



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119137152 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202380035677.6

(22) 申请日 2023.03.24

(30) 优先权数据

2204159.4 2022.03.24 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2023/050760 2023.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/180767 EN 2023.09.28

(71) 申请人 奈克斯拉制药英国有限公司

地址 英国

(72) 发明人 凯瑟琳·哈钦斯 格雷格·奥斯本

奥利弗·施伦克

克里斯托弗·奥克拉萨

安德烈·朱可夫 安妮卡·施密德

亚历山德拉·克劳斯

多雷西·鲁勒

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 陈九洲

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书11页 说明书66页

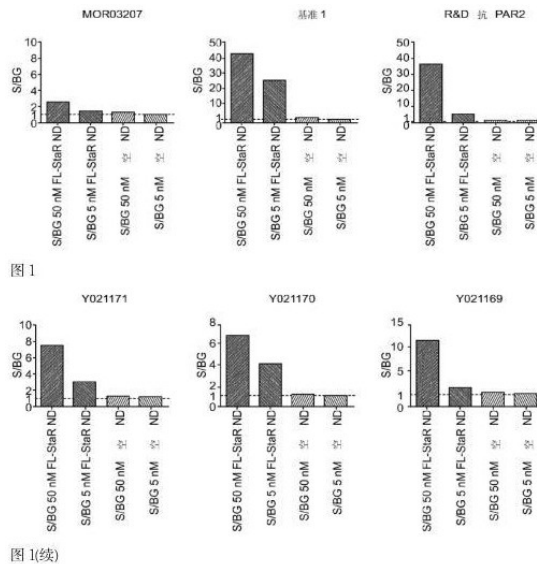
序列表(电子公布) 附图37页

(54) 发明名称

抗PAR2抗体

(57) 摘要

本公开内容提供了能够与人PAR2结合的抗体和抗原结合片段,包括能够用作PAR2双重抑制剂的抗体。双重抑制剂抗体能够抑制以下二者:蛋白酶切割介导的PAR2激活(例如通过胰蛋白酶)和肽介导的PAR2激活(例如通过PAR2-AP或PAR1-AP)。本公开内容还提供了用于制备和使用所述抗体和抗原结合片段的方法。



1. 与PAR2特异性结合并抑制PAR2活性的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段与包含PAR2的ECL3、区段1和螺旋0/1的不连续表位结合。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体与根据SEQ ID NO:1进行编号时的PAR2的区域V55-F77和L306-Y326结合。

3. 任选地根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并抑制PAR2活性,并且包含含有HCDR3的V<sub>H</sub>结构域,所述HCDR3选自:

(a) 包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成的HCDR3:SEQ ID NO:5、22或30;或者其中具有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5、22或30;

(b) 这样的HCDR3:其包含与SEQ ID NO:5、22或30具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;或者

(c) 这样的HCDR3氨基酸序列:其根据Kabat或Chothia所定义,并且来自于选自SEQ ID NO:2、10、13、16、19或27的V<sub>H</sub>结构域。

4. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述V<sub>H</sub>结构域包含:

i. HCDR1氨基酸序列,其选自SEQ ID NO:3、11、14、17、20或28,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. HCDR2氨基酸序列,其选自SEQ ID NO:4、12、15、18、21或29,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其还包含V<sub>L</sub>结构域,任选地为包含与SEQ ID NO:6、23或31具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的V<sub>L</sub>结构域。

6. 根据任一前述权利要求所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含LCDR3,其中:

a. LCDR3氨基酸序列选自SEQ ID NO:9、26或33,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;或者

b. LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于根据SEQ ID NO:6、23或31的V<sub>L</sub>结构域,任选地其中该LCDR3序列包含3、2或1个氨基酸替换。

7. 根据权利要求5或权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述V<sub>L</sub>结构域包含:

a) i) SEQ ID NO:7、24或32的LCDR1氨基酸序列,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;或者

ii) 这样的LCDR1氨基酸序列:其根据Chothia或Kabat所定义,来自于根据SEQ ID NO 6、23或31的V<sub>L</sub>结构域,任选地其中该LCDR1序列包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

b) i) SEQ ID NO:8或25的LCDR2氨基酸序列,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;或者

ii) 这样的LCDR2氨基酸序列:其根据Chothia或Kabat所定义,来自于根据SEQ ID NO 6、23或31的V<sub>L</sub>结构域,任选地其中该LCDR2序列包含3、2或1个氨基酸替换。

8. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其与PAR2特异性结合,包含:

V<sub>H</sub>区,其选自SEQ ID NO:2、10、13和16、19或27或者与之具有至少80%、85%、90%、

92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;以及

$V_L$ 区,其是根据SEQ ID NO:6、23或31或者与之具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

9.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

10.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID 10具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

11.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID 13具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

12.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID 16具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

13.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID 19具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

14.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID 27具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

15.根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID 6具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

16.根据任一前述权利要求所述的抗体,其中所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID 23具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

17.根据任一前述权利要求所述的抗体,其中所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID 31具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

18.任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID NO:2相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

19.任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID NO:10相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

20.任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 包含与SEQ ID NO:13相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

21. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID NO:16相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

22. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID NO:19相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID NO:23相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

23. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述 $V_H$ 区包含与SEQ ID NO:27相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述 $V_L$ 区包含与SEQ ID NO:31相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

24. 任选地根据任一前述权利要求所述的与PAR2特异性结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中所述 $V_H$ 包含:

(a) HCDR1,其具有SEQ ID NO:3或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

(b) HCDR2,其具有SEQ ID NO:4或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:4的氨基酸序列;

(c) HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;

并且其中所述 $V_L$ 包含:

(d) LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

(e) LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

以及

(f) LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

25. 任选地根据任一前述权利要求所述的与PAR2特异性结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中所述 $V_H$ 包含:

(a) HCDR1,其具有SEQ ID NO:11或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

(b) HCDR2,其具有SEQ ID NO:12或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及

(c) HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;

并且其中所述 $V_L$ 包含:

(d) LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

(e) LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸

序列;以及

(f)LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

26. 任选地根据任一前述权利要求所述的与PAR2特异性结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中所述 $V_H$ 包含:

(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:14或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:15或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;

并且其中所述 $V_L$ 包含:

(d)LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

(e)LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及

(f)LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

27. 任选地根据任一前述权利要求所述的与PAR2特异性结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中所述 $V_H$ 包含:

(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:17或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:17的氨基酸序列;

(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:18或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:18的氨基酸序列;

(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;

并且其中所述 $V_L$ 包含:

(d)LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

(e)LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及

(f)LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

28. 任选地根据任一前述权利要求所述的与PAR2特异性结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中所述 $V_H$ 包含:

(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:20或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:20的氨基

酸序列;

(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:21或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:21的氨基酸序列;

(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:22或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

并且其中所述 $V_L$ 包含:

(d)LCDR1,其具有SEQ ID NO:24或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:24的氨基酸序列;

(e)LCDR2,其具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的氨基酸序列;以及

(f)LCDR3,其具有SEQ ID NO:26或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

29. 任选地根据任一前述权利要求所述的与PAR2特异性结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中所述 $V_H$ 包含:

(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:28或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:28的氨基酸序列;

(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:29或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:29的氨基酸序列;

(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:30或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:30的氨基酸序列;

并且其中所述 $V_L$ 包含:

(d)LCDR1,其具有SEQ ID NO:32或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

(e)LCDR2,其具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的氨基酸序列;以及

(f)LCDR3,其具有SEQ ID NO:33或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制PAR2肽对PAR2的激活。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体与包含氨基酸序列SEQ ID NO:41、42、43和44或者由氨基酸序列SEQ ID NO:41、42、43和44组成的表位结合。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中抑制PAR2激活包括抑制PAR2束缚配体结合。

33. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且抑制PAR2激活肽与PAR2的结合。

34. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段与这样的表位结合:所述表位与特异性结合于选自克隆Y022065、Y022870、Y022877、

Y022883、Y022054和/或Y021171的抗体或片段的表位相同。

35. 根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中与所述抗体或片段结合的表位通过氘氘交换(HDX)和/或通过定点诱变和流式细胞术来鉴别。

36. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且抑制PAR2激活肽与PAR2的结合,其中所述抗体或片段以1至100nM的 $IC_{50}$ 抑制PAR2激活肽介导的一磷酸肌醇(IP)积累,任选地其中PAR2肽介导的IP积累使用PAR2肽刺激的IP信号传导测定来确定。

37. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段以1至300nM的 $IC_{50}$ 抑制胰蛋白酶介导的IP积累,任选地其中胰蛋白酶介导的IP积累使用胰蛋白酶刺激的IP信号传导测定来确定。

38. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段以1至100nM的 $IC_{50}$ 抑制PAR2激活肽介导的一磷酸肌醇(IP)积累,任选地其中PAR2肽抑制使用HTRF测定来确定。

39. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,其中所述抗体或片段抑制PAR2激活肽介导的钙动员,任选地以1至100nM的 $IC_{50}$ 抑制,并且任选地其中钙动员使用PAR2激活肽刺激的钙动员测定来确定。

40. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段抑制胰蛋白酶介导的钙动员,任选地以1至200nM的 $IC_{50}$ 抑制,并且任选地其中钙动员使用PAR2激活肽刺激的钙动员测定来确定。

41. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段在与细胞表面上的PAR2结合时不内化到所述细胞中,任选地其中内化通过使用FAC对抗体或片段结合进行量化来确定。

42. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段不抑制配体SFLLR介导的PAR1激活,其中PAR1激活通过使用配体SFLLR刺激的IP信号传导测定来确定。

43. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段以600pM至5nM或更小的 $EC_{50}$ 与食蟹猴PAR2结合,任选地其中食蟹猴PAR2结合使用流式细胞术来确定。

44. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段以100pM至10nM的 $K_D$ 与人PAR2结合,任选地其中结合亲和力使用表面等离子体共振(SPR)或KinExA来确定。

45. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段与PAR2的结合在pH 7.5至6.0之间是pH非依赖性的。

46. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,其中所述抗体或其片段不与PAR1结合,任选地其中PAR1结合使用流式细胞术或ELISA来确定。

47. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段不与PAR3结合,任选地其中PAR3结合使用流式细胞术或ELISA来确定。

48. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片

段不与PAR4结合,任选地其中PAR4结合使用流式细胞术或ELISA来确定。

49. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中3mg/kg抗体或片段在30天的时间段内将PAR2刺激剂诱导的白细胞应答抑制>95%,其中抑制通过确定刺激剂诱导的基因特征来测量。

50. 任选地根据任一前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中1mg/kg抗体或片段在30天的时间段内将PAR2肽诱导的白细胞应答抑制>90%,其中抑制通过确定刺激剂诱导的基因特征来测量。

51. 根据任一前述权利要求所述的抗体或片段,其中所述抗体或片段与PAR2结合,并且抑制PAR1束缚配体对PAR2的交叉激活。

52. 任一前述权利要求中所限定的抗体或片段,其用于治疗。

53. 权利要求1至52中任一项中所限定的抗体或片段,其用于治疗PAR2介导的疾病或病症,例如特应性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症包括乳腺癌、黑素瘤、头颈癌)、疼痛(慢性、炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎、斯提耳氏病、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤病。

54. 权利要求1至53中任一项中所限定的抗体或片段在制备用于治疗PAR2介导的疾病或病症的药物中的用途,所述PAR2介导的疾病或病症例如为特应性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症包括乳腺癌、黑素瘤、头颈癌)、疼痛(慢性、炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎、斯提耳氏病、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤病。

55. 治疗患者的PAR2介导的疾病或病症(例如疼痛,任选地其中所述疼痛独立地选自慢性疼痛、炎性疼痛、术后疼痛、神经性疼痛、骨折相关疼痛、痛风相关疼痛、癌症相关疼痛、与炎性肠病相关的胃肠性疼痛等)的方法,其包括向所述患者(例如人)施用治疗有效量的根据权利要求1至53中任一项中所限定的抗体或其片段,其中所述PAR2介导的疾病或病症由此得以治疗。

56. 根据权利要求53所述的抗体或片段、根据权利要求54所述的用途、或者根据权利要求55所述的方法,其还包括施用另外的治疗,任选地其中所述另外的治疗包含一种或更多种独立地选自以下的另外的治疗剂:抗炎药、镇痛剂、非甾体抗炎药(NSAID)、皮质类固醇、透明质酸、对乙酰氨基酚、可待因、lorcet、lortab、维柯丁、氢可酮、吗啡、奥施康定、罗西可酮、percocet、阿司匹林、塞来昔布、普瑞巴林、阿巴西普、阿达木单抗、阿那白滞素、赛妥珠单抗、依那西普、戈利木单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗、托珠单抗和托法替尼。

57. 药物组合物,其包含根据权利要求1至53中任一项中所限定的抗体或片段以及可药用的赋形剂、稀释剂或载体,并且任选地还包含一种或更多种独立地选自以下的另外的治疗剂:镇痛剂,包括抗炎药(例如NSAIDs,包括阿司匹林、布洛芬、双氯芬酸、萘普生)、扑热息痛、阿片样物质(例如可待因、吗啡、羟考酮、芬太尼、丁丙诺啡)、阿米替林、加巴喷丁;抗癌药,包括烷化剂(例如氮芥、硝基脲)、抗代谢物(例如叶酸类似物、嘧啶和嘌呤类似物)、抗生素和酶(例如放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、L-天冬酰胺酶)、天然药剂(例如长春花生物

碱、taxens、tecans)、激素和拮抗剂(例如孕激素、雌激素、GnRH、抗雌激素)、羟基脲、免疫调节剂、酪氨酸激酶抑制剂、生物应答调节剂、分子靶向治疗(例如抗体缀合的药物)、基于铂的治疗(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂)。

58. 根据权利要求57所述的药物组合物、或者包含根据权利要求57中所限定药物组合物的药盒,其中所述组合物用于治疗PAR2介导的疾病或病症,例如选自特应性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症包括乳腺癌、黑素瘤、头颈癌)、疼痛(慢性、炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎、斯提耳氏病、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤病。

59. 根据权利要求57或权利要求58所述的药物组合物,或者根据权利要求58所述的药盒,其与用于在患者中治疗所述疾病或病症的标签或说明组合;任选地其中所述标签或说明包含上市许可号(例如,FDA或EMA许可号);任选地其中所述药盒包含含有所述抗体或片段的IV或注射装置。

60. 根据任一前述权利要求所述的抗体或片段,其中所述V<sub>H</sub>结构域包含:

a. 具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和

i. 具有SEQ ID NO:3或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:3的HCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:4或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:4的HCDR2氨基酸序列;

b. 具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和

i. 具有SEQ ID NO:11或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:11的HCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:12或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:12的HCDR2氨基酸序列;

c. 具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和

i. 具有SEQ ID NO:14或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:14的HCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:15或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:15的HCDR2氨基酸序列;

d. 具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和

i. 具有SEQ ID NO:17或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:17的HCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:18或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:18的HCDR2氨基酸序列;

e. 具有SEQ ID NO:22或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:22的HCDR3氨基酸序

列;和

i. 具有SEQ ID NO:20或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:20的HCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:21或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:21的HCDR2氨基酸序列;

f. 具有SEQ ID NO:30或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:30的HCDR3氨基酸序列;和

i. 具有SEQ ID NO:28或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:28的HCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:29或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:29的HCDR2氨基酸序列;

g. HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i. HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

h. HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i. HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

i. HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i. HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的 $V_H$ 结构域,或者其中所述HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

j. HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的 $V_H$ 结

构域,或者其中所述HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i.HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii.HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

k.HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i.HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii.HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

l.HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i.HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii.HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的V<sub>H</sub>结构域,或者其中所述HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换。

61.根据任一前述权利要求所述的抗体或片段,其中所述V<sub>L</sub>结构域包含:

a.具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的LCDR3氨基酸序列;和

i.具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的LCDR1氨基酸序列;和/或者

ii.具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的LCDR2氨基酸序列;

b.具有SEQ ID NO:26或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:26的LCDR3氨基酸序列;和

i.具有SEQ ID NO:24或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:24的LCDR1氨基酸序列;和/或者

ii.具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的LCDR2氨基酸序列;

c. 具有SEQ ID NO:33或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:33的LCDR3氨基酸序列;和

i. 具有SEQ ID NO:32或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:32的LCDR1氨基酸序列;和/或者

ii. 具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的LCDR2氨基酸序列;

d. LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i. LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

e. LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i. LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;

f. LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和

i. LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者

ii. LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域,或者其中所述LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换。

## 抗PAR2抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及能够与人PAR2结合的抗体或抗原结合片段。本发明还涉及与人PAR2受体的表位特异性结合并阻断、拮抗、抑制或阻止人PAR2激活的抗体。本发明涉及包含所述抗体的药物组合物,及其制备方法、使用方法。

### 背景技术

[0002] 慢性疼痛和慢性炎症是两种最大的全球健康负担。单独的慢性疼痛就影响了约5000万美国成年人,或者说20%的人口。慢性疼痛是致衰弱的病症,其定义为持续存在且在6个月或更长时间内在大多数日子或每天都经历的疼痛(<https://uspainfoundation.org/wp-content/uploads/2018/09/Chronic-pain-facts-infographic.pdf>)。慢性炎症在导致大量死亡的疾病(包括癌症、心血管疾病和糖尿病)中发挥核心作用。据预测,到2020年,慢性病将占全世界所有死亡中的约四分之三(Helamo, Delil and Dileba, 2017)。尽管慢性疼痛是全球负担,但患者从目前可用的治疗中仅得到30%疼痛减轻(Rice, Smith and Blyth, 2016)。

[0003] 蛋白酶激活受体2(Protease Activated Receptor 2, PAR2)是属于蛋白酶激活受体(Protease-Activated Receptor, PAR)家族的G蛋白偶联受体。PAR2被认为在炎症、疼痛和其他病理生理学响应(在其中发现蛋白酶水平升高)中具有关键作用。PAR2在胰腺、肝、肾、小肠和结肠中以特别高的水平广泛表达。在许多上皮和内皮细胞和器官中检测到中等表达,其中在脑或骨骼肌中表达的证据有限。另外,PAR2也在免疫和炎症细胞(例如T细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞)上表达。

[0004] 文献表明,PAR2的阻断可能对以下产生临床益处:特应性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症,包括乳腺癌、黑素瘤、头颈癌)、疼痛(炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病(Reiter's disease)、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎(chronic Lyme arthritis)、斯提耳氏病(Still's disease)、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎、淋巴管平滑肌瘤病、变应性鼻结膜炎(allergic rhinoconjunctivitis, AR)、嗜酸性食管炎(eosinophilic esophagitis, EoE)以及与上皮屏障功能相关的疾病(在Yau et al., 2013; Heuberger and Schuepbach, 2019中综述)。

[0005] 因此,PAR2拮抗剂被认为可能向广泛多样的患者提供益处,并可能具有缓解疼痛和/或炎症相关病症的潜力。因此,PAR2被视为用于治疗数种疾病适应证的有价值的治疗靶标。

[0006] 需要鉴定可特异性抑制PAR2的治疗部分。如果这样的药剂可抑制所有的PAR2激活机制,那么其将是特别期望的。

### 发明内容

[0007] 本文中提供了与PAR2结合的抗体及其抗原结合片段。本公开内容的抗体和抗原结

合片段尤其可用于抑制PAR2介导的信号传导,以及用于治疗由PAR2活性和/或信号传导引起或者与之相关的疾病和病症。

[0008] 本文中提供的抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并抑制PAR2的活性,其中抗体或其片段与包含PAR2的胞外环(extracellular loop,ECL)和N端区段(包含螺旋0和1)的表位结合。认为,与这些区域中的二者结合可导致PAR2活性的全面功能性抑制。因此本文中提供的抗体具有双重活性,即其能够抑制以下二者:蛋白酶切割介导的PAR2激活(例如通过胰蛋白酶)以及肽介导的PAR2激活(例如通过PAR2-AP或PAR1-AP)。

[0009] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2的不连续表位特异性结合,其中该表位包含在螺旋0/1、螺旋0/1区和ECL3之前的非螺旋区段1的一个或更多个区域,任选地其中当根据SEQ ID NO:1的人PAR2序列进行编号时,区段1、螺旋0/1和ECL3的区域选自PAR2的V55-F77、L306-Y311和F312-Y326。

[0010] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并抑制PAR2的活性并且包含VH结构域,所述VH结构域含有HCDR3,其中:(a)包含以下或由以下组成的HCDR3:SEQ ID NO:5、22或30,或者其中具有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5、22或30的氨基酸序列;(b)包含与SEQ ID NO:5、22或30具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的HCDR3;或者d)HCDR3氨基酸序列,其根据Kabat或Chothia所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2、10、13、16、19或27的VH结构域。

[0011] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含VH结构域,其中VH结构域包含:i.HCDR1氨基酸序列,其选自SEQ ID NO:3、11、14、17、20或28,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其选自SEQ ID NO:4、12、15、18、21或29,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换。

[0012] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含VL结构域,任选地为包含与SEQ ID NO:6、23或31具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0013] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含LCDR3,其中a)LCDR3氨基酸序列选自SEQ ID NO:9、26或33,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;或者b)LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于根据SEQ ID NO:6、23或31的VL结构域,任选地其中LCDR3包含3、2或1个氨基酸替换。

[0014] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含VL结构域,其中VL结构域包含:a) i) SEQ ID NO:7、24或32的LCDR1氨基酸序列,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;或者 ii)LCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义,来自于根据SEQ ID NO:6、23或31的VL结构域,任选地其中LCDR1序列包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者b) i) SEQ ID NO:8或25的LCDR2氨基酸序列,任选地其中具有3、2或1个氨基酸替换;或者 ii)LCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义,来自于根据SEQ ID NO:6、23或31的VL结构域,任选地其中LCDR2序列包含3、2或1个氨基酸替换。

[0015] 本文中提供了与PAR2特异性结合、包含以下的抗体或其抗原结合片段:VH区,其选自SEQ ID NO:2、10、13和16、19或27或者与之具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;以及VL区,其是根据SEQ ID NO:6、23或31或者与之具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基

酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:13具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID 16具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID 19具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>L</sub>区,其中V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:23具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>L</sub>区,其中V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:31具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:2相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:10相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:13相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:16相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:6相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:19相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:23相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含V<sub>H</sub>区,其中V<sub>H</sub>区包含与SEQ ID NO:27相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且V<sub>L</sub>区包含与SEQ ID NO:31相同或与之具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且包含重链可变结构域(V<sub>H</sub>)和轻链可变结构域(V<sub>L</sub>),其中V<sub>H</sub>包含:(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:3或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:3的氨基酸序列;(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:4或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;并且其中V<sub>L</sub>包含:(d)LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;(e)LCDR2,其

具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及(f) LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中 $V_H$ 包含:(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:11或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:12或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;并且其中VL包含:(d) LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;(e) LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及(f) LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中 $V_H$ 包含:(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:14或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:14的氨基酸序列;(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:15或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;并且其中VL包含:(d) LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;(e) LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及(f) LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中 $V_H$ 包含:(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:17或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:17的氨基酸序列;(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:18或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:18的氨基酸序列;(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的氨基酸序列;并且其中VL包含:(d) LCDR1,其具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的氨基酸序列;(e) LCDR2,其具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的氨基酸序列;以及(f) LCDR3,其具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且包含重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中 $V_H$ 包含:(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:20或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:21或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:22或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:22的氨基酸序列;并且其中VL包含:(d) LCDR1,其具有SEQ ID NO:24或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:24的氨基酸序列;(e) LCDR2,其具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的氨基酸序列;以及(f) LCDR3,其具有SEQ ID NO:26或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且包含重链可

变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),其中 $V_H$ 包含:(a)HCDR1,其具有SEQ ID NO:28或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(b)HCDR2,其具有SEQ ID NO:29或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(c)HCDR3,其具有SEQ ID NO:30或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:30的氨基酸序列;并且其中 $V_L$ 包含:(d)LCDR1,其具有SEQ ID NO:32或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:32的氨基酸序列;(e)LCDR2,其具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的氨基酸序列;以及(f)LCDR3,其具有SEQ ID NO:33或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:77具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:78具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:79具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:80具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:83具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:84具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含 $V_H$ 结构域,其中 $V_H$ 结构域包含:a)具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:3或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:3的HCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:4或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:4的HCDR2氨基酸序列;b)具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:11或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:11的HCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:12或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:12的HCDR2氨基酸序列;c)具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:14或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:14的HCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:15或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:15的HCDR2氨基酸序列;d)具有SEQ ID NO:5或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:5的HCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:17或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:17的HCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:18或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:18的HCDR2氨基酸序列;e)具有SEQ ID NO:22或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:22的HCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:20或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:20的HCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:21或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:21的HCDR2氨基酸序列;f)具有SEQ ID NO:30或者含有3、2或1个氨基酸替

换的SEQ ID NO:30的HCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:28或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:28的HCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:29或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:29的HCDR2氨基酸序列;g)HCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.HCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;h)HCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.HCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:10的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;i)HCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.HCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:13的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;j)HCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.HCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:16的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;k)HCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.HCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域,或者其中HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自

于选自SEQ ID NO:19的 $V_H$ 结构域,或者其中HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:19的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;1)HCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的 $V_H$ 结构域,或者其中HCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.HCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的 $V_H$ 结构域,或者其中HCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.HCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的 $V_H$ 结构域,或者其中HCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:27的 $V_H$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换。

[0026] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含 $V_L$ 结构域,其中 $V_L$ 结构域包含a)具有SEQ ID NO:9或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:9的LCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:7或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:7的LCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:8或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:8的LCDR2氨基酸序列;b)具有SEQ ID NO:26或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:26的LCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:24或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:24的LCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的LCDR2氨基酸序列;c)具有SEQ ID NO:33或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:33的LCDR3氨基酸序列;和i.具有SEQ ID NO:32或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:32的LCDR1氨基酸序列;和/或者ii.具有SEQ ID NO:25或者含有3、2或1个氨基酸替换的SEQ ID NO:25的LCDR2氨基酸序列;d)LCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.LCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.LCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:6的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;e)LCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.LCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.LCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:23的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;f)LCDR3氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的 $V_L$ 结构域,或者其中LCDR3氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的 $V_L$ 结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和i.LCDR1氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的 $V_L$ 结构域,或者

其中LCDR1氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换;和/或者ii.LCDR2氨基酸序列,其根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域,或者其中LCDR2氨基酸序列根据Chothia或Kabat所定义并且来自于选自SEQ ID NO:31的V<sub>L</sub>结构域并且包含3、2或1个氨基酸替换。

[0027] 在一个优选实施方案中,本发明的抗体是分离的或纯化的。

[0028] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段抑制PAR2肽对PAR2的激活。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并抑制PAR2的活性,其中抑制PAR2活性包括与PAR2受体的区段1、螺旋0/1、ECL3结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并抑制PAR2激活,其中抑制PAR2激活包括抑制PAR2束缚配体结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并抑制PAR2激活,其中抑制PAR2激活包括抑制PAR1-PAR2异二聚体中PAR1束缚配体的交叉激活。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并且抑制PAR2激活肽与PAR2的结合。在一些实施方案中,本文中提供的抗体能够抑制以下二者:蛋白酶切割介导的PAR2激活(例如通过胰蛋白酶)以及肽介导的PAR2激活(例如通过PAR2-AP或PAR1-AP)。

[0029] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与这样的表位结合,所述表位与同选自克隆Y022065、Y022870、Y022877、Y022883、Y022054和/或Y021171的抗体或片段特异性结合的表位相同。

[0030] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与这样的表位结合,其中与抗体或片段结合的所述表位通过氘交换(hydrogen deuterium exchange, HDX)和/或通过定点诱变和流式细胞术来鉴定。

[0031] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并抑制PAR2激活肽与PAR2的结合,其中抗体或片段以1至100nM的IC<sub>50</sub>抑制PAR2激活肽介导的一磷酸肌醇(inositol monophosphate, IP)积累,任选地其中PAR2肽介导的IP积累是使用PAR2肽刺激的IP信号传导测定来确定的。

[0032] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的PAR2激活。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以1至300nM的IC<sub>50</sub>抑制胰蛋白酶介导的IP积累,任选地其中胰蛋白酶介导的IP积累是使用胰蛋白酶刺激的IP信号传导测定来确定的。

[0033] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以1至100nM的IC<sub>50</sub>抑制PAR2激活肽介导的一磷酸肌醇(IP)积累,任选地其中PAR2肽抑制是使用HTRF测定来确定的。

[0034] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,其中抗体或片段抑制PAR2激活肽介导的钙动员,任选地以1至100nM的IC<sub>50</sub>抑制,并且任选地其中钙动员是使用PAR2激活肽刺激的钙动员测定来确定的。

[0035] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的钙动员,任选地以1至200nM的IC<sub>50</sub>抑制,并且任选地其中钙动员是使用PAR2激活肽刺激的钙动员测定来确定的。

[0036] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在与细胞表面上的PAR2结合时不内化到细胞中,任选地其中内化是通过使用FAC对抗体或片段结合进行定量来确定的。

[0037] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段不抑制配体SFLLR介导的PAR1激活,其中PAR1激活是通过使用配体SFLLR刺激的IP信号传导测定来确定的。

[0038] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以600pM至5nM或更小的 $EC_{50}$ 与食蟹猴PAR2结合,任选地其中食蟹猴PAR2结合是使用流式细胞术来确定的。

[0039] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以100pM至10nM的 $K_D$ 与人PAR2结合,任选地其中结合亲和力使用表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)或KinExA来确定。

[0040] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并且抑制PAR2肽与PAR2的结合,其中抗体或片段与PAR2的结合在pH 7.5至6.0之间是pH非依赖性的。

[0041] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段不与PAR1结合,任选地其中PAR1结合是使用流式细胞术或ELISA来确定的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段不与PAR3结合,任选地其中PAR3结合是使用流式细胞术或ELISA来确定的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段不与PAR4结合,任选地其中PAR4结合是使用流式细胞术或ELISA来确定的。

[0042] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并且抑制PAR2肽与PAR2结合,其中3mg/kg抗体或片段在30天的时间段内将PAR2刺激剂诱导的白细胞应答抑制>95%,其中抑制是通过确定刺激剂诱导的基因特征来测量的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合并且抑制PAR2肽与PAR2结合,其中1mg/kg抗体或片段在30天的时间段内将PAR2肽诱导的白细胞应答抑制>90%,其中抑制是通过确定刺激剂诱导的基因特征来测量的。

[0043] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与功能性配体AZ8838竞争与PAR2结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与AZ8838直接竞争与PAR2结合。

[0044] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2同二聚体结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2-PAR1异二聚体结合,任选地其中该结合抑制PAR1束缚配体对PAR2的交叉激活。

[0045] 本文中提供了与PAR2结合的抗体及其抗原结合片段,其用于治疗。

[0046] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段用于治疗PAR2介导的疾病或病症,例如特应性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症包括乳腺癌、黑素瘤、头颈癌)、疼痛(慢性、炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎、斯提耳氏病、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤病。

[0047] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段用于制备用于治疗PAR2介导的疾病或病症的药物,所述PAR2介导的疾病或病症例如特应性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症包括乳腺癌、黑素瘤、头颈癌)、疼痛(慢性、炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎、斯提耳氏病、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤病。

[0048] 本文中提供了在患者中治疗PAR2介导的疾病或病症(例如疼痛,任选地其中疼痛独立地选自慢性疼痛、炎性疼痛、术后疼痛、神经性疼痛、骨折相关疼痛、痛风相关疼痛、癌症相关疼痛、与炎性肠病相关的胃肠性疼痛等)的方法,其包括向所述患者(例如人)施用治疗有效量的本公开内容的抗体或其片段,其中PAR2介导的疾病或病症由此得以治疗。

[0049] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体可以与另外的治疗组合或同时施用,任选地其中另外的治疗包含一种或更多种独立地选自镇痛剂的另外的治疗剂,所述镇痛剂包括抗炎药(例如NSAIDS,包括阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、双氯芬酸、萘普生(naproxen))、扑热息痛(paracetamol)、阿片样物质(opioids)(例如可待因(codeine)、吗啡(morphine)、羟考酮(oxycodone)、芬太尼(fentanyl)、丁丙诺啡(buprenorphine))、阿米替林(amitriptyline)、加巴喷丁(gabapentin);抗癌药,包括烷化剂(例如氮芥、硝基脲)、抗代谢物(例如叶酸类似物、嘧啶和嘌呤类似物)、抗生素和酶(例如放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、L-天冬酰胺酶)、天然药剂(例如长春花生物碱、紫杉醇(taxens)、tecans)、激素和拮抗剂(例如孕激素、雌激素、GnRH、抗雌激素)、羟基脲、免疫调节剂、酪氨酸激酶抑制剂、生物响应调节剂、分子靶向治疗剂(例如抗体缀合的药物)、基于铂的治疗剂(例如顺铂、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin));和/或者任选地其中另外的治疗选自放射治疗和/或手术移除肿瘤。

[0050] 本文中提供了这样的药物组合物,其包含本公开内容的抗体或片段以及可药用的赋形剂、稀释剂或载体,并且任选地还包含一种或更多种独立地选自以下的另外的治疗剂:镇痛剂,包括抗炎药(例如NSAIDS,包括阿司匹林、布洛芬、双氯芬酸、萘普生)、扑热息痛、阿片样物质(例如可待因、吗啡、羟考酮、芬太尼、丁丙诺啡)、阿米替林、加巴喷丁;抗癌药物,包括烷化剂(例如氮芥、硝基脲)、抗代谢物(例如叶酸类似物、嘧啶和嘌呤类似物)、抗生素和酶(例如放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、L-天冬酰胺酶)、天然药剂(例如长春花生物碱、紫杉醇、tecans)、激素和拮抗剂(例如孕激素、雌激素、GnRH、抗雌激素)、羟基脲、免疫调节剂、酪氨酸激酶抑制剂、生物响应调节剂、分子靶向治疗剂(例如抗体缀合的药物)、基于铂的治疗剂(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂)。

[0051] 本文中提供了本公开内容的药物组合物或包含所述药物组合物的药盒,其中组合物用于治疗PAR2介导的疾病或病症,例如选自特异性皮炎、哮喘、癌症(多种癌症包括乳腺癌、黑色素瘤、头颈癌)、疼痛(慢性、炎性、术后、神经性、骨折、痛风、癌症、与炎性肠病相关的胃肠性)、类风湿性关节炎和相关的葡萄膜炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、骨关节炎、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、莱特尔氏病、银屑病关节炎、慢性莱姆关节炎、斯提耳氏病、皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤病。

[0052] 本文中提供了本公开内容的药物组合物、或者本公开内容的药盒,其与用于在患者中治疗疾病或病症的标签或说明组合;任选地其中标签或说明包括上市许可号(例如,FDA或EMA许可号);任选地其中药盒包含含有所述抗体或片段的IV或注射装置。

[0053] 在一些实施方案中,氨基酸替换包含同源替换。这些氨基酸替换可以是保守替换。保守氨基酸替换是指将氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基进行的替换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 $\beta$ -支化侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。在一些方面中,抗PAR-2抗体中的预测的非必需氨基酸残基被来自相同侧链家族的另外的氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的氨基酸保守替换的方法是本领域公知的(参见例如,

Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12 (10):879-884 (1999); 和 Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)。

[0054] 在一些实施方案中, 当在7.4至7.6的pH下, 在PAR2结合测定(例如SPR或Kinexa测定)中测试时, 与具有氨基酸序列为SEQ ID NO:16的VH和氨基酸序列为SEQ ID NO:6的VL的抗体或抗原结合片段相比, 氨基酸替换将抗体或其抗原结合片段对人PAR2的结合亲和力降低至不超过1000倍、800倍、700倍、500倍、400倍、300倍、200倍、100倍、50倍或10倍。

[0055] 本文中提供的抗体可以是人的。在一些实施方案中, 抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中, 抗体是IgG抗体。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段。在一个实施方案中, 抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中, 抗原结合片段是Fab。在一个实施方案中, 抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0056] 本文中提供的抗体与人PAR2结合, 并且还可与食蟹猴(*Cynomolgus*) PAR2和恒河猴(*Rhesus*) PAR2结合, 但不与小鼠和/或大鼠PAR2结合。

[0057] 在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段阻止胰蛋白酶、类胰蛋白酶和/或蛋白裂解酶与PAR2相互作用。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶的PAR2激活。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制束缚配体的暴露。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段阻止束缚配体与PAR2相互作用。

[0058] 在一些实施方案中, 本文中提供了能够表达抗体或其抗原结合片段的核酸。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:34、70和72中任一者具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:34、70和72中任一者具有至少95%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含SEQ ID NO:34、70和72中任一者的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:35、36、37、38、71和73中任一者具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:35、36、37、38、71和73中任一者具有至少95%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含SEQ ID NO:35、36、37、38、71和73中任一者的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:34具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:34具有至少95%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:38具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含与SEQ ID NO:38具有至少95%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列。

[0059] 在一个优选实施方案中, 本发明的核酸是分离的或纯化的。

[0060] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了包含任何本文中公开的核酸的载体。在一些实施方案中, 本公开内容提供了包含任一种或更多种本文中公开的核酸的载体集合。

[0061] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了包含任一种或更多种本文中公开的载体的宿主细胞。

[0062] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了这样的组合物, 其包含可药用载体以及本文中公开的任何抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中, 本公开内容提供了这样的冻干组合物, 其包含本文中公开的任何抗体或其抗原结合片段。

[0063] 在一些实施方案中, 本公开内容提供了这样的重构冻干组合物, 其包含本文中公开的任何抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 组合物被配制用于通过以下进行

施用:锭剂、喷雾剂、经口施用、延迟释放或持续释放、经黏膜施用、糖浆剂、黏膜黏附剂、口含制剂、黏膜黏附片剂、表面施用、肠胃外施用、注射、皮下施用、经口溶液、直肠施用、口含施用或经皮施用。

[0064] 在一些实施方案中,本公开内容提供了这样的药盒,其包含本文中公开的任何抗体或抗原结合片段、或者本文中公开的任何组合物。

[0065] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于在有此需要的对象中治疗疼痛的方法,其包括向对象施用药学有效量的本文中公开的任何组合物。在一些实施方案中,疼痛选自:伤害性、神经性和混合型疼痛。在一些实施方案中,疼痛与以下相关:头痛、慢性头痛、偏头痛、癌症、病毒感染、类风湿性关节炎、骨关节炎、克罗恩病(Crohn's disease)、肝病、多发性硬化、脊髓损伤、疱疹后神经痛、糖尿病性神经病、下背痛、炎性心脏病、肾病、胃炎、龈炎、牙周病、哮喘、慢性阻塞性肺病、自身免疫病、肠易激综合征、纤维肌痛、腿痛、不宁腿综合征、糖尿病性神经病、变应性病症、手术程序、急性或慢性身体损伤、骨折或挤压伤、脊髓损伤、炎性疾病、非炎性神经性或功能障碍性疼痛状况、或其组合。在一些实施方案中,疼痛是骨关节炎疼痛。在一些实施方案中,对象是人。

[0066] 在一些实施方案中,本公开内容提供了产生本文中公开的任何抗体或抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:在经培养的细胞中表达本文中公开的任何核酸,将抗体或抗原结合片段进行纯化。

### 具体实施方案

[0067] 本发明提供了与人PAR2受体结合的抗体或抗原结合片段。本发明的抗体可用于抑制PAR2及其下游信号传导级联。

[0068] 在描述本公开内容之前,应理解,本公开内容不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这样的方法和条件可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不旨在进行限制。

[0069] PAR2或GPR11(PAR2;人PAR2 Uniprot蛋白质ID:P55085)是属于蛋白酶激活受体(PAR)家族的44kDa G蛋白偶联受体。其由基因F2RL1(凝血因子II受体样1)编码。PAR2属于蛋白酶激活受体(PAR)家族,其通过胞外N端内的蛋白水解切割来激活。该家族包含通过不同蛋白酶激活的四个成员PAR1至PAR4。PAR2主要通过丝氨酸蛋白酶类胰蛋白酶和胰蛋白酶激活,而其他PAR家族成员主要通过凝血酶激活,尽管蛋白酶3、因子VIIa和因子Xa也被描述参与PAR激活。关于综述,参见Yau et al.,2016;Mrozkova et al.,2016;Hamilton and Trejo,2017;Kagota et al.,2016。

[0070] PAR2通过三种主要机制来激活。机制中的一种涉及蛋白酶切割胞外N端结构域。这导致与受体上胞外环2上保守区域结合的束缚配体的暴露,并触发胞内信号传导。或者,PAR2可通过模拟束缚N端配体的前六个氨基酸的被称为激活肽(PAR2-AP)的合成短肽激活。另外,PAR2还可通过PAR1-PAR2异二聚化中PAR1束缚配体的交叉激活来激活。在PAR2激活之后, $G_{\alpha q}$ 和 $G_i$ 蛋白被激活,这转而导致了钙内流、诱导MAPK信号传导和下游炎性信号传导。这导致了后续的生物响应,例如促炎细胞因子(例如,IL-6、IL-8(也称为CXCL8)和GM-CSF)的增殖或分泌。

[0071] 已表明PAR2表达在人类风湿性关节炎和关节炎动物模型中在滑膜衬里、软骨细胞

和组织中提高(Amiabile et al 2009)。PAR2还通过通道例如TRPV1(Dai et al 2007)(参与炎性疼痛的配体门控离子通道)来增强信号传导。还已知PAR2信号传导在体内敏化TRPV1,导致热痛觉过敏(Amadesi et al.,2006)。

[0072] 已表明PAR2激活是多种炎性信号传导途径的原因。在缺乏PAR2受体的小鼠中,存在响应于炎性介质的炎症的延迟发作(Lindner et al,2000)。另一些啮齿动物PAR2敲除研究已表明,PAR2在许多疾病病症,例如疼痛、肌肉骨骼炎症(包括骨关节炎)、神经炎性病症、气道炎症、发痒、皮炎、结肠炎和相关病症的病理生理学中发挥重要作用(Yau et al 2013)。还已表明PAR2受体拮抗剂例如GB88在体内(包括胶原蛋白诱导的关节炎大鼠模型)阻断炎性应答(Lohman et al 2012)。

[0073] 已知的小分子PAR2拮抗剂由于效力不高且特异性广泛因而并不是理想的治疗剂。鉴于在其中PAR2被认为关键的这样的疾病的范围,因此需要确定有效的、特异性的PAR2拮抗剂。本发明的抗体是有效且特异性的PAR2拮抗剂,其抑制由N端结构域的切割介导的PAR2激活。

[0074] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0075] 尽管与本文中所述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料均可用于本公开内容的实践或测试,但是现在描述了优选的方法和材料。

[0076] 除非上下文另有清楚规定,否则如本说明书和所附权利要求书中所用的,未用数量词限定的名词意指“一个/种或更多个/种”。

[0077] 在此方便指出,本文中使用的“和/或”应视为具体公开了具有或不具有另一者的两个特定特征或组分中的每一者。例如“A和/或B”被视为具体公开了以下中的每一者:(i) A、(ii)B、以及(iii)A和B,就如每一者在本文中单独列出一样。

[0078] 本文中氨基酸可通过其通常已知的三字母符号或通过由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来表示。同样地,核苷酸可通过其通常接受的单字母代码来表示。

[0079] 所有数字名称,例如pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围,均是近似值。应当理解,尽管并不总是明确说明,但在所有数字名称之前均有术语“约”。还应理解,虽然并不总是明确说明,但本文中所述的试剂仅是一些实例并且这样的等同物是本领域已知的。

[0080] 本文中使用的术语“人蛋白酶激活受体2”或“人PAR2”或“PAR2”等均是指人PAR2(野生型(wildtype)或wt),其具有UniProt ID号:P55085,本文中重新表示为SEQ ID NO:1。人PAR2包括与任何SEQ ID NO:1或其生物活性片段的氨基酸序列具有至少99%或100%同一性的任何序列。

[0081] 本文中使用的术语“束缚配体”是指PAR2的N端部分的区域,所述区域在被蛋白酶(例如胰蛋白酶)进行蛋白水解切割之后暴露,并且一旦被切割就与PAR2受体上的近端结合位点结合以将它激活。人PAR2受体N端的束缚配体包含SEQ ID NO:39。

[0082] 通过“PAR2-AP”、“PAR2激活肽(PAR2 activated peptide或PAR2 activating peptide)”意指模拟所切割束缚N端配体的合成短肽。人肽是SEQ ID NO:39,并且鼠肽包含SEQ ID NO:40。

[0083] 本文中使用的术语“抗体”、“针对PAR2的抗体”或“抗PAR2”是指完整的抗体或抗原结合片段。本文中使用的抗体与PAR2相互作用(例如,通过结合、空间位阻、使稳定/不稳定、

空间分布)并干扰PAR2的激活。天然存在的“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(heavy, H)链和两条轻(light, L)链的糖蛋白。重链包含可变区(VH)和恒定区,并且轻链包含可变区(VL)和恒定区。VH和VL区可进一步分为高变(HV)和框架(FR)区。每个VH和VL由三个互补决定区(complementarity determining region, CDR)和四个FR构成。术语“抗体”可以指例如,单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、鲨鱼抗体、骆驼科抗体或嵌合抗体。

[0084] 轻链和重链二者均分成具有结构和功能同源性的区域。术语“恒定”和“可变”在功能上使用。在这方面,应当理解,重链和轻链二者的可变结构域决定了抗原识别和特异性。相反,轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)赋予重要的生物学特性,例如分泌、经胎盘活动性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们变得愈加远离抗体的抗原结合位点或氨基端而增大。N端是可变区并且C端处为恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

[0085] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)可被分配为不同的类别。人免疫球蛋白有五种主要类别(同种型):IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的数种可进一步分为亚类,例如,IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类别免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是公知的,并且一般性地描述在例如Abbas et al., (2000)中。抗体可以是较大融合分子的一部分,所述较大融合分子通过抗体与一种或更多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合来形成。

[0086] “互补决定区”(“CDR”)是使用许多公知方案(例如表1中所示的“Kabat”和“Chothia”编号方案)中的任一种来确定边界的氨基酸序列。例如,在Kabat方案下,重链中的CDR氨基酸残基,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基被编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);然而在Chothia下,VH中的CDR氨基酸被编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3)。

[0087] 表1:CDR定义(编号根据Kabat命名法)。

|               | Chothia    | Kabat      |
|---------------|------------|------------|
| CDR-L1        | L26 - L32  | L24 - L34  |
| CDR-L2        | L50 - L52  | L50 - L56  |
| [0088] CDR-L3 | L91 - L96  | L89 - L97  |
| CDR-H1        | H26 - H32  | H31 - H35  |
| CDR-H2        | H52 - H56  | H50 - H65  |
| CDR-H3        | H95 - H102 | H95 - H102 |

[0089] 本文中使用的术语抗体的“抗原结合部分”或“表位结合片段”等包括任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或遗传改造的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可使用涉及操纵和表达编码抗体可变结构域和任选的恒定结构域的DNA的任何合适的标准技术,例如蛋白水解消化或重组遗传改造技术,而来源于例如完整抗体分子。这样的DNA是已知的和/或者可容易地从例如商业来源、DNA文库(包括,例如,噬

菌体-抗体文库)获得,或者可合成。可对DNA进行测序并通过化学方法或通过使用分子生物学技术进行操纵,例如,从而将一个或多个可变和/或恒定结构域排列成合适的构型,或者从而引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0090] 尽管两个片段可变(Fv)结构域VL和VH由单独的基因编码,但可使用重组方法通过合成接头将它们连接,使之能够成为单个蛋白质链,其中VL和VH区配对以形成一价分子(称为单链Fv(single chain Fv,scFv);参见例如,Bird et al.,1988;和Huston et al.,1988)。这样的单链抗体还旨在涵盖在术语“片段”、“表位结合片段”或“抗体片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些片段,并以与完整抗体相同的方式针对效用对片段进行筛选。

[0091] 抗原结合片段的另一些非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) Fab'片段;(iii) F(ab')<sub>2</sub>片段;(iv) Fd片段;(v) Fv片段;(vi) dAb片段;和(vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单元(例如,分离的互补决定区(CDR),例如CDR3肽),或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。另一些经改造分子例如结构域特异性抗体、单结构域抗体、骆驼科抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、adnectin、小型模块化免疫药物(small modular immunopharmaceutical,SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在本文中使用的表述“抗原结合片段”中。

[0092] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域(例如,VH或VL中的至少一个)。可变结构域可具有任何尺寸或氨基酸组成,并且通常将包含至少一个CDR,其与一个或多个框架序列相邻或与其同框。在具有与VL结构域缔合的VH结构域的抗原结合片段中,VH和VL结构域可以以任何合适的排列相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并包含VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可包含单体VH或VL结构域。

[0093] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可包含与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可存在于本公开内容的抗体的抗原结合片段内的可变结构域和恒定结构域的一些非限制性示例性构型包括:

[0094] (i) VH-CH<sub>1</sub>; (ii) VH-CH<sub>2</sub>; (iii) VH-CH<sub>3</sub>; (iv) VH-CH<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>; (v) VH-CH<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; (vi) VH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH<sub>1</sub>; (ix) VL-CH<sub>2</sub>; (x) VL-CH<sub>3</sub>; (xi) VL-CH<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>; (xii) VL-CH<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; (xiii) VL-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>;和(xiv) VL-CL。

[0095] 在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包括以上列出的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可彼此直接连接,或者可通过全部或部分铰链或接头区连接。铰链区可由至少2个(例如,5、10、15、20、40、60或多个)氨基酸组成,所述氨基酸引起在单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。在一些实施方案中,铰链区包含甘氨酸-丝氨酸接头。

[0096] 此外,本公开内容的抗体的抗原结合片段可包含彼此非共价缔合和/或一个或多个单体VH或VL结构域(例如,通过二硫键)非共价缔合的以上列出的可变结构域和恒定结构域构型中任一种的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。

[0097] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常将包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够与单独的抗原或与同一抗原上的不同表位特异性结合。使用本领域可用的

常规技术,任何多特异性抗体形式均可适用于本公开内容抗体的抗原结合片段的上下文中。

[0098] 本文中使用的术语“双互补位抗体”是指与单个PAR2靶标上两个不同表位结合的双特异性抗体。

[0099] 本文中使用的术语“一价抗体”是指包含一个表位结合部分的抗体。本文中使用的术语“二价抗体”是指包含两个表位结合部分的抗体。

[0100] 术语“多价抗体”是指具有多于一个化合价的单个结合分子,其中“化合价”被描述为抗体构建体的每个分子存在的抗原结合部分的数目。因此,单个结合分子可以与靶分子上的多于一个结合位点结合。多价抗体的一些实例包括但不限于二价抗体、三价抗体、四价抗体、五价抗体等,以及多特异性抗体和双互补位抗体。例如,对于PAR2,多价抗体(例如PAR2双互补位抗体)分别针对PAR2的两个不同表位具有两个不同的结合部分。

[0101] 本文中使用的术语“单克隆抗体”或“mAb”是指多肽,包括具有基本上相同的氨基酸序列或者来源于相同遗传源的抗体、双特异性抗体等。该术语还包括具有单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一的结合特异性和亲和力。

[0102] 本文中使用的术语“片段可结晶区”或“Fc区”是指包含抗体的恒定结构域的铰链区的至少一部分和CH3、CH2的多肽。任选地,Fc区可包含CH4结构域,其存在于某些抗体类别中。Fc区可包含抗体的恒定结构域的整个铰链区。在一个实施方案中,与野生型恒定区相比,恒定区是经修饰的。也就是说,本文中公开的本发明多肽可包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或更多个和/或对轻链恒定区结构域(CL)的改变或修饰。一些示例性修饰包括一个或更多个结构域中一个或更多个氨基酸的添加、缺失或替换。这样的改变可包括优化效应物功能、半衰期等。

[0103] 本文中使用的术语“双重活性(dual-active或dual-activity)”或“双重活性抗体”是指本文中提供的Ab,其能够抑制以下二者:蛋白酶切割介导的PAR2激活(例如通过胰蛋白酶)和肽介导的PAR2激活(例如通过PAR2-AP或PAR1-AP)。

[0104] 本文中使用的术语“参考抗体”、“参考mAb”或“参考Ab或“基准”或“基准抗体”是指本公开内容中在针对本发明抗PAR2抗体以供参考的实验期间使用的任何抗体(例如用于阳性或阴性对照以及建立测定条件)。本文中的实验中使用的基准抗体包括:基准1,其与PAR2的N端表位结合(Giblin et al 2011);基准2(WO2018167322A1),也被称为R001053或PaB670129;基准3,Regeneron Ab,也被称为R001044或H4H581P;基准4,Amgen Ab,也被称为R001048或1A1;MAB3949,鼠R&D systems mAb;以及基准6(Giblin et al 2011)。

[0105] 术语“表位”是指与抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点(称为互补位)相互作用的抗原决定簇。单个抗原可具有多于一个表位。因此,不同的抗体可与抗原上的不同区域结合,并且可具有不同的生物学作用。表位可以是构象的(例如不连续的)或线性的。构象表位通过来自线性多肽链不同区段的空间并置氨基酸产生。线性表位是通过多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0106] 本文中使用的术语“结合位点”包含在PAR2靶分子上且抗体或抗原结合片段与之选择性结合的区域。

[0107] 通常来说,对特定靶抗原具有特异性的抗体将与蛋白质和/或大分子的复杂混合

物中的靶抗原上的表位结合。

[0108] 本文中使用的术语“亲和力(affinity)”是指在单个抗原位点处抗体与抗原之间相互作用的强度。在每个抗原位点内,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力在许多位点与抗原进行相互作用;相互作用越多,亲和力越强。本文中使用的术语“高亲和力”对于IgG抗体或其片段(例如Fab片段)是指抗体针对靶抗原具有的KD为 $10^{-8}$ M或更小、 $10^{-9}$ M或更小、或 $10^{-10}$ M、或 $10^{-11}$ M或更小、或 $10^{-12}$ M或更小、或 $10^{-13}$ M或更小。然而,高亲和力结合可因其他抗体同种型而变化。例如,对于IgM同种型,高亲和力结合是指抗体具有的KD为 $10^{-7}$ M或更小、或 $10^{-8}$ M或更小。

[0109] 本文中使用的术语“亲合力(avidity)”是指抗体-抗原复合物的整体稳定性或强度的信息性量度。它受三个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原和抗体二者的化合价;以及相互作用部分的结构排列。最终,这些因素决定了抗体的特异性,即特定抗体与精确抗原表位结合的可能性。

[0110] 术语“核酸”和“多核苷酸”可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构并且可执行任何功能。以下是多核苷酸的一些非限制性实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(messenger RNA, mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸(branched polynucleotide)、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针、siRNA、shRNA、RNAi剂和引物。多核苷酸可在一个或更多个碱基、糖和/或磷酸处用本文中所述或本领域已知的多种修饰或替换中的任一种进行修饰或替换。多核苷酸可包含经修饰核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在修饰,可在聚合物组装之前或之后进行核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可间插有非核苷酸组分。多核苷酸可在聚合之后被进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。该术语也指双链和单链分子二者。除非另有说明或要求,否则本发明关于多核苷酸的任何实施方案涵盖两种情况,即涵盖双链形式以及涵盖已知或预测构成双链形式的两个互补单链形式中的每一个。

[0111] “基因”是指包含至少一个开放阅读框(open reading frame, ORF)的多核苷酸,所述开放阅读框(ORF)在转录和翻译之后能够编码特定的多肽或蛋白质。多核苷酸序列可用于鉴定与其相关的基因的较大片段或全长编码序列。分离较大片段序列的方法是本领域技术人员已知的。

[0112] 本文中使用的术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成氨基酸,任何氨基酸和氨基酸类似物的D和L光学异构体二者。如果肽链是短的,则三个或更多个氨基酸的所述肽通常被称为寡肽。如果肽链是长的,则所述肽通常被称为多肽或蛋白质。术语“生物标志物”或“标志物”在本文中可互换使用。生物标志物是在人中表达的核酸、多肽或其他有机或无机分子,并且生物标志物的突变或差异表达的存在或不在于确定对任何包含根据本发明的抗PAR2抗体的治疗的敏感性。例如,与正常(非癌)细胞或对照细胞中的相同蛋白质相比,当蛋白质在翻译后修饰、产生、表达、水平、稳定性和/或活性方面有缺陷、突变、缺失或降低时,所述蛋白质是癌细胞的生物标志物。

[0113] 术语“多肽”、“肽”、“肽模拟物”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或更多个氨基酸残基是相应天然存在氨基酸的人工化

学模拟物的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。残基可通过肽键或其他键,例如酯、醚等来连接。

[0114] 多核苷酸或多核苷酸区域(或者多肽或多肽区域)与另一序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%、95%、98%或99%)的“序列同一性”,意味着在比对时,在比较两个序列中,该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。该比对和同源性百分比或序列同一性可使用本领域已知的软件程序来确定,所述软件程序例如在Ausubel et al., (1987)中描述的那些。优选地,使用默认参数进行比对。优选的比对工具在欧洲分子生物学实验室-欧洲生物信息学研究所(European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute,EMBL-EBI)网页上提供,使用默认参数。其他程序包括BLAST、BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤器=无;链=两条;截止=60;期望=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序依据=高分(HIGH SCORE);数据库=非冗余。

[0115] 本文中使用的术语“表达产物”或“基因产物”是指基因转录和翻译时产生的核酸或氨基酸(例如肽或多肽)。

[0116] 本文中使用的“表达”是指DNA转录成mRNA的过程,和/或者转录的mRNA随后翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸来源于基因组DNA,则表达可包括真核细胞中mRNA的剪接。

[0117] 应用于基因的“差异表达”是指从基因转录的mRNA或由基因编码的蛋白质产物的差异产生。与正常或对照细胞的表达水平相比,差异表达的基因可能过表达或低表达。然而,本文中使用的过表达是基因表达的提高,并且通常是正常或对照对应物(counterpart)细胞或组织中检测到的表达的至少1.25倍、或者替代地至少1.5倍、或者替代地至少2倍、或者替代地至少3倍、或者替代地至少4倍表达。本文中使用的低表达是基因表达的降低,并且通常是正常或对照对应物细胞或组织中检测到的表达的至多1.25分之一、或者替代地至多1.5分之一、或者替代地至多2分之一、或者替代地至多3分之一、或者替代地至多4分之一表达。术语“差异表达”还指检测到了在癌细胞或癌组织中的表达,但检测不到在对照细胞或正常组织(例如非癌细胞或组织)中的表达。

[0118] 基因的高表达水平可由于基因的过表达或基因拷贝数的增加而发生。由于负调节子的失调或缺失,基因还可被转录和翻译成提高的蛋白质水平。最后,基因的高表达可由于蛋白质的稳定性提高或降解减少而发生,从而导致蛋白质的积累。

[0119] 本文中使用的术语“抑制(inhibit或inhibiting)”等是指干扰、拮抗或阻断PAR2受体激活。这样的术语表示两个状态之间的定量差异,例如,指的是两个状态之间在统计学上显著的差异。例如,“有效抑制PAR2激活的量”意味着由于激动剂和PAR2阻断抗体而导致的PAR2的激活与单独用激动剂处理的细胞相比将具有至少在统计学上显著的差异。

[0120] 术语“治疗(treatment、treating)”、“减轻”等在本文中通常意指获得期望的药理学和/或生理学作用,并且还可用于指改善、减轻和/或降低所治疗病症的一种或更多种症状的严重程度。该作用可以就完全或部分延迟疾病、病症或其症状的发作或复发而言是预防性的,和/或可以就疾病或病症的部分或完全治愈和/或可归因于该疾病或病症的不良作用而言是治疗性的。本文中使用的“治疗”覆盖了对哺乳动物,特别是人的疾病或病症的任何治疗,并且包括以下中的任一种或更多种:(a) 预防疾病或病症在可能易患该疾病或病症但尚未被诊断为患有该疾病或病症的对象中发生;(b) 抑制疾病或病症(例如,阻止其发

展);或者(c)缓解疾病或病症(例如,使得疾病或病症消退,提供一种或更多种症状的改善)。例如,疼痛(例如慢性或神经病理性疼痛)的“治疗”涉及减少、阻止、减轻或消除所治疗对象的疼痛症状。通过该疾病的方法治疗的对象群体包括患有不期望病症或疾病的对象,以及处于该病症或疾病发展的风险之中的对象。

[0121] 术语“治疗有效剂量”意指产生了施用其时所期望的剂量的剂量。确切的剂量将取决于治疗目的,并且将可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见例如,The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding, 第3版,2008)。

[0122] 一旦确定了编码这样的抗体的核苷酸序列,就可以通过重组方法产生嵌合抗体。将编码抗体的核酸引入到宿主细胞中并使用本领域通常已知的以及本文中公开的材料和程序来表达。

[0123] “分离的”或“纯化的”抗体或蛋白质是已从其产生环境(例如天然或重组)的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体或蛋白质。例如,抗体或蛋白质基本上不含来自抗体所来源的细胞或组织源的细胞物质或其他污染性蛋白质,或者当通过化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。措辞“基本上不含细胞物质”包括这样的抗体制剂,其中抗体分离自其从中分离或重组产生的细胞的细胞组分。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括具有小于约30%、20%、10%或5%(按干重计)的异源蛋白质(本文中也被称为“污染性蛋白质”)的抗体制剂。当抗体是重组产生的时,其优选地也基本上不含培养基,即培养基占蛋白质制剂体积的小于约20%、10%或5%。当抗体通过化学合成产生时,其优选地基本上不含化学前体或其他化学物质,即其分离自参与蛋白质合成的化学前体或其他化学物质。

[0124] 因此,这样的抗体制剂具有小于约30%、20%、10%或5%(按干重计)的除目的抗体之外的化学前体或化合物。在一个优选实施方案中,本发明的抗体是分离的或纯化的。

[0125] 本文中提供了与PAR2结合的PAR2定向抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体是拮抗性、中和性和/或阻断性抗PAR2抗体或抗原结合片段。本文中使用的“拮抗性”、“中和性”或“阻断性”抗体或抗原结合片段旨在是指这样的抗体或抗原结合片段,其与PAR2的结合进行以下:(i)抑制PAR2激活肽与PAR2的结合、或PAR2激活肽对PAR2的激活;和/或(ii)干扰PAR2暴露的束缚配体与PAR2之间的相互作用;和/或(iii)干扰PAR2与蛋白酶(例如胰蛋白酶、类胰蛋白酶、蛋白裂解酶、豆荚蛋白(legumain))之间的相互作用;和/或(iv)抑制PAR2信号传导(例如抑制PAR2介导的IP积累或胞内Ca<sup>2+</sup>调动);和/或(vi)抑制PAR2激活;和/或(vii)导致对PAR2的至少一种生物学功能(例如PAR2介导的炎性应答)的抑制;和/或(viii)抑制通过主要G<sub>αq</sub>信号传导伴侣的激活所驱动的PAR2次级信使信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗体或抗原结合片段抑制PAR2的激活。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段抑制束缚配体的暴露。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段抑制PAR2受体被其暴露的束缚配体激活。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段抑制PAR2被暴露的束缚配体激活。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段抑制暴露的束缚配体与PAR2的第二胞外环(ECL2)的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与不连续表位结合,其中与所述表位的结合通过空间位阻阻塞了暴露的束缚配体与ECL2的结合。由抗PAR2中和、阻断或拮抗抗体引起的抑制不需要是完全的,只要使用适当的测定可检出即可。在一些实施方案中,与未被抑制的活性PAR2相比,抗体或其抗原结合片段抑制PAR2活性至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。示例部分中描述了用于检

测代表性抗PAR2抗体或抗原结合片段的活性的测定的一些实例。技术人员知晓另外的抗PAR2抗体活性测定。

[0126] 在一些实施方案中,本文中提供了干扰PAR2与蛋白酶之间相互作用的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,蛋白酶是胰蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是中性粒细胞弹性蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是中性粒细胞蛋白酶3。在一些实施方案中,蛋白酶是肥大细胞类胰蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是组织因子/因子Vila/因子Xa。在一些实施方案中,蛋白酶是激肽释放酶相关肽酶。在一些实施方案中,蛋白酶是膜束缚的丝氨酸蛋白酶-1/蛋白裂解酶1。在一些实施方案中,蛋白酶是寄生物半胱氨酸蛋白酶。

[0127] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段抑制/减轻炎症诱导的疼痛。

[0128] 本文中提供了在生理性胞外pH(即pH 7.5)下以高亲和力结合PAR2分子的PAR2定向抗体及其抗原结合片段。

[0129] 本公开内容的抗体或抗原结合片段可具有一种或更多种上述生物学特征或其任何组合。通过阅读包括本文中提供的示例部分在内的本公开内容,本公开内容的抗体的其他生物学特征对于本领域普通技术人员将是明显的。

[0130] 在本公开内容的一些实施方案中,本公开内容的抗PAR2抗体是人抗体。本文中使用的术语“人抗体”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开内容的人抗体可包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变而引入的突变),例如在CDR中,并且在一些实施方案中在CDR3中。然而,本文中使用的术语“人抗体”不旨在包括其中来源于另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已接枝到人框架序列上的抗体。

[0131] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体可以是重组人抗体。本文中使用的术语“重组人抗体”旨在包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组组合人抗体文库中分离的抗体、从对于人免疫球蛋白基因而言为转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体(参见例如,Taylor et al. 1992),或者通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在一些实施方案中,对这样的重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用对人Ig序列而言为转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),并因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,其虽然来源于人种系VH和VL序列并与之相关,但可能不天然存在于体内人抗体种系文库中。

[0132] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并抑制PAR2激活肽与PAR2的结合,任选地其中抗体或片段抑制PAR2激活肽介导的一磷酸肌醇(IP)积累,其 $IC_{50}$ 值为小于约50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM或300nM,任选地其中PAR2肽介导的IP积累是使用PAR2肽刺激的IP信号传导测定来确定的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并抑制PAR2激活肽与PAR2的结合,其中抗体或片段抑制PAR2激活肽介导的一磷酸肌醇(IP)积累,其 $IC_{50}$ 值为小于约40nM、50nM、60nM、70nM或80nM,任选地其中PAR2肽介导的IP积累是使用PAR2肽刺激的IP信号传导测定来确定的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与PAR2特异性结合,并抑制PAR2激活肽与PAR2的结合,其中抗体或片段以40nM或更小的 $IC_{50}$ 抑制PAR2激活肽介导

的一磷酸肌醇 (IP) 积累, 任选地其中 PAR2 肽介导的 IP 积累是使用 PAR2 肽刺激的 IP 信号传导测定来确定的。在一些实施方案中, IP 信号传导测定是 Cisbio IP-One HTRF 测定。

[0133] 在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的 IP 积累, 其  $IC_{50}$  值为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM 或 300nM; 任选地其中胰蛋白酶介导的 IP 积累是使用胰蛋白酶刺激的 IP 信号传导测定来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的 IP 积累, 其  $IC_{50}$  值为小于约

[0134] 60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM、190nM、200nM、210nM、220nM、230nM、240nM、250nM、260nM、270nM、280nM、290nM 或 300nM;

[0135] 任选地其中胰蛋白酶介导的 IP 积累是使用胰蛋白酶刺激的 IP 信号传导测定来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段以 70nM 或更小的  $IC_{50}$  抑制胰蛋白酶介导的 IP 积累; 任选地其中胰蛋白酶介导的 IP 积累是使用胰蛋白酶刺激的 IP 信号传导测定来确定的。

[0136] 在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制 PAR2 激活肽介导的一磷酸肌醇 (IP) 积累, 其  $IC_{50}$  值为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM 或 300nM; 任选地其中 PAR2 肽抑制是使用 HTRF 测定来确定的。

[0137] 在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与 PAR2 特异性结合, 其中抗体或片段抑制 PAR2 激活肽介导的钙动员, 任选地其  $IC_{50}$  值为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM 或 300nM, 并且任选地其中钙动员是使用 PAR2 肽刺激的钙动员测定来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与 PAR2 特异性结合, 其中抗体或片段抑制 PAR2 激活肽介导的钙动员, 任选地其  $IC_{50}$  值为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM 或 160nM, 并且任选地其中钙动员是使用 PAR2 激活肽刺激的钙动员测定来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与 PAR2 特异性结合, 其中抗体或片段抑制 PAR2 激活肽介导的钙动员, 任选地其  $IC_{50}$  为 140nM 或更小, 并且任选地其中钙动员是使用 PAR2 激活肽刺激的钙动员测定来确定的。

[0138] 在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的钙动员, 任选地其  $IC_{50}$  为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM 或 300nM, 并且任选地其中钙动员是使用 PAR2 激活肽刺激的钙动员测定来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的钙动员, 任选地其  $IC_{50}$  为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM 或 250nM, 并且任选地其中钙动员是使用 PAR2 激活肽刺激的钙动员测定来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段抑制胰蛋白酶介导的钙动员, 任选地其  $IC_{50}$  为 200nM 或更小, 并且任选地其中钙动员是使用 PAR2 激活肽刺激的钙动员测定来确定的。

[0139] 在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与食蟹猴 PAR2 结合, 其  $EC_{50}$  为小于约 50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM 或 300nM, 任选地其中食蟹猴 PAR2 结合是使用流式细胞术来确定的。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与食蟹猴 PAR2 结合, 其  $EC_{50}$  为小于约 400pM、800pM、1nM、5nM 或 10nM, 任选地其中食蟹猴 PAR2 结合是使用流式细胞术来确定的。

[0140] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与人PAR2结合,其 $K_D$ 为小于约50pM、100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM、200nM或300nM,任选地其中结合亲和力使用表面等离子体共振 (SPR) 或KinExA来确定。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以小于约100pM、200pM、400pM、800pM、1nM、5nM、10nM或20nM的 $K_D$ 与人PAR2结合,任选地其中结合亲和力使用表面等离子体共振 (SPR) 或KinExA来确定。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以10nM或更小的 $K_D$ 与人PAR2结合,任选地其中结合亲和力使用表面等离子体共振 (SPR) 或KinExA来确定。

### 附图说明

[0141] 图1:通过阳性对照mAb ‘基准1’ 和市售的PAR2 mAb ‘R&D抗huPAR2 mAb (MAB3949)’ 进行的特定PAR2纳米盘 (nanodisc) (FL-StaR ND) 相对于空纳米盘 (空ND) 结合的一些实例以及对于这些和示出的PAR2噬菌体来源的三种抗体克隆所观察到的剂量依赖性结合。抗体以5 $\mu$ g/mL直接包被到板上。在阴性对照, MOR03207 (抗溶菌酶抗体) 的情况下没有观察到显著的背景结合。数据显示为信号除以背景 (S/BG)。

[0142] 图2:使用全长PAR2 StaR纳米盘在PAR2 mAb (来源于Ylanthia噬菌体抗体文库) 组 (panel) 方面与市售阳性对照mAb ‘MAB3949’ (R&D抗huPAR2) 的竞争程度 (完全、部分和无竞争) 的示例,并从而表明多样性。在全长StaR纳米盘的竞争中,针对R&D抗huPAR2 (MAB3949) 的剂量响应来滴定50nM候选mAb。完全竞争和部分竞争二者均表现出剂量依赖性的结合作用。对于参考Ab ‘基准1’ (N端结合剂) 或 ‘MOR03207’ (用作阴性对照的抗溶菌酶抗体), 没有观察到剂量依赖性结合作用或与MAB3949的竞争。数据显示为信号除以背景 (S/BG)。

[0143] 图3:通过FACS测量的以下剂量依赖性结合:A) 基准1mAb和MAB3949与CHO\_V5HIS-huPAR2细胞vs CHO亲本细胞上细胞表面表达的PAR2的剂量依赖性结合,以表明测定设置的有效性;BG=背景;B) 克隆Y022065与CHO\_V5HIS-huPAR2细胞vs CHO亲本细胞经重组表达的PAR2的剂量依赖性结合;C) 克隆Y022065与内源性表达人PAR2的A549细胞和表达小鼠PAR2的CHO细胞的剂量依赖性结合。BG=背景。数据显示为相对发光单位 (relative luminescence unit, RLU)。

[0144] 图4:通过流式细胞术来了解抗体克隆结合全长huPAR2 (FL-N, 第二行) 和N端截短的huPAR2 (截短, 第一行) 的能力。得到的数据表明,不仅能够鉴定与N端优先结合的抗体克隆 (全长受体, 例如Y022066), 而且能够鉴定与经截短和全长受体结合的其他抗体克隆 (例如Y022065、Y022071) (其中表位还包含胞外结构域的一部分) 以及结合经截短受体而非全长受体的克隆 (例如YY22075)。

[0145] 图5:使用IntelliCyt进行的多重谱分析。该图示出了表达人PAR2的细胞上的经纯化IgG1f\_AEASS的结合。数据为克隆 ‘Y022065’ (功能性候选物) 的示例性数据。顶部) HEK Flp-In TRex 293\_huPAR2表达经诱导、HEK Flp-In TRex 293\_huPAR2未经诱导、Flp-In CHO\_V5His\_huPAR2、亲本Flp-In CHO细胞和Flp-In CHO\_huPAR1。底部) 经BacMam WT FL-huPAR2感染的HEK293F和未经感染的HEK293F。数据显示为信号除以背景 (S/BG)。

[0146] 图6:在肽抑制测定中使用Cisbio® IP-One G $\alpha$ q测定在两种浓度下一式两份地进行的对Y021171、Y022063和Y022054&Y022065hIgG1f\_AEASS的功能表征。在最高测试浓度下,对于四种克隆针对6.28nM单独激动剂的响应观察到了对激活肽诱导的人PAR2激动的统

计学上显著的抑制,为17%至43%。Y022065被确定为最具活性的候选物。数据显示为以单份运行的2个独立实验的带有标准偏差的平均响应。

[0147] 图7:使用嵌入纳米盘的人PAR2 **StaR**<sup>®</sup>和经纯化的可溶性**StaR**<sup>®</sup>蛋白进行的解离速率常数排序(Koff-ranking)的ELISA,其中亲本候选物代表被鉴定为在功能上具有双重活性的22种成熟IgG候选物的谱系(lineage)。数据显示为信号除以背景(S/BG)。

[0148] 图8:通过在FlpIn CHO-V5His-huPar2相对于FlpIn CHO亲本细胞上的亲本谱系所示出的亲和力成熟克隆的结合特异性。

[0149] 图9:格式化为Fab片段的亲和力成熟的克隆与表达人PAR2的CHO细胞结合,如通过流式细胞术进行评估。数据显示为信号除以背景(S/BG)。

[0150] 图10:格式化为IgG或fAb的亲和力成熟的克隆与食蟹猴(IgG)和人-PAR2(fAb) BacMam感染的HEK293细胞结合,如通过流式细胞术进行评估。数据显示为信号除以背景(S/BG)。

[0151] 图11:与基准mAb相比,亲和力成熟的先导mAb组作为Fab片段和IgG与表达人和食蟹猴PAR2的细胞结合的确。将抗体与人PAR-2和食蟹猴PAR-2过表达细胞在具有叠氮化钠的情况下在约5°C下孵育过夜。所有抗体作为Fab片段以及作为完整IgG这两种情况下均显示出明显与食蟹猴PAR-2和人PAR-2结合。数据显示为信号除以背景(S/BG)。

[0152] 图12:在针对PAR2激活肽的抑制测定中对先导优化克隆(lead optimized clone)的功能表征。IP-One测定用于测量IP积累作为体外人PAR2活性和Gαq激活的函数。每个值代表在对各个先导克隆进行重复测试的最高浓度下,针对10μM MAB3949归一化的抑制%。先导克隆已与亲本IgG进行比对。对于从所有亲本IgG中成熟的先导克隆均观察到了激活肽的抑制。相对于R&D System抗人PAR2 MAB3949,在所测试的克隆中抑制百分比为0至约250%,这表明在相当的浓度下,与MAB3949相比时,大量先导克隆显示出更大的对人PAR2的激活肽激动的抑制。通过亲和力成熟得到的来源于亲本IgG Y021171和Y022065的先导克隆表现出了最大比例的活性物(active)。

[0153] 图13:在针对牛胰蛋白酶的抑制测定中对优化的先导克隆的功能表征。IP-One测定用于测量IP积累作为体外人PAR2活性和Gαq激活的函数。每个值代表在对各个先导克隆进行重复测试的最高浓度下,针对1μM基准1归一化的抑制%。先导克隆已与亲本IgG进行比对。对于从所有亲本IgG中成熟的先导克隆均观察到了牛胰蛋白酶的抑制。相对于基准1,在所测试的克隆中抑制百分比为0至约130%。从IgG Y022065的成熟中鉴定出的先导克隆显示出了最大比例的针对牛胰蛋白酶攻击(challenge)的活性物。来源于Y021171的两个代表显示出了最高的抑制%。

[0154] 图14:在响应于用牛胰蛋白酶进行HT-29攻击以激活内源性PAR2而测量的钙动员测定中,与基准1和基准2相比,亲本克隆(Y022065)和亲和力成熟的先导代表(Y022870、Y022877、Y022883)的剂量响应抑制剂曲线的图示。数据显示为以重复孔运行的3个独立实验的带有标准偏差的平均响应。

[0155] 图15:为确定pH对Y022883与PAR2结合的影响而通过Biacore进行的SPR评价。

[0156] 图16:通过KinExA进行的先导候选物Y022870和Y022883对HEK-293F-表达人PAR2的细胞的亲和力确定。

[0157] 图17:由亲本家族起源(derivation)得到的亲和力成熟克隆的表位分箱矩阵。抗

huPAR2是MAB3949。

[0158] 图18:PAR2的后视图(ECL3、区段1和螺旋0/1)。由HDX得出的PAR2中与Y022883相互作用的区域显示为阴影区域。

[0159] 图19:PAR2的俯视图(ECL3、区段1和螺旋0/1)。由HDX得出的PAR2中与Y022883相互作用的区域显示为阴影区域。

[0160] 图20:PAR2的侧视图(ECL3、区段1和螺旋0/1)。由HDX得出的PAR2中与Y022883相互作用的区域显示为阴影区域。

[0161] 图21:使用流式细胞术对用基准1(N端结合剂)或Y022883染色的经BacMam感染的HEK293F细胞所检测到的WT和突变(S60W、D62F、G318F、D62G&E63G)人PAR2的表达谱。仅2<sup>nd</sup>:仅二级FACS抗体;n.i.:未经感染。

[0162] 图22:在单次静脉内给药10mg/kg Y022883之后相对于时间的大鼠血清mAb浓度。数据显示为来自3只雄性成年动物的带有95%置信区间(实心条)的平均值(空心圆圈);还示出了单独动物数据(经填充圆圈);在BLOQ(5ng/mL)或低于BLOQ(5ng/mL)的可检测mAb浓度被报道为BLOQ/2(虚线)。

[0163] 图23:在单次静脉内给药10、3或1mg/kg Y022883之后相对于时间的食蟹猴血清mAb浓度。数据显示为来自3只雄性成年动物的带有95%置信区间(实心条)的平均值(10mg/kg空心圆圈,3mg/kg实心方形,1mg/kg实心三角形);还示出了单独动物数据(10mg/kg空心圆圈,3mg/kg空心方形,1mg/kg空心三角形);在BLOQ(5ng/mL)或低于BLOQ(5ng/mL)的可检测mAb浓度被报道为BLOQ/2(虚线)。

[0164] 图24:在Y022883的单次10mg/kg给药之后的食蟹猴离体药效学。数据显示为给药前刺激剂诱导的(PAR2-AP为圆圈,胰蛋白酶为方形,LPS为三角形)基因特征的百分比。

[0165] 图25:在Y022883的单次3mg/kg给药之后的食蟹猴离体药效学。数据显示为给药前刺激剂诱导的(PAR2-AP为圆圈,胰蛋白酶为方形,LPS为三角形)基因特征的百分比。

[0166] 图26:在Y022883的单次1mg/kg给药之后的食蟹猴离体药效学。数据显示为给药前刺激剂诱导的(PAR2-AP为圆圈,胰蛋白酶为方形,LPS为经填充的三角形)基因特征的百分比。

[0167] 图27:Y022883(SH-C)和基准II(SH-D)对胰蛋白酶诱导的T84细胞中的p38-MAPK和pERK磷酸化的抑制。数据显示了相对于用载剂进行的处理的水平,并且相对于总ERK或p38-MAPK归一化。

[0168] 图28:Y022883(SH-C)和基准II(SH-D)对PAR2-AP诱导的T84细胞中的p38-MAPK和pERK磷酸化的抑制。数据显示了相对于用载剂进行的处理的水平,并且相对于总ERK或p38-MAPK归一化。

[0169] 图29:Y022883(SH-C)和基准II(SH-D)对胰蛋白酶和PAR2-AP诱导的T84细胞中的pERK(左)和p38-MAPK(右)磷酸化的抑制。数据显示了作为载剂与阳性对照之间差异百分比的水平。

[0170] 实施例

[0171] 现在将通过实施例并参考上述图来举例说明本发明的某些方面和实施方案。

[0172] 实施例1——全长和N端截短的人PAR2构建体的产生

[0173] 设计PAR2构建体

[0174] 基于Hutchison et al.,1978,使用标准定点突变策略来编辑人蛋白酶激活受体2 (PAR2) 的基因,以通过引入九个点突变来将受体稳定为拮抗剂构象 (Cheng et al 2017)。被稳定的受体还在N端被遗传截短了54个氨基酸 (编码的构建体中的第一个残基是V55), 或者使用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction,PCR,基于Saiki et al.,1985) 保持全长 (FL-N), 这在本领域中是广泛已知的。所有四种PAR2蛋白还在C端被遗传截短了20个氨基酸 (最后一个残基K377) 作为被稳定受体过程的一部分。

[0175] 产生了以下构建体:

[0176] PAR2-1:P151:55-377,糖基化的,pFastBacHisStrepII,经截短的

[0177] PAR2-2:P166:1-377,去糖基化的:N30Q,N222Q,pFastBacHis StrepII,全长的

[0178] PAR2-3:P157:1-377,糖基化的,pBacMamHisStrepII,全长的

[0179] PAR2-4:P155:55-377,糖基化的,pBacMamHisStrepII,经截短的

[0180] 产生足够稳定用作抗原的N端截短的PAR2受体的理由是使得能够发现和鉴定与受体仅除N端之外的其他区域结合的抗体,从而产生新的抗体。

[0181] 通过对FL-N蛋白PAR2-2中的谷氨酰胺残基的定点突变,替换了潜在的糖基化位点N30和N222。

[0182] 通过技术人员已知的PCR和内切核酸酶克隆策略将StrepII和十-组氨酸标签添加至C端,以允许在ELISA测定中进行亲和纯化和特异性选择。将PAR2-1和PAR2-2基因克隆到pFastBac1载体 (Thermofisher,#10360014) 中。载体的多克隆位点经修饰以允许使用NheI作为限制性内切核酸酶来插入基因。pFastBac1载体是用于昆虫细胞的商业Bac-to-Bac表达系统 (Smith et al.,1983,Thermofisher,#10359016) 的一部分,其在本领域中是已知的并被广泛使用。我们遵循了制造商的说明。Bac-to-Bac表达系统用于PAR2-1蛋白和PAR2-2蛋白。pFastBac1载体经修饰以通过多角体启动子之后引入人巨细胞病毒启动子3' 来产生pBacMam载体,从而允许哺乳动物细胞中蛋白质PAR2-3和PAR2-4的蛋白质表达。Bac-to-Bac表达系统的说明也应用于pBacMam病毒产生。

[0183] 表达

[0184] 通过用2.7%病毒以 $2.5 \times 10^6$ /ml的细胞密度进行48小时的病毒感染,在具有10%胎牛血清白蛋白 (FBS,Sigma-Aldrich,#F9665) 并补充有5mM丁酸钠 (Sigma-Aldrich,#303410) 的Lonza Pro293s CDM培养基 (#BE02-025Q) 中,在人胚胎肾293F细胞 (Gibco 293F细胞,Thermofisher Scientific,#11625019) 中表达了蛋白质PAR2-3和PAR2-4。收获细胞并如下所述进行处理以用于Sf9-细胞表达。哺乳动物细胞系用于构建体表达,以便提供利用含有哺乳动物样糖基化模式的抗原的选择。

[0185] 在具有10% FBS (Sigma-Aldrich,#F9665) 的表达系统ES921培养基 (#96-001-01) 中,在草地贪夜蛾Sf9 (*Spodoptera frugiperda* Sf9) 细胞 (Thermofisher,#89070101) 中表达了蛋白质PAR2-1和蛋白质PAR2-2。以 $3.5 \times 10^6$ /ml的细胞密度在为2的感染复数 (multiplicity of infection,MOI) 下感染细胞。在48小时之后通过离心收获细胞,将其用补充有Roche无EDTA完全蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor,PI,Sigma-Aldrich,#5056489001) 的50mM HEPES pH 7.5,250mM NaCl (PAR2缓冲液) 洗涤,并储存在-80°C下。为了制备细胞膜,将细胞重悬在补充有PI片剂 (PAR2/PI) 的PAR2缓冲液中,并随后经由单通过 (single pass through) 微流控微流化器处理器进行均质化。通过在Beckman 45Ti转子中

以135,000g超速离心1小时来收集膜,将其均质化到PAR2/PI缓冲液中并储存在-80℃下。所有后续纯化步骤均在4℃下进行。

#### [0186] 纯化

[0187] 通过添加1% (w/v) LMNG (Anatrace, #NG310) / 0.1% (w/v) 胆固醇半琥珀酸酯 (cholesteryl hemisuccinate, CHS, Anatrace, #210) 混合物1小时来溶解经解冻的膜。通过在Beckman 45Ti转子中以205,000g超速离心30分钟来去除不溶性物质。在存在8mM咪唑的情况下,将蛋白质分批结合至8ml NiNTA Superflow树脂(Qiagen, #30430)持续2小时。将树脂装入XK 16/20柱(GE Healthcare, #GE28-9889-37)中,并用15柱体积(column volume, CV)的高盐缓冲液A1 (50mM HEPES pH 7.5, 500mM NaCl, 0.02% LMNG, 0.002% CHS, 75mM咪唑)和3CV的缓冲液A2 (50mM HEPES pH 7.5, 250mM NaCl, 0.02% LMNG, 0.002% CHS, 75mM咪唑)洗涤。将蛋白质用补充有300mM咪唑的缓冲液A2洗脱,并使用具有100kDa分子量截留值的Amicon Ultra-15再生纤维素浓缩器(Millipore, #UFC900308)浓缩至0.5ml。通过使用TLA-100.2转子在Beckman Coulter台式离心机中以220,000g超速离心10分钟来去除聚集的物质。然后使样品在Superdex 200 10/300GL柱(GE Healthcare, #17-5175-01)上,在50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 0.02% LMNG, 0.002% CHS中进行尺寸排阻色谱分析。将对应于单体物质的级分合并,并使用具有100kDa分子量截留值的Vivaspin 500浓缩器(Vivaproducts, #VS0242)浓缩至6至8mg/ml。通过SDS-PAGE和分析性凝胶过滤来分析样品纯度和单分散性。采用Nanodrop分光光度计(ThermoFisher Scientific)使用分子量、消光系数和280nm处的蛋白质吸光度来确定蛋白质浓度。通过质谱检查蛋白质以确定目的蛋白质。

#### [0188] 嵌入纳米盘的人PAR2 StaR蛋白的制备

[0189] 纳米盘的制备在本领域中是已知的,并且基于Banerjee et al., 2008,使用斑马鱼载脂蛋白-1 (ZAP1)作为具有N端六-组氨酸标签的支架蛋白。将蛋白质PAR2-1和蛋白质PAR2-2在100至200 $\mu$ M下重构到纳米盘中,并用作用于Fab选择的抗原。为了重构纳米盘,首先将以下脂质重悬在水性200mM脱氧胆酸钠溶液(Sigma-Aldrich, #6750)中:比率为3:2:0.5的POPC(1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱, Anatrace, #P616)、POPG(1-十六烷酰基-2-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸甘油, Anatrace, #P516)和胆固醇(Anatrace, #CH200)。PAR2:POPC:POPG:胆固醇:脱氧胆酸钠各自的最终摩尔比为1:72:48:12:264。最终脱氧胆酸钠浓度保持在高于15mM,并用10mM HEPES 7.4, 150mM NaCl缓冲液进行调节。

[0190] 在冰上进行30分钟孵育之后,以1:2PAR2:ZAP1的摩尔比添加斑马鱼载脂蛋白1 (ZAP1)。将混合物在冰上孵育1小时。然后,通过采用生物珠(Bio-bead) SM-2 (Bio-Rad, #1528920)以1:1比率的蛋白质溶液与干生物珠重量(例如900 $\mu$ l蛋白质对900 $\mu$ g生物珠)将样品搅拌过夜来去除洗涤剂。将纳米盘作为上清液回收,并将珠用50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl洗涤,两份体积用于一份重量的珠(例如1.8mL用于900 $\mu$ g珠)。将蛋白质溶液浓缩至低于1mL,以13,500g在台式离心机中离心15分钟,并且将上清液在如以上所使用的Superdex 200 10/300GL柱(GE Healthcare)上在50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl中进行尺寸排阻色谱分析。将代表纳米盘峰的级分合并,并且在Amicon Ultra-4再生纤维素浓缩器(100kDa分子量截留值, Millipore, #UFC810096)中浓缩至1至2mg/mL并在-80℃下等分冷冻。

**[0191] 实施例2——筛查**

**[0192]** 从噬菌体展示文库中鉴定出本公开内容的抗体或抗原结合片段。本领域已知多种方法,用于产生噬菌体展示文库并对这样的文库进行筛查以得到具有期望结合特征的抗体。用于鉴定本文中提供的抗体的噬菌体展示文库是基于Ylanthia(Tiller et al.2013)概念的**Ylanthia®**噬菌粒,并采用CysDisplay™技术以在噬菌体表面上展示Fab(Lohning et al.2000)。

**[0193]** 设计了十种淘选(pan)策略(包括使用本领域已知技术的固相淘选、捕获淘选和全细胞淘选),其中着重于使用全长或N端截短的嵌入纳米盘的人PAR2 StaR蛋白进行的固相淘选。实施了多种抗原呈递技术,以确保嵌入纳米盘的PAR2 StaR的完整性和稳定性以及降低在淘选过程期间针对其他不期望表位具有特异性的候选物富集的风险。嵌入纳米盘的人PAR2 StaR变体用作淘选抗原(即无洗涤剂状态)。对于大多数淘选策略,嵌入纳米盘的人PAR2 StaR蛋白是通过标签特异性捕获抗体呈递的。实施了捕获模式的交替,以降低对捕获抗体基准1(Giblin et al 2011)、抗组氨酸-Ab IgG1(StrepMAB-Immo)或试剂(NiNTA)具有特异性的候选物富集的风险。对于一些策略,对表达人PAR2的Flp-In CHO和经BacMam感染的HEK293F细胞进行了差异性全细胞淘选。采用对StaR的交替淘选以及随后的细胞淘选,以降低对其他细胞靶标具有特异性(脱靶结合)的候选物富集的风险。为了扩增与人PAR2的功能活性配体竞争的噬菌体-抗体,使用嵌入纳米盘的人PAR2 StaR变体PAR2-2 P166:1-377,去糖基化的:N30Q,N222Q,pFastBacHis StrepII或hPAR2(55-377\_10xH\_Sx2(经截短的)PAR2-1:P151:55-377,糖基化的,pFastBacHisStrepII),其用市售的小分子配体AZ8838和AZ3451进行饱和(Cheng et al 2017)进行淘选。这些淘选导致鉴定了大量的**Ylanthia®**候选物,其对在许多不同细胞背景中表达的人PAR2受体具有多半良好的特异性。为了更严格地不去选择非特异性结合的噬菌体,在每一轮固相淘选之前对无关抗原组分进行预吸附。无关抗原组分包括Ni-NTA、空纳米盘以及捕获抗体抗StrepII mAb(StrepMAB-Immo)和抗多6x组氨酸-Ab IgG1(R&D MAB050)、或嵌入纳米盘的替代GPCR(仅用于成熟淘选)。

**[0194] 噬菌体制备**

**[0195]** 呈递Fab的噬菌体颗粒的产生:每一个选择轮次均产生了新的在其表面上呈递Fab片段的噬菌体颗粒。因此,将大肠杆菌(E.coli)TG1培养物用来源于先前选择轮次的噬菌体感染。在离心之后,将细菌沉淀物重悬在新鲜培养基中并平板接种在琼脂板上。在长出(outgrowth)之后,将菌落从板上刮下并用于噬菌体救援(phage rescue)、所选定克隆的多克隆扩增和噬菌体产生。采用经纯化的噬菌体,开始下一个淘选轮次。在最后的淘选轮次之后,从琼脂板挑选单克隆,放入预填充有培养基的无菌微量滴定板的孔中。在长出之后,将含有甘油的培养基添加到主板(master plate)的每个孔中;将板用铝箔密封并储存在-80℃下。

**[0196]** 实施例3——通过ELISA来鉴定命中物以及通过FACS和IntelliCyt筛查来鉴定全细胞结合

**[0197] ELISA**

**[0198]** ELISA技术已被用于以下二者:对从靶抗原的淘选输出中鉴定到的单Fab克隆进行筛查,以及表征经纯化抗体。根据现有技术方法确定最佳抗原和抗体浓度以及封闭条件。

**[0199] 抗原的直接包被**

[0200] 将抗原固定在微量滴定板上。对板进行封闭,并用抗体例如含粗制大肠杆菌裂解物的Fab或经纯化的Fab或IgG样品进行孵育。使用碱性磷酸酶(alkaline-phosphatase,AP)偶联二抗以及与‘AttoPhos’荧光底物相组合来检测结合的抗体。在各个测定步骤之间进行了多个洗涤步骤。

#### [0201] 抗原捕获

[0202] 在其他ELISA设置中,通过包被在微量滴定板上的标签特异性抗体(例如抗StrepII、抗His或基准1参考mAb)将抗原捕获至板。使用相应的碱性磷酸酶(AP)偶联二抗以及与‘AttoPhos’荧光底物相组合来检测结合的抗体。在各个测定步骤之间进行了多个洗涤步骤。

#### [0203] 通过抗Fd ELISA进行的Fab表达检查

[0204] 为了证实粗制细菌裂解物中的Fab表达,将板用Fd片段特异性抗体包被。使用相应的碱性磷酸酶(AP)偶联抗Fab特异性抗体以及与‘AttoPhos’荧光底物相组合来检测结合的Fab。在各个测定步骤之间进行了多个洗涤步骤。

#### [0205] $K_{off}$ 排序的ELISA

[0206] 对于 $K_{off}$ 估计,将ELISA板在初始读出之后进行了另外的频繁且严格的洗涤,并进行了第二检测以鉴定kd缓慢的候选物。在检测之前,使用以下条件进行洗涤:用10分钟孵育洗涤5次,随后孵育过夜,并随后用10分钟孵育洗涤5次,随后进行1小时孵育,随后用5分钟孵育洗涤5次。使用相应的碱性磷酸酶(AP)偶联二抗以及与‘AttoPhos’荧光底物相组合来检测结合的抗体。

#### [0207] ELISA方法的实施

[0208] ELISA技术用于以下二者:对从靶抗原的淘选输出中鉴定到的单Fab克隆进行筛查,以及表征经纯化抗体。评价最佳抗原和抗体浓度以及封闭条件,并调整设置。

[0209] 在淘选选择之后,在初步筛查中对来自每第三个淘选轮次输出的368种克隆作为细菌裂解物进行处理。通过使用经标记的StaR变体或嵌入纳米盘的StaR在包被StaR的磁珠上或在ELISA中进行FACS来对固相淘选的淘选输出进行筛查。筛查主要对PAR2-1 P151变体(55-377,糖基化的,pFastBacHisStrepII)进行。反筛查(counter screening)主要包括空纳米盘以及抗Fd mAb和小鼠丙种球蛋白。

[0210] 二次筛查主要在ELISA中进行。抗原组包含PAR2-1:P151:55-377,糖基化的,pFastBacHisStrepII以及嵌入纳米盘的PAR2-2:P166:1-377,去糖基化的:N30Q,N222Q,pFastBacHis StrepII,其用配体AZ8838和AZ3451进行饱和。类似地,反筛查也扩展到捕获抗体StrepMAB-Imm和bRIL-His-StrepII。尽管细胞上的结合信号低,但所有目的克隆在细胞结合与对重组的嵌入纳米盘的StaR物质所获得的结合谱之间均显示出良好的相关性。

[0211] 这些被选择用于测序以及使得IgG转化为沉默的h\_IgG1f\_AEASS形式(IgG1 L234A L235E G237A A330S P331S;该形式已在Novo Nordisk的第二代抗C5aR抗体NNC0215-0384(Wagner et al.,2014)中进行了临床验证),并以先进的微量规模(micro scale)和/或探索性规模(exploratory scale)进行表达和纯化以用于表征。在功能鉴定之前,通过ELISA来重新筛查IgG(图1和2),并通过IntelliCyt来重新筛选细胞结合,以再确定结合特异性。

#### [0212] FACS和IntelliCyt

[0213] 为了筛查对PAR2结合剂的阳性鉴定而通过流式细胞术和IntelliCyt进行的细胞

## 结合

[0214] 使用来自淘选输出的粗制大肠杆菌裂解物或经纯化抗体,通过流式细胞术来鉴定与细胞表面表达抗原的结合事件。差异性全细胞淘选(differential whole cell panning, DWCP)的淘选输出的高通量初步筛查主要针对以下进行:人野生型表达PAR2的Flp-In CHO细胞(Flp-In CHO\_huPAR2)、GNTI BacMam野生型PAR2细胞和GNTI BacMam截短的PAR2 StaR相对于亲本Flp-In CHO细胞(PAR2阴性)或未经感染的HEK293GNTI-细胞。显示出与亲本Flp-In CHO细胞的背景结合升高的候选物被归为非特异性或脱靶结合剂。所有步骤均在FACS缓冲液(包含FCS和叠氮化钠)中进行,以防止潜在的受体内化。将细胞悬液转移到微量滴定板中并添加抗体样品,随后在4℃下对板进行后续孵育。针对所使用的板类型来调整样品体积和细胞数目。在孵育之后,将细胞离心并用FACS缓冲液洗涤。荧光团缀合的第二试剂用于检测结合的抗体。使用BD FACS阵列或IntelliCyt HTFC/iQue系统对板进行测量,并且使用FlowJo、ForeCyt或专有软件工具来分析数据(图3)。

[0215] 全细胞结合/特异性的性质的评价(FACS, IntelliCyt)

[0216] 如通过对表达人PAR2的Sf9细胞进行流式细胞术所评价的结合特异性

[0217] 使用表达PAR2的Sf9昆虫细胞进行对初始PAR2候选物的基于FACS的分析。为了了解抗体是否与受体的N端或胞外暴露部分的其余部分优先结合,将细胞用表达PAR-2StaR的全长N端(PAR2-3,1--377,在此描述为FL-N StaR)或N端截短的受体(PAR2-4,55-377,在此描述为N $\Delta$ 53StaR,或者在图4和7中为“经截短的”)进行感染。

[0218] 将200 $\mu$ L Sf9-细胞以 $4 \times 10^6$ 个细胞/mL在FACS缓冲液(PBS(Sigma, #F9665)、1% BSA(Sigma, #A9647)和Roche完全蛋白酶抑制剂(#11836145001))中用20nM目的抗体在室温下孵育1小时。使细胞进行沉淀,并将其用200 $\mu$ L FACS缓冲液洗涤三次。相继地,将细胞用200 $\mu$ L二级别藻蓝蛋白(APC)缀合的20nM抗人IgG孵育1小时,并用200 $\mu$ L FACS缓冲液再次洗涤三次。

[0219] 使用BD FACS Canto II FACS仪器来监测读出。

[0220] 产生了一系列具有不同结合谱(如通过流式细胞术所确定的)的结合剂,其中Y022075与经截短的受体优先结合,并且Y022065与经截短的受体和全长PAR2二者结合。相比之下,抗体克隆Y22066几乎仅与FL-N构建体结合。这些观察结果反映了表位的多样性(图4)。

[0221] 如通过IntelliCyt确定的结合特异性

[0222] 针对经纯化IgG而确定结合特异性,并且其作为n=2实验对表达人PAR2的细胞一式两份地以16点滴定进行。分析中包括以下细胞系:

[0223] • Flp-In CHO\_V5His\_huPAR2相对于亲本Flp-In CHO细胞

[0224] • Flp-In CHO\_huPAR1相对于亲本Flp-In CHO细胞

[0225] • HEK Flp-In TRex 293\_huPAR2表达经诱导,相对于未经诱导的细胞

[0226] • 经BacMam WT FL-huPAR2感染的HEK293F相对于未经感染的细胞

[0227] • 经BacMam WT FL-狨猴PAR2感染的HEK293F相对于未经感染的细胞

[0228] 所有目的克隆均起源于PAR2纳米盘淘选策略,其能够使得借助于通过经标记受体和/或纳米盘支架进行的抗体捕获来实现定向呈递,并能够使得显示出与不同细胞背景中表达PAR2的细胞的选择性结合。PAR2 StaR纳米盘制剂在无洗涤剂的环境中呈递与细胞上

表达的天然受体相当的高品质PAR2受体,并导致鉴定出极具前景、功能活性的候选物。另外,使用重组物质(例如StaR纳米盘)来容易地控制淘选严格性。

[0229] 通过IntelliCyt进行的多重化

[0230] 为了同时评价物种交叉反应性和/或不期望的与反靶标(counter-target)的结合,使用IntelliCyt的HTFC/iQue筛查平台以384孔板形式进行了筛查。HTFC/iQue筛查系统还用于评价与多个靶细胞系的结合或同时评价不期望的/非特异性结合,也就是说多重化。不同的细胞群可通过以下来区分:用不同量的荧光染料(例如钙黄绿素或细胞追踪剂绿色(Cell-Tracker Green))进行预标记,为每个细胞群建立独特的荧光强度特征,从而产生荧光编码系统。然后将颜色编码的细胞系与待测试的抗体物理组合并混合在一起。各个细胞系可通过已预标记的相应细胞系的荧光来鉴定。将粗制细菌细胞裂解物与细胞组合,并在轻轻摇动下在黑暗中在室温下孵育1小时。荧光测量采用IntelliCyt HTFC/iQue装置进行。在孵育步骤之间,不需要洗涤。原始数据借助于‘ForeCyt’软件进行评价。在数据采集之后,来自每个样品的细胞系可根据其荧光特征进行鉴定,并单独评价抗体结合。优化了每种细胞系的染色条件,以便找到允许分离不同细胞系的测定设置(图5)。

[0231] Y022065,最终先导集合的亲本,是通过采用捕获的嵌入纳米盘的去糖基化全长hPAR2(PAR2-2,1-377,N30Q,N222Q)\_10xH\_Sx2的淘选策略得到的。在第一和第三轮中,抗原用抗StrepII抗体捕获。在第二轮中,抗原用基准1捕获或包被在Ni-NTA板上。总之,特异性通过以下来评估:对在存在或不存在配体AZ8838和AZ3451的情况下与FL-StaR纳米盘和经截短StaR纳米盘的结合进行的基于ELISA的评估;对与反靶标的结合进行的基于ELISA的评估,所述反靶标包括空纳米盘、bRIL-His-StrepII、StrepMAB-Immo(捕获抗体)和小鼠丙种球蛋白;评估与以下表达PAR2的细胞系(n>2)的结合:CHO V5His\_huPAR2、HEK Flp-In TRex293\_huPAR2经诱导、经BacMam WT FL-huPAR2感染的HEK293F、A549、Flp-In CHO\_mPAR2(恒河猴(rhesus)、恒河猴(Macaca mulatta))、Flp-In CHO\_moPAR2(小鼠)、以及PAR2阴性细胞系(亲本Flp-In CHO、Jurkat、Flp-In CHO\_huPAR1)。

[0232] 实施例4——Fab片段和IgG的表达和纯化

[0233] 亚克隆到Fab表达载体中

[0234] 如果需要并为了促进大肠杆菌中可溶性Fab的快速表达,则将所选定Ylanthia®噬菌体的Fab编码插入物从pYPdis10展示载体亚克隆到包含期望特征的Fab表达载体(pYBex10\_h\_Fab-FH)中。通过经由XbaI|EcoRI-HF|PstI-HF进行的三重消化来进行亚克隆。

[0235] 为了HKB11细胞中的全长FabCys表达,还将选定的候选物克隆到pYMex10\_h\_FabCys-AviH表达载体中。亚克隆通过以下进行:将抗体编码片段用限制性酶NdeI|XhoI从pYMex\_h\_IgG1f\_AEASS源载体中切出,并连接到靶载体pYMex10\_h\_FabCys-Avi-His中。

[0236] 亚克隆到IgG表达载体中

[0237] 为了HKB11细胞中的全长IgG表达,将选定的候选物克隆到pYMex10\_h\_IgG1f\_AEASS表达载体中。使用方便且有效地将大量序列独特的Fab克隆转化成IgG形式的方法进行亚克隆。简言之,将VH编码片段(侧接NheI|XhoI的限制性位点)、VL编码片段(侧接NdeI|KpnI的限制性位点)以及κ或λ特异性真核pYMin表达盒(侧接KpnI|NheI的限制性位点)克隆到受体载体中,以用于以一步或两步克隆在哺乳动物细胞中表达(用NdeI|XhoI进行消化)。在大肠杆菌XL-1blue细胞转化(transformation)之后,通过菌落PCR和对整个插入区测序

来对单克隆进行质量控制。

[0238] 为了在HKB11细胞中的大规模表达,将选定的候选物克隆到含有吉欧霉素(Zeocin)抗性基因的pCMex003/004\_kan\_h\_IgG1f\_AEASS表达载体中,用于产生稳定的库(pool)。简言之,将VH编码DNA片段、VL编码DNA片段和 $\lambda$ 特异性真核pYMin表达盒克隆到接受载体pCMex003/004\_kan\_h\_IgG1f\_AEASS中。

[0239] 含Fab片段的细菌裂解物的产生

[0240] 使用来自主板的甘油储备物对预填充有生长培养基(含氯霉素、IPTG和0.1%葡萄糖的2xYT)的96孔/384孔微量滴定板进行接种。将板在37°C下孵育用于细菌长出,并在22°C下摇动过夜用于Fab表达。次日,通过添加含有硼酸盐缓冲液、EDTA和溶菌酶的BEL缓冲液来将表达培养物裂解。根据所选定的板形式和应用,调整体积并相应地调整封闭方案。如果裂解物用于敏感细胞筛查,例如功能测定,则省略EDTA。

[0241] Fab片段的探索性规模产生

[0242] 使用500mL补充有0.1%葡萄糖和34 $\mu$ g/mL氯霉素的2xYT培养基,在摇瓶培养物中进行大肠杆菌TG1 F-细胞中细菌表达载体所编码的Fab片段的表达。摇动培养物,直至OD600达到0.5的值。通过添加IPTG(异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)并进一步培养20小时来诱导Fab表达。收获细胞并使用溶菌酶将其破坏。将His6标记的Fab片段通过IMAC (Bio-Rad | Germany)来分离,并使用咪唑进行洗脱。使用‘PD10’柱(GE Healthcare | Germany)进行缓冲液交换至1 $\times$ Dulbecco’s PBS (pH 7.2)。将样品进行无菌过滤(0.2 $\mu$ m)。通过UV-分光光度法确定蛋白质浓度。在变性、非还原性15% SDS-PAGE中分析样品的纯度。采用校准标准品通过尺寸排阻色谱(HP-SEC)确定天然状态下Fab制剂的均匀性。

[0243] 哺乳动物细胞中IgG的微量规模产生

[0244] 用编码IgG重链和轻链二者的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11或HEK293-6E细胞。在转染之后7天收获细胞培养上清液,并使用液体处理站进行蛋白A亲和色谱分析(MabSelect SURE | GE Healthcare)。除非另有说明,否则将样品保留在中和的洗脱缓冲液(NaPS:137mM磷酸Na,81mM NaCl,pH 7)中。将样品进行无菌过滤(0.2 $\mu$ m孔尺寸)。通过UV-分光光度法确定蛋白质浓度,并使用CE-SDS (LabChip GXII | Perkin Elmer | USA)在变性、还原性条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析天然状态下的IgG制剂。

[0245] IgG的探索性规模产生

[0246] 用编码IgG重链和轻链二者的哺乳动物表达载体DNA来转染真核HKB11或HEK293-6E细胞。在转染之后第3或6天收获细胞培养上清液,并进行标准蛋白A亲和色谱分析(MabSelect SURE | GE Healthcare)。除非另有说明,否则进行缓冲液交换至1 $\times$ Dulbecco’s PBS (pH 7.2 | Invitrogen),并将样品进行无菌过滤(0.2 $\mu$ m孔尺寸)。通过UV-分光光度法确定蛋白质浓度,并使用CE-SDS (LabChip GXII | Perkin Elmer | USA)在变性、还原性和非还原性条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析天然状态下的IgG制剂。

[0247] AviHis标记的FabCys的探索性规模产生

[0248] 用编码二硫键桥接FabCysAviHis的重链和轻链二者的哺乳动物表达载体DNA来转染真核HKB11或HEK293-6E细胞。在转染之后第3或7天收获细胞培养上清液,并进行金属离子亲和色谱分析(Protino Ni-NTA | Macherey Nagel)。除非另有说明,否则进行缓冲液交换至1 $\times$ Dulbecco’s PBS (pH 7.2 | Invitrogen),并将样品进行无菌过滤(0.2 $\mu$ m孔尺寸)。通

过UV-分光光度法确定蛋白质浓度,并使用CE-SDS (LabChip GXII|Perkin Elmer|USA) 在变性、还原性和非还原性条件下分析FabCysAviHis的纯度。进行HP-SEC以分析天然状态下的FabCysAviHis制剂。

[0249] 用于体内表征的IgG产生

[0250] 通过建立稳定的HKB11细胞库 (pool1) 进行物质产生。用编码IgG重链和轻链二者的哺乳动物表达载体DNA来转染真核HKB11细胞。为了产生稳定表达的细胞库,相应载体还另外含有吉欧霉素抗性基因。在转染之后三天,通过将160 $\mu$ g/mL吉欧霉素添加至细胞悬液从而开始选择。在选择期间,细胞计数和生存力最初降低。在转染之后20至30天,细胞开始恢复。达到约80%的生存力时,稳定的库被扩大规模至期望的量。在转染之后第6天收获细胞培养上清液,并进行蛋白A亲和色谱分析 (MabSelect SURE|GE Healthcare)。如果需要的话,则进行第二纯化步骤 (制备型SEC|Superdex 200|GE Healthcare) 以去除聚集体。进行缓冲液交换至1 $\times$ Dulbecco's PBS (pH 7.2|Invitrogen),并将样品进行无菌过滤 (0.2 $\mu$ m孔尺寸)。通过UV-分光光度法确定蛋白质浓度,并使用CE-SDS (LabChip GXII|Perkin Elmer|USA) 在变性、还原性和非还原性条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析天然状态下的IgG制剂。通过KQCL测定 (Lonza) 来确定内毒素水平。使用质谱分析 (100MDL43) 来确定蛋白质身份。

[0251] 实施例5——先导分离物克隆谱分析

[0252] 用于鉴定功能性初步命中物 (functional primary hit) 而对人PAR2进行的基于细胞的IP-One  $\alpha$ q测定

[0253] 在ELISA和IntelliCyt中对克隆进行完全验证之后,进行了功能表征,以确定PAR2结合状态。使用Cisbio® IP-One  $\alpha$ q测定,在两种浓度下重复对探索性规模纯化的IgG1f\_AEASS克隆测试其对合成激动剂即激活肽 (2-Furyol-LIGRO) 激活PAR2受体的抑制能力。

[0254] 在生长培养基 (Pro293, 5% FBS, 1% Glutamax, 0.4% 青霉素/链霉素) 中,在存在0.5mM丁酸钠的情况下,用2% v/v人PAR2 BacMam病毒感染HEK293F细胞,在37 $^{\circ}$ C下具有5% CO<sub>2</sub>气氛的湿润培养箱中以悬浮液形式培养24小时。在实验当天,收获细胞并将其以1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml的密度重悬在含有LiCl和0.5%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, Sigma) 的测定缓冲液中,其密度为1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml (1份刺激缓冲液 (Cisbio) : 5份ddH<sub>2</sub>O)。以储备物浓度或在PBS中进行初始1:2稀释之后测试抗体。将任一浓度的抗体的5 $\mu$ l样品一式两份地 (in replicate) 添加至半区白色96孔板 (Corning), 随后是25 $\mu$ l PAR2细胞悬液 (PAR2 of cell suspension)。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后添加5 $\mu$ l/孔的激活肽,使最终激动剂攻击浓度为6.28nM。最终测定抗体筛查在Ab储备物的1:7或1:14稀释下进行。将板在37 $^{\circ}$ C下再孵育另外30分钟,然后添加在裂解缓冲液中的10 $\mu$ l IP-One detection kit (Cisbio)。将细胞板置于板振荡器上在室温 (room temperature, RT) 下持续1小时,然后在PHERAstar FS微板读取仪 (BMG Labtech) 上使用标准HTRF方案来读板,其中激发在335nm处并且发射读出在620nm和665nm处。HTRF比率按等式1计算。将响应针对在6.28nM (EC<sub>80</sub>) 最终测定浓度下对激活肽IP-One响应的抑制%归一化 (图6)。

[0255] 等式1: HTRF比率的计算

$$[0256] \quad \text{HTRF 比率} = \frac{665\text{nm 处的发射}}{620\text{nm 处的发射}} \times 10.000$$

[0257] 表2:对肽诱导的人PAR2激动的抑制

[0258] 在肽抑制测定中使用Cisbio®IP-One Gαq测定在最高浓度下一式两份地进行的对Y021171、Y022063和Y022054&Y022065hIgG1f\_AEASS的功能表征。也在图6中示出。

| 抗体克隆 ID        | % 最大抑制 AP ± SD | 重复次数 |
|----------------|----------------|------|
| Y022054        | 17 ± 10        | 2    |
| [0259] Y021171 | 32 ± 4         | 2    |
| Y022063        | 27 ± 5         | 2    |
| Y022065        | 43 ± 1         | 2    |

[0260] 亲和力确定

[0261] 使用抗体捕获设置通过SPR进行的 $K_D$ 、 $k_a$ 和 $k_d$ 确定

[0262] 对于 $K_D$ 确定,使用了抗体蛋白(Fab片段或IgG)的单体级分(至少90%单体含量,如通过分析型SEC所分析的)。如下所述,通过使用Biacore (Biacore T200)或Octet (QK384或HTX)仪器进行动力学表征来确定亲和力。

[0263] 在抗人IgG芯片表面上捕获抗体,随后注射100nM PAR2。将数据拟合至1:1相互作用模型,但排除克隆‘Y021160’,在该情况下使用异质配体模型,并使用缓慢解离的组分进行比较。

[0264] 表3:先导分离物克隆的Biacore

| 抗体克隆 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   |
| [0265] 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   |

[0266] 制备合适的高容量捕获表面,例如通过使用EDC/NHS化学作用将合适的捕获配体共价固定到CM5芯片(Biacore,GE Healthcare)或AR2G传感器(fortéBIO, Pall Corp.)上,或者通过使SA传感器负载生物素化的捕获试剂。合适的捕获系统的一些实例是抗hu-Fc抗体(Biacore,GE Healthcare)、蛋白A传感器(fortéBIO, Pall Corp.)、MabSelect Sure配体(GE Healthcare)和抗His-标签抗体(Genscript)。在动力学实验期间,使用六至八种不同的分析物浓度( $2^n$ 连续稀释)进行分析。在每个周期(cycle)之后,对传感器表面进行再生以去除捕获的抗体/抗原复合物,同时维持捕获表面的完整性。将运行缓冲液的空白注射用于进行参考。在所有实验中,测定缓冲液与PAR2蛋白的制剂相匹配,即基础缓冲液和洗涤剂。通过Fc-片段来捕获IgG,并且将洗涤剂(LMNG/CHS)溶解的FL-N PAR2 StaR(PAR2-3)用作溶液中的分析物。将50mM HEPES pH 7.5,150mM NaCl,0.02%LMNG用作测定缓冲液。将CM3传

传感器芯片用作固定高密度抗hu-Fc捕获抗体 (BR-1008-39, GE Healthcare) 的基础。以约500RU的相对高水平来捕获IgG, 以实现特异性结合与非特异性结合的更高比率 (同时仍维持适合于动力学表征的条件)。传感图用相应仪器的评价软件进行评价, 即Biacore T200评价软件3.x (Biacore, GE Healthcare) 或fortéBIO Octet数据分析 (fortéBIO, Pall Corp.)。将所有传感图拟合至1:1结合模型以确定 $k_a$ 和 $k_d$ 速率常数, 其用于计算 $K_D$ 。在Y021160的情况下, 应用异质配体模型, 并使用缓慢解离的组分来计算 $k_a$ 、 $k_d$ 和 $K_D$ 。

[0267] 对于三种经纯化的IgG1f\_AEASS克隆Y021171、Y022054和Y022063, 其与人PAR2-3变体 (P157:1-377, 糖基化的, pBacMamHisStrepII, 全长的) 的亲合力通过SPR固定IgG并用经洗涤剂 (LMNG/CHS) 溶解的FL-N PAR2 StaR进行探测来确定。对于Y022063和Y021171, 亲合力分别为22nM和20nM。与其他候选物相比, Y022054显示出2.5nM的10倍高的亲合力。Y021171显示出快速缔合 ( $k_a$ ), 但也显示出非常快速的解离 ( $k_d$ )。从结合亲合力向功能性抑制进行推断, 拮抗性抗PAR2抗体所需的亲合力被假定在<100pM范围内。在亲合力成熟活动期间实施了“解离速率 (off rate) 选择”策略 (Hawkins et al. 1992) 以改善 $K_D$ 特性, 特别对于Y021171。

[0268] 使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare) 进行PAR2与抗PAR2抗体相互作用的测定。通过胺偶联将抗人IgG抗体 (人抗体捕获试剂盒 (Human Antibody Capture Kit), GE Healthcare) 固定在传感器芯片CM3 (GE Healthcare) 上以使得表面密度为3500至4500共振单位 (resonance unit, RU)。在HBS-EP+缓冲液 (GE Healthcare) 中在25°C下进行固定。然后将缓冲液改变为50mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.02% LMNG, 0.002% CHS。每个周期的PAR2-抗体相互作用测定由以下组成: 抗体捕获 (以5 $\mu$ L/分钟的流量持续2分钟注射100nM抗体)、PAR2注射 (空白或250nM, 接触和解离时间分别为2分钟和3分钟, 流量为20 $\mu$ L/分钟) 以及使用来自人抗体捕获试剂盒 (GE Healthcare) 的再生溶液进行芯片表面再生 (以20 $\mu$ L/分钟进行30秒)。将减去空白的数据拟合至1:1相互作用模型, 以获得缔合和解离速率常数 $k_a$  ( $k_{on}$ ) 和 $k_d$  ( $k_{off}$ ) 以及亲合力常数 $K_D$ 。每个实验数据集之间的测量值均在该方法的可接受范围内。

[0269] 表4: 通过SPR进行的功能性候选物Y021171、Y022063和Y022054的亲合力确定

[0270] 在抗人IgG芯片表面上捕获抗体, 随后注射250nM PAR2。将数据拟合至1:1相互作用模型。

|        | 克隆      | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|--------|---------|--------------|-------------|-----------|
| [0271] | 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   |

[0272] 实施例6——亲合力成熟/先导优化和噬菌体选择

[0273] 在IP One测定中, 数种IgG克隆包括Y021171、Y022054、Y022063和Y022065部分地抑制了PAR2-AP激活。数种其他克隆 (但不是这四种功能性候选物中任一种) 显示出对非人灵长类 (non-human primate, NHP) PAR2具有交叉反应性, 并且尽管人和恒河猴PAR2序列彼此之间在胞外结构域方面具有高度同一性, 但在亲合力成熟之前, 没有一种克隆显示出对

FlpIn CHO\_maPAR2 (恒河猴 (rhesus)、恒河猴 (Macaca mulatta)) 或 FlpIn CHO\_moPAR2 (小鼠) 具有明显的交叉反应性。

[0274] 成熟文库

[0275] 噬菌体成熟文库的产生: 成熟文库的克隆在编码亲本 Fab 片段的 CysDisplay™ 载体中进行。编码亲本 Fab 片段的 DNA 序列如果尚未存在于 CysDisplay™ 载体中, 则在进行文库克隆之前通过限制性消化和连接来将其转移到相应的载体中。为了提高亲和力和生物活性以及降低所选抗体候选物的非特异性, 并行优化了 CDR-L3 和 CDRH-1/CDR-H2 区。由于其模块化结构, MorphoSys 的抗体文库被设计成用于通过 CDR 交换进行亲和力优化, 其中抗体的单个 CDR 被切除并被大的 CDR 文库的单独成员替代 (Prassler et al. 2009)。Ylanthia® 成熟模块 (Ylanthia® maturation module, YMM) 是基于 Ylanthia 文库设计, 并采用 Slonomics® 技术进行预构建 (van den Brulle et al. 2008)。对每种成熟候选物单独进行成熟文库的产生。为了监测克隆效率, 将亲本 CDR-L3 替代为 Ylanthia 成熟填充物 (Ylanthia Maturation Stuffer, YMS), 然后插入多样化的 LCDR-L3 YMM。将消化的载体片段与 2 倍摩尔过量的携带多样化 CDR-L3 的插入物片段连接。同样的程序也适用于 CDRH-1 & CDR-H2 的多样化。将连接混合物在大肠杆菌 MC1061F' 细胞中电穿孔, 产生 >108 个独立菌落。按文献中所述进行文库的扩增 (Tiller et al. 2013)。为了进行质量控制, 随机挑选了每个文库的约 10 种单克隆, 并进行 Sanger 测序。

[0276] 根据以下科学依据和标准来选择成熟候选物:

[0277] 1. 不去选择由于对以下的结合提高而导致脱靶结合风险提高的候选物:

[0278] • PAR2-阴性抗原 (ELISA): 空纳米盘、小鼠 IgG、抗 StrepII、bRIL

[0279] • PAR2-阴性细胞系 (FACS): 亲本 Flp-In CHO 细胞、Flp-In CHO\_huPAR1 和 Jurkat 细胞

[0280] 2. 不去选择与 N 端的膜远端部分优先结合的候选物 (通过对 FL-StaR 纳米盘相对于经截短 StaR 纳米盘进行的比较性 ELISA 来评估)

[0281] 将人 PAR2 特异性 IgG1f\_AEASS 候选物如下排序:

[0282] 1. 功能活性候选物;

[0283] 2. 与细胞表面表达的人 PAR2 结合, 其中着重于经 WT FL-huPAR2BacMam 感染的功能活性 HEK293F 细胞系, 作为评估功能的先决条件;

[0284] 3. 与功能活性候选物 Y021171 候选物和/或功能活性 R&D 抗 PAR2 试剂 mAb MAB3949 的结合竞争, 因为已公开的 PAR2 结构 (Cheng et al., 2017) 表明该试剂抗体与胞外环相互作用。

[0285] 表 5: 成熟候选物的概述

|        | 抗体克隆 ID | VH/VL         | 与 R&D mAb 竞争 | 与 Y021171 竞争 | 人 PAR2 结合 | 恒河猴 PAR2 结合 |
|--------|---------|---------------|--------------|--------------|-----------|-------------|
|        | Y021171 | VH3-21/Vk1-12 | 未确定          | 参考           | 是         | 否           |
| [0286] | Y022054 | VH3-07/Vk1-12 | 否            | 是            | 是         | 否           |
|        | Y022063 | VH3-23/Vλ2-23 | 是            | 否            | 是         | 否           |
|        | Y022065 | VH3-23/Vλ2-23 | 是            | 是            | 是         | 否           |

[0287] 亲和力成熟的主要目标是改善现有特征并且通常不导致靶表位的置换。观察到在 IgG 特征方面,功能性候选物对恒河猴 PAR2 不具有交叉反应,然而非功能性候选物与该物质结合。由于缺乏重组恒河猴 PAR2 StaR 抗原物质,因此实施了差异性全细胞淘选策略 (DWCP)。

[0288] SPR 数据突出了 Y021171 的快速解离速率 ( $k_d$  (1/秒) 为 0.01)。因此,在第三个成熟淘选轮次期间,实施了所谓的“解离速率选择”程序 (Hawkins et al., 1992),以富集解离速率提高的候选物。由于 SPR 数据并非都可用于所有成熟候选物,因此该方法仅限于包括功能性候选物的淘选策略。

[0289] 在成熟期间,使洗涤严格性相比于淘选轮而提高,例如,通过增加洗涤步骤的数目和持续时间(例如过夜洗涤)。在解离速率选择策略中使用长时间或过夜洗涤并连同将可溶性抗原添加至洗涤缓冲液,以防止抗体-噬菌体与经固定的抗原进行任何再结合。

[0290] 九种亲本克隆进展到了亲和力成熟活动中,涵盖了所有可用的结合谱和潜在的作用模式。为了提高先前选定的抗体片段的亲和力和生物活性,将 CDR-L3 或 CDR-H1&CDR-H2 区通过多样化模块进行并行交换 (Prassler et al. 2009)。使用特定的 Ylanthia® 成熟模块 (YMM) 来保存固定的 VH/VL 人种系框架对,以避免出现交叉-克隆或另外的框架组合。在进行亲和力成熟的文库克隆之前,将亲本 Fab 片段从相应的表达载体转移到 CysDisplay™ 载体中。针对每种成熟候选物分别克隆 CDR-L3 和 CDR-H1&CDR-H2 文库并将其合并。亲和力成熟是为 6 种单独候选物定制的,即所有的功能性候选物 (Y021171、Y022054、Y022063、Y022065) 以及 Y022059 和 Y022069。较弱的候选物在库中成熟 (Y021160、Y022075 和 Y022079)。为 CDR-L3 和 CDR-H1&CDR-H2 的个体多样性产生了成熟文库。成熟淘选被设计成着重于使用全长或 N 端截短的嵌入纳米盘的 PAR2 StaR 进行高严格性固相淘选,以及着重于恒河猴 PAR2 交叉反应性的产生或改善。在亲和力成熟和筛查之后,项目团队成功鉴定出大量的高度特异性的 Ylanthia® 抗体候选物。克隆进展到了 IgG 转化和深入表征。

[0291] 亲和力成熟淘选选择

[0292] 为了提高先前选定的抗体片段的亲和力和生物活性,将 CDR-L3 和 CDR-H2 区通过多样化模块进行并行交换 (Prassler et al. 2009)。在进行亲和力成熟的文库克隆之前,将亲本 Fab 片段从相应的表达载体转移到 CysDisplay™ 载体中。为了选择亲和力提高的候选物,

对来源于成熟文库的噬菌体进行了三轮成熟淘选。通过降低每个淘选轮次中的抗原浓度来提高淘选严格性 (Low et al.1996)。除抗原减少之外,还对选定的策略进行了解离速率选择 (Hawkins et al.1992)。这些策略与长时间洗涤步骤连同将可溶性抗原添加至洗涤缓冲液相组合,以防止抗体-噬菌体与经固定的抗原进行任何再结合。

[0293] 在亲和力成熟之后,将编码经修饰可变区的DNA片段直接替代在编码亲本IgG的 pYMex10\_h\_IgG1f\_AEASS表达载体中。简言之,用合适的限制性酶 (NheI|XhoI用于VH,NdeI|KpnI用于VL) 去除编码亲本VH或VL的载体组分,并且将编码亲和力成熟可变区的片段插入并进行表达和纯化(如前所述),以产生全长IgG。

[0294] 实施例7——先导优化 (Lead optimisation) 和克隆谱分析

[0295] 经纯化Ylanthia®IgG的谱分析包括对人、小鼠、恒河猴和狨猴表达PAR2的细胞的结合特异性和交叉反应性评估,如嵌入纳米盘的StaR与PAR2的良好结合(通过ELISA进行再确定)以及表达PAR2的细胞与PAR2的良好结合(通过流式细胞术进行再确定)。在亲和力成熟之后,数种IgG克隆(主要来源于功能活性的亲本IgG Y022065)被确定具有拮抗活性,因为它们能够完全抑制人PAR2受体激活,并从而强调了它们对功能相关表位的特异性。

[0296] 在ELISA中对经截短或FL PAR2 StaR纳米盘的初步筛查显示出了与亲本抗体相比,对结合的优异改善。对所有淘选亚编码(subcode)进行kd排序的ELISA。用经典ELISA设置相对于Koff排序ELISA设置所获得的数据的绘图显示出了信号的明显线性相关性,表明大多数成熟的候选物具有缓慢Koff值。为了分析,结合信号的损失被计算为经典ELISA设置的相对于背景的信号(signal over background,S/BG)与Koff排序ELISA的S/BG之比:[经截短/FL PAR2 StaR纳米盘S/BG]/[Koff ELISA经截短/FL PAR2 StaR纳米盘S/BG]。根据ELISA排序得到的差的Koff估计值与经典ELISA设置中的低信号相关。信号比率损失>2倍的候选物被分类为具有潜在快速降解速率的候选物。94%的成熟候选物显示出没有信号变化或信号变化小(<2倍),其中的67%是亲本候选物Y021171的衍生物。

[0297] 在Koff排序ELISA中,亲本Y021171显示出最大的结合信号损失,然而其他亲本抗体候选物显示出没有信号变化或信号变化小。结果与先前为Y021171产生的SPR数据一致,其中候选物被归为快速解离速率, $kd(1/秒)=0.01058$ 。6%的成熟候选物显示出信号变化升高(2至4.5倍),表明了快速降解速率。其中的92%是Y021171的成熟衍生物(全部Y021171候选物的约33%) (图7)。

[0298] 如通过IntelliCyt确定的与PAR2的全细胞结合

[0299] 在Intellicyt中,对在FlpIn CHO-V5His-huPAR2相对于FlpIn CHO亲本细胞上的2200种主要候选物的筛查显示,大多数成熟衍生物与其各自的亲本抗体候选物相比,结合均有提高。对Y021171、Y022065、Y022069和库中成熟亲本的成熟淘选实现了最佳提高,其中Y022079的衍生物预期为主要家族。所有候选物均显示出对FlpIn CHO亲本细胞的低结合( $S/BG < 1.5$ )。超过800种候选物显示出与FlpIn CHO-V5His-huPAR2的良好或极好结合,其中与FlpIn CHO亲本细胞(信号/信号亲本)相比结合提高,为2至5倍、5至10倍、或>10倍(图8至11)。

[0300] PAR2特异性的蛋白质组谱分析(protein panel profiling,3P)

[0301] 对于蛋白质组谱分析(Frese et al.2013),将32种不同的蛋白质和对照以 $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度包被在两个384孔MSD标准板(Meso Scale Discovery,MTP 384孔MA6000,#L21XA)

上,在4℃下过夜进行。将包被溶液丢弃,并在微量滴定板振荡器(约500rpm)上将板用50μL在PBS中的3%(w/v)BSA或3%(w/v)脱脂乳粉在室温下封闭一小时,随后用50μL洗涤缓冲液(具有0.05%(v/v)吐温20的PBS)进行三个洗涤步骤。将抗体样品(Fab片段或IgG)在测定缓冲液(具有0.5%(w/v)BSA、0.05%(v/v)吐温20的PBS)中稀释至100nM和10nM。使用MOR参考mAb抗溶菌酶MOR03207 Fab或IgG(取决于样品形式)和测定缓冲液,作为对照。添加样品和对照(30μL/孔)并在微量滴定板振荡器上在室温下孵育三小时。将板洗涤三次,并向每孔添加30μL检测抗体(ECL标记的抗人Fab,1:2000稀释),并在微量滴定板振荡器(约500rpm)上孵育一小时。在将MSD板洗涤并添加35μL/孔的具有表面活性剂的MSD读取缓冲液T(MSD Read Buffer T)之后,使用Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery|Gaithersburg |MD|USA)检测电化学发光信号。为了进行评价,将某种蛋白质上的抗体样品的信号除以抗溶菌酶参考mAb MOR03207的相应信号,得到结合率。大多数克隆,包括所有较晚的成熟克隆,均显示出没有非特异性结合倾向或非特异性结合倾向小。

[0302] 实施例8——先导优化克隆的功能表征

[0303] 功能测定:基于细胞的IP-One Gαq测定

[0304] 测定方法遵循实施例5的测定方法。将抗体储备物根据10点浓度曲线进行1:2连续稀释,以确定IC<sub>50</sub>值。在单独的实验中,在针对激活肽(2-Furyol-LIGRO,6.28nM;表6)、牛胰蛋白酶(2nM;表7)或PAR1激活肽(SFLLR-NH<sub>2</sub>,632nM;表8)的攻击中测试了先导优化抗体克隆。

[0305] 将在针对激活肽的攻击中筛查亲本抗体克隆时得到的IP-One HTRF结果相对于10μM MAB3949的作用归一化(图12)。

[0306] 将在针对牛胰蛋白酶的攻击中筛查亲本抗体克隆时得到的IP-One HTRF结果相对于1μM基准1的作用归一化(图13)。

[0307] 在针对PAR1肽SFLLR-NH<sub>2</sub>胰蛋白酶的攻击中进行筛查时,将IP-One HTRF结果相对于10μM MAB3949的作用归一化(表8)。

[0308] 将归一化数据在GraphPad Prism7.04版中拟合为4参数S形剂量-响应曲线(等式2)。

[0309] 表8中的数据表明,Y022883抗体能够阻断PAR1激活肽进行的PAR2激活。

[0310] 等式2:4参数S形-剂量响应拟合

[0311]  $Y = \text{下限} + (\text{上限} - \text{下限}) / (1 + ((X^{\text{Hill斜率}}) / (\text{IC}_{50}^{\text{Hill斜率}})))$

[0312] 其中IC<sub>50</sub>是将AP/胰蛋白酶响应抑制了50%的浓度(以nM计),并且最大抑制值%是对AP/胰蛋白的最大抑制(获取自曲线的最小渐近线,即‘下限(bottom)’)。

[0313] 表6:先导优化克隆针对激活肽的功能表征,该先导优化克隆在使用Cisbio®IP-One Gαq试剂盒重复进行的IP-One人PAR2拮抗剂测定中显示出活性,其在牛胰蛋白酶攻击测定中也具有活性。

| 亲本克隆           | 先导克隆    | 人 PAR2 AP IC <sub>50</sub> (nM) ± SD | % 最大抑制 ± SD | 重复次数 |
|----------------|---------|--------------------------------------|-------------|------|
| 基准 1           |         | 无活性                                  | 3 ± 1       | 2    |
| MAB3949        |         | 241 ± 60                             | 100 ± 6     | 2    |
| Y021171        | Y022931 | 56 ± 22                              | 155 ± 64    | 2    |
| Y021171        | Y022930 | 113 ± 48                             | 116 ± 48    | 2    |
| Y021171        | Y021171 | 4254 ± 360                           | 163 ± 124   | 2    |
| Y022063        | Y022063 | 2392 ± 1717                          | 61 ± 56     | 2    |
| Y022065        | Y022883 | 57 ± 11                              | 149 ± 8     | 2    |
| Y022065        | Y022885 | 56 ± 3                               | 142 ± 2     | 2    |
| Y022065        | Y022884 | 51 ± 7                               | 150 ± 12    | 2    |
| Y022065        | Y022889 | 57 ± 11                              | 131 ± 7     | 2    |
| [0314] 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    |

[0315] 表7:先导优化克隆针对牛胰蛋白酶的功能表征,该先导优化克隆在使用Cisbio® IP-One Gαq试剂盒进行的IP-One人PAR2拮抗剂测定中显示出活性,其在激活肽攻击测定中也具有活性。其中活性可以仅在一次重复中进行确定,这在称为‘重复次数’的列中表示。

| 亲本             | 先导克隆    | 人 PAR2 胰蛋白酶 IC <sub>50</sub><br>(nM) ± SD | % 最大抑制 ±<br>SD | 重复次数 |
|----------------|---------|---|----------------|------|
| 基准 1           |         | 44 ± 0                                    | 118 ± 5        | 2    |
| MAB3949        |         | 无活性                                       | 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    |
| [0316] 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    |

[0317] 来源于亲本 IgG Y022065 的亲力和成熟先导克隆显示出最大比例的针对激活肽和胰蛋白酶二者均具有活性的活性先导克隆。表 6 和 7 列出了功能性 IgG 活性物, 其针对激活肽和牛胰蛋白酶二者均表现出 IC<sub>50</sub> 值  $n \geq 1$ 。表 8: 在针对 PAR1 肽 SFFLR-NH2 胰蛋白酶的攻击中进行筛查时, 将 IP-One HTRF 结果相对于 10 μM MAB3949 的作用归一化。

|        | 亲本克隆    | 先导克隆    | 人 PAR2 SFLLR IC <sub>50</sub><br>(nM) ± SD | % 最大抑制 ± SD | 重复次数 |
|--------|---------|---------|--|-------------|------|
| [0318] | 基准 2    |         | 无活性  | 3 ± 1       | 2    |
|        | Y022065 | Y022883 | 13.5 ± 12.5                                | 100 ± 5     | 2    |

[0319] 功能测定:使用HT-29细胞系进行的基于细胞的FLIPR钙动员Gαq测定

[0320] 在IP-One重组人PAR2体外测定中对先导克隆进行IC<sub>50</sub>确定之后,对永生化人结肠腺癌细胞系(内源性表达PAR2受体的HT-29)的活性进行了确定。

[0321] 在37°C下具有5% CO<sub>2</sub>气氛的湿润培养箱中,使用具有高葡萄糖(25mM),不具有丙酮酸钠,但具有GlutaMAX (Gibco,Paisley,UK)、10%的热灭活胎牛血清和青霉素/链霉素(100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素)的DMEM培养基将HT-29细胞(ATCC HTB-38)保持在连续培养基中。从接种之后第二天起,每2天更换培养基,并且在达到80%至90%汇合之后,在对数生长期通过0.05%胰蛋白酶/EDTA来收获细胞。

[0322] 将细胞以5,000个细胞/孔的细胞密度在培养基中以50μL/孔平板接种在384孔黑壁板(Corning)中,并在37°C下具有5% CO<sub>2</sub>气氛的湿润培养箱中孵育24小时。在实验当天,去除细胞培养基,并且添加含有从储备物(Molecular Devices)进行1:20稀释的钙5染料的50μL测定缓冲液(含有0.1% BSA的HBSS20mM HEPES pH7.4缓冲液)。将板在37°C下再孵育45分钟,然后将细胞在室温下平衡另外15分钟。

[0323] 将IgG先导克隆在测定缓冲液中制备,并连续稀释以产生10点曲线。使用FLIPR Tetra(Molecular Devices)移液器(10μL)在线添加IgG剂量响应曲线,并在5分钟的时间段内测量钙响应。在37°C下再次将板再孵育60分钟,然后以10μL/孔在线添加激活肽(630nM)或牛胰蛋白酶(63nM),并且进一步测量在5分钟的时间段内进行的由钙动员所激活的人PAR2。

[0324] 将数据通过提取Max-Min原始数据文件进行分析,并通过等式2进行分析。对于激活肽和牛胰蛋白酶测定,将数据分别针对MAB3949或基准1进行归一化。

[0325] 表9:先导克隆针对牛胰蛋白酶或激活肽(AP)的功能表征,所述先导克隆在针对相应抗体对照进行归一化的HT-29FLIPR钙动员测定中显示出全剂量依赖性抑制 $n \geq 3$ 。

|        | 亲本克隆    | 先导克隆    | 胰蛋白酶IC <sub>50</sub> (nM) ± SD | AP IC <sub>50</sub> (nM) ± SD |
|--------|---------|---------|--------------------------------|-------------------------------|
|        | Y022059 | Y022856 | 60 ± 38                        | 76.2 ± 55                     |
|        | Y022065 | Y022857 | 51 ± 58                        | 20.5 ± 55                     |
|        | Y022065 | Y022858 | 104 ± 58                       | 62.8 ± 60                     |
|        | Y022065 | Y022860 | 138 ± 44                       | 62.6 ± 60                     |
|        | Y022065 | Y022861 | 159 ± 38                       | 70.7 ± 53                     |
|        | Y022065 | Y022867 | 171 ± 41                       | 87.5 ± 47                     |
|        | Y022065 | Y022870 | 40 ± 46                        | 17.8 ± 51                     |
| [0326] | Y022065 | Y022877 | 49 ± 77                        | 44.3 ± 71                     |
|        | Y022065 | Y022879 | 42 ± 64                        | 34.6 ± 75                     |
|        | Y022065 | Y022880 | 107 ± 61                       | 67.9 ± 60                     |
|        | Y022065 | Y022881 | 35 ± 64                        | 23 ± 56.8                     |
|        | Y022065 | Y022882 | 67 ± 59                        | 38.2 ± 78                     |
|        | Y022065 | Y022883 | 47 ± 41                        | 42 ± 79                       |
|        | Y022065 | Y022884 | 116 ± 39                       | 39.4 ± 73                     |
|        | Y022065 | Y022885 | 65 ± 69                        | 76.7 ± 58                     |
|        | Y022065 | Y022887 | 192 ± 48                       | 51.5 ± 35                     |
|        | Y022065 | Y022889 | 94 ± 48                        | 64.1 ± 61                     |

[0327] 功能测定:对食蟹猴PAR2和恒河猴PAR2进行的基于细胞的IP-One Gαq测定

[0328] 使用Cisbio® IP-One Gαq测定在两种浓度下重复进行功能表征以测试在针对合成激动剂SLIGKV的攻击方面,针对食蟹猴和恒河猴PAR2受体的先导克隆跨物种拮抗剂活性。

[0329] 在生长培养基(Pro293,5% FBS,1% Glutamax,0.4%青霉素/链霉素)中,在存在0.5mM丁酸钠的情况下,用2.5% v/v食蟹猴PAR2 BacMam病毒或2.5% v/v恒河猴PAR2 BacMam病毒感染HEK293f细胞,在37°C下具有5%CO<sub>2</sub>气氛的湿润培养箱中以悬浮液形式培养24小时。在实验当天,收获细胞并将其以1×10<sup>6</sup>/ml的密度重悬在含有LiCl和0.5%牛血清白蛋白(BSA,Sigma)的测定缓冲液中,其密度为1×10<sup>6</sup>/ml(1份刺激缓冲液(Cisbio):5份ddH<sub>2</sub>O)。

[0330] 将抗体储备物根据10点浓度曲线进行1:2连续稀释,以确定IC<sub>50</sub>值。在针对SLIGKV(1μM)的攻击方面对抗体先导克隆进行测试。将任一浓度的抗体的5μl等分试样一式两份地

添加至半区白色96孔板(Corning),随后是25 $\mu$ l PAR2细胞悬液(PAR2 of cell suspension)。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后添加5 $\mu$ l/孔的SLIGKV,使最终激动剂攻击浓度为1 $\mu$ M。将板在37 $^{\circ}$ C下再孵育另外30分钟,然后添加在裂解缓冲液中的10 $\mu$ l IP-One detection kit(Cisbio)。将细胞板置于板振荡器上在室温(RT)下持续1小时,然后在PHERAstar FS微板读取仪(BMG Labtech)上使用标准HTRF方案来读板,其中激发在335nm处并且发射读出在620nm和665nm处。HTRF比率按等式1计算。将响应针对1 $\mu$ M单独SLIGKV最终测定浓度下的倍数抑制%进行归一化,并且将结果在GraphPad Prism7.04版中拟合为4参数S形剂量-响应曲线(等式2)。

[0331] 表10:先导克隆针对SLIGKV的功能特征,所述先导克隆在Cisbio IP-One食蟹猴PAR2或恒河猴PAR2受体测定中重复显示出拮抗剂活性。

| 亲本克隆           | 先导克隆    | 食蟹猴 PAR2 SLIGKV IC <sub>50</sub> (nM) $\pm$ SD | SLIGKV 倍数抑制 |
|----------------|---------|--|-------------|
| 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           |
| [0332] Y022065 | Y022881 | 41   | 2.0         |
| Y021171        | Y022916 | >3162  | 0           |
| 基准 1           |         | >759   | 0           |
| 基准 2           |         | NA   | 0           |
| MAB3949        |         | >1000  | 0           |
| 亲本克隆           | 先导克隆    | 恒河猴 PAR2 SLIGKV IC <sub>50</sub> (nM) $\pm$ SD | SLIGKV 倍数抑制 |
| Y022065        | -       | >2000  | 0           |
| Y022065        | Y022870 | 51   | 1.9         |
| Y022065        | Y022877 | 47   | 2.0         |
| Y022065        | Y022883 | 43   | 1.8         |
| 基准 1           |         | >398   | 0           |

[0333] 功能测定:对人PAR1进行的基于细胞的IP-One Gαq测定

[0334] 使用Cisbio® IP-One Gαq测定在两种浓度下一式两份进行功能表征以测试在针对合成激动剂SFLLR的攻击方面,针对人PAR1受体的先导克隆跨物种拮抗剂活性。

[0335] 在生长培养基(Pro293,5% FBS,1% Glutamax,0.4%青霉素/链霉素)中,在存在0.5mM丁酸钠的情况下,用5% v/v人PAR1 BacMam病毒感染HEK293f细胞,在37°C下具有5% CO<sub>2</sub>气氛的湿润培养箱中以悬浮液形式培养24小时。在实验当天,收获细胞并将其以 $1 \times 10^6$ /ml的密度重悬在含有LiCl和0.5%牛血清白蛋白(BSA,Sigma)的测定缓冲液中,其密度为 $1 \times 10^6$ /ml(1份刺激缓冲液(Cisbio):5份ddH<sub>2</sub>O)。

[0336] 将抗体储备物根据10点浓度曲线进行1:2连续稀释,以确定IC<sub>50</sub>值。在针对SFLLR(100nM)的攻击方面对抗体先导克隆进行测试。将任一浓度的抗体的5μl等分试样一式两份地添加至半区白色96孔板(Corning),随后是25μl PAR2细胞悬液(PAR2 of cell suspension)。将板在37°C下孵育30分钟,然后添加5μl/孔的SFLLR,使最终激动剂攻击浓度为100nM。将板在37°C下再孵育另外30分钟,然后添加在裂解缓冲液中的10μl IP-One detection kit(Cisbio)。将细胞板置于板振荡器上在室温(RT)下持续1小时,然后在PHERAstar FS微板读取仪(BMG Labtech)上使用标准HTRF方案来读板,其中激发在335nm处并且发射读出在620nm和665nm处。HTRF比率按等式1计算。将响应针对100nM单独SFLLR最终测定浓度下的倍数抑制%进行归一化,并且将结果在GraphPad Prism7.04版中拟合为4参数S形剂量-响应曲线(等式2)。

[0337] 作为PAR1人体外测定的阳性拮抗剂对照,孵育小分子PAR1拮抗剂沃拉帕沙(Vorapaxar)(Axon Medchem Cat 1755)的剂量响应曲线(以3倍稀释系列从10μM最终测定浓度进行测试)并且确定IC<sub>50</sub>。

[0338] 表11:在Cisbio IP-One人PAR1选择性测定中先导克隆针对SFLLR的功能表征

|        | 亲本克隆    | 先导克隆    | 人 PAR1 SFLLR IC <sub>50</sub> (nM) ± SD | SFLLR 倍数抑制 |
|--------|---------|---------|---|------------|
|        | Y022059 | Y022856 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022858 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022870 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022877 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022879 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022882 | >3162                                   | 0          |
| [0339] | Y022065 | Y022883 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022884 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022885 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022889 | >3162                                   | 0          |
|        | Y022065 | Y022881 | >3162                                   | 0          |
|        | Y021171 | Y022916 | >3162                                   | 0          |
|        | 基准1     |         | >759                                    | 0          |
|        | MAB3949 |         | >1000                                   | 0          |
|        | 沃拉帕沙    |         | 51                                      | 2.5        |

[0340] 先导组——功能测定：使用HT-29细胞系进行的基于细胞的FLIPR钙动员Gαq测定

[0341] 在扩大规模之后，在HT-29细胞中对先导克隆进行了表征（遵循实施例8方法），以用于确定针对对内源性表达的PAR2进行的0.1nM牛胰蛋白酶攻击的拮抗剂活性（图14）。

[0342] 除此之外，它们还显示出在以下方面的双重活性：胰蛋白酶在胞外N端内进行的蛋白水解切割，以及对PAR2-AP激活的抑制。3P特异性测定中的分析突出了几种具有增强的结合非特异性抗原倾向的克隆，并从而减少了用于进一步考虑作为治疗候选物的双重活性IgG的数目。为了改进（refine）靶表位并进行初步表位评估，在基于ELISA的表位分箱实验中分析了这些也通过了3P测定QC的IgG克隆。所有候选物均显示出彼此竞争以及可能靶向与基准1的N端表位不同的近端结合区。最终候选物选择的深入表征还包括通过SPR进行的亲和力测量。

[0343] 基于功能测定、序列多样性和结合谱，剩余克隆的数目进一步减少。这些候选物以单价FabCys-AviH形式产生，并对其测试了与食蟹猴PAR2的交叉功能（cross-functionality）。除此之外，还采用优化设置对亲和力确定进行了改进。

[0344] Y022870、Y022877和Y022883（Y022065的三种衍生物）被选定为最终候选物并被定义为“先导组”或“先导集合”，这主要基于功能测定、SPR亲和力数据、生产QC以及在蛋白质组谱分析（3P）测定中与32种不同蛋白质的非特异性结合。

[0345] 将这三种候选物进行最终表征与六种竞争物抗体的集合相比较。深入表征表明，先导集合以在竞争物抗体范围内的亲和力与经纯化且在细胞表面表达的PAR2结合。未检测到与相关蛋白PAR1、PAR3和PAR4的脱靶结合。与所有竞争物(基准)抗体相比，本文中提供的抗体的先导集合不仅能够抑制蛋白酶激活，而且能够抑制PAR2的肽激活，从而充当PAR2激活的双重抑制剂。

[0346] 表12:SLIGKV激动剂攻击的体外跨物种汇总

|        | 克隆 ID & IC50<br>(nM) | Y022065 | Y022870 | Y022877 | Y022883 |
|--------|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| [0347] | 人                    | 264     | 61      | 52      | 54      |
|        | 恒河猴                  | >1995   | 50      | 47      | 43      |
|        | 食蟹猴                  | >1995   | 88      | 74      | 68      |

[0348] 实施例9——亲和力成熟抗体克隆的亲和力和动力学确定

[0349] 使用Biacore和Octet的无标记方法来确定KD和 $k_{off}$

[0350] 对于IgG的高通量动力学评价,使用Biacore T200或Octet (QK384或HTX) 仪器确定解离速率常数( $k_{off}$ )。使用单体抗原物质(PAR2 StaR)时,适用与完全动力学表征所述相同的基本先决条件、原则和考虑因素。对于所有88种经纯化IgG, $k_{off}$ 通过Octet进行确定,并且显示出与亲本抗体相比有净改善。对经截短huPAR2 StaR和FL-huPAR2 StaR所评估的 $k_d$ [1/秒]为 $1.1E-4$ 至 $1.0E-05$ 。

[0351] 一般来说,仅将一种分析物浓度用于 $k_{off}$ 确定。将直接从IgG上清液或细菌裂解物(Fab片段)中评估的样品使用Octet以抗体捕获形式进行 $k_{off}$ 确定。作为先决条件,将单体抗原用作分析物。将IgG样品以中等捕获水平(0.4nm)捕获到负载有高密度捕获配体(生物素化的MabSelect SuRe配体)的链霉亲和素传感器上。将单体抗原蛋白人PAR2-1变体(P15155-377,经截短的)和人PAR2-2变体(P166:1-377,全长的)用作溶液中的分析物。对解离进行监测长达1500秒。使用相应的仪器特异性评价软件(Biacore T200评价软件2.x或3.x|Octet数据分析9.x或10.x)将记录的传感图拟合至1:1结合模型。

[0352] 对于所有11种IgG1f\_AEASS,对人PAR2的亲和力通过SPR来确定。将IgG通过其Fc-片段来捕获,并且将洗涤剂(LMNG/CHS)溶解的FL-N PAR2 StaR用作溶液中的分析物。将50mM HEPES pH 7.5,150mM NaCl,0.02%LMNG用作测定缓冲液。为了使由FL-N PAR2 StaR与传感器非特异性相互作用引起的假象(artefact)最小化,将CM3传感器用作固定高密度抗hu-Fc捕获抗体的基础(BR-1008-39,GE Healthcare)。以约500RU的相对高水平来捕获IgG,从而实现特异性结合与非特异性结合的更高比率(同时仍维持适合于动力学表征的条件)。亲和力为6.5nM至130pM。最佳候选物的 $k_{off}$ 值为测定下限(lower assay limit)。报道了最小 $k_{off}$ 为 $2.00E-05$ 秒<sup>-1</sup>(对应于在1500秒内3%解离)。观察到了KD值为6.5nM至130pM的一系列亲和力,以及在亲和力成熟过程之后大多数显示出对亲本克隆Y022065( $K_D=5.3$ nM)的改善,如所预期的。

[0353] 表13:如使用Octet系统和可溶性PAR2 **StaR**<sup>®</sup>进行确定的亲和力成熟克隆的SPR动力学

| 克隆             | $k_a$ (1/Ms) | $K_d$ (1/s) | $K_D$ (nM) |
|----------------|--------------|-------------|------------|
| [0354] 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       |
| [0355] 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       |
| 基准 1           | 1.2E+6       | 8.8E-4      | 0.76       |

[0356] 表14:如使用Biacore系统和可溶性PAR2 **StaR**<sup>®</sup>进行确定的SPR动力学,以及对前三种目的亲和力成熟克隆的分析

| 克隆           | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)  |
|--------------|--------------|-------------|---------|
| [0357] 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 |

[0358] 表15:如使用Biacore系统进行确定的SPR动力学,使用并入到纳米盘中的人PAR2 **StaR**<sup>®</sup>——三种亲和力成熟克隆与非亲和力成熟克隆 (Y021171) 的比较。

| 克隆             | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)  |
|----------------|--------------|-------------|---------|
| Y021171        | 1.2E+06      | 3.7E-02     | 3.1E-08 |
| [0359] 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 |

[0360] 使用重组PAR2 **StaR**<sup>®</sup>蛋白进行SPR亲和力测量以及评价温度对结合的影响:在25°C和37°C下人PAR2与经固定mAb的结合

[0361] 使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)进行PAR2与抗PAR2抗体相互作用的测定。通过胺偶联将抗人IgG抗体(人抗体捕获试剂盒,GE Healthcare)固定在传感器芯片CM3(GE Healthcare)的靶流动池和参考流动池中以使得表面密度为2700至3000共振单位(RU)。在HBS-EP+缓冲液(GE Healthcare)中在25°C下进行固定。然后将缓冲液更换为50mM HEPES,pH 7.5,150mM NaCl,0.02% LMNG,0.002%CHS用于在25或37°C下进行的PAR2-抗体相互作用测定。测定的每个周期从靶流动池中的抗体捕获开始至达到400至450RU的水平。然后将PAR2以三种浓度注射到靶流动池和参考流动池上,每种5分钟,随后进行30分钟解离。然后用试剂盒(人抗体捕获试剂盒,GE Healthcare)中提供的溶液将表面进行再生。对于所测试的每种抗体,第一周期为空白(三次注射运行缓冲液)以及第二周期为50、100和200nM PAR2注射。将减去空白的数据拟合至1:1相互作用模型,以获得缔合和解离速率常数 $k_a$ 和 $k_d$ 以及亲和力常数 $K_D$ 。

[0362] 表16:在25°C和37°C下亲和力成熟之后的先导克隆的结合的汇总

| 克隆            | 温度 °C | 解离时间<br>(分钟) | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $KD$ (M) | t1/2 (小时) |
|---------------|-------|--------------|--------------|-------------|----------|-----------|
| 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      |
| [0363] 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       |

[0364] 确定先导克隆是否表现出pH敏感性结合的评估

[0365] 将Y22883捕获到280至320RU,并注射100nM PAR2持续2分钟。在注射停止之后约400秒,注射pH 6.0缓冲液持续5分钟以查看其是否会导致更快的解离。实验是以这样的方式设计的,使得无法对解离速率常数进行数值评价。然而,明显的是pH 6.0的条件不加速解离(图15)。通过KinExA进行的全细胞上表观 $K_D$ 确定

[0366] 为了使用“天然”PAR2(即在细胞表面表达的PAR2)来确定表观 $K_D$ ,应用KinExA方法评价先导克隆的子集,即Y022870和Y02283。为了确定表面表达抗原(而不是可溶性抗原)的平衡 $KD$ ,使用表达野生型全长人PAR2的经BacMam感染的HEK-293F细胞进行滴定。将细胞在孵育缓冲液(Gibco的D-PBS,0.5% (w/v)BSA,0.02% (v/v)叠氮化钠)中滴定。实验由具有低和高固定IgG浓度的两种滴定组成。在两种滴定实验(化学计量和亲和力受控制的条件下),最大量的细胞必须含有足够高的有效配体浓度,以对IgG进行完全饱和。将IgG与细胞的混合物在非常温和的搅拌下在室温下孵育过夜,以使得平衡形成。随后,将形成的细胞-抗体

复合物通过离心来移出。用包被在PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 珠上的山羊抗人F(ab')<sub>2</sub>片段特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch, #109-005-097) 以及采用抗人F(ab')<sub>2</sub>片段特异性 Alexa Fluor 647抗体 (Jackson ImmunoResearch, #109-605-097) 进行的荧光检测, 来确定上清液的游离IgG量。由于在KinExA实验中使用了IgG分子, 因此所得值被标记为‘表观K<sub>D</sub>’, 以指出不能排除抗原呈递细胞上的二价结合, 并且结合可被亲合力的贡献所加强。用KinExAPro软件4.1.11, 通过应用“平衡, 全细胞”模型, 使用n-曲线分析工具对记录的滴定曲线进行分析。Y022870以约370pM的亲合力与全细胞上表达的野生型人PAR2结合, 然而Y022883具有约260pM的亲合力 (图16)。值与使用PAR2纳米盘 (分别为210和140pM) 确定的SPR相符。

[0367] 实施例10——通过受体突变的流式细胞术分析和HDX进行的亲和力成熟克隆的表位分箱和分析

[0368] 通过抗体竞争进行的基于ELISA的表位分箱

[0369] 表位分箱通过基于ELISA的测定进行。将抗人PAR2 IgG1f样品IgG以100nM的浓度直接包被在微量滴定板上。并行地, 将恒定浓度 (12.5nM至25nM) 的标记抗原 (例如嵌入纳米盘的StaR) 与25倍摩尔过量的第二抗人PAR2 IgG1f一起孵育, 以对所有表位 (最大浓度312.5nM至625nM, 7点滴定, 1:4) 进行饱和1小时, 并使得形成复合物。对于每个所评估的IgG样品而言均包括内部阳性对照 (自我竞争)。将抗原-IgG复合物添加至IgG包被的板持续30分钟。与包被的IgG结合的抗原-IgG复合物通过标签特异性抗体 (例如抗StrepII或抗His) 来检测, 所述标签特异性抗体用合适的碱性磷酸酶 (AP) 偶联二抗与‘AttoPhos’ 荧光底物相组合进行检测。在各个测定步骤之间进行了多个洗涤步骤。在竞争相同表位的情况下, 抗原-IgG复合物不能与IgG包被的板结合, 这转化为低信号。靶向不同的表位允许抗原-IgG复合物同时结合包被的IgG和溶液中的IgG, 从而导致阳性检测信号。

[0370] 该竞争ELISA装置用于通过表位分箱来表征可用候选物的靶表位和表位多样性。对16种双功能PAR2特异性候选物测试了针对彼此的结合竞争以及针对参考抗体 (包括MAB3949 (R&D Systems) 和基准1) 的结合竞争。该16种抗体的集合包含五个亲本家族中每者的至少一种衍生物, 即通过亲和力成熟得到的来源于亲本克隆的克隆 (Y022079、Y022069、Y022065、Y021171、Y022059)。所有亲和力成熟家族彼此竞争, 以及与抗huPAR2 (MAB3949 R&D Systems) 竞争。这表明所有这些抗体均靶向近端结合区 (即除N端之外的胞外结构域)。没有一种候选物与基准mAb1竞争。基准mAb 1是所测试的组中仅有的只与全长PAR2结合 (即结合线性N端表位) 的抗体; 这些结果表明, 亲和力成熟的候选物与这样的明显不同的表位结合, 该表位与胞外环区更密切相关或直接靶向胞外环区 (图17)。

[0371] 另外, 还对StaR变性条件下的结合进行了评估, 以帮助分类为对线性或构象表位的识别。97%的所测试IgG候选物显示出结合损失, 并因此被分配为与构象表位结合。

[0372] 氘氘交换

[0373] 氘氘交换 (HDX) 是可用于查询和鉴定结合界面的方法之一。通过编目 (catalogue) 蛋白质骨架中酰胺氢的氢/氘交换率来探测蛋白质-蛋白质相互作用位点。该交换发生的快慢如何取决于那些酰胺氢对溶剂的可及性。因此, 在暴露区域中的酰胺应当比埋入蛋白质-蛋白质界面内的酰胺具有更高的交换率, 因为它们对溶剂环境具有更高的可及性。

[0374] 实施例中使用了以下装置和材料。在配备有两个温控柱室的Thermo Vanquish

UHPLC (Thermo Scientific) 上进行液相色谱分离。在15°C下在Enzymate BEH胃蛋白酶柱 2.1×50mm (Waters) 上进行在线消化,并将获得的肽在4°C下在Kinetex Evo C18 2.6 $\mu$ m 50×2.1mm (Phenomenex) 上分离。用于肽分离的流动相由乙腈/0.1%甲酸(formic acid,FA)和水/0.1%FA (Fisher Chemical) 组成。使用0%至40%乙腈/0.1%FA的17.5分钟梯度来实现分离。在Orbitrap Fusion仪器 (Thermo Scientific) 上对获得的肽进行MS1和MS/MS分析。使用具有Byonic node的Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Scientific) 进行肽分析,并且使用HDExaminer 2.4 (Sierra Analytics) 进行HDX处理。在LMNG/CHS中纯化了经遗传修饰的PAR2-21-377 (糖基化位点被去除) PAR2 StaR蛋白。直接表达了抗原-结合片段 (Fab) Y022883 (参见实施例4), 并且参考Fab来源于R&D IgG MAB3949的木瓜蛋白酶消化物。

[0375] HDX的典型自下而上的(bottom-up)HDX质谱(mass spectrometry,MS)程序包括蛋白质-Fab孵育、用氘化缓冲液进行同位素标记、猝灭、蛋白水解消化、脱盐/分离、和MS分析。将PAR2-2构建体稀释至50 $\mu$ M,并与等摩尔浓度的Fab Y022883(或Fab MAB3949)一起在22°C下孵育30分钟。HDX通过以下来启动:在22°C下将蛋白质混合物在氘化缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液pH 7.5,150mM NaCl)中稀释,每者持续数个时间段(连续标记):1分钟、10分钟、30分钟、2小时。选择20倍稀释以实现溶剂可及氢的高达90%至95% D标记(通常将2 $\mu$ l蛋白质混合物与38 $\mu$ l氘化缓冲液混合)。在期望时间之后,通过用0.8%甲酸将溶液pH降至约2.5来将交换猝灭,并立即将溶液在干冰上快速冷冻以减少反向交换。然后将样品解冻,之后在胃蛋白酶柱上进行酶促在线消化以及在LC-MS上进行后续分析。然后对仅PAR2-2构建体和仅Fab Y022883(或Fab MAB3949)遵循相同的方案,以便鉴定非复合蛋白中的溶剂/氘-可及氢。将PAR2-2/Fab Y022883(或PAR2-2/Fab MAB3949)复合物中的氘化水平与均质蛋白质(Fab Y022883、Fab MAB3949或PAR2-2)的氘化水平进行的比较给出了对溶剂可及氢周围变化的指示,并且随后这样的“映射(mapping)”可用于确定PAR2-2/Fab Y022883(或PAR2-2/Fab MAB3949)相互作用位点。为了验证该方法,将对PAR2/MAB3949 Fab获得的HDX结果映射在已公开的PAR2与MAB3949 Fab复合的共结构(Cheng et al.,Nature,2017)上。从HDX推断出的相互作用与在晶体共结构中观察到的相互作用匹配得很好。然后查询PAR2-2/Fab Y022883HDX,并且数据表明了与对Fab MAB3949所观察到的相互作用(Cheng et al.,Nature,2017)不同的相互作用(图18至20)。PAR2的N端区域显示出了独特的氘-氢交换模式,这可能表明该区域参与了结合。

[0376] 表17:通过HDX鉴定的PAR2-2肽的列表,所述PAR2-2肽被确定位于相互作用区域并因此包含Y022883抗体表位。

| 肽   | 在 PAR2-2 中的位置 |
|---|---------------|
| SEQ ID NO: 41 - 55-59 VETVF                     | 区段 1          |
| [0377] SEQ ID NO: 42 - 60-77 SVDEFS ASVLTGKLTVF | 区段 1/螺旋 0/1   |
| SEQ ID NO: 43 - 306-311 LLVVHY                  | ECL3          |
| SEQ ID NO: 44 - 312-326 FLIK SQGQSHVYALY        | ECL3          |

[0378] 这些HDX数据表明,PAR2的ECL1或ECL2以小得多的可能性参与到与Y022883PAR2抗体的直接相互作用中;使用该方法观察到的直接相互作用位于以下的区域:区段1、螺旋0/1

(靠近跨膜结构域并且相反于与受体的相对远端区域结合的其他PAR2靶向抗体)和ECL3。

[0379] 使用流式细胞术进行的突变分析

[0380] 如下在表达人PAR2的HEK293F-细胞上通过流式细胞术来评价PAR2结合表位突变。使用基准1抗体进行表达水平的监测。在WT PAR2背景中引入的突变靶向区段1、螺旋0/1(单突变F59A、S60W、D62G、D62F、E63K、E63A和双突变D62G/E63G)或ECL3(单突变Q317A、G318F、Q319A、Q319I)。通过BacMam感染将多种形式的PAR2引入到HEK293F细胞中。

[0381] 将200 $\mu$ L HEK293F-细胞以 $4 \times 10^6$ 个细胞/mL在FACS-缓冲液(PBS(Sigma, #F9665), 1% BSA(Sigma, #A9647)和Roche完全蛋白酶抑制剂(#11836145001))中与20nM的Y022883或基准1一起在4 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。将细胞进行沉淀并用200 $\mu$ L FACS缓冲液洗涤三次。相继地,将细胞与200 $\mu$ L二级别藻蓝蛋白(APC)缀合的抗人IgG抗体(20nM)一起在4 $^{\circ}$ C下搅拌1小时,并用200 $\mu$ L FACS缓冲液再次洗涤三次。

[0382] 当用基准1检测时,突变的PAR2和WT PAR2显示出非常相似的表达谱,但排除D62F,其显示出部分降低的表达水平,然而S60W、D62F、G318F和双突变D62G/E63G在用Y022883检测时均显示出与WT相比降低的表达谱,表明通过HDX分析所鉴定到的区域参与了Y022883与人PAR2的结合。在所选突变的情况下观察到的结合减少对于区段1/螺旋0/1而言比ECL3更强(图21)。

[0383] 这些突变的影响可赋予改变抗体表位的构象变化,并且也可导致受体功能活性的变化。

[0384] 实施例11——大鼠药代动力学

[0385] 在成年雄性Sprague Dawley大鼠中探索了Y022883的药代动力学。将3只大鼠静脉内注射10mg/kg Y022883,并在2周内的不同时间点获取血液样品。将血液样品用于产生血清,并将这些血清在Gyrolab平台(通用PK试剂盒)上通过合格的非GLP ELISA方法进行分析,其中使用Phoenix<sup>TM</sup> WinNonlin通过非房室分析(non-compartmental analysis, NCA)来计算PK参数。汇总数据示于图22和表18中。这些数据与对人mAb的预期一致,人mAb不具有显著的抗原沉默(antigen sink),其被预期为Y022883不结合大鼠PAR2。

[0386] 表18:大鼠(n=3)中Y022883的组PK参数。数据显示为平均平均值(mean average),其中括号中为标准偏差。

| 组别              | 半衰期(小时)      | C <sub>最大</sub> (ng·mL <sup>-1</sup> ) | AUC <sub>总</sub> (hr·ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|--------------|--|--|
| 10mg/kg Y022883 | 146.7 (15.0) | 109136 (4502)                          | 6937883 (496973)                           |

[0388] 实施例12——食蟹猴药代动力学和药效学

[0389] 在成年雄性食蟹猴中探索了Y022883的药代动力学。将3组各3只雄性成年食蟹猴静脉内注射10mg/kg、3mg/kg或1mg/kg Y022883,并在4周内的不同时间点获取血液样品。血液样品用于评估药效学(包括图24至26)或产生用于药代动力学的血清(参见图23)。

[0390] 血清在Gyrolab平台(通用PK试剂盒)上通过合格的非GLP ELISA方法进行分析,其中使用Phoenix<sup>TM</sup> WinNonlin通过非房室分析(NCA)来计算PK参数。汇总数据示于图23和表19中。这些数据与对人mAb的预期一致,人mAb不具有显著的抗原沉默。

[0391] 表19:食蟹猴(n=3)中Y022883的组PK参数。数据显示为平均平均值,其中括号中为标准偏差。

| 组别                     | 半衰期 (小时)      | C最大 (ng.mL <sup>-1</sup> ) | AUC <sub>总</sub> (hr.ng.mL <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|---------------|----------------------------|--|
| [0392] 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)                           |

[0393] 药效学在4个时间点(给药前,给药后1、13和29天)在无菌条件下评估。向每个血液样品添加1体积的PBS,并添加6%右旋糖酐T-500至终浓度为2%。在25至40分钟孵育之后(当富含白细胞的和富含红细胞的2相为各50%时反应停止),移出含白细胞的上清液,在PBS中洗涤,并以原始血体积重悬在培养基(RPMI-1640,2% FCS,1%青霉素-链霉素,1%L-谷氨酰胺,1%非必需氨基酸)中。然后将1mL细胞样品用PBS,100mcM 2f-LIGRLO,100nM胰蛋白酶或100pg/mL LPS攻击,并在37°C下孵育6小时。然后将样品进行沉淀(306g,5分钟,室温),将沉淀物重悬并与0.48mLRNAlater混合,之后在-70°C下冷冻。然后使用标准方法提取样品RNA,并用50×的读取深度下的基于基因组的读取映射来评估转录组。

[0394] 将测序读出(FASTQ文件)与参考基因组进行比对,并且所计数的映射到每个基因的读出的数目转生成基因计数表。然后对每个给药组在每个时间点的每种刺激之间进行差异基因表达分析,例如1mg/kg给药前PBS vs 1mg/kg给药前PAR2AP、1mg/kg给药前PBS vs 1mg/kg给药前胰蛋白酶、1mg/kg给药前PBS vs 1mg/kg给药前LPS。然后通过生成火山图(基因表达倍数变化vs统计学显著性(P值)的散点图)来确定差异基因表达。大于或等于2倍上调或下调且显著性小于或等于0.05的基因被认为是差异表达的。因此,为每种刺激(来自给药前样品)生成了差异表达的基因的集合;通过确定每种刺激的给药前差异表达基因集合是否在每个时间点仍然差异表达,来评价用mAb进行的处理的作用。例如,在1mg/kg给药组中,1816种基因在给药前时间点受到LPS(vs给药前PBS)的差异调节;在24小时时,这些基因中有1379种仍然受到LPS的差异调节(vs 24小时PBS),因此在1mg/kg LPS给药组中,76%的给药前LPS基因-特征在给药后24小时时存在。

[0395] 使用该方法,发现单次IV输注10mg/kg Y022883在所有时间点均抑制了PAR2AP诱导的和胰蛋白酶诱导的基因特征,然而LPS基因特征在24小时时被抑制了36%,然后到29天恢复到23%抑制(图24)。跟随3mg/kg Y022883进行了一组类似的观察(图25),尽管在1mg/kg Y022883的情况下胰蛋白酶基因特征到第29天开始恢复(在24小时、第13天、第29天为96%、92%、91%抑制;图26)。这些数据与Y022883一致,其在单次输注至少1mg/kg之后持续一个月提供对外周血白细胞上PAR2的阻断并特异性拮抗PAR2(至少相对于TLR4)。PAR2拮抗作用对LPS诱导的基因特征的部分抑制与将TLR4和PAR2信号传导级联相联系的文献报道一致(Yamaguchi et al 2016)。

[0396] 实施例13 SH-C和基准II对T84细胞系中胰蛋白酶和Par2-AP诱导的p38 MAPK和pERK磷酸化的影响

[0397] 将T84细胞在生长培养基中用胰蛋白酶(1μM)或PAR2-AP(2fu-LIGRLO)(10μM)处理。将抗体Y022883(SH-C)和基准2(SH-D)在10nM至3μM的浓度下进行了测试。将细胞在处理之后5或30分钟时在裂解缓冲液(PBS+1% TritonX-100,蛋白酶和磷酸酶抑制剂)中进行裂解。在磷蛋白分析之前,通过BCA评价总蛋白浓度。将蛋白质浓度调节至0.3mg/ml,并将样品装载到Protein Simple的12-230kDa Wes分离模块8×25毛细管筒(cartridge)上。将兔抗

体用于检测pERK和ERK (pERK, Cell signalling, cat:9101S; ERK, Cell signalling, cat:4695S) 以及磷酸化p38 MAPK和p38 MAPK (Cell signalling, cat:9211L; p38, Cell signalling, cat:9212S)。将抗兔检测模块 (Protein Simple, cat:DM-001) 用作二抗。将磷酸化-ERK或磷酸化p38的数据相对于总ERK或总p38的数据归一化; 对生物学重复进行了分析。将最大比率的百分比用于在板之间进行归一化 (图27至29)。

[0398] 用胰蛋白酶或PAP2-AP进行的处理引起了pERK的>8倍提高以及磷酸化p38-MAPK的>3倍提高。SH-C和基准II二者均显示出了对经胰蛋白酶处理的细胞中ERK和p38-MAPK磷酸化的抑制。仅SH-C显示出对经PAR2-AP处理的细胞中磷酸化的显著抑制。

[0399] 序列

[0400] 表20至23: 克隆Y022065、Y022870、Y022877和Y022883的抗体克隆序列, 其具有根据Kabat鉴定的CDR。

| 可变区对 (pair) 名称<br>Y022065    |   |
|------------------------------|---|
| 框架 Vh                        | YLAN_VH3-23   |
| 框架 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   |
| 蛋白质序列 (VH)<br>(SEQ ID NO:2)  | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST<br>YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIHWG<br>QGTLVTVSS   |
| 蛋白质序列 (VL)<br>(SEQ ID NO: 6) | QSALTQPASVSGSPGQISITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIIYEGSKRPSG<br>VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ   |
| Ppt 形式                       | h_IgG1f AEASS   |
| LC 蛋白质 (SEQ ID NO: 70)       | QSALTQPASVSGSPGQISITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIIYEGSKRPSG<br>VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAPS<br>VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYA<br>ASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS   |
| LC DNA (SEQ ID NO: 34)       | CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT<br>AGCTGCACCG GCACCCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG<br>CATCCGGGCA AAGCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGCA GCAAACGCC GAGCGCGTT<br>AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCTG<br>CAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGCT<br>GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAAGCCGC CCCTAGCGTG<br>ACCTGTTCC CCCAAGCAG CGAGGAACTC CAGGCCAACA AGGCCACCCT CGTGTGCTG<br>ATCAGCGACT TCTACCCTGG CGCCGTGACC GTGGCCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG<br>AAGGCCGCGG TGGAAACCAC CACCCACAGC AAGCAGAGCA ACAACAATA CGCCGCCAGC<br>AGCTACCTGA GCCTGACCCG CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTC<br>ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAGAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGCAG C |
| HC 蛋白质 (SEQ ID NO: 71)       | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST<br>YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIHWG<br>QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSKV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCP   |

[0401]

|                        |   |
|------------------------|---|
|                        | PCPAPEAEGAPSVFLFPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG<br>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| HC DNA (SEQ ID NO: 35) | GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG<br>AGCTGTGCCG CAAGCGGCTT TACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT GCGCCAAGCA<br>CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGCGCC ATTAGCGGCA GCGGTGGCAG CACCTATTAT<br>GCCGATAGCG TGAAAGGTCG CTTTACCATT AGTCGCGATA ACAGCAAAA CACCTGTAT<br>CTGCAAATGA ACAGCTGCG GGCAGAAGAT ACCCGAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATTC<br>CACTACACTC ACTCCGGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG CCAGGGCACC<br>CTGGTACTG TCTCGAGCGC GTCGACCAA GGCCCCAGCG TGTTCCCTCT GGCCCCAGC<br>AGCAAGAGCA CCTCTGGCGG AACAGCCGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAAGTA CTACTTCCCC<br>GAGCCCGTGA CCGTGTCTCG GAACTCTGGC GCCTGACCA CCGGCGTGCA CACCTTTCCA<br>GCCGTGCTCC AGAGCAGCGG CCTGTACAGC CTGAGCAGCG TCGTGACCCT GCCCAGCAGC<br>AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAACCACA AGCCAGCAA CACAAGGTG<br>GACAAGCGGG TGGAAACCAA GAGCTGCGAC AAGACCACA CCTGTCCCC CTGCCTGCC<br>CCTGAAGCGG AGGGAGCCCC CTCCGTGTTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCCTG<br>ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACCTGTCCA CGAGGACCTG<br>GAAGTGAAGT TTAATTGGTA CGTGGACGGC GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC<br>AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCCG TGCTGACCCT GCTGCACCAG<br>GACTGGCTGA ACGGCAAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCTCTC<br>ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCCGGG AGCCCCAGGT GTACACACTG<br>CCCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT CGTGAAGGGC<br>TTCTACCCCA GCGACATTGC CGTGAATGG GAGAGCAACG GCGAGCCCGA GAACAACACT<br>AAGACCACC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGTGACC<br>GTGGACAAGA GCGGTGGCA GCAGGGCAAC GTGTTAGCT GCTCCGTGAT GCACGAGGCC<br>CTGCACAACC ACTACACCA GAAGTCCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG |

| 可変区对名称<br>Y022870             |  |
|-------------------------------|--|
| 框架 Vh                         | YLAN_VH3-23  |
| 框架 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  |
| 蛋白质序列 (VH)<br>(SEQ ID NO: 10) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYAITWVRQAPGKGLEWVSTISALGLEYA<br>AESVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYYTHSGKRYYPFDI<br>WQGLTLTVSS  |
| 蛋白质序列 (VL)<br>(SEQ ID NO: 6)  | QSALTQPASVSGSPGQISITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEYEGSKRPSG<br>VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ  |
| Ppt 形式                        | h_ IgG1f_AEASS   |
| LC 蛋白质<br>(SEQ ID NO: 70)     | QSALTQPASVSGSPGQISITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEYEGSKRPSG<br>VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGPQAAPS<br>VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYA<br>ASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS  |
| LC DNA (SEQ ID NO: 34)        | CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT<br>AGCTGCACCG GCACCCAGC CGACGTGGCC AGCTATAACC TGGTATAGTG GTATCAGCAG<br>CATCCGGGCA AAGCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAACGCCG GAGCGCGTT<br>AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCTG<br>CAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGT<br>GTGTTGGCG GCGGTACCA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAGCCGC CCCTAGCGTG<br>ACCCTGTTCC CCCAAGCAG CGAGGAAGCT CAGGCCAACA AGGCCACCCT CGTGTGCTG<br>ATCAGCGACT TCTACCCTGG CGCCGTGACC GTGGCCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG<br>AAGGCCGGG TGGAAACAC CACCCACAG AAGCAGAGCA ACAACAAATA CGCCGCCAG<br>AGCTACCTGA GCCTGACCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTC<br>ACACACGAGG GCAGCACCGT GAAAAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGCAG C |
| HC 蛋白质 (SEQ ID NO: 72)        | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYAITWVRQAPGKGLEWVSTISALGLEY<br>YAESVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFHYYTHSGKRYYPFDI<br>WQGLTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTHTCP<br>PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  |

[0402]

| SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |   |
|---|---|
| HC DNA (SEQ ID NO: 36)                        | GAAGTGACG TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGACG CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG<br>AGCTGTGCC CAAGCGGGTT TTCTTTCTCC AGATACGCAA TCACCTGGGT GCGCAAGCA<br>CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGCACC ATTTCCGCAC TGGGTCTGGA GACATATTAC<br>GCGGAGTCCG TCCGGGGCCG CTTTACCATT AGTCGCGATA ACAGCAAAA CACCTGTAT<br>CTGCAATGA ACAGCTGCG GGCAGAAGAT ACCCGAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATT<br>CACTACACT ACTCCGGTAA ACCTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG CCAGGGCACC<br>CTGGTACTG TCTCGAGCG GTGACCAAAA GGCCCCAGCG TGTTCCTCT GGCCCCAGC<br>AGCAAGAGCA CCTCTGGCG AACAGCCGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAAGTA CTACTTCCC<br>GAGCCCCTGA CCGTGTCTG GAACCTGCGC GCCTGACCA GCGGCGTGA CACCTTTCCA<br>GCCGTGCTC AGAGCAGCG CCTGTACAG CTGAGCAGCG TCGTGACCGT GCCAGCAGC<br>AGCCTGGCA CCCAGACCTA CATCTGAAC GTGAACCACA AGCCAGCAA CACAAAGGTG<br>GACAAGCGG TGGAAACCAA GAGCTGCGAC AAGACCACA CCTGTCCCC CTGCCCTGCC<br>CCTGAAGCG AGGGAGCCC CTCCGTGTT CTGTTCCCC CAAAGCCTAA GGACACCTG<br>ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTACCTGC GTGGTGGTGG ACCTGTCCA CGAGGACCT<br>GAAGTGAAG TTAATTGTA CGTGGACGG GTGGAAGTGC ACAACGCCA GACCAAGCCC<br>AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACCTACCG GTGGTGTCCG TGCTGACCGT GCTGCACCAG<br>GACTGGCTGA ACGGCAAAGA GTACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTTCTCC<br>ATCGAGAAA CCATCAGCAA GGCCAAAGGC CAGCCCCGG AGCCCCAGGT GTACACACTG<br>CCCCCTAGCC GGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACTGCCT CGTGAAGGGC<br>TTCTACCCA GCGACATTG CGTGGAAATG GAGAGCAACG GCGAGCCGA GAACAACACT<br>AAGACCACC CCCCTGTGCT GGACAGCGC GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGTGACC<br>GTGGACAAGA GCCGGTGGCA GCAGGGCAAC GTGTTACGCT GCTCCGTGAT GCACGAGGCC<br>CTGCACAAC ACTACACCCA GAAGTCCCTG AGCCTGAGCC CCGGCAAG |

| 可变区对名称 Y022877                |   |
|-------------------------------|---|
| 框架 Vh                         | YLAN_VH3-23   |
| 框架 VI                         | YLAN_VL2-23   |
| HCDR1 (SEQ ID NO: 14)         | RYAMT   |
| HCDR2 (SEQ ID NO: 15)         | TISGLGQEAYYAGSVKKG  |
| HCDR3 (SEQ ID NO: 5)          | GFHYTHSGKRYYPFDI  |
| LCDR1 (SEQ ID NO: 7)          | TGTSSDVGSYNLVS  |
| LCDR2 (SEQ ID NO: 8)          | EGSKRPS   |
| LCDR3 (SEQ ID NO: 9)          | SQYATFIAFAV   |
| 蛋白质序列 (VH)<br>(SEQ ID NO: 13) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKLEWVSTISGLGQE<br>AYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYYTHSGKRYYPFDI<br>WGQGLTVTVSS  |
| 蛋白质序列 (VL)<br>(SEQ ID NO: 6)  | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG<br>VSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ   |
| Ppt 形式                        | h_IgG1f_AEASS   |
| LC 蛋白质<br>(SEQ ID NO: 70)     | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG<br>VSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAPS<br>VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKSQSNNKYA<br>ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS   |
| LC DNA<br>(SEQ ID NO: 34)     | CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT<br>AGCTGCACCG GCACCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGGTTAGCTG GTATCAGCAG<br>CATCCGGGCA AAGCCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAACGCC GAGCGGCGTT<br>AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCCGCA GCCTGACCAT TAGCGGCCTG<br>CAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCCAGTACG CTACTTTCAT CGCTTTCGCT<br>GTGTTTGCGG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAAGCCGC CCCTAGCGTG<br>ACCTGTTCC CCCCAGCAG CGAGGAACTC CAGGCCAACA AGGCCACCTT CGTGTGCCTG<br>ATCAGCGACT TCTACCCTGG CGCCGTGACC GTGGCCTGGA AGGCCGATAG CAGCCCTGTG<br>AAGGCCGGCG TGGAACACAC CACCCACAGC AAGCAGAGCA ACAACAATA CGCCGCCAGC<br>AGCTACCTGA GCCTGACCCC CGAGCAGTGG AAGTCCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTC<br>ACACACGAGG GCAGCACCGT GGAAAAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGCAG C |
| HC 蛋白质<br>(SEQ ID NO: 73)     | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKLEWVSTISGLGQE<br>AYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYYTHSGKRYYPFDI<br>WGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTH<br>PPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQP<br>REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| HC DNA<br>(SEQ ID NO: 37)     | GAAGTGACG TGCTGGAAG CGGTGGCGGT CTGGTGACG CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG<br>AGCTGTGCC CAAGCGGCTT TACCTTCAGC AGATATGCAA TGACTTGGGT GCGCCAAGCA<br>CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGTACC ATAAGCGGGC TGGGACAAGA GGCTTACTAC<br>GCAGGCTCCG TCAAAGCCG CTTTACCATT AGTCGCGATA ACAGCAAAA CACCTGTAT<br>CTGCAAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAGTTT ATTATTGCGC GCGAGGATTC  |

[0403]

|            |            |            |            |            |             |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| CACTACACTC | ACTCCGGTAA | ACGTTACTAC | TATCCTTTTG | ACATTTGGGG | CCAGGGCACC  |
| CTGGTACTG  | TCTCGAGCGC | GTCGACCAA  | GGCCCCAGCG | TGTTCCCTCT | GGCCCCCAGC  |
| AGCAAGAGCA | CCTCTGGCGG | AACAGCCGCC | CTGGGCTGCC | TGGTCAAGGA | CTACTTCCCC  |
| GAGCCCGTGA | CCGTGTCTG  | GAACTCTGCG | GCCCTGACCA | GCGGCCTGCA | CACCTTTCCA  |
| GCCGTGCTCC | AGAGCAGCGG | CCTGTACAGC | CTGAGCAGCG | TCGTGACCGT | GCCCAGCAGC  |
| AGCCTGGGCA | CCCAGACCTA | CATCTGCAAC | GTGAACCACA | AGCCAGCAA  | CACAAGGTG   |
| GACAAGCGGG | TGGAACCCAA | GAGCTGCAC  | AAGACCCACA | CCTGTCCCCC | CTGCCCTGCC  |
| CCTGAAGCGG | AGGGAGCCCC | CTCCGTGTTT | CTGTTCCCCC | CAAAGCCTAA | GGACACCCCTG |
| ATGATCAGCC | GGACCCCGA  | AGTGACCTGC | GTGGTGGTGG | ACGTGTCCCA | CGAGGACCCCT |
| GAAGTGAAGT | TAAATTGGTA | CGTGGACGCG | GTGGAAGTGC | ACAACGCCAA | GACCAAGCCC  |
| AGAGAGGAAC | AGTACAACAG | CACCTACCGG | GTGGTGTCCG | TGCTGACCGT | GCTGCACCAG  |
| GACTGGCTGA | ACGGCAAAGA | GTACAAGTGC | AAGGTGTCCA | ACAAGGCCCT | GCCTTCTCC   |
| ATCGAGAAAA | CCATCAGCAA | GGCCAAAGGC | CAGCCCCGCG | AGCCCCAGGT | GTACACACTG  |
| CCCCTAGCC  | GGGAAGAGAT | GACCAAGAAC | CAGGTGTCCC | TGACCTGCCT | CGTGAAGGGC  |
| TTCTACCCCA | GCGACATTGC | CGTGGAAATG | GAGAGCAACG | GCCAGCCCGA | GAACAACCTAC |
| AAGACCACCC | CCCCGTGTCT | GGACAGCGAC | GGCTATTCT  | TCCTGTACAG | CAAGCTGACC  |
| GTGGACAAGA | GCCGGTGGCA | GCAGGGCAAC | GTGTTCAAGT | GCTCCGTGAT | GCACGAGGCC  |
| CTGCACAACC | ACTACACCCA | GAAGTCCCTG | AGCCTGAGCC | CCGGCAAG   |             |

[0404]

| 可変区对名称<br>Y022883             |  |
|-------------------------------|--|
| 框架 Vh                         | YLAN_VH3-23  |
| 框架 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  |
| 蛋白质序列 (VH)<br>(SEQ ID NO: 16) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTRYAISWVRQAPGKGLEWVSVISGHGSEAN<br>YAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQ<br>GTLVTVSS   |
| 蛋白质序列 (VL)<br>(SEQ ID NO: 6)  | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLWSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG<br>VSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQ  |
| Ppt 形式                        | h_IgG1f_AEASS  |
| LC 蛋白质 (SEQ ID NO: 70)        | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLWSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSG<br>VSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSQYATFIAFAVFGGGTKLTVLGQPKAAP<br>VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYYAA<br>SSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS  |
| LC DNA (SEQ ID NO: 34)        | CAGAGCGCCC TGACCCAGCC AGCCAGCGTT AGCGGTAGCC CAGGCCAGAG CATTACCATT<br>AGCTGCACCG GCACCAGCAG CGACGTGGGC AGCTATAACC TGTTTAGCTG GTATCAGCAG<br>CATCCGGGCA AAGCCCCGAA ACTGATGATC TATGAAGGCA GCAAACGCC GAGCGCGCTT<br>AGCAACCGCT TTAGTGGCAG CAAAAGCGGC AACACCGCCA GCCTGACCAT TAGCGGCCTG<br>CAAGCCGAAG ACGAAGCCGA TTATTACTGC TCCCAGTAGC CTACTTTCAT CGCTTTCCT<br>GTGTTTGGCG GCGGTACCAA GCTGACCGTG CTGGGCCAGC CCAAAGCCGC CCCTAGCGTG<br>ACCTGTTC CCCCAGCAG CGAGGAATC CAGGCCAACA AGGCCACCT CGTGTGCCTG<br>ATCAGCGACT TCTACCTGG CGCCGTGACC GTGGCTGGA AGGCCGATAG GATGCCCTGTG<br>AAGGCCGGCG TGGAAACCA CACCCCAAGC AAGCAGAGCA ACAACAATA CGCCGCCAGC<br>AGCTACCTGA GCCTGACCC CGAGCAGTGG AAGTCCACA GATCCTACAG CTGCCAGGTC<br>ACACACGAGG GCAGCACCGT GAAAAGACC GTGGCCCCA CCGAGTGCAG C |
| HC 蛋白质<br>(SEQ ID NO: 74)     | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTRYAISWVRQAPGKGLEWVSVISGHGSEAN<br>YAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGFHYTHSGKRYYPFDIWGQ<br>GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCP<br>APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK   |
| HC DNA<br>(SEQ ID NO: 38)     | GAAGTGCAGC TGCTGGAAG CCGTGGCGGT CTGGTGCAGC CAGGTGGTAG CCTGCGCCTG<br>AGCTGTGCCG CAAGCGGGTT CTCCTTACC AGATATGCAA TTTCTGGGT GCGCCAAGCA<br>CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GGTGAGTGTG ATAAGCGGGC ATGGTTCCGA GGCTAACTAC<br>GCCGAGAGCG TCAAGGGTCG CTTTACCATT AGTCGCGATA ACAGCAAAA CACCTGTAT<br>CTGCAAATGA ACAGCCTGCG GGCAGAAGAT ACCGCAATTT ATTATTGCGC GCGAGGATTC<br>CACTACACTC ACTCCGGTAA ACGTTACTAC TATCCTTTTG ACATTTGGGG CCAGGGCACC<br>CTGTTACTG TCTCGAGCGC GTCGACCAA GGCCCCAGCG TGTTCCCTCT GGCCCCAGC<br>AGCAAGAGCA CCTCTGGCGG AACAGCCGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCC<br>GAGCCCGTGA CCGTGTCTG GAACTCTGGC GCCCTGACCA GCGGCGTGA CACCTTCCA<br>GCCGTGCTCC AGAGCAGCG CCGTACAGC CTGAGCAGC TCGTGACCGT GCCCAGCAGC  |

|            |            |             |            |            |            |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| AGCCTGGGCA | CCCAGACCTA | CATCTGCAAC  | GTGAACCACA | AGCCAGCAA  | CACAAAGGTG |
| GACAAGCGGG | TGGAACCCAA | GAGCTGCAGC  | AAGACCACA  | CCTGTCCCC  | CTGCCCTGCC |
| CCTGAAGCGG | AGGGAGCCCC | CTCCGTGTTT  | CTGTTCCCC  | CAAAGCCTAA | GGACACCCTG |
| ATGATCAGCC | GGACCCCGA  | AGTGACCTGC  | GTGGTGGTGG | ACGTGTCCA  | CGAGGACCTC |
| GAAGTGAAGT | TTAATTGGTA | CGTGGACGGC  | GTGGAAGTGC | ACAACGCCAA | GACCAAGCCC |
| AGAGAGGAAC | AGTACAACAG | CACCTACCGG  | GTGGTGTCCG | TGCTGACCGT | GCTGCACCAG |
| GACTGGCTGA | ACGGCAAAGA | GTACAAGTGC  | AAGGTGTCCA | ACAAGGCCCT | GCCTTCTCTC |
| ATCGAGAAAA | CCATCAGCAA | GGCCAAAGGC  | CAGCCCCGCG | AGCCCCAGGT | GTACACACTG |
| CCCCCTAGCC | GGGAAGAGAT | GACCAAGAAC  | CAGGTGTCCC | TGACCTGCCT | CGTGAAGGGC |
| TTCTACCCCA | GCGACATTGC | CGTGGAAATGG | GAGAGCAACG | GCCAGCCCGA | GAACAACACT |
| AAGACCACCC | CCCCTGTGCT | GGACAGCGAC  | GGCTCATTCT | TCCTGTACAG | CAAGCTGACC |
| GTGGACAAGA | GCCGGTGGCA | GCAGGGCAAC  | GTGTTCAAGT | GCTCCGTGAT | GCACGAGGCC |
| CTGCACAACC | ACTACACCCA | GAAGTCCCTG  | AGCCTGAGCC | CCGGCAAG   |            |

[0405]

表 24: 序列表图例 (key)

| SEQ ID NO: | 描述信息 (descriptor)  | 序列   |
|------------|--|--|
| 1          | 野生型人 PAR2  | MRSPSAAWLLGAAIILAAASLSCSGTIQGTNRSSKGRSLIGKVDGTSHTVTKGVTVEVFSVDFSAVLTGKLTVTFLPIVYTVFVWGLPSNMGMALWVFLFRTKKHPAVIYMANLADLLSVIWFPLKIAYHIHGNWYIYGEALCNVLIIGFYGNMYCSILFMTCLSVQRVWVIVNPMGHSRKKANIAIGISLAIWLLLVITPLVWVKQTFIPALNITTCVDLPEQLLVGDMFNFLSLAIGVFLFPAFLTASAYVLMIRMLRSSAMDENSEKKRRAIKLIVTVLAMYLI CFTPSNLLLWHYFLIKSQGQSHVYALYVALCLSTLNSCIDPFVYVYVSHDFRDHAKNALLCRSRTVQMQVSLTSKKHSRKSQSSSSSTTVKTSY |
| 2          | 克隆 Y022065 的 VH 区  | 参见表 20   |
| 3          | 根据 Kabat 的克隆 Y022065 的 HCDR1 区                             | 参见表 20   |
| 4          | 根据 Kabat 的克隆 Y022065 的 HCDR2 区                             | 参见表 20   |
| 5          | 根据 Kabat 的克隆 Y022065, Y022870, Y022877 和 Y022883 的 HCDR3 区 | 参见表 20 至 23  |
| 6          | 克隆 Y022065, Y022870, Y022877 和 Y022883 的 VL 区              | 参见表 20 至 23  |
| 7          | 根据 Kabat 的克隆 Y022065, Y022870, Y022877 和 Y022883 的 LCDR1 区 | 参见表 20 至 23  |
| 8          | 根据 Kabat 的克隆 Y022065, Y022870, Y022877 和 Y022883 的 LCDR2 区 | 参见表 20 至 23  |
| 9          | 根据 Kabat 的克隆 Y022065, Y022870, Y022877 和 Y022883 的 LCDR3 区 | 参见表 20 至 23  |
| 10         | 克隆 Y022870 的 VH 区  | 参见表 21   |
| 11         | 根据 Kabat 的克隆 Y022870 的 HCDR1 区                             | 参见表 21   |

[0406]

|    |  |  |
|----|--|--|
| 12 | 根据 Kabat 的克隆 Y022870 的 HCDR2 区           | 参见表 21   |
| 13 | 克隆 Y022877 的 VH 区                        | 参见表 22   |
| 14 | 根据 Kabat 的克隆 Y022877 的 HCDR1 区           | 参见表 22   |
| 15 | 根据 Kabat 的克隆 Y022877 的 HCDR2 区           | 参见表 22   |
| 16 | 克隆 Y022883 的 VH 区                        | 参见表 23   |
| 17 | 根据 Kabat 的克隆 Y022883 的 HCDR1 区           | 参见表 23   |
| 18 | 根据 Kabat 的克隆 Y022883 的 HCDR2 区           | 参见表 23   |
| 19 | 克隆 Y022054 的 VH 区                        | EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYSAISWVROAPGKLEWVSAISGSGGTYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCA<br>RGAIEFGWVGQGLTVTVSS |
| 20 | 根据 Kabat 的克隆 Y022054 的 HCDR1 区           | SYAIS  |
| 21 | 根据 Kabat 的克隆 Y022054 的 HCDR2 区           | AISGSGGTYAESVKG  |
| 22 | 根据 Kabat 的克隆 Y022054 的 HCDR3 区           | GYAEFGV  |
| 23 | 克隆 Y022054 的 VL 区                        | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASLSQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTWGGPQIF<br>GGGTKVEIKRT        |
| 24 | 根据 Kabat 的克隆 Y022054 的 LCDR1 区           | RASQSISSYLN  |
| 25 | 根据 Kabat 的克隆 Y022054 和 Y021171 的 LCDR2 区 | AASSLQS  |
| 26 | 根据 Kabat 的克隆 Y022054 的 LCDR3 区           | QQTWGGPQT  |
| 27 | 克隆 Y021171 的 VH 区                        | EVQLVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYINWVROAPGKLEWVSSISSYTYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCA<br>RAASGFAIFDYWGQGLTVTVSS   |
| 28 | 根据 Kabat 的克隆 Y021171 的 HCDR1 区           | SYSIN  |
| 29 | 根据 Kabat 的克隆 Y021171 的 HCDR2 区           | SISSSSYTYAESVKG  |

[0407]

|    |  |   |
|----|--|---|
| 30 | 根据 Kabat 的克隆 Y021171 的 HCDR3 区                 | AASGFAIFDY  |
| 31 | 克隆 Y021171 的 VL 区                              | DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISWLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASLSQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLSQPEDFATYYCQQTHYVPLTFGGTKVEIKRT |
| 32 | 根据 Kabat 的克隆 Y021171 的 LCDR1 区                 | RASQGISWLA  |
| 33 | 根据 Kabat 的克隆 Y021171 的 LCDR3 区                 | QQTHVPLT  |
| 34 | Y022065, Y022870, Y022877 和 Y022883 的 LC 核苷酸序列 | 参见表 20 至 23   |
| 35 | Y022065 的 HC 核苷酸序列                             | 参见表 20  |
| 36 | Y022870 的 HC 核苷酸序列                             | 参见表 21  |
| 37 | Y022877 的 HC 核苷酸序列                             | 参见表 22  |
| 38 | Y022883 的 HC 核苷酸序列                             | 参见表 23  |
| 39 | 人 PAR2 激活肽                                     | SLIGKV  |
| 40 | 鼠 PAR2 激活肽                                     | SLIGRL  |
| 41 | 涵盖 N 端的 PAR2 表位序列 1                            | VETVF   |
| 42 | 涵盖螺旋 0/1 的 PAR2 表位序列 2                         | SVDEFSASVLTGKLTTF   |
| 43 | 涵盖 ECL3 的 PAR2 表位序列 3                          | LLVVHY  |
| 44 | 涵盖 ECL3 的 PAR2 表位序列 4                          | FLIKSQGQSHVYALY   |
| 45 | PAR2 N 端区                                      | VTVETVFSVDEFSASVLTGKLTTV  |
| 46 | 根据 Chothia 的克隆 Y022065 的 HCDR1 区               | GFTFSSY   |
| 47 | 根据 Chothia 的克隆 Y022065 的 HCDR2 区               | SGSGGS  |
| 48 | 根据 Chothia 的克隆                                 | GFHYTHSGKRYVYVFDI   |

[0408]

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
|           | Y022065, Y022870, Y022877<br>和 Y022883 的HCDR3 区                   |            |
| <b>49</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022065, Y022870, Y022877<br>和 Y022883 的LCDR1 区 | TSSDVGSYNL |
| <b>50</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022065, Y022870, Y022877<br>和 Y022883 的LCDR3 区 | YATFIIFA   |
| <b>51</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022870 的HCDR1 区                                | GFSFSRY    |
| <b>52</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022870 的 HCDR2 区                               | SALGLE     |
| <b>53</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022877 的HCDR1 区                                | GFTFSRY    |
| <b>54</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022877 的HCDR2 区                                | SGLGQE     |
| <b>55</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022883 的HCDR1 区                                | GFSFTRY    |
| <b>56</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022883 的HCDR2 区                                | SGHGSE     |
| <b>57</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022054 的HCDR1 区                                | GFTFSSY    |
| <b>58</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022054 的HCDR2 区                                | SGSGGS     |
| <b>59</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y022054 的HCDR3 区                                | GYAEFGV    |
| <b>60</b> | 根据 Chothia 的克隆 Y022054<br>的 LCDR1 区                               | SQSISSY    |
| <b>61</b> | 根据 Chothia 的克隆 Y022054<br>的 LCDR3 区                               | WGGPQ      |
| <b>62</b> | 根据 Chothia 的克隆<br>Y021171 的HCDR1 区                                | GFTFSSY    |
| <b>63</b> | 根据 Chothia 的克隆  | SSSSSY     |

[0409]

|    |  |  |
|----|--|--|
| 64 | Y021171 的 HCDR2 区<br>根据 Chothia 的克隆<br>Y021171 的 HCDR3 区 | AASGFAIFDY   |
| 65 | 根据 Chothia 的克隆 Y021171<br>的 LCDR1 区                      | SQGISSW  |
| 66 | 根据 Chothia 的克隆 Y021171<br>的 LCDR3 区                      | HWPL   |
| 67 | 野生型人 PAR 1   | MGPRRLLLVAAACFSLCGPILLSARTRARRPESKATNATLDRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGLTEYRLVSNKSSPLQKQLPAFISEDASGYLTSS<br>WLTLPVSVYTGFFVYSLPIMAIWFIKMKYKPAVYVMHLATADVLFVSVLPFKISYYFSGSDWQFGSELCRFVTAAFYCNMYASILLMTVISI<br>DRFLAVVYPMQSLSWRTLGRASFTCLAIWALAIAGVVP LLLKEQTIQVPLNITTC HDVLNETLEGYYAYFSAFSAVFFVPLIISTVCYVSIIRCLSS<br>AVANRKKSRALFLSAAVFCIFICFGPTNVLLIA-HYSFLSHTSTTEAAAYFAYLLCVSVSSICCIDPLIYYASSECQRVYVSI LCCKESSDPSSYNSSGQLM<br>ASKMDTCSNLLNNSIYKLLT                                      |
| 68 | 野生型人 PAR 3   | MKALIFAAAAGLLLLPTFCQSGMENDTNLAKPTLPKIFTRGAPPNSFEFFPSALEGWTGATITVKKICEESASHLHVKNATMGYLTSSLSLTKLIPAI<br>YLLVFGVGPANAVTLWMLFFRTRSICTTVYTNLAIADFLFCVTLPKIAYHLNGNWWFGEVLCRATTVFYGNMYCSILLACISINRYLAIVHPFT<br>YRGLPKHTYALVTCGLVWATVFLYMLPFILKQEYLVQPDITTC HDVHNTCESSPFQLYYFISLAFGGFLIPFVLIYCYAAIIRTLNAYDHRWLWVYK<br>ASLLIVFTICFAPSNIILIHANYYNNNDGLYFIYLIACLGLSLSCLDPFLYFLMSKTRNHSTAYLTK  |
| 69 | 野生型人 PAR 4   | MWGRLLWPLVLFGLSGLGTTSPVYDESGTGGDDSTPSILPAPRGYPGQVCANDSDTLELPDSSRALLLGGWVPTRLVPALYGLLVVGLPAN<br>GLALWVLAQAAPRIPSTMILLMNLAAADLLALALPPRIAYHLRGORWPFGEAACRLATAALYGHMYGVSLLAAVSDRYLALVHPLRARALRGR<br>RLALGLCMAAWLMAAALALPLTQRQTRLARSDRVLC HDALPDAQASHWQPAFTCLALLGCFLPLLAMLLCYGATLHTLAASGRRYGHALRLT<br>AVVLASAVAFFVPSNLLLLHYS D P S P S A W G N L Y G A V V P S I A L S T L N S C V D P F I Y Y V V S A E F R D K V R A G L F Q R S P G D T V A S K A S A E G G S R G M G T H S S<br>LLQ |
| 70 | Y022065, Y022870, Y022877<br>和 Y022883 的 LC 氨基酸序列        | 参见表 20 至 23  |
| 71 | Y022065 的 HC 氨基酸序列                                       | 参见表 20   |
| 72 | Y022870 的 HC 氨基酸序列                                       | 参见表 21   |
| 73 | Y022877 的 HC 氨基酸序列                                       | 参见表 22   |
| 74 | Y022883 的 HC 氨基酸序列                                       | 参见表 23   |

[0410] 参考文献

[0411] Abbas, A., Lichtman, A. and Pillai, S., 2000. Cellular and molecular

immunology.4th ed.

[0412] Allen L.V.2008.The Art,Science,and Technology of Pharmaceutical Compounding,Third Edition.

[0413] 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 $\epsilon$ - and A-dependent mechanisms in rats and mice.J.Physiol,575(2),pp.555-571.

[0414] 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.

[0415] Ausubel,F.,1987.Current protocols in molecular biology.

[0416] 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.

[0417] 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.

[0418] 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.,Wiggin,G.,Zhukov,A.,Marshall,F.and Dekker,N.,2017.Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2.Nature,545(7652),pp.112-115.

[0419] 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.

[0420] 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

[0421] 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.

[0422] 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.

[0423] Hamilton JR, Trejo J. 2017. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 57, pp. 349-373.

[0424] 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.

[0425] 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).

[0426] 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).

[0427] Huston, J., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M., Novotny, J., Margolies, M., Ridge, R., Bruccoleri, 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.

[0428] 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.

[0429] 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

[0430] 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.

[0431] 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. *FASEBJ*. 26(7), pp. 2877-87.

[0432] 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

[0433] 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.

[0434] 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.

[0435] 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.

[0436] 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.

[0437] 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.

[0438] 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.

[0439] 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.

[0440] Tiller T, Schuster I, Deppe D, Siegers K, Strohner R, Herrmann T, Berenguer M, Poujol D, Stehle J, Stark Y, Heßling M, Daubert D, Felderer K, Kaden S, 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.

[0441] 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.

[0442] 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>

[0443] 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.

[0444] Yau MK, Liu L, Fairlie DP. 2013. Toward drugs for protease-activated receptor 2 (PAR2). *J Med Chem*. 56(19), pp.7477-97.

[0445] 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.

[0446] 本发明的范围不受本文中所述的具体方面所限制。实际上,本发明的多种修改(除了所描述的那些之外)根据前述描述和附图对于本领域技术人员将变得明显。这样的修改旨在落入所附权利要求书的范围内。本文中引用的所有参考文献(例如出版物或专利或专利申请)均通过引用以其整体并入本文。

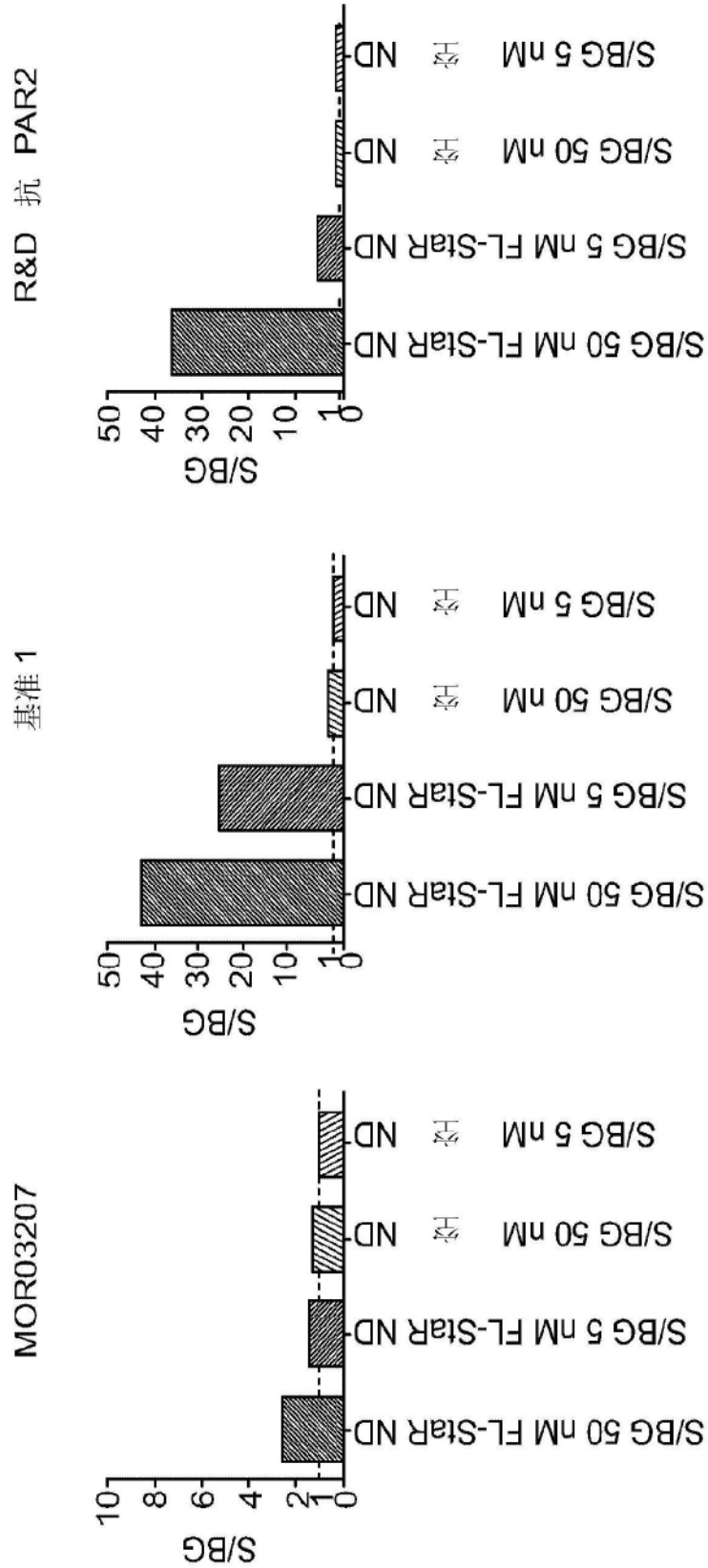


图1

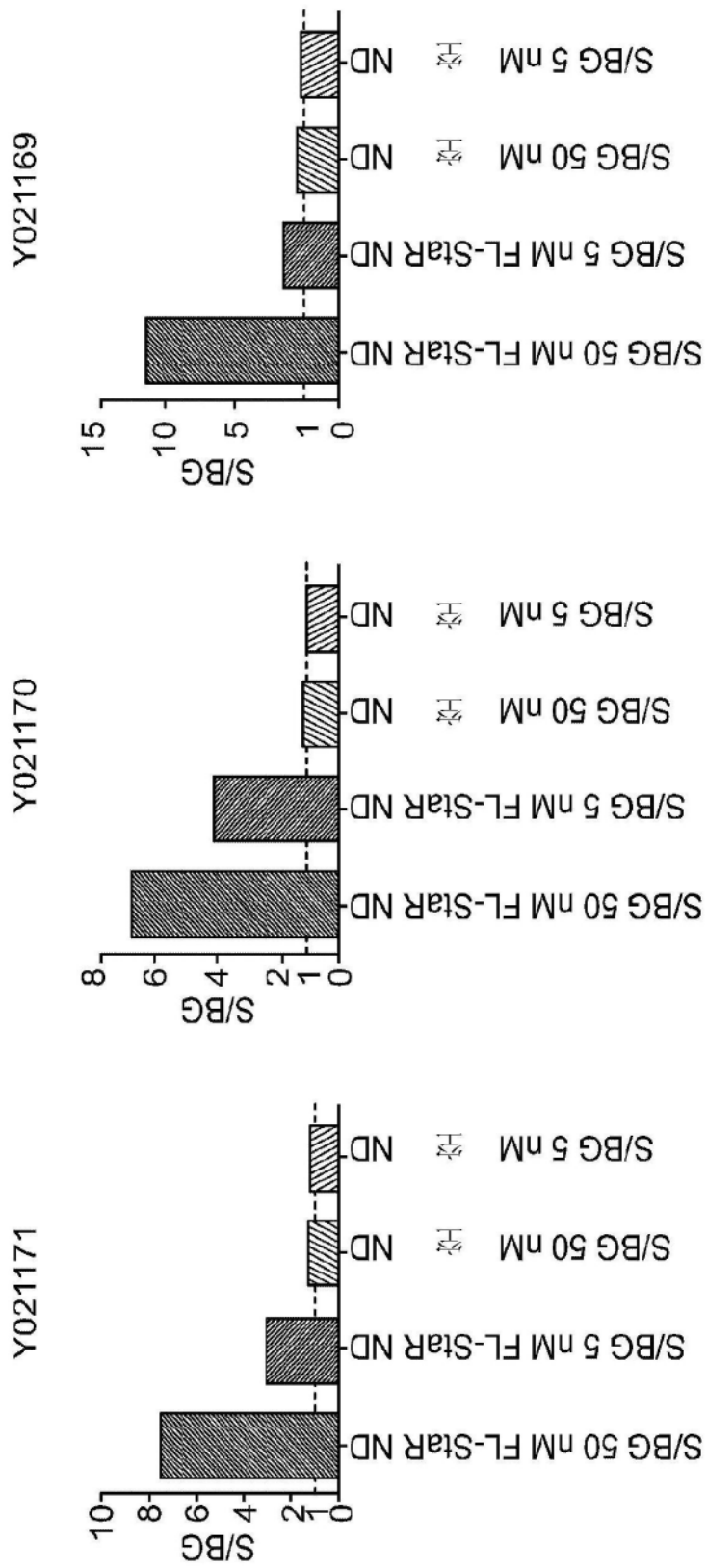


图1 (续)

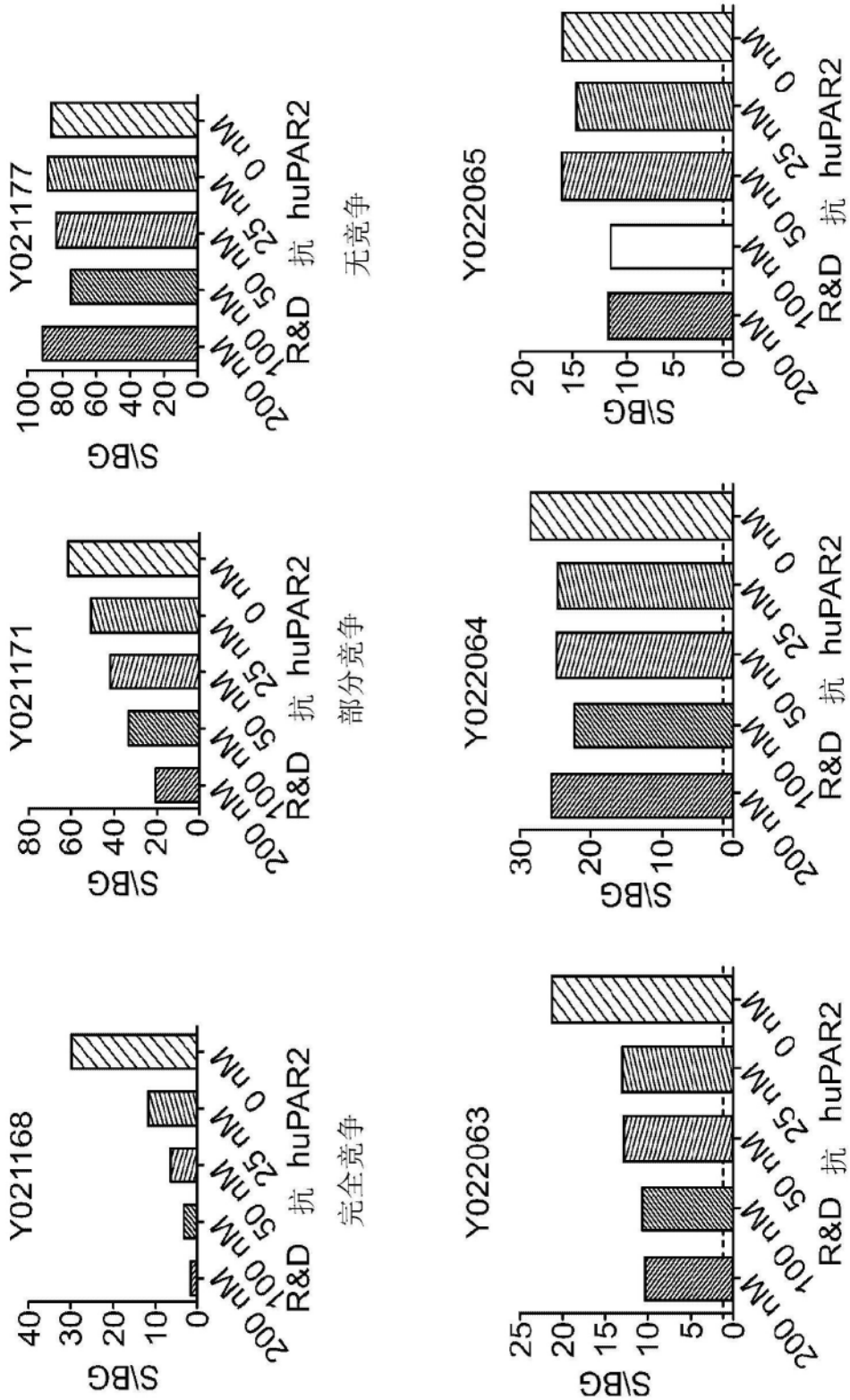


图2

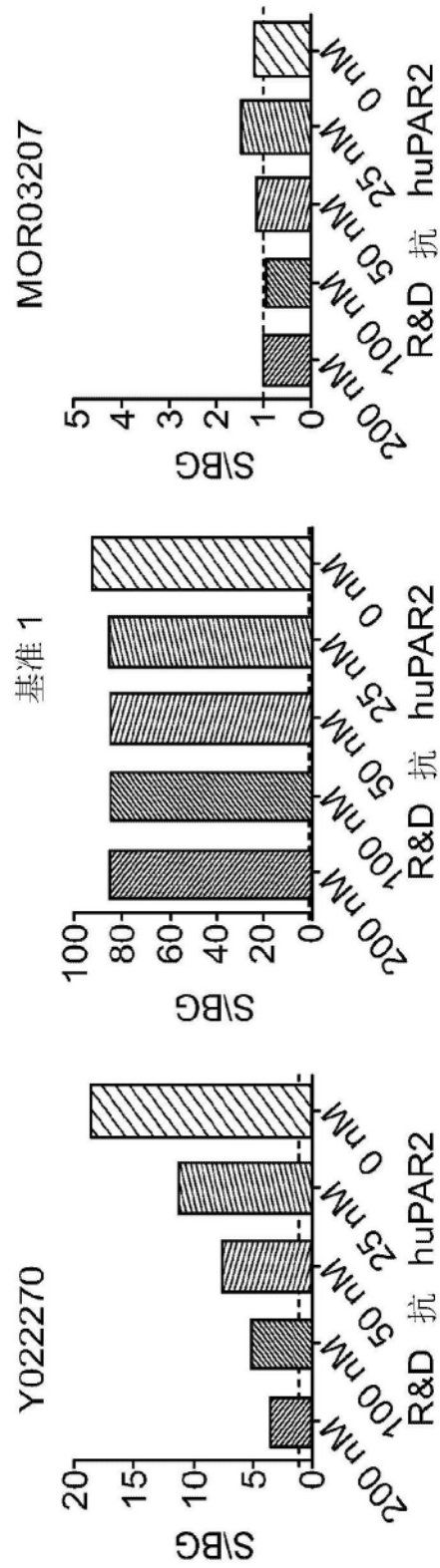


图2(续)

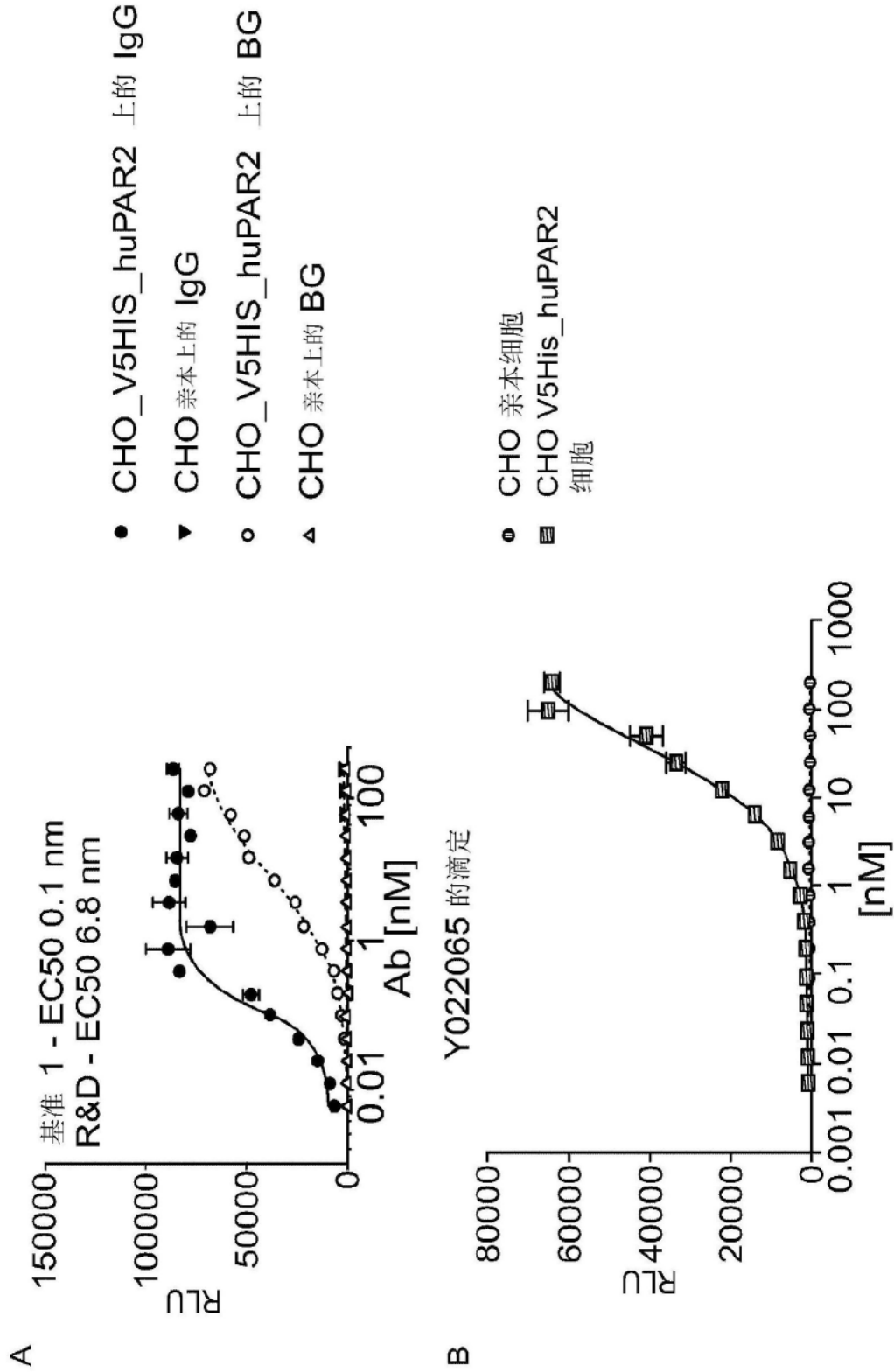


图3

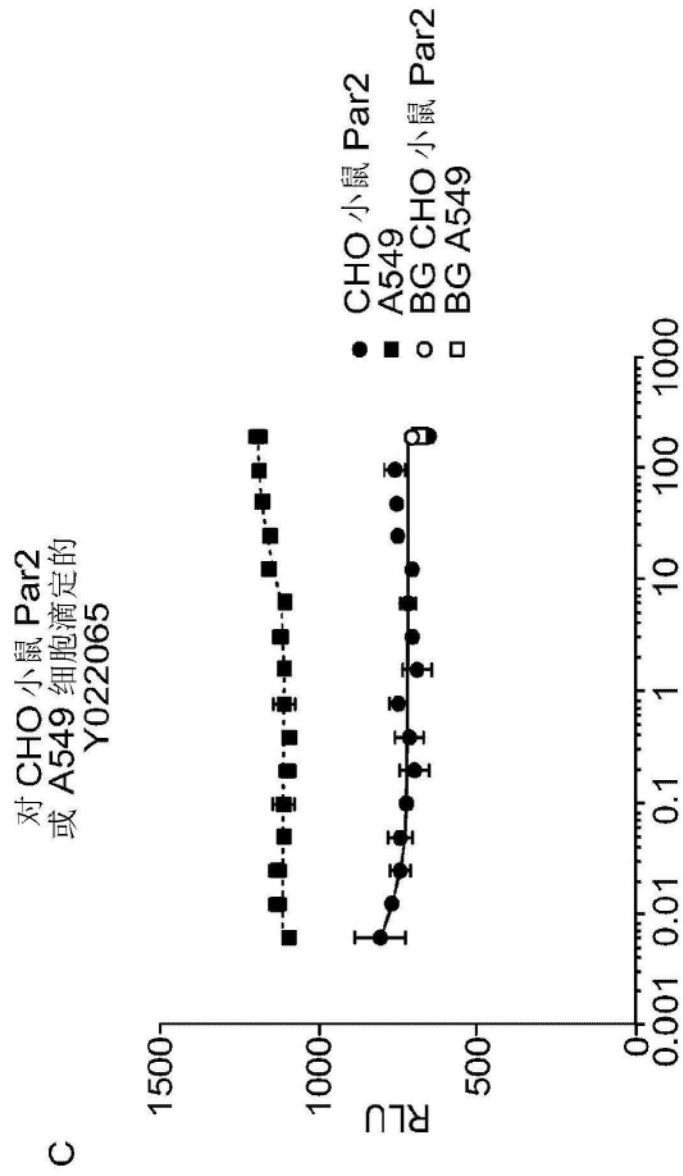


图3 (续)

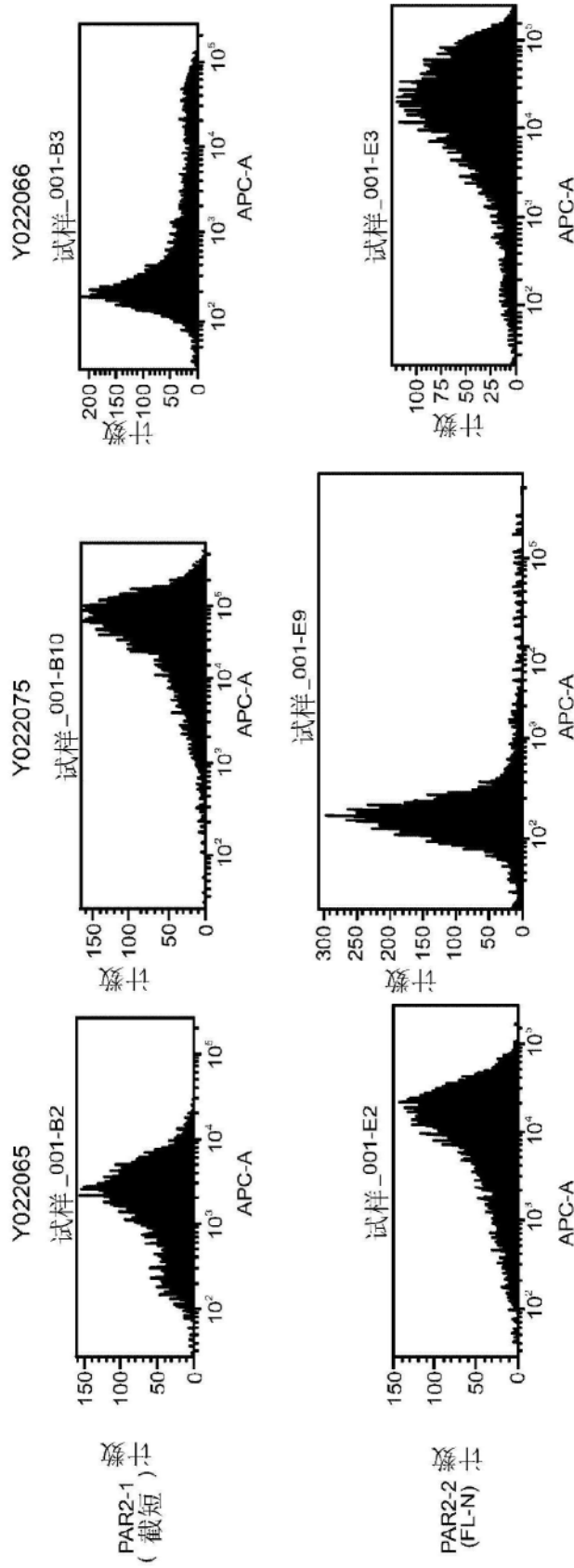


图4

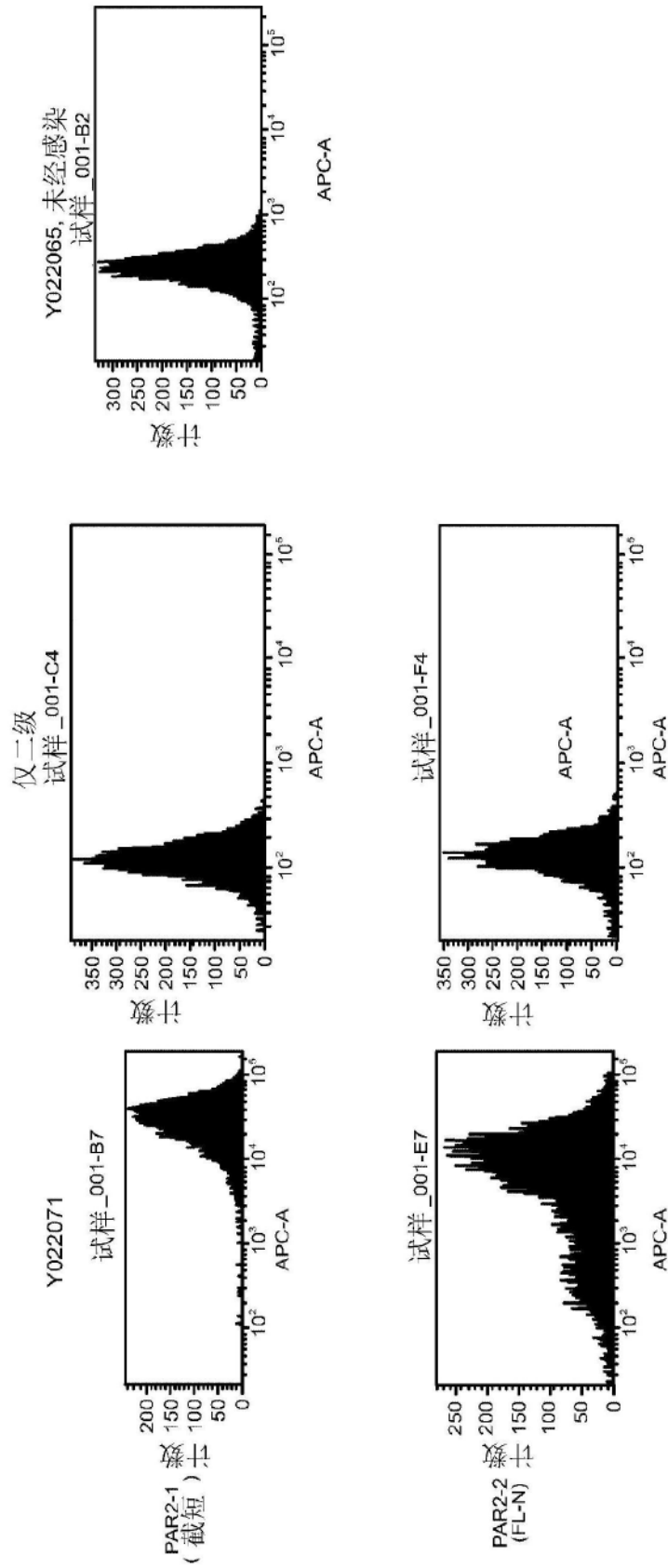


图4 (续)

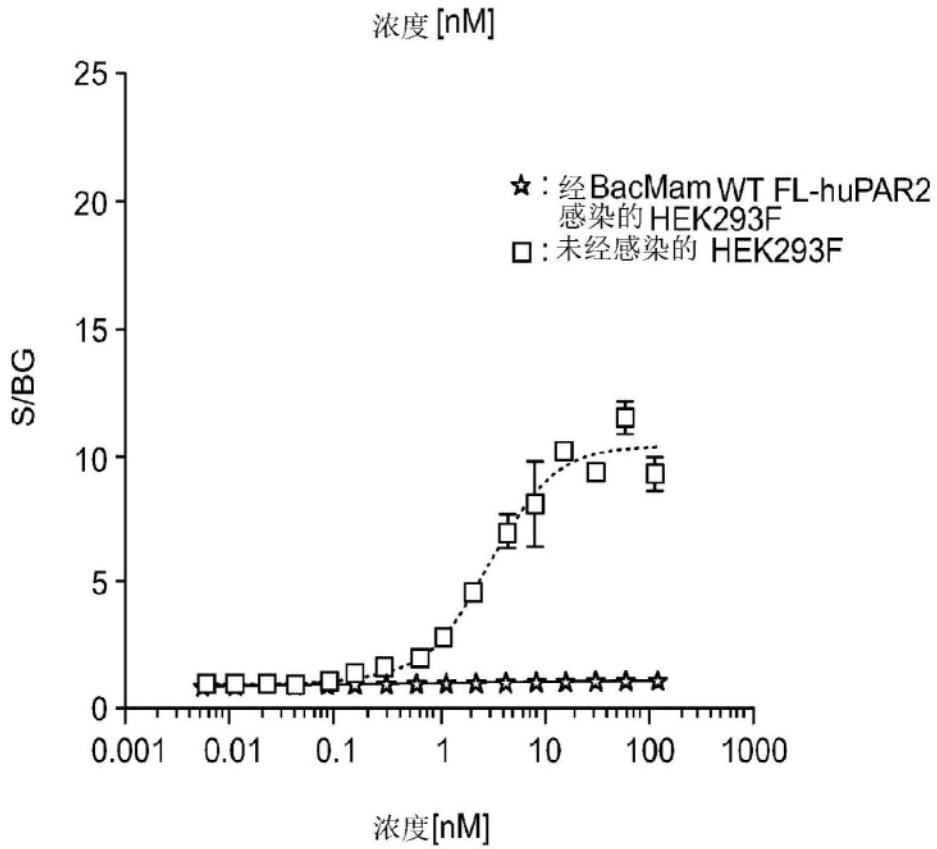
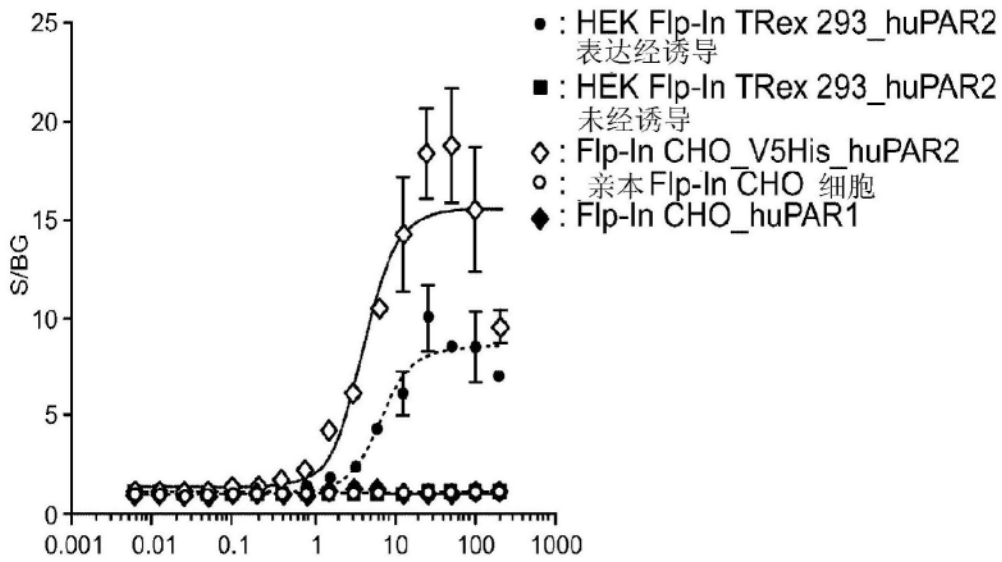


图5

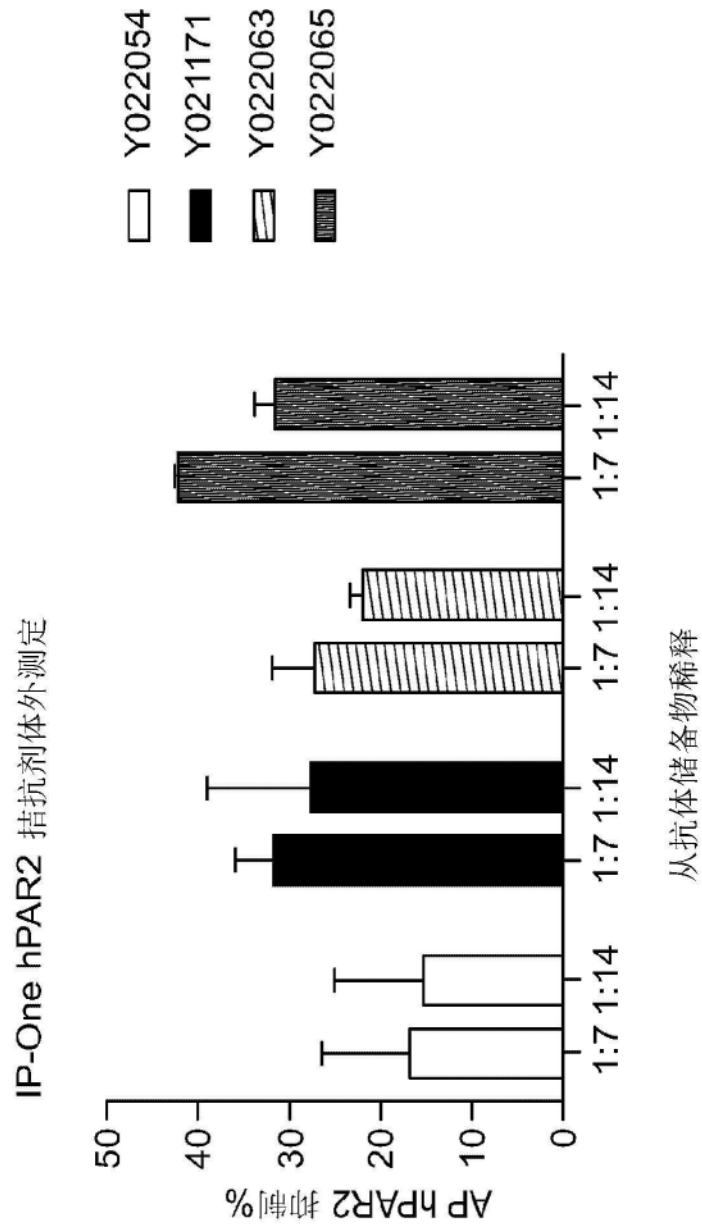


图6

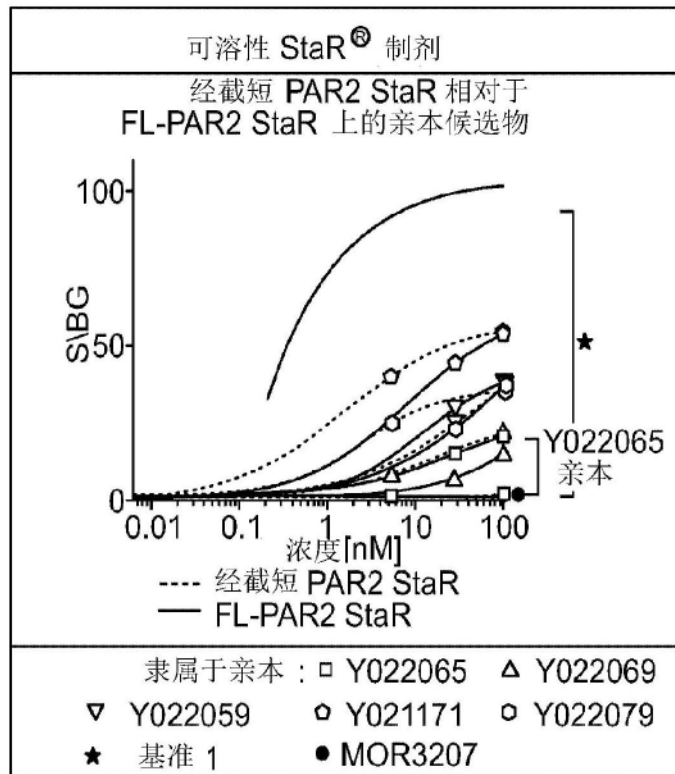
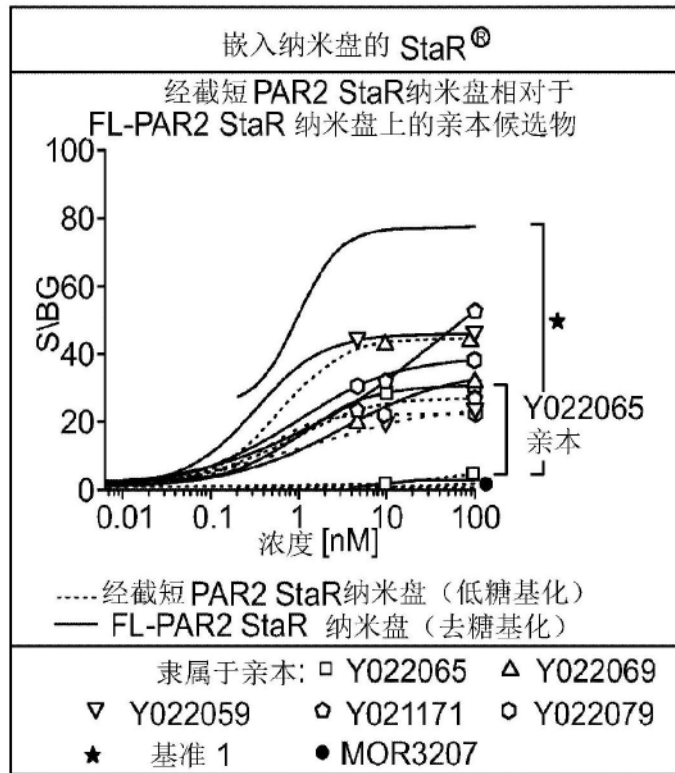


图7

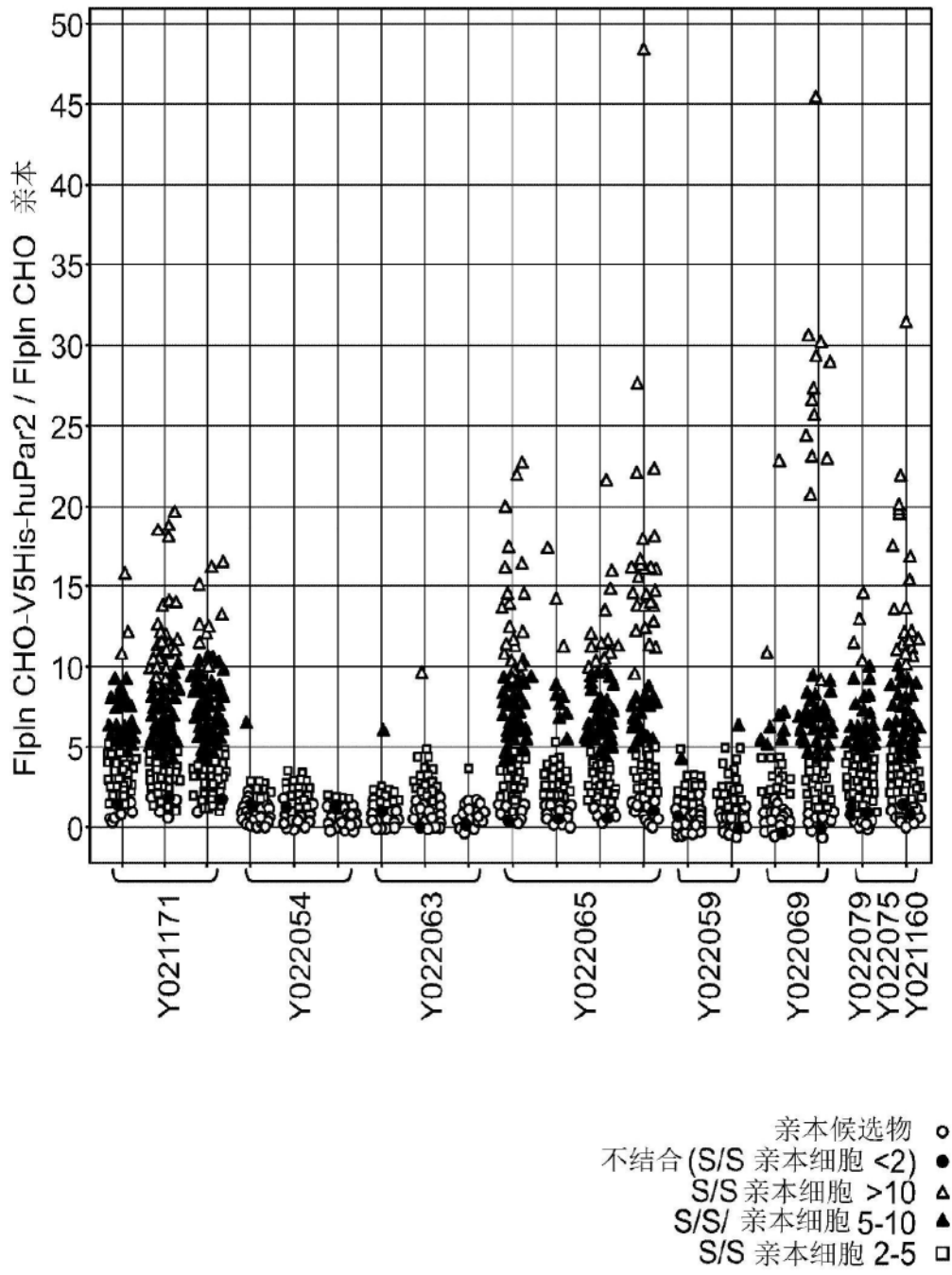


图8

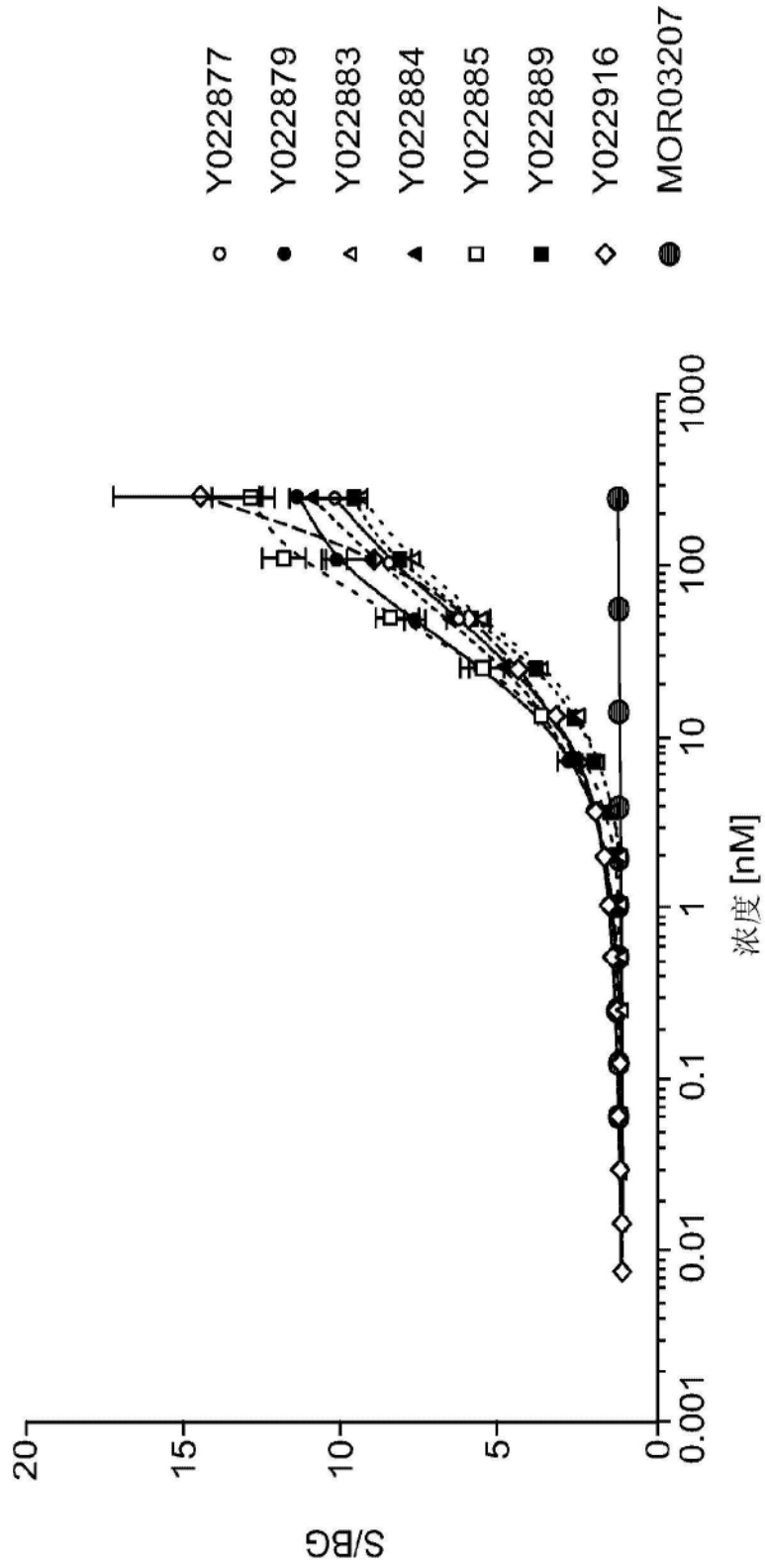


图9

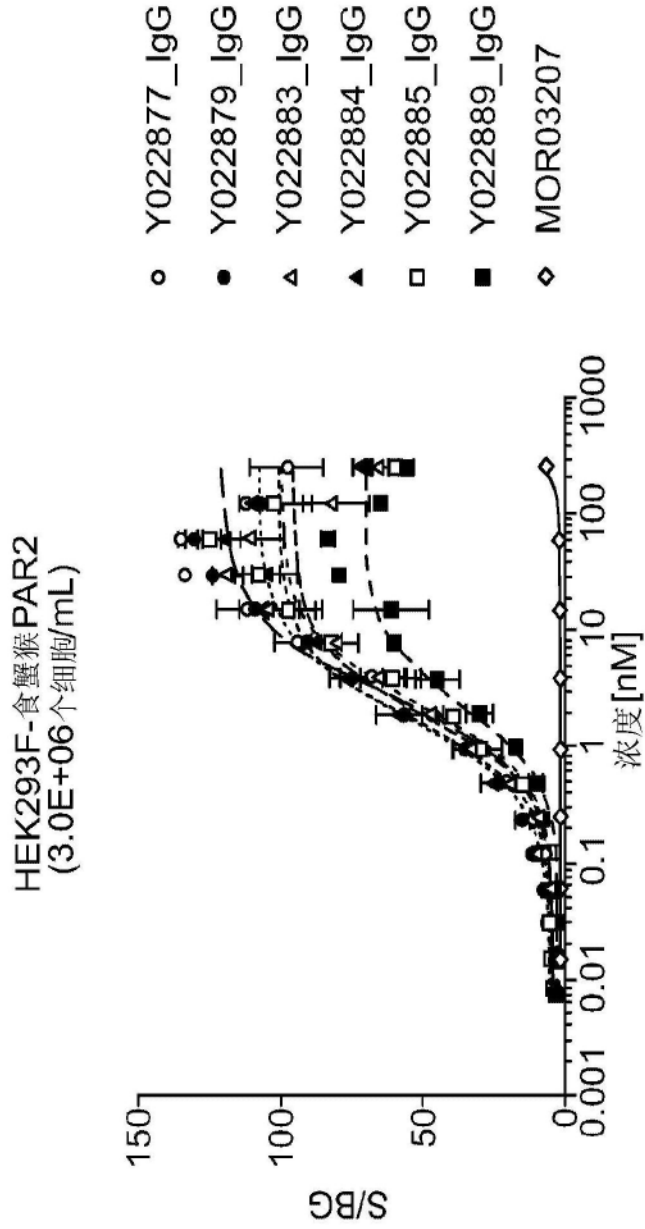


图10

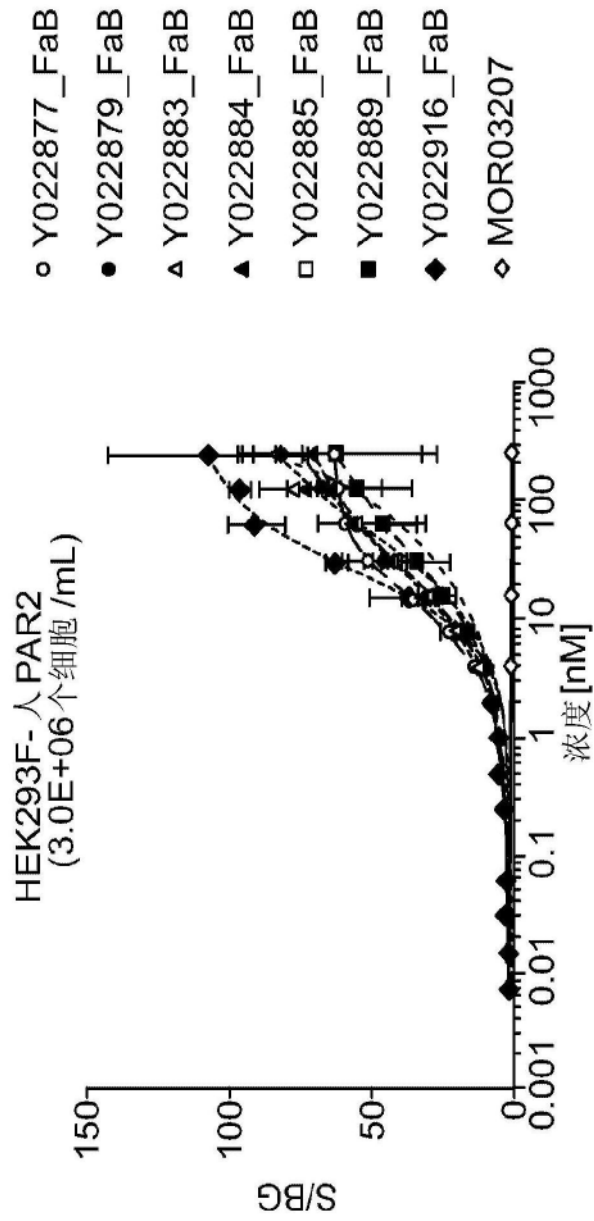


图10(续)

HEK293F-人PAR2  
(3.0E+06个细胞/mL, w/ NaN<sub>3</sub>)

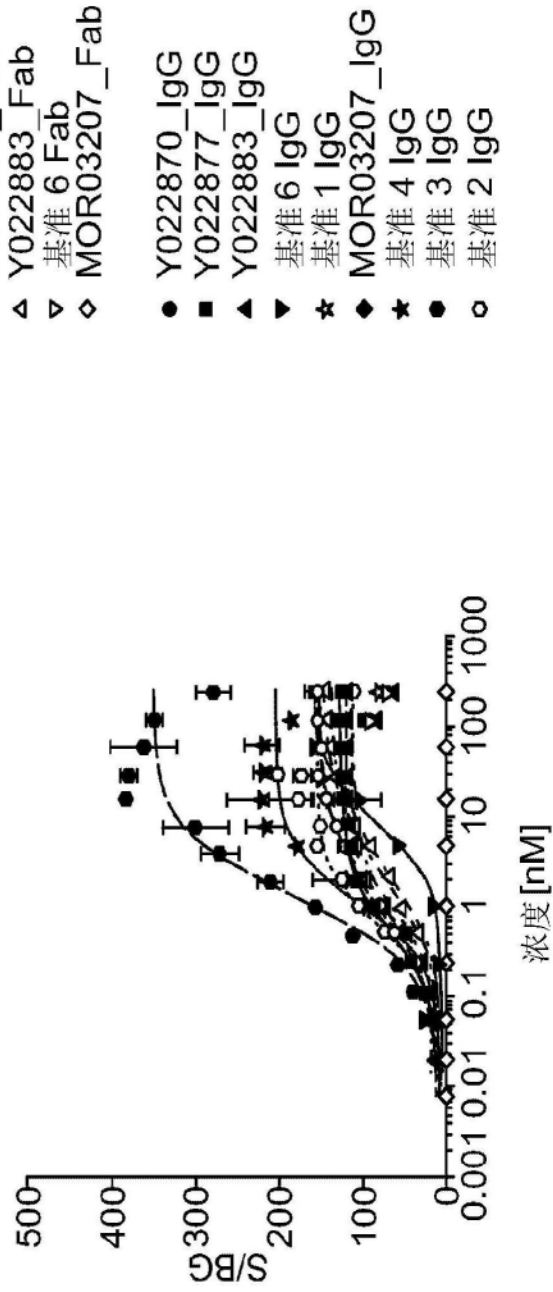


图11

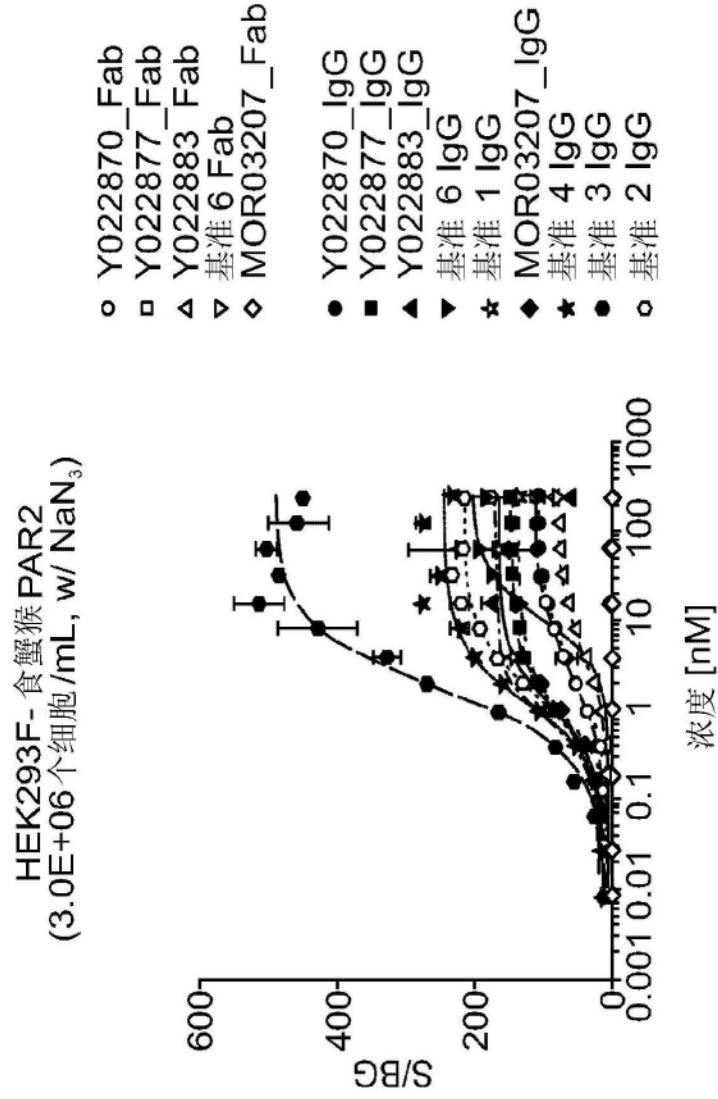


图11(续)

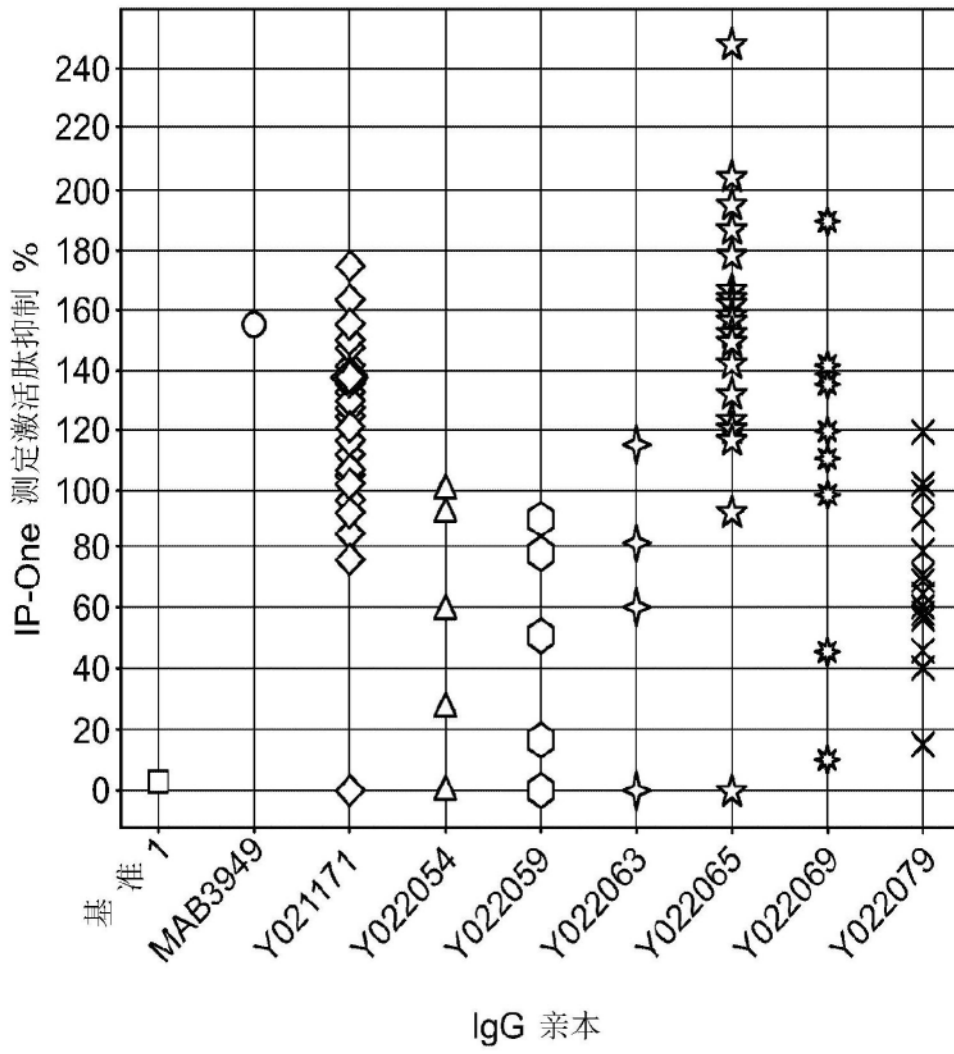


图12

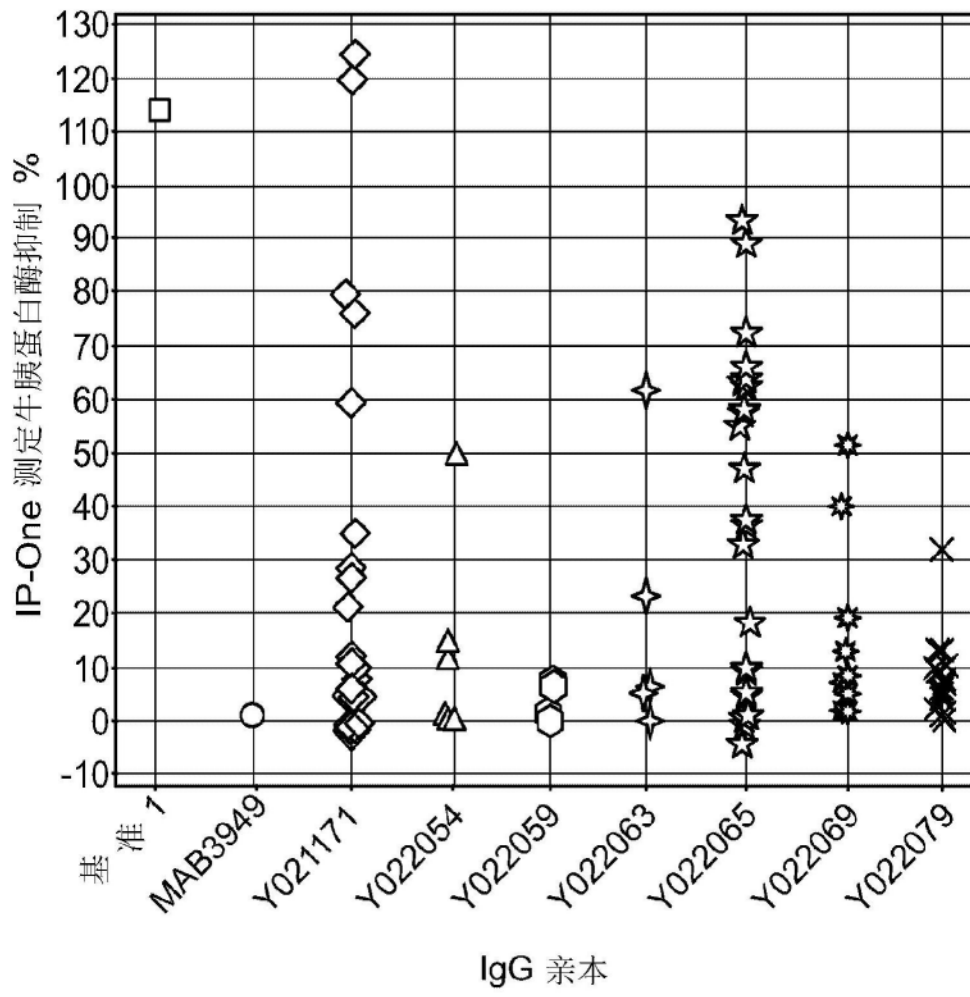


图13

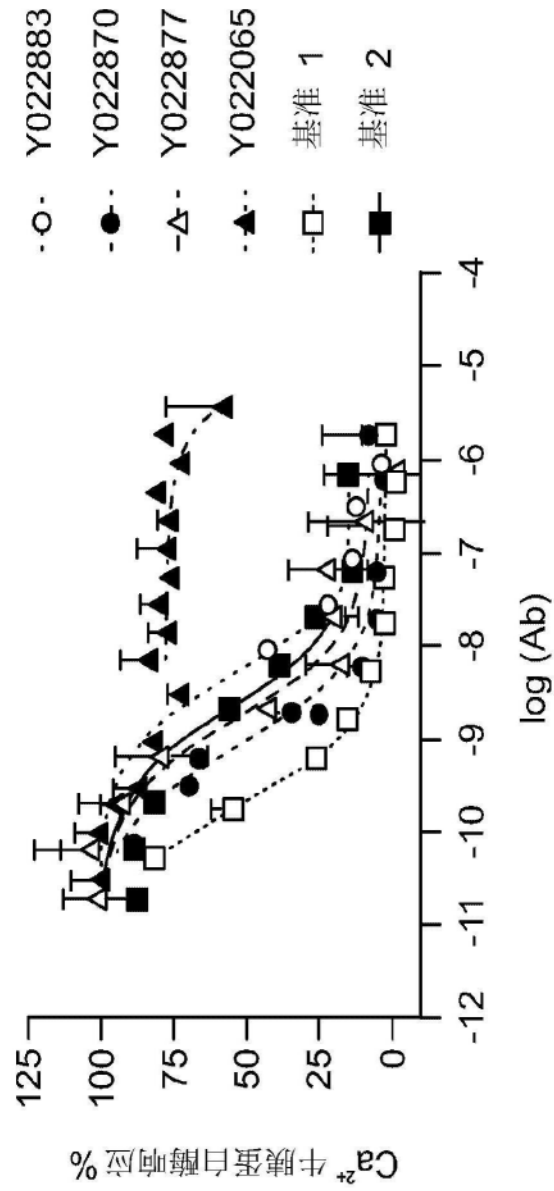


图14

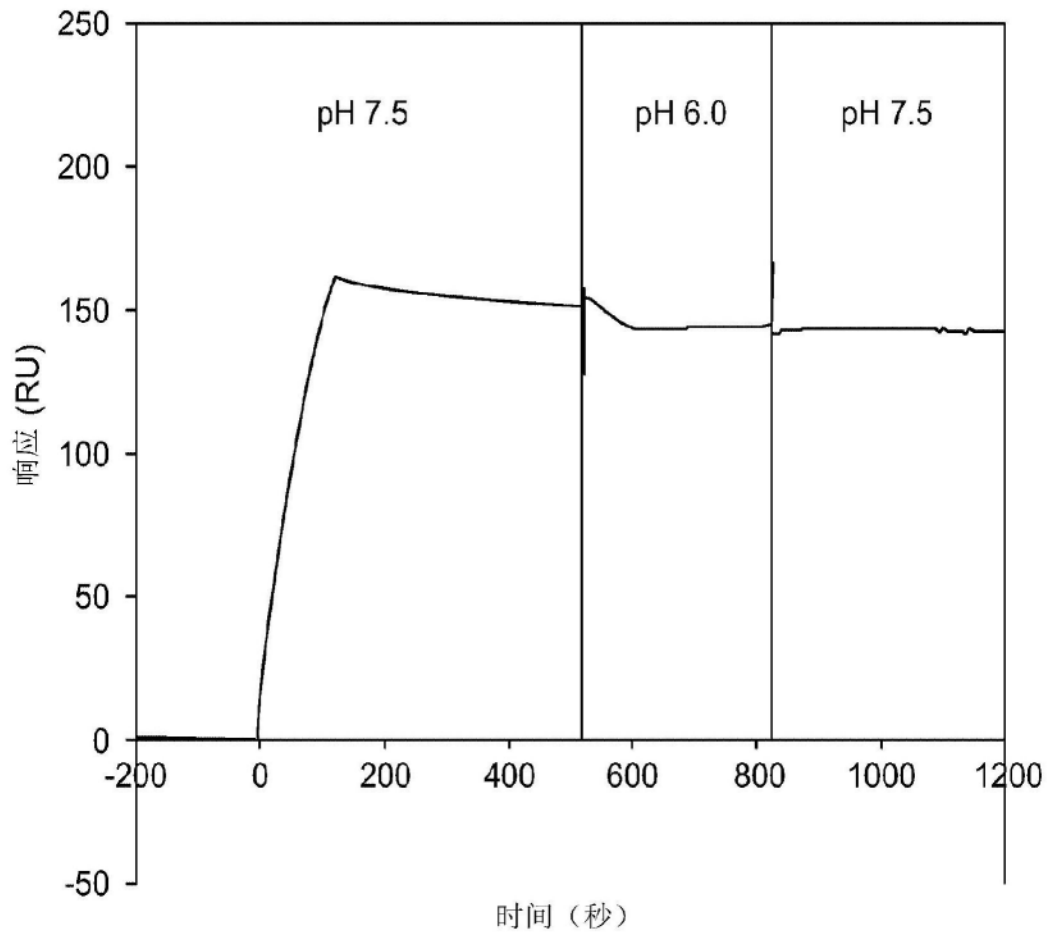


图15

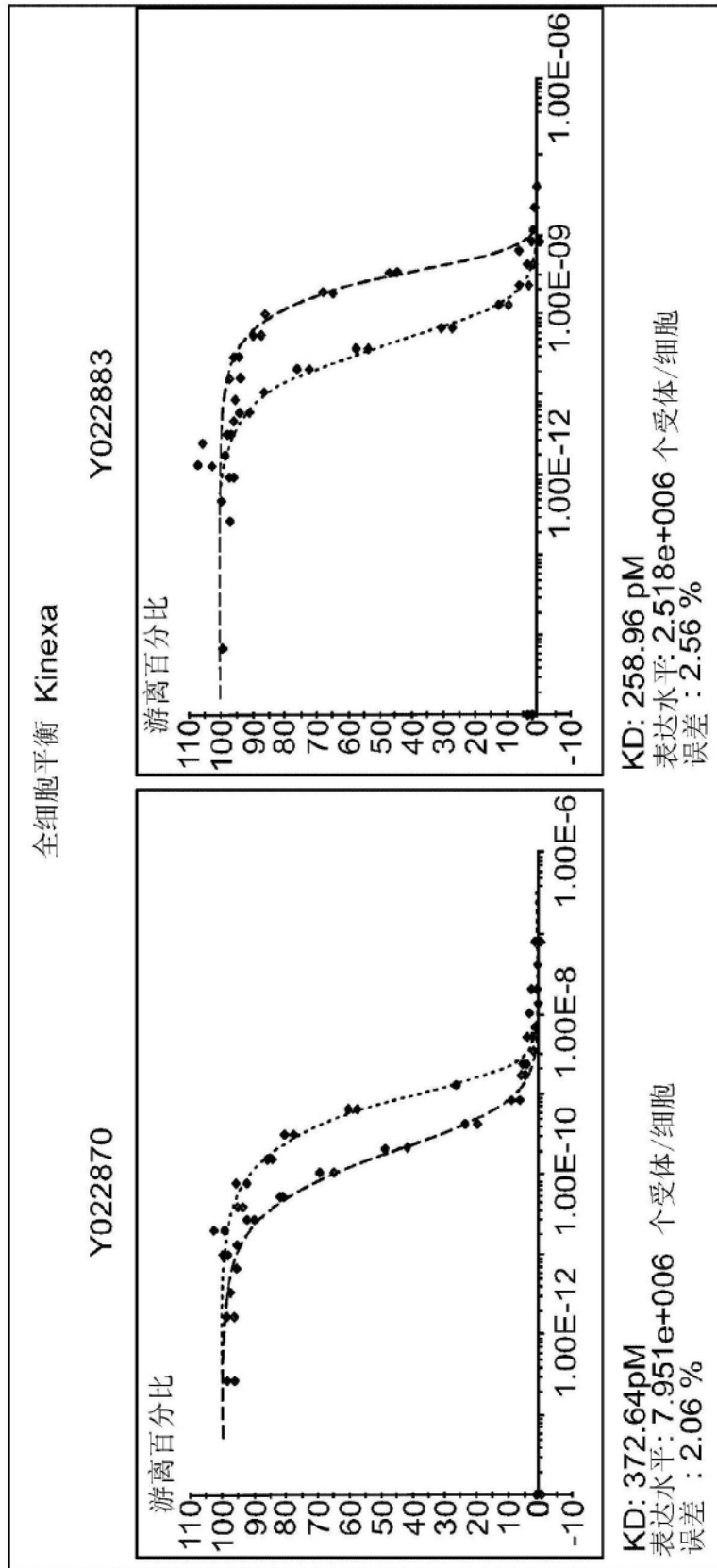


图16

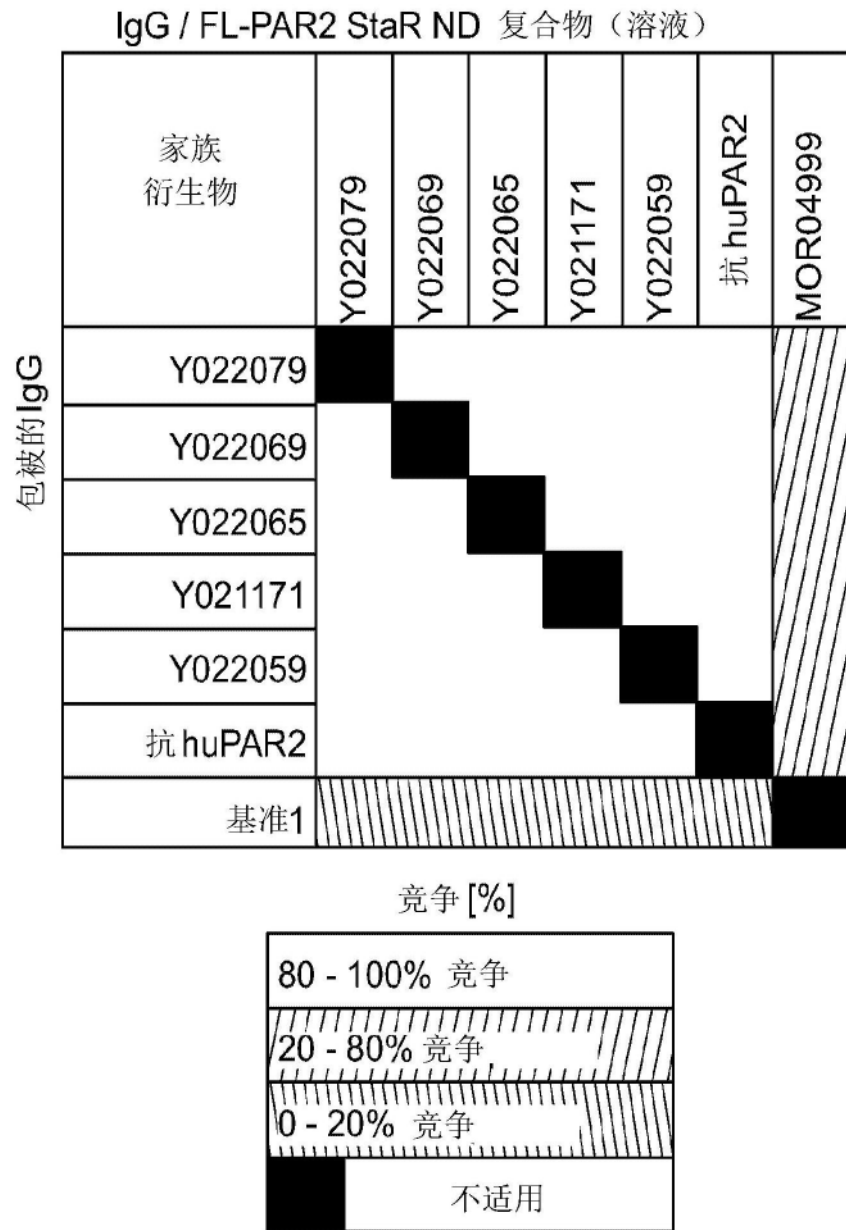


图17

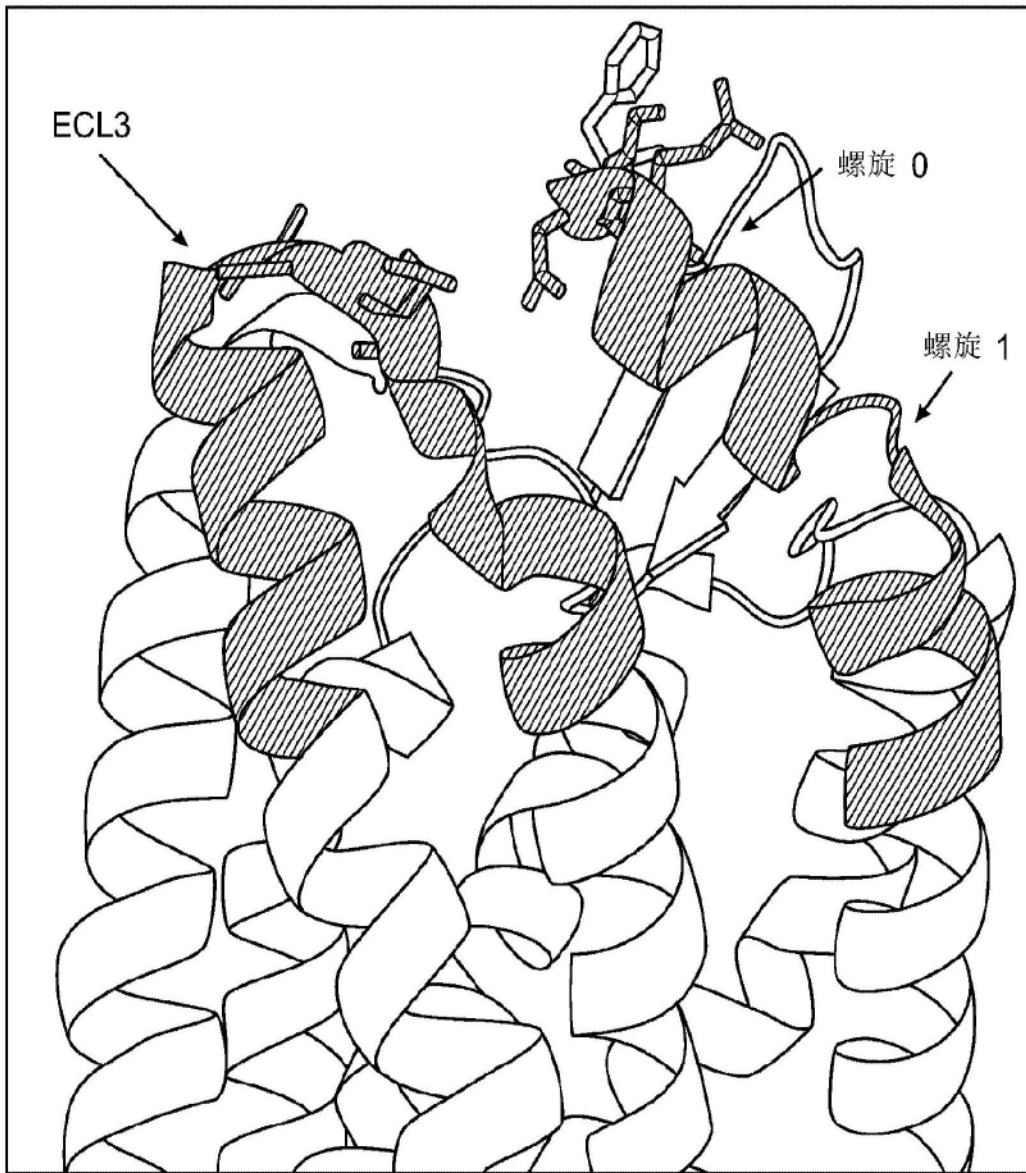


图18

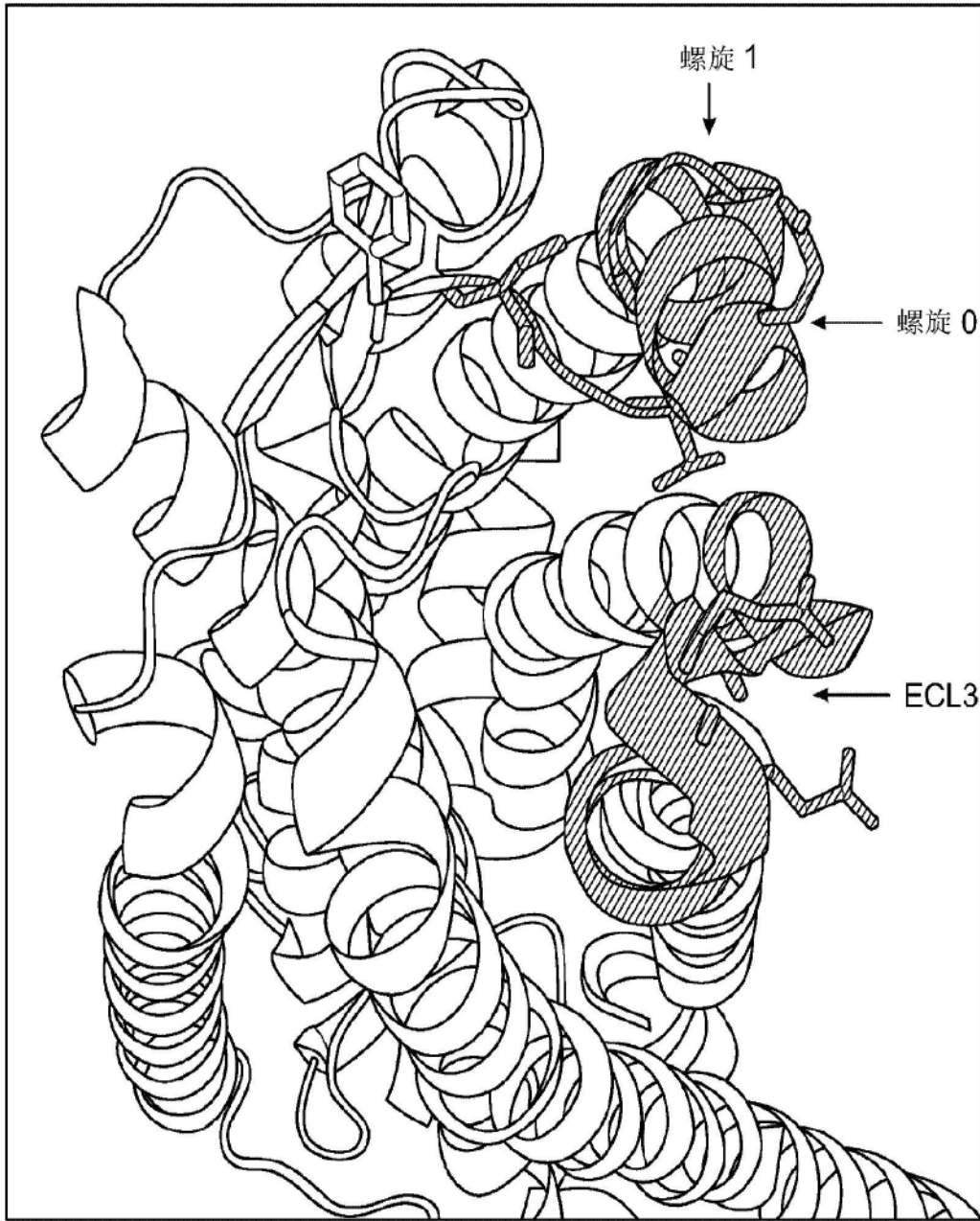


图19

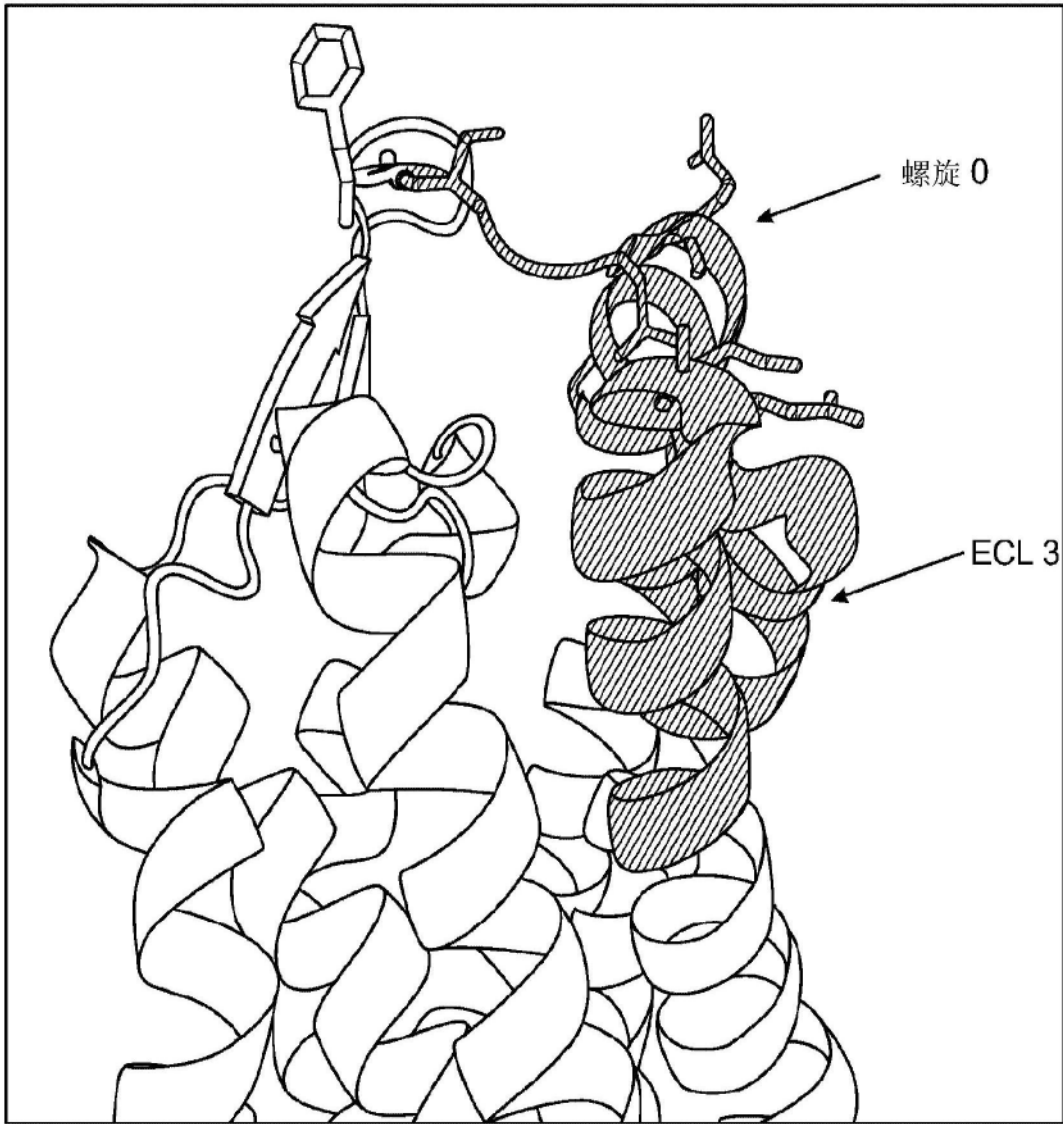


图20

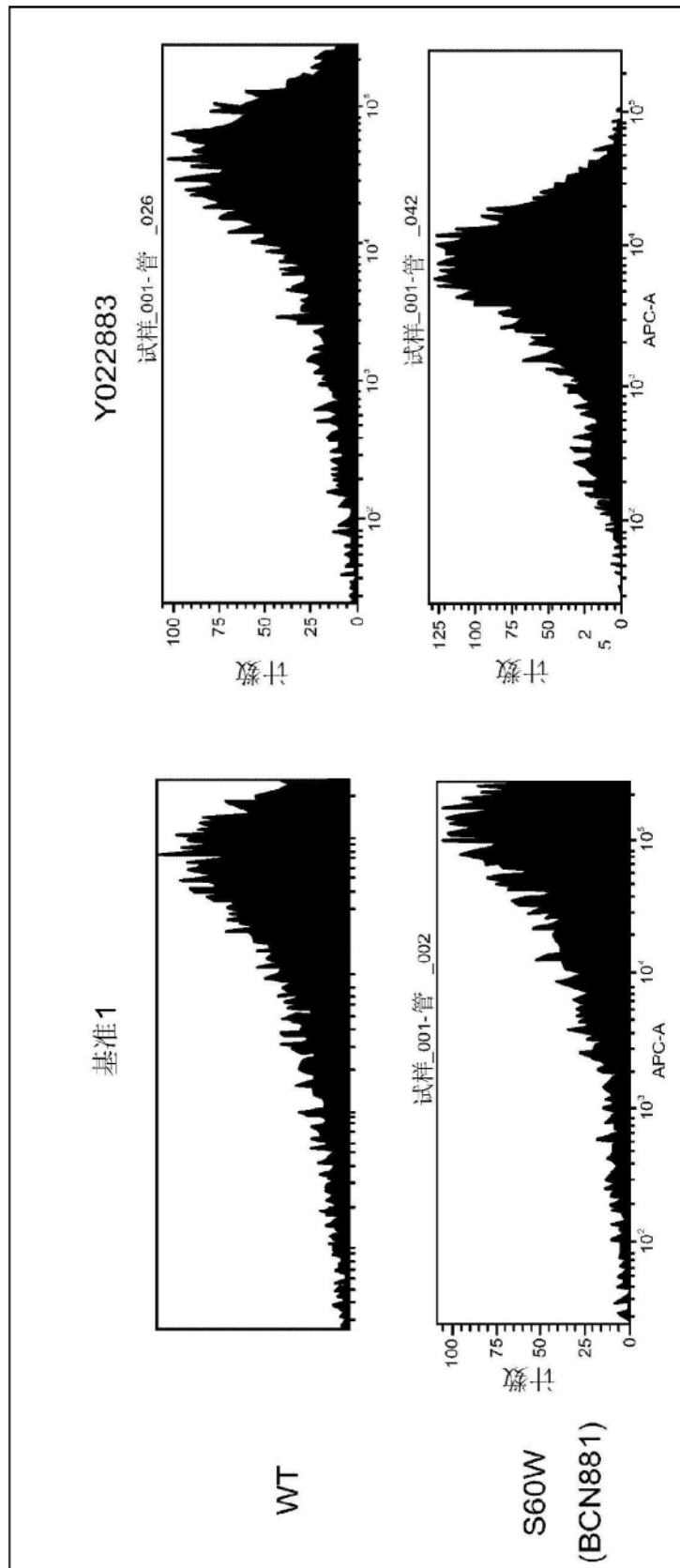


图21

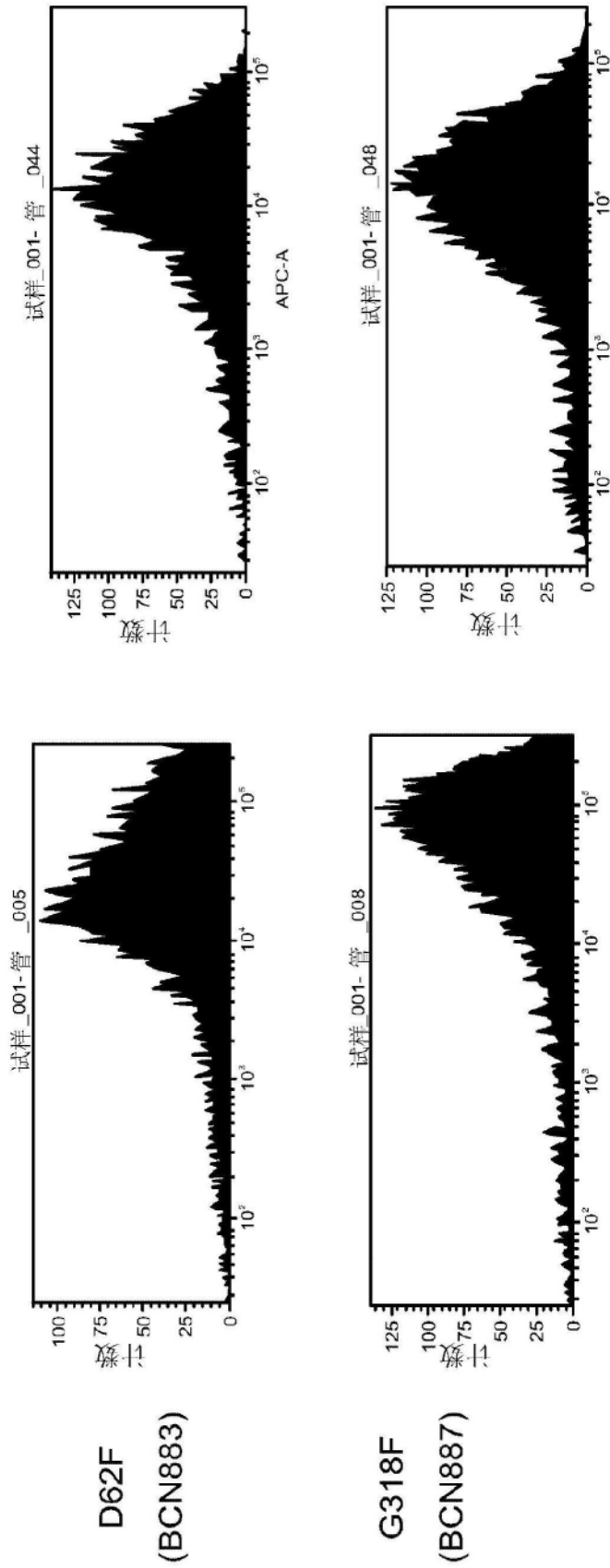
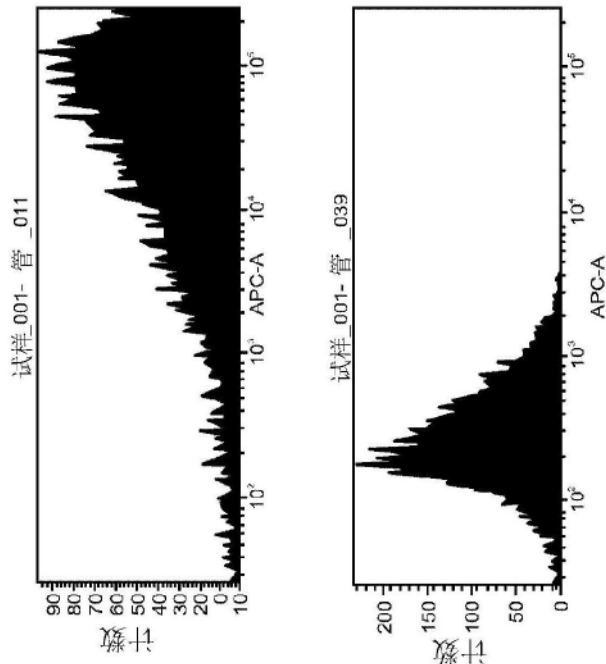
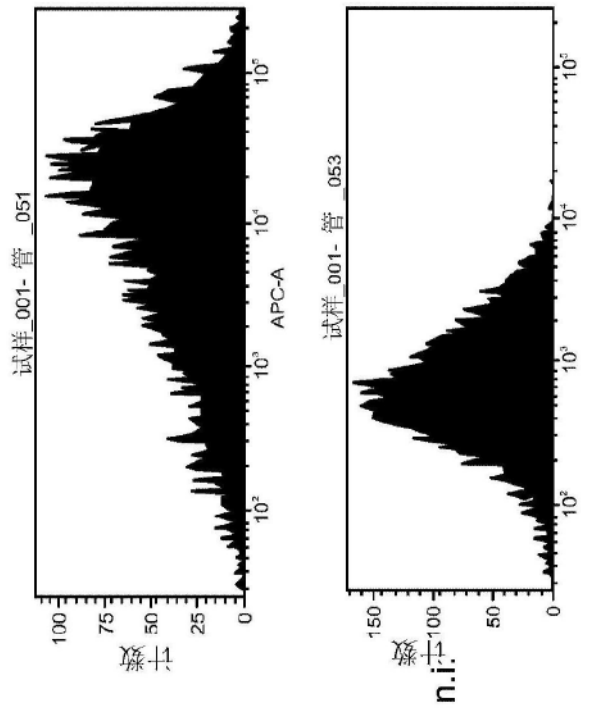


图21(续)



D62G E63G  
(BCN890)

仅 2<sup>nd</sup>

图21(续)

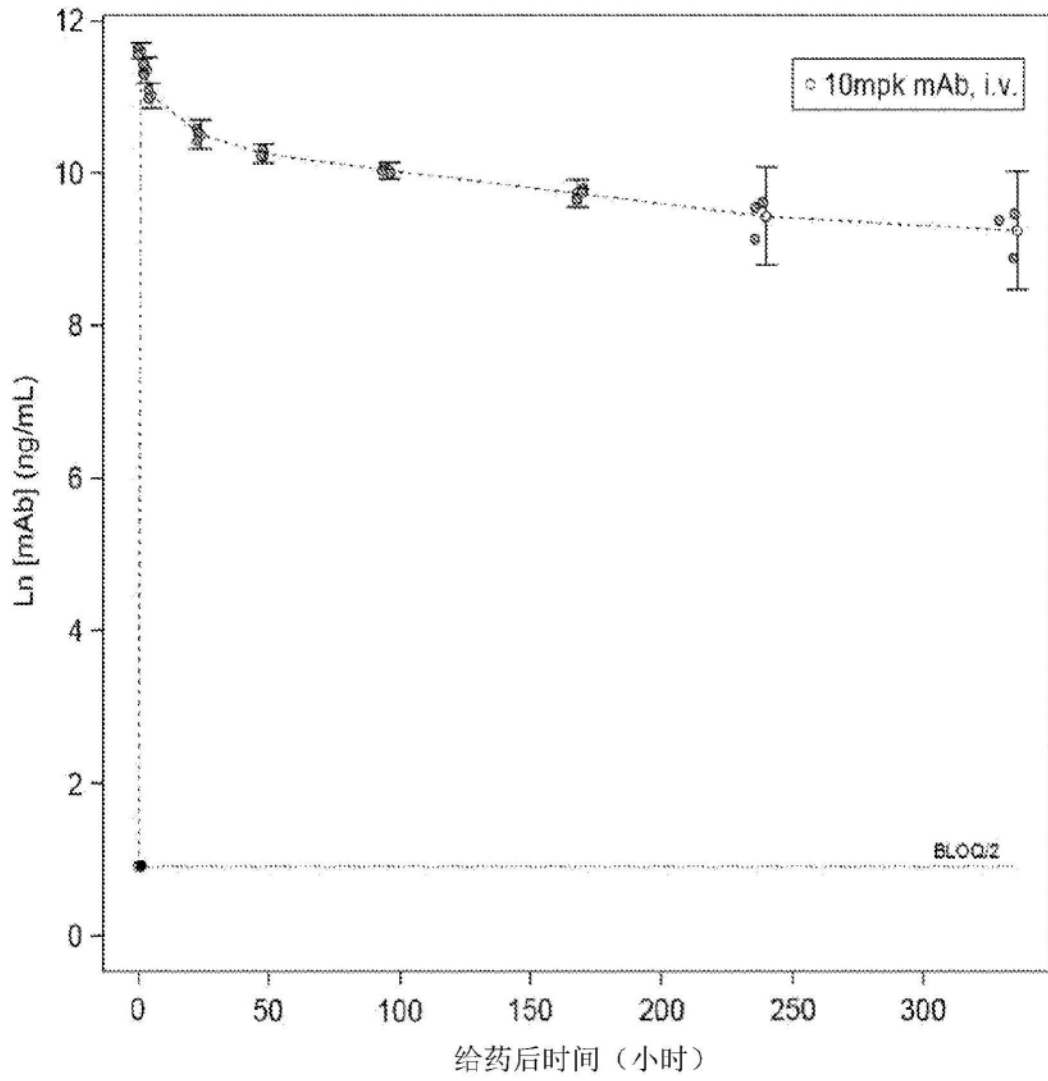


图22

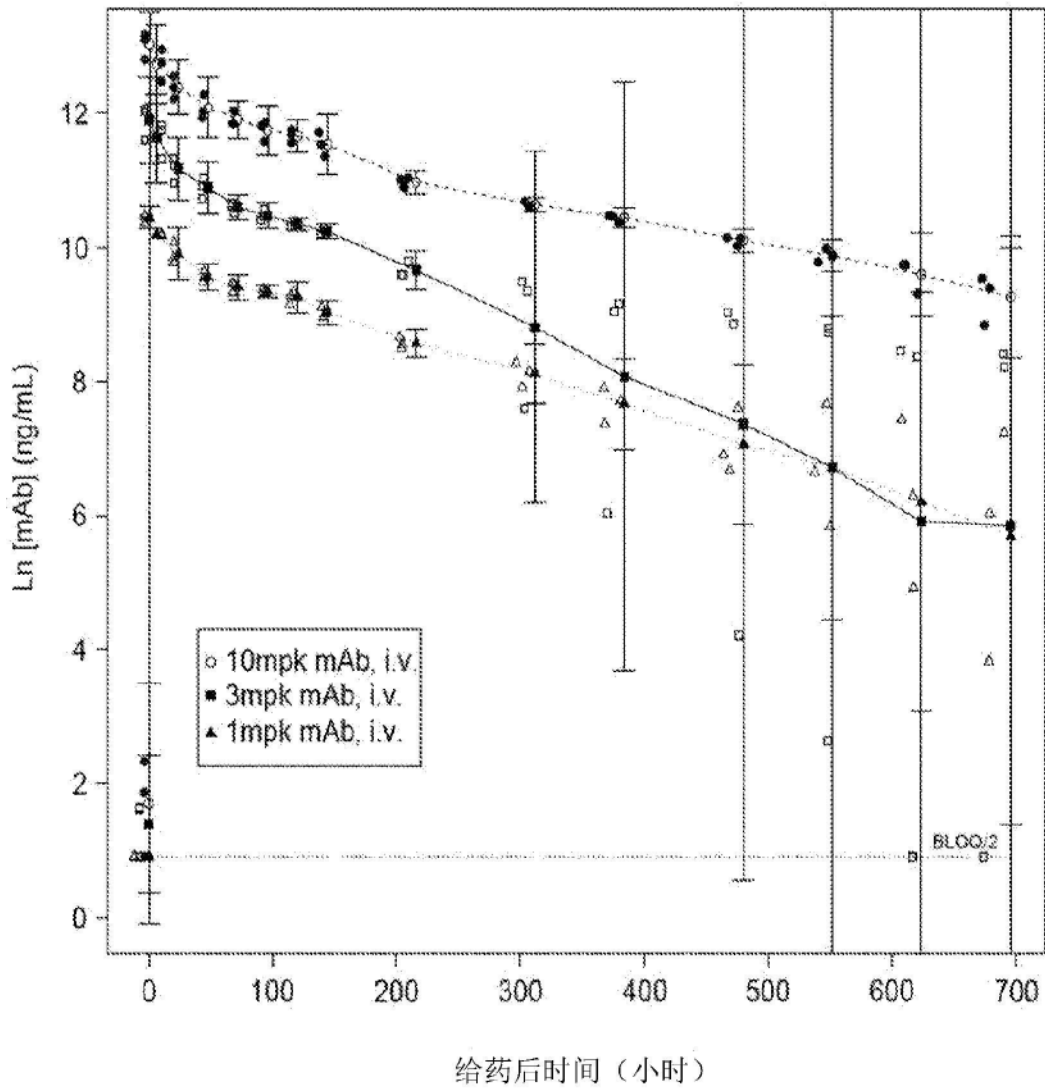


图23

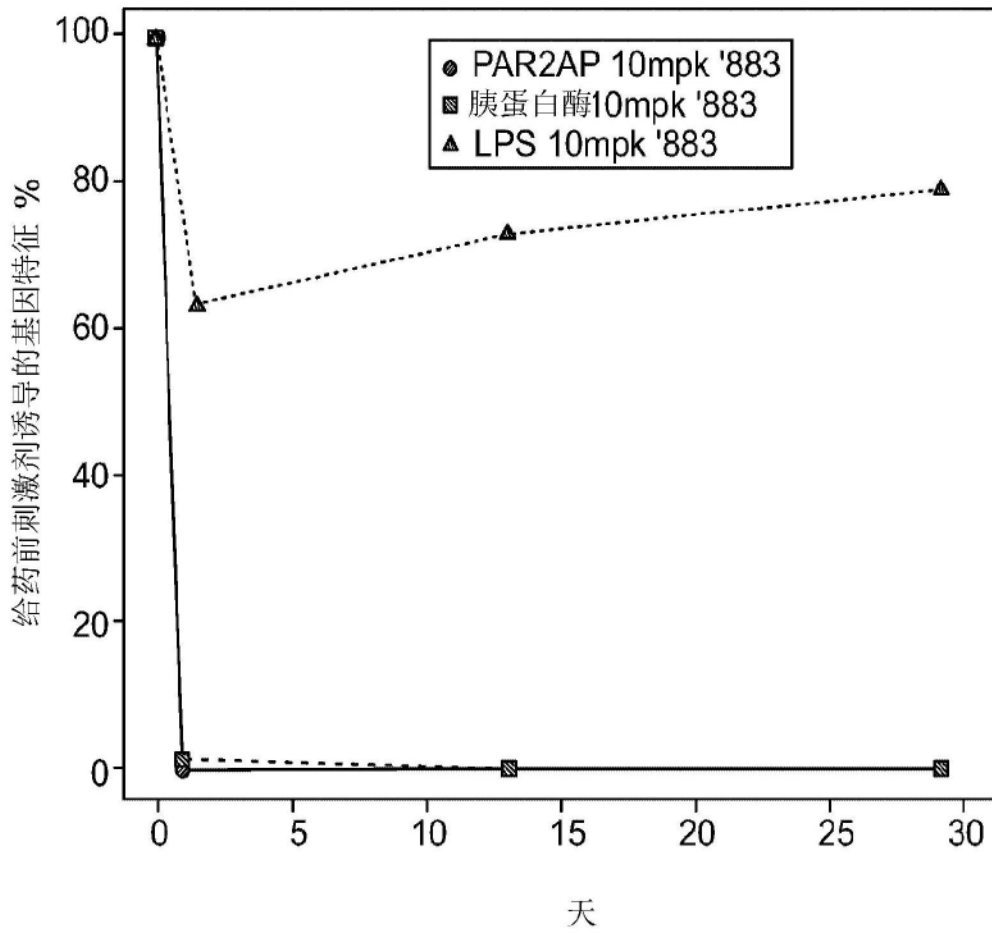


图24

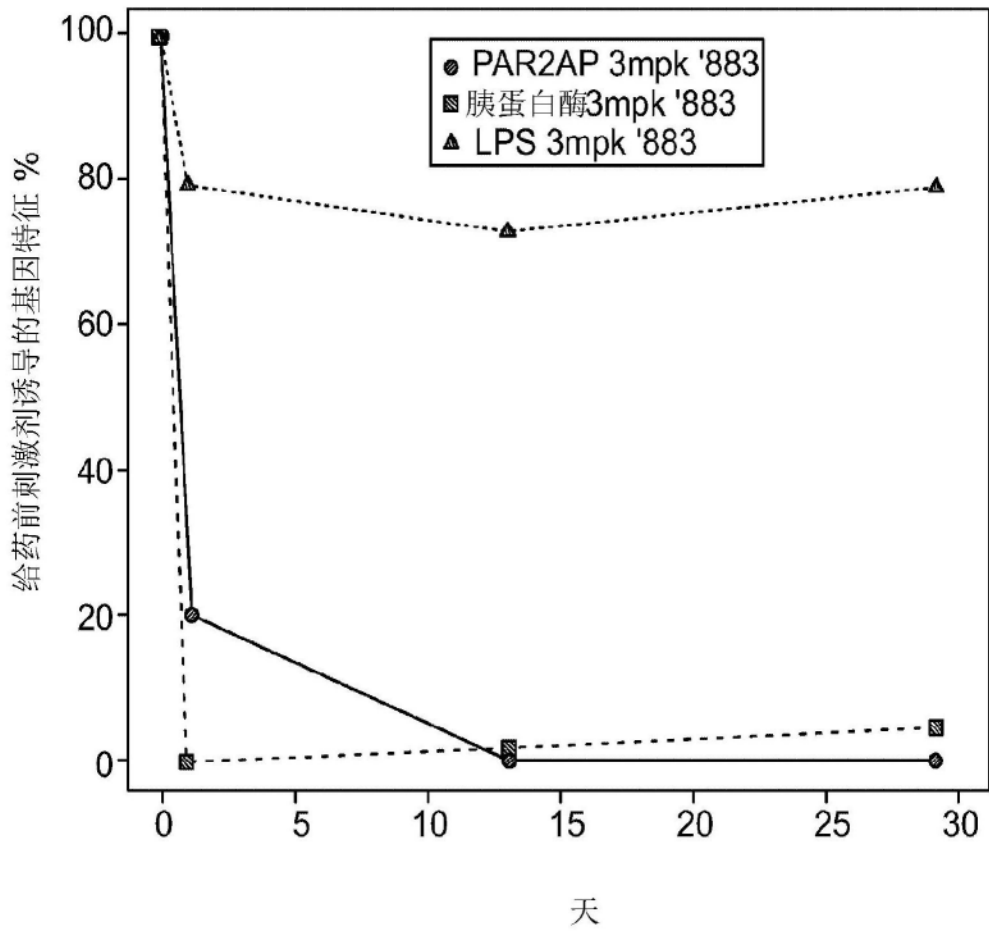


图25

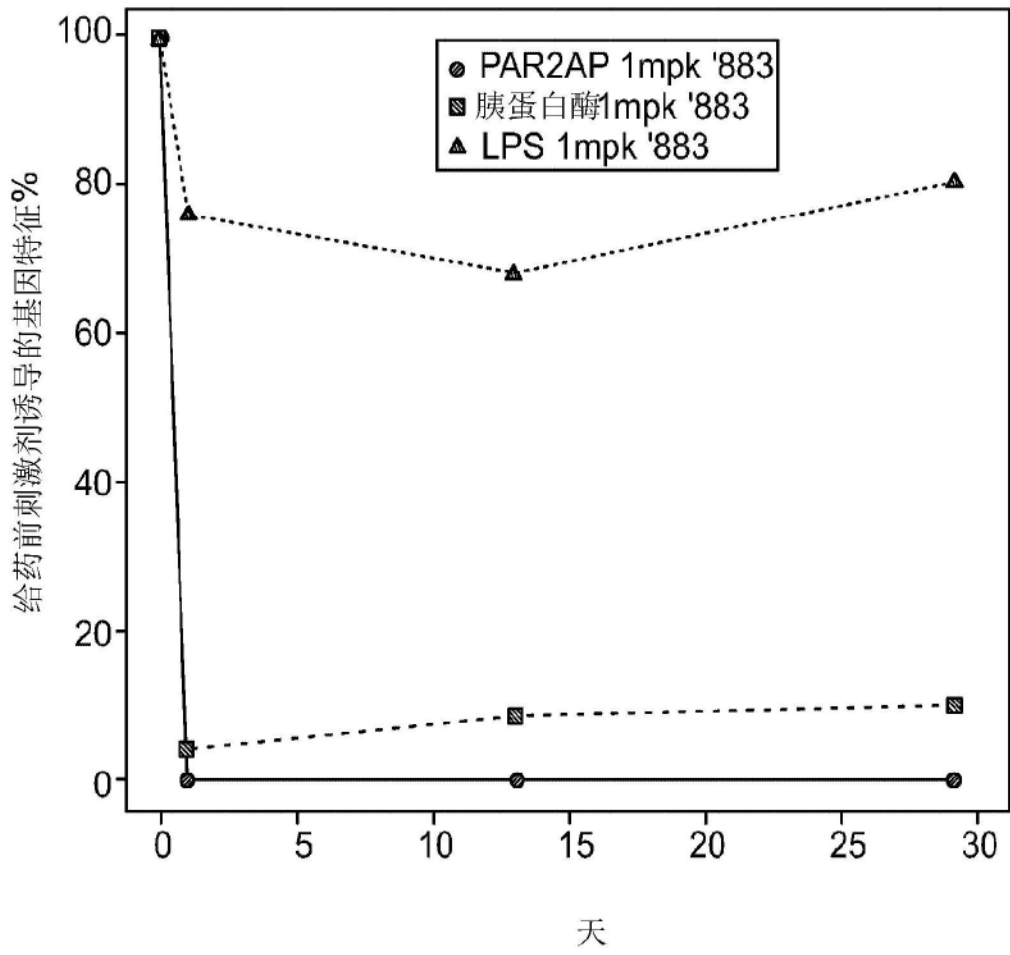


图26

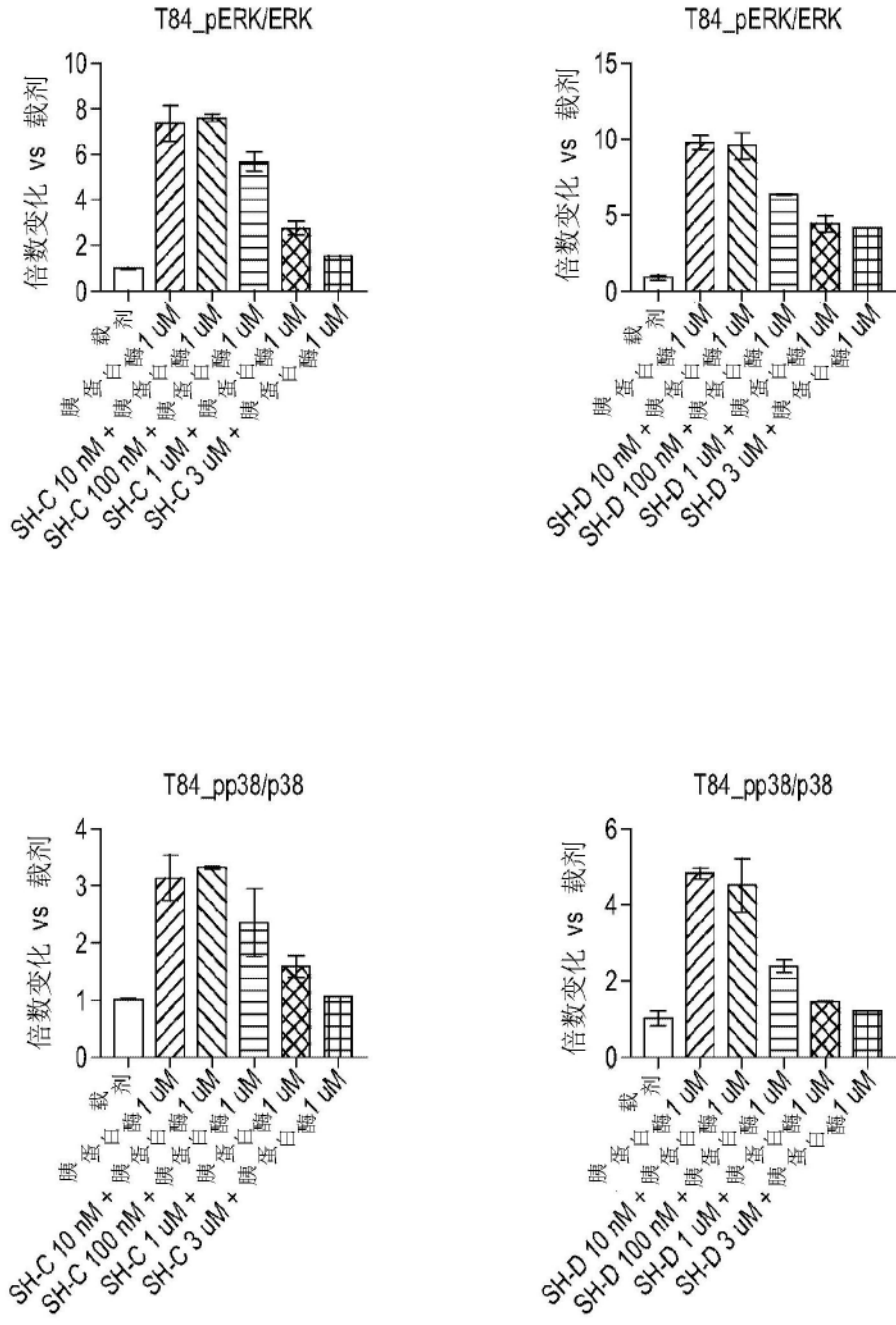


图27

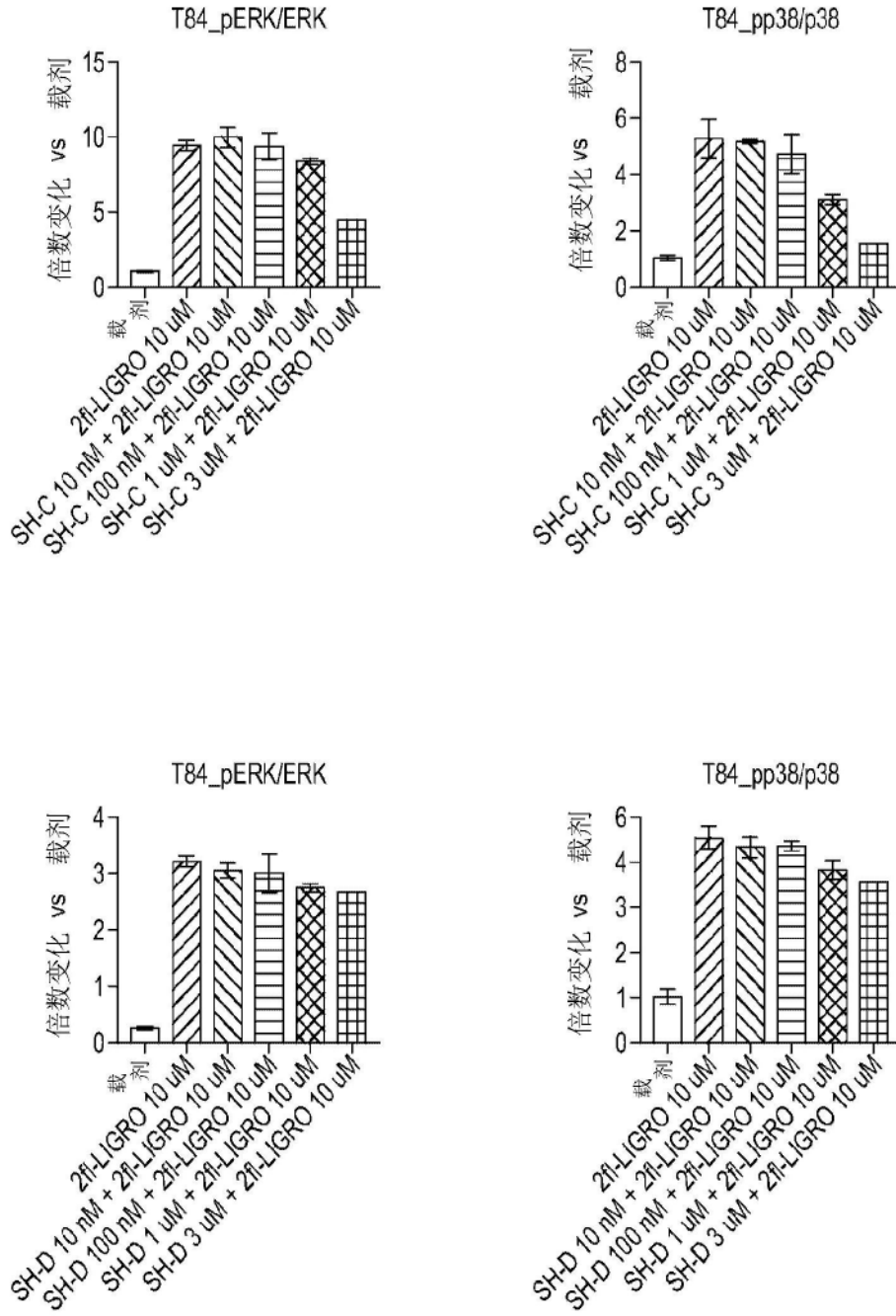


图28

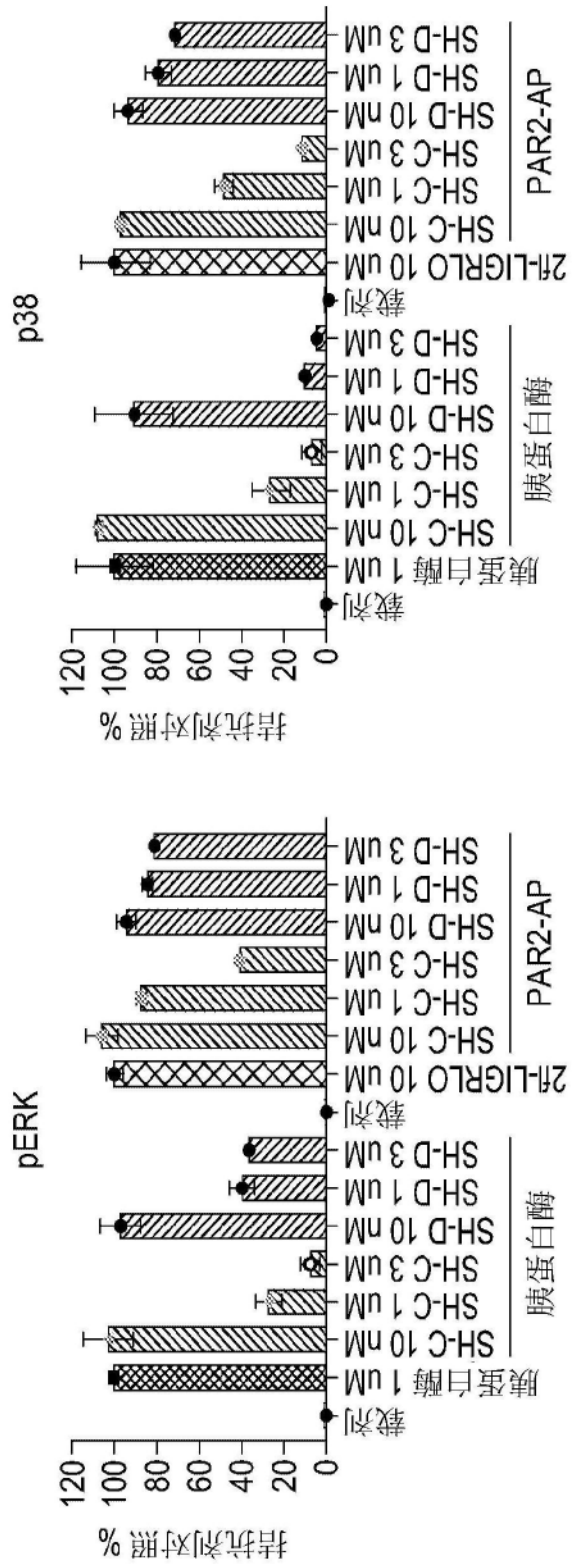


图29