



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161970
(43) 공개일자 2024년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7034959
(22) 출원일자(국제) 2023년03월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월21일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2023/050760
(87) 국제공개번호 WO 2023/180767
국제공개일자 2023년09월28일
(30) 우선권주장
2204159.4 2022년03월24일 영국(GB)

(71) 출원인
넥세라 파마 유케이 리미티드
영국 씨비21 6단지 캠브리지셔어 캠브리지 그레이
트 아빙톤 그랜타 파크
(72) 발명자
허칭스, 캐서린
영국 씨비21 6단지 캠브리지 그레이트 애빙턴 그
랜타 파크 슈타인메츠 빌딩 헵테일즈 테라퓨틱스
리미티드 내
오스본, 그렉
영국 씨비21 6단지 캠브리지 그레이트 애빙턴 그
랜타 파크 슈타인메츠 빌딩 헵테일즈 테라퓨틱스
리미티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이윤기

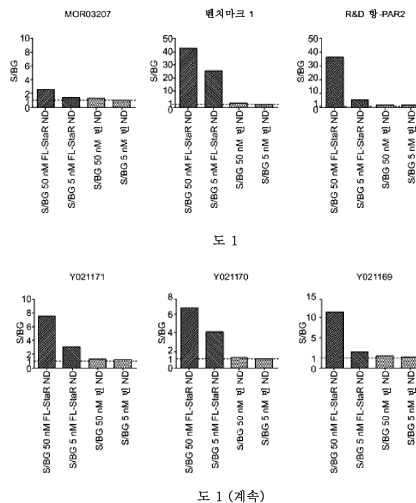
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 항-PAR2 항체

(57) 요약

본 개시내용은 인간 PAR2에 결합할 수 있는 항체 및 항원-결합 단편, 예컨대 PAR2의 이중 억제제로서 작용할 수 있는 항체를 제공한다. 이중 억제제 항체는 PAR2의 프로테아제 절단 매개된 활성화 (예를 들어 트립신에 의해) 및 PAR2의 펩티드 매개된 활성화 (예를 들어 PAR2-AP 또는 PAR1-AP에 의해) 둘 다를 억제할 수 있다. 본 개시내용은 항체 및 항원-결합 단편의 제조 및 사용 방법을 추가로 제공한다.

대표도



도 1 (계속)

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

슈렌커, 올리버

영국 씨비21 6디지 캠프리지 그레이트 애빙턴 그랜
타 파크 슈타인메츠 빌딩 헵테얼즈 테라퓨틱스 리
미티드 내

오크라사, 크르지스토프

영국 씨비21 6디지 캠프리지 그레이트 애빙턴 그랜
타 파크 슈타인메츠 빌딩 헵테얼즈 테라퓨틱스 리
미티드 내

주코프, 안드레이

영국 씨비21 6디지 캠프리지 그레이트 애빙턴 그랜
타 파크 슈타인메츠 빌딩 헵테얼즈 테라퓨틱스 리
미티드 내

슈미트, 아니카

독일 82152 플라네그 제멜바이스스트라쎄 7 모르포
시스 아게 내

크라우스, 알렉산드라

독일 82152 플라네그 제멜바이스스트라쎄 7 모르포
시스 아게 내

쉴레, 도로테

독일 82152 플라네그 제멜바이스스트라쎄 7 모르포
시스 아게 내

명세서

청구범위

청구항 1

PAR2에 특이적으로 결합하여 그의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서, 여기서 항체 또는 그의 단편은 PAR2의 ECL3, 세그먼트1 및 헬릭스0/1을 포함하는 불연속 에피토프에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 1에 따라 넘버링될 때 PAR2의 영역 V55-F77 및 L306-Y326에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

임의적으로 제1항 또는 제2항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하여 그의 활성을 억제하며, 하기로부터 선택된 HCDR3을 포함하는 V_H 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편:

- (a) 서열식별번호: 5, 22 또는 30; 또는 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 5, 22 또는 30의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 HCDR3;
- (b) 서열식별번호: 5, 22 또는 30과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- (c) HCDR3 아미노산 서열이 카바트 또는 코티아에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2, 10, 13, 16, 19 또는 27로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것임.

청구항 4

임의적으로 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 도메인이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

- i. 서열식별번호: 3, 11, 14, 17, 20 또는 28로부터 선택되며, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 갖는 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는
- ii. 서열식별번호: 4, 12, 15, 18, 21 또는 29로부터 선택되며, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 갖는 HCDR2 아미노산 서열.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, V_L 도메인, 임의적으로 서열식별번호: 6, 23 또는 31과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, LCDR3을 포함하며, 여기서

- a. LCDR3 아미노산 서열이 서열식별번호: 9, 26 또는 33으로부터 선택되며, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 갖거나; 또는
- b. LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6, 23 또는 31에 따른 V_L 도메인으로부터의 것이며, 임의적으로 여기서 LCDR3 서열이 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 것인

항체 또는 그의 단편.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, V_L 도메인이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

a) i) 서열식별번호: 7, 24 또는 32의 LCDR1 아미노산 서열, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 가짐; 또는

ii) 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같은, 서열식별번호 6, 23 또는 31에 따른 V_L 도메인으로부터의 LCDR1 아미노산 서열, 임의적으로 여기서 LCDR1 서열은 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는

b) i) 서열식별번호: 8 또는 25의 LCDR2 아미노산 서열, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 가짐; 또는

ii) 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같은, 서열식별번호 6, 23 또는 31에 따른 V_L 도메인으로부터의 LCDR2 아미노산 서열, 임의적으로 여기서 LCDR2 서열은 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함.

청구항 8

임의적으로 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하며, 하기를 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편:

서열식별번호: 2, 10, 13 및 16, 19 또는 27, 또는 그와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로부터 선택된 V_H 영역; 및

서열식별번호: 6, 23 또는 31, 또는 그와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열에 따른 V_L 영역.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 10과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 16과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 19와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 27과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%,

95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, V_L 영역이 서열식별번호: 6과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, V_L 영역이 서열식별번호: 23과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, V_L 영역이 서열식별번호: 31과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 18

임의적으로 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 2와 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역이 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 19

임의적으로 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 10과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역이 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 20

임의적으로 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 가 서열식별번호: 13과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역이 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 21

임의적으로 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 16과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역이 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 22

임의적으로 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 19와 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역이 서열식별번호: 23과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 23

임의적으로 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 영역이 서열식별번호: 27과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역이 서열식별번호: 31과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 24

임의적으로 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 여기서 V_H 가 하기를 포함하고:

(a) 서열식별번호: 3, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

(b) 서열식별번호: 4, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2;

(c) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3;

여기서 V_L 이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(d) 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1;

(e) 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2; 및

(f) 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 25

임의적으로 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 여기서 V_H 가 하기를 포함하고:

(a) 서열식별번호: 11, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

(b) 서열식별번호: 12, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2; 및

(c) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3;

여기서 V_L 이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(d) 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,

(e) 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및

(f) 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 26

임의적으로 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 여기서 V_H 가 하기를 포함하고:

(a) 서열식별번호: 14, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 14의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

(b) 서열식별번호: 15, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2;

(c) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을

갖는 HCDR3;

여기서 V_L 이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(d) 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,

(e) 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및

(f) 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 27

임의적으로 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 여기서 V_H 가 하기를 포함하고:

(a) 서열식별번호: 17, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 17의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

(b) 서열식별번호: 18, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2;

(c) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3;

여기서 V_L 이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(d) 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,

(e) 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및

(f) 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 28

임의적으로 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 여기서 V_H 가 하기를 포함하고:

(a) 서열식별번호: 20, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 20의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

(b) 서열식별번호: 21, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 21의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2;

(c) 서열식별번호: 22, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 22의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3;

여기서 V_L 이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(d) 서열식별번호: 24, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 24의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,

(e) 서열식별번호: 25, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및

(f) 서열식별번호: 26, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 26의 아미노산 서열

을 갖는 LCDR3.

청구항 29

임의적으로 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하며, 여기서 V_H 가 하기를 포함하고:

(a) 서열식별번호: 28, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 28의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

(b) 서열식별번호: 29, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 29의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2;

(c) 서열식별번호: 30, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 30의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3;

여기서 V_L 이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(d) 서열식별번호: 32, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 32의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,

(e) 서열식별번호: 25, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및

(f) 서열식별번호: 33, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 PAR2의 PAR2 펩티드 활성화를 억제하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 아미노산 서열 서열식별번호: 41, 42, 43 및 44를 포함하거나 또는 그로 이루어진 에피토프에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2 활성화의 억제가 PAR2 테더링된 리간드 결합의 억제를 포함하는 것인 항체.

청구항 33

임의적으로 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합을 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 34

임의적으로 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 클론 Y022065, Y022870, Y022877, Y022883, Y022054 및/또는 Y021171로부터 선택된 항체 또는 단편이 특이적으로 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 결합하는 에피토프가 수소 중수소 교환 (HDX) 및/또는 부위-지정 돌연변이 유발 및 유동 세포계측에 의해 식별되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 36

임의적으로 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화

펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 항체 또는 단편이 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 1 내지 100 nM의 IC₅₀으로 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 IP의 PAR2 펩티드 매개된 축적이 PAR2 펩티드 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 37

임의적으로 제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 IP의 트립신 매개된 축적을 1 내지 300 nM의 IC₅₀으로 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 트립신 매개된 축적이 트립신 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 38

임의적으로 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 단편이 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 1 내지 100 nM의 IC₅₀으로 억제하며, 임의적으로 여기서 PAR2 펩티드 억제가 HTRF 검정을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 39

임의적으로 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하며, 여기서 항체 또는 단편이 PAR2 활성화 펩티드 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 1 내지 100 nM의 IC₅₀으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원이 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 40

임의적으로 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 트립신 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 1 내지 200 nM의 IC₅₀으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원이 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 41

임의적으로 제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 세포 표면 상의 PAR2에 결합 시 세포에 내재화되지 않으며, 임의적으로 여기서 내재화가 FAC를 이용하여 항체 또는 단편 결합을 정량화함으로써 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 42

임의적으로 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 리간드 SFLLR 매개된 PAR1 활성화를 억제하지 않으며, 여기서 PAR1 활성화가 리간드 SFLLR 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 43

임의적으로 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 시노몰구스 PAR2에 600 pM 내지 5 nM 또는 그 미만의 EC₅₀으로 결합하며, 임의적으로 여기서 시노몰구스 PAR2 결합이 유동 세포계측을 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 44

임의적으로 제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 인간 PAR2에 100 pM 내지 10 nM의 K_D로 결합하며, 임의적으로 여기서 결합 친화도가 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 또는 KinExA를 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 45

임의적으로 제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 대한 항체 또는 단편의 결합이 pH 7.5 내지 6.0에서 pH 독립적인 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 46

임의적으로 제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2에 특이적으로 결합하며, 여기서 항체 또는 그의 단편이 PAR1에 결합하지 않으며, 임의적으로 여기서 PAR1 결합이 유동 세포계측 또는 ELISA를 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 47

임의적으로 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 PAR3에 결합하지 않으며, 임의적으로 여기서 PAR3 결합이 유동 세포계측 또는 ELISA를 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 48

임의적으로 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 PAR4에 결합하지 않으며, 임의적으로 여기서 PAR4 결합이 유동 세포계측 또는 ELISA를 이용하여 결정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 49

임의적으로 제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 3mg/kg 항체 또는 단편이 30일의 기간에 걸쳐 백혈구에서 PAR2 자극제 유도된 반응을 >95% 저해하며, 여기서 저해가 자극제 유도된 유전자 시그니처를 결정함으로써 측정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 50

임의적으로 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 1mg/kg 항체 또는 단편이 30일의 기간에 걸쳐 백혈구에서 PAR2 펩티드 유도된 반응을 >90% 저해하며, 여기서 저해가 자극제 유도된 유전자 시그니처를 결정함으로써 측정되는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 단편이 PAR2에 결합하고, PAR1 테더링된 리간드에 의한 PAR2의 교차 활성화를 억제하는 것인 항체 또는 단편.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에서 사용하기 위한 항체 또는 단편.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, PAR2-매개된 질환 또는 병태, 예를 들어 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (만성, 염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이터병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염 및 림프관평활근증증을 치료하는데 사용하기 위한 항체 또는 단편.

청구항 54

PAR2-매개된 질환 또는 병태, 예를 들어 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (만성, 염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이터병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염 및 림프관평활근증증을 치료하기 위한 의학의 제조에서 제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 또는 단편의 용도.

청구항 55

환자에서 PAR2-매개된 질환 또는 병태 (예를 들어 통증, 임의적으로 여기서 통증은 만성 통증, 염증성 통증, 수술후 통증, 신경병증성 통증, 골절 연관된 통증, 통풍 연관된 통증, 암 연관된 통증, 염증성 장 질환과 연관된 위장 통증 등으로부터 독립적으로 선택됨)를 치료하는 방법으로서, 상기 환자 (예를 들어 인간)에게 제1항 내지

제53항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 또는 그의 단편의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 이로써 PAR2-매개된 질환 또는 병태가 치료되는 것인 방법.

청구항 56

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 요법을 투여하는 것을 추가로 포함하며, 임의적으로 여기서 추가의 요법이 항염증성 약물, 진통제, 비스테로이드성 항염증성 약물 (NSAID), 코르티코스테로이드, 히알루론산, 아세트아미노펜, 코데인, 로르셋, 로르탭, 비코딘, 히드로코돈, 모르핀, 옥시코돈, 록시코돈, 퍼코셋, 아스피린, 셀레콕시브, 프레가발린, 아바타셉트, 아달리루맙, 아나킨라, 세르톨리주맙, 에타너셉트, 골리루맙, 인플릭시맙, 리툽시맙, 토실리주맙 및 토파시티닙으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 추가의 치료제(들)를 포함하는 것인 항체 또는 단편, 용도 또는 방법.

청구항 57

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 또는 단편 및 제약상 허용가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하고, 임의적으로 진통제, 예컨대 항염증성 약물 (예를 들어 NSAID, 예컨대 아스피린, 이부프로펜, 디클로페낙, 나프록센), 파라세타몰, 오피오이드 (예를 들어 코데인, 모르핀, 옥시코돈, 펜타닐, 부프레노르핀), 아미트립틸린, 가바펜틴; 항암 약물, 예컨대 알킬화제 (예를 들어 질소 머스타드, 니트로우레아), 항대사물 (예를 들어 엽산 유사체, 피리미딘 및 퓨린 유사체), 항생제 및 효소 (예를 들어 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, L-아스파라기나제), 천연 작용제 (예를 들어 빈카 알칼로이드, 탁센, 테칸), 호르몬 및 길항제 (예를 들어 프로게스틴, 에스트로겐, GnRH, 항에스트로겐), 히드록시우레아, 면역조절제, 티로신 키나제 억제제, 생물학적 반응 변형제, 분자 표적 요법 (예를 들어 항체 접합된 약물), 백금 기반 요법 (예를 들어 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 58

제57항에 따른 제약 조성물, 또는 제57항에 정의된 바와 같은 제약 조성물을 포함하는 키트로서, 여기서 조성물은, 예를 들어 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (만성, 염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이트병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염 및 림프관평활근종증으로부터 선택된 PAR2 매개된 질환 또는 병태를 치료하기 위한 것인 제약 조성물 또는 키트.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 환자에서 상기 질환 또는 병태를 치료하는데 사용하는 것에 대한 표지 또는 지침과 조합되며; 임의적으로 여기서 표지 또는 지침이 마케팅 승인 번호 (예를 들어, FDA 또는 EMA 승인 번호)를 포함하며; 임의적으로 여기서 키트가 상기 항체 또는 단편을 포함하는 IV 또는 주사 디바이스를 포함하는 것인 제약 조성물 또는 키트.

청구항 60

제1항 내지 제53항 및 제56항 중 어느 한 항에 있어서, V_H 도메인이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 단편:

- a. 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및
 - i. 서열식별번호: 3, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 3의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는
 - ii. 서열식별번호: 4, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 4의 HCDR2 아미노산 서열;
- b. 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및
 - i. 서열식별번호: 11, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 11의 HCDR1 아미

노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 12, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 12의 HCDR2 아미노산 서열,

c. 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 14, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 14의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 15, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 15의 HCDR2 아미노산 서열,

d. 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 17, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 17의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 18, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 18의 HCDR2 아미노산 서열,

e. 서열식별번호: 22, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 22의 HCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 20, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 20의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 21, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 21의 HCDR2 아미노산 서열,

f. 서열식별번호: 30, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 30의 HCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 28, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 28의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 29, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 29의 HCDR2 아미노산 서열,

g. HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및

i. HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는

ii. HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함,

h. HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및

i. HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서

별번호: 27로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는

ii. HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 27로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 27로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함.

청구항 61

제1항 내지 제53항, 제56항 및 제60항 중 어느 한 항에 있어서, V_L 도메인이 하기를 포함하는 것인 항체 또는 단편:

a. 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 LCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 LCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 LCDR2 아미노산 서열;

b. 서열식별번호: 26, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 26의 LCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 24, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 24의 LCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 25, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 25의 LCDR2 아미노산 서열,

c. 서열식별번호: 33, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 33의 LCDR3 아미노산 서열; 및

i. 서열식별번호: 32, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 32의 LCDR1 아미노산 서열; 및/또는

ii. 서열식별번호: 25, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 25의 LCDR2 아미노산 서열,

d. LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및

i. LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는

ii. LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함,

e. LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및

i. LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서

열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는

ii. LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함,

f. LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및

i. LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는

ii. LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 PAR2에 결합할 수 있는 항체 또는 항원-결합 단편에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 인간 PAR2 수용체의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 인간 PAR2의 활성화를 차단, 길항, 억제 또는 예방하는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 상기 항체의 제조 방법, 사용 방법, 및 그를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만성 통증 및 만성 염증은 세계 건강에 가장 큰 부담 중 두 가지이다. 만성 통증 단독은 대략 5천만 명의 미국 성인 또는 인구의 20%에서 발병한다. 만성 통증은 6개월 이상 지속되고 대부분의 날에 또는 매일 경험하는 통증으로 정의되는 쇠약화 병태이다 (<https://uspainfoundation.org/wp-content/uploads/2018/09/Chronic-pain-facts-infographic.pdf>). 만성 염증은 암, 심혈관 질환 및 당뇨병을 비롯하여 많은 수의 사망에 기여하는 질환에서 중심적인 역할을 한다. 만성 질환이 2020년까지 전세계에서 모든 사망의 대략 3/4을 차지할 것으로 예측되었다 (Helamo, Delil and Dileba, 2017). 만성 통증이 세계적인 부담임에도 불구하고, 환자는 현재 이용가능한 치료로부터 30% 통증 감소만을 제공받는다 (Rice, Smith and Blyth, 2016).

[0003] 프로테아제 활성화된 수용체 2 (PAR2)는 프로테아제-활성화된 수용체 (PAR)의 패밀리에 속하는 G 단백질-커플링된 수용체이다. PAR2는 프로테아제의 수준 상승이 발견되는 염증, 통증 및 다른 병리생리학적 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. PAR2는 췌장, 간, 신장, 소장 및 결장에서 특히 높은 수준으로 광범위하게 발현된다. 수많은 상피 및 내피 세포 및 장기에서 중간 정도의 발현이 검출되고, 뇌 또는 골격근에서의 발현에 대한 증거는 제한적이다. 또한, PAR2는 면역 및 염증성 세포, 예컨대 T-세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 비만 세포, 및 호산구에서도 발현된다.

[0004] 문헌을 통해 PAR2의 차단이 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이트병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염, 림프관평활근종증, 알리지성 비결막염 (AR), 호산구성 식도염 (EoE) 및 상피층 장막 기능과 연관된 질환에서 임상적 이익을 생성할 가능성이 있음이 시사되었다 ([Yau et al., 2013; Heuberger and Schuepbach, 2019]에서 검토됨).

[0005] 따라서, PAR2 길항제는 매우 다양한 환자에게 이익을 제공하고, 통증 및/또는 염증-관련된 병태를 완화시키는 잠재성을 가질 가능성이 있는 것으로 생각된다. 따라서, PAR2는 몇몇 질환 정후의 치료를 위해 가치있는 치료 표적으로 간주된다.

[0006] PAR2를 특이적으로 억제할 수 있는 치료 모이어터를 식별할 필요가 있다. 이러한 작용제는 PAR2 활성화의 모든 메카니즘을 억제할 수 있다면 특히 바람직할 것이다.

발명의 내용

[0007] PAR2에 결합하는 항체 및 그의 항원-결합 단편이 본원에 제공된다. 본 개시내용의 항체 및 항원-결합 단편은 특히 PAR2-매개된 신호전달을 억제하고, PAR2 활성 및/또는 신호전달에 의해 유발되거나 또는 그와 관련된 질환 및 장애를 치료하는데 유용하다.

[0008] 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하여 그의 활성을 억제하며, 여기서 항체 또는 그의 단편은 헬릭스 0 및 1을 비롯하여 PAR2의 세포외 루프 (ECL) 및 N-말단 세그먼트를 포함하는 에피토프에 결합한다. 이들 영역 둘 다에 대한 결합이 PAR2 활성의 포괄적인 기능 억제를 초래할 수 있는 것으로 믿어진다. 따라서, 본원에 제공된 항체는 PAR2의 프로테아제 절단 매개된 활성화 (예를 들어 트립신에 의해) 및 PAR2의 펩티드 매개된 활성화 (예를 들어 PAR2-AP 또는 PAR1-AP에 의해) 둘 다를 억제할 수 있다는 점에서 이중-활성이다.

[0009] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2의 불연속 에피토프에 특이적으로 결합하며, 여기서 에피토프는 헬릭스0/1 앞에 비-헬릭스 세그먼트1, 헬릭스0/1 영역 및 ECL3의 하나 이상의 영역을 포함하며, 임의적으로 여기서 세그먼트1, 헬릭스0/1 및 ECL3의 영역은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1의 인간 PAR2 서열에 따라 numbering될 때 PAR2의 V55-F77, L306-Y311 및 F312-Y326으로부터 선택된다.

[0010] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하여 그의 활성을 억제하고, 하기 HCDR3을 포함하는 V_H 도메인을 포함한다: (a) 서열식별번호: 5, 22 또는 30; 또는 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 5, 22 또는 30의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 HCDR3; (b) 서열식별번호: 5, 22 또는 30과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; 또는 d) HCDR3 아미노산 서열은 카바트(Kabat) 또는 코티아(Chothia)에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2, 10, 13, 16, 19 또는 27로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것임.

[0011] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 V_H 도메인을 포함하며, 여기서 V_H 도메인은 하기를 포함한다: i. 서열식별번호: 3, 11, 14, 17, 20 또는 28로부터 선택되며, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 갖는 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 4, 12, 15, 18, 21 또는 29로부터 선택되며, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 갖는 HCDR2 아미노산 서열.

[0012] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 V_L 도메인, 임의적으로 서열식별번호: 6, 23 또는 31과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다.

[0013] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 LCDR3을 포함하며, 여기서 a) LCDR3 아미노산 서열은 서열식별번호: 9, 26 또는 33으로부터 선택되며, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 갖거나; 또는 b) LCDR3 아미노산 서열은 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6, 23 또는 31에 따른 V_L 도메인으로부터의 것이며, 임의적으로 여기서 LCDR3 서열은 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0014] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 V_L 도메인을 포함하며, 여기서 V_L 도메인은 하기를 포함한다: a) i) 서열식별번호: 7, 24 또는 32의 LCDR1 아미노산 서열, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 가짐; 또는 ii) 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같은, 서열식별번호: 6, 23 또는 31에 따른 V_L 도메인으로부터의 LCDR1 아미노산 서열, 임의적으로 여기서 LCDR1 서열은 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는 b) i) 서열식별번호: 8 또는 25의 LCDR2 아미노산 서열, 임의적으로 그에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 가짐; 또는 ii) 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같은, 서열식별번호: 6, 23 또는 31에 따른 V_L 도메인으로부터의 LCDR2 아미노산 서열, 임의적으로 여기서 LCDR2 서열은 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함.

[0015] PAR2에 특이적으로 결합하고, 서열식별번호: 2, 10, 13 및 16, 19 또는 27, 또는 그와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로부터 선택된 V_H 영역; 및 서열식별번호: 6, 23 또는 31, 또는 그와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열

에 따른 VL 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 본원에 제공된다.

[0016] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 10과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 16과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 19와 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 27과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VL 영역을 포함하며, 여기서 VL 영역은 서열식별번호: 23과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VL 영역을 포함하며, 여기서 VL 영역은 서열식별번호: 31과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 2와 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역은 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 10과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역은 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 13과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역은 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 16과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역은 서열식별번호: 6과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 19와 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역은 서열식별번호: 23과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 VH 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 서열식별번호: 27과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역은 서열식별번호: 31과 동일한 또는 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하며, 여기서 VH는 하기를 포함하고: (a) 서열식별번호: 3, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1; (b) 서열식별번호: 4, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2; (c) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 여기서 VL은 하기를 포함한다: (d) 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1; (e) 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2; 및 (f) 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3.

[0019] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하며, 여기서 VH는 하기를 포함하고: (a) 서열식별번호: 11, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1; (b) 서열식별번호: 12, 또는 3, 2

와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 79의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 80과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 80의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 83과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 83의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 84와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 84의 아미노산 서열을 포함한다.

[0025]

실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 V_H 도메인을 포함하며, 여기서 V_H 도메인은 하기를 포함한다:

a) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 3, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 3의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 4, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 4의 HCDR2 아미노산 서열; b) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 11, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 11의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 12, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 12의 HCDR2 아미노산 서열, c) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 14, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 14의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 15, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 15의 HCDR2 아미노산 서열, d) 서열식별번호: 5, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 5의 HCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 17, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 17의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 18, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 18의 HCDR2 아미노산 서열, e) 서열식별번호: 22, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 22의 HCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 20, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 20의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 21, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 21의 HCDR2 아미노산 서열, f) 서열식별번호: 30, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 30의 HCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 28, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 28의 HCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 29, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 29의 HCDR2 아미노산 서열, g) HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및 i. HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는 ii. HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 2로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함, h) HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및 i. HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는 ii. HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 10으로부터 선택된 V_H 도메인으로부터의 것이거나, 또는 HCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식

[illegible]

[0026]

실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 V_L 도메인을 포함하며, 여기서 V_L 도메인은 하기를 포함한다:
a) 서열식별번호: 9, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 9의 LCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 7, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 7의 LCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 8, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 8의 LCDR2 아미노산 서열; b) 서열식별번호: 26, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 26의 LCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 24, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포

합하는 서열식별번호: 24의 LCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 25, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 25의 LCDR2 아미노산 서열, c) 서열식별번호: 33, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 33의 LCDR3 아미노산 서열; 및 i. 서열식별번호: 32, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 32의 LCDR1 아미노산 서열; 및/또는 ii. 서열식별번호: 25, 또는 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함하는 서열식별번호: 25의 LCDR2 아미노산 서열, d) LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및 i. LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는 ii. LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 6으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함, e) LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및 i. LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는 ii. LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 23으로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함, f) LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR3 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및 i. LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR1 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함; 및/또는 ii. LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이거나, 또는 LCDR2 아미노산 서열이 코티아 또는 카바트에 의해 정의된 바와 같고, 서열식별번호: 31로부터 선택된 V_L 도메인으로부터의 것이며, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 포함함.

[0027] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단리되거나 또는 정제된다.

[0028] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2의 PAR2 펩티드 활성화를 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하여 그의 활성을 억제하며, 여기서 PAR2 활성의 억제는 PAR2 수용체의 세그먼트1, 헬릭스0/1, ECL3에 대한 결합을 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2 활성화를 억제하며, 여기서 PAR2 활성화의 억제는 PAR2 테더링된 리간드 결합의 억제를 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2 활성화를 억제하며, 여기서 PAR2 활성화의 억제는 PAR1-PAR2 이중이량체에서 PAR1 테더링된 리간드에 의한 교차-활성화의 억제를 포함한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합을 억제한다. 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 PAR2의 프로테아제 절단 매개된 활성화 (예를 들어 트립신에 의해) 및 PAR2의 펩티드 매개된 활성화 (예를 들어 PAR2-AP 또는 PAR1-AP에 의해)를 억제할 수 있다.

[0029] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 클론 Y022065, Y022870, Y022877, Y022883, Y022054 및/또는

Y021171로부터 선택된 항체 또는 단편이 특이적으로 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합한다.

- [0030] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 에피토프에 결합하며, 여기서 항체 또는 단편이 결합하는 에피토프는 수소 중수소 교환 (HDX) 및/또는 부위-지정 돌연변이 유발 및 유동 세포계측에 의해 식별된다.
- [0031] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 항체 또는 단편은 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 1 내지 100 nM의 IC₅₀으로 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 IP의 PAR2 펩티드 매개된 축적은 PAR2 펩티드 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다.
- [0032] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2의 트립신 매개된 활성화를 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IP의 트립신 매개된 축적을 1 내지 300 nM의 IC₅₀으로 억제하며; 임의적으로 여기서 IP의 트립신 매개된 축적은 트립신 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다.
- [0033] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 1 내지 100 nM의 IC₅₀으로 억제하며, 임의적으로 여기서 PAR2 펩티드 억제는 HTRF 검정을 이용하여 결정된다.
- [0034] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하며, 여기서 항체 또는 단편은 PAR2 활성화 펩티드 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 1 내지 100 nM의 IC₅₀으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다.
- [0035] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 트립신 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 1 내지 200 nM의 IC₅₀으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다.
- [0036] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포 표면 상의 PAR2에 결합 시 세포에 내재화되지 않으며, 임의적으로 여기서 내재화는 FAC를 이용하여 항체 또는 단편 결합을 정량화함으로써 결정된다.
- [0037] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 리간드 SFLLR 매개된 PAR1 활성화를 억제하지 않으며, 여기서 PAR1 활성화는 리간드 SFLLR 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다.
- [0038] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 시노몰구스 PAR2에 600 pM 내지 5 nM 또는 그 미만의 EC₅₀으로 결합하며, 임의적으로 여기서 시노몰구스 PAR2 결합은 유동 세포계측을 이용하여 결정된다.
- [0039] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 PAR2에 100 pM 내지 10 nM의 K_D로 결합하며, 임의적으로 여기서 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 또는 KinExA를 이용하여 결정된다.
- [0040] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 PAR2에 대한 항체 또는 단편의 결합은 pH 7.5 내지 6.0에서 pH 독립적이다.
- [0041] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR1에 결합하지 않으며, 임의적으로 여기서 PAR1 결합은 유동 세포계측 또는 ELISA를 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR3에 결합하지 않으며, 임의적으로 여기서 PAR3 결합은 유동 세포계측 또는 ELISA를 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR4에 결합하지 않으며, 임의적으로 여기서 PAR4 결합은 유동 세포계측 또는 ELISA를 이용하여 결정된다.
- [0042] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 3mg/kg 항체 또는 단편은 30일의 기간에 걸쳐 백혈구에서 PAR2 자극제 유도된 반응을 >95% 저해하며, 여기서 저해는 자극제 유도된 유전자 시그니처를 결정함으로써 측정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 1mg/kg 항체 또는 단편은 30일의 기간에 걸쳐 백혈구에서 PAR2 펩티드 유도된 반응을 >90% 저해하며, 여기서 저해는 자극제 유도된 유전자 시그니처를 결정함으로써 측정된다.
- [0043] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 결합하는데 있어서 기능적 리간드 AZ8838과 경쟁한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 결합하는데 있어서 AZ8838과 직접적으로 경쟁한다.
- [0044] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2 동종이량체에 결합한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2-PAR1 이종이량체에 결합하며, 임의적으로 여기서 결합은 PAR1 테더링된 리간드에 의한

PAR2의 교차 활성화를 억제한다.

- [0045] 요법에서 사용하기 위해 PAR2에 결합하는 항체 및 그의 항원-결합 단편이 본원에 제공된다.
- [0046] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2-매개된 질환 또는 병태, 예를 들어 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (만성, 염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이터병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염, 및 림프관평활근증증을 치료하기 위해 사용된다.
- [0047] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2-매개된 질환 또는 병태, 예를 들어 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (만성, 염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이터병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염, 및 림프관평활근증증의 치료를 위한 의약의 제조에서 사용된다.
- [0048] 환자에서 PAR2-매개된 질환 또는 병태 (예를 들어 통증, 임의적으로 여기서 통증은 만성 통증, 염증성 통증, 수술후 통증, 신경병증성 통증, 골절 연관된 통증, 통풍 연관된 통증, 암 연관된 통증, 염증성 장 질환과 연관된 위장 통증 등으로부터 독립적으로 선택됨)를 치료하는 방법으로서, 상기 환자 (예를 들어 인간)에게 본 개시내용의 항체 또는 그의 단편의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 이로써 PAR2-매개된 질환 또는 병태가 치료되는 것인 방법이 본원에 제공된다.
- [0049] 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 추가의 요법과 조합되거나 또는 함께 투여될 수 있으며, 임의적으로 여기서 추가의 요법은 진통제, 예컨대 항염증성 약물 (예를 들어 NSAID, 예컨대 아스피린, 이부프로펜, 디클로페낙, 나프록센), 파라세타몰, 오피오이드 (예를 들어 코데인, 모르핀, 옥시코돈, 펜타닐, 부프레노르핀), 아미트립틸린, 가바펜틴; 항암 약물, 예컨대 알킬화제 (예를 들어 질소 머스타드, 니트로우레아), 항대사물 (예를 들어 엽산 유사체, 피리미딘 및 퓨린 유사체), 항생제 및 효소 (예를 들어 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, L-아스파라기나제), 천연 작용제 (예를 들어 빈카 알칼로이드, 탁센, 테칸), 호르몬 및 길항제 (예를 들어 프로게스틴, 에스트로겐, GnRH, 항에스트로겐), 히드록시우레아, 면역조절제, 티로신 키나제 억제제, 생물학적 반응 변형제, 분자 표적 요법 (예를 들어 항체 접합된 약물), 백금 기반 요법 (예를 들어 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 추가의 치료제(들)를 포함하고/거나; 임의적으로 여기서 추가의 요법은 종양의 방사선 요법 및/또는 수술적 제거로부터 선택된다.
- [0050] 본 개시내용의 항체 또는 단편 및 제약상 허용가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하고, 임의적으로 진통제, 예컨대 항염증성 약물 (예를 들어 NSAID, 예컨대 아스피린, 이부프로펜, 디클로페낙, 나프록센), 파라세타몰, 오피오이드 (예를 들어 코데인, 모르핀, 옥시코돈, 펜타닐, 부프레노르핀), 아미트립틸린, 가바펜틴; 항암 약물, 예컨대 알킬화제 (예를 들어 질소 머스타드, 니트로우레아), 항대사물 (예를 들어 엽산 유사체, 피리미딘 및 퓨린 유사체), 항생제 및 효소 (예를 들어 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, L-아스파라기나제), 천연 작용제 (예를 들어 빈카 알칼로이드, 탁센, 테칸), 호르몬 및 길항제 (예를 들어 프로게스틴, 에스트로겐, GnRH, 항에스트로겐), 히드록시우레아, 면역조절제, 티로신 키나제 억제제, 생물학적 반응 변형제, 분자 표적 요법 (예를 들어 항체 접합된 약물), 백금 기반 요법 (예를 들어 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다.
- [0051] 본 개시내용의 제약 조성물, 또는 상기 제약 조성물을 포함하는 키트로서, 여기서 조성물은, 예를 들어 아토피성 피부염, 천식, 암 (유방암, 흑색종, 두경부암을 비롯한 다양한 암), 통증 (만성, 염증성, 수술후, 신경병증성, 골절, 통풍, 암, 염증성 장 질환과 연관된 위장), 류마티스성 관절염 및 연관된 포도막염, 경피증, 전신성 홍반성 루푸스, 골관절염, 류마티스성 다발근육통, 강직성 척추염, 라이터병, 건선성 관절염, 만성 라임 관절염, 스틸병, 피부근염, 봉입체 근염, 다발근염, 및 림프관평활근증증으로부터 선택된 PAR2 매개된 질환 또는 병태를 치료하기 위한 것인 제약 조성물 또는 키트가 본원에 제공된다.
- [0052] 환자에서 질환 또는 병태를 치료하는데 사용하는 것에 대한 표지 또는 지침과 조합된 본 개시내용의 제약 조성물 또는 본 개시내용의 키트로서; 임의적으로 여기서 표지 또는 지침은 마케팅 승인 번호 (예를 들어, FDA 또는 EMA 승인 번호)를 포함하며; 임의적으로 여기서 키트는 상기 항체 또는 단편을 포함하는 IV 또는 주사 디바이스를 포함하는 것인 제약 조성물 또는 키트가 본원에 제공된다.

- [0053] 실시양태에서, 아미노산 치환(들)은 상동성 치환(들)을 포함한다. 이들 아미노산 치환(들)은 보존적 치환(들)일 수 있다. 보존적 아미노산 치환(들)은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 치환하는 것을 지칭한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리에는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리에는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산이 포함된다. 일부 측면에서, 항-PAR-2 항체에서 예측된 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산 잔기로 대체된다. 항원 결합을 제거하지 않는 아미노산 보존적 치환을 식별하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, [Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 및 Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997) 참조).
- [0054] 실시양태에서, 아미노산 치환(들)은 7.4 내지 7.6의 pH에서 PAR2 결합 검정, 예컨대 SPR 또는 Kinexa 검정에서 시험할 때 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 VL을 가진 항체 또는 항원-결합 단편과 비교하여 인간 PAR2에 대한 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 결합 친화도를 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50 또는 10배 이하로 감소시킨다.
- [0055] 본원에 제공된 항체는 인간의 것일 수 있다. 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 실시양태에서, 항체는 IgG 항체이다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 항원-결합 단편이다. 실시양태에서, 항원 결합 단편은 scFv이다. 실시양태에서, 항원-결합 단편은 Fab이다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 인간화된 것이다.
- [0056] 본원에 제공된 항체는 인간 PAR2에 결합하며, 시노몰구스 PAR2 및 레서스 PAR2에도 결합할 수 있지만, 마우스 및/또는 래트 PAR2에는 결합할 수 없다.
- [0057] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 트립신, 트립타제 및/또는 마트립타제가 PAR2와 상호작용하는 것을 방지한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 트립신에 의해 PAR2 활성화를 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 테더링된 리간드의 노출을 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 테더링된 리간드가 PAR2와 상호작용하는 것을 방지한다.
- [0058] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현할 수 있는 핵산이 본원에 제공된다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 34, 70 및 72 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 34, 70 및 72 중 어느 하나와 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 34, 70 및 72 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 35, 36, 37, 38, 71 및 73 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 35, 36, 37, 38, 71 및 73 중 어느 하나와 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 35, 36, 37, 38, 71 및 73 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 34와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 34와 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 34의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 38과 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 38과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 실시양태에서, 핵산은 서열식별번호: 38의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0059] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 단리되거나 또는 정제된다.
- [0060] 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 핵산 중 임의의 하나 이상을 포함하는 벡터의 세트를 제공한다.
- [0061] 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 벡터 중 임의의 하나 이상을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0062] 실시양태에서, 본 개시내용은 제약상 허용가능한 담체 및 본원에 개시된 임의의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 제공한다. 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 동결 건조된 조성물을 제공한다.

[0063] 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 재구성된 동결 건조된 조성물을 제공한다. 실시양태에서, 조성물은 로젠지, 스프레이, 경구 투여, 지연 방출 또는 지속 방출, 경점막 투여, 시럽, 점막 접착, 협측 제형, 점막 접착 정제, 국소 투여, 비경구 투여, 주사, 피하 투여, 경구 용액, 직장 투여, 협측 투여 또는 경피 투여에 의한 투여를 위해 제형화된다.

[0064] 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 항체 또는 항원-결합 단편 또는 본원에 개시된 임의의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0065] 실시양태에서, 본 개시내용은 통증 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 임의의 조성물의 제약학적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 통증은 침해수용성, 신경병증성 및 혼합형 통증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 통증은 두통, 만성 두통, 편두통, 압, 바이러스 감염, 류마티스성 관절염, 골관절염, 크론(Crohn) 질환, 간 질환, 다발성 경화증, 척수 손상, 포진 후 신경통, 당뇨병성 신경병증, 요통, 염증성 심장 질환, 신장 질환, 위염, 치은염, 치주 질환, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 자가면역 질환, 과민성 대장 증후군, 섬유근육통, 하지 통증, 하지 불안 증후군, 당뇨병성 신경병증, 알러지성 병태, 수술적 처치, 급성 또는 만성 신체 손상, 뼈 골절 또는 압제 손상, 척수 손상, 염증성 질환, 비염증성 신경병증성 또는 기능장애성 통증 병태, 또는 이들의 조합과 연관이 있다. 일부 실시양태에서, 통증은 골관절염 통증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0066] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 배양된 세포에서 본원에 개시된 임의의 핵산을 발현시키는 단계, 항체 또는 항원-결합 단편을 정제하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 임의의 항체 또는 항원-결합 단편을 생성하는 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 본 발명은 인간 PAR2 수용체에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공한다. 본 발명의 항체는 PAR2 및 그의 하류 신호전달 캐스케이드를 억제하는데 유용하다.

[0068] 본 개시내용을 기재하기 전에, 본 개시내용이 기재된 특정한 방법 및 실험 조건으로 제한되지 않음을 이해해야 하며, 따라서 이러한 방법 및 조건은 다양할 수 있다. 또한, 본원에 기재된 용어는 특정한 실시양태를 설명하는 것에만 목적이 있으며, 제한하는 것으로 의도되지 않음을 이해해야 한다.

[0069] PAR2 또는 GPR11 (PAR2; 인간 PAR2 유니프روت(Uniprot) 단백질 ID: P55085)은 프로테아제-활성화된 수용체(PAR)의 패밀리에 속하는 44 kDa G 단백질-커플링된 수용체이다. 이는 유전자 *F2RL1* (웅고 인자 II 수용체-유사 1)에 의해 코딩된다. PAR2는 세포의 N-말단 내에서 단백질 분해성 절단에 의해 활성화되는 프로테아제-활성화된 수용체 (PAR)의 패밀리에 속한다. 이 패밀리는 상이한 프로테아제에 의해 활성화된 4가지 구성원 PAR1-PAR4를 포함한다. PAR2는 주로 세린 프로테아제 트립타제 및 트립신에 의해 활성화되는 반면에, 다른 PAR 패밀리의 구성원은 주로 트롬빈에 의해 활성화되지만, 프로테이나제 3, 인자 VIIa 및 인자 Xa 또한 PAR 활성화에 관여하는 것으로 설명된다. 검토를 위해, [Yau et al., 2016; Mrozkova et al., 2016; Hamilton and Trejo, 2017; Kagota et al., 2016]을 참조한다.

[0070] PAR2는 3가지 주요 메커니즘에 의해 활성화된다. 메커니즘 중 하나는 프로테아제에 의한 세포의 N-말단 도메인의 절단을 수반한다. 이는 수용체 상의 세포의 루프 2에 있는 보존된 영역에 결합하고 세포내 신호전달을 촉발시키는 테더링된 리간드의 노출을 일으킨다. 대안적으로, PAR2는 테더링된 N-말단 리간드의 처음 6개의 아미노산을 모방하는 활성화된 펩티드 (PAR2-AP)로 공지된 합성의 짧은 펩티드에 의해 활성화될 수 있다. 추가로, PAR2는 또한 PAR1-PAR2 이중이량체화에서 PAR1 테더링된 리간드에 의한 교차-활성화에 의해 활성화될 수 있다. PAR2의 활성화 시, G_{aq} 및 G_i 단백질이 활성화되어, 칼슘이 유입되고, MAPK 신호전달 및 하류 염증성 신호전달이 유도된다. 이는 후속적인 생물학적 반응, 예컨대 염증 유발성 시토카인, 예를 들어 IL-6, IL-8 (CXCL8로도 공지됨) 및 GM-CSF의 증식 또는 분비를 일으킨다.

[0071] PAR2 발현은 인간 류마티스성 관절염 및 관절염 동물 모델에서 활막, 연골세포 및 조직에서 증가하는 것으로 나타났다 (Amiable et al. 2009). PAR2는 또한 염증성 통증에 수반되는 리간드-게이팅 이온 채널인 TRPV1 (Dai et al. 2007)과 같은 채널을 통한 신호전달을 강화시킨다. PAR2 신호전달은 또한 생체내에서 TRPV1을 민감화시켜, 열 통각과민을 일으키는 것으로 공지되어 있다 (Amadesi et al., 2006).

[0072] PAR2 활성화는 다양한 염증성 신호전달 경로를 담당하는 것으로 나타났다. PAR2 수용체가 결여된 마우스에서는, 염증성 매개체에 대한 반응으로 염증 개시가 지연된다 (Lindner et al., 2000). 다른 설치류

PAR2 녹아웃 연구를 통해 PAR2가 여러 질환 병태, 예컨대 통증, 골관절염을 비롯한 근골격계 염증, 신경 염증성 장애, 기도 염증, 가려움증, 피부염, 대장염 및 관련 병태의 병리생리학에서 중요한 역할을 하는 것으로 입증되었다 (Yau et al. 2013). PAR2 수용체 길항제, 예컨대 GB88은 또한 래트에서 콜라겐-유도된 관절염 모델을 비롯하여 생체내에서 염증 반응을 차단하는 것으로 나타났다 (Lohman et al. 2012).

- [0073] 공지된 소분자 PAR2 길항제는 적당한 효능 및 광범위한 특이성으로 인해 이상적인 치료제가 아니다. PAR2가 핵심적인 것으로 고려되는 질환의 범위를 감안할 때, 강력하고 특이적인 PAR2 길항제를 식별할 필요가 있다. 본 발명의 항체는 N-말단 도메인의 절단에 의해 매개되는 PAR2 활성화를 억제하는 강력하고 특이적인 PAR2 길항제이다.
- [0074] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0075] 본원에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 개시내용의 실시 또는 교시에 이용될 수 있지만, 이제 바람직한 방법 및 물질이 기재된다.
- [0076] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명확하게 달리 지시되지 않는다면 복수 형태를 포함한다.
- [0077] 본원에서 사용된 "및/또는"이 다른 것의 존재 또는 부재 하에 두 가지 지정된 특징 또는 성분 각각을 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 함을 여기서 지적하는 것이 편리하다. 예를 들어, "A 및/또는 B"는 각각이 본원에 개별적으로 제시된 것과 같이 (i) A, (ii) B 및 (iii) A 및 B 각각을 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0078] 아미노산은 본원에서 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 권장되는 일반적으로 공지된 그들의 세 글자 기호 또는 한 글자 기호로 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 일반적으로 허용되는 그들의 한 글자 코드로 지칭될 수 있다.
- [0079] 범위를 비롯한 모든 수치 지정, 예를 들어 pH, 온도, 시간, 농도 및 분자량은 근사치이다. 항상 명확하게 언급되는 것은 아니지만, 모든 수치 지정 앞에 용어 "약"이 선행한다는 것을 이해해야 한다. 또한, 항상 명확하게 언급되는 것은 아니지만, 본원에 기재된 시약이 단지 예시적인 것이고, 그의 등가물이 관련 기술분야에 공지되어 있음을 이해해야 한다.
- [0080] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 프로테아제 활성화된 수용체 2" 또는 "인간 PAR2" 또는 "PAR2" 등은 유니프루트 ID 번호: P55085를 갖는 인간 PAR2 (야생형 또는 wt)를 지칭하며, 본원에서 서열식별번호: 1로 재현된다. 인간 PAR2는 임의의 서열식별번호: 1의 아미노산 서열과 적어도 99% 또는 100% 동일한 임의의 서열, 또는 그의 생물학적으로 활성인 단편을 포함한다.
- [0081] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "테더링된 리간드"는 프로테아제 (예를 들어, 트립신)에 의한 단백질 분해성 절단 후 노출되고, 일단 절단되면 PAR2 수용체 상의 근위 결합 부위에 결합하여 그를 활성화시키는 PAR2의 N-말단 부분의 영역을 지칭한다. 인간 PAR2 수용체의 N-말단에서 테더링된 리간드는 서열식별번호: 39를 포함한다.
- [0082] "PAR2-AP", "PAR2 활성화된 펩티드" 또는 "PAR2 활성화 펩티드"는 절단된 테더링된 N-말단 리간드를 모방하는 합성의 짧은 펩티드를 의미한다. 인간 펩티드는 서열식별번호: 39이고, 뮤린 펩티드는 서열식별번호: 40을 포함한다.
- [0083] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체", "PAR2에 대한 항체" 또는 "항-PAR2"는 전체 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 항체는 (예를 들어, 결합, 입체 장애, 안정화/탈안정화, 공간 분포에 의해) PAR2와 상호작용하고, PAR2의 활성화를 방해한다. 천연 발생 "항체"는 디설피드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질이다. 중쇄는 가변 영역 (VH) 및 불변 영역을 포함하고, 경쇄는 가변 영역 (VL) 및 불변 영역을 포함한다. VH 및 VL 영역은 추가로 초가변 (HV) 및 프레임워크 (FR) 영역으로 나뉘어질 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 4개의 FR로 구성된다. 용어 "항체"는 예를 들어 모노클로날 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 상어 항체, 낙타과 항체, 또는 키메라 항체를 지칭할 수 있다.
- [0084] 경쇄 및 중쇄 둘 다 구조적 및 기능적 상동성의 영역으로 나뉘어진다. 용어 "불변" 및 "가변"은 기능적으로 사용된다. 이와 관련하여, 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 도메인이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 것이 이해될 것이다. 대조적으로, 경쇄 (CL) 및 중쇄 (CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 중요한 생물학적 성질, 예컨대

분비, 태반 경유 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 부여한다. 관례에 따라, 불변 영역 도메인의 넘버링은 항체의 항원-결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 더 멀어질수록 증가한다. N-말단은 가변 영역이고, C-말단은 불변 영역이며; CH3 및 CL 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 포함한다.

[0085] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (이뮤노글로불린)는 상이한 클래스로 배정될 수 있다. 인간에서 이뮤노글로불린의 5가지 주요 클래스 (이소타입): IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이들 중 몇몇은 하위 클래스, 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 나뉘어질 수 있다. 이뮤노글로불린의 상이한 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 지칭된다. 이뮤노글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 널리 공지되어 있고, 일반적으로 예를 들어 [Abbas et al., (2000)]에 기재되어 있다. 항체는 항체와 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유적인 또는 비공유적인 회합에 의해 형성된 더 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0086] "상보성 결정 영역" ("CDR")은 임의의 수많은 널리 공지된 체계, 예컨대 표 1에 나타낸 "카바트" 및 "코티아" 넘버링 체계를 이용하여 결정되는 경계를 갖는 아미노산 서열이다. 예를 들어, 카바트 체계 하에, 중쇄 가변 도메인 (VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 넘버링되는 반면에; 코티아에서는 VH의 CDR 아미노산이 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 넘버링된다.

[0087] 표 1: CDR 정의 (넘버링은 카바트 명명법에 따름).

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

[0088]

[0089] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 항체의 "항원-결합 단편" 또는 "에피토프-결합 단편" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 천연 발생의, 효소적으로 수득가능한, 합성의 또는 유전자 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편은 예를 들어 항체 가변 및 임의적으로 불변 도메인을 코딩하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 임의의 적합한 표준 기술, 예컨대 단백질 분해성 소화 또는 재조합 유전자 조작 기술을 이용하여 완전 항체 분자로부터 유래될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/거나, 예를 들어 상업적인 공급원, DNA 라이브러리 (예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함)로부터 용이하게 입수가능하거나, 또는 합성될 수 있다. DNA는 화학적으로 또는 분자 생물학 기술을 이용하여 시퀀싱되고 조작되어, 예를 들어 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 형태로 배열할 수 있거나, 또는 코돈의 도입, 시스테인 잔기의 생성, 아미노산의 변형, 부가 또는 결실 등을 수행할 수 있다.

[0090] 2개의 단편 가변 (Fv) 도메인, VL 및 VH가 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 VL 및 VH 영역이 쌍을 형성하여 1가 분자 (단일 쇠 Fv (scFv)로 공지됨; 예를 들어 [Bird et al., 1988; 및 Huston et al., 1988] 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇠로 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 결합될 수 있다. 이러한 단일 쇠 항체는 또한 용어 "단편", "에피토프-결합 단편" 또는 "항체 단편" 내에 포함되는 것으로 의도된다. 이들 단편은 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되며, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

[0091] 항원-결합 단편의 추가의 비제한적인 예에는 다음이 포함된다: (i) Fab 단편; (ii) Fab' 단편; (iii) F(ab')₂ 단편; (iv) Fd 단편; (v) Fv 단편; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 초가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 구성된 최소 인식 단위 (예를 들어, 단리된 상보성 결정 영역 (CDR), 예컨대 CDR3 펩티드), 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩티드. 다른 조작된 분자, 예컨대 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 낙타과 항체, 도메인-결실된 항체, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디 (예를 들어 1가 나노바디, 2가 나노바디, 등), 애드벡틴, 소형 모듈형 면역-약제 (SMIP), 및 상어 가변 IgNAR 도메인 또한

본원에서 사용되는 표현 "항원-결합 단편" 내에 포함된다.

- [0092] 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인 (예를 들어, VH 또는 VL 중 적어도 하나)을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성을 가질 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 프레임 워크 서열에 인접하거나 또는 프레임 내에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. VL 도메인과 연관된 VH 도메인을 갖는 항원-결합 단편에서, VH 및 VL 도메인은 서로에 대해 임의의 적합한 배열로 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체일 수 있고, VH-VH, VH-VL 또는 VL-VL 이량체를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원-결합 단편은 단량체성 VH 또는 VL 도메인을 함유할 수 있다.
- [0093] 특정 실시양태에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유적으로 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인 예시적인 형태에는 다음이 포함된다: (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; 및 (xiv) VL-CL. 상기 나열된 임의의 예시적인 형태를 비롯하여 가변 및 불변 도메인의 임의의 형태에서, 가변 및 불변 도메인은 서로 직접적으로 연결될 수 있거나 또는 전체 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개의 (예를 들어, 5, 10, 15, 20, 40, 60개 또는 그 초과) 아미노산으로 구성될 수 있으며, 이는 단일 폴리펩티드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 가요성 또는 반가요성 연결을 생성한다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 글리신-세린 링커를 포함한다.
- [0094] 더욱이, 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편은 상기 나열된 임의의 가변 및 불변 도메인 형태의 동종이량체 또는 이종이량체 (또는 다른 다량체)를 서로 비공유적 회합으로 및/또는 하나 이상의 단량체성 VH 또는 VL 도메인과 함께 (예를 들어, 디설피드 결합(들)에 의해) 포함할 수 있다.
- [0095] 완전 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일특이적 또는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중특이적 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이고, 여기서 각각의 가변 도메인은 별도의 항원에 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 임의의 다중특이적 항체 포맷은 관련 기술분야에서 이용가능한 일상적인 기술을 이용하여 본 개시내용의 항체의 항원-결합 단편의 맥락에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.
- [0096] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중파라토프성 항체"는 단일 PAR2 표적 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 이중특이적 항체를 지칭한다.
- [0097] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "1가 항체"는 1개의 에피토프-결합 모이어티를 포함하는 항체를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "2가 항체"는 2개의 에피토프-결합 모이어티를 포함하는 항체를 지칭한다.
- [0098] 용어 "다가 항체"는 1 초과인 결합가를 갖는 단일 결합 분자를 지칭하며, 여기서 "결합가"는 항체 구축물의 분자당 존재하는 항원-결합 모이어티의 수로 기재된다. 따라서, 단일 결합 분자는 표적 분자 상의 1개 초과인 결합 부위에 결합할 수 있다. 다가 항체의 예에는 2가 항체, 3가 항체, 4가 항체, 5가 항체 등, 뿐만 아니라 다중특이적 항체 및 이중파라토프성 항체가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, PAR2의 경우, 다가 항체 (예를 들어, PAR2 이중파라토프성 항체)는 PAR2의 2개의 상이한 에피토프에 대해 각각 2개의 상이한 결합 모이어티를 갖는다.
- [0099] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖거나 또는 동일한 유전자 공급원으로부터 유래된 항체, 이중특이적 항체 등을 비롯한 폴리펩티드를 지칭한다. 이 용어는 또한 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 포함한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [0100] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단편 결정화가능한 영역" 또는 "Fc 영역"은 항체의 불변 도메인의 CH3, CH2, 및 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 임의적으로, Fc 영역은 일부 항체 클래스에 존재하는 CH4 도메인을 포함할 수 있다. Fc 영역은 항체의 불변 도메인의 전체 힌지 영역을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 불변 영역은 야생형 불변 영역과 비교하여 변형된다. 즉, 본원에 개시된 발명의 폴리펩티드는 3개의 중쇄 불변 도메인 (CH1, CH2 또는 CH3) 중 하나 이상에 및/또는 경쇄 불변 영역 도메인 (CL)에 변경 또는 변형을 포함할 수 있다. 예시적인 변형에는 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환이 포함된다. 이러한 변화는 이펙터 기능, 반감기 등을 최적화하기 위해 포함될 수 있다.
- [0101] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중-활성의", "이중-활성" 또는 "이중-활성 항체"는 PAR2의 프로테아제 절

단 매개된 활성화 (예를 들어 트립신에 의해) 및 PAR2의 펩티드 매개된 활성화 (예를 들어 PAR2-AP 또는 PAR1-AP에 의해) 둘 다를 억제할 수 있는 본원에 제공된 바와 같은 Ab를 지칭한다.

[0102] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "참조 항체", "참조 mAb" 또는 "참조 Ab 또는 "벤치마크" 또는 "벤치마크 항체"는 (예를 들어 양성 또는 음성 대조군 및 검정 조건 설정에 대해) 본 발명의 항-PAR2 항체에 대한 참조를 위해 실험 동안에 본 개시내용에서 사용되는 임의의 항체를 지칭한다. 본원에서 실험에 사용된 벤치마크 항체에는 다음이 포함된다: PAR2의 N-말단 에피토프에 결합하는 벤치마크 1 (Giblin et al. 2011); 벤치마크 2 (W02018167322A1) (R001053 또는 PaB670129로도 지칭됨); 벤치마크 3, 리제너론(Regeneron) Ab (R001044 또는 H4H581P로도 지칭됨); 벤치마크 4, 암젠(Amgen) Ab (R001048 또는 1A1로도 지칭됨); MAB3949, 뮌헨 R&D 시스템즈(R&D Systems) mAb; 및 벤치마크 6 (Giblin et al. 2011).

[0103] 용어 "에피토프"는 파라토프로 공지된 항체 분자의 가변 영역에 있는 특이적 항원 결합 부위와 상호작용하는 항원 결정인자를 지칭한다. 단일 항원은 1개 초과와 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체는 항원 상의 상이한 영역에 결합할 수 있고, 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 입체 배좌형 (예를 들어 불연속) 또는 선형일 수 있다. 입체 배좌형 에피토프는 선형 폴리펩티드 쇄의 상이한 세그먼트로부터의 공간적으로 병치된 아미노산에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 쇄의 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성된 것이다. 특정 상황에서, 에피토프는 항원 상의 당류, 포스포릴 기 또는 술포닐 기의 모이어티를 포함할 수 있다.

[0104] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합 부위"는 항체 또는 항원-결합 단편이 선택적으로 결합하는 PAR2 표적 분자 상의 영역을 포함한다.

[0105] 일반적으로, 특정한 표적 항원에 대해 특이적인 항체는 단백질 및/또는 거대 분자의 복잡한 혼합물에서 표적 항원 상의 에피토프에 결합할 것이다.

[0106] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "친화도"는 단일 항원 부위에서 항체와 항원 사이의 상호작용의 강도를 지칭한다. 각각의 항원 부위 내에서, 항체 "아암"의 가변 영역은 약한 비공유적인 힘을 통해 수많은 부위에서 항원과 상호작용하고; 상호작용이 더 많을수록, 친화도가 더 강하다. 본원에서 사용된 바와 같이, IgG 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, Fab 단편)에 대한 용어 "고친화도"는 표적 항원에 대해 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M, 또는 10^{-11} M 이하, 또는 10^{-12} M 이하, 또는 10^{-13} M 이하의 KD를 갖는 항체를 지칭한다. 그러나, 고친화도 결합은 다른 항체 이소타입에 대해서는 달라질 수 있다. 예를 들어, IgM 이소타입에 대한 고친화도 결합은 10^{-7} M 이하, 또는 10^{-8} M 이하의 KD를 갖는 항체를 지칭한다.

[0107] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합력"은 항체-항원 복합체의 전반적인 안정성 또는 강도에 대한 정보적 척도를 지칭한다. 이는 3가지 주요 인자: 항체 에피토프 친화도; 항원 및 항체 둘 다의 결합가; 및 상호작용하는 부분의 구조적 배열에 의해 제어된다. 궁극적으로 이들 인자는 항체의 특이성, 즉, 특정한 항체가 정확히 항원 에피토프에 결합할 가능성을 정의한다.

[0108] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태로서 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예는 다음과 같다: 유전자 또는 유전자 단편 (예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, siRNA, shRNA, RNAi 작용제, 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기, 당 및/또는 포스페이트에서 본원에 기재되거나 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다양한 변형 또는 치환에 의해 변형되거나 또는 치환될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전에 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에 예컨대 표지화 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 상기 용어는 또한 이중- 및 단일-가닥 분자 둘 다를 지칭한다. 달리 명시되지 않거나 또는 필요하지 않다면, 폴리뉴클레오티드인 본 발명의 임의의 실시양태는 이중-가닥 형태, 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 또는 예측되는 2개의 각각의 상보성 단일-가닥 형태 모두를 포함한다.

- [0109] "유전자"는 전사 및 번역된 후에 특정한 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩할 수 있는 적어도 하나의 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드 서열은 이들이 회합되는 유전자의 더 큰 단편 또는 전장 코딩 서열을 식별하기 위해 사용될 수 있다. 더 큰 단편 서열의 단리 방법은 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다.
- [0110] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산, 임의의 아미노산의 D 및 L 광학 이성질체 둘 다 및 아미노산 유사체를 지칭한다. 3개 이상의 아미노산의 펩티드는 일반적으로 펩티드 쇠가 짧은 경우에 올리고펩티드로 지칭된다. 펩티드 쇠가 긴 경우, 펩티드는 일반적으로 폴리펩티드 또는 단백질로 지칭된다. 용어 "생체마커" 또는 "마커"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 생체마커는 인간에서 발현되는 핵산, 폴리펩티드 또는 다른 유기 또는 무기 분자이며, 생체마커의 돌연변이 또는 차등 발현의 존재 또는 부재는 본 발명에 따른 항-PAR2 항체를 포함하는 임의의 처리에 대한 민감도를 결정하기 위해 사용된다. 예를 들어, 단백질은 정상 (비-암성) 세포 또는 대조군 세포에서 동일한 단백질과 비교하여 번역 후 변형, 생성, 발현, 수준, 안정성 및/또는 활성에 있어서 결핍, 돌연변이, 결실 또는 감소되는 경우에 암 세포에 대한 생체마커이다.
- [0111] 용어 "폴리펩티드", "펩티드", "펩티드 모방체" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산 뿐만 아니라 천연 발생 아미노산 중합체 및 비천연 발생 아미노산 중합체의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체에 적용된다. 상기 잔기는 펩티드 결합 또는 다른 결합, 예를 들어 에스테르, 에테르 등에 의해 연결될 수 있다.
- [0112] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 영역 (또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역)은 또 다른 서열에 대해 특정 백분율 (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%)의 "서열 동일성"을 가지며, 이는 정렬 시 두 서열을 비교할 때 해당 백분율의 염기 (또는 아미노산)가 동일함을 의미한다. 이러한 정렬 및 백분율 상동성 또는 서열 동일성은 관련 기술분야에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 [Ausubel et al., (1987)]에 기재된 것들을 이용하여 결정될 수 있다. 바람직하게는, 정렬을 위해 디폴트 파라미터가 사용된다. 바람직한 정렬 도구는 디폴트 파라미터를 이용하는 유럽 분자 생물학 실험실 - 유럽 생물정보학 연구소(European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI) 웹페이지에 제공된다. 다른 프로그램에는 하기 디폴트 파라미터를 이용하는 BLAST, BLASTN 및 BLASTP가 포함된다: 유전자 코드=표준; 필터=없음; 가닥=둘 다; 컷오프=60; 기대치=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50 서열; 분류 기준=높은 점수; 데이터베이스=중복 배제.
- [0113] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현 생성물" 또는 "유전자 생성물"은 유전자가 전사되고 번역될 때 생성되는 핵산 또는 아미노산 (예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드)을 지칭한다.
- [0114] 본원에서 사용된 바와 같이, "발현"은 DNA가 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 후속적으로 전사된 mRNA가 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유래되는 경우, 발현은 진핵생물 세포에서 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.
- [0115] 유전자에 적용되는 "차등 발현"은 유전자로부터 전사된 mRNA 또는 유전자에 의해 코딩된 단백질 생성물의 차등 생성을 지칭한다. 차등 발현된 유전자는 정상 또는 대조군 세포의 발현 수준과 비교하여 과다발현 또는 과소발현될 수 있다. 그러나, 본원에서 사용된 바와 같이, 과다발현은 유전자 발현의 증가이며, 일반적으로 정상 또는 대조군 대응물 세포 또는 조직에서 검출되는 것에 비해 적어도 1.25배 또는 대안적으로 적어도 1.5배 또는 대안적으로 적어도 2배 또는 대안적으로 적어도 3배 또는 대안적으로 적어도 4배 더 많은 발현이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 과소 발현은 유전자 발현의 감소이며, 일반적으로 정상 또는 대조군 대응물 세포 또는 조직에서 검출되는 것에 비해 적어도 1.25배 또는 대안적으로 적어도 1.5배 또는 대안적으로 적어도 2배 또는 대안적으로 적어도 3배 또는 대안적으로 적어도 4배 더 적은 발현이다. 용어 "차등 발현"은 또한 암 세포 또는 암 성 조직에서 발현이 검출되지만, 대조군 세포 또는 정상 조직 (예를 들어 비-암성 세포 또는 조직)에서는 발현이 검출 불가능한 것을 지칭한다.
- [0116] 유전자의 높은 발현 수준은 유전자의 과다 발현 또는 유전자 카피 수의 증가로 인해 발생할 수 있다. 유전자는 또한 탈조절 또는 음성 조절제 부재로 인해 증가된 단백질 수준으로 전사되고 번역될 수 있다. 마지막으로, 유전자의 높은 발현은 단백질의 증가된 안정화 또는 감소된 분해로 인해 단백질이 축적되어 발생할 수 있다.
- [0117] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "억제하다" 또는 "억제" 등은 PAR2 수용체 활성화의 방해, 길항 또는 차단을 지칭한다. 이러한 용어는 두 상태 사이의 정량적인 차이를 나타내며, 예를 들어 두 상태 사이의 통계적으로 유

의한 차이를 지칭한다. 예를 들어, "PAR2 활성화를 억제하기 위한 유효량"은 효능제 및 PAR2 차단 항체로 인한 PAR2의 활성화가 효능제 단독으로 처리된 세포와 적어도 통계적으로 유의하게 상이할 것임을 의미한다.

[0118] 용어 "치료", "치료하는", "완화" 등은 일반적으로 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 획득하는 것을 의미하기 위해 사용되며, 치료할 병태의 하나 이상의 증상의 중증도를 개선시키고, 완화시키고/거나, 감소시키는 것을 또한 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 효과는 질환, 병태, 또는 그의 징후의 개시 또는 재발을 완전히 또는 부분적으로 지연시킨다는 점에서 예방적일 수 있고/거나, 질환 또는 병태 및/또는 질환 또는 병태에서 기인하는 부작용을 부분적으로 또는 완전히 치유한다는 점에서 치료적일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"는 포유동물, 특히 인간의 질환 또는 병태의 임의의 치료를 포함하고, 다음 중 임의의 하나 이상을 포함한다: (a) 질환 또는 병태에 걸리기 쉬울 수 있지만, 아직 가진 것으로 진단받지 않은 대상체에서 질환 또는 병태가 발생하는 것을 예방하거나; (b) 질환 또는 병태를 억제하거나 (예를 들어, 그의 발달을 정지시키거나); 또는 (c) 질환 또는 병태를 경감시킴 (예를 들어, 질환 또는 병태를 퇴행시킴, 하나 이상의 증상에서 개선을 제공함). 예를 들어, 통증 (예를 들어, 만성 또는 신경병증성 통증)의 "치료"는 치료 대상체에서 통증 증상의 감소, 정지, 완화 또는 제거를 수반한다. 질환의 방법으로 치료되는 대상체의 집단에는 바람직하지 않은 병태 또는 질환을 앓고 있는 대상체 뿐만 아니라, 병태 또는 질환의 발달 위험이 있는 대상체가 포함된다.

[0119] 용어 "치료 유효 용량"은 원하는 효과를 생성하기 위해 투여되는 용량을 의미한다. 정확한 용량은 치료 목적에 따라 좌우될 것이며, 공지된 기술을 이용하여 관련 기술분야의 기술자에 의해 확인될 수 있을 것이다 (예를 들어, [The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding, 3rd Edition, 2008] 참조).

[0120] 이러한 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 결정되면, 키메라 항체는 재조합 방법에 의해 생성될 수 있다. 일반적으로 관련 기술분야에 공지되고 본원에 개시된 물질 및 방법을 이용하여, 항체를 코딩하는 핵산이 숙주 세포에 도입되고 발현된다.

[0121] "단리된" 또는 "정제된" 항체 또는 단백질은 그의 생성 환경의 성분 (예를 들어 천연 또는 재조합)으로부터 식별되고, 분리되거나, 회수된 것이다. 예를 들어, 항체 또는 단백질에는 항체가 유래된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다. 용어 "세포 물질이 실질적으로 없는" 것에는 항체가 단리되거나 또는 재조합적으로 생성된 세포의 세포 성분으로부터 분리된 항체의 제제가 포함된다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 항체에는 약 30%, 20%, 10% 또는 5% (건조 중량 기준) 미만의 이종성 단백질 (본원에서 "오염 단백질"로도 지칭됨)을 갖는 항체의 제제가 포함된다. 항체가 재조합적으로 생성되는 경우, 배양 배지가 실질적으로 없는 것 또한 바람직하며, 즉, 배양 배지는 단백질 제제의 부피의 약 20%, 10% 또는 5% 미만을 나타낸다. 항체가 화학적 합성에 의해 생성되는 경우, 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는 것이 바람직하며, 즉, 단백질 합성에 수반되는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 분리된다.

[0122] 따라서, 이러한 항체의 제제는 관심 항체 이외의 화학적 전구체 또는 화합물을 약 30%, 20%, 10% 또는 5% (건조 중량 기준) 미만으로 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단리되거나 또는 정제된다.

[0123] PAR2에 결합하는 PAR2-지정된 항체 및 그의 항원-결합 단편이 본원에 제공된다. 실시양태에서, 항체는 항-PAR2 항체 또는 항원-결합 단편을 길항시키고, 중화시키고/거나, 차단한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 항체 또는 항원-결합 단편의 "길항", "중화" 또는 "차단"은 PAR2에 대한 결합이 (i) PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합 또는 PAR2 활성화 펩티드에 의한 PAR2의 활성화를 억제하고/거나; (ii) PAR2 노출된 테더링된 리간드와 PAR2 사이의 상호작용을 방해하고/거나; (iii) PAR2와 프로테아제 (예를 들어, 트립신, 트립타제, 마트립타제, 레구마인) 사이의 상호작용을 방해하고/거나; (iv) PAR2 신호전달을 억제하고/거나 (예를 들어 PAR2 매개된 IP 축적 또는 세포내 Ca^{2+} 동원을 억제함); (v) PAR2 활성화를 억제하고/거나; (vi) PAR2의 적어도 하나의 생물학적 기능 (예를 들어 PAR2 매개된 염증 반응)을 억제하고/거나; (vii) PAR2의 적어도 하나의 생물학적 기능 (예를 들어 PAR2 매개된 IP 축적 또는 세포내 Ca^{2+} 동원을 억제함); (viii) 우세한 G_{aq} 신호전달 파트너의 활성화를 통해 유도된 PAR2 이차 메신저 신호전달을 억제하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하기 위해 의도된다. 실시양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 PAR2의 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 테더링된 리간드의 노출을 억제한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 그의 노출된 테더링된 리간드에 의한 PAR2 수용체의 활성화를 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 PAR2의 노출된 테더링된 리간드에 의한 활성화를 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 PAR2의 제2 세포외 루프 (ECL2)에 대한 노출된 테더링된 리간드의 결합을 억제한다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 불연속 에피토프에 결합하며, 여기서 상기 에피토프에 대한 결합은 입체 장애를 통해

ECL2에 대한 노출된 테더링된 리간드의 결합을 막는다. 항-PAR2 중화, 차단 또는 길항 항체에 의해 유발된 억제제는 적절한 검정을 이용하여 검출되는 한 완전할 필요가 없다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 억제되지 않은 활성 PAR2와 비교하여 PAR2 활성을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 억제한다. 대표적인 항-PAR2 항체 또는 항원-결합 단편의 활성을 검출하기 위한 검정의 일부 예는 실시예 섹션에 기재되어 있다. 숙련된 기술자는 추가의 항-PAR2 항체 활성 검정을 알고 있다.

[0124] 실시양태에서, PAR2와 프로테아제 사이의 상호작용을 방해하는 항체 또는 항원-결합 단편이 본원에 제공된다. 실시양태에서, 프로테아제는 트립신이다. 실시양태에서, 프로테아제는 호중구 엘라스타제이다. 실시양태에서, 프로테아제는 호중구 프로테이나제 3이다. 실시양태에서, 프로테아제는 비만 세포 트립타제이다. 실시양태에서, 프로테아제는 조직 인자/인자 Vila/인자 Xa이다. 실시양태에서, 프로테아제는 칼리크레인-관련된 펩티다제이다. 실시양태에서, 프로테아제는 막-테더링된 세린 프로테이나제-1/마트립타제 1이다. 실시양태에서, 프로테아제는 기생충 시스템인 프로테이나제이다.

[0125] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 염증-유도된 통증을 억제/감소시킨다.

[0126] 생리학적 세포의 pH (즉, pH 7.5)에서 고친화도로 PAR2 분자에 결합하는 PAR2-지정된 항체 및 그의 항원-결합 단편이 본원에 제공된다.

[0127] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 상기 언급된 생물학적 특징 중 하나 이상, 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 본 개시내용의 항체의 다른 생물학적 특징은 본원에 제공된 실시예 섹션을 비롯한 본 개시내용의 검토를 통해 관련 분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0128] 본 개시내용의 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PAR2 항체는 인간 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 개시내용의 인간 항체는 예를 들어 CDR에서, 실시양태에서 CDR3에서 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0129] 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 재조합 인간 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 인간 항체"에는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포에 형질감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 이뮤노글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉인 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체 (예를 들어, [Taylor et al. 1992] 참조) 또는 인간 이뮤노글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 것을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체가 포함되는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 실시양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이 유발 (또는 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우에는, 생체내 체세포 돌연변이 유발)에 적용되며, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 그와 관련이 있지만 생체내 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0130] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 항체 또는 단편은 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 IC₅₀ 값으로 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 IP의 PAR2 펩티드 매개된 축적은 PAR2 펩티드 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 항체 또는 단편은 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 약 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM 또는 80 nM 미만의 IC₅₀ 값으로 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 IP의 PAR2 펩티드 매개된 축적은 PAR2 펩티드 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하고, PAR2에 대한 PAR2 활성화 펩티드의 결합을 억제하며, 여기서 항체 또는 단편은 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 40 nM 이하의 IC₅₀으로 결합을 억제하며, 임의적으로 여기서 IP의 PAR2 펩티드 매개된 축적은 PAR2 펩티드 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서,

IP 신호전달 검정은 시스바이오 IP-원(Cisbio IP-One) HTF 검정이다.

- [0131] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IP의 트립신 매개된 축적을 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 IC_{50} 값으로 억제하며; 임의적으로 여기서 IP의 트립신 매개된 축적은 트립신 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IP의 트립신 매개된 축적을 약 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 110 nM, 120 nM, 130 nM, 140 nM, 150 nM, 160 nM, 170 nM, 180 nM, 190 nM, 200 nM, 210 nM, 220 nM, 230 nM, 240 nM, 250 nM, 260 nM, 270 nM, 280 nM, 290 nM 또는 300 nM 미만의 IC_{50} 값으로 억제하며; 임의적으로 여기서 IP의 트립신 매개된 축적은 트립신 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IP의 트립신 매개된 축적을 70 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제하며; 임의적으로 여기서 IP의 트립신 매개된 축적은 트립신 자극된 IP 신호전달 검정을 이용하여 결정된다.
- [0132] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이노시톨 모노포스페이트 (IP)의 PAR2 활성화 펩티드 매개된 축적을 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 IC_{50} 값으로 억제하며, 임의적으로 여기서 PAR2 펩티드 억제는 HTRF 검정을 이용하여 결정된다.
- [0133] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하며, 여기서 항체 또는 단편은 PAR2 활성화 펩티드 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 IC_{50} 값으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하며, 여기서 항체 또는 단편은 PAR2 활성화 펩티드 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM 또는 160 nM 미만의 IC_{50} 값으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PAR2에 특이적으로 결합하며, 여기서 항체 또는 단편은 PAR2 활성화 펩티드 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 140 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다.
- [0134] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 트립신 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 IC_{50} 으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 트립신 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 250 nM 미만의 IC_{50} 으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 트립신 매개된 칼슘 동원을 임의적으로 200 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제하며, 임의적으로 여기서 칼슘 동원은 PAR2 활성화 펩티드 자극된 칼슘 동원 검정을 이용하여 결정된다.
- [0135] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 EC_{50} 으로 시노몰구스 PAR2에 결합하며, 임의적으로 여기서 시노몰구스 PAR2 결합은 유동 세포계측을 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM 또는 10 nM 미만의 EC_{50} 으로 시노몰구스 PAR2에 결합하며, 임의적으로 여기서 시노몰구스 PAR2 결합은 유동 세포계측을 이용하여 결정된다.
- [0136] 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약 50 pM, 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM 또는 300 nM 미만의 K_D 로 인간 PAR2에 결합하며, 임의적으로 여기서 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 또는 KinExA를 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 약 100 pM, 200 pM, 400 pM, 800 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM 또는 20 nM 미만의 K_D 로 인간 PAR2에 결합하며, 임의적으로 여기서 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 또는 KinExA를 이용하여 결정된다. 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 10 nM 이하의 K_D 로 인간 PAR2에 결합하며, 임의적으로 여기서 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 또는 KinExA를 이용하여 결정된다.

- [0137] **도면**
- [0138] **도 1:** 양성 대조군 mAb '벤치마크 1' 및 상업적으로 입수가 가능한 PAR2 mAb 'R&D 항-huPAR2 mAb (MAB3949)'에 의한 특이적 PAR2 나노디스크 (FL-StaR ND) 대 빈 나노디스크 (빈 ND) 결합, 및 이들 및 도시된 3가지 PAR2 파지-유래된 항체 클론에 대해 관찰된 용량 의존적인 결합의 예. 항체는 5 μ g/mL로 플레이트 상에 직접적으로 코팅되었다. 음성 대조군인 MOR03207 항-리소자임 항체에 의해서는 유의한 백그라운드 결합이 관찰되지 않았다. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).
- [0139] **도 2:** 전장 PAR2 StaR 나노디스크를 사용하여 PAR2 mAb (일란티아(Ylanthia) 파지 항체 라이브러리로부터 유래됨)의 패널 상에서 상업적으로 입수가 가능한 양성 대조군 mAb 'MAB3949' (R&D 항-huPAR2)와의 경쟁 정도 (완전, 부분 및 비경쟁), 따라서 다양성 지표에 대한 예시. 50nM 후보 mAb는 전장 StaR 나노디스크에 대한 경쟁에서 R&D 항-huPAR2 (MAB3949)의 용량-반응에 대해 적정되었다. 완전 경쟁 및 부분 경쟁 둘 다 용량 의존적인 결합 효과를 입증한다. 참조 Ab '벤치마크 1' (N 말단 결합제) 또는 'MOR03207' (음성 대조군으로 사용된 항-리소자임 항체)에 대해서는 MAB3949와의 용량 의존적인 결합 효과 또는 경쟁이 관찰되지 않았다. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).
- [0140] **도 3:** 하기에 대해 FACS에 의해 측정된 용량 의존적인 결합: A) 검정 설정의 검증을 입증하기 위해 CHO_V5HIS-huPAR2 세포 대 CHO 부모 세포 상에서 세포 표면-발현된 PAR2에 대한 벤치마크 1 mAb 및 MAB3949. BG = 백그라운드; B) CHO_V5HIS-huPAR2 세포 대 CHO 부모 세포 상에서 재조합적으로 발현된 PAR2에 대한 클론 Y022065; C) 인간 PAR2를 내인성으로 발현하는 A549 세포 및 마우스 PAR2-발현 CHO 세포에 대한 클론 Y022065. BG = 백그라운드. 데이터는 상대 발광 단위 (RLU)로 나타낸다.
- [0141] **도 4:** 유동 세포계측에 의해 항체 클론이 전장 huPAR2 (FL-N, 두번째 행) 및 N-말단에서 말단절단된 huPAR2 (말단절단, 첫번째 행)에 결합하는 능력의 이해. 생성된 데이터는 N 말단에 우선적으로 결합하는 항체 클론 (전장 수용체, 예를 들어 Y022066) 뿐만 아니라, 말단절단된 수용체 및 전장 수용체에 결합하는 다른 항체 클론 (예를 들어 Y022065, Y022071) (여기서 에피토프는 세포외 도메인의 일부도 포함함), 및 전장 수용체가 아니라 말단절단된 수용체에 결합하는 클론 (예를 들어 Y022075)을 식별하는 능력을 입증한다.
- [0142] **도 5:** 인텔리사이트(IntelliCyt)를 이용하는 멀티플렉스 프로파일링. 그래프는 인간 PAR2-발현 세포 상에서 정제된 IgG1f_AEASS의 결합을 도시한다. 데이터는 클론 'Y022065' (기능적 후보)에 대한 예시이다. 상부) HEK Flp-In TRex 293_huPAR2 발현-유도됨, HEK Flp-In TRex 293_huPAR2 비-유도됨, Flp-In CHO_V5His_huPAR2, 부모 Flp-In CHO 세포 및 Flp-In CHO_huPAR1. 하부) HEK293F 감염된 BacMam WT FL-huPAR2 및 HEK293F 비-감염됨. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).
- [0143] **도 6:** 2가지 농도에서 반복해서 시스바이오® IP-원 Gaq 검정을 이용하여 펩티드 억제 검정에서 Y021171, Y022063 및 Y022054 & Y022065 hIgG1f_AEASS의 기능적 특성분석. 인간 PAR2에서 활성화 펩티드 유도된 효능작용의 통계적으로 유의한 억제는 6.28nM 효능제 단독의 반응에 대해 4가지 클론에서 관찰되었고, 시험한 가장 높은 농도에서 17-43% 범위였다. Y022065는 가장 활성인 후보로 식별되었다. 데이터는 단일 실행된 2개의 독립적인 실험으로부터의 평균 반응을 표준 편차와 함께 나타낸다.
- [0144] **도 7:** 나노디스크-매립된 인간 PAR2 StaR® 및 정제된 가용성 StaR® 단백질을 사용하는 Koff-순위 ELISA이며, 여기서 부모 후보는 기능적으로 이중-활성인 것으로 식별된 22개의 성숙한 IgG 후보의 계통을 나타낸다. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).
- [0145] **도 8:** FlpIn CHO-V5His-huPar2 대 FlpIn CHO 부모 세포에 대해 부모 계통별로 나타낸 친화도 성숙 클론의 결합 특이성.
- [0146] **도 9:** Fab 단편으로 포맷된 친화도 성숙 클론은 유동 세포계측에 의해 평가되는 바와 같이 인간 PAR2 발현 CHO 세포에 결합한다. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).
- [0147] **도 10:** IgG 또는 fAb로 포맷된 친화도 성숙 클론은 유동 세포계측에 의해 평가되는 바와 같이 시노몰구스 (IgG)- 및 인간-PAR2 (fAb) BacMam-감염된 HEK293 세포에 결합한다. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).
- [0148] **도 11:** 벤치마크 mAb와 비교하여 Fab 단편 및 IgG로서 친화도 성숙 리드 mAb 패널에 대한 인간 및 시노몰구스 PAR2 발현 세포와의 결합의 확인. 항체를 인간 PAR-2 및 시노 PAR-2 과다 - 발현 세포와 함께 ~5°C에서 아지드

화나트륨과 함께 밤새 인큐베이션하였다. 모든 항체는 Fab 단편 및 온전한 IgG 둘 다로서 시노 PAR-2 및 인간 PAR-2에 대한 명확한 결합을 나타낸다. 데이터는 신호를 백그라운드로 나누어서 나타낸다 (S/BG).

- [0149] **도 12:** PAR2 활성화 펩티드에 대한 억제 검정에서 리드 최적화된 클론의 기능적 특징분석. IP-원 검정을 이용하여, 시험관내 Gαq 활성화 및 인간 PAR2 활성화의 함수로서 IP의 축적을 측정한다. 각각의 값은 개별 리드 클론에 대해 반복해서 시험된 가장 높은 농도에서 10 μM MAB3949에 대해 정규화된 % 억제를 나타낸다. 리드 클론은 부모 IgG에 의해 정렬되었다. 활성화 펩티드의 억제는 모든 부모 IgG로부터 성숙한 리드 클론에 대해 관찰되었다. 백분율 억제는 R&D 시스템즈 항-인간 PAR2 MAB3949에 비해 시험한 클론에 걸쳐 0 내지 ~250% 범위이며, 이는 비슷한 농도에서 많은 수의 리드 클론이 MAB3949와 비교하여 인간 PAR2의 활성화 펩티드 효능작용의 더 큰 억제를 나타냄을 시사한다. 친화도 성숙에 의해 부모 IgG Y021171 및 Y022065로부터 유래된 리드 클론은 가장 큰 비율의 활성을 나타낸다.
- [0150] **도 13:** 소 트립신에 대한 억제 검정에서 리드 최적화된 클론의 기능적 특징분석. IP-원 검정을 이용하여, 시험관내 Gαq 활성화 및 인간 PAR2 활성화의 함수로서 IP의 축적을 측정한다. 각각의 값은 개별 리드 클론에 대해 반복해서 시험된 가장 높은 농도에서 1 μM 벤치마크 1에 대해 정규화된 % 억제를 나타낸다. 리드 클론은 부모 IgG에 의해 정렬되었다. 소 트립신의 억제는 모든 부모 IgG로부터 성숙한 리드 클론에 대해 관찰되었다. 백분율 억제는 벤치마크 1에 비해 시험한 클론에 걸쳐 0 내지 ~130% 범위이다. IgG Y022065의 성숙으로부터 식별된 리드 클론은 소 트립신 켈린지에 대해 가장 큰 비율의 활성을 입증한다. Y021171로부터 유래된 2가지 대표는 가장 높은 % 억제를 입증한다.
- [0151] **도 14:** 내인성 PAR2를 활성화시키기 위해 소 트립신에 의한 HT-29 켈린지에 대한 반응으로 측정된 칼슘 동원 검정에서 벤치마크 1 및 벤치마크 2와 비교하여 부모 클론 (Y022065) 및 친화도 성숙 리드 대표 (Y022870, Y022877, Y022883)의 용량 반응 억제제 곡선의 그래픽 표현. 데이터는 이별식 웰로서 실행된 3개의 독립적인 실험으로부터의 평균 반응을 표준 편차와 함께 나타낸다.
- [0152] **도 15:** PAR2에 대한 Y022883의 결합에 대해 pH의 효과를 결정하기 위해 비아코어(Biacore)에 의한 SPR 평가.
- [0153] **도 16:** HEK-293F-인간 PAR2 발현 세포에 대한 리드 후보 Y022870 및 Y022883의 KinExA에 의한 친화도 결정.
- [0154] **도 17:** 부모 패밀리 유래에 의한 친화도 성숙 클론의 에피토프 비닝 매트릭스. 항-huPAR2는 MAB3949이다.
- [0155] **도 18:** PAR2 (ECL3, 세그먼트1 및 헬릭스0/1)의 뒷면. HDX에 의해 유래되는 바와 같이 Y022883과 상호작용하는 PAR2의 영역은 빗금친 영역으로 나타낸다.
- [0156] **도 19:** PAR2 (ECL3, 세그먼트1 및 헬릭스0/1)의 앞면. HDX에 의해 유래되는 바와 같이 Y022883과 상호작용하는 PAR2의 영역은 빗금친 영역으로 나타낸다.
- [0157] **도 20:** PAR2 (ECL3, 세그먼트1 및 헬릭스0/1)의 측면. HDX에 의해 유래되는 바와 같이 Y022883과 상호작용하는 PAR2의 영역은 빗금친 영역으로 나타낸다.
- [0158] **도 21:** 벤치마크 1 (N-말단 결합제) 또는 Y022883으로 염색된 BacMam-감염된 HEK293F 세포의 유동 세포계측을 이용하여 검출된 WT 및 돌연변이된 (S60W, D62F, G318F, D62G & E63G) 인간 PAR2의 발현 프로파일. 이차 단독: 이차 FACS 항체 단독; n.i.: 감염되지 않음.
- [0159] **도 22:** 10mg/kg Y022883의 단일 정맥내 투여 후 래트 혈청 mAb 농도 대 시간. 데이터는 3마리의 수컷 성체 동물로부터의 평균 (빈 원)을 95% 신뢰 구간 (실선 막대)과 함께 나타내고; 개별 동물 데이터 또한 나타내고 (채워진 원); BLOQ (5ng/mL) 이하에서 검출가능한 mAb 농도는 BLOQ/2 (점선)로 보고된다.
- [0160] **도 23:** 10, 3 또는 1 mg/kg Y022883의 단일 정맥내 투여 후 시노물구스 원숭이 혈청 mAb 농도 대 시간. 데이터는 3마리의 수컷 성체 동물로부터의 평균 (10mg/kg 빈 원, 3mg/kg 채워진 사각형, 1mg/kg 채워진 삼각형)을 95% 신뢰 구간 (실선 막대)과 함께 나타내고; 개별 동물 데이터 또한 나타내고 (10mg/kg 채워진 원, 3mg/kg 채워진 사각형, 1mg/kg 빈 삼각형); BLOQ (5ng/mL) 이하의 검출가능한 mAb 농도는 BLOQ/2 (점선)로 보고된다.
- [0161] **도 24:** Y022883의 단일 10mg/kg 투여 후 시노물구스 원숭이 생체의 약력학. 데이터는 투여전 자극제-유도된 (PAR2-AP는 원으로, 트립신은 사각형으로, LPS는 삼각형으로) 유전자 시그니처의 백분율로 나타낸다.
- [0162] **도 25:** Y022883의 단일 3mg/kg 투여 후 시노물구스 원숭이 생체의 약력학. 데이터는 투여전 자극제-유도된 (PAR2-AP는 원으로, 트립신은 사각형으로, LPS는 삼각형으로) 유전자 시그니처의 백분율로 나타낸다.

- [0163] 도 26: Y022883의 단일 1mg/kg 투여 후 시노물구스 원숭이 생체의 약력학. 데이터는 투여전 자극제-유도된 (PAR2-AP는 원으로, 트립신은 사각형으로, LPS는 채워진 삼각형으로) 유전자 시그니처의 백분율로 나타낸다.
- [0164] 도 27: Y022883 (SH-C) 및 벤치마크 II (SH-D)에 의해 T84 세포에서 p38-MAPK 및 pERK의 트립신 유도된 인산화의 억제. 데이터는 비히클로의 처리에 비한 수준을 나타내고, 총 ERK 또는 p38-MAPK에 대해 정규화된다.
- [0165] 도 28: Y022883 (SH-C) 및 벤치마크 II (SH-D)에 의해 T84 세포에서 p38-MAPK 및 pERK의 PAR2-AP 유도된 인산화의 억제. 데이터는 비히클로의 처리에 비한 수준을 나타내고, 총 ERK 또는 p38-MAPK에 대해 정규화된다.
- [0166] 도 29: Y022883 (SH-C) 및 벤치마크 II (SH-D)에 의해 T84 세포에서 pERK (좌측) 및 p38-MAPK (우측)의 트립신 및 PAR2-AP 유도된 인산화의 억제. 데이터는 비히클과 양성 대조군 사이의 차이의 백분율로서 수준을 나타낸다.
- [0167] 실시예
- [0168] 본 발명의 특정 측면 및 실시양태는 이제 예시적인 방식으로 상기 기재된 도면을 참조하여 설명될 것이다.
- [0169] 실시예 1 - 전장 및 N-말단에서 말단절단된 인간 PAR2 구축물의 생성
- [0170] PAR2 구축물의 설계
- [0171] 인간 프로테아제-활성화된 수용체 2 (PAR2)의 유전자는 [Hutchison et al., 1978]을 기반으로 하는 표준 부위-지정 돌연변이 유발 전략을 이용하여 편집되어, 9개의 점 돌연변이의 도입에 의해 길항제 형태에서 수용체를 안정화시켰다 (Cheng et al. 2017). 안정화된 수용체는 또한 54개의 아미노산만큼 N-말단에서 유전적으로 말단절단되거나 (코딩된 구축물에서 첫번째 잔기는 V55임) 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 폴리머라제 연쇄 반응 ([Saiki et al., 1985]를 기반으로 하는 PCR)을 이용하여 전장 (FL-N)을 유지하였다. 4가지 모든 PAR2 단백질은 또한 안정화된 수용체 과정의 일부로서 20개의 아미노산만큼 C-말단에서 말단절단된다 (마지막 잔기 K377).
- [0172] 하기 구축물이 생성되었다:
- [0173] PAR2-1: P151: 55-377, 글리코실화, pFastBacHisStrepII, 말단절단
- [0174] PAR2-2: P166: 1-377, 탈글리코실화: N30Q, N222Q, pFastBacHis StrepII, 전장
- [0175] PAR2-3: P157: 1-377, 글리코실화, pBacMamHisStrepII, 전장
- [0176] PAR2-4: P155: 55-377, 글리코실화, pBacMamHisStrepII, 말단절단
- [0177] 항원으로서 사용하기에 충분히 안정한 N 말단에서 말단절단된 PAR2 수용체를 생성하는 근거는 N 말단만이 아니라 수용체의 다른 영역에 결합된 항체의 발견 및 식별을 가능하게 하여, 신규 항체를 생성하는 것이었다.
- [0178] 잠재적인 글리코실화 부위 N30 및 N222는 부위-지정 돌연변이 유발에 의해 FL-N 단백질 PAR2-2에서 글루타민 잔기로 치환되었다.
- [0179] StrepII 및 데카-히스티딘 태그는 숙련된 기술자에게 공지된 PCR 및 엔도뉴클레아제 클로닝 전략에 의해 C-말단에 추가되어, ELISA 검정에서 친화도 정제 및 특이적 선택을 허용하였다. PAR2-1 및 PAR2-2 유전자는 pFastBac1 벡터 (써모피셔(Thermofisher), #10360014)로 클로닝되었다. 벡터의 다중 클로닝 부위는 제한 엔도뉴클레아제로서 NheI를 사용하여 유전자 삽입을 허용하도록 변형되었다. pFastBac1 벡터는 곤충 세포에 대한 상업적인 Bac-to-Bac 발현 시스템의 일부 (Smith et al., 1983, 써모피셔, #10359016)이며, 이는 관련 기술분야에 공지되어 있고 널리 사용된다. 본 발명자들은 제조자의 지침을 따랐다. Bac-to-Bac 발현 시스템은 PAR2-1 및 -2 단백질에 대해 사용되었다. pFastBac1 벡터는 폴리헤드론 프로모터 3' 뒤에 인간 시토메갈로바이러스 프로모터를 도입시킴으로써 pBacMam 벡터를 생성하여, 포유동물 세포에서 단백질 PAR2-3 및 PAR2-4의 단백질 발현을 허용하도록 변형되었다. Bac-to-Bac 발현 시스템의 지침을 pBacMam 바이러스 생성에도 적용하였다.
- [0180] 발현
- [0181] 단백질 PAR2-3 및 PAR2-4는 10 % 태아 소 혈청 알부민 (FBS, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), #F9665)을 갖고 5 mM 부티르산나트륨 (시그마-알드리치, #303410)으로 보충된 론자(Lonza) Pro293s CDM 배지 (#BE02-025Q) 중 에서 인간 배아 신장 293 F 세포 (깁코(Gibco) 293F 세포, 써모피셔 싸이언티픽(Thermofisher Scientific), #11625019)에서 2.5×10^6 /ml의 세포 밀도에서 2.7% 바이러스로 바이러스 감염에 의해 48시간 동안 발현되었다. 세포를 Sf9-세포 발현에 대해 하기 기재된 바와 같이 수확하고 가공하였다. 포유동물 세포주는

포유동물-유사 글리코실화 패턴을 함유하는 항원을 이용하기 위한 옵션을 제공하도록 구축물 발현을 위해 사용되었다.

[0182] 단백질 PAR2-1 및 -2는 10 % FBS (시그마-알드리치, #F9665)를 갖는 발현 시스템 ES921 배지 (#96-001-01) 중 에서 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) Sf9 세포 (써모피셔, #89070101)에서 발현되었다. 세포를 3.5×10^6 /ml의 세포 밀도에서 2의 감염 다중도 (MOI)로 감염시켰다. 세포를 48시간 후에 원심분리에 의해 수확하고, 로슈(Roche) EDTA-무함유 완전 프로테아제 억제제 (PI, 시그마-알드리치, #5056489001)로 보충 된 50 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl (PAR2 완충제)로 세척하고, -80℃에서 보관하였다. 세포막을 제조하기 위해, 세포를 PI-정제로 보충된 PAR2 완충제 (PAR2/PI)에 재현탁시킨 다음, 미세유동학 미세유동기 프로세서 (Microfluidics Microfluidizer Processor)를 통해 1회 통과시켜 균질화시켰다. 막을 베크만(Beckman) 45 Ti 로터에서 135,000 g에서 1시간 동안 초원심분리에 의해 수집하고, PAR2/PI 완충제로 균질화시키고, -80℃에서 보관하였다. 모든 후속적인 정제 단계는 4℃에서 수행되었다.

[0183] 정제

[0184] 해동된 막은 1% (w/v) LMNG (아나트레이스(Anatrace), #NG310) / 0.1% (w/v) 콜레스테릴 헤미숙시네이트 (CHS, 아나트레이스, #210) 혼합물을 1시간 동안 첨가하여 가용화되었다. 불용성 물질은 베크만 45 Ti 로터에서 205,000 g에서 30분 동안 초원심분리에 의해 제거되었다. 단백질은 8 mM 이미다졸의 존재 하에 8 ml NiNTA 수 퍼플로우(Superflow) 수지 (퀴아젠(Qiagen), #30430)에 2시간 동안 배치 결합되었다. 수지를 XK 16/20 컬럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare), #GE28-9889-37)에 패키징하고, 15 컬럼 부피 (CV)의 고염 완충제 A1 (50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.02 % LMNG, 0.002 % CHS, 75 mM 이미다졸) 및 3 CV의 완충제 A2 (50 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl, 0.02 % LMNG, 0.002% CHS, 75 mM 이미다졸)로 세척하였다. 단백질을 300 mM 이미다졸로 보충된 완충제 A2에 의해 용리시키고, 100 kDa 분자량 컷오프를 갖는 아미콘(Amicon) 울트라-15 재순환 셀룰로 스 농축기 (밀리포어(Millipore), #UFC900308)를 사용하여 0.5 ml로 농축시켰다. TLA-100.2 로터를 사용하여 베크만 쿨터(Beckman Coulter) 벤치탑 원심분리기에서 220,000 g에서 10분 동안 초원심분리에 의해 응집된 물질을 제거하였다. 이어서, 샘플을 슈퍼덱스(Superdex) 200 10/300 GL 컬럼 (지이 헬스케어, #17-5175-01) 상에서 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % LMNG, 0.002 % CHS 중의 크기 배제 크로마토그래피에 적용하였다. 단량체성 종에 상응하는 분획을 풀링하고, 100 kDa 분자량 컷오프 (비바프로덕츠(Vivaproducts), #VS0242)를 갖는 비바스핀(Vivaspin) 500 농축기를 사용하여 6 - 8 mg/ml까지 농축시켰다. 샘플 순도 및 단분 산성은 SDS-PAGE 및 분석용 겔 여과에 의해 분석하였다. 단백질 농도는 나노드롭 분광광도계 (써모피셔 싸이언 티픽)에 의해 280 nm에서의 분자량, 흡광 계수 및 단백질 흡광도를 사용하여 결정되었다. 질량 분광분석법에 의해 단백질을 검사하여 관심 단백질을 확인하였다.

[0185] 나노디스크-매립된 인간 PAR2 StaR 단백질의 제조

[0186] 나노디스크의 제조는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, N-말단 헥사-히스티딘 태그를 갖는 스캐폴드 단백질로 서 제브라피쉬 아포지단백질-1 (ZAP1)을 사용하는 [Banerjee et al., 2008]을 기반으로 한다. 단백질 PAR2-1 및 -2는 100 내지 200 μ M에서 나노디스크로 재구성하고, Fab-선택을 위한 항원으로서 사용하였다. 나노디스크 를 재구성하기 위해, 먼저 하기 지질을 수성 200 mM 테옥시콜산나트륨 (시그마-알드리치, #6750) 용액에 재현탁 시켰다: 3:2:0.5의 비로 POPC (1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 아나트레이스, #P616), POPG (1-헥사데카노일-2-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포글리세롤, 아나트레이스, #P516), 및 콜레스테롤 (아나트레이스, #CH200). 최종 몰비는 PAR2:POPC:POPG:콜레스테롤:테옥시콜산나트륨에 대해 각각 1:72:48:12:264였다. 최종 테옥시콜산나트륨 농도는 15 mM보다 높게 유지되었고, 10 mM HEPES 7.4, 150 mM NaCl 완충제에 의해 조정되었다.

[0187] 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 제브라피쉬 아포지단백질 1 (ZAP1)을 1:2 PAR2:ZAP1의 몰비로 첨가하 였다. 혼합물을 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 바이오-비드 SM-2 (바이오-라드 (Bio-Rad), #1528920)와 함께 1:1 비의 단백질 용액 대 건조 바이오-비드 중량 (예를 들어 900 μ l 단백질 대 900 μ g 바이오-비드)에서 밤새 교반시킴으로써 세제를 제거하였다. 나노디스크는 상청액으로서 회수되었고, 비드는 비드 중량의 2 부피에 대해 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl (예를 들어 900 μ g 비드에 대해 1.8 mL)로 세척하였다. 단백질 용액을 1 mL 미만으로 농축시키고, 13,500 g에서 테이블 탑 원심분리기에서 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 상기 기재된 바와 같이 슈퍼덱스 200 10/300 GL 컬럼 (지이 헬스케어) 상에서 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl 중에서 크기 배제 크로마토그래피에 적용하였다. 나노디스크 피크를 나타내는 분획 을 풀링하고, 아미콘 울트라-4 재순환 셀룰로스 농축기 (100 kDa 분자량 컷오프, 밀리포어, #UFC810096)에서 1

- 2 mg/mL로 농축시키고, -80℃에서 분취량으로 냉동시켰다.

[0188] **실시예 2 - 스크리닝**

[0189] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 파지 디스플레이 라이브러리로부터 식별되었다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특징을 갖는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 본원에 제공된 항체를 식별하기 위해 사용되는 파지 디스플레이 라이브러리는 일란티아 (Tiller et al. 2013) 개념을 기반으로 하는 일란티아[®] 파지미드이고, 파지 표면 상에 Fab를 디스플레이하기 위해 시스디스플레이(CysDisplay)TM 기술을 이용한다 (Lohning et al. 2000).

[0190] 10가지 패닝 전략 (관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하는 고체상 패닝, 포획 패닝 및 전세포 패닝 포함)은 전장 또는 N-말단에서 말단절단된 나노디스크-매립된 인간 PAR2 StaR 단백질을 이용하는 고체상 패닝에 중점을 두어 설계되었다. 패닝 과정 동안에 나노디스크-매립된 PAR2 StaR의 온전성 및 안정성을 보장하고, 다른 원치 않는 에피토프에 대해 특이적인 후보의 풍부화 위험을 낮추기 위해, 다양한 항원 제조 기술이 실행되었다. 나노디스크-매립된 인간 PAR2 StaR 변이체가 패닝 항원 (즉, 세제 무함유 상태)으로 사용되었다. 대부분의 패닝 전략의 경우, 나노디스크-매립된 인간 PAR2 StaR 단백질은 태그-특이적 포획 항체를 통해 제시되었다. 포획 항체 벤치마크 1 (Giblin et al. 2011), 항히스티딘-Ab IgG1 (StrepMAB-Immo) 또는 시약 (NiNTA)에 대해 특이적인 후보의 풍부화 위험을 낮추기 위해 포획 방식이 교대로 실행되었다. 일부 전략의 경우, 인간 PAR2-발현 Flp-In CHO 및 BacMam-감염된 HEK293F 세포에 대해 차등 전세포 패닝을 수행하였다. 다른 세포 표적에 대해 특이적인 후보의 풍부화 위험 (표적-이탈 결합)을 낮추기 위해 StaR에서의 패닝에 이어 세포 패닝을 교대로 이용하였다. 인간 PAR2의 기능적으로 활성인 리간드와 경쟁하는 파지-항체를 증폭시키기 위해, 나노디스크 매립된 인간 PAR2 StaR 변이체 PAR2-2 P166: 1-377, 탈글리코실화: N30Q, N222Q, pFastBacHis StrepII 또는 hPAR2(55-377_10xH_Sx2 (말단절단) PAR2-1: P151: 55-377, 글리코실화, pFastBacHisStrepII) (상업적으로 입수가 가능한 소분자 리간드인 AZ8838 및 AZ3451로 포화됨) (Cheng et al. 2017)를 사용하여 패닝을 수행하였다. 이들 패닝은 수많은 상이한 세포 백그라운드에서 발현되는 인간 PAR2 수용체에 대해 가장 양호한 특이성을 갖는 많은 수의 일란티아[®] 후보의 식별을 초래한다. 비-특이적으로 결합된 파지의 더욱 엄격한 선택 해제를 위해, 고체상 패닝의 각 라운드 전에 무관한 항원 성분에 대한 사전 흡착을 수행하였다. 무관한 항원 성분에는 Ni-NTA, 빈 나노디스크 뿐만 아니라, 포획 항체 항-StrepII mAb (StrepMAB-Immo) 및 항-폴리 6x 히스티딘-Ab IgG1 (R&D MAB050) 또는 나노디스크-매립된 대안적인 GPCR (성숙 패닝에서만 사용됨)이 포함되었다.

[0191] 파지 제조

[0192] Fab-제시 파지 입자의 생성: 각 선택 라운드에 대해 그들의 표면 상에 Fab 단편을 제시하는 새로운 파지 입자를 생성하였다. 이로써, 이. 콜라이(*E. coli*) TG1 배양물을 이전의 선택 라운드로부터 유래된 파지로 감염시켰다. 원심분리 시, 박테리아 펠렛을 신선한 배지에 재현탁시키고, 한천 플레이트 상에 플레이팅하였다. 성장 후, 콜로니를 플레이트에서 긁어내고, 파지 구출, 선택된 클론의 폴리클로날 증폭, 및 파지 생성을 위해 사용하였다. 정제된 파지를 사용하여, 다음 패닝 라운드를 시작하였다. 마지막 패닝 라운드 시 한천 플레이트로부터 단일 클론을 배지로 사전 증진된 멸균성 미세여가 플레이트의 웰에 집어 넣었다. 성장 시, 글리세롤을 함유하는 배지를 마스터 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고; 플레이트를 알루미늄 호일로 밀봉하고, -80℃에서 보관하였다.

[0193] **실시예 3 - ELISA에 의한 히트 및 FACS 및 인텔리사이트 스크리닝에 의한 전세포 결합의 식별**

[0194] **ELISA**

[0195] 표적 항원에 대한 패닝 출력으로부터 식별된 단일 Fab 클론의 스크리닝 뿐만 아니라, 정제된 항체의 특징분석을 다에 대해 ELISA 기술이 이용되었다. 최적의 항원 및 항체 농도 뿐만 아니라 차단 조건은 관련 기술분야의 방법에 따라 결정되었다.

[0196] 항원의 직접적인 코팅

[0197] 항원을 미세여가 플레이트 상에 고정시켰다. 플레이트를 차단하고, 항체, 예컨대 조 이. 콜라이 용해물을 함유하는 Fab 또는 정제된 Fab 또는 IgG 샘플과 함께 인큐베이션하였다. 알칼리-포스파타제 (AP) 커플링된 이차 항체를 '아토포스(AttoPhos)' 형광 기질과의 조합으로 사용하여 결합된 항체를 검출하였다. 개별 검정 단계 사이에 다중 세척 단계를 수행하였다.

[0198] 항원 포획

- [0199] 다른 ELISA 설정에서, 미세역가 플레이트 상에 코팅된 태그-특이적 항체 (예를 들어 항-StrepII, 항-His 또는 벤치마크 1 참조 mAb)를 통해 항원을 플레이트에 포획시켰다. 각각의 알칼리-포스파타제 (AP) 커플링된 이차 항체를 '아토포스' 형광 기질과의 조합으로 사용하여 결합된 항체를 검출하였다. 개별 검정 단계 사이에 다중 세척 단계를 수행하였다.
- [0200] 항-Fd ELISA에 의한 Fab 발현 검사
- [0201] 조 박테리아 용해물에서 Fab 발현의 검증을 위해, 플레이트를 Fd-단편 특이적 항체로 코팅하였다. 각각의 알칼리-포스파타제 (AP) 커플링된 항-Fab 특이적 항체를 '아토포스' 형광 기질과의 조합으로 사용하여 결합된 Fab를 검출하였다. 개별 검정 단계 사이에 다중 세척 단계를 수행하였다.
- [0202] K_{off} 순위 ELISA
- [0203] K_{off} 추정을 위해, ELISA 플레이트를 초기 판독 시에 추가의 빈번하고 엄격한 세척에 적용하고, 두번째 검출을 수행하여, 느린 kd를 갖는 후보를 식별하였다. 하기 조건을 이용하여 세척을 수행하였다: 10분 인큐베이션에 의한 5회 세척 후 밤새 인큐베이션, 이어서 10분 인큐베이션에 의한 5회 세척 후 1시간 인큐베이션, 이어서 검출하기 전에 5분 인큐베이션에 의한 5회 세척. 각각의 알칼리-포스파타제 (AP) 커플링된 이차 항체를 '아토포스' 형광 기질과의 조합으로 사용하여 결합된 항체를 검출하였다.
- [0204] ELISA 방법의 실행
- [0205] 표적 항원에 대한 패닝 출력으로부터 식별된 단일 Fab 클론의 스크리닝 뿐만 아니라, 정제된 항체의 특징분석 둘 다에 대해 ELISA 기술이 이용되었다. 최적의 항원 및 항체 농도 뿐만 아니라 차단 조건을 평가하고, 설정을 조정하였다.
- [0206] 패닝 선택 후, 각각의 세번째 패닝 라운드 출력으로부터 368개의 클론은 박테리아 용해물로서 일차 스크리닝에서 가공되었다. 고체상 패닝으로부터의 패닝 출력은 StaR-코팅된 자성 비드 상에서의 FACS에 의해 또는 태그 부착된-StaR 변이체 또는 나노디스크-매립된 StaR을 이용하는 ELISA에서 스크리닝되었다. 주로 PAR2-1 P151 변이체 (55-377, 글리코실화, pFastBacHisStrepII)에 대해 스크리닝을 수행하였다. 카운터 스크리닝에는 주로 빈 나노디스크 및 항-Fd mAb 및 마우스 감마 글로불린 또한 포함되었다.
- [0207] 이차 스크리닝은 주로 ELISA에서 수행되었다. 항원 패널에는 PAR2-1: P151: 55-377, 글리코실화, pFastBacHisStrepII 뿐만 아니라 나노디스크-매립된 PAR2-2: P166: 1-377, 탈글리코실화: N30Q, N222Q, pFastBacHis StrepII (리간드 AZ8838 및 AZ3451로 포화됨)이 포함되었다. 유사하게, 카운터 스크리닝은 포획 항체 StrepMAB-Immo 및 bRIL-His-StrepII로 확장되었다. 세포 상에서 낮은 결합 신호에도 불구하고, 모든 관심 클론은 재조합 나노디스크-매립된 StaR 물질에 대해 수득된 세포 결합과 결합 프로파일 사이에 양호한 상관관계를 나타내었다.
- [0208] 이들은 시퀀싱 및 침묵 h_IgG1f_AEASS 포맷 (IgG1 L234A L235E G237A A330S P331S로의 IgG 전환을 위해 선택되었다. 이 포맷은 노보 노르디스크(Novo Nordisk)의 2세대 항-C5aR 항체 NNC0215-0384 (Wagner et al., 2014))에서 임상적으로 검증되었고, 특징분석을 위해 고급 마이크로 규모 및/또는 탐구적 규모로 발현되고 정제되었다. 기능적 특징분석 전에, IgG를 ELISA에 의해 재스크리닝하였고 (도 1 및 2), 인텔리사이트에 의해 세포 결합에 대해 결합 특이성을 재확인하였다.
- [0209] **FACS 및 인텔리사이트**
- [0210] PAR2 결합제의 양성 식별에 대해 스크리닝하기 위해 유동 세포계측 및 인텔리사이트에 의한 세포 결합
- [0211] 세포 표면 발현된 항원에 대한 결합 사건은 패닝 출력으로부터의 조 이. 콜라이 용해물 또는 정제된 항체를 사용하여 유동 세포계측에 의해 식별되었다. 차등 전세포 패닝 (DWCP)으로부터의 패닝 출력의 고처리량 일차 스크리닝은 주로 인간 야생형 PAR2-발현 Flp-In CHO 세포 (Flp-In CHO_huPAR2), GNTI BacMam 야생형 PAR2 세포 및 GNTI BacMam 말단절단된 PAR2 StaR 대 부모 Flp-In CHO 세포 (PAR2 음성) 또는 비-감염된 HEK293GNTI-세포에 대해 수행되었다. 부모 Flp-In CHO 세포에 대해 상승된 백그라운드 결합을 나타내는 후보는 비-특이적 또는 표적-이탈 결합제로 할당되었다. 모든 단계는 잠재적인 수용체 내재화를 방지하기 위해 FCS 및 아지드화나트륨을 포함하는 FACS 완충제에서 수행되었다. 세포 현탁액을 미세역가 플레이트로 옮기고, 항체 샘플을 첨가한 후, 후속적으로 플레이트를 4°C에서 인큐베이션하였다. 샘플 부피 및 세포 수는 사용된 플레이트 유형에 따라 조정되었다. 인큐베이션 후, 세포를 회전시키고, FACS 완충제로 세척하였다. 형광단-결합된 이차 시약은 결합

된 항체의 검출을 위해 사용되었다. BD FACS 어레이 또는 인텔리사이트 HTFC/ 아이큐(iQue) 시스템을 이용하여 플레이트를 측정하고, 플로우조(FlowJo), 포어사이트(ForeCyt) 또는 독점 소프트웨어 도구를 사용하여 데이터를 분석하였다 (도 3).

[0212] **전세포 결합/특이성의 특성 평가 (FACS, 인텔리사이트)**

[0213] 인간 PAR2 발현 Sf9 세포에 대한 유동 세포계측에 의해 평가되는 결합 특이성

[0214] 초기 PAR2 후보의 FACS-기반 분석은 PAR2-발현 Sf9 곤충 세포를 사용하여 수행하였다. 항체가 수용체의 N-말단에 또는 세포외 노출된 나머지 부분에 우선적으로 결합하는지 여부를 이해하기 위해, 세포를 전장 N-말단 발현 PAR-2 StaR (PAR2-3, 1 - 377, 여기서 FL-N StaR로 표시됨) 또는 N-말단에서 말단절단된 수용체 (PAR2-4, 55 - 377, 여기서 NΔ53 StaR로 표시되거나, 또는 도 4 및 7에서 "말단절단된"으로 표시됨)로 감염시켰다.

[0215] FACS-완충제 (PBS (시그마, #F9665), 1% BSA (시그마, #A9647) 및 로슈 완전 프로테아제 억제제 (#11836145001)) 중에서 4×10^6 세포/mL의 200 μ L Sf9- 세포를 20 nM에서 관심 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 펠렛화하고, 200 μ L FACS 완충제로 3회 세척하였다. 연속적으로, 세포를 20 nM에서 200 μ L 이차 알로피코시아닌 (APC) 접합된 항-인간 IgG와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 다시 200 μ L FACS 완충제로 3회 세척하였다.

[0216] 관독 결과는 BD FACS 칸토(Canto) II FACS 장비를 사용하여 모니터링하였다.

[0217] 유동 세포계측에 의해 결정되는 바와 같이 상이한 결합 프로파일을 갖는 다양한 결합체가 생성되었고, 여기서 Y022075는 말단절단된 수용체에 우선적으로 결합하고, Y022065는 말단절단된 수용체 및 전장 PAR2 둘 다에 결합한다. 대조적으로, 항체 클론 Y22066은 거의 FL-N 구조물에만 결합한다. 이들 관찰은 에피토프의 다양성을 반영한다 (도 4).

[0218] 인텔리사이트에 의해 결정되는 결합 특이성

[0219] 결합 특이성은 정제된 IgG에 대해 확인되었고, n=2 실험으로서 인간 PAR2-발현 세포에 대해 이별식으로 16-포인트 적정으로 수행되었다. 하기 세포주가 분석에 포함되었다:

- [0220] • F1p-In CHO_V5His_huPAR2 대 부모 F1p-In CHO 세포
- [0221] • F1p-In CHO_huPAR1 대 부모 F1p-In CHO 세포
- [0222] • HEK F1p-In TRex 293_huPAR2 발현-유도된 대 비-유도된 세포
- [0223] • HEK293F 감염된 BacMam WT FL-huPAR2 대 비-감염된 세포
- [0224] • HEK293F 감염된 BacMam WT FL-마모셋 PAR2 대 비-감염된 세포

[0225] 모든 관심 클론은 PAR2 나노디스크 패닝 전략으로부터 발생하였고, 이는 태그 부착된 수용체 및/또는 나노디스크 스캐폴드를 통해 항체 포획에 의한 배향성 제시를 가능하게 하였고, 상이한 세포 백그라운드에서 PAR2-발현 세포에 대한 선택적인 결합을 나타내었다. PAR2 StaR 나노디스크 제제는 세포 상에서 발현되는 천연 수용체와 비슷하게 세제-무함유 환경에서 고품질 PAR2 수용체를 제시하였고, 매우 유망하고 기능적으로 활성인 후보의 식별을 초래하였다. 또한, 패닝 엄격성은 StaR 나노디스크와 같은 제조합 물질을 사용하여 용이하게 제어된다.

[0226] **인텔리사이트에 의한 멀티플렉싱**

[0227] 종 교차 반응성 및/또는 반대 표적에 대한 원치않는 결합을 동시에 평가하기 위해, 인텔리사이트로부터의 HTFC/ 아이큐 스크리닝 플랫폼을 사용하여 384-웰 플레이트 포맷으로 스크리닝을 수행하였다. HTFC/ 아이큐 스크리닝 시스템은 또한 다중 표적 세포주에 대한 결합의 평가 또는 원치않는/비-특이적 결합의 평가를 위해 병렬로 사용하였다 (달리 말하면 멀티플렉싱). 상이한 세포 집단은 형광 염료, 예컨대 칼세인(Calcein) 또는 셀-트래커 그린(Cell-Tracker Green)을 별개의 양으로 사전 표지함으로써 구별될 수 있고, 이는 각각의 세포 집단에 대한 형광 강도의 고유의 시그니처를 확립하여, 형광 코딩 시스템을 생성한다. 이어서, 색상-코딩된 세포주들을 물리적으로 합하고, 시험할 항체와 함께 혼합하였다. 개별 세포주는 사전 표지된 각각의 세포주의 형광을 통해 식별될 수 있다. 조 박테리아 세포 용해물을 세포와 합하고, 부드럽게 진탕시키면서 어두운 곳에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 측정은 인텔리사이트 HTFC/ 아이큐 디바이스에 의해 수행되었다. 인큐베이션 단계 사이에, 세척은 필요하지 않았다. 원시 데이터는 '포어사이트' 소프트웨어의 도움으로 평가되었다. 데이터 획득 후, 각각의 샘플로부터의 세포주는 그들의 형광 시그니처에 따라 식별되고, 개별적으로 항체 결합에 대해

평가될 수 있었다. 각각의 세포주에 대한 염색 조건은 별개의 세포주의 분리를 가능하게 하는 검정 설정을 찾기 위해 최적화되었다 (도 5).

[0228] 최종 리드 세트의 부모인 Y022065는 포획된 나노디스크-매립된 탈글리코실화된 전장 hPAR2(PAR2-2, 1-377, N30Q, N222Q)_{10xH₂Sx2}를 사용하는 패닝 전략으로부터 생성되었다. 첫번째 및 세번째 라운드에서, 항원은 항-StrepII 항체에 의해 포획되었다. 두번째 라운드에서, 항원은 벤치마크 1에 의해 포획되거나 또는 Ni-NTA 플레이트 상에 코팅되었다. 요컨대, 특이성은 리간드 AZ8838 및 AZ3451의 존재 또는 부재 하에 FL-StaR 나노디스크 및 말단절단된 StaR 나노디스크에 대한 결합의 ELISA-기반 평가에 의해; 빈 나노디스크, bRIL-His-StrepII, StrepMAB-Immo (포획 항체) 및 마우스 감마 글로불린을 비롯한 반대 표적에 대한 결합의 ELISA-기반 평가에 의해; PAR2-발현 세포주에 대한 결합의 평가에 의해 ($n > 2$) 평가되었다: CHO V5His_{hu}PAR2, 유도된 HEK F1p-In TRex 293_{hu}PAR2, HEK293F 감염된 BacMam WT FL-_{hu}PAR2, A549, F1p-In CHO_{ma} PAR2 (레스스, 마카카 물라타 (Macaca mulatta)), F1p-In CHO_{mo}PAR2 (마우스) 뿐만 아니라 PAR2 음성 세포주 (부모 F1p-In CHO, Jurkat, F1p-In CHO_{hu}PAR1).

[0229] **실시예 4 - Fab 단편 및 IgG의 발현 및 정제**

[0230] Fab 발현 벡터로의 서브클로닝

[0231] 필요한 경우, 이. 콜라이에서 가용성 Fab의 신속한 발현을 용이하게 하기 위해, 선택된 일란티아[®] 파지의 Fab 코딩 삽입물을 pYPdis10 디스플레이 벡터로부터 원하는 특징을 포함하는 Fab-발현 벡터 (pVBex10_h-Fab-FH)에 서브클로닝하였다. 서브클로닝은 XbaI | EcoRI-HF | PstI-HF를 통한 삼중 소화에 의해 수행되었다.

[0232] HKB11 세포에서 전장 FabCys 발현을 위해, 선택된 후보를 pYMex10_h-FabCys-AviH 발현 벡터에 클로닝하였다. 서브클로닝은 항체 코딩 단편을 pYMex_h-IgG1f-AEASS 공급원 벡터로부터 제한 효소 NdeI | XhoI에 의해 절단하고, 표적 벡터 pYMex10_h-FabCys-Avi-His에 라이게이션함으로써 수행되었다.

[0233] IgG 발현 벡터로의 서브클로닝

[0234] HKB11 세포에서 전장 IgG 발현을 위해, 선택된 후보를 pYMex10_h-IgG1f-AEASS 발현 벡터에 클로닝하였다. 서브클로닝은 다량의 서열-고유의 Fab 클론을 IgG 포맷으로 편리하고 효율적으로 전환시키는 방법을 이용하여 수행되었다. 간략히, VH 코딩 단편 (NheI | XhoI에 대한 제한 부위로 플랭킹됨), VL 코딩 단편 (NdeI | KpnI에 대한 제한 부위로 플랭킹됨) 및 카파 또는 람다 특이적 진행생물 pYMin 발현 카세트 (KpnI | NheI에 대한 제한 부위로 플랭킹됨)를 포유동물 세포에서의 발현을 위한 수용자 벡터에 1-단계 또는 2-단계 클로닝으로 클로닝하였다 (NdeI | XhoI에 의해 소화됨). 이. 콜라이 XL-1 블루 세포의 형질전환 후, 단일 클론은 콜로니 PCR 및 전체 삽입 영역의 시퀀싱을 통해 품질 관리되었다.

[0235] HKB11 세포에서 대규모 발현을 위해, 선택된 후보를 안정한 폴의 생성을 위해 제오신 내성 유전자를 함유하는 pCMex003/004_{kan}-h-IgG1f-AEASS 발현 벡터에 클로닝하였다. 간략히, VH 코딩 DNA 단편, VL 코딩 DNA 단편 및 람다 특이적 진행생물 pYMin 발현 카세트를 수용자 벡터 pCMex003/004_{kan}-h-IgG1f-AEASS에 클로닝하였다.

[0236] Fab 단편을 함유하는 박테리아 용해물의 생성

[0237] 마스터플레이트로부터 글리세롤 스톱을 사용하여 성장 배지 (클로람페니콜, IPTG 및 0.1% 글루코스를 함유하는 2xYT)로 사전 충전된 96-웰/ 384-웰 미세역가 플레이트를 접종하였다. 플레이트를 박테리아 성장을 위해 37°C에서 인큐베이션하고, Fab 발현을 위해 22°C에서 밤새 진탕시켰다. 다음 날, 봉산염 완충제, EDTA 및 리소자임을 함유하는 BEL 완충제를 첨가하여 발현 배양물을 용해시켰다. 선택된 플레이트 포맷 및 적용에 따라, 부피를 조정하고, 그에 따라 차단 프로토콜을 조정하였다. 용해물이 민감성 세포 스크리닝, 예를 들어 기능적 검정을 위해 사용되는 경우에는 EDTA를 생략하였다.

[0238] Fab 단편의 탐구적 규모 생성

[0239] 이. 콜라이 TG1 F⁻ 세포에서 박테리아 발현 벡터에 의해 코딩된 Fab 단편의 발현을 0.1% 글루코스 및 34 µg/mL 클로람페니콜로 보충된 500 mL의 2xYT 배지를 사용하여 진탕 플라스크 배양으로 수행하였다. OD600이 0.5의 값에 도달할 때까지 배양물을 진탕시켰다. IPTG (이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드)를 첨가하여 Fab 발현을 유도하고, 20시간 동안 추가로 배양하였다. 세포를 수확하고, 리소자임을 사용하여 붕괴시켰다. His6-태그 부착된 Fab 단편을 IMAC (바이오-라드 | 독일)를 통해 분리하고, 이미다졸을 사용하여 용리시켰다. 1x 둘베코 (Dulbecco) PBS (pH 7.2)로의 완충제 교환은 'PD10' 컬럼 (지이 헬스케어 | 독일)을 사용하여 수행하였다. 샘플

폴을 멸균 여과하였다 (0.2 μm). 단백질 농도는 UV-분광광도법에 의해 결정되었다. 샘플의 순도는 변성, 비-환원 15% SDS-PAGE에서 수행하였다. Fab 제제의 균질성은 교정 표준을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피 (HP-SEC)에 의해 천연 상태에서 결정되었다.

[0240] 포유동물 세포에서 IgG의 마이크로 규모 생성

[0241] 진핵생물 HKB11 또는 HEK293-6E 세포는 IgG의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 포유동물 발현 벡터 DNA로 형질감염시켰다. 세포 배양물 상청액을 형질감염 7일 후에 수확하고, 액체 취급 스테이션을 이용하여 단백질 A 친화도 크로마토그래피 (맵셀렉트 슈어(MabSelect SURE) | 지이 헬스케어)에 적용하였다. 달리 명시되지 않는다면, 샘플을 중화된 용리 완충제 (NaPS: 137 mM Na 포스페이트, 81 mM NaCl, pH 7)에 두었다. 샘플을 멸균 여과하였다 (0.2 μm 공극 크기). 단백질 농도는 UV-분광광도법에 의해 결정되었고, IgG 순도는 변성, 환원 조건 하에 CE-SDS (랩칩(LabChip) GXII | 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) | 미국)를 사용하여 분석되었다. HP-SEC를 수행하여 IgG 제제를 천연 상태에서 분석하였다.

[0242] IgG의 탐구적 규모 생성

[0243] 진핵생물 HKB11 또는 HEK293-6E 세포는 IgG의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 포유동물 발현 벡터 DNA로 형질감염시켰다. 세포 배양물 상청액을 형질감염 후 3 또는 6일차에 수확하고, 표준 단백질 A 친화도 크로마토그래피 (맵셀렉트 슈어 | 지이 헬스케어)에 적용하였다. 달리 명시되지 않는다면, 1x 둘베코 PBS (pH 7.2 | 인비트로젠(Invitrogen))로의 완충제 교환을 수행하였고, 샘플을 멸균 여과하였다 (0.2 μm 공극 크기). 단백질 농도는 UV-분광광도법에 의해 결정되었고, IgG 순도는 변성, 환원 및 비-환원 조건 하에 CE-SDS (랩칩 GXII | 퍼킨 엘머 | 미국)를 사용하여 분석되었다. HP-SEC를 수행하여 IgG 제제를 천연 상태에서 분석하였다.

[0244] AviHis 태그 부착된 FabCys의 탐구적 규모 생성

[0245] 진핵생물 HKB11 또는 HEK293-6E 세포는 디설피드-브릿지 FabCysAviHis의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 포유동물 발현 벡터 DNA로 형질감염시켰다. 세포 배양물 상청액을 형질감염 후 3 또는 7일차에 수확하고, 금속 이온 친화도 크로마토그래피 (프로티노(Protino) Ni-NTA | 마체리 나겔(Macherey Nagel))에 적용하였다. 달리 명시되지 않는다면, 1x 둘베코 PBS (pH 7.2 | 인비트로젠)로의 완충제 교환을 수행하였고, 샘플을 멸균 여과하였다 (0.2 μm 공극 크기). 단백질 농도는 UV-분광광도법에 의해 결정되었고, FabCysAviHis 순도는 변성, 환원 및 비-환원 조건 하에 CE-SDS (랩칩 GXII | 퍼킨 엘머 | 미국)를 사용하여 분석되었다. HP-SEC를 수행하여 FabCysAviHis 제제를 천연 상태에서 분석하였다.

[0246] 생체내 특징분석을 위한 IgG 생성

[0247] 안정한 HKB11 세포 폴을 확립시킴으로써 물질 생성을 수행하였다. 진핵생물 HKB11 세포는 IgG의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 포유동물 발현 벡터 DNA로 형질감염시켰다. 안정하게 발현하는 세포 폴을 생성하기 위해, 각각의 벡터는 제오신 내성 유전자를 추가로 함유한다. 형질감염 후 3일차에, 세포 현탁액에 160 $\mu\text{g/mL}$ 제오신을 첨가하여 선택을 시작하였다. 선택 동안에, 초기에는 세포 카운트 및 생존율이 감소하였다. 형질감염 후 20 내지 30일차에, 세포를 회수하기 시작하였다. ~80%의 생존율에 도달하면, 안정한 폴을 원하는 부피로 규모를 확장시켰다. 형질감염 후 6일차에 세포 배양물 상청액을 수확하였고, 단백질 A 친화도 크로마토그래피 (맵셀렉트 SURE | 지이 헬스케어)에 적용하였다. 필요한 경우, 두번째 정제 단계 (제조용 SEC | 슈퍼텍스 200 | 지이 헬스케어)를 수행하여 응집물을 제거하였다. 1x 둘베코 PBS (pH 7.2 | 인비트로젠)로의 완충제 교환을 수행하였고, 샘플을 멸균 여과하였다 (0.2 μm 공극 크기). 단백질 농도는 UV-분광광도법에 의해 결정되었고, IgG 순도는 변성, 환원 및 비-환원 조건 하에 CE-SDS (랩칩 GXII | 퍼킨 엘머 | 미국)를 사용하여 분석되었다. HP-SEC를 수행하여 IgG 제제를 천연 상태에서 분석하였다. 내독소 수준은 KQCL 검정 (론자)에 의해 결정되었다. 단백질 신원은 질량 분광분석법 분석 (100MDL43)을 이용하여 확인하였다.

[0248] 실시예 5 - 리드 단리 클론 프로파일링

[0249] 기능적 주요 히트의 식별을 위해 인간 PAR2에서 세포-기반 IP-원 Gαq 검정

[0250] ELISA 및 인텔리사이트에서 클론을 완전히 검증한 후에 기능적 특징분석을 수행하여 PAR2 결합 상태를 확인하였다. 탐구적 규모 정제된 IgG1f_AEASS 클론을 2가지 농도에서 반복해서 시스바이오® IP-원 Gαq 검정을 이용하여 합성 효능제인 활성화 펩티드 (2-푸리올-LIGRO)에 의해 PAR2 수용체의 활성화를 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다.

[0251] 37℃에서 5 % CO₂ 분위기 하에 가슴 인큐베이터에서 현탁액 포맷으로 24시간 동안 배양된 성장 배지 (Pro293, 5% FBS, 1% 글루타맥스, 0.4% 페니실린/스트렙토마이신)에서 HEK293F 세포를 0.5mM 부티르산나트륨의 존재 하에 2% v/v 인간 PAR2 BacMam 바이러스로 감염시켰다. 실험 당일에, 세포를 수확하고, 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA, 시그마)과 함께 LiCl을 함유하는 1x10⁶/ml (1부의 자극 완충제 (시스바이오): 5부의 ddH₂O) 밀도의 검정 완충제 중에서 1x10⁶/ml 밀도로 재현탁시켰다. 항체를 스톱 농도에서 시험하거나 또는 PBS 중에서 초기 1:2 희석 후에 시험하였다. 반복해서 어느 한 농도의 항체의 5 μl 샘플을 절반 면적 백색 96-웰 플레이트 (코닝 (Corning))에 첨가한 후, 25 μl PAR2의 세포 현탁액을 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션 한 후, 6.28nM의 최종 효능제 켈린지 농도를 위해 5 μl/웰 활성화 펩티드를 첨가하였다. Ab 스톱으로부터 1:7 또는 1:14의 희석으로 최종 검정 항체 스크리닝을 수행하였다. 플레이트를 37℃에서 추가 30분 동안 다시 인큐베이션한 후, 용해 완충제 중에서 10 μl IP-원 검출 키트 (시스바이오)를 첨가하였다. 세포 플레이트를 실온 (RT)에서 1시간 동안 플레이트 진탕기 상에 둔 후, 335nm에서의 여기 및 620nm 및 665nm 둘 다에서의 방출 관독에 의해 표준 HTRF 프로토콜을 사용하여 페라스타(PHERAstar) FS 마이크로플레이트 관독기 (비엠지 랩테크(BMG Labtech)) 상에서 플레이트를 관독하였다. HTRF 비는 방정식 1에서와 같이 계산되었다. 반응은 6.28nM (EC₈₀) 최종 검정 농도에서 활성화 펩티드 IP-원 반응의 % 억제에 대해 정규화되었다 (도 6).

[0252] 방정식 1: HTRF 비의 계산

$$HTRF \text{ 비} = \frac{665 \text{ nm에서의 방출}}{620 \text{ nm에서의 방출}} \times 10,000$$

[0253]

[0254] 표 2: 인간 PAR2의 펩티드-유도된 효능작용의 억제

[0255] 가장 높은 농도에서 반복해서 시스바이오[®] IP-원 Gaq 검정을 이용하여 펩티드 억제 검정에서 Y021171, Y022063 및 Y022054 & Y022065 hIgG1f_AEASS의 기능적 특징분석. 도 6에도 도시됨.

항체 클론 ID	% 최대 억제 AP ± SD	반복 횟수
Y022054	17 ± 10	2
Y021171	32 ± 4	2
Y022063	27 ± 5	2
Y022065	43 ± 1	2

[0256]

[0257] 친화도 결정

[0258] 항체 포획 설정을 이용하여 SPR에 의한 K_D, k_a 및 k_d 결정

[0259] K_D 결정을 위해, 항체 단백질 (Fab 단편 또는 IgG)의 단량체 분획을 사용하였다 (분석용 SEC에 의해 분석되는 바와 같이 적어도 90% 단량체 함량). 친화도는 하기 기재된 바와 같이 비아코어 (비아코어 T200) 또는 옥텟 (Octet) (QK384 또는 HTX) 장비를 사용하여 동역학적 특징분석에 의해 결정되었다.

[0260] 항체를 항-인간 IgG 칩 표면 상에 포획시킨 후, 100 nM PAR2를 주사하였다. 이중성 리간드 모델이 사용되고 비교를 위해 느린 해리를 갖는 성분이 사용된 클론 'Y021160'을 제외하고는 데이터를 1:1 상호작용 모델에 피팅하였다.

[0261] 표 3: 리드 단리 클론의 비아코어

항체 클론 ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Y022065	3.0E+04	1.6E+04	5.3E-09
Y021172	3.5E+09	2.7E+02	7.7E-08
Y021194	4.6E+04	1.4E-03	3.0E-08
Y021160	2.0E+05	6.3E-04	3.1E-09
Y021171	4.1E+05	2.9E-02	7.0E-08

[0262]

[0263]

예를 들어 EDC/NHS 화학을 이용하여 CM5 칩 (비아코어, 지이 헬스케어) 또는 AR2G 센서 (포르테바이오 (forteBIO), 폴 코포레이션(PaII Corp.)) 상에 적절한 포획 리간드를 공유적으로 고정시킴으로써 또는 비오틴화 포획 시약에 의해 SA 센서를 로딩함으로써 적절한 고용량 포획 표면을 준비하였다. 적절한 포획 시스템을 위한 예는 항-hu-Fc 항체 (비아코어, 지이 헬스케어), 단백질 A 센서 (포르테바이오, 폴 코포레이션), 맵셀렉트 슈어 리간드 (지이 헬스케어), 및 항-His-태그 항체 (진스크립트(Genscript))였다. 동역학적 실험 동안에 분석을 위해 6 내지 8개의 상이한 피분석물 농도 (2^n 계열 희석)를 사용하였다. 각각의 주기 후에, 센서 표면을 재생시켜, 포획 표면의 온전성을 유지하면서 포획된 항체/항원 복합체를 제거하였다. 러닝 완충제의 블랭크 주사는 참조를 위해 사용되었다. 모든 실험에서, 검정 완충제는 PAR2 단백질의 제형, 즉, 염기 완충제 및 세제와 일치하였다. IgG는 Fc- 단편을 통해 포획되었고, 세제 (LMNG/CHS) 가용화된 FL-N PAR2 StaR (PAR2-3)은 용액에서 피분석물로서 사용되었다. 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % LMNG는 검정 완충제로서 사용되었다. CM3 센서 칩은 고밀도의 항-hu-Fc 포획 항체 (BR-1008-39, 지이 헬스케어)를 고정시키기 위한 기반으로 사용되었다. 특이적 대 비-특이적 결합의 더 높은 비를 달성하기 위해 (동역학적 특징분석에 적합한 조건은 여전히 유지하면서) 대략 500 RU의 비교적 높은 수준으로 IgG를 포획하였다. 센서그램은 상응하는 장비의 평가 소프트웨어, 즉, 비아코어 T200 평가 소프트웨어 3.x (비아코어, 지이 헬스케어) 또는 포르테바이오 옥텟 데이터 분석 (포르테바이오, 폴 코포레이션)에 의해 평가되었다. 모든 센서그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여, k_a 및 k_d 속도 상수를 결정하였고, 이를 이용하여 K_D 를 계산하였다. Y021160의 경우, 이중성 리간드 모델이 적용되었고, 느린 해리를 갖는 성분을 이용하여 k_a , k_d 및 K_D 를 계산하였다.

[0264]

3가지 정제된 IgG1f-AEASS 클론 Y021171, Y022054 및 Y022063의 경우, 인간 PAR2-3 변이체 (P157: 1-377, 글리코실화된, pBacMamHisStrepII, 전장)에 대한 친화도는 IgG를 고정하고 세제 (LMNG/CHS) 가용화된 FL-N PAR2 StaR에 의해 프로빙하는 SPR에 의해 결정되었다. 친화도는 Y022063 및 Y021171의 경우에 각각 22 nM 및 20 nM 이었다. Y022054는 다른 후보와 비교하여 2.5 nM의 10배 더 높은 친화도를 나타내었다. Y021171은 빠른 회합 (k_a)을 나타내었지만, 매우 빠른 해리 (k_d) 또한 나타내었다. 결합 친화도로부터 기능적 억제를 향해 외삽하면, 길항성 항-PAR2 항체의 필요한 친화도가 <100pM 범위로 추정되었다. 특히 Y021171에 대한 K_D 성질을 개선시키기 위해 친화도 성숙 캠페인 동안에 "오프 레이트 선택" 전략 (Hawkins et al. 1992)을 실시하였다.

[0265]

항-PAR2 항체와의 PAR2 상호작용의 검정은 비아코어 T200 장비 (지이 헬스케어)를 사용하여 수행하였다. 항-인간 IgG 항체 (인간 항체 포획 키트, 지이 헬스케어)를 3500 내지 4500 공명 단위 (RU)의 표면 밀도로 센서 칩 CM3 (지이 헬스케어) 상에 아민 커플링에 의해 고정시켰다. 고정화는 25°C에서 HBS-EP+ 완충제 (지이 헬스케어) 중에서 수행되었다. 이어서, 완충제를 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % LMNG, 0.002 % CHS로 변경하였다. PAR2-항체 상호작용 검정의 각각의 주기는 항체 포획 (5 μ L/분의 유속에서 2분 동안 주사된 100 nM 항체), PAR2 주사 (블랭크 또는 250 nM, 20 μ L/분의 유속에서 각각 2분 및 3분의 접촉 및 해리 시간), 및 인간 항체 포획 키트 (지이 헬스케어)로부터의 재생 용액을 사용하는 칩 표면 재생 (20 μ L/분에서 30초)으로 구성되었다. 블랭크-차감된 데이터를 1:1 상호작용 모델에 피팅하여, 회합 및 해리 속도 상수, k_a (k_{on}) 및 k_d (k_{off}), 및 친화도 상수 K_D 를 획득하였다. 각각의 실험 데이터 세트 사이의 측정은 이 방법론에 대한 허용가능한 한계 내에 있었다.

[0266]

표 4: SPR에 의한 기능적 후보 Y021171, Y022063 및 Y022054의 친화도 결정

[0267]

항체를 항-인간 IgG 칩 표면 상에 포획시킨 후, 250 nM PAR2를 주사하였다. 데이터를 1:1 상호작용 모델에 피

팅하였다.

클론	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
Y022054	1.2E+05	2.9E-04	2.5E-09
Y021171	5.3E+05	1.1E-02	2.0E-08
Y022063	1.8E+05	3.8E-03	2.2E-08

[0268]

[0269]

실시예 6 - 친화도 성숙/리드 최적화 및 파지 선택

[0270]

Y021171, Y022054, Y022063 및 Y022065를 비롯한 몇몇 IgG 클론은 IP 원 검정에서 PAR2-AP 활성화를 부분적으로 억제하였다. 4가지 기능적 후보 중 어느 것도 아닌 몇몇 다른 클론은 비-인간 영장류 (NHP) PAR2에 대해 교차 반응성인 것으로 나타났고, 세포외 도메인에서 인간 및 레서스 PAR2 서열 사이의 높은 정도의 동일성에도 불구하고, 친화도 성숙 전에 클론 중 어느 것도 FlpIn CHO_maPAR2 (레서스, 마카카 물라타) 및 FlpIn CHO_moPAR2 (마우스)에 대해 명확한 교차 반응성을 나타내지 않았다.

[0271]

성숙 라이브러리

[0272]

파지 성숙 라이브러리의 생성: 성숙 라이브러리의 클로닝은 부모 Fab 단편을 코딩하는 시스디스플레이™ 벡터에서 수행되었다. 시스디스플레이™ 벡터에 이미 존재하지 않는 경우에는, 라이브러리 클로닝 전에 부모 Fab 단편을 코딩하는 DNA 서열을 제한 소화 및 라이게이션을 통해 각각의 벡터로 옮겼다. 친화도 및 생물학적 활성을 증가시키고 선택된 항체 후보의 비-특이성을 감소시키기 위해, CDR-L3 및 CDRH-1/ CDR-H2 영역은 병렬로 최적화되었다. 이들의 모듈식 구축으로 인해, 모르포시스(MorphoSys) 항체 라이브러리는 CDR 교환에 의한 친화도 최적화를 위해 설계되었고, 여기서 항체의 단일 CDR이 절제되고, 대형 CDR 라이브러리의 개별 구성원으로 대체된다 (Prassler et al. 2009). 일란티아® 성숙 모듈 (YMM)은 일란티아 라이브러리 설계를 기반으로 하며, 슬로노믹스(Slonomics)® 기술로 사전 구축되었다 (van den Brulle et al. 2008). 성숙 라이브러리의 생성은 각각의 성숙 후보에 대해 개별적으로 수행되었다. 클로닝 효율을 모니터링하기 위해, 다양화된 LCDR-L3 YMM이 삽입되기 전에, 부모 CDR-L3은 일란티아 성숙 스테퍼 (YMS)로 대체된다. 소화된 벡터 단편은 다양화된 CDR-L3을 운반하는 2배 물 과량의 삽입 단편에 의해 라이게이션되었다. 동일한 절차가 CDRH-1 & CDR-H2의 다양화에 대해 적용되었다. 라이게이션 혼합물을 이. 콜라이 MC1061F의 세포에서 전기 천공시켜, >108개의 독립적인 콜로니를 수득하였다. 라이브러리의 증폭은 문헌에 기재된 바와 같이 수행되었다 (Tiller et al. 2013). 품질 관리를 위해, 라이브러리당 대략 10개의 단일 클론을 무작위로 골라서 생어(Sanger) 시퀀싱하였다.

[0273]

성숙 후보는 하기 과학적 근거 및 기준에 따라 선택되었다:

[0274]

1. 하기에 대한 상승된 결합으로 인해 표적-이탈 결합의 위험이 증가된 후보의 선택 해제:

[0275]

• PAR2-음성 항원 (ELISA): 빈 나노디스크, 마우스 IgG, 항-StrepII, bRIL

[0276]

• PAR2-음성 세포주 (FACS): 부모 Flp-In CHO 세포, Flp-In CHO_huPAR1 및 Jurkat 세포

[0277]

2. N-말단의 막 원위 부분에 우선적으로 결합하는 후보의 선택 해제 (FL-StaR 나노디스크 대 말단절단된 StaR 나노디스크에 대한 비교용 ELISA에 의해 평가됨)

[0278]

인간 PAR2-특이적 IgG1f_AEASS 후보는 하기와 같이 순위를 매겼다:

[0279]

1. 기능적으로 활성인 후보;

[0280]

2. 기능성의 평가를 위한 전제 조건으로서 WT FL-huPAR2 BacMam으로 감염된 기능적으로 활성인 HEK293F 세포주에 중점을 두고 세포 표면 발현된 인간 PAR2에 대한 결합;

[0281]

3. 공개된 PAR2 구조 (Cheng et al., 2017)는 이 시약 항체가 세포외 루프와 상호작용하였음을 입증하였기 때문에, 기능적으로 활성인 후보 Y021171 후보 및/또는 기능적으로 활성인 R&D 항-PAR2 시약 mAb MAB3949와의 결합 경쟁.

[0282] 표 5: 성숙 후보의 개요

항체 클론 ID	VH/VL	R&D mAb와의 경쟁	Y021171과의 경쟁	인간 PAR2 결합	레스스 PAR2 결합
Y021171	VH3-21/Vk1-12	결정되지 않음	참조	있음	없음
Y022054	VH3-07/Vk1-12	없음	있음	있음	없음
Y022063	VH3-23/VA2-23	있음	없음	있음	없음
Y022065	VH3-23/VA2-23	있음	있음	있음	없음

[0283]

[0284]

친화도 성숙의 주요 목표는 기존 성질의 개선이며, 일반적으로 표적화된 에피토프의 변위를 초래하지 않는다. IgG 특징분석에서, 기능적 후보는 레스스 PAR2에 대해 교차 반응성이지만, 비-기능적 후보는 이 중에 결합하는 것으로 관찰되었다. 제조용 레스스 PAR2 StaR 항원 물질의 부족으로 인해, 차등 전세포 패닝 전략 (DWC P)이 실시되었다.

[0285]

SPR 데이터는 Y021171의 경우 빠른 오프 레이트 (0.01의 kd (1/s))를 강조하였다. 따라서, 세번째 성숙 패닝 라운드 동안에, 개선된 오프 레이트를 갖는 후보를 풍부화시키기 위해 소위 "오프 레이트 선택" 절차 (Hawkins et al., 1992)를 실시하였다. SPR 데이터가 모든 성숙 후보에 대해 이용가능하지 않았기 때문에, 이 방법은 기능적 후보만을 포함하는 패닝 전략으로 제한되었다.

[0286]

성숙 동안에, 예를 들어 세척 단계의 횟수 및 시간을 증가시킴으로써 (예를 들어 밤새 세척) 패닝 라운드에 걸쳐 세척 엄격성을 증가시켰다. 연장 또는 밤새 세척은 고정된 항원에 대한 항체-파지의 임의의 재결합을 방지하기 위해 세척 완충제에 가용성 항원의 첨가와 조합하여 오프 레이트 선택 전략에서 이용되었다.

[0287]

9개의 부모 클론은 이용가능한 모든 결합 프로파일 및 잠재적인 작용 모드를 포함하는 친화도 성숙 캠페인으로 진행되었다. 이전에 선택된 항체 단편의 친화도 및 생물학적 활성을 증가시키기 위해, CDR-L3 또는 CDR-H1 & CDR-H2 영역은 다양화된 모듈에 의해 병렬로 교환되었다 (Prassler et al. 2009). 교차-클론 또는 추가의 프레임워크 조합의 출현을 피하기 위해, 고정된 VH/VL 인간 생식계열 프레임워크 쌍은 특이적 일란티아® 성숙 모듈 (YMM)을 사용하여 보존되었다. 친화도 성숙을 위한 라이브러리 클로닝 전에 부모 Fab 단편을 상응하는 발현 벡터에서 시스디스플레이™ 벡터로 옮겼다. CDR-L3 및 CDR-H1 & CDR-H2 라이브러리를 각각의 성숙 후보에 대해 개별적으로 클로닝하고 풀링하였다. 친화도 성숙은 6개의 개별 후보, 즉, 모든 기능적 후보 (Y021171, Y022054, Y022063, Y022065) 뿐만 아니라 Y022059 및 Y022069에 대해 맞춤형으로 이루어졌다. 더 약한 후보는 풀에서 성숙되었다 (Y021160, Y022075 및 Y022079). 성숙 라이브러리는 CDR-L3 및 CDR-H1 & CDR-H2의 개별 다양화를 위해 생성되었다. 성숙 패닝은 전장 또는 N-말단에서 말단절단된 나노디스크-매립된 PAR2 StaR을 사용하는 고엄격성 고체상 패닝 뿐만 아니라, 레스스 PAR2 교차 반응성의 생성 또는 개선에 중점을 두고 설계되었다. 친화도 성숙 및 스크리닝 후, 프로젝트 팀은 고도로 특이적인 일란티아® 항체 후보의 대형 세트를 식별하는데 성공적이었다. 클론은 IgG 전환 및 심층적 특징분석으로 진행되었다.

[0288]

친화도 성숙 패닝 선택

[0289]

이전에 선택된 항체 단편의 친화도 및 생물학적 활성을 증가시키기 위해, CDR-L3 및 CDR-H2 영역은 다양화된 모듈에 의해 병렬로 교환되었다 (Prassler et al. 2009). 친화도 성숙을 위한 라이브러리 클로닝 전에 부모 Fab 단편을 상응하는 발현 벡터에서 시스디스플레이™ 벡터로 옮겼다. 친화도가 개선된 후보의 선택을 위해, 성숙 라이브러리로부터 유래된 파지를 성숙 패닝의 3회 라운드에 적용하였다. 패닝 엄격성은 각각의 패닝 라운드에서 항원 농도를 감소시킴으로써 증가되었다 (Low et al. 1996). 항원 감소 외에도, 선택된 전략에 대해 오프 레이트 선택을 수행하였다 (Hawkins et al. 1992). 이들 전략은 고정된 항원에 대한 항체-파지의 임의의 재결합을 방지하기 위해 세척 완충제에 가용성 항원의 첨가와 조합되어 연장된 세척 단계와 조합되었다.

[0290]

친화도 성숙 후, 변형된 가변 영역을 코딩하는 DNA 단편은 부모 IgG를 코딩하는 pYMex10_h-IgG1f-AEASS 발현 벡터로 직접적으로 대체되었다. 간략히, 부모 VH 또는 VL을 코딩하는 벡터 성분을 적절한 제한 효소 (VH의 경우 NheI | XhoI, VL의 경우 NdeI | KpnI)에 의해 제거하고, 친화도 성숙 가변 영역을 코딩하는 단편을 삽입하고,

이전에 기재된 바와 같이 발현하고 정제하여, 전장 IgG를 생성하였다.

[0291] 실시예 7 - 리드 최적화 및 클론 프로파일링

[0292] 정제된 일란티아® IgG의 프로파일링은 인간, 마우스, 래스 및 마모셋 PAR2-발현 세포에 대한 결합 특이성 및 교차 반응성 평가를 포함하였고, 나노디스크-매립된 StaR에 대해 ELISA에 의해 및 PAR2 발현 세포에 대해 유동 세포계측에 의해 재확인된 PAR2에 대한 결합 또한 포함하였다. 친화도 성숙 후, 대부분 기능적으로 활성인 부모 IgG Y022065로부터 유래되는 몇몇 IgG 클론은 인간 PAR2 수용체 활성화를 완전히 억제하는 그들의 능력으로 인해 길항 활성을 갖는 것으로 확인되었고, 따라서 기능적으로 관련된 에피토프에 대한 그들의 특이성을 강조하였다.

[0293] ELISA에서 말단절단된 또는 FL PAR2 StaR 나노디스크에 대한 일차 스크리닝을 통해, 부모 항체와 비교하여 결합의 우수한 개선이 밝혀졌다. 모든 패닝 하위 코드에 대해 kd-순위 ELISA를 수행하였다. 고전적인 ELISA 설정대 Koff-순위 ELISA 설정에 의해 수득된 데이터의 플롯은 신호의 명확한 선형 상관관계를 나타내었고, 이는 대부분의 성숙한 후보가 느린 Koff 값을 가졌음을 나타낸다. 분석을 위해, 결합 신호의 손실은 고전적인 ELISA 설정의 백그라운드에 비한 신호 (S/BG)와 Koff-순위 ELISA의 S/BG 사이의 비로서 계산되었다: [말단절단된/FL PAR2 StaR 나노디스크 S/BG] / [Koff ELISA 말단절단된/FL PAR2 StaR 나노디스크 S/BG]. ELISA 순위에 따른 불량한 Koff 추정치는 고전적인 ELISA 설정에서 낮은 신호와 상관관계가 있었다. 신호에서 > 2배의 비 손실을 갖는 후보는 잠재적으로 빠른 오프 레이트를 갖는 후보로 분류되었다. 성숙한 후보의 94%는 신호에서 변화가 없거나 또는 낮은 변화 (< 2배)를 나타내었고, 그 중 67%는 부모 후보 Y021171의 유도체였다.

[0294] 부모 Y021171은 Koff-순위 ELISA에서 가장 큰 결합 신호 손실을 나타낸 반면에, 다른 부모 항체 후보는 신호에서 변화가 없거나 또는 낮은 변화를 나타내었다. 결과는 후보가 kd (1/s) = 0.01058의 빠른 오프 레이트를 나타낸 Y021171에 대해 생성된 이전의 SPR 데이터와 일치하였다. 성숙한 후보 중 6%는 신호에서 상승된 변화 (2-4.5배)를 나타내었으며, 이는 빠른 오프 레이트를 시사한다. 그 중 92%는 Y021171의 성숙한 유도체였다 (전체 Y021171 후보의 ~33%) (도 7).

[0295] 인텔리사이트에 의해 결정되는 PAR2에 대한 전세포 결합

[0296] 인텔리사이트에서 FlpIn CHO-V5His-huPAR2 대 FlpIn CHO 부모 세포에 대한 2200개의 주요 후보의 스크리닝을 통해, 이들 각각의 부모 항체 후보와 비교하여 대부분의 성숙한 유도체에 대해 결합의 개선이 밝혀졌다. 최상의 개선은 풀에서 성숙한 Y021171, Y022065, Y022069 및 부모의 성숙 패닝의 경우에 달성되었고, Y022079의 유도체는 우세한 패밀리인 것으로 예상되었다. 모든 후보는 FlpIn CHO 부모 세포에 대해 낮은 결합을 나타내었다 (S/BG < 1.5). 800개 초과 후보는 FlpIn CHO-V5His-huPAR2에 대해 양호한 또는 우수한 결합을 나타내었으며, FlpIn CHO 부모 세포에 비해 결합이 2-5배, 5-10배 또는 >10배 개선되었다 (신호 / 신호 부모) (도 8-11).

[0297] PAR2 특이성에 대한 단백질 패널 프로파일링 (3P)

[0298] 단백질 패널 프로파일링의 경우 (Frese et al. 2013), 32개의 상이한 단백질 및 대조군을 4°C에서 밤새 2개의 384-웰 MSD 표준 플레이트 (메조 스케일 디스커버리 (Meso Scale Discovery), MTP 384-웰 MA6000, #L21XA) 상에 1.0 µg/mL의 농도로 코팅하였다. 코팅 용액을 폐기하고, 플레이트를 미세역가 플레이트 진탕기 상에서 (~500 rpm) 실온에서 1시간 동안 PBS 중 50 µL 3% (w/v) BSA 또는 3% (w/v) 탈지 분유로 차단시킨 후, 50 µL 세척 완충제 (0.05% (v/v) Tween 20을 갖는 PBS)로 3회 세척 단계에 적용하였다. 항체 샘플 (Fab 단편 또는 IgG)을 검정 완충제 (0.5% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20을 갖는 PBS) 중에서 100 nM 및 10 nM로 희석하였다. 대조군으로서, MOR 참조 mAb 항-리소자임 MOR03207 Fab 또는 IgG (샘플 포맷에 따라) 및 검정 완충제를 사용하였다. 샘플 및 대조군을 첨가하고 (30 µL/웰), 미세역가 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 3회 세척하고, 웰당 30 µL 검출 항체 (ECL-표지된 항-인간 Fab, 1:2000 희석)를 첨가하고, 미세역가 플레이트 진탕기 (~500 rpm) 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. MSD 플레이트를 세척하고, 계면활성제를 갖는 35 µL/웰 MSD 판독 완충제 T를 첨가한 후, 섹터 이미저 (Sector Imager) 6000 (메조 스케일 디스커버리 | 미국 | 메릴랜드주 | 게이트스버그)을 이용하여 전기화학발광 신호를 검출하였다. 평가를 위해, 특정 단백질에 대한 항체 샘플의 신호를 항-리소자임 참조 mAb MOR03207의 각각의 신호로 나누어 결합 비를 생성하였다. 모든 후기 성숙 클론을 비롯한 대부분의 클론은 비-특이적 결합 성향이 없거나 또는 낮았다.

- [0299] 실시예 8 - 리드 최적화된 클론의 기능적 특징분석
- [0300] 기능적 검정: 세포-기반 IP-원 Gαq 검정
- [0301] 검정 방법론은 실시예 5의 방법을 따랐다. IC₅₀ 값을 결정하기 위해 항체 스톡을 10-포인트 농도 곡선에 걸쳐 1:2로 계열 희석하였다. 리드 최적화된 항체 클론을 활성화 펩티드 (2-퓨리올-LIGRO, 6.28nM; 표 6), 소 트립신 (2nM; 표 7) 또는 PAR1 활성화 펩티드 (SFLLR-NH2, 632nM; 표 8)에 대한 웰린지에서 별도의 실험으로 시험하였다.
- [0302] IP-원 HTRF 결과는 활성화 펩티드에 대한 웰린지에서 부모 항체 클론을 스크리닝할 때 10 μM MAB3949의 효과에 대해 정규화된다(도 12)
- [0303] IP-원 HTRF 결과는 소 트립신에 대한 웰린지에서 부모 항체 클론을 스크리닝할 때 1 μM 벤치마크 1의 효과에 대해 정규화된다 (도 13)
- [0304] IP-원 HTRF 결과는 PAR1 펩티드 SFLLR-NH2 트립신에 대한 웰린지에서 스크리닝할 때 10 μM MAB3949의 효과에 대해 정규화된다 (표 8)
- [0305] 정규화된 데이터는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 버전 7.04에서 4-파라미터 시그모이드 용량-반응 곡선에 피팅되었다 (방정식 2).
- [0306] 표 8의 데이터는 Y022883 항체가 PAR1 활성화 펩티드에 의해 PAR2 활성화를 차단할 수 있음을 나타낸다.
- [0307] 방정식 2: 4 파라미터 시그모이드-용량 반응 피팅
- [0308]
$$Y = 하단 + (상단 - 하단) / (1 + ((X^{경사면}) / (IC50^{경사면})))$$
- [0309] 여기서, IC₅₀은 AP/트립신 반응을 50%만큼 억제하는 농도 (nM)이고, % 최대 억제 값은 AP / 트립신의 최대 억제 (곡선의 최소 점근선, 즉 '하단'으로부터 취함)이다.
- [0310] 표 6: 소 트립신 웰린지 검정에서도 활성을 공유하는 시스마이오® IP-원 Gαq 키트를 사용하여 IP-원 인간 PAR2 길항제 검정에서 반복해서 활성을 입증하는 활성화 펩티드에 대한 리드 최적화된 클론의 기능적 특징분석.

부보 클론	리드 클론	인간 PAR2 AP IC ₅₀ (nM) ± SD	% 최대 억제 ± SD	반복 횟수
벤치마크 1		불활성	3 ± 1	2
MAB3949		241 ± 60	100 ± 6	2
Y021171	Y022931	56 ± 22	155 ± 64	2
Y021171	Y022930	113 ± 48	116 ± 48	2
Y021171	Y021171	4254 ± 360	163 ± 124	2
Y022063	Y022063	2392 ± 1717	61 ± 56	2
Y022065	Y022883	57 ± 11	149 ± 8	2
Y022065	Y022885	56 ± 3	142 ± 2	2
Y022065	Y022884	51 ± 7	150 ± 12	2
Y022065	Y022889	57 ± 11	131 ± 7	2
Y022065	Y022870	55 ± 7	203 ± 76	2
Y022065	Y022876	62 ± 0	156 ± 4	2
Y022065	Y022860	57 ± 1	155 ± 2	2
Y022065	Y022879	61 ± 0	161 ± 6	2
Y022065	Y022857	63 ± 3	186 ± 50	2
Y022065	Y022887	58 ± 5	143 ± 15	2
Y022065	Y022858	73 ± 11	161 ± 25	2
Y022065	Y022881	58 ± 3	158 ± 10	2
Y022065	Y022882	49 ± 8	124 ± 28	2
Y022065	Y022877	63 ± 12	167 ± 1	2
Y022065	Y022880	61 ± 0	178 ± 39	2
Y022079	Y022878	119 ± 32	102 ± 67	2

[0311]

[0312]

표 7: 활성화 펩티드 챌린지 검정에서도 활성을 공유하는 시스바이오® IP-원 Gaq 키트를 사용하여 IP-원 인간 PAR2 길항제 검정에서 활성을 입증하는 소 트립신에 대한 리드 최적화된 클론의 기능적 특징분석. 활성이 1회 반복만으로 확인될 수 있는 경우, 이는 '반복 횟수'로 표시된 열에 나타난다.

부모	리드 클론	인간 PAR2 트립신 IC ₅₀ (nM) ± SD	% 최대 억제 ± SD	반복 횟수
벤치마크 1		44 ± 0	118 ± 5	2
MAB3949		불활성	0	2
Y021171	Y022931	3365 ± 0	27	1
Y021171	Y022930	332 ± 0	50	1
Y021171	Y021171	54 ± 0	19	1
Y022063	Y022063	58 ± 0	31	1
Y022065	Y022883	183 ± 161	48	1
Y022065	Y022885	226 ± 219	90	1
Y022065	Y022884	204 ± 187	73 ± 30	2
Y022065	Y022889	279 ± 0	70	1
Y022065	Y022870	72 ± 0	10 ± 0	2
Y022065	Y022876	82 ± 36	34	1
Y022065	Y022860	70 ± 0	22 ± 0	2
Y022065	Y022879	101 ± 18	63 ± 29	2
Y022065	Y022857	66 ± 0	20 ± 0	2
Y022065	Y022887	255 ± 256	64	1
Y022065	Y022858	69.5 ± 28	115 ± 15	1
Y022065	Y022881	161 ± 0	9	1
Y022065	Y022882	169 ± 28	64	1
Y022065	Y022877	89.5 ± 43	58 ± 24	2
Y022065	Y022880	161 ± 104	94 ± 9	2
Y022079	Y022878	99 ± 0	106	1

[0313]

[0314]

부모 IgG Y022065로부터 유래된 친화도 성숙 리드 클론은 활성화 펩티드 및 트립신 둘 다에 대해 활성인 활성 리드 클론 중 가장 큰 비율을 나타낸다. 표 6 및 7은 활성화 펩티드 및 소 트립신 둘 다에 대한 IC₅₀ 값 n ≥ 1 을 입증하는 기능적 IgG 활성을 나열한다.

[0315]

표 8: IP-원 HTRF 결과는 PAR1 펩티드 SFLLR-NH2 트립신에 대한 켈린지에서 스크리닝할 때 10 μM MAB3949의 효과에 대해 정규화된다.

부모 클론	리드 클론	인간 PAR2 SFLLR IC ₅₀ (nM) ± SD	% 최대 억제 ± SD	반복 횟수
벤치마크 2		불활성	3 ± 1	2
Y022065	Y022883	13.5 ± 12.5	100 ± 5	2

[0316]

[0317]

기능적 검정: HT-29 세포주를 사용하는 세포-기반 FLIPR 칼슘 동원 Gαq 검정

[0318]

불멸화된 인간 결장 선암종 세포주 (PAR2 수용체를 내인성으로 발현하는 HT-29에서 활성의 확인은 IP-원 제조한 인간 PAR2 시험관내 검정에서 리드 클론의 IC₅₀ 확인 후에 수행되었다.

[0319]

HT-29 세포 (ATCC HTB-38을 37°C에서 5 % CO2 분위기 하에 가습 인큐베이터에서 피루브산나트륨은 없지만 글루타맥스 (김코, 영국 페이지리), 10 %의 열-불활성화된 태아 소 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신 (100 단위/mL의 페니실린 및 100 μg/mL의 스트렙토마이신)을 갖는 높은 글루코스 (25 mM)의 DMEM 배지를 사용하여 연속 배양으로 유지하였다. 배양 배지는 접종 후 둘째 날부터 2일마다 교체하고, 세포는 0.05 % 트립신/EDTA에 의해 80-90 % 전면생장에 도달한 후 대수적 성장기에 수확한다.

[0320] 세포를 384-웰 흑색 벽 플레이트 (코닝)에서 웰당 5,000개 세포의 세포 밀도로 배양 배지에서 50 μ L/웰로 플레이트하고, 37°C에서 5% CO₂ 분위기 하에 가습 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 실험 당일, 세포 배지를 제거하고, 칼슘 5 염료를 함유하는 50 μ L 검정 완충제 (0.1% BSA를 함유하는 HBSS 20mM HEPES pH7.4 완충제)를 스톡 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))으로부터 1:20 희석하였다. 플레이트를 37°C에서 45분 동안 다시 인큐베이션한 후, 세포를 실온에서 추가 15분 동안 평형화시켰다.

[0321] IgG 리드 클론을 검정 완충제 중에서 준비하고, 계열 희석하여, 10-포인트 곡선을 생성하였다. FLIPR 테트라 (몰레큘라 디바이시스) 피펫터 (10 μ L)를 사용하여 IgG 용량 반응 곡선을 온라인으로 추가하고, 칼슘 반응을 5분 기간에 걸쳐 측정하였다. 플레이트를 37°C에서 60분 동안 다시 인큐베이션한 후, 활성화 펩티드 (630nM) 또는 소 트립신 (63nM)을 10 μ L/웰로 온라인으로 추가하고, 칼슘 동원에 의해 활성화된 인간 PAR2의 추가 측정을 5분 기간에 걸쳐 수행하였다.

[0322] 데이터는 Max-Min 원시 데이터 파일 추출에 의해 분석하고, 방정식 2에 의해 분석하였다. 데이터는 활성화 펩티드 및 소 트립신 검정의 경우 각각 MAB3949 또는 벤치마크 1에 대해 정규화되었다.

[0323] 표 9: 상응하는 항체 대조군에 대해 정규화된 HT-29 FLIPR 칼슘 동원 검정에서 완전한 용량 의존적인 억제 $n \geq 3$ 을 입증하는 소 트립신 또는 활성화 펩티드 (AP)에 대한 리드 클론의 기능적 특징분석.

부모 클론	리드 클론	트립신 IC ₅₀ (nM) $\pm$ SD	AP IC ₅₀ (nM) $\pm$ SD
Y022059	Y022856	60 $\pm$ 38	76.2 $\pm$ 55
Y022065	Y022857	51 $\pm$ 58	20.5 $\pm$ 55
Y022065	Y022858	104 $\pm$ 58	62.8 $\pm$ 60
Y022065	Y022860	138 $\pm$ 44	62.6 $\pm$ 60
Y022065	Y022861	159 $\pm$ 38	70.7 $\pm$ 53
Y022065	Y022867	171 $\pm$ 41	87.5 $\pm$ 47
Y022065	Y022870	40 $\pm$ 46	17.8 $\pm$ 51
Y022065	Y022877	49 $\pm$ 77	44.3 $\pm$ 71
Y022065	Y022879	42 $\pm$ 64	34.6 $\pm$ 75
Y022065	Y022880	107 $\pm$ 61	67.9 $\pm$ 60
Y022065	Y022881	35 $\pm$ 64	23 $\pm$ 56.8
Y022065	Y022882	67 $\pm$ 59	38.2 $\pm$ 78
Y022065	Y022883	47 $\pm$ 41	42 $\pm$ 79
Y022065	Y022884	116 $\pm$ 39	39.4 $\pm$ 73
Y022065	Y022885	65 $\pm$ 69	76.7 $\pm$ 58
Y022065	Y022887	192 $\pm$ 48	51.5 $\pm$ 35
Y022065	Y022889	94 $\pm$ 48	64.1 $\pm$ 61

[0324]

[0325] 기능적 검정: 시노물구스 PAR2 및 레서스 PAR2에서 세포-기반 IP-원 G α q 검정

[0326] 2가지 농도에서 반복해서 시스바이오[®] IP-원 G α q 검정을 이용하여 합성 효능제인 SLIGKV에 대한 켈린지에서 시노물구스 및 레서스 PAR2 수용체에 대한 리드 클론 중간 길항제 활성을 시험하기 위해 기능적 특징분석을 수행하였다.

[0327] 37°C에서 5 % CO₂ 분위기 하에 가습 인큐베이터에서 현탁액 포맷으로 24시간 동안 배양된 성장 배지 (Pro293, 5% FBS, 1% 글루타맥스, 0.4% 페니실린/스트렙토마이신)에서 HEK293f 세포를 0.5mM 부티르산나트륨의 존재 하에 2.5 % v/v 시노물구스 PAR2 BacMam 바이러스 또는 2.5 % v/v 레서스 PAR2 BacMam 바이러스로 감염시켰다. 실험 당일, 세포를 수확하고, 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA, 시그마)과 함께 LiCl을 함유하는 1x10⁶/ml (1부의 자극 완충제 (시스바이오): 5부의 ddH₂O) 밀도의 검정 완충제 중에서 1x10⁶/ml 밀도로 재현탁시켰다.

[0328] IC₅₀ 값을 결정하기 위해 항체 스톡을 10-포인트 농도 곡선에 걸쳐 1:2로 계열 희석하였다. 항체 리드 클론을 SLIGKV (1 μ M)에 대한 켈린지에서 시험하였다. 반복해서 어느 한 농도의 항체의 5 μ L 분취량을 절반 면적 백색

96-웰 플레이트 (코닝)에 첨가한 후, 25 μ L PAR2의 세포 현탁액을 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 1 μ M의 최종 효능제 챌린지 농도에 대해 5 μ L/웰 SLIGKV를 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 추가 30분 동안 다시 인큐베이션한 후, 용해 완충제 중 10 μ L IP-원 검출 키트 (시스바이오)를 첨가하였다. 세포 플레이트를 실온 (RT)에서 1시간 동안 플레이트 진탕기 상에 둔 후, 335nm에서의 여기 및 620nm 및 665nm 둘 다에서의 방출 관독에 의해 표준 HTRF 프로토콜을 사용하여 페라스타 FS 마이크로플레이트 관독기 (비엠티 랩테크) 상에서 플레이트를 관독하였다. HTRF 비는 방정식 1에서와 같이 계산되었다. 반응은 1 μ M SLIGKV 단독 최종 검정 농도에 걸쳐 % 배수 억제에 대해 정규화되었고, 결과는 그래프패드 프리즘 버전 7.04에서 4-파라미터 시그모이드 용량-반응 곡선에 피팅하였다 (방정식 2).

[0329]

표 10: 시스바이오 IP-원 시노몰구스 PAR2 또는 레서스 PAR2 수용체 검정에서 반복해서 길항제 활성을 입증하는 SLIGKV에 대한 리드 클론의 기능적 특징분석.

부모 클론	리드 클론	시노 PAR2 SLIGKV IC ₅₀ (nM) $\pm$ SD	SLIGKV 배수 억제
Y022059	Y022856	>3162	0
Y022065	Y022858	300	2.1
Y022065	Y022870	25	2.2
Y022065	Y022877	37	2.3
Y022065	Y022879	63	2.2
Y022065	Y022882	96	2.2
Y022065	Y022883	25	2.4
Y022065	Y022884	385	2.1
Y022065	Y022885	>3162	0
Y022065	Y022889	>3162	0
Y022065	Y022881	41	2.0
Y021171	Y022916	>3162	0
벤치마크 1		>759	0
벤치마크 2		NA	0
MAB3949		>1000	0

부모 클론	리드 클론	레서스 PAR2 SLIGKV IC ₅₀ (nM) $\pm$ SD	SLIGKV 배수 억제
Y022065	-	>2000	0
Y022065	Y022870	51	1.9
Y022065	Y022877	47	2.0
Y022065	Y022883	43	1.8
벤치마크 1		>398	0

[0330]

[0331]

기능적 검정: 인간 PAR1에서 세포-기반 IP-원 G α q 검정

[0332]

2가지 농도에서 반복해서 시스바이오[®] IP-원 G α q 검정을 이용하여 합성 효능제인 SFLLR에 대한 챌린지에서 인간 PAR1 수용체에 대한 리드 클론 중간 길항제 활성을 시험하기 위해 기능적 특징분석을 수행하였다.

[0333]

37°C에서 5 % CO₂ 분위기 하에 가습 인큐베이터에서 현탁액 포맷으로 24시간 동안 배양된 성장 배지 (Pro293, 5% FBS, 1% 글루타맥스, 0.4% 페니실린/스트렙토마이신)에서 HEK293f 세포를 0.5mM 부티르산나트륨의 존재 하에 5 % v/v 인간 PAR1 BacMam 바이러스로 감염시켰다. 실험 당일, 세포를 수확하고, 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA, 시그마)과 함께 LiCl을 함유하는 1x10⁶/ml (1부의 자극 완충제 (시스바이오): 5부의 ddH₂O) 밀도의 검정 완충제 중에서 1x10⁶/ml 밀도로 재현탁시켰다.

[0334] IC₅₀ 값을 결정하기 위해 항체 스톡을 10-포인트 농도 곡선에 걸쳐 1:2로 계열 희석하였다. 항체 리드 클론을 SFLLR (100nM)에 대한 웰링지에서 시험하였다. 반복해서 어느 한 농도의 항체의 5 µL 분취량을 절반 면적 백색 96-웰 플레이트 (코닝)에 첨가한 후, 25 µL PAR2의 세포 현탁액을 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 100nM의 최종 효능제 웰링지 농도에 대해 5 µL/웰 SFLLR을 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 추가 30분 동안 다시 인큐베이션한 후, 용해 완충제 중 10 µL IP-원 검출 키트 (시스바이오)를 첨가하였다. 세포 플레이트를 실온 (RT)에서 1시간 동안 플레이트 진탕기 상에 둔 후, 335nm에서의 여기 및 620nm 및 665nm 둘다에서의 방출 관독에 의해 표준 HTRF 프로토콜을 사용하여 페라스타 FS 마이크로플레이트 관독기 (비엠티 랩테크) 상에서 플레이트를 관독하였다. HTRF 비는 방정식 1에서와 같이 계산되었다. 반응은 100nM SFLLR 단독 최종 검정 농도에 걸쳐 % 배수 억제에 대해 정규화되었고, 결과는 그래프패드 프리즘 버전 7.04에서 4-파라미터 시그모이드 용량-반응 곡선에 피팅하였다 (방정식 2).

[0335] PAR1 인간 시험관내 검정에 대한 양성 길항제 대조군으로서, 10 µM 최종 검정 농도로부터 3배 계열 희석으로 시험된 소분자 PAR1 길항제 보라팍사르(Vorapaxar) (악손 메드캡(Axon Medchem) Cat 1755)의 용량 반응 곡선을 인큐베이션하고, IC₅₀을 결정하였다.

[0336] 표 11: 시스바이오 IP-원 인간 PAR1 선택성 검정에서 SFLLR에 대한 리드 클론의 기능적 특징분석

부모 클론	리드 클론	인간 PAR1 SFLLR IC ₅₀ (nM) ± SD	SFLLR 배수 억제
Y022059	Y022856	>3162	0
Y022065	Y022858	>3162	0
Y022065	Y022870	>3162	0
Y022065	Y022877	>3162	0
Y022065	Y022879	>3162	0
Y022065	Y022882	>3162	0
Y022065	Y022883	>3162	0
Y022065	Y022884	>3162	0
Y022065	Y022885	>3162	0
Y022065	Y022889	>3162	0
Y022065	Y022881	>3162	0
Y021171	Y022916	>3162	0
벤치마크 1		>759	0
MAB3949		>1000	0
보라팍사르		51	2.5

[0337]

[0338] 리드 패널 - 기능적 검정: HT-29 세포주를 이용하는 세포-기반 FLIPR 칼슘 동원 Gαq 검정

[0339] 규모를 증가시킨 후, 내인성으로 발현된 PAR2에 대한 0.1nM 소 트립신 웰링지에 대해 길항제 활성을 확인하기 위해 HT-29 세포에서 리드 클론을 특징분석하였다 (실시에 8 방법론을 따름) (도 14).

[0340] 그 외에도, 이들은 트립신에 의한 세포의 N-말단 내의 단백질 분해성 절단 뿐만 아니라 PAR2-AP 활성화의 억제에서 이중-활성을 나타내었다. 3P 특이성 검정에서의 분석은 비-특이적 항원에 결합하는 경향이 증강된 몇몇 클론을 강조하였고, 이로써 치료제 후보로서 추가로 고려되는 이중-활성 IgG의 수가 감소하였다. 표적화된 에피토프의 정제 및 예비 에피토프 평가를 위해, 3P 검정 QC도 통과한 이들 IgG 클론을 ELISA-기반 에피토프-비닝 실험에서 분석하였다. 모든 후보는 서로 경쟁하는 것으로 나타났고, 벤치마크 1의 N 말단 에피토프와 상이한 근위 결합 영역을 표적화할 가능성이 있다. 최종 후보 선택의 심층적 특징분석은 SPR에 의한 친화도 측정도 포함하였다.

[0341] 남아있는 클론의 수는 기능적 검정, 서열 다양성 및 결합 프로파일을 기반으로 하여 추가로 감소하였다. 이들 후보는 1가 FabCys-AviH 포맷으로 생성되었고, 시노물구스 PAR2에 대한 교차 기능성에 대해 시험하였다. 그 외에도, 친화도 결정은 최적화된 설정에 의해 개선되었다.

[0342] Y022870, Y022877 및 Y022883 (Y022065의 3가지 유도체)이 최종 후보로 선택되었고, 주로 기능적 검정에서의 성능, SPR 친화도 데이터, 생성 QC, 및 단백질 패널 프로파일링 (3P) 검정에서 32개의 상이한 단백질에 대한 비-특이적 결합을 기반으로 하여 "리드 패널" 또는 "리드 세트"로 정의되었다.

[0343] 이들 3가지 후보를 6가지 경쟁자 항체의 세트와 비교하여 최종적으로 특징분석하였다. 심층적 특징분석은 리드 세트가 경쟁자 항체의 범위 내의 친화도로 정제된 및 세포 표면 발현된 PAR2에 결합함을 나타내었다. 관련 단백질 PAR1, PAR3 및 PAR4에 대한 표적-이탈 결합은 검출될 수 없었다. 모든 경쟁자 (벤치마크) 항체와는 대조적으로, 본원에 제공된 항체의 리드 세트는 프로테아제 활성화 뿐만 아니라 PAR2의 펩티드 활성화를 억제할 수 있으며, 따라서 PAR2 활성화의 이중 억제제로서 작용하였다.

[0344] 표 12: SLIGKV 효능제 켈린지에서 시험관내 중간 요약

클론 ID & IC50 (nM)	Y022065	Y022870	Y022877	Y022883
인간	264	61	52	54
레스스	>1995	50	47	43
시노	>1995	88	74	68

[0345]

[0346] 실시예 9 - 친화도 성숙 항체 클론의 친화도 및 동역학 결정

[0347] 비아코어 및 옥텟에 대해 표지 무함유 방법을 이용하여 KD 및 k_{off} 의 결정

[0348] IgG의 고처리량 동역학적 평가를 위해, 비아코어 T200 또는 옥텟 (QK384 또는 HTX) 장비를 사용하여 해리 속도 상수 (k_{off})를 결정하였다. 단량체성 항원 물질 (PAR2 StaR)을 사용하여 전체 동역학적 특징분석에 대해 기재된 것과 동일한 기본 전제 조건, 원리 및 고려 사항을 적용한다. 88개의 정제된 모든 IgG의 경우, k_{off} 는 옥텟에 의해 결정되었고, 부모 항체에 비해 순 개선을 나타내었다. 말단절단된 huPAR2 StaR 및 FL-huPAR2 StaR에 대해 평가된 k_d [1/s]는 $1.1E-4$ 내지 $1.0E-05$ 의 범위이다.

[0349] 일반적으로, k_{off} 결정을 위해 1개의 피분석물 농도만이 사용되었다. IgG 상청액 또는 박테리아 용해물 (Fab 단편)로부터 직접적으로 평가된 샘플은 항체 포획 포맷으로 옥텟을 이용하여 k_{off} 결정에 적용되었다. 전제 조건으로서, 단량체성 항원은 피분석물로서 사용되었다. IgG 샘플은 고밀도의 포획 리간드 (비오틴화 맵셀렉트 슈어 리간드)가 로딩된 스트렙타비딘 센서 상에 적당한 포획 수준 (0.4 nm)으로 포획되었다. 단량체성 항원 단백질 인간 PAR2-1 변이체 (P151 55-377, 말단절단된) 및 인간 PAR2-2 변이체 (P166: 1-377, 전장)는 용액에서 피분석물로서 사용되었다. 해리는 최대 1500초 동안 모니터링되었다. 기록된 센서그램은 상응하는 장비-특이적 평가 소프트웨어 (비아코어 T200 평가 소프트웨어 2.x 또는 3.x | 옥텟 데이터 분석 9.x 또는 10.x)를 사용하여 1:1 결합 모델에 피팅되었다.

[0350] 11가지 모든 IgG1f_AEASS의 경우, 인간 PAR2에 대한 친화도는 SPR에 의해 결정되었다. IgG는 그들의 Fc- 단편에 의해 포획되었고, 세제 (LMNG/CHS) 가용화된 FL-N PAR2 StaR은 용액에서 피분석물로서 사용되었다. 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02% LMNG는 검정 완충제로서 사용되었다. FL-N PAR2 StaR과 센서의 비-특이적 상호작용에 의해 도입되는 인공물을 최소화하기 위해, 고밀도의 항-hu-Fc 포획 항체 (BR-1008-39, 지이 헬스케어)를 고정시키기 위한 기반으로서 CM3 센서를 사용하였다. IgG는 대략 500 RU 의 비교적 높은 수준으로 포획되어, (동역학적 특징분석에 적합한 조건을 여전히 유지하면서) 특이적 대 비-특이적 결합의 높은 비를 달성하였다. 친화도는 6.5 nM 내지 130 pM 의 범위였다. 최상의 후보의 k_{off} 값은 더 낮은 검정 한계에 있었다. $2.00E-05 \text{ s}^{-1}$ 의 최소 k_{off} 가 보고되었다 (1500 초에서 3% 해리에 상응함). 6.5nM 내지 130pM 의 KD 값으로 다양한 친화도가 관찰되었고, 대부분은 예상되는 바와 같이 친화도 성숙 과정 후에 부모 클론 Y022065 ($K_D = 5.3\text{nM}$)에 대한 개선을 입증하였다.

[0351] 표 13: 옥텟 시스템 및 가용성 PAR2 StaR[®]을 이용하여 결정되는 친화도 성숙 클론의 SPR 동역학

클론	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (nM)
Y022916	3.9E+4	2.5E-4	6.5
Y022856	1.2E+5	2.5E-4	2.5
Y022858	5.2E+4	7.3E-5	1.4
Y022870	9.6E+4	2.0E-5	0.21
Y022877	6.8E+4	2.0E-5	0.29
Y022879	5.9E+4	3.2E-5	0.5
Y022882	1.1E+5	2.0E-5	0.18
Y022883	1.4E+5	2.0E-5	0.14
Y022884	7.1E+4	8.4E-5	1.2
Y022885	1.5E+5	2.0E-5	0.14
Y022889	1.6E+5	2.0E-5	0.13
벤치마크1	1.2E+6	8.8E-4	0.76

[0352]

[0353] 표 14: 비아코어 시스템 및 가용성 PAR2 StaR[®]을 이용하여 결정되는 SPR 동역학 및 상위 3개의 관심 친화도 성숙 클론의 분석

클론	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
22870	3.4E+04	7.0E-06	2.1E-10
22883	3.0E+04	1.2E-05	4.0E-10
22877	2.7E+04	8.0E-06	3.0E-10

[0354]

[0355] 표 15: 나노디스크에 혼입된 인간 PAR2 StaR[®]을 사용하는 비아코어 시스템을 이용하여 결정되는 SPR 동역학 - 3 가지 친화도-성숙 클론과 비-친화도 성숙 클론 (Y021171)의 비교.

클론	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Y021171	1.2E+06	3.7E-02	3.1E-08
Y022870	9.3E+04	2.5E-04	2.7E-09
Y022877	7.3E+04	2.1E-04	2.8E-09
Y022881	1.3E+05	8.3E-04	6.3E-09

[0356]

[0357] 제조함 PAR2 StaR[®] 단백질을 사용하는 SPR 친화도 측정 및 결합에 대한 온도의 영향의 평가: 25℃ 및 37℃에서 고정된 mAb에 대한 인간 PAR2 결합

[0358] 항-PAR2 항체와의 PAR2 상호작용의 검정은 비아코어 T200 장비 (지이 헬스케어)를 사용하여 수행하였다. 항-인간 IgG 항체 (인간 항체 포획 키트, 지이 헬스케어)를 센서 칩 CM3 (지이 헬스케어)의 표적 및 참조 유동 셀에서 아민 커플링에 의해 2700 내지 3000 공명 단위 (RU)의 표면 밀도로 고정시켰다. 고정은 25℃에서 HBS-EP+ 완충제 (지이 헬스케어) 중에서 수행되었다. 이어서, 25 또는 37℃에서 수행되는 PAR2-항체 상호작용 검정을 위해 완충제를 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % LMNG, 0.002 % CHS로 교체하였다. 각각의 검정 주기는 표적 유동 셀에서 400 내지 450 RU의 수준으로 항체 포획에 의해 시작되었다. 이어서, PAR2를 3가지 농도

에서 각각 5분 동안 표적 및 참조 유동 셀 위에 주사한 후, 30분 동안 해리시켰다. 이어서, 표면을 키트 (인간 항체 포획 키트, 지이 헬스케어)에 제공된 용액으로 재생시켰다. 시험한 모든 항체에서 첫번째 주기는 블랭크였고 (러닝 완충제의 3회 주사), 두번째는 일련의 50, 100 및 200 nM PAR2 주사였다. 블랭크-차감된 데이터를 1:1 상호작용 모델에 피팅하여, 회합 및 해리 속도 상수, k_a 및 k_d , 및 친화도 상수 K_D 를 획득하였다.

표 16: 25°C 및 37°C에서 친화도 성숙 후 리드 클론의 결합 요약

클론	온도 °C	해리 시간 (min)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (h)
Y22870	25	90	3.4E+04	7.0E-06	2.1E-10	27.6
Y22870	25	30	2.8E+04	1.2E-05	4.3E-10	16.1
Y22870	37	30	4.1E+04	1.9E-05	4.5E-10	10.3
Y22877	25	90	2.7E+04	8.0E-06	3.0E-10	24.1
Y22877	25	30	2.2E+04	5.1E-06	2.3E-10	37.9
Y22877	37	30	3.1E+04	1.7E-05	5.5E-10	11.5
Y22883	25	90	3.0E+04	1.2E-05	4.0E-10	16.2
Y22883	25	30	4.0E+04	8.1E-06	2.0E-10	23.7
Y22883	37	30	3.6E+04	2.3E-05	6.5E-10	8.3

리드 클론이 pH 민감성 결합을 나타내는지를 결정하기 위한 평가

Y22883을 280-320 RU로 포획하였고, 100 nM PAR2를 2분 동안 주사하였다. 주사를 중단한지 약 400초 후에, pH 6.0 완충제를 5분 동안 주사하여, 더 빠른 해리를 일으킬 수 있는지를 확인하였다. 실험은 해리 속도 상수의 수치적 평가가 불가능한 방식으로 설계되었다. 그럼에도 불구하고, pH 6.0의 조건이 해리를 가속시키지 않음이 명확하다 (도 15).

KinExA에 의해 전세포에 대한 겉보기 K_D 결정

"천연" PAR2 (즉, 세포 표면에서 발현되는 PAR2)를 사용하여 겉보기 K_D 의 결정을 위해, KinExA 방법론을 적용하여 리드 클론의 하위 집합, 즉, Y022870 및 Y022883을 평가하였다. 가용성 항원 대신에 표면-발현된 항원에 대한 평형 K_D 를 결정하기 위해, 야생형 전장 인간 PAR2를 발현하는 BacMam 감염된 HEK-293F 세포를 적정에 사용하였다. 세포를 인큐베이션 완충제 (킵코로부터의 D-PBS, 0.5% (w/v) BSA, 0.02% (v/v) 아지드화나트륨)에서 적정하였다. 실험은 낮은 및 높은 고정된 IgG 농도를 이용하는 2가지 적정으로 구성되었다. 두 적정 실험 모두에서 (화학양론- 및 친화도-제어된 조건), 최대량의 세포는 IgG를 완전히 포화시키기 위해 충분히 효과적인 높은 리간드 농도를 함유해야 했다. IgG 및 세포의 혼합물을 매우 부드러운 교반 하에 실온에서 밤새 인큐베이션하여, 평형을 형성하였다. 후속적으로, 형성된 세포-항체 복합체를 원심분리에 의해 제거하였다. 상청액의 유리 IgG 양은 PMMA (폴리메틸메타크릴레이트) 비드 상에 코팅된 염소 항-인간 F(ab')₂ 단편 특이적 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), #109-005-097)에 의해 결정되었고, 항-인간 F(ab')₂ 단편 특이적 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647 항체 (잭슨 이뮤노리서치, #109-605-097)에 의해 형광 검출하였다. IgG 분자가 KinExA 실험에서 사용되었기 때문에, 생성된 값은 '겉보기 K_D '로 표시되어, 항원 제시 세포에 대한 2가 결합이 배제될 수 없음을 나타내고, 결합은 결합력의 기여에 의해 강화될 수 있다. 기록된 적정 곡선은 "평형, 전세포" 모델을 적용함으로써 n-곡선 분석 도구를 사용하여 KinExA 프로 소프트웨어 4.1.11에 의해 분석되었다. Y022870은 전세포 상에서 발현되는 야생형 인간 PAR2에 ~370pM의 친화도로 결합하는 반면에, Y022883은 ~260pM의 친화도를 갖는다 (도 16). 값은 PAR2 나노디스크를 사용하여 결정된 SPR과 일치한다 (각각 210 및 140pM).

실시예 10 - HDX에 의한 친화도 성숙 클론의 에피토프 비닝 및 분석, 및 수용체 돌연변이의 유동 세포계측

항체 경쟁에 의한 ELISA 기반 에피토프 비닝

에피토프 비닝은 ELISA-기반 검정에 의해 수행되었다. 항-인간 PAR2 IgG1f 샘플 IgG를 100nM의 농도로 미세역가 플레이트 상에 직접적으로 코팅하였다. 동시에 일정한 농도 (12.5 nM 내지 25 nM)의 태그 부착된 항원 (예를 들어 나노디스크-매립된 StaR)을 25배 물 과량의 두번째 항-인간 PAR2 IgG1f와 함께 인큐베이션하여, 모든

에피토프 (최대 농도 312.5 nM 내지 625 nM, 7-포인트 적정, 1:4)를 1시간 동안 포화시키고, 복합체를 형성하였다. 평가된 각각의 샘플 IgG에 대해 내부 양성 대조군 (자가-경쟁)이 포함되었다. 항원-IgG 복합체를 IgG 코팅된 플레이트에 30분 동안 첨가하였다. 코팅된 IgG에 결합된 항원-IgG 복합체는 '아토포스' 형광 기질과 조합하여 적합한 알칼리-포스파타제 (AP) 커플링된 이차 항체에 의해 검출되는 태그-특이적 항체 (예를 들어 항-StrepII 또는 항-His)를 통해 검출되었다. 개별 검정 단계 사이에 다중 세척 단계를 수행하였다. 동일한 에피토프에 대한 경쟁이 발생하는 경우, 항원-IgG 복합체는 IgG 코팅된 플레이트에 결합할 수 없으며, 이는 낮은 신호로 해석된다. 상이한 에피토프의 표적화는 항원-IgG 복합체가 코팅된 IgG 및 용액 중 IgG에 동시에 결합하게 하여, 양성 검출 신호를 초래한다.

[0368] 이 경쟁 ELISA 설정을 이용하여, 에피토프 비닝에 의해 이용가능한 후보의 표적화된 에피토프 및 에피토프 다양성을 특징분석하였다. 16개의 이중-기능적 PAR2-특이적 후보를 서로에 대한 및 MAB3949 (R&D 시스템즈) 및 벤치마크 1을 포함하는 참조 항체에 대한 결합 경쟁에 대해 시험하였다. 16개 항체의 이 세트는 5가지 부모 패밀리 각각의 적어도 하나의 유도체, 즉, 친화도 성숙에 의해 부모 클론으로부터 유래된 클론 (Y022079, Y022069, Y022065, Y021171, Y022059)을 포함하였다. 모든 친화도 성숙 패밀리는 서로에 대해서 뿐만 아니라 항-huPAR2 (MAB3949 R&D 시스템즈)과 경쟁하였다. 이는 이들 모든 항체가 근위 결합 영역 (즉, N 말단 이외의 세포외 도메인)을 표적화한다는 것을 나타낸다. 어느 후보도 벤치마크 mAb 1과 경쟁하지 않았다. 벤치마크 mAb 1은 시험한 패널 중에서 독점적으로 전장 PAR2에 결합하는, 즉, 선형 N-말단 에피토프에 결합하는 유일한 항체이며; 이들 결과는 친화도 성숙 후보가 세포외 루프 영역과 더 밀접하게 관련되거나 또는 그를 직접적으로 표적화하는 완전히 상이한 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다 (도 17).

[0369] 또한, StaR-변성 조건 하에 결합의 평가를 실시하여, 선형 또는 입체 배좌형 에피토프의 인식으로 분류하는데 도움을 주었다. 시험한 IgG 후보의 97%는 결합의 손실을 나타내었고, 따라서 입체 배좌형 에피토프에 대한 결합으로 배정되었다.

[0370] 수소 중수소 교환

[0371] 수소 중수소 교환 (HDX)은 결합 계면을 조사하고 식별하기 위해 사용될 수 있는 방법 중 하나이다. 단백질-단백질 상호작용 부위는 단백질 백본에서 아미드 수소의 수소/중수소 교환 속도를 목록화함으로써 탐사된다. 이 교환이 얼마나 빠르게 또는 느리게 일어나는지는 용매에 대한 이들 아미드 수소의 접근성에 의해 결정된다. 따라서, 노출된 영역에서 아미드는 용매 환경에 대한 접근성이 더 높기 때문에, 이들은 단백질-단백질 계면 내에 묻혀 있는 것들보다 더 높은 교환 속도를 가져야 한다.

[0372] 하기 장비 및 물질이 실시예에서 사용되었다. 액체 크로마토그래피 분리는 2개의 온도-제어된 컬럼 구획을 구비한 써모 밴퀴쉬(Thermo Vanquish) UHPLC (써모 사이언티픽) 상에서 수행되었다. 온라인 소화는 15°C에서 엔자이메이트(Enzymate) BEH 펩신 컬럼 2.1x50mm (워터스(Waters)) 상에서 수행되었고, 수득된 펩티드는 4°C에서 키네틱스 예보(Kinetex Evo) C18 2.6 μm 50x2.1mm (페노메넥스(Phenomenex)) 상에서 분리되었다. 펩티드의 분리를 위한 이동상은 아세트니트릴/0.1% 포름산 (FA) 및 물/0.1% FA (피셔 케미컬(Fisher Chemical))로 구성되었다. 분리는 0% 내지 40%의 아세트니트릴/0.1%FA의 17.5분 구배를 이용하여 달성되었다. 수득된 펩티드의 MS1 및 MS/MS 분석은 오르비트랩 퓨전(Orbitrap Fusion) 장비 (써모 사이언티픽) 상에서 수행되었다. 펩티드 분석은 바이오닉 노드(Byonic node) (써모 사이언티픽)가 있는 프로테오 디스커버리(Proteome Discoverer) 2.4를 사용하여 수행되었고, HDX 가공은 에이치디이그제미너(HDExaminer) 2.4 (시에라 애널리틱스(Sierra Analytics))를 사용하여 수행되었다. 유전자 변형된 PAR2-2 1-377 (글리코실화 부위가 제거됨) PAR2 StaR 단백질은 LMNG/CHS에서 정제되었다. 항원-결합 단편 (Fab) Y022883은 직접적으로 발현되었고 (실시예 4 참조), 참조 Fab는 R&D IgG MAB3949의 과파인 소화로부터 유래되었다.

[0373] HDX를 위한 전형적인 바텀-업 HDX 질량 분광분석법 (MS) 절차는 단백질-Fab 인큐베이션, 중수소화된 완충제로 동위원소 표지화, 켄칭, 단백질 분해성 소화, 탈염/분리, 및 MS 분석을 포함한다. PAR2-2 구축물을 50 μM로 희석하고, 등물 농도의 Fab Y022883 (또는 Fab MAB3949)과 함께 22°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. HDX는 22°C에서 1분, 10분, 30분, 2시간의 각각 여러 기간 동안 (연속 표지화) 중수소화된 완충제 (10mM 포스페이트 완충제 pH 7.5, 150mM NaCl)에서 단백질 혼합물을 희석함으로써 개시되었다. 20배 희석을 선택하여, 용매 접근 가능한 수소의 D 표지화를 90-95%까지 달성하였다 (일반적으로 2 μl의 단백질 혼합물을 38 μl의 중수소화된 완충제와 혼합하였음). 원하는 시간 후, 0.8% 포름산으로 용액 pH를 ~2.5까지 저하시킴으로써 교환을 켄칭시켰고, 용액을 드라이 아이스 상에서 즉시 급랭시켜, 역교환을 감소시켰다. 이어서, 펩신 컬럼 상에서 효소적 온라인 소화 및 LC-MS 상에서 후속적인 분석 이전에 샘플을 해동시켰다. 이어서, 비-복합체화된 단백질에

서 용매/중수소-접근가능한 수소를 식별하기 위해 동일한 프로토콜을 PAR2-2 구축물에만 및 Fab Y022883 (또는 Fab MAB3949)에만 적용하였다. PAR2-2/Fab Y022883 (또는 PAR2-2/Fab MAB3949) 복합체에서의 중수소화 수준과 균질한 단백질 (Fab Y022883, Fab MAB3949 또는 PAR2-2)에서의 중수소화 수준의 비교는 용매 접근가능한 수소의 주변에 대한 변화의 지표를 제공하고, 후속적으로 이러한 "맵핑"을 이용하여, PAR2-2/Fab Y022883 (또는 PAR2-2/Fab MAB3949) 상호작용 부위를 결정할 수 있다. 방법론을 검증하기 위해, PAR2/MAB3949 Fab에 대해 수득된 HDX 결과를 MAB3949 Fab와의 복합체에서 PAR2의 공개된 공동-구조 상에 맵핑하였다 (Cheng et al., Nature, 2017). HDX로부터 추론된 상호작용은 결정 공동-구조에서 관찰된 것과 잘 일치하였다. 이어서, PAR2-2/Fab Y022883 HDX를 조사하였고, 데이터는 Fab MAB3949에 대해 관찰된 것에 대해 상이한 상호작용 (도 18-20)을 나타내었다 (Cheng et al., Nature, 2017). PAR2의 N-말단 영역은 독특한 중수소-수소 교환 패턴을 나타내었고, 이는 결합에 이 영역이 관여함을 시사할 가능성이 있다.

[0374] 표 17: HDX에 의해 식별된 PAR2-2 펩티드의 목록 (이는 상호작용 영역에 위치하는 것으로 결정되며, 따라서 Y022883 항체 에피토프를 포함함).

펩티드	PAR2-2에서의 위치
SEQ ID NO: 41 - 55-59 VETVF	세그먼트1
SEQ ID NO: 42 - 60-77 SVDEFS ASVLTKGLTTVF	세그먼트1/헬릭스0/1
SEQ ID NO: 43 - 306-311 LLVVHY	ECL3
SEQ ID NO: 44 - 312-326 FLIK SQGQSHVYALY	ECL3

[0375]

[0376] 이들 HDX 데이터는 PAR2의 ECL1 또는 ECL2가 Y022883 PAR2 항체와의 직접적인 상호작용에 관여할 가능성이 훨씬 낮음을 시사하며; 이 방법론을 이용하여 관찰된 직접적인 상호작용은 세그먼트1, 헬릭스0/1 (막횡단 도메인에 대해 근위에 있고, 수용체의 비교적 원위 영역에 결합하는 다른 PAR2 표적화 항체와는 대조적임) 및 ECL3의 영역에 위치한다.

[0377] 유동 세포계측을 이용하는 돌연변이 분석

[0378] PAR2 결합 에피토프 돌연변이는 다음과 같이 인간 PAR2 발현 HEK293F-세포에 대한 유동 세포계측에 의해 평가되었다. 발현 수준의 모니터링은 벤치마크 1 항체를 사용하여 수행되었다. WT PAR2 백그라운드에 도입된 돌연변이는 세그먼트1, 헬릭스0/1 (단일 돌연변이 F59A, S60W, D62G, D62F, E63K, E63A 및 이중 돌연변이 D62G/E63G) 또는 ECL3 (단일 돌연변이 Q317A, G318F, Q319A, Q319I)을 표적화하였다. PAR2의 다양한 버전을 BacMam 감염에 의해 HEK293F 세포에 도입하였다.

[0379] FACS-완충제 (PBS (시그마, #F9665), 1% BSA (시그마, #A9647) 및 로슈 완전 프로테아제 억제제 (#11836145001)) 중에서 4×10^6 세포/mL로 200 μ L HEK293F- 세포를 20 nM의 벤치마크 1 또는 Y022883과 함께 4°C에서 1시간 동안 교반하였다. 세포를 펠렛화하고, 200 μ L FACS 완충제로 3회 세척하였다. 연속적으로, 세포를 20 nM의 200 μ L 이차 알로피코시아닌 (APC) 접합된 항-인간 IgG 항체와 함께 4°C에서 1시간 동안 교반하고, 200 μ L FACS 완충제로 다시 3회 세척하였다.

[0380] 돌연변이된 PAR2 및 WT PAR2는 벤치마크 1로 검출하였을 때 매우 유사한 발현 프로파일을 나타내었지만, D62F는 부분적으로 감소된 발현 수준을 나타낸 반면에, S60W, D62F, G318F 및 이중 돌연변이 D62G/E63G 모두는 Y022883으로 검출하였을 때 WT에 비해 감소된 발현 프로파일을 나타내었으며, 이는 HDX 분석에 의해 식별된 영역이 인간 PAR2에 대한 Y022883 결합에 관여함을 나타낸다. 선택된 돌연변이에 의한 결합 감소의 관찰은 ECL3에 비해 세그먼트1/헬릭스0/1에 대해 더 강하다 (도 21).

[0381] 이들 돌연변이의 영향은 항체 에피토프를 변경시키는 형태적 변화를 부여할 수 있으며, 수용체의 기능적 활성 또한 변화시킬 수 있다.

[0382] 실시예 11 - 래트 약동학

[0383] Y022883의 약동학을 성체 수컷 스프라구 돌리(Sprague Dawley) 래트에서 탐구하였다. 3마리의 래트에게 10mg/kg Y022883을 정맥내로 주사하였고, 2주까지 다양한 시점에서 혈액 샘플을 취하였다. 혈액 샘플을 이용하여 혈청을 생성하였고, 피닉스(Phoenix)TM 윈놀린(WinNonlin)을 이용하여 비-구획 분석 (NCA)에 의해 계산되는

PK 파라미터를 사용하여 자이로랩(Gyrolab) 플랫폼 (일반 PK 키트)에서 적격한 비-GLP ELISA에 의해 이들 혈청을 분석하였다. 요약 데이터는 도 22 및 표 18에 나타내었다. 이들 데이터는 Y022883이 래트 PAR2에 결합하지 않기 때문에 예상되는 유의한 항원 싱크가 없는 인간 mAb의 기대치와 일치한다.

표 18: 래트에서 Y022883의 그룹 PK 파라미터 (n=3). 데이터는 평균을 괄호 안의 표준 편차와 함께 나타낸다.

그룹	반감기 (h)	Cmax (ng.mL ⁻¹)	AUC ₀₋₁₂ (hr.ng.mL ⁻¹)
10mg/kg Y022883	146.7 (15.0)	109136 (4502)	6937883 (496973)

실시예 12 - 시노몰구스 약동학 및 약력학

Y022883의 약동학을 성체 수컷 시노몰구스 원숭이에서 탐구하였다. 3마리의 수컷 성체 시노몰구스 원숭이의 3개 그룹에게 10mg/kg, 3mg/kg 또는 1mg/kg Y022883을 정맥내로 주사하고, 4주까지 다양한 시점에서 혈액 샘플을 취하였다. 혈액 샘플을 사용하여 약력학을 평가하거나 (도 24-26, 포함) 또는 약동학을 위한 혈청을 생성하였다 (도 23 참조).

피닉스TM 원플린을 이용하여 비-구획 분석 (NCA)에 의해 계산되는 PK 파라미터를 사용하여 자이로랩 플랫폼 (일반 PK 키트)에서 적격한 비-GLP ELISA에 의해 혈청을 분석하였다. 요약 데이터는 도 23 및 표 19에 나타내었다. 이들 데이터는 유의한 항원 싱크가 없는 인간 mAb의 기대치와 일치한다.

표 19: 시노몰구스 원숭이 (n=3)에서 Y022883의 그룹 PK 파라미터. 데이터는 평균을 괄호 안의 표준 편차와 함께 나타낸다.

그룹	반감기 (h)	Cmax (ng.mL ⁻¹)	AUC ₀₋₁₂ (hr.ng.mL ⁻¹)
10mg/kg Y022883	182.3 (66.3)	463117 (85204)	45635218 (5182962)
3mg/kg Y022883	174.5 (132.5)	150540 (35878)	12188113 (2805691)
1mg/kg Y022883	150.8 (97.3)	34523 (2255)	3588673 (168372)

약력학은 멸균 조건 하에 4가지 시점에서 (투여전, 투여후 1, 13 및 29일차) 평가하였다. 1 부피의 PBS를 각각의 혈액 샘플에 첨가하고, 6% 텍스트란 T-500을 2%의 최종 농도로 첨가하였다. 25-40분 동안 인큐베이션한 후 (백혈구-풍부 및 적혈구-풍부의 두 단계가 각각 50%일 때 반응을 중단함), 백혈구-보유 상청액을 제거하고, PBS로 세척하고, 원래의 혈액 부피에서 배양 배지 (RPMI-1640, 2% FCS, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민, 1% 비-필수 아미노산)에 재현탁시켰다. 이어서, 1mL 세포 샘플을 PBS, 100mcM 2f-LIGRLO, 100nM 트립신 또는 100pg/mL LPS로 켈린지하고, 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 펠렛화하고 (306g, 5분, 실온), 펠렛을 재현탁시키고, 0.48mL RNAlater와 혼합한 후, -70°C에서 냉동시켰다. 이어서, 샘플 RNA를 표준 방법에 의해 추출하고, 50x 판독 깊이에서 게놈-기반 판독 맵핑에 의해 전사체를 평가하였다.

시퀀싱 판독 (FASTQ 파일)을 참조 게놈에 대해 정렬시키고, 각각의 유전자에 맵핑된 판독의 수를 카운트하여, 유전자-카운트 표를 생성하였다. 이어서, 차등 유전자 발현 분석을 각각의 자극 사이에 각각의 시점에서 투여 그룹별로 (예를 들어 1mg/kg 투여전 PBS 대 1mg/kg 투여전 PAR2AP, 1mg/kg 투여전 PBS 대 1mg/kg 투여전 트립신, 1mg/kg 투여전 PBS 대 1mg/kg 투여전 LPS) 수행하였다. 이어서, 차등 유전자 발현을 볼케이노 플롯 (유전자 발현의 배수 변화 대 통계적 유의성 (P 값)의 산점도)의 생성을 통해 결정하였다. 2배 이상 상향 또는 하향 조절되고 0.05 이하의 유의성을 갖는 유전자는 차등 발현된 것으로 고려되었다. 따라서, 차등 발현된 유전자의 세트를 각각의 자극에 대해 (투여전 샘플로부터) 생성하였고; mAb로의 처리 효과는 각각의 자극에 대해 투여전 차등 발현된 유전자의 세트가 각각의 시점에서 여전히 차등 발현되었는지 여부를 결정함으로써 평가되었다. 예를 들어, 1mg/kg 투여 그룹에서 투여전 시점에서 1816개의 유전자가 LPS에 의해 (투여전 PBS에 비해) 차등 조절되었고; 24시간째에 이들 유전자 중 1379개가 LPS에 의해 (24시간 PBS에 비해) 여전히 차등 조절되었고, 따라서 1mg/kg LPS 투여 그룹에서 투여전 LPS 유전자-시그니처의 76%가 투여후 24시간째에 존재하였다.

이 방법론을 이용하여, 10mg/kg Y022883의 단일 IV 주입이 모든 시점에서 PAR2AP-유도된 및 트립신-유도된 유전자 시그니처를 저해하는 것으로 확인된 반면에, LPS 유전자 시그니처는 24시간째에 36%만큼 저해된 후, 29일까지 23% 저해로 회복되었다 (도 24). 3mg/kg Y022883 후에 유사한 관찰 세트가 이루어졌지만 (도 25), 1mg/kg Y022883에 의해서는 트립신 유전자 시그니처가 29일까지 회복되기 시작하였다 (24시간, 13일차, 29일차에 96%, 92%, 91% 저해; 도 26). 이들 데이터는 Y022883이 (적어도 TLR4에 비해) PAR2를 특이적으로 길항시키고, 적어

도 1mg/kg의 단일 주입 후 1개월 동안 말초 혈액 백혈구에서 PAR2의 차단을 제공하는 것과 일치한다. PAR2 길항작용에 의한 LPS-유도된 유전자 시그니처의 부분 저해는 TLR4 및 PAR2 신호전달 캐스케이드를 연결하는 문헌 보고와 일치한다 (Yamaguchi et al. 2016).

[0394] 실시예 13 T84 세포주에서 트립신 및 Par2-AP 유도된 p38 MAPK 및 pERK 인산화에 대한 SH-C 및 벤치마크 II의 효과

[0395] T84 세포를 성장 배지에서 트립신 (1 μ M) 또는 PAR2-AP (2fu-LIGRLO) (10 μ M)로 처리하였다. 항체 Y022883 (SH-C) 및 벤치마크 2 (SH-D)를 10 nM 내지 3 μ M 범위의 농도에서 시험하였다. 처리 후 5분 또는 30분째에 용해 완충제 (PBS + 1% 트리톤 X-100, 프로테아제 및 포스파타제 억제제) 중에서 세포를 용해시켰다. 인단백질 분석 전에 총 단백질 농도를 BCA에 의해 평가하였다. 단백질 농도를 0.3 mg/ml로 조정하고, 샘플을 12-230 kDa Wes 분리 모듈 8 x 25 모세관 카트리지를, 프로테인 심플(Protein Simple) 상에 로딩하였다. 토끼 항체를 사용하여 pERK 및 ERK (pERK, 셀 시그널링(Cell signalling), cat: 9101S; ERK, 셀 시그널링, cat: 4695S) 및 포스포 p38 MAPK 및 p38 MAPK (셀 시그널링, cat: 9211L; p38, 셀 시그널링, cat: 9212S)를 검출하였다. 항-토끼 검출 모듈 (프로테인 심플, cat: DM-001)이 이차 항체로서 사용되었다. 포스포-ERK 또는 포스포 p38에 대한 데이터는 총 ERK 또는 총 p38에 대한 데이터에 대해 정규화되었고; 생물학적 복제물을 분석하였다. 최대 비의 백분율을 이용하여 플레이트 사이에 정규화하였다 (도 27-29).

[0396] 트립신 또는 PAP2-AP로의 처리는 pERK에서 >8배 증가 및 포스포 p38-MAPK에서 >3배 증가를 생성하였다. SH-C 및 벤치마크 II 둘 다 트립신 처리된 세포에서 ERK 및 p38-MAPK의 인산화의 억제를 입증하였다. SH-C만이 PAR2-AP 처리된 세포에서 인산화의 유의한 억제를 입증하였다.

[0397] 서열

[0398] 표 20-23: 카바트에 따라 식별된 CDR을 갖는 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883에 대한 항체 클론 서열.

가변 영역 창 명칭 Y022065					
프레임워크 Vh	YLAN_VH3-23				
프레임워크 VI	YLAN_VL2-23				
HCDR1 (SEQ ID NO: 3)	SYAMS				
HCDR2 (SEQ ID NO: 4)	AISGSGGSTYYADSVKG				
HCDR3 (SEQ ID NO: 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI				
LCDR1 (SEQ ID NO: 7)	TGTSSDVGSYNLVS				
LCDR2 (SEQ ID NO: 8)	EGSKRPS				
LCDR3 (SEQ ID NO: 9)	SQYATFIAFAV				
단백질 서열 (VH) (SEQ ID NO: 2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSVWRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCARGFHYTHSGKRYYPFDIWIWQGTLTVTVSS				
단백질 서열 (VL) (SEQ ID NO: 6)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ				
Ppt 포맷	h_1gG1f AEASS				
LC 단백질 (SEQ ID NO: 70)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS				
LC DNA (SEQ ID NO: 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCACTT AGCTGCACCG GCACCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAAACGCC GAGCGGCGTT AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCCGT CAAGCCGAAG ACCGAAGCCA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGCT GTGTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCTG CTGGCCAGC CCAAGCGCG CCTAGCGTG ACCCTGTTCC CCCCAAGCAG CGAGGAACCT CAGGCCAAC AGGCCACCT CGTGTGCTG ATCAGCGACT TCTACCTGG CGCCGTGACC GTGGCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG AAGGCCGGCG TGGAAACCA CACCCAGCAG AAGCAGAGCA ACAACAATA CGCCGCCAGC AGCTACTCGA GCCTGACCCC CGAGCAGTGG AAGTCCCA CA GATCCTACAG CTGCCAGGTC ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAAAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGCAG C				
HC 단백질 (SEQ ID NO: 71)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSVWRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCARGFHYTHSGKRYYPFDIWIWQGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				
HC DNA (SEQ ID NO: 35)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGCAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCTG AGCTGTGCC CAAGCGGCTT TACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT GCGCCAAGCA CCAGCAAAAG GCCTGGAATG GGTGAGCGCC ATTAGCGGCA GCGGTGCAG CACTATTAT CCGCATAGCG TGAAGGTG CTTTACCAT AGTCGCGATA ACAGCAAAA CACCCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATATTGCGC GCGAGGATT CACTACACT ACTCCGTA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGG CAGGGCACC CTGTTACTG TCTCGAGCG GTCGACCAA GGGCCAGCG TGTTCCCTCT GGGCCCGAG AGCAAGAGCA CCTCTGGCG AACAGCGCC CTGGGTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCC GAGCCCGTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCGCTGACCA GCGGCGTGA CACTTTCCA GCGCTGCTCC AGAGCAGCG CCTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCCAGCAG AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACCACA AGCCCAGCAA CACAAGGTG GACAAGCGGG TGGAAACCAA GAGCTGCGAC AAGACCCA CA CTGTCCCCC CTGCTGCCC CTGGAAGCG AGGGAGCCC CTCCGTGTC CTGTTCCC CAAAGCTAA GGACACCTG ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACGTGTCCA CGAGACCTG GAAGAGAGT TTAATTGGA CGTGGACGG GTGGAAGTGC ACAACGCCA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACTACCGG GTGGTGTCC TGCTGACCGT GCTGCACCG CACTGGCTGA ACGGCAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAGGC CAGCCCGCG CAGCCCAGGT GTACACTGT CCCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT CGTGAAGGC TTCTACCCA GCGACATTG CGTGGAATGG GAGAGCAAC GCCAGCCGA GAACAATAC AAGACACCC CCCCTGTGCT GGAACGCA C GGCTATTCT TCCTGTACG CAAGCTGACC GTGACAGAA GCGGTGCA GCAAGGCAAC GTGTCAGCT GCTCGTGAT GCACGAGCC CTGCACAACC ACTACACCA GAAGTCCCT AGCTGAGCC CCGGAAG				

[0399]

가변 영역 창 명칭 Y022870	
프레임워크 Vh	YLAN_VH3-23
프레임워크 VI	YLAN_VL2-23
HCDR1 (SEQ ID NO: 11)	RYAIT
HCDR2 (SEQ ID NO: 12)	TISALGLEYAESVRG
HCDR3 (SEQ ID NO: 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI
LCDR1 (SEQ ID NO: 7)	TGTSSDVGSYNLVS
LCDR2 (SEQ ID NO: 8)	EGSKRPS
LCDR3 (SEQ ID NO: 9)	SQYATFIAFAV
단백질 서열 (VH) (SEQ ID NO: 10)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYAITWVRQAPGKGLEWVSTISALGLEYAESVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYYTHSGKRYYPFDIWIWQGLTLTVSS
단백질 서열 (VL) (SEQ ID NO: 6)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ
Ppt 포맷	h_lg1f_AEASS
LC 단백질 (SEQ ID NO: 70)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC DNA (SEQ ID NO: 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATTTAGCTGCACG GCACCCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAGCATCCGGGCA AAGCCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAACGCCC GAGCGCGTTAGCAACCGCT TTAGTGCGAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCCTGCAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGCTGTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGCCAGC CCAAAGCCGC CCTAGCGTGAACCTGTTCC CCCCAAGCAG CGAGCAACTC CAGGCCAACA AGGCCACCT CGTGTGCTGACTCAGCACT CTACCTCTGG CGCCGTGACC GTGGCTGGA AGCCGATAG CAGCCCTGTGAAGCCCGCG TGGAAACCA CACCCCGAGC AAGCAGAGCA ACAACAATA CGCCCGCAGCAGCTACCTGA GCCTGACCCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTCACACAGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGCA C
HC 단백질 (SEQ ID NO: 72)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYAITWVRQAPGKGLEWVSTISALGLEYAESVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYYTHSGKRYYPFDIWIWQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQWYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC DNA (SEQ ID NO: 36)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCTGAGCTGTCCG CAAGCGGGTT TTCTTTCTCC AGATACGCAA TCACCTGGGT GCGCCAAGCACCAAG GCCTGGAATG GGTGAGCACC ATTTCCGCA TGGGTCTGGA GACATATTACGCGGAGTCCG TCCGGCGCCG CTTTACCAT AGTCGCGATA ACAGCAAAAA CACCTGTATCTGCAATGA ACAGCTGCG GGCAGAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCG GCGAGGATTCACTACACTC ACTCCGTAAC ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG CCAAGGCCACCCTGGTACTG TCTCGAGCGC CTGCACCAA GCGCCAGCG TGTTCCTCT GGCCCCAGCAGCAAGCA CCTCTGCGG AACAGCCGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTTCCA GCGGTGCTCC AGAGCAGCG CCGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACACA AGCCAGCAA CACAAAGGTGGACAAGCGGG TGGAAACCAA GAGCTGCGAC AAGACCCACA CCTGTCCCC CTGCCCTGCCCTGAAGCGG AGGGAGCCCC CTCCGTGTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCTGATGATCAGCC GGAACCCGA AGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACCTGTCCA CGAGACCTTGAAGTGAAGT TTAATTGGA CTGGAGCGG GTGGAAGTGG ACAAGCCAA GACCAAGCCGAGAGAGAAC AGTACAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCCG TGCTGACCGT GCTGCACCGGACTGGCTGA ACGCAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCCTCCATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCCGCG AGCCCCAGGT GTACACACTGCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT CGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATTGC CGTGGAAATG GAGAGCAACG GCCAGCCGGA GAACAACCTAAGACCAACC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACCTGGACAAGA GCCGTGGCA GCAAGGCAAC GTGTTAGCT GCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAGCC ACTACACCCA GAAGTCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG

[0400]

가변 영역 쌍 명칭 Y022877			
프레임워크 Vh	YLAN_VH3-23		
프레임워크 Vi	YLAN_VL2-23		
HCDR1 (SEQ ID NO: 14)	RYAMT		
HCDR2 (SEQ ID NO: 15)	TISGLQEAYYAGSVKG		
HCDR3 (SEQ ID NO: 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI		
LCDR1 (SEQ ID NO: 7)	TGTSSDVGSYNLVS		
LCDR2 (SEQ ID NO: 8)	EGSKRPS		
LCDR3 (SEQ ID NO: 9)	SQYATFIAFAV		
단백질 서열 (VH) (SEQ ID NO: 13)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKGLEWVSTISGLGQE AYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARGFHYTHSGKRYYPFDIW GQGTLTVTSS		
단백질 서열 (VL) (SEQ ID NO: 6)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGPKAAPS VTLFPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTPATECS		
Ppt 포맷	h_lg1f AEASS		
LC 단백질 (SEQ ID NO: 70)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGPKAAPS VTLFPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTPATECS		
LC DNA (SEQ ID NO: 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCAT AGCTGCACCG GCACCCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGCA GCAACGCCG GAGCGCGTT AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAGCGGC AACACCGCA GCTGACCAT TAGCGCGCTG CAGCCCAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTGCTG GTGTTTGGCG GCGGTACCA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAGCCGC CCCTAGCGTG ACCTGTGTC CCCCAAGCAG CGAGGAATC CAGGCCAACA AGGCCACCT CGTGTGCTG ATCAGCACT TCTACCTGG CGCGTGACC GTGGCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG AAGGCCGCG TGAACACAC CACCCAGC AAGCAGACA ACAACAAATA CGCCCGCAGC AGCTACCTGA GCTGACCCC CGAGCAGTG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGTG ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC GTGGCCCCA CCGAGTCAG C		
HC 단백질 (SEQ ID NO: 73)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKGLEWVSTISGLGQE AYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARGFHYTHSGKRYYPFDIW GQGTLTVTSSASTKGPSVFLPASPSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHC PPCPAPEAEGAPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
HC DNA (SEQ ID NO: 37)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAAG CGGTGGCGGT CTGGTGCAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCTG AGCTGTGCTG CAAGCGGCTT TACCTTCAGC AGATATGCAA TGACTTGGGT GCGCAAGCA CCAGGCAAGG GCCTGGAATG GGTGACTACC ATAAGCGGGC TGGACAAGA GGCTTACTAC CGAGGCTCCG TCAAAGGCGG CTTTACCAT AGTCGCAGATA ACAGCAAAA CACCTGTAT CTGCAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATT CACTACACTC ACTCCGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTGCGG CAGGGCACC CTGTTTACTG TCTCGAGCG GTCGACCAA GGCCCCAGCG GTTCCCTCT GGCCCCAGC AGCAAGAGCA CCTTGCGCG AACAGCGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCC GAGCCCGTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGCGCTGCA CACCTTCCA GCCGTGCTCC AGAGCAGCG CCTGTACAGC CTGAGCAGC TCGTACCGT GCCCAGCAGC AGCTTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACACA AGCCAGCAA CACAAGGTG GACAGCGGG TGAACCCAA GAGCTGCGAC AAGACCCACA CTTGTCCCC CTGCTGCC CCTGAAGCGG AGGAGCCCC CTCCGTGTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCTG ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTGACCTG GTGGTGGTG AGCTGTCCA CGAGGACCTG GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGACGGC GTGGAAGTG ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACTACCGG GTGGTGTCC TGCTGACCTG GCTGACACAG GACTGGCTGA ACGGCAAGA GTACAAGTG AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCCGCG AGCCCCAGGT GTACACACTG CCCCCTAGCC GGGAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT CGTGAAGGGC TTTACCCCC GCGACATTG CGTGAATGG GAGAGCAAG GCCAGCCGA GAACAACTAC AAGACACCC CCCTGTGCT GGAACGAGC GGTCTATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACC GTGGACAAGA GCCGTGGCA GCAGGCAAC GTGTTAGCT GCTCCGTGAT GCACGAGGCC CTGCACAACC ACTACACCA GAAGTCCCTG AGCTTGAGCC CCGCAAG		

[0401]

가변 영역 쌍 명칭 Y022883					
프레임워크 Vh	YLAN_VH3-23				
프레임워크 Vi	YLAN_VL2-23				
HCDR1 (SEQ ID NO: 17)	RYAIS				
HCDR2 (SEQ ID NO: 18)	VISGHGSEANYAESVKG				
HCDR3 (SEQ ID NO: 5)	GFHYTHSGKRYYPFDI				
LCDR1 (SEQ ID NO: 7)	TGTSSDVGSYNLVS				
LCDR2 (SEQ ID NO: 8)	EGSKRPS				
LCDR3 (SEQ ID NO: 9)	SQYATFIAFAV				
단백질 서열 (VH) (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFSTRYAISWVRQAPGKGLEWVSVISGHGSEAN YAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQ GTLTVVSS				
단백질 서열 (VL) (SEQ ID NO: 6)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ				
Ppt 포맷	h_IgG1f_AEASS				
LC 단백질 (SEQ ID NO: 70)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAP SSTLFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS				
LC DNA (SEQ ID NO: 34)	CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCACT AGCTGCACCG GCACCCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG CATCCGGGCA AAGCCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAAACGCC GAGCGGCGTT AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCGCTG CAAGCGGAAG AGGAAGCCGA TTATTACTGC TCCCACTAGC CTACTTTCAT CGCTTTCCTG GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGCCAGC CCAAGCCGC CCCTAGCGTG ACCCTGTTCC CCCCAAGCAG CGAGGAAGCT CAGGCCAACA AGGCCACCTC CGTGTGCTG ATCAGCGACT TCTACCTGG CGCGGTGACC GTGGCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG AAGGCGGCGG TGGAAACAC CACCCCGAGC AAGCAGAGCA ACAACAATA CGCCGCGCAG AGCTACCTGA GCCTGACCCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTCCAGGTG ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAAAGACC GTGGCCCCCA CCGAGTGCAG C				
HC 단백질 (SEQ ID NO: 74)	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFSTRYAISWVRQAPGKGLEWVSVISGHGSEAN YAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQ GTLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDSKRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				
HC DNA (SEQ ID NO: 38)	GAAGTGCAGC TGCTGGAAAG CGGTGGCGGT CTGGTGAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCTG AGCTGTGCCG CAAGCGGGTT CTCTTCAAC AGATATGCAA TTCTCTGGGT GCGCCAAGCA CCAGGCCAAG GCCTGGAATG GGTGAGTGTG ATAAGCGGGC ATGGTTCGA GGCTAACTAC GCCGAGAGCG TCAAGGGTCG CTTTACCATT AGTCGCATA ACAGCAAAA CACCCTGTAT CTGCAAAATGA ACAGCCTGCG CGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATT CACTACACTC ACTCCGTAA AGTTTACTAC TATCCTTTTG ACATTGGGG CCAGGCGACC CTGGTTACTG TCTCGAGCG GTCCAGCAA GGCCCCAGCG TGTTCCCTCT GGCCCCAGC AGCAAGAGCA CCTCTGGCG AACAGCCGCC CTGGGTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC GAGCCCGTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTCCA GCCGTGCTCC AGAGCAGCGG CTTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCCAGCAGC AGCCTGGGCA CCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACACA AGCCAGCAA CACAAGGTG GACAGCGGG TGGAAACCAA GAGCTGCGAC AAGACCCACA CTGTCCCCC CTGCCCTGCC CCTGAAGCGG AGGAGAGCCC CTCCGTGTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCTG ATGATCAGCC GGACCCCCA AGTGACCTGC GTGGTGTGG ACGTGTCCA CGAGACCTC GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGACGCG GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACTACCGG GTGGTGTCCG TGCTGACCGT GCTGCACCG GACTGGCTGA ACGGCAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCTCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCCGCG AGCCCCAGGT GTACACCTG CCCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT CGTGAAGGGC TTCTACCCCA GCGACATTGC CGTGAATGG GAGAGCAACG GCAGCCCGA GAACTACTAC AAGACACCC CCCCTGTGCT GACAGCGAC GGCTCATTCT TCTGTACAG CAAGCTGACC GTGACAAAG GCGGTGGCA GCAGGGCAAC GTGTTCACT GCTCCGTGAT GCACGAGCC CTGCACAACT ACTACCCCA GAAGTCCCTG AGCTGAGCC CCGCAAG				

[0402]

[0403] 표 24: 서열 목록 핵심

SEQ ID NO:	설명어	서열
1	야생형 인간 PAR2	MRSPSAAWLLGAALLAASISCSGTIGQTNRSSKGRSLGKVDGTSHTGKGVTVETV/PSYDEFSASVLTGKLTTFVLPVYTVFVGLPSNGMALWVFLRFTKKKHPAVYVMANLALADLSYVWFLKIAVHIGNNWYGEALCNVLI GFYGNMYCSILFMTCLSVQRWV/VNPMGHSRKKANIAIGISLAIMWLLLVTPLVVKKQTFIPALNTTCHDYLP EQLLVGD MFNFSLAIGVFLPAFLTASAVVLMIRMLRSSAMDENSEKKRRAKLVTVLAMYLI CFTPSNILLVHYFLKSGQSHYVALCLSTLNSCIDPFVYVYFVSHDFRDHAKNALLCRSV/RTVKMQVSLTSKKHSRKS9YSS5STTVKTSY
2	클론 Y022065의 VH 영역	표 20 참조
3	카바트에 따른 클론 Y022065의 HCDR1 영역	표 20 참조
4	카바트에 따른 클론 Y022065의 HCDR2 영역	표 20 참조
5	카바트에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 HCDR3 영역	표 20-23 참조
6	클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 VL 영역	표 20-23 참조
7	카바트에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LCDR1 영역	표 20-23 참조
8	카바트에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LCDR2 영역	표 20-23 참조
9	카바트에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LCDR3 영역	표 20-23 참조
10	클론 Y022870의 VH 영역	표 21 참조
11	카바트에 따른 클론 Y022870의 HCDR1 영역	표 21 참조

표 24: 서열 목록 설명표

12	카바트에 따른 클론 Y022870의 HCDR2 영역	표 21 참조
13	클론 Y022877의 VH 영역	표 22 참조
14	카바트에 따른 클론 Y022877의 HCDR1 영역	표 22 참조
15	카바트에 따른 클론 Y022877의 HCDR2 영역	표 22 참조
16	클론 Y022883의 VH 영역	표 23 참조
17	카바트에 따른 클론 Y022883의 HCDR1 영역	표 23 참조
18	카바트에 따른 클론 Y022883의 HCDR2 영역	표 23 참조
19	클론 Y022054의 VH 영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCASGFTSSYASVWVQAPGKGLEWVSASISGSGSTYYAESYKGRFTISRDN SKNTLYIQMINSIRAEDTAVYYCA RGYAEFGVWGGGLTVYSS SYAIS
20	카바트에 따른 클론 Y022054의 HCDR1 영역	AISGSGSTYYAESVKG
21	카바트에 따른 클론 Y022054의 HCDR2 영역	GYAEFGV
22	클론 Y022054의 VL 영역	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTTTCRASQISSYLNNWYQQRPGAKPLLVAASSLDSGVPSTRFSGSGTDFTLTSSIQPEDFATYYCOQTWGGPQTF GGGTVEIKRT RASQSISSYLIN
23	카바트에 따른 클론 Y022054의 LCDR1 영역	AASSLDS
24	카바트에 따른 클론 Y022054의 LCDR2 영역	QQTWGGPQT
25	클론 Y021171의 VH 영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCASGFTSSYINWVQAPGKGLEWVSISISSSTYYAESYKGRFTISRDNKNSLYIQMINSIRAEDTAVYYCA RAASGFAIFDWWGQGLTVYSS SYSIN
26	카바트에 따른 클론 Y021171의 HCDR1 영역	SISSSSSTYYAESVKG
27	카바트에 따른 클론 Y021171의 HCDR2 영역	
28	카바트에 따른 클론 Y021171의 HCDR3 영역	
29	카바트에 따른 클론 Y021171의 HCDR2 영역	

30	카바트에 따른 클론. Y021171의 HCDR3 영역	AASGFAlFDY
31	클론 Y021171의 VL 영역	DIQMTQSPSSVSASVGDRAVTTTCRAASQISSWLAWYQOKPGKAPKLLVAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQT HWPLTF GGGTVEIKRT
32	카바트에 따른 클론 Y021171의 LCDR1 영역	RASQGISSWLA
33	카바트에 따른 클론 Y021171의 LCDR3 영역	QQT HWPLT
34	Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LC 뉴클레오타이드 서열	표 20-23 참조
35	Y022065의 HC 뉴클레오타이드 서열	표 20 참조
36	Y022870의 HC 뉴클레오타이드 서열	표 21 참조
37	Y022877의 HC 뉴클레오타이드 서열	표 22 참조
38	Y022883의 HC 뉴클레오타이드 서열	표 23 참조
39	인간 PAR2 활성화된 펩티드	SLIGKV
40	무인 PAR2 활성화된 펩티드	SLIGRL
41	N-말단을 포함하는 PAR2 에피토프 서열 1	VEIVF
42	헬릭스0/1을 포함하는 PAR2 에피토프 서열 2	SVDEFASVLTGKLTTF
43	EC13을 포함하는 PAR2 에피토프 서열 3	LLWHV
44	EC13을 포함하는 PAR2 에피토프 서열 4	FLUKSQGSHVYALV
45	PAR2 N-말단 영역	VTVETVFSVDEFASVLTGKLTIV
46	코티아에 따른 클론 Y022065의 HCDR1 영역	GFTFSY
47	코티아에 따른 클론	SGSGGS

	Y022065의 HCDR2 영역	
48	코터이에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 HCDR3 영역	GFTHTHSGKRYYPFDI
49	코터이에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LCDR1 영역	TSDDVGSYNL
50	코터이에 따른 클론 Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LCDR3 영역	YATIAFA
51	코터이에 따른 클론 Y022870의 HCDR1 영역	GFSFSRY
52	코터이에 따른 클론 Y022870의 HCDR2 영역	SALGLE
53	코터이에 따른 클론 Y022870의 HCDR1 영역	GFTFSRY
54	코터이에 따른 클론 Y022870의 HCDR2 영역	SGLGQE
55	코터이에 따른 클론 Y022883의 HCDR1 영역	GFSFTRY
56	코터이에 따른 클론 Y022883의 HCDR2 영역	SGHGSE
57	코터이에 따른 클론 Y022054의 HCDR1 영역	GFTFSY
58	코터이에 따른 클론 Y022054의 HCDR2 영역	SGSGGS
59	코터이에 따른 클론 Y022054의 HCDR3 영역	GVAEFGV
60	코터이에 따른 클론 Y022054의 LCDR1 영역	SQSISY
61	코터이에 따른 클론 Y022054의 LCDR3 영역	WGGPQ
62	코터이에 따른 클론 Y021171의 HCDR1 영역	GFTFSY

63	코터이에 따른 클론 Y021171의 HCDR2 영역	SSSSSY
64	코터이에 따른 클론 Y021171의 HCDR3 영역	AASGFAIFDY
65	코터이에 따른 클론 Y021171의 LCDR1 영역	SQGISSW
66	코터이에 따른 클론 Y021171의 LCDR3 영역	HWPL
67	아생형 인간 PAR 1	MGPRRLVLAACSLGPILSARTRARPEKATNATIDPPSFLRPNNDKYEPEWEDEEKNESGLTEYRLVSNKSSPLQKQLPAFISEDASGYLTSS WLTLEVPSTYGVFVVSPLNMAIVFLMKMKYKPAVVMHLATADVLFVSVLPFKISYFSGSDWQFGSELCRVTAAFCNMVYSILLMTVTSI DRFLAVVYPMQOSLWRTIGRASFTCLAWMALAGVVP LLKEQTQVPGILNTTCHDVLNETLLEGVYAYTFSAFSAFFFPUISTVCVYSIRQLSSS AVANSKSKRALFLSAVCFIIFCGPTNNVLLAHYSFHSHTSTTEAAVFAVLLCVCSYSICQIDPLVYASSECQRVYSILCKESSDPSYVNSGQLM ASKMDTCSSNLNNSYKLLT
68	아생형 인간 PAR 3	MKALIFAAAGLLLLLPTFCQSGMENDTNNLAKPTLPKTRRGAPPNVSFEFPFSALEGWGTGATTVKIKCPESASHLVKNATMGVLTSSLTKLPAL YLVFVWGVPANAATVLMMLFFRTSICITTFYTNLAADFLFCVTLPEFKAYHLNGNNWVFGELCRATTVIFGNMVCISILLACISINRYLAIVHPFT YRGLPKHTYALVTGLVWATVELVMLPEFLKEQYIVQPDITGCHDVHNTCESSPEQLYFISLAFFGFLIPEVLIIYCAAIIRTLNAYDHRWILWYVK ASLLIVTICFAPSNIILIHNAVYNNVDGLFYIALCLGSLNSCLDPEVFLMSKTRNHSTAVLTK
69	아생형 인간 PAR 4	MMGRLLWPLVILGFSLSGGTOTPSYVDESSTGGDDSTPSILPAPRGVPGQVCANDSDTLELPDSSRALLLGWVPTRLPALYGLVLVWGLPAN GIALWVATQAPRLPSTMLMNLAAADLLALALPRLAYHLRGQRWPFGEAAGRATATYGHMYSVLLAANVSLDRYLAIVHPLAARALRGR RLAIGLCMAAWLMAALALPLTIQRQTFRLARSDRYLCHDALPLDAQASHWQPAFTCLALLGFLPLAMLLCVGATLHTLAASGRYGHALRLT AVVLASAVAFVPSNILLHLHSDPSAWGNLIGAVPSLALSTLNSCVDPFIYVYSAEFRDKVRAGLFORSPGDTVASKASAEGSGRMGTSS LLQ
70	Y022065, Y022870, Y022877 및 Y022883의 LC 아미노산 서열	표 20-23 참조
71	Y022065의 HC 아미노산 서열	표 20 참조
72	Y022870의 HC 아미노산 서열	표 21 참조
73	Y022877의 HC 아미노산 서열	표 22 참조
74	Y022883의 HC 아미노산 서열	표 23 참조

참고문헌

- Abbas, A., Lichtman, A. and Pillai, S., 2000. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed.
- Allen L.V. 2008. *The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding*, Third Edition.
- Amadesi, S., Cottrell, G.S., Divino, L., Chapman, K., Grady, E.F., Bautista, F., Karanjia, R., Barajas-Lopez, C., Vanner, S., Vergnolle, N. and Bunnett, N.W. 2006. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C ϵ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J.Physiol*, 575(2), pp.555–571.
- Amiable, N., Tat, S., Lajeunesse, D., Duval, N., Pelletier, J., Martel-Pelletier, J. and Boileau, C., 2009. Proteinase-activated receptor (PAR)-2 activation impacts bone resorptive properties of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone*, 44(6), pp.1143-1150.
- Ausubel, F., 1987. *Current protocols in molecular biology*.
- Banerjee, S., Huber, T. and Sakmar, T., 2008. Rapid Incorporation of Functional Rhodopsin into Nanoscale Apolipoprotein Bound Bilayer (NABB) Particles. *Journal of Molecular Biology*, 377(4), pp.1067-1081.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M.Science. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877), pp. 423-6.
- Cheng, R., Fiez-Vandal, C., Schlenker, O., Edman, K., Aggeler, B., Brown, D., Brown, G., Cooke, R., Dumelin, C., Doré, A., Geschwindner, S., Grebner, C., Hermansson, N., Jazayeri, A., Johansson, P., Leong, L., Prihandoko, R., Rappas, M., Soutter, H., Snijder, A., Sundström, L., Tehan, B., Thornton, P., Troast, D., Wiggan, G., Zhukov, A., Marshall, F. and Dekker, N., 2017. Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2. *Nature*, 545(7652), pp.112-115.
- Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. 2007. *Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain*. *J Clin Invest*. 117(7), pp 1979-87.
- Frese, K., Eisenmann, M.; Ostendorp, R.; Brocks, B.; Pabst, S. 2013. An automated immunoassay for early specificity profiling of antibodies. *mAbs* 5(2), pp. 279–287
- Gawinowicz, M. A., Merlini, G., Birken, S., Osserman, E. F., Kabat, E. A. 1991. Amino acid sequence of the FV region of a human monoclonal IgM (NOV) with specificity for the capsular polysaccharide of the group B meningococcus and of Escherichia coli K1, which cross-reacts with polynucleotides and with denatured DNA. *J Immunol* 147(3), pp. 915–920.
- Giblin P, Boxhammer R, Desai S, Kroe-Barrett R, Hansen G, Ksiazek J, Panzenbeck M, Ralph K, Schwartz R, Zimmitti C, Pracht C, Miller S, Magram J, Litzenburger T. 2011. Fully human antibodies against the Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) with anti-inflammatory activity. *Hum Antibodies*. 20(3-4):83-94.

[0409]

Hamilton JR, Trejo J. 2017. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 57, pp. 349-373.

Hawkins, R. E.; Russell, S. J.; Winter, G. 1992: Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J.Mol.Biol.* 226(3), pp. 889-896.

Helamo, D., Delil, R. and Dileba, T. 2017. Trends of diabetes mellitus and hypertension at Nigist Eleni Mohammed General Hospital, Hossana, Ethiopia (December 2010-January 2014): a five year longitudinal study. *Safety in Health*, 3(1).

Heuberger, D. and Schuepbach, R., 2019. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis Journal*, 17(4).

Huston, J., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M., Novotny, J., Margolies, M., Ridge, R., Brucoleri, R., Haber, E. and Crea, R., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(16), pp.5879-5883.

Hutchison, C., Phillips, S., Edgell, M., Gillam, S., Jahnke, P. and Smith, M., 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 253(18), pp.6551-6560.

Kagota S, Maruyama K, McGuire JJ. 2016. Characterization and Functions of Protease-Activated Receptor 2 in Obesity, Diabetes, and Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2016:3130496

Lindner, J., Kahn, M., Coughlin, S., Sambrano, G., Schauble, E., Bernstein, D., Foy, D., Hafezi-Moghadam, A. and Ley, K., 2000. Delayed Onset of Inflammation in Protease-Activated Receptor-2-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 165(11), pp.6504-6510.

Lohman RJ, Cotterell AJ, Barry GD, Liu L, Suen JY, Vesey DA, Fairlie DP. 2012. An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. *FASEB J.* 26(7), pp. 2877-87.

Lohning, C. Novel methods for displaying (poly)peptides/ proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. Applied for by MorphoSys AG. Patent no. WO 01/05950 A2

Low, N. M.; Hollinger, P.; Winter, G. (1996): Mimicking Somatic Hypermutation: Affinity maturation of Antibodies Displayed on Bacteriophage Using a Bacterial Mutator Strain. *J.Mol.Biol.* 260(3), pp. 359-368.

Mrozkova P, Palecek J, Spicarova D. 2016. The role of protease-activated receptor type 2 in nociceptive signaling and pain. *Physiol Res.* 65(3), pp. 357-67.

Prassler, J., Steidl, S., Urlinger, S. 2009. In vitro affinity maturation of HuCAL antibodies: complementarity determining region exchange and RapMAT technology. *Immunotherapy* 1 (4), pp. 571-583.

[0410]

Rice, A.S.C., Smith, B.H. and Blyth, F.M. 2016. Pain and the global burden of disease. *PAIN*, 157(4), pp.791-796.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. and Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), pp.1350-1354.

Smith, G., Summers, M. and Fraser, M., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, 3(12), pp.2156-2165.

Taylor, L., Carmack, C., Schramm, S., Mashayekh, R., Higgins, K., Kuo, C., Woodhouse, C., Kay, R. and Lonberg, N., 1992. A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Research*, 20(23), pp.6287-6295.

Tiller T, Schuster I, Deppe D, Siegers K, Strohn R, Herrmann T, Berenguer M, Poujol D, Stehle J, Stark Y, Heßling M, Daubert D, Felderer K, Kaden S, Kölln J, Enzelberger M, Urlinger S. 2013. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MAbs*. 5(3), pp. 445-70.

Van den Brulle J, Fischer M, Langmann T, Horn G, Waldmann T, Arnold S, Fuhrmann M, Schatz O, O'Connell T, O'Connell D, Auckenthaler A, Schwer H. 2008. A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques*. 45(3), pp.340-3.

Wagner F, Lange CF, Nowak M, Ignatenko S. 2014. FRI0315 First Human Dose of the Anti-C5a Receptor-Targeting, Human Monoclonal Antibody NNC0215-0384 in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Phase 1, Randomised, Double-Blind, Single-Dose, Dose-Escalation Trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(Supplement 2), abstract FRI0315. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-eular.2156>

Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, Narahara S, Sugiuchi H, Yamaguchi Y. 2016. Neutrophil elastase enhances IL-12p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via transactivation of the PAR-2/EGFR/TLR4 signaling pathway. *Blood Cells Mol Dis*. 59, pp.1-7.

Yau MK, Liu L, Fairlie DP. 2013. Toward drugs for protease-activated receptor 2 (PAR2). *J Med Chem*. 56(19), pp. 7477-97.

Yau MK, Lim J, Liu L, Fairlie DP. 2016. Protease activated receptor 2 (PAR2) modulators: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther. Pat*. 26(4), pp. 471-83.

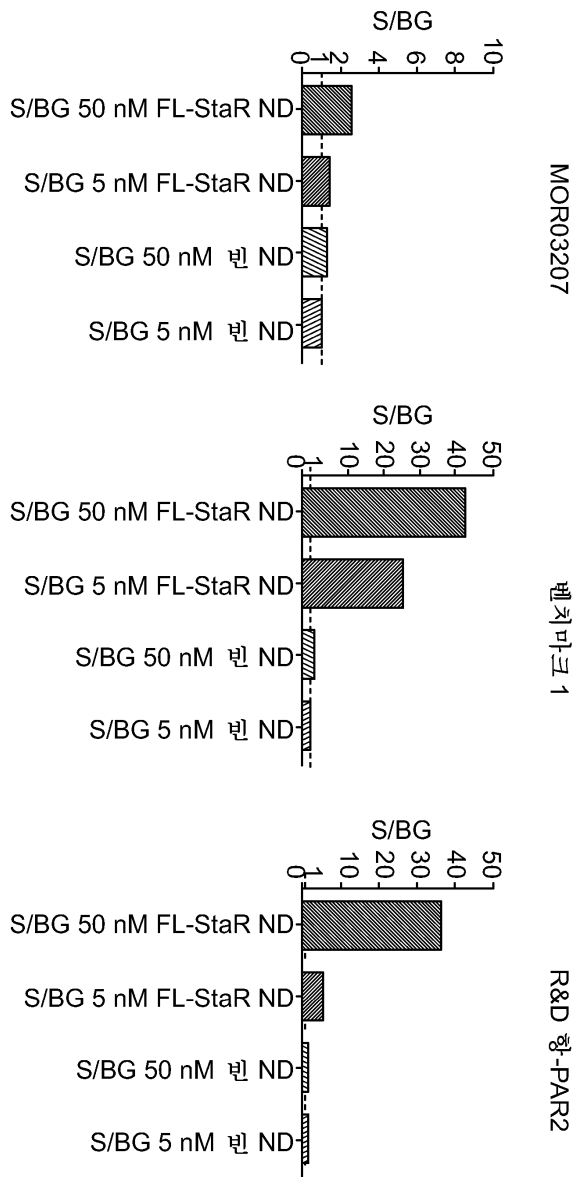
[0411]

[0412]

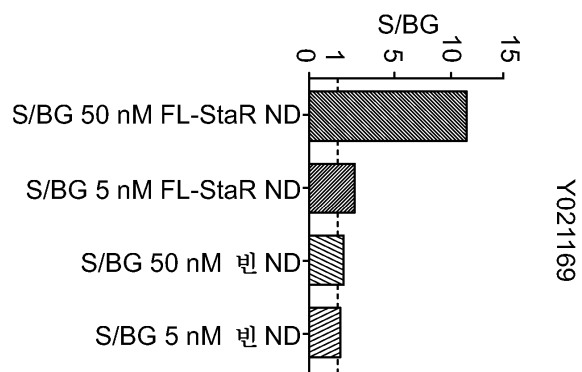
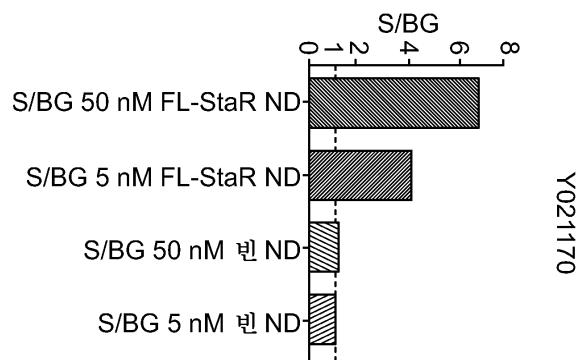
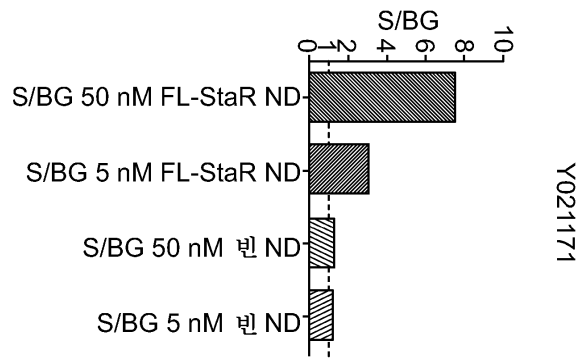
본 발명은 본원에 기재된 구체적인 측면에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 기재된 것들 외에도 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 본 발명의 다양한 변형이 관련 기술분야의 기술자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다. 본원에 인용된 모든 참고문헌 (예를 들어, 공보 또는 특허 또는 특허 출원)은 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

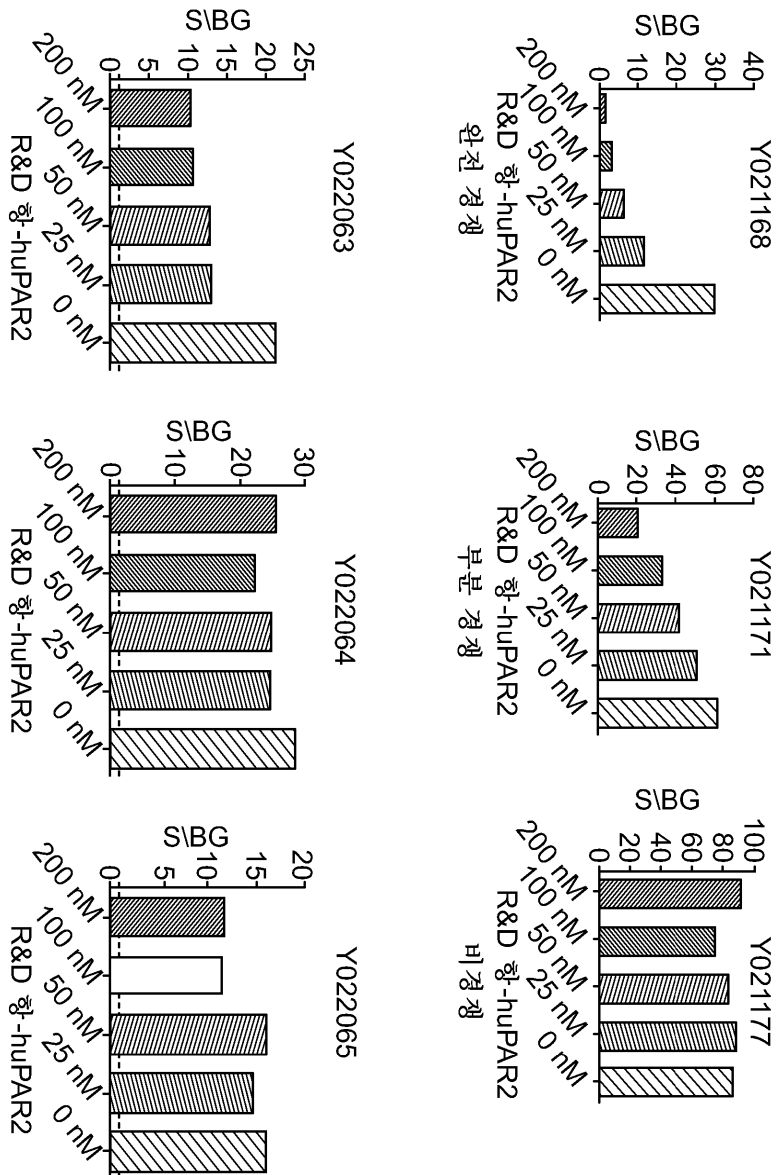
도면1i



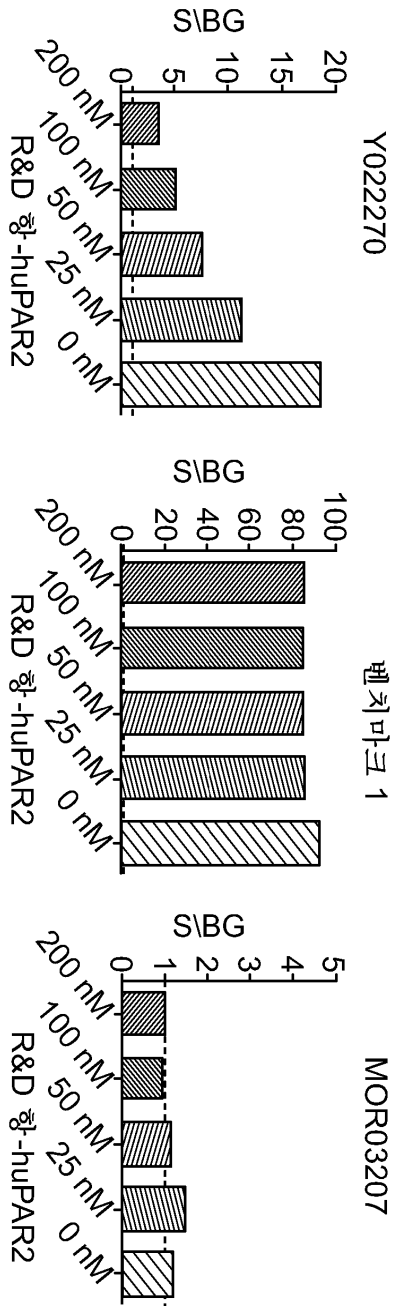
도면1ii



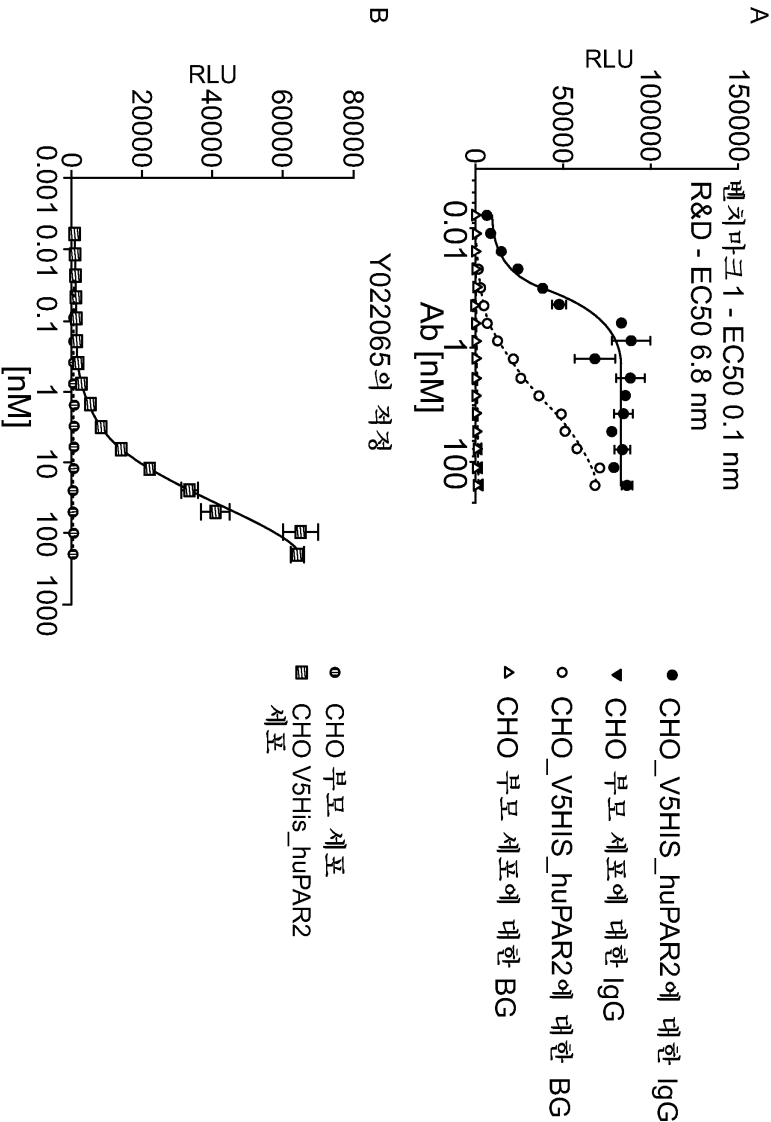
도면2i



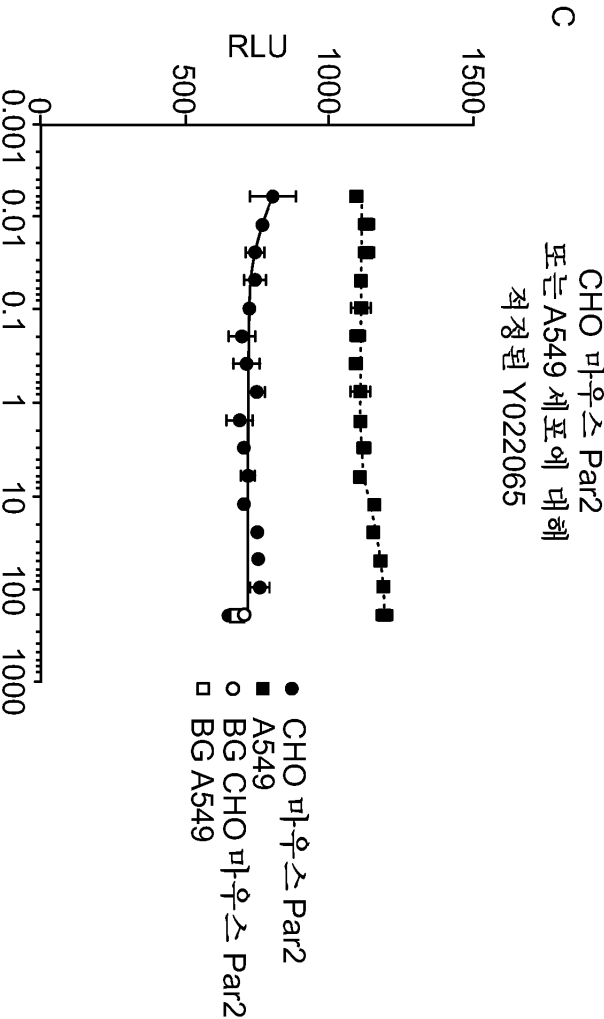
도면2ii



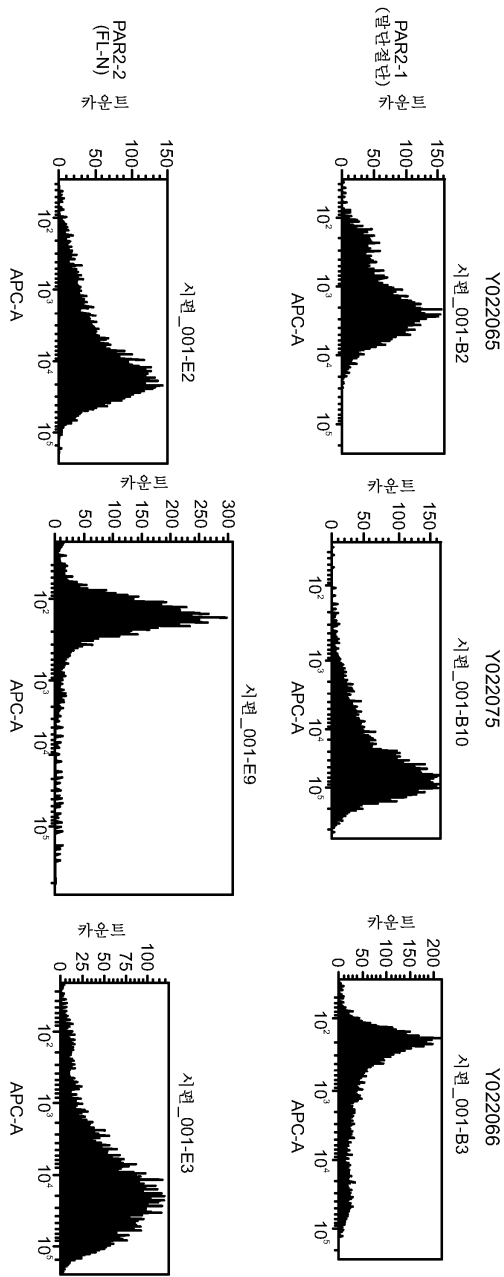
도면3i



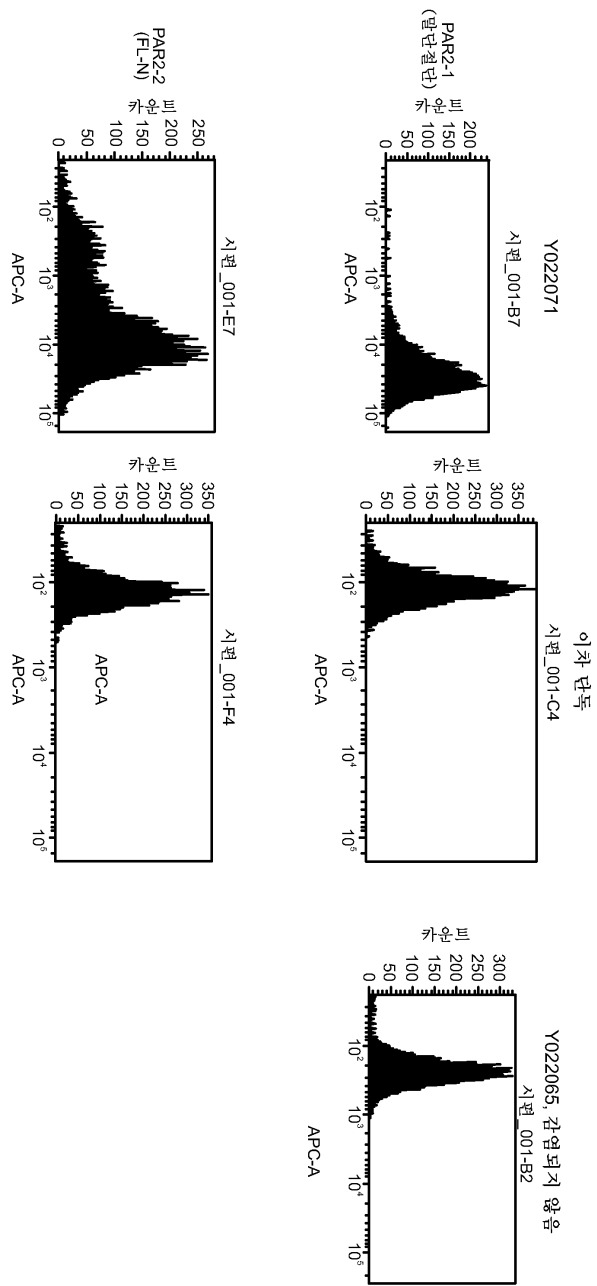
도면3ii



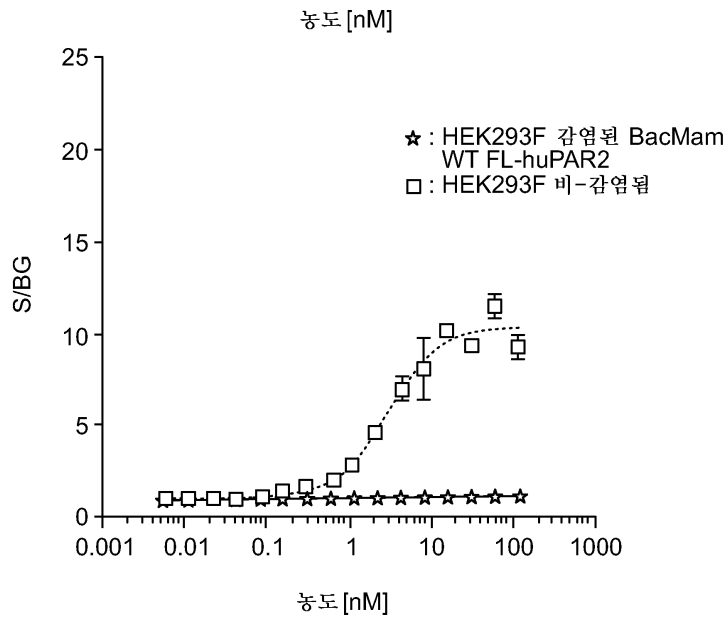
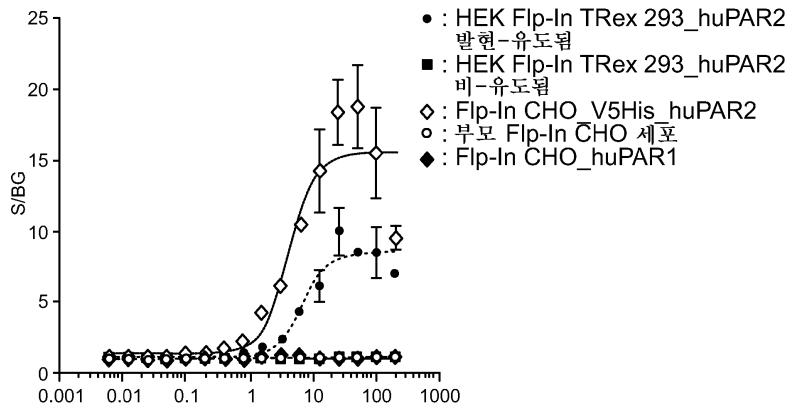
도면4i



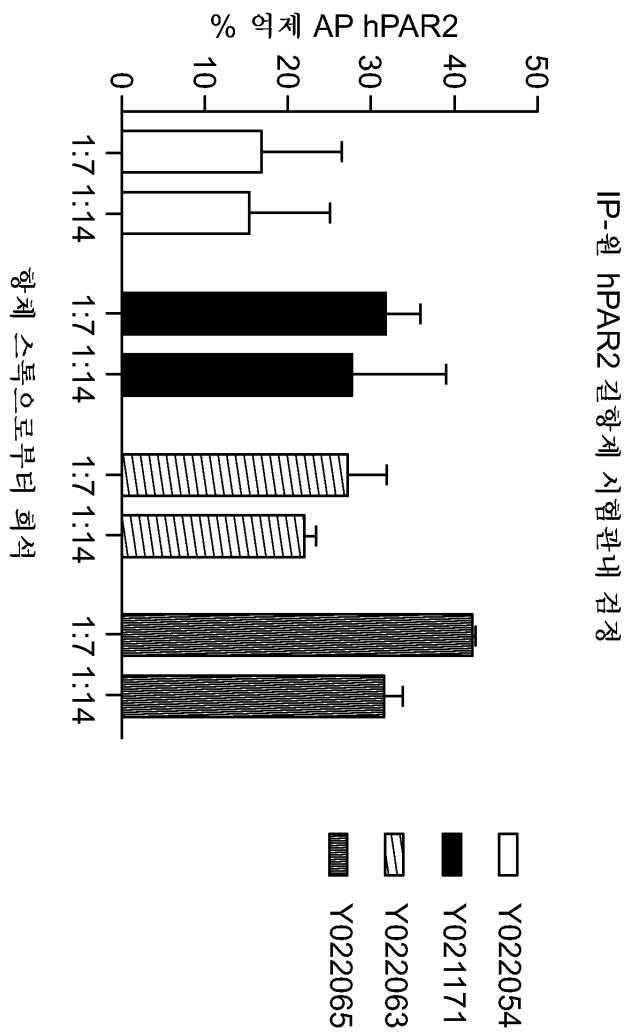
도면4ii



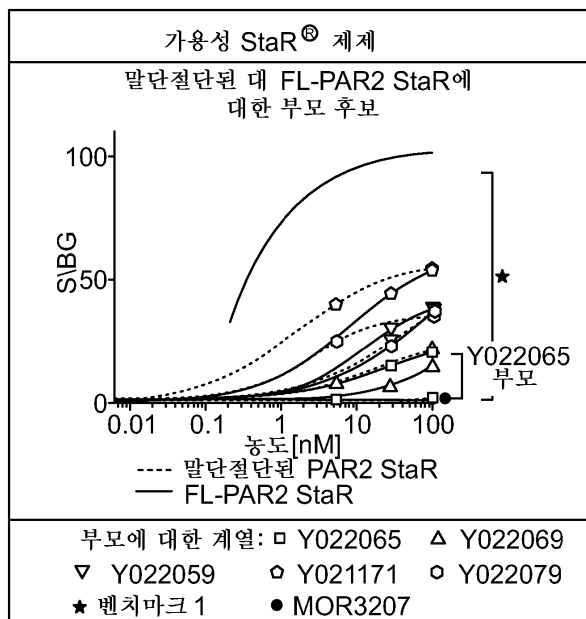
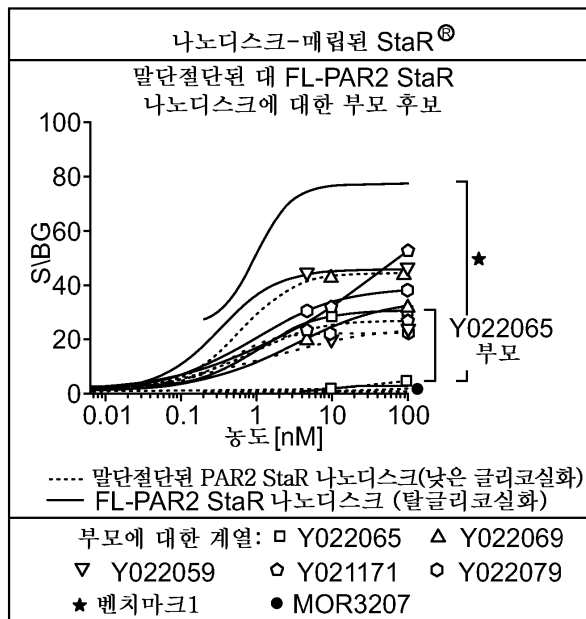
도면5



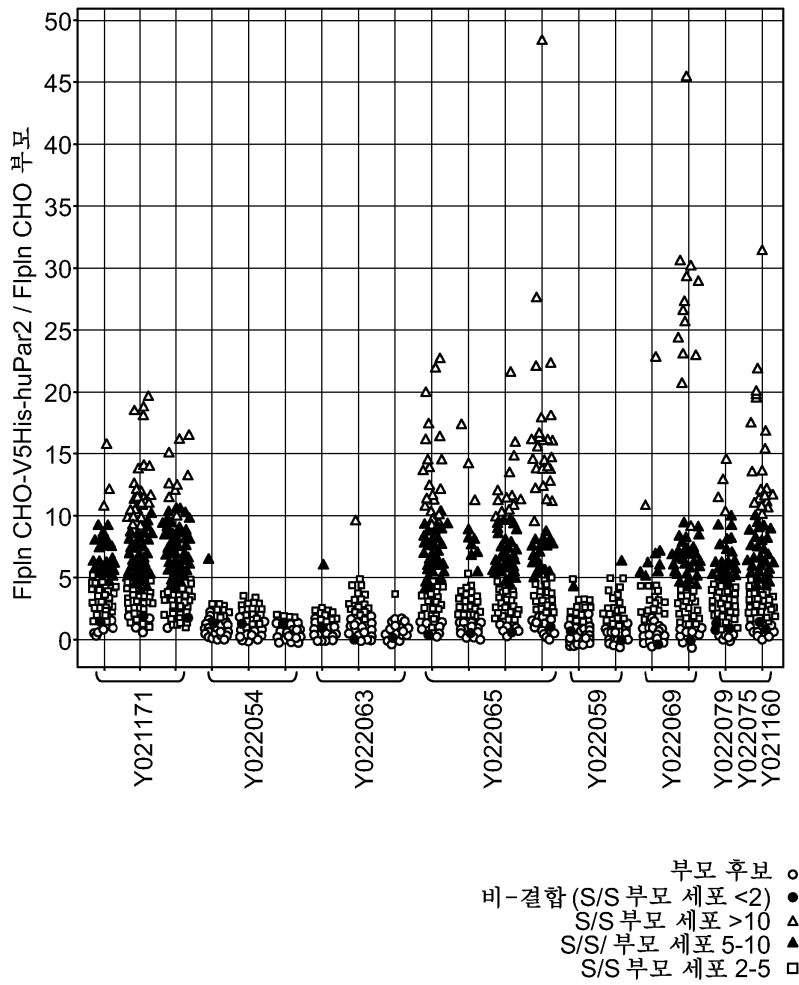
도면6



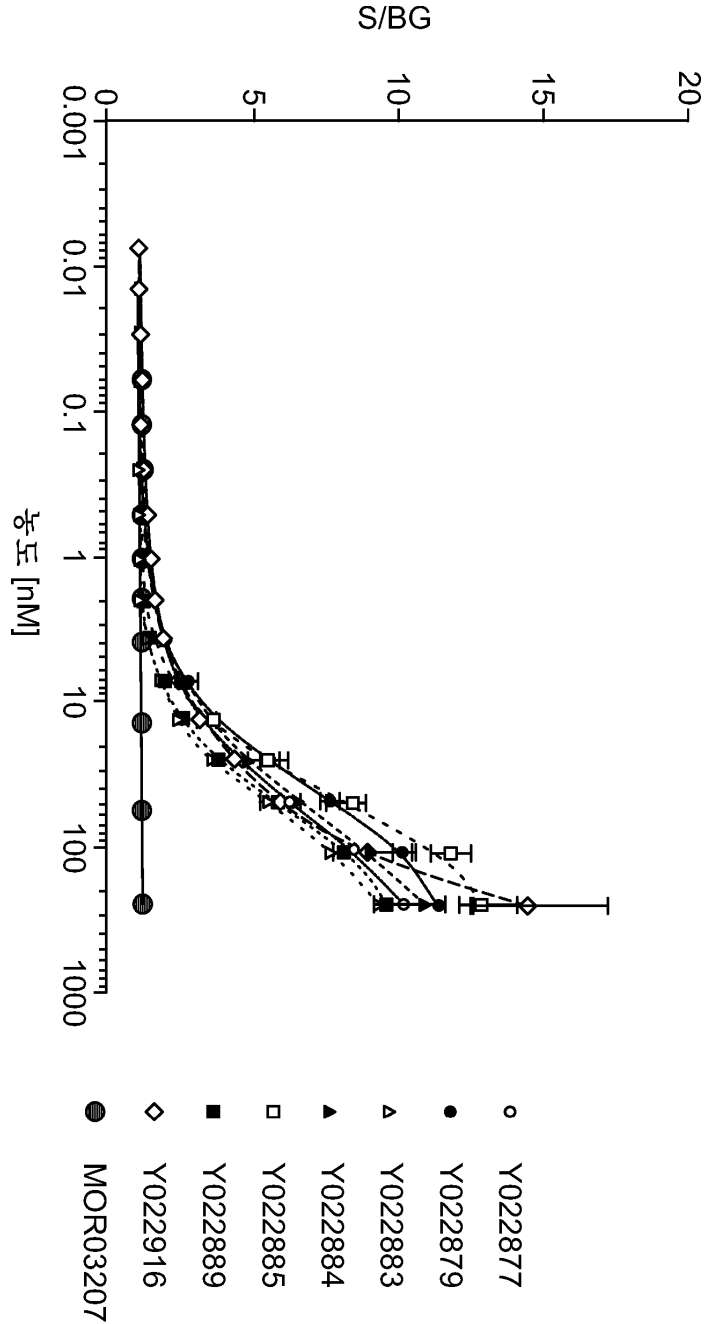
도면7



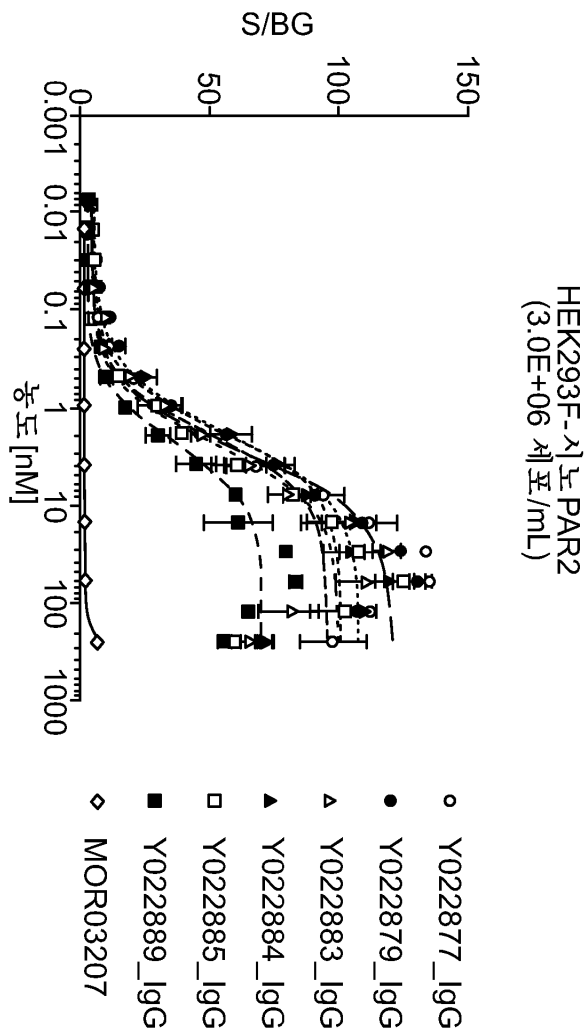
도면8



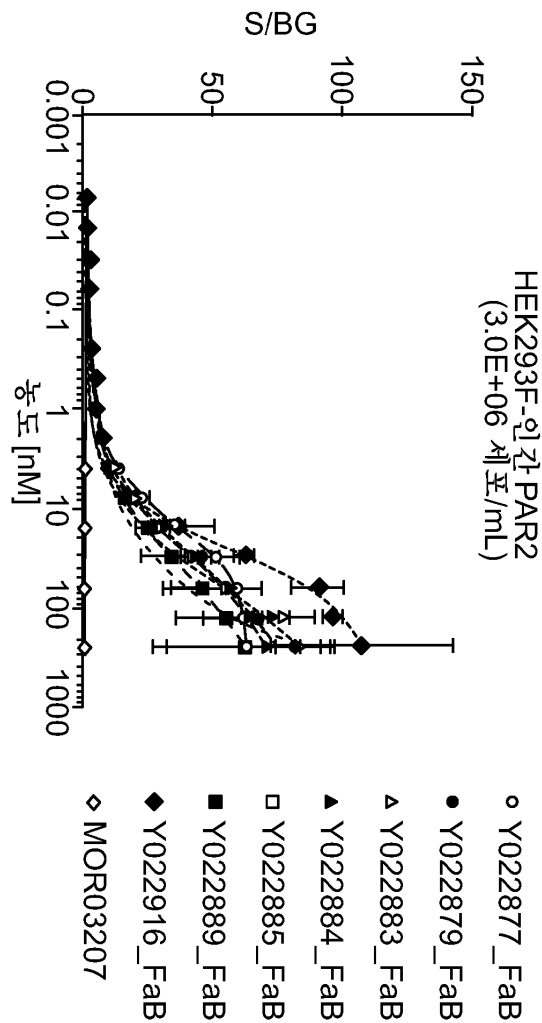
도면9



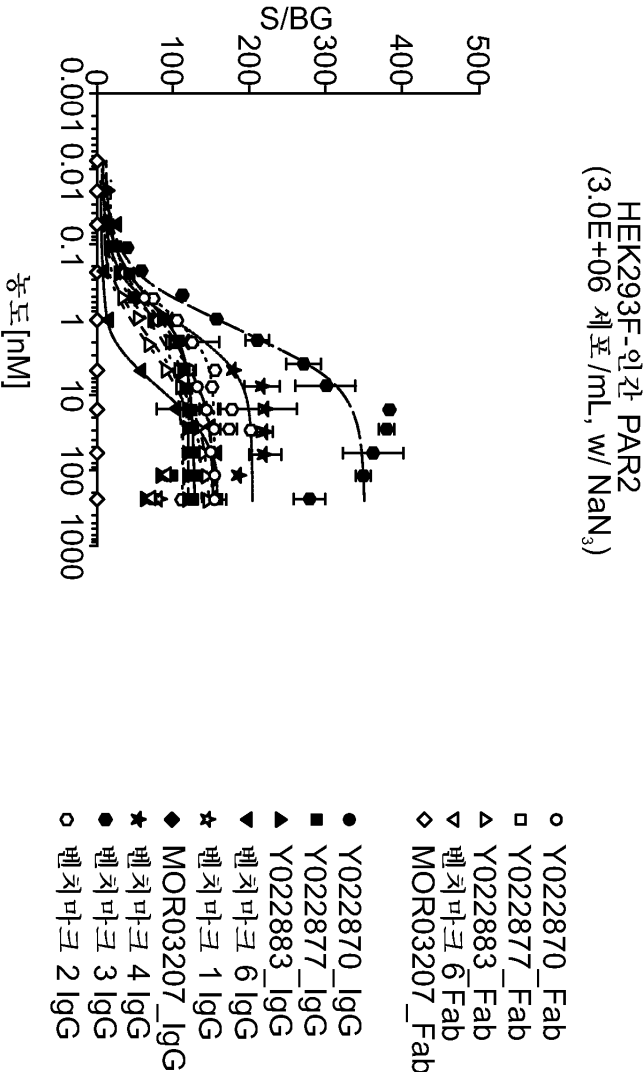
도면10i



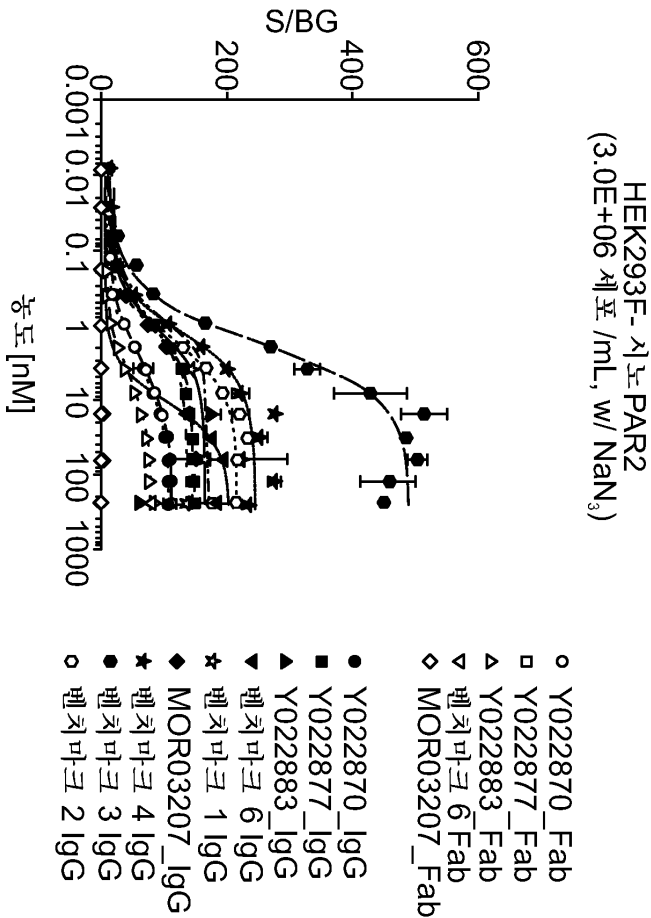
도면10ii



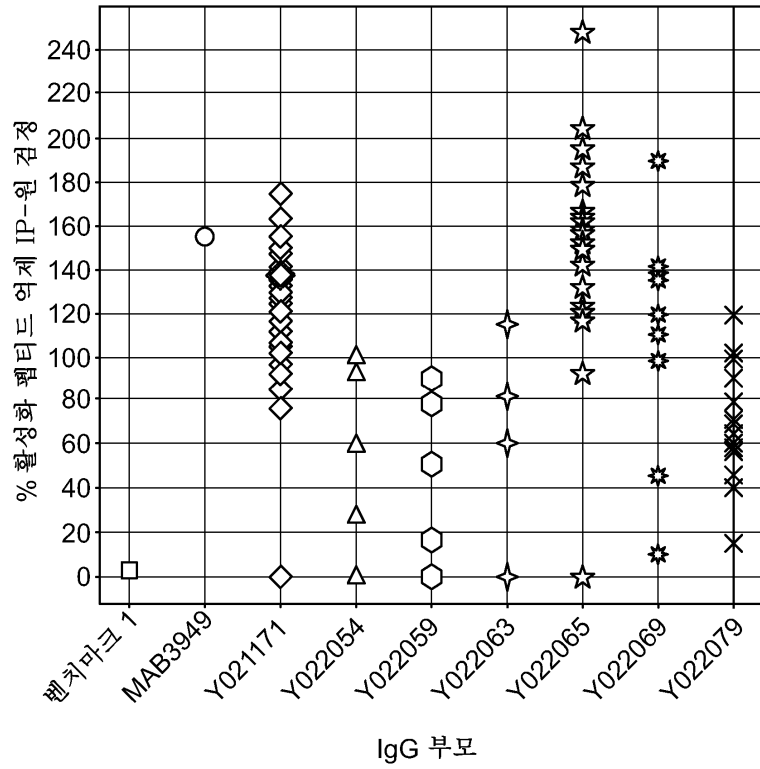
도면11i



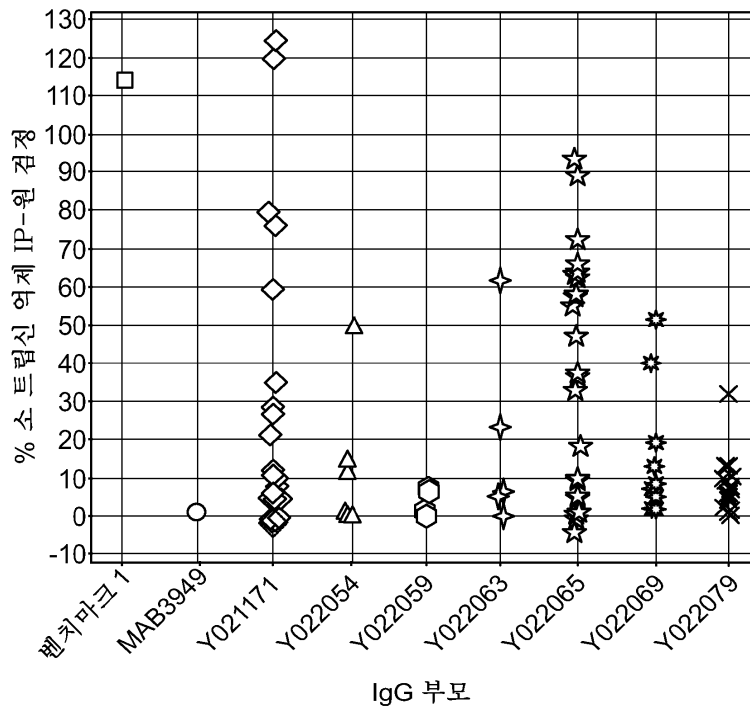
도면11ii



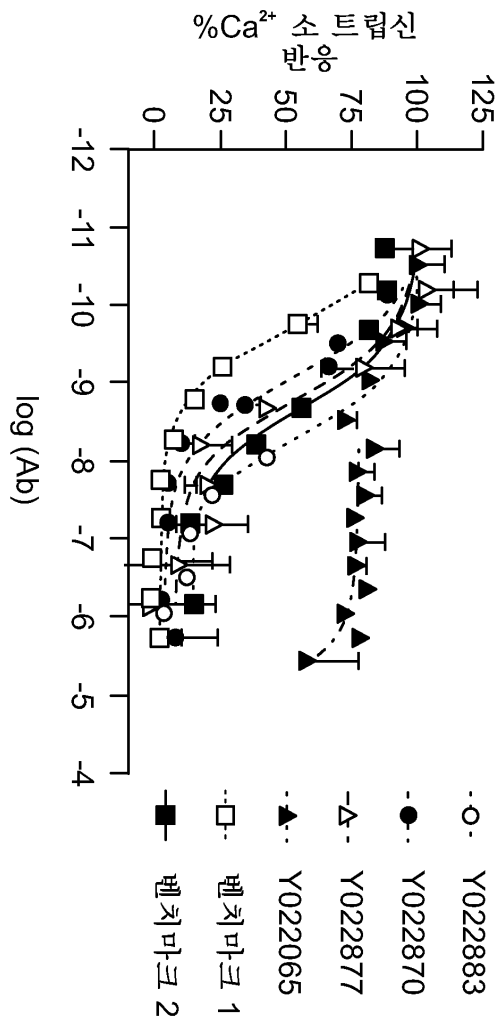
도면12



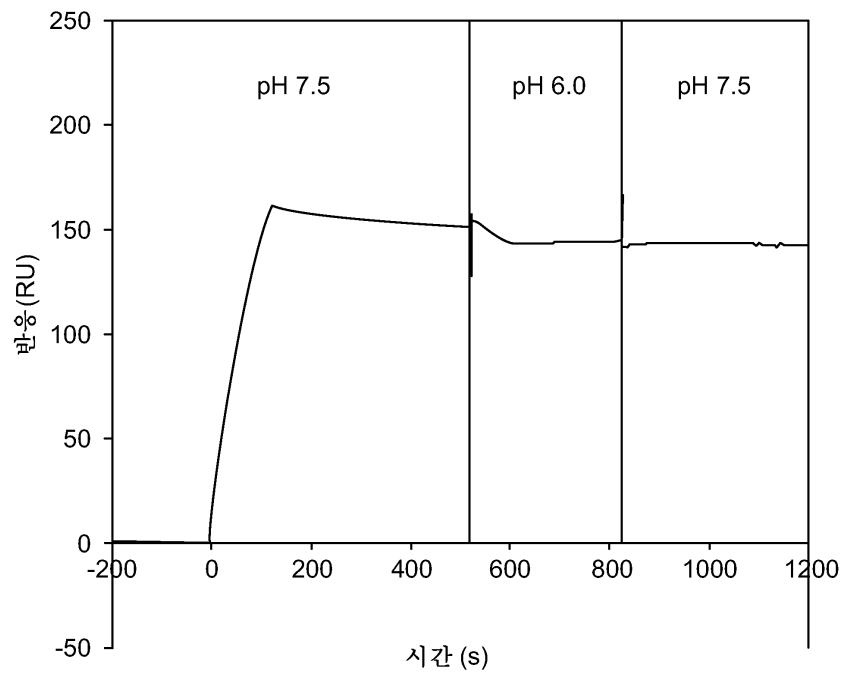
도면13



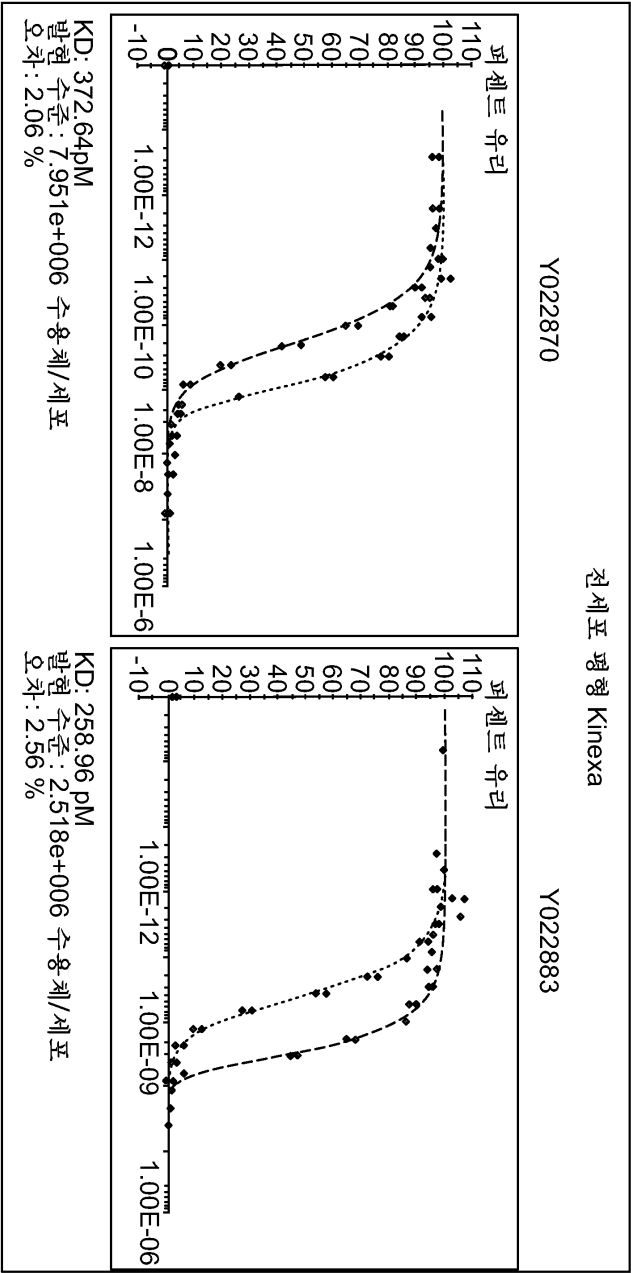
도면14



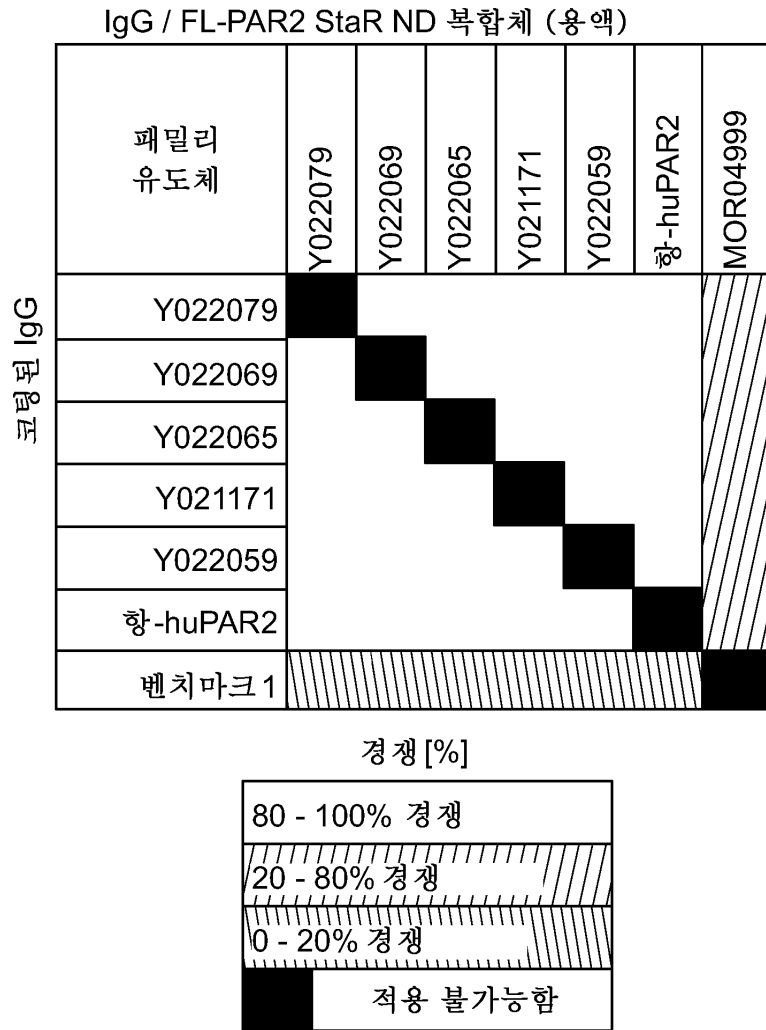
도면15



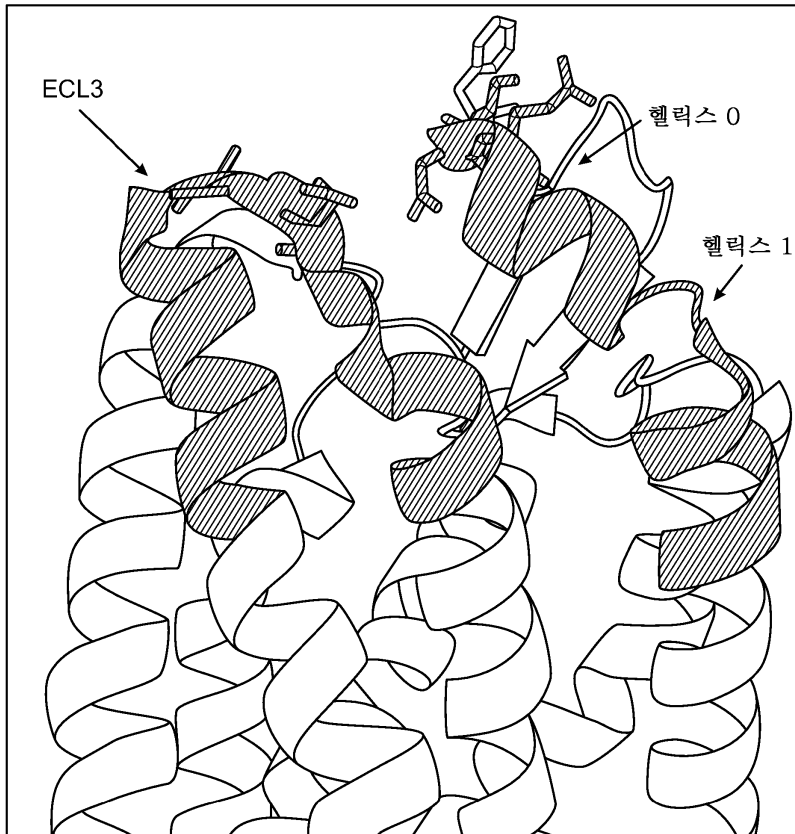
도면16



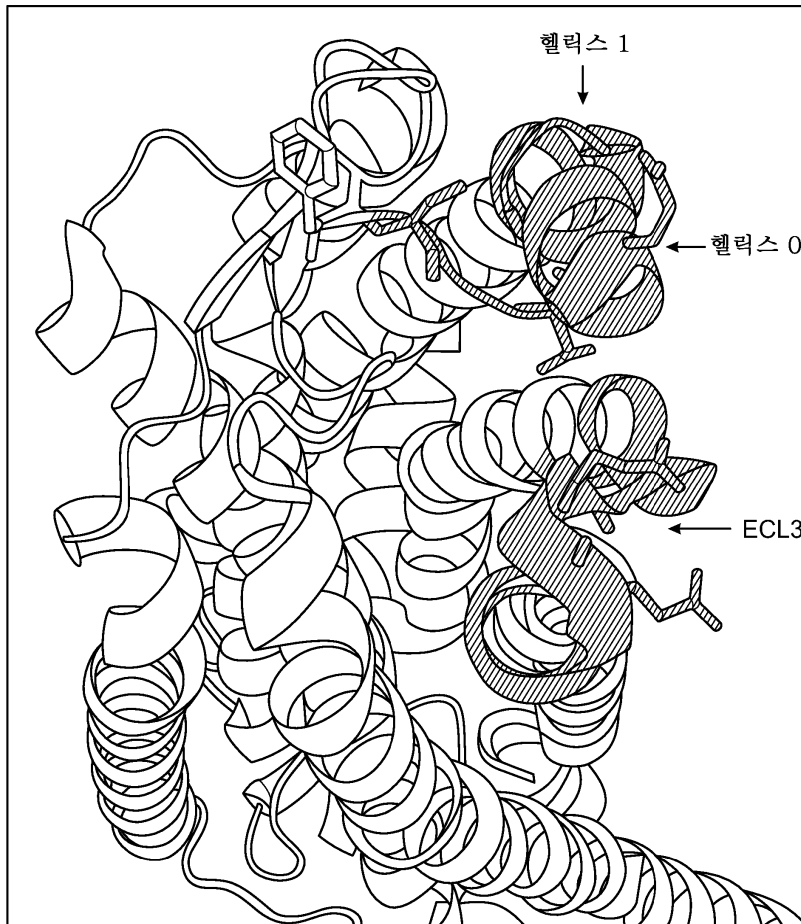
도면17



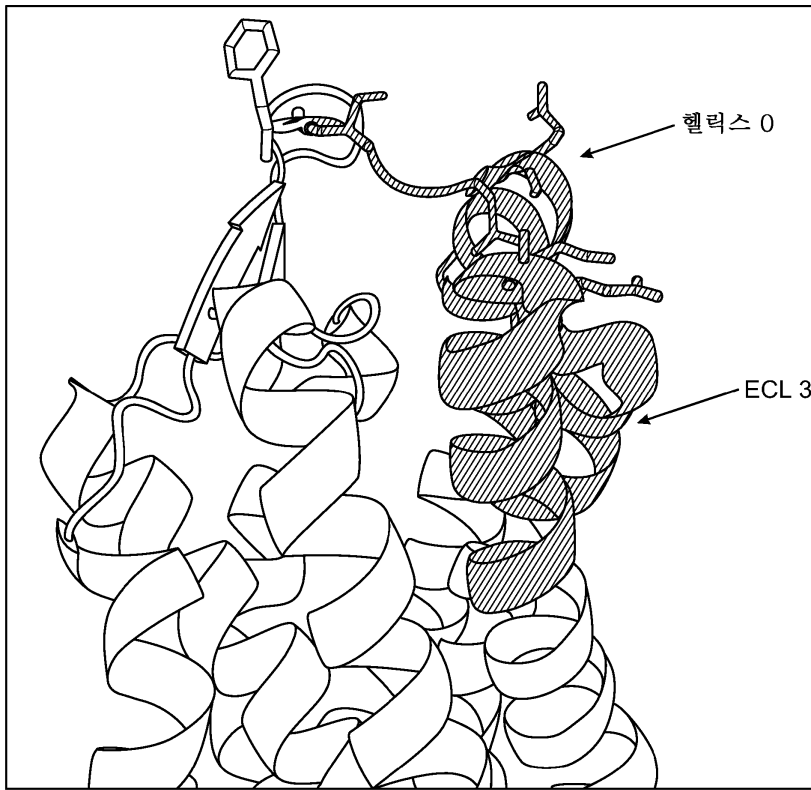
도면18



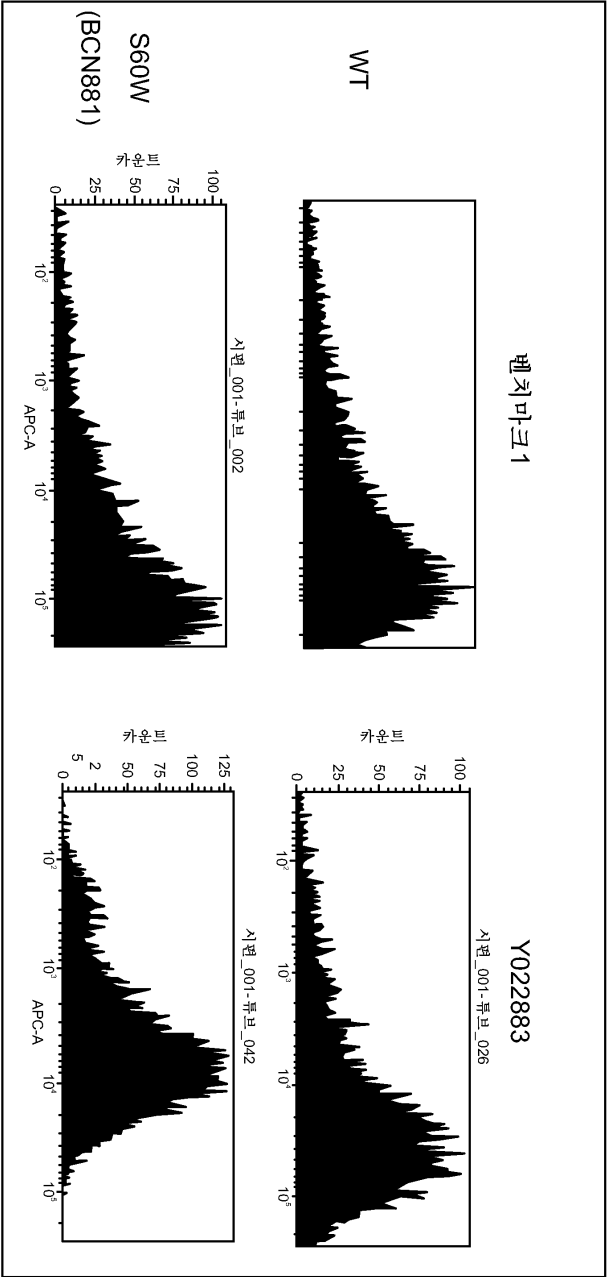
도면19



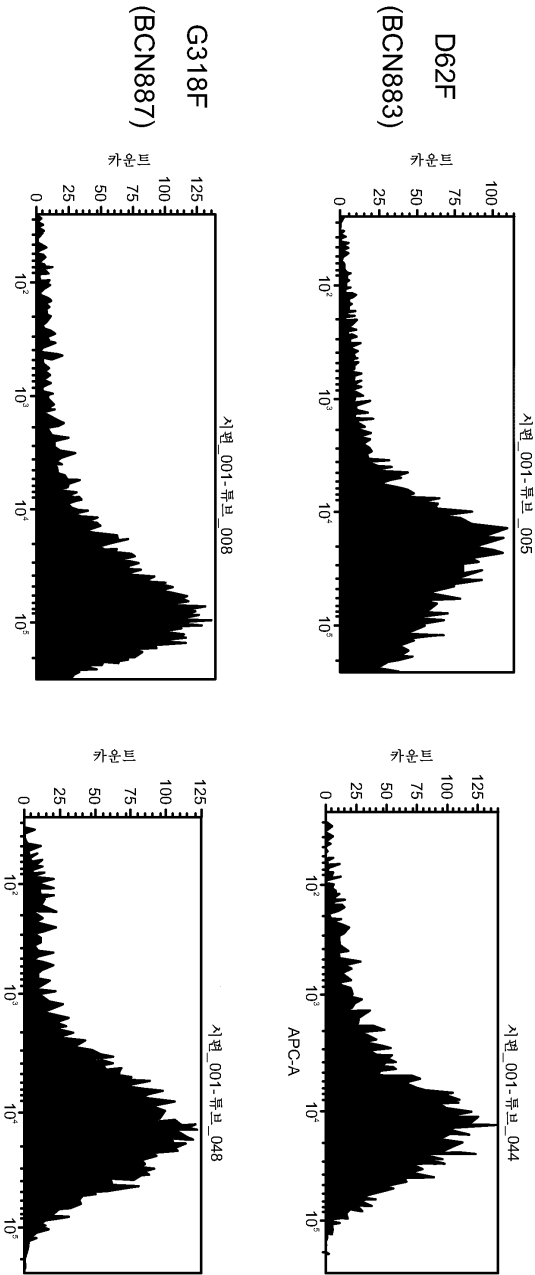
도면20



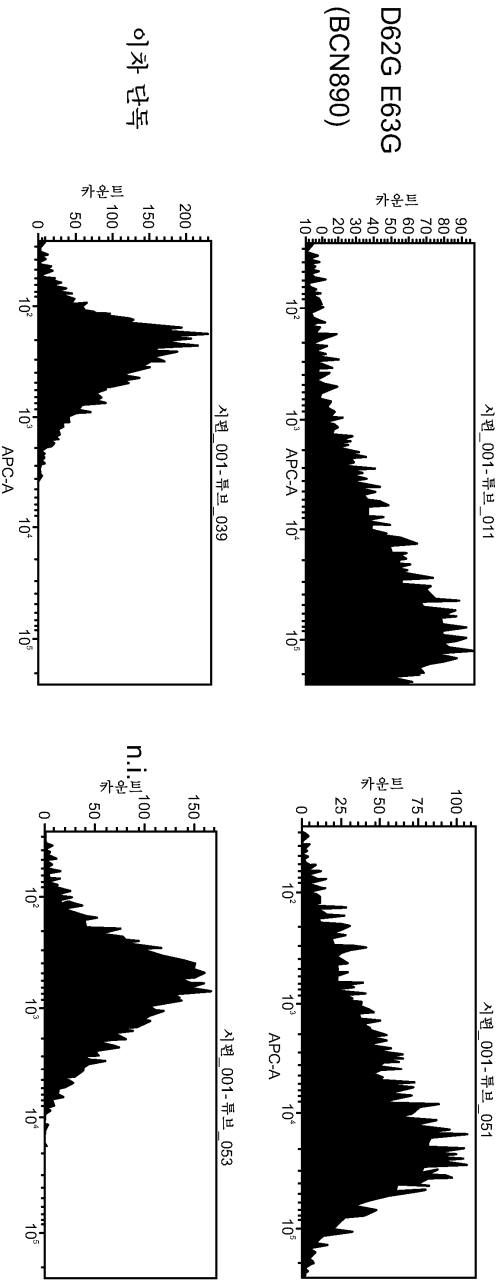
도면21i



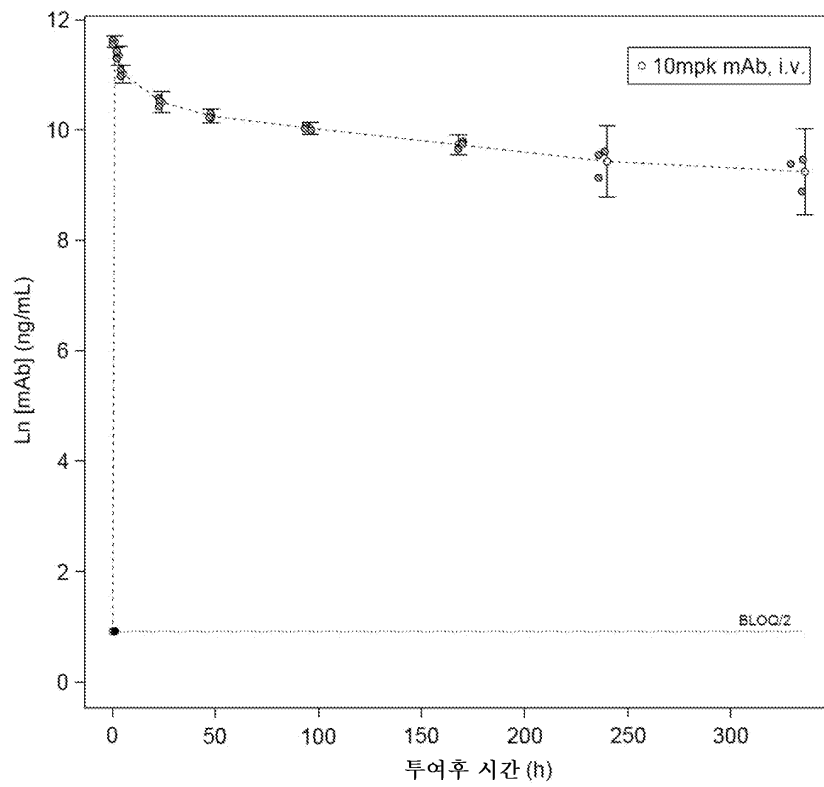
도면21ii



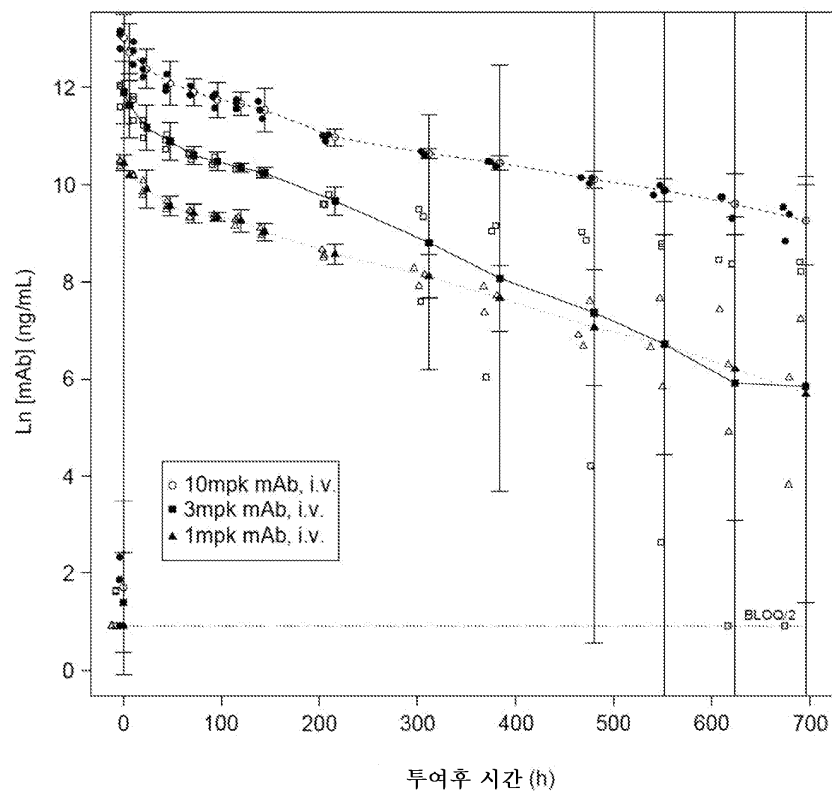
도면21iii



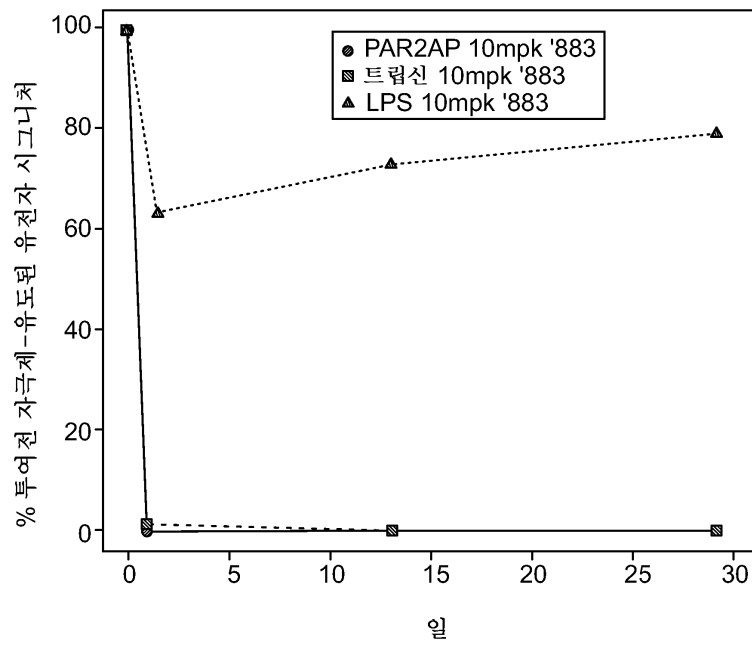
도면22



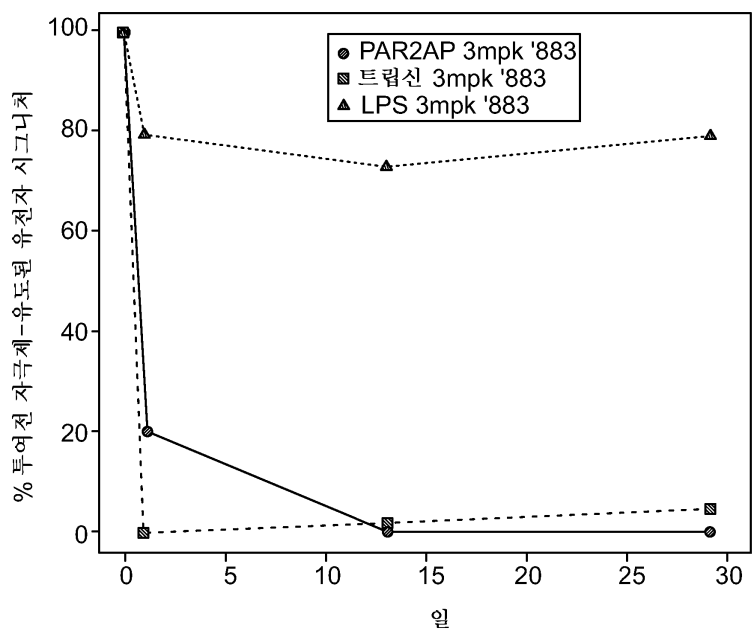
도면23



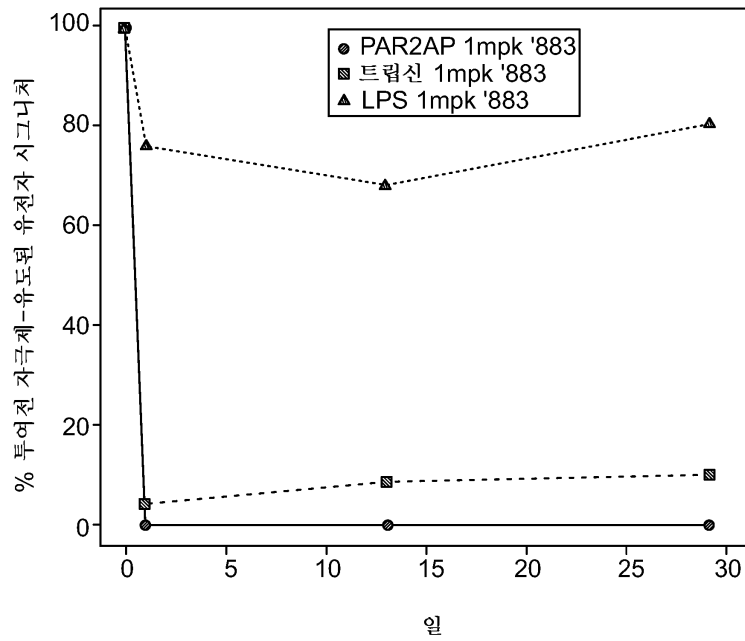
도면24



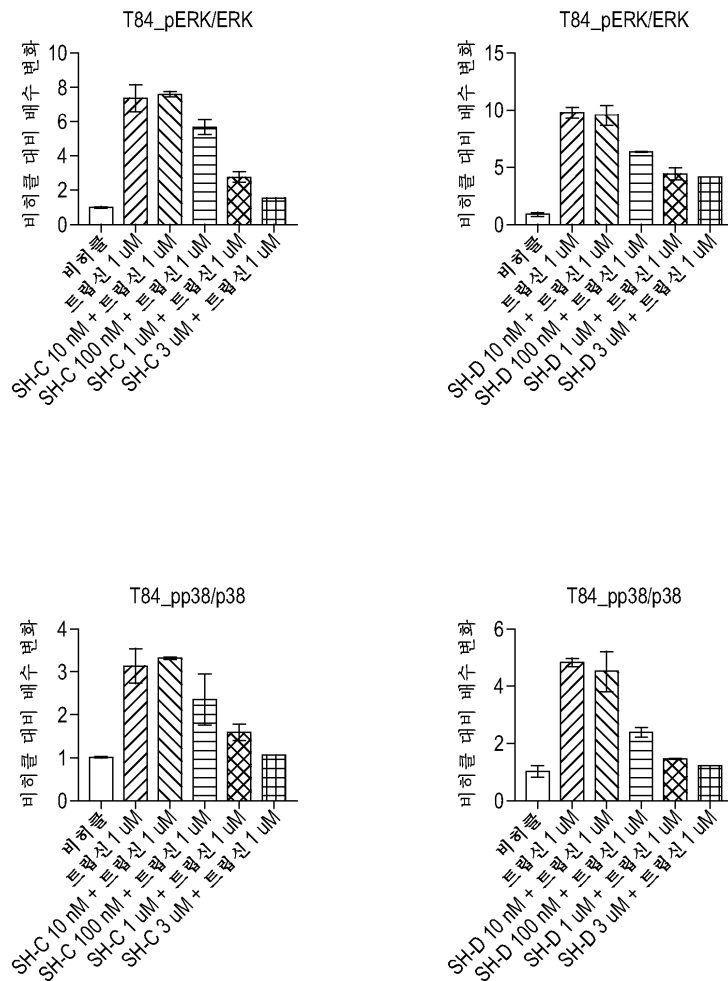
도면25



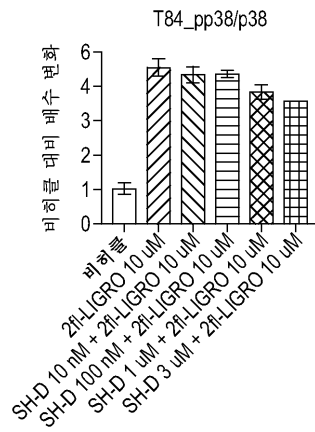
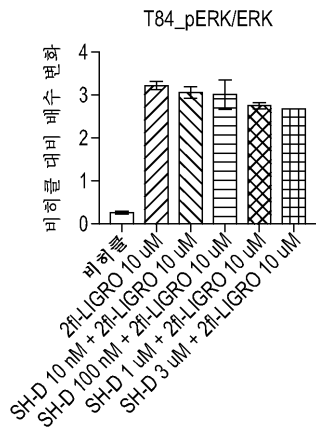
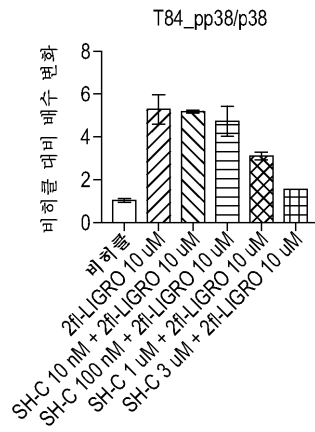
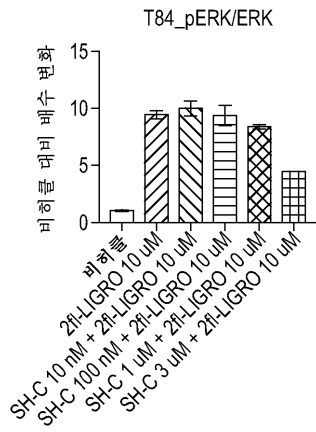
도면26



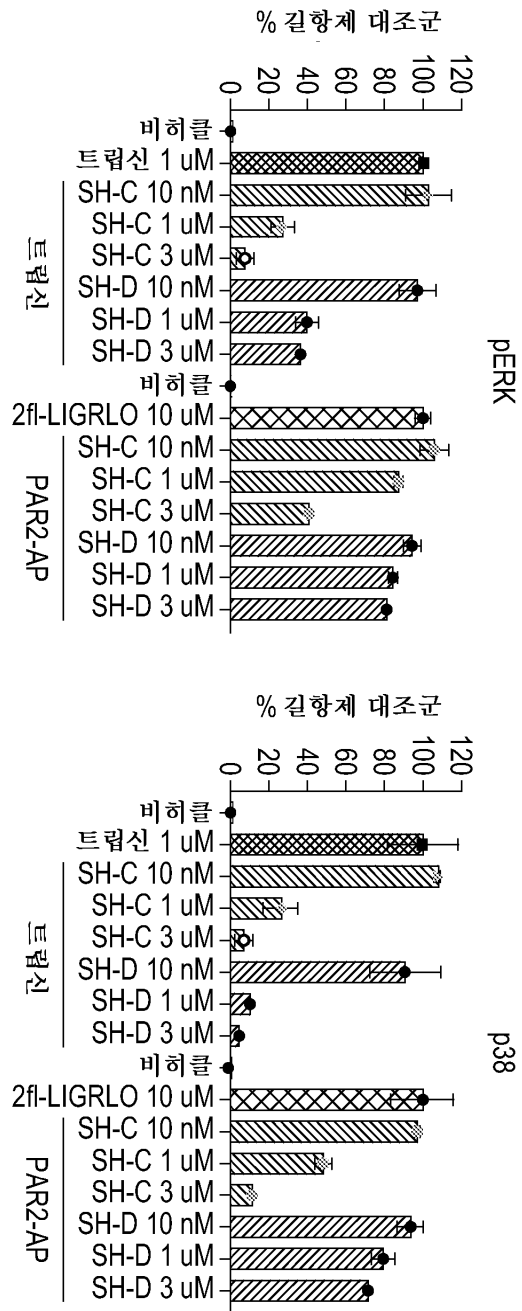
도면27



도면28



도면29



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.