
YSKLRVEKKNWVERNSYSCVVHEGLHNHHTKSFRTPGK

配列番号 17 (Mu S P I N K 5 (E 4 2 1 - A 6 9 5 、 カザールドメイン D 6 - D 9))

EAAKEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDGKRHSNKCAMCASVFLLEEEEKKDD
 KTEKVDAKGAKKEAVQELCRKYHTQLRNGPLRCTRRNNPIEGLDGKMYKNACFMCWAF
 FQQEAKKSGAGFRPKVKREVKVDCEYLALSKRGEIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMC
 KAVFKKENEERKRKEGENQRITSSESSGGNPKA KDECAQYRESMKHGQLSCTRESDPVR
GVDGEHYNNKVMCKELLQKEMEETNKNSASRSNGTGSA

配列番号 18 (Hu S P I N K 5 (R 2 9 1 - R 3 5 2 、 カザールドメイン D 5 、 二重

下線：リンカー、下線：F c ヒト I g G 1 E 3 5 6 . M 3 5 8)

REIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEKKKAEAR
ARGNSVTDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKE
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PVLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 19 (Hu S P I N K 5 (R 2 9 1 - R 3 5 2 、カザールドメイン D 5 、二重
下線：リンカー、下線：F c ヒト I g G 4 . S 2 2 8 P)

REIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEKKKAEAR
ARGNSVTSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSGK

配列番号 20 (Hu S P I N K 5 (R 2 9 1 - R 3 5 2 、カザールドメイン D 5)

REIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEKKKAEAR
 AR

配列番号 21 (Mu S P I N K 5 (M 2 9 3 - R 3 5 5 、カザールドメイン D 4 、二重
下線：リンカー、下線：F c マウス I g G 2 a)

MEIQKRCSEFQDRARNGTLFCTRENDPIRGLDGKTHGNLCSMCQAFFKTEAEKKAEAGSR
NRGNSRAQVTDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMISSPIVTCVV
 DVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTQHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
 NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNN
 GKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSFSRT
 PGK

配列番号 22 (Mu S P I N K 5 (M 2 9 3 - R 3 5 5 、カザールドメイン D 4)

MEIQKRCSEFQDRARNGTLFCTRENDPIRGLDGKTHGNLCSMCQAFFKTEAEKKAEAGSR
 NR

配列番号 23 > s p | Q 5 D T 2 1 | I S K 9 _ H U M A N セリンプロテアーゼ阻害剤力
 ザール 9 型 O S = ホモ・サピエンス G N = S P I N K 9 P E = 1 S V = 1 (下線のシグ
 ナルペプチドアミノ酸 1 - 19 を含む完全長ヒト S P I N K 9)

MRATAIVLLLALTATMFSIECAKQTKQMVDCHSHYKKLPPGQQRFCHHMYDPICGSDGKT
 YKNDCFFCSKVKKTDGLKFVHFGKC

配列番号 24 ヒト S P I N K 9 (マイナスシグナルペプチドアミノ酸 1 - 19) の成熟形態

10

20

30

40

50

IECAKQTQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHHMYDPICGSDGKYKNDCFFCSVKKTDGTL
KFVHFGKC

配列番号 25 (Hu S P I N K 9 (I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E .
二重下線 : リンカー、下線 : Fc ヒト Ig G1 E 3 5 6 . M 3 5 8)

IESAKQTQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHREYDPICGSDGKYKNDCFFCSVKKTDGTLK
FVHFGKCGNSVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 26 (Hu S P I N K 9 (I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E .
二重下線 : リンカー、下線 : Fc ヒト Ig G4 S 2 2 8 P)

IESAKQTQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHREYDPICGSDGKYKNDCFFCSVKKTDGTLK
FVHFGKCGNSVTSKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

20

配列番号 27 (Hu S P I N K 9 (I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E .
二重下線 : リンカー、下線 : Fc マウス Ig G2a)

IESAKQTQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHREYDPICGSDGKYKNDCFFCSVKKTDGT
LK FVHFGKCGNSRAQVTDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMSLSP
IVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTOQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK
EFKCKVNNKDLPPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPSEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIY
VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT
TKSFSRTPGK

30

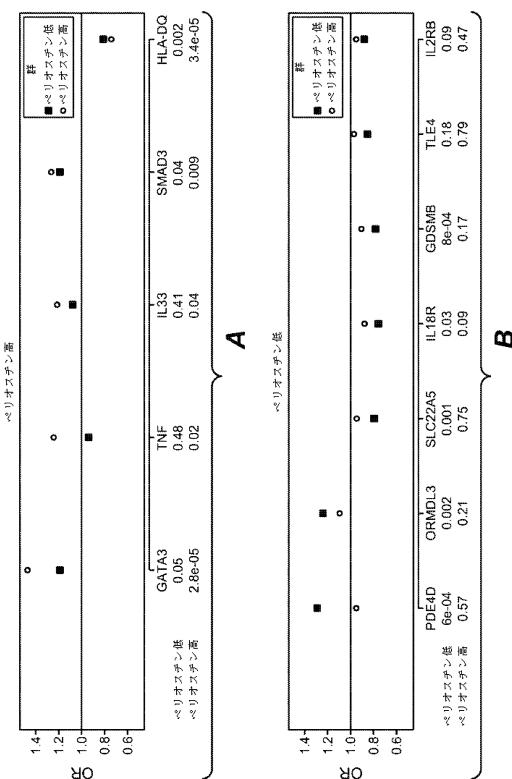
配列番号 28 (Hu S P I N K 9 (I 2 0 - C 8 6 . C 2 2 S . H 4 8 R . M 4 9 E))

IESAKQTQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHREYDPICGSDGKYKNDCFFCSVKKTDGTLK
FVHFGKC

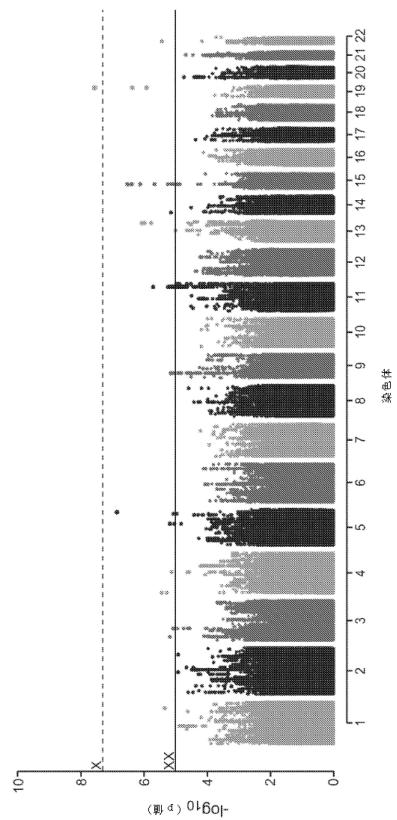
40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】



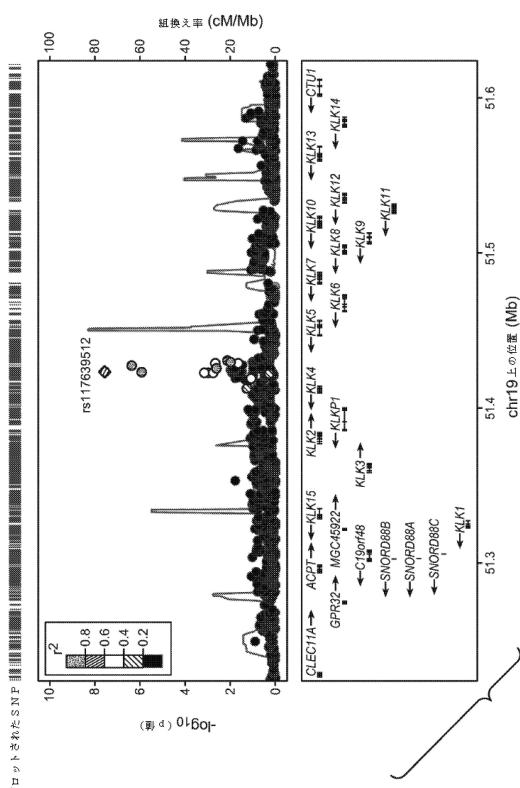
10

20

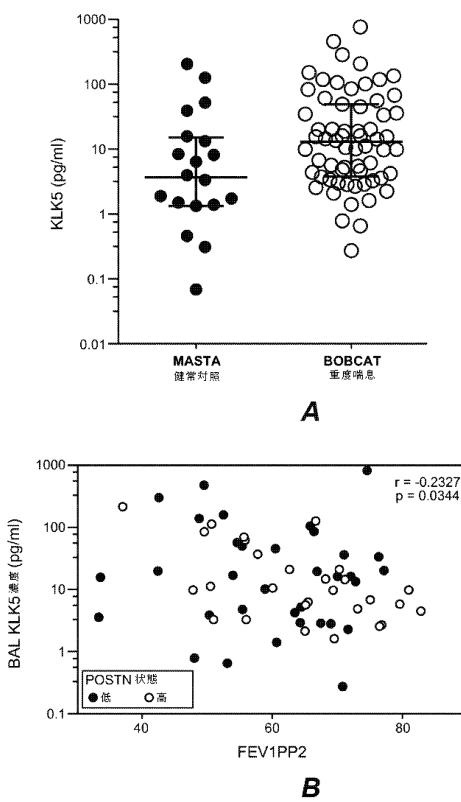
30

40

【図 3】

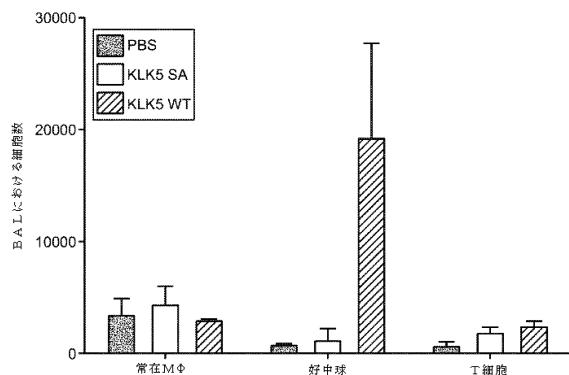


【図 4】

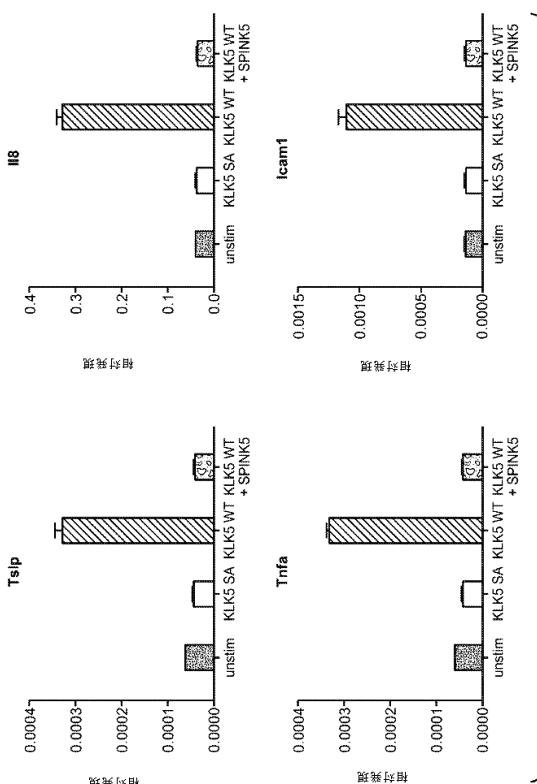


50

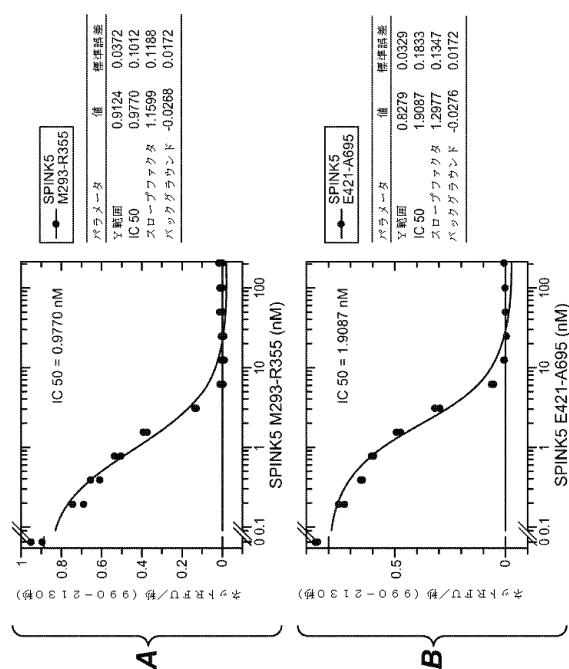
【図 5 A】



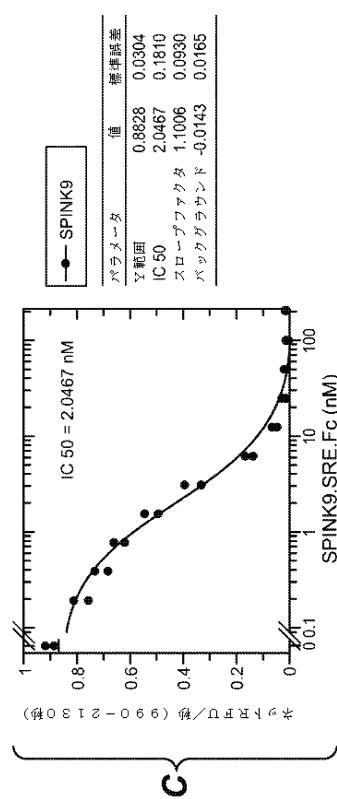
【図 5 B】



【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



10

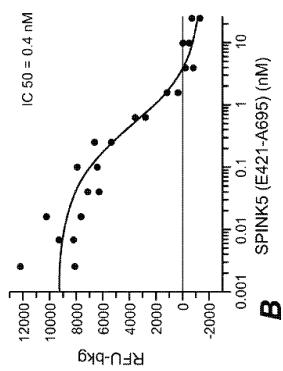
20

30

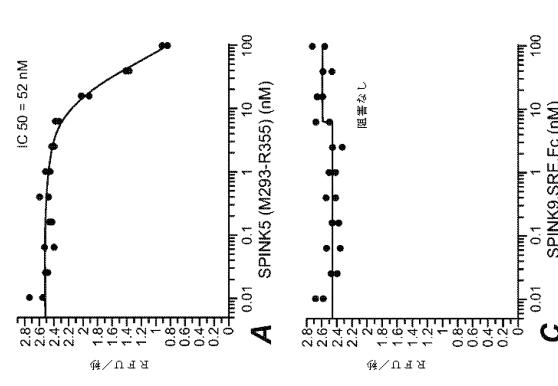
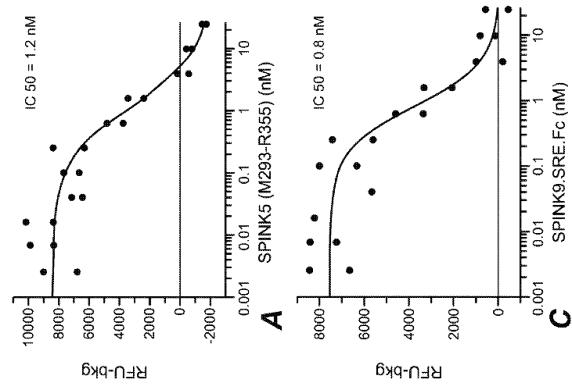
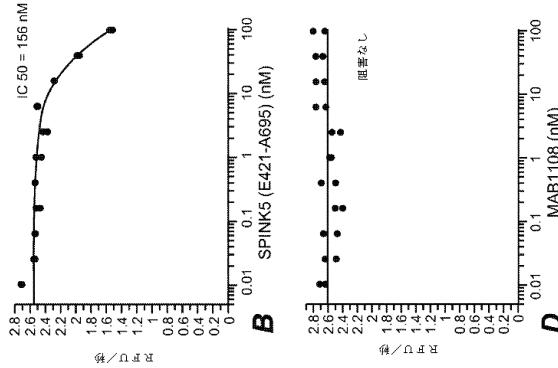
40

50

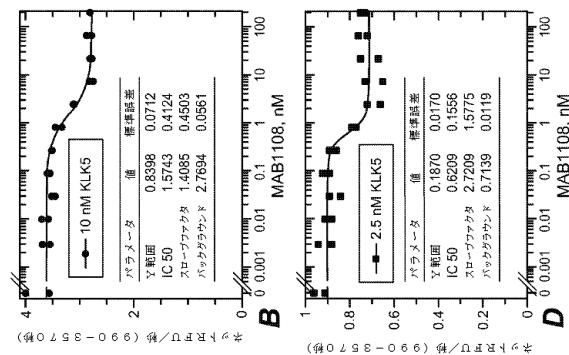
【図 7】



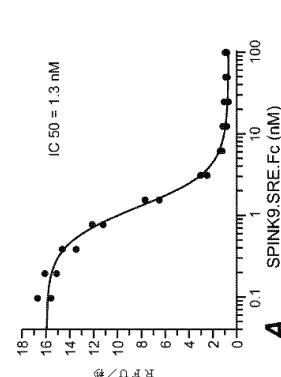
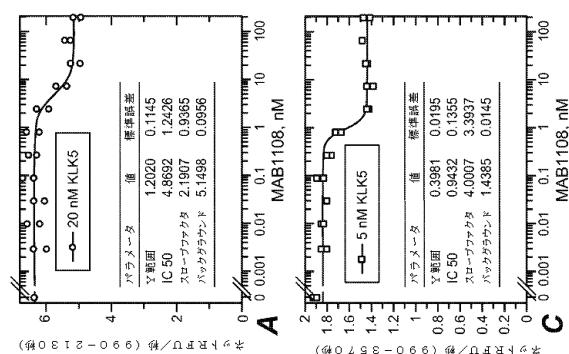
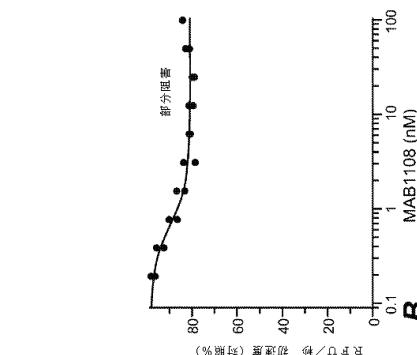
【図 8】



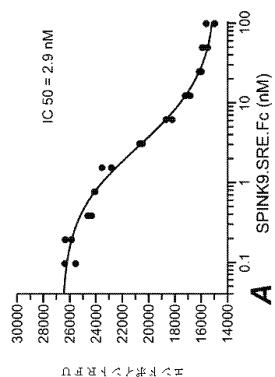
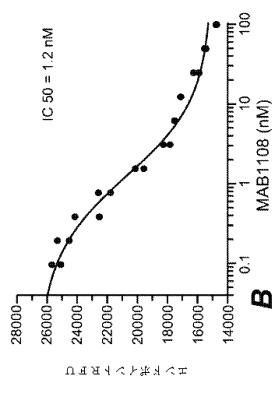
【図 9】



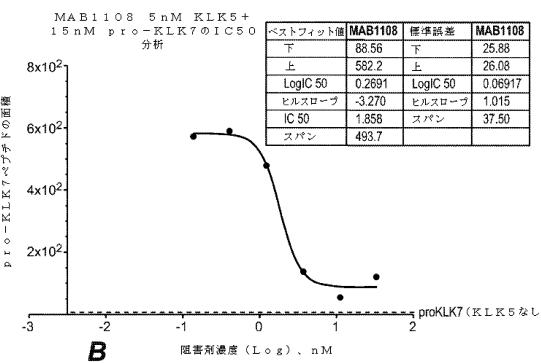
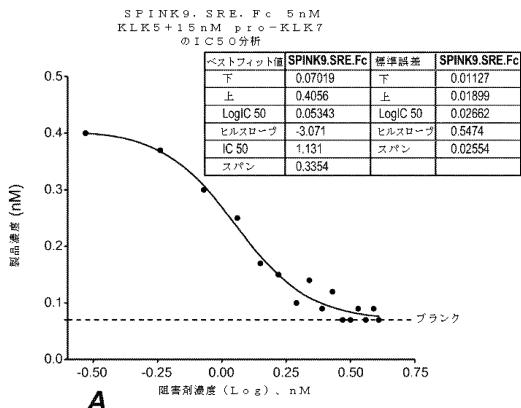
【図 10】



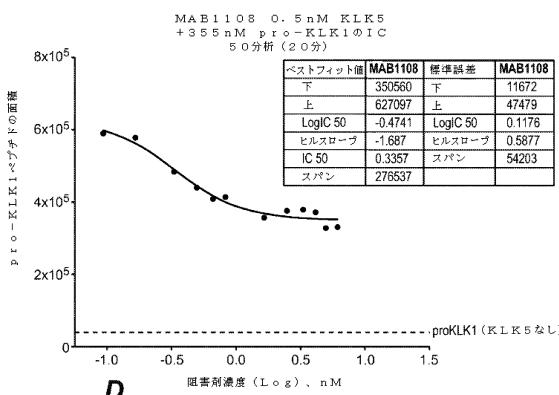
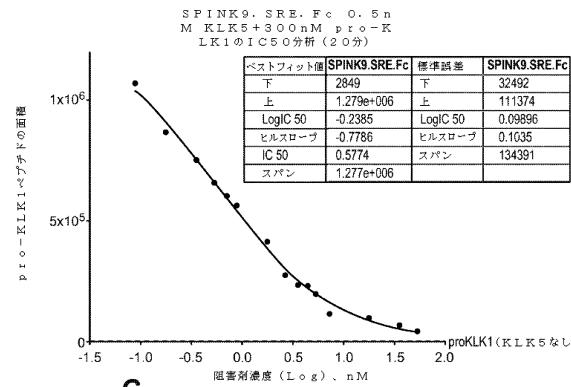
【図 1 1】



【図 1 2 - 1】



【図 1 2 - 2】



【配列表】

0007248588000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 07K	19/00 (2006.01)	F I	C 07K	19/00
C 07K	14/81 (2006.01)		C 07K	14/81

イーエヌエー ウェイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 イスマーラー , ムーレイ ヒシャム アラウイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402 , サン マテオ , サビル ウェイ 128

(72)発明者 ジャックマン , ジャネット ケー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 ラザラス , ロバート エー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 ロイット , ケリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 マウン , ヘンリー アール .

スイス国 4070 バーゼル , グレンツアッハーシュトラーセ 124

(72)発明者 ヤスパン , ブライアン エル .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 イー , タンション

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 アーロン , ジョーセフ アール .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72)発明者 ヘルナンデス - バリー , ヒルダ ワイ .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ディーエヌエー ウエイ 1 , シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表2010-518039 (JP, A)

特表2008-508862 (JP, A)

特表2007-500744 (JP, A)

Molecular Biology of the Cell , 2007年 , Vol. 18 , p. 3607-3619

Arch Dermatol Res. , 2016年 , Vol. 308 , p. 133-137

Experimental Dermatology, 41st Annual Meeting of the ADF , 2014年 , Vol. 23 , p. e4, P017

J Allergy Clin Immunol. , 2014年 , Vol. 134 , p. 891-899.e3

Respiratory Medicine , 2012年 , Vol. 106 , p. 349-355

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A 61 K 45 / 00 - 45 / 08

A 61 K 38 / 00 - 38 / 58

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)