(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0079499
(43) 공개일자 2023년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01) *A61P 15/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/244 (2013.01)
A61P 15/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7017761(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년08월04일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7009872
원출원일자(국제) 2017년08월04일
심사청구일자 2020년08월03일
(85) 번역문제출일자 2023년05월25일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2017/028346
(87) 국제공개번호 WO 2018/025982
국제공개일자 2018년02월08일
(30) 우선권주장
JP-P-2016-154174 2016년08월05일 일본(JP)

(71) 출원인
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고
각코우호우진 지치 이카다이가쿠
일본국 도쿄토 치요다쿠 히라카와쵸 2쵸메 6반 3고
고쿠리츠 켄큐 카이하츠 호진 이야쿠 키반 켄코 에이요 켄큐쇼
일본 오사카후 이바라키시 사이토아사기 7쵸메 6-8
(72) 발명자
가키우치 아야코
일본 가나가와켄 가마쿠라시 가지와라 200반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
가토 아쓰히코
일본 시즈오카켄 고템바시 고마카도 1초메 135반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

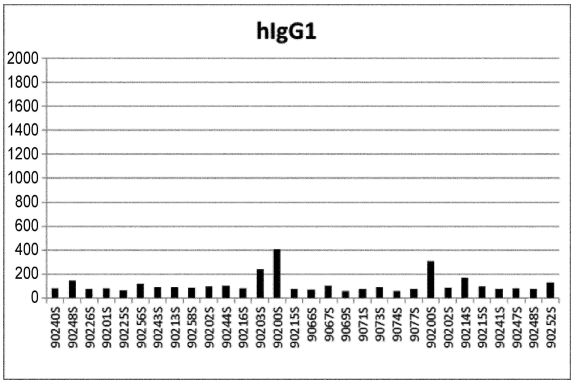
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **IL-8 관련 질환의 치료용 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

예를 들어, 신규 IL-8 관련 질환에 대한, IL-8 시그널 저해제를 이용한 치료 방법 등의 제공. 혹은, 예를 들어, 공지 또는 신규 IL-8 관련 질환에 대한, 신규 항IL-8 항체를 이용한 치료 방법 등의 제공.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 15/08 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
하야시 슈지
일본 시즈오카켄 고텐바시 고마카도 1초메 135반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
야나기사와 이즈미
일본 가나가와켄 가마쿠라시 가지와라 200반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
곤노 료
일본 사이타마켄 사이타마시 오미야쿠 아마누마초 1-847 지치의과대학부속 사이타마의료센터 내
네쓰 사치호
일본 사이타마켄 사이타마시 오미야쿠 아마누마초 1-847 지치의과대학부속 사이타마의료센터 내
산카이 다다시
일본 이바라키켄 쓰쿠바시 하치만다이 1반치 1 국립연구개발법인 의약기반·건강·영양연구소 영장류의과학 연구센터 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

본 명세서에 기재된 발명.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는, IL-8 관련 질환의 치료용 또는 예방용 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자궁내막증은 에스트로겐 의존적이라고 할 뿐만 아니라(비특허문헌 1 및 2), 염증성 질환으로서도 알려져 있다(비특허문헌 3).

[0003] 자궁내막증은, 한정을 의도하지 않지만, 일 측면에 있어서, 자궁에 존재하는 내막 조직이, 자궁 외에 이소성(異所性)(통상은 골반내, 가끔, 복강, 드물게는 흉강)으로 발생하여, 증식하는 질환이다. 악성 종양은 아니기는 하지만, 경시적으로 진행되어, 종양 형성과 주위의 유착, 월경 시 및 그 이외에서의 중증의 복통이나 골반통, 및, 불임증(임잉능 저하)을 초래하는 질환이다. 주로, 20세 이상의 생식 연령에 있는 여성에게 발생하여, 아픔 등에 의한 QOL의 저하, 유착의 중증화에 의한 동통의 만성화나 불임증에 이른다. 자궁선근증은, 한정을 의도하지 않지만, 일 측면에 있어서, 내막증의 유사 질환이지만, 내막이 자궁 내의 근층에 발생하는 것이다. 중증의 월경통, 과다 월경 및 빈혈, 만성 동통을 초래한다. (한편, 본 명세서에 기재되는 자궁내막증 및 자궁선근증이라고 하는 용어는, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 있어서 후술되는 기술에 의해 정의된다.)

[0004] 종래 이용되어 온, 자궁내막증 또는 자궁선근증의 치료법으로서, 진통제, 호르몬 요법, 수술 요법이 있다. 진통제는, 효과가 한정적인 데다가, 병태의 진행을 막을 수 없다. 호르몬 요법의 경우, 통증의 경감이나 병태 진행의 지연에는 효과가 있지만, 월경을 멈추기 때문에 치료 중에는 임잉능이 없어지는 것, 치료를 중지하면 다시 병태가 진행될 가능성이 높은 것, 더욱이, 호르몬제의 부작용 등이 문제점으로서 있다. 또한, 호르몬제의 투여에 의해서도, 투여 후에 임잉능이 개선된다는 보고는 없다. 수술 요법의 경우도, 3~5년에 약 50%로 재발할 가능성은 높고(비특허문헌 4 및 5), 수술 후 재발을 예방하려면, 부작용을 견디고 호르몬제를 계속 복용할 필요가 있다.

[0005] IL-8(인터류킨 8, Interleukin 8)은 케모카인의 일종이며, 72 아미노산형 및 77 아미노산형의 존재가 알려진 단백질이다. IL-8은 CXCL8이라고도 불린다. IL-8 단량체는, 72 아미노산형으로 표기하면, 시스테인 7과 시스테인 34 사이, 및 시스테인 9와 시스테인 50 사이에 2개의 다이설파이드 가교를 갖는다. IL-8은, 용액 중에서는 호모이량체로서도 존재할 수 있다는 것이 알려져 있지만, 이들 호모이량체의 분자간에는 공유 결합은 존재하지 않고, 2개의 단량체의 β 시트간의 비공유 결합성의 상호 작용에 의해 안정화되어 있다.

[0006] IL-8은, 염증성 사이토카인 등의 자극에 의해, 말초 혈단구, 조직 매크로파지, NK 세포, 섬유아세포, 혈관 내피 세포 등 여러 가지 세포로부터 산생된다(비특허문헌 6). IL-8은 주로 호중구를 활성화시키고, 세포 접착 분자의 발현을 항진하여, 호중구의 혈관 내피 세포에 대한 접착을 높이는 작용을 갖는다고 말해지고 있다. 또한, IL-8은 호중구 주화능(走化能)도 가져, 손상 조직에서 산생되는 IL-8은 혈관 내피 세포에 접착한 호중구의 조직으로의 유주를 촉진하여, 호중구 침윤에 수반하는 염증이 야기된다. 더욱이, IL-8은, 내피 세포에 대한 유력한 혈관 신생 인자이며, 또한 종양의 혈관 신생에 관련되어 있다는 것도 알려져 있다.

[0007] 지금까지, 난소를 절제하고 에스트라다이올 방출 캡슐을 이식한 누드 마우스에게 증식기에 있는 인간 자궁내막 조직을 복강에 이식 후, 항IL-8 항체를 투여한 바, 자궁내막 병변의 퇴축이 보였다는 것이 보고되어 있다(특허문헌 1).

[0008] 그러나, 인간과 마찬가지의 월경은 영장류 이외에 실험동물 모델에서는 존재하지 않기 때문에, 인간 자궁내막증의 원인 구명을 향해, 래트, 마우스 등에서는 인간 자궁내막증의 진정한 의미에서의 동물 모델로는 될 수 없다.

원래, 래트, 마우스에는 IL-8이 존재하지는 않는다. 또한, 최근까지 인간 자궁내막증을 올바르게 평가할 수 있는 비인간 영장류의 in vivo 모델이 없었던 것도 있어, 지금까지 자궁내막증에 대한 IL-8 시그널의 영향을 실제로 비인간 영장류의 in vivo 모델로 확인한 보고는 존재하지 않는다.

[0009] 또한, 외과적 수술 등에 의한 유착은, 다양한 병태에 있어서 문제가 되고 있다. 유착 등의 치료 또는 예방법으로서 유착 방지 시트가 있다. 유착 방지 시트에는 수술 후 유착 저감 효과는 있지만, 아직도 15%의 빈도로 dense adhesion(강고한 유착)이 형성되어(비특허문헌 7), 아직 충분하지는 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) WO2009/026117

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Bulun et al., Endometriosis. N Engl J Med 2009; 360:268-279

(비특허문헌 0002) Giudice et al., Endometriosis. Lancet 2004; 364:1789-1799

(비특허문헌 0003) Donnez et al., Gynecol Obstet Invest 2002; 54 Suppl 1:52-58; discussion 59-62

(비특허문헌 0004) Vercellini et al., Am J Obstet Gynecol. 2008 May; 198(5): 504. e1-5

(비특허문헌 0005) Guo et al., Hum Reprod Update. 2009 Jul-Aug; 15(4): 441-461

(비특허문헌 0006) Remo et al., Expert Rev. Clin. Immunol. 2014 10(5):593-619

(비특허문헌 0007) Becker et al., J Am Coll Surg. 1996 Oct; 183(4): 297-306

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 전술을 포함하는 다양한 상황에 비추어 이루어진 것으로, 그 목적은, 비한정적인 일 측면에 있어서, IL-8 관련 질환에 대한, IL-8 시그널 저해제를 이용한 신규 치료 방법 등을 제공하는 것에 있다.

[0013] 보다 구체적으로는, 본 발명은, 비한정적인 일 실시태양에 있어서, 신규 IL-8 관련 질환에 대한, IL-8 시그널 저해제를 이용한, 신규 치료 방법 등을 제공하는 것에 있다. 혹은, 본 발명은, 비한정적인 다른 실시태양에 있어서, 신규 또는 기지의 IL-8 관련 질환에 대한, 신규 항IL-8 항체를 이용한, 신규 치료 방법 등을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 이론에 구속되는 것을 반드시 의도하지 않지만, 본 발명자들은, 자궁내막증의 진정한 병태는 이미 보고(Odagiri, Fertil Steril. 2009; 92(5):1525-31.)한 바와 같은 만성 염증성 증식 질환의 개념임을 제창해 왔다. 자궁내막증의 병태 병리는 만성 염증에 이어지는 면역 반응이며, 섬유화, 평활근 화생, 신경 재생, 혈관 신생 등으로서 나타난다. 만성 염증의 메커니즘의 중요한 부분에 IL-8이 관여하고 있어, 자궁내막증이 만성 염증성 질환이라는 개념에 기초하여, 약효의 병리학적 평가 및 임상적 평가(복강경이나 MR로의 관찰)를 행해 왔다.

[0015] 한정을 의도하지 않지만, 본 발명은, 자궁내막증 등의 병태 해명을 위한 비인간 영장류 모델의 제작으로부터, 한편으로, 고기능 항IL-8 항체의 작성과 개량, 항체의 약리 효과의 평가를 행한다고 하는, 기초로부터 동물 모델 임상까지 취급한 포괄적 연구에 기초하는 것이다. 인간 자궁 관련 질환의 진정한 평가는 래트, 마우스, 그 외의 작은 동물에서의 모델 실험에서는 불가능하기 때문에, 본 발명자들은, 외과적으로 유인된 자궁내막증 모델 필리핀원숭이를 제작하여, 필리핀원숭이를 포함하는 영장류의 생식 기초 연구, 및 인간 자궁내막증 등의 병리학적 병태 개념 및 평가와 임상(복강경 수술과 관찰, MRI(자기 공명 화상) 평가 등) 관리 등의 우수한 기술과 지

견 등을 서로 추렴하여, 시행 착오와 예의 검토 끝에 본 발명을 완성시켰다.

[0016] 즉, 비한정적인 일 실시태양에 있어서, 본 발명자들은, 자궁내막증 또는 자궁선근증에 대해서, 기존의 호르몬 요법과는 달리, 성 주기에는 영향을 주지 않고 병태의 개선에 작용하는 치료약으로서, 자궁내막증에서 주요한 염증성 사이토카인인 IL-8에 주목하여 항염증의 측면에서 접근을 행하여, IL-8 시그널 저해제를 투여함으로써 병태가 개선된다는 것을 놀랍게도 발견했다.

[0017] 또한, 비한정적인 다른 실시태양에 있어서, 본 발명자들은, 외과적 수술 등에 의해 생기는 유착에 대해 항염증의 측면에서 접근을 행하여, IL-8 시그널 저해제를 투여함으로써 유착이 개선된다는 것을 놀랍게도 발견했다.

[0018] 더욱이, 비한정적인 다른 실시태양에 있어서, 본 발명자들은, 본 개시에 있어서의 고기능 항IL-8 항체가, 신규 또는 기지의 IL-8 관련 질환의 치료 등에 유용하다는 것에 상도했다. 그와 같은 고기능 항IL-8 항체로서는, pH 의존성 항IL-8 항체(pH 의존적으로 IL-8에 결합하는 항IL-8 항체)여도 된다. 당해 pH 의존성 항IL-8 항체는, 개체에게 투여되었을 때에 참조 항체와 비교하여, 이하의 적어도 하나 이상의 특성: IL-8을 신속하게 소실시킨다, IL-8을 중화시키는 활성을 안정적으로 유지한다, 면역원성이 낮다, 발현량이 많다,를 가질 수 있기 때문에 유리하다. 혹은, 그와 같은 고기능 항IL-8 항체는, 이하의 적어도 하나 이상의 특성을 갖는 항체: 산성 pH에 있어서의 FcRn에 대한 결합 친화성이, 천연형의 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합 친화성보다 증대되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항IL-8 항체, 기존의 ADA에 대한 결합 친화성이 천연형의 Fc 영역의 기존의 ADA에 대한 결합 친화성보다 저하되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항IL-8 항체, 혈장 중 반감기가 천연형의 Fc 영역의 혈장 중 반감기보다 증대되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항IL-8 항체, 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성이 천연형의 Fc 영역의 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성보다 저하되어 있는 Fc 영역을 포함하는 pH 의존성 항IL-8 항체여도 된다.

[0019] 본 발명은, 비한정의 구체적인 일 실시태양에 있어서 이하에 관한 것이다:

[0020] 〔1〕 인간 IL-8에 결합하는 단리된 항IL-8 항체를 유효 성분으로서 함유하는, 자궁내막증; 자궁선근증; 월경곤란증; 유착; 섬유화 질환; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료용 또는 예방용 조성물로서,

[0021] 상기 항IL-8 항체는 이하 (1) 내지 (7)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물:

[0022] (1) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0023] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0024] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0025] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0026] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0027] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0028] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0029] (2) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0030] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0031] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0032] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0033] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0034] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0035] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0036] 여기에서, 당해 항IL-8 항체는 서열 번호: 25의 아미노산 서열의 3위의 티로신, 서열 번호: 27의 아미노산 서열의 1위의 아스파라긴과 5위의 류신, 서열 번호: 28의 아미노산 서열의 1위의 글루타민에서 아미노산의 치환을

각각 적어도 포함한다;

[0037] (3) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0038] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0039] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0040] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0041] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0042] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0043] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0044] 여기에서, 당해 항IL-8 항체는 서열 번호: 24의 아미노산 서열의 9위의 티로신과 11위의 아르기닌, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열의 3위의 티로신에서 아미노산의 치환을 각각 적어도 포함한다;

[0045] (4) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0046] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0047] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0048] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0049] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0050] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0051] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0052] 여기에서, 당해 항IL-8 항체는 서열 번호: 24의 아미노산 서열의 6위의 알라닌, 8위의 글리신, 9위의 티로신과 11위의 아르기닌, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열의 3위의 티로신에서 아미노산의 치환을 각각 적어도 포함한다;

[0053] (5) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0054] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0055] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0056] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0057] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0058] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0059] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0060] 여기에서, 당해 항IL-8 항체는 서열 번호: 27의 아미노산 서열의 1위의 아스파라긴과 5위의 류신, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열의 1위의 글루타민에서 아미노산의 치환을 각각 적어도 포함한다;

[0061] (6) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0062] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0063] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0064] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0065] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0066] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0067] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0068] 여기에서, 당해 항IL-8 항체는 서열 번호: 24의 아미노산 서열의 9위의 티로신과 11위의 아르기닌, 서열 번호: 25의 아미노산 서열의 3위의 티로신, 서열 번호: 27의 아미노산 서열의 1위의 아스파라긴과 5위의 류신, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열의 1위의 글루타민에서 아미노산의 치환을 각각 적어도 포함한다; 및,

[0069] (7) 이하 (a) 내지 (f) 중 적어도 1개에 있어서, 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는, 항IL-8 항체:

[0070] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0071] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0072] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0073] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0074] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0075] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0076] 여기에서, 당해 항IL-8 항체는 서열 번호: 24의 아미노산 서열의 6위의 알라닌, 8위의 글리신, 9위의 티로신과 11위의 아르기닌, 서열 번호: 25의 아미노산 서열의 3위의 티로신, 서열 번호: 27의 아미노산 서열의 1위의 아스파라긴과 5위의 류신, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열의 1위의 글루타민에서 아미노산의 치환을 각각 적어도 포함한다.

[0077] 〔2〕 항IL-8 항체는 이하 (8) 내지 (19)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 〔1〕에 기재된 조성물:

[0078] (8) (a) HVR-H1로서 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, (b) HVR-H2로서 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (c) HVR-H3으로서 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체;

[0079] (9) (d) HVR-L1로서 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하고, (e) HVR-L2로서 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (f) HVR-L3으로서 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체;

[0080] (10) (a) HVR-H1로서 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, (b) HVR-H2로서 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (c) HVR-H3으로서 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체;

[0081] (11) (d) HVR-L1로서 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하고, (e) HVR-L2로서 서열 번호: 107의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (f) HVR-L3으로서 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체;

[0082] (12) (a) HVR-H1로서 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, (b) HVR-H2로서 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하고, (c) HVR-H3으로서 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하고, d) HVR-L1로서 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하고, (e) HVR-L2로서 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (f) HVR-L3으로서 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체;

[0083] (13) (a) HVR-H1로서 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, (b) HVR-H2로서 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하고, (c) HVR-H3으로서 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하고, (d) HVR-L1로서 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하고, (e) HVR-L2로서 서열 번호: 107의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (f) HVR-L3으로서 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는, 〔1〕의 (1) 또는 (2)에 기재된 항IL-8 항체;

[0084] (14) 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체;

[0085] (15) 서열 번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 〔1〕의 (1) 또는 (2)에 기재된 항IL-8 항체;

[0086] (16) (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, (c) 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (e) 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (f) 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3과 각각 적어도 80%의 (아미노산) 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, (a) HVR-H1로서 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, (b) HVR-H2로서 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하고, (c) HVR-H3으로서 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하고, (d) HVR-L1로서 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하고, (e) HVR-L2로서 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (f) HVR-L3으로서 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.);

[0087] (17) (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, (c) 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (e) 서열 번호: 107의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (f) 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3과 각각 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, (a) HVR-H1로서 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, (b) HVR-H2로서 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하고, (c) HVR-H3으로서 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하고, (d) HVR-L1로서 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하고, (e) HVR-L2로서 서열 번호: 107의 아미노산 서열을 포함하고, 및 (f) HVR-L3으로서 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.);

[0088] (18) 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역과 각각 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.); 및,

[0089] (19) 서열 번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역과 각각 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 〔1〕의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, 서열 번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.).

[0090] 〔3〕 인간 IL-8에 결합하는 단리된 항IL-8 항체를 유효 성분으로서 함유하는, 자궁내막증; 자궁선근증; 월경곤란증; 유착; 섬유화 질환; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료용 또는 예방용 조성물로서,

[0091] 당해 항IL-8 항체는 이하 (I) 내지 (VIII)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물:

[0092] (I) EU 넘버링으로 표시되는, 235위, 236위, 239위, 327위, 330위, 331위, 428위, 434위, 436위, 438위, 및 440위로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 위치에 아미노산의 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체;

[0093] (II) EU 넘버링으로 표시되는, 434위, 438위, 및 440위로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모든 위치에 아미노산의 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체;

[0094] (III) EU 넘버링으로 표시되는, 434위에 Ala; 438위에 Glu, Arg, Ser 또는 Lys; 및, 440위에 Glu, Asp 또는 Gln의 모든 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체;

[0095] (IV) EU 넘버링으로 표시되는, 434위에 Ala; 438위에 Glu, Arg, Ser 또는 Lys; 및, 440위에 Glu, Asp 또는 Gln의 모든 아미노산 치환을 포함하고, 추가로 428위에 Ile 또는 Leu, 및/또는, 436위에 Ile, Leu, Val, Thr 또는 Phe를 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체;

[0096] (V) EU 넘버링으로 표시되는, L235R, G236R, S239K, A327G, A330S, P331S, M428L, N434A, Y436T, Q438R, 및 S440E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 1개 이상 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체;

[0097] (VI) EU 넘버링으로 표시되는,

[0098] N434A/Q438R/S440E; N434A/Q438R/S440D;

[0099] N434A/Q438K/S440E; N434A/Q438K/S440D;

[0100] N434A/Y436T/Q438R/S440E; N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0101] N434A/Y436T/Q438K/S440E; N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0102] N434A/Y436V/Q438R/S440E; N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0103] N434A/Y436V/Q438K/S440E; N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0104] N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;

[0105] N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;

[0106] N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;

[0107] N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E; N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;

[0108] M428L/N434A/Q438R/S440E; M428L/N434A/ Q438R/S440D;

[0109] M428L/N434A/Q438K/S440E; M428L/N434A/ Q438K/S440D;

[0110] M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0111] M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E; M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0112] M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0113] M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E; 및, M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D

[0114] 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 치환의 조합을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체;

[0115] (VII) EU 넘버링으로 표시되는,

[0116] L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; 또는,

[0117] L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E

[0118] 의 아미노산 치환의 조합을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 항IL-8 항체; 및,

[0119] (VIII) 상기 (I) 내지 (VII) 중 어느 하나에 기재된 Fc 영역을 포함하고, 당해 Fc 영역이 이하의 (a) 내지 (e)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 성질 중 적어도 1개를 갖는 항IL-8 항체:

[0120] (a) 산성 pH에서의, 당해 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합 친화성이, 천연형의 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합 친화성보다 증대되어 있다,

[0121] (b) 기존의 ADA에 대한 당해 Fc 영역의 결합 친화성이 천연형의 Fc 영역의 기존의 ADA에 대한 결합 친화성보다 저하되어 있다,

[0122] (c) 당해 Fc 영역의 혈장 중 반감기가 천연형의 Fc 영역의 혈장 중 반감기보다 증대되어 있다,

[0123] (d) 당해 Fc 영역의 혈장 중 클리어런스가 천연형의 Fc 영역의 혈장 중 클리어런스보다 감소되어 있다, 및

[0124] (e) 이펙터 수용체에 대한 당해 Fc 영역의 결합 친화성이 천연형의 Fc 영역의 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성보다 저하되어 있다.

[0125] 〔4〕 인간 IL-8에 결합하는 단리된 항IL-8 항체를 유효 성분으로서 함유하는, 자궁내막증; 자궁선근증; 월경곤란증; 유착; 섬유화 질환; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료용 또는 예방용 조성물로서,

[0126] 당해 항IL-8 항체는 이하 (A) 내지 (F)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물:

[0127] (A) 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를

포함하는 항IL-8 항체;

[0128] (B) 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항IL-8 항체;

[0129] (C) 서열 번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항IL-8 항체;

[0130] (D) 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와 각각 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.);

[0131] (E) 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와 각각 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.); 및,

[0132] (F) 서열 번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와 각각 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항IL-8 항체(여기에서, 당해 항체는, 서열 번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 기능적으로 동등해도 된다.).

[0133] 〔5〕 섬유화 질환이, 자궁내막증 또는 자궁선근증에 있어서의 섬유화, 만성 폐색폐질환(COPD), 낭포성 섬유증, 마른 버짐, 간섬유증, 신장 섬유증, 및 폐섬유증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 〔1〕 ~ 〔4〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0134] 〔6〕 IL-8 시그널 저해제(바람직하게는 인간 IL-8 시그널 저해제)를 유효 성분으로서 함유하는, 인간 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 인간 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료용 또는 예방용 조성물.

[0135] 〔7〕 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤을 억제하기 위한, 〔6〕에 기재된 조성물.

[0136] 〔8〕 아로마타제 또는 섬유화 인자의 산생을 저해하기 위한, 〔6〕 또는 〔7〕에 기재된 조성물.

[0137] 〔9〕 성 주기에 대한 영향을 주지 않는, 〔6〕 ~ 〔8〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0138] 〔10〕 자궁내막증 또는 자궁선근증에 있어서의 유착 또는 섬유화를 억제시키기 위한, 〔6〕 ~ 〔9〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0139] 〔11〕 (1) 자궁내막증 또는 자궁선근증의 환자에 있어서 자궁내막의 상피 세포 또는 스트로마(stroma) 세포를 위축시키기 위한, 또는, (2) 자궁내막증에 있어서 자궁내막의 간질(interstitium)을 감소시키기 위한, 〔6〕 ~ 〔10〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0140] 〔12〕 월경 곤란증이 자궁내막증 또는 자궁선근증을 갖는 월경 곤란증이거나, 또는 자궁내막증 또는 자궁선근증이 의심되는 월경 곤란증인, 〔6〕 ~ 〔11〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0141] 〔13〕 유착이 수술 후에 생긴 유착인, 〔6〕에 기재된 조성물.

[0142] 〔14〕 IL-8 시그널 저해제가 IL-8 저해제(바람직하게는 인간 IL-8 저해제), CXCR1 저해제(바람직하게는 인간 CXCR1 저해제), 또는 CXCR2 저해제(바람직하게는 인간 CXCR2 저해제)인, 〔6〕 ~ 〔13〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0143] 〔15〕 IL-8 저해제, CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제가, 각각 항IL-8 항체(바람직하게는 항인간 IL-8 항체), 항CXCR1 항체(바람직하게는 항인간 CXCR1 항체), 또는 항CXCR2 항체(바람직하게는 항인간 CXCR2 항체)인, 〔14〕에 기재된 조성물.

[0144] 〔16〕 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤을 억제하기 위한, 〔1〕 ~ 〔5〕 중

어느 하나에 기재된 조성물.

[0145] 〔17〕 아로마타제 또는 섬유화 인자의 산생을 저해하기 위한, 〔1〕 ~ 〔5〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0146] 〔18〕 성 주기에 대한 영향을 주지 않는, 〔1〕 ~ 〔5〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0147] 〔19〕 자궁내막증 또는 자궁선근증에 있어서의 유착 또는 섬유화를 억제시키기 위한, 〔1〕 ~ 〔5〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0148] 〔20〕 (1) 자궁내막증 또는 자궁선근증의 환자에 있어서 자궁내막의 상피 세포 또는 스트로마 세포를 위축시키기 위한, 또는, (2) 자궁내막증에 있어서 자궁내막의 간질을 감소시키기 위한, 〔1〕 ~ 〔5〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0149] 〔21〕 월경 곤란증이 자궁내막증 또는 자궁선근증을 갖는 월경 곤란증이거나, 또는, 자궁내막증 또는 자궁선근증이 의심되는 월경 곤란증인, 〔1〕 ~ 〔5〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0150] 〔22〕 유착이 수술 후에 생긴 유착인, 〔1〕 ~ 〔5〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0151] 〔23〕 IL-8 관련 질환이 IL-8 시그널에 응답성을 나타내는, 〔1〕 ~ 〔22〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0152] 〔24〕 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 〔1〕 ~ 〔23〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0153] 〔25〕 자궁내막증이, 인간 자궁내막증인, 〔1〕 ~ 〔5〕, 〔16〕 ~ 〔24〕 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0154] 〔A1〕 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 섬유화 질환; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료 또는 예방에 있어서의 사용을 위한, 〔1〕 ~ 〔5〕, 〔16〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 규정되는 항IL-8 항체.

[0155] 〔A2〕 인간 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 인간 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료 또는 예방에 있어서의 사용을 위한 〔6〕 ~ 〔15〕, 〔23〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 규정되는 IL-8 시그널 저해제.

[0156] 〔A3〕 〔1〕 ~ 〔5〕, 〔16〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 규정되는 항IL-8 항체 또는 〔1〕 ~ 〔5〕, 〔16〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 기재되는 조성물을, 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 섬유화 질환; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환을 치료 또는 예방하는 방법(여기에서, 그것을 필요로 하는 대상이란, 당해 IL-8 관련 질환으로 이환한, 또는 이환하고 있을 우려가 있는 대상이어도 된다.).

[0157] 〔A4〕 〔6〕 ~ 〔15〕, 〔23〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 규정되는 IL-8 시그널 저해제 또는 〔6〕 ~ 〔15〕, 〔23〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 기재되는 조성물을, 그것을 필요로 하는 대상으로 투여하는 것을 포함하는, 인간 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 인간 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환을 치료 또는 예방하는 방법(여기에서, 그것을 필요로 하는 대상이란, 당해 IL-8 관련 질환으로 이환한, 또는 이환하고 있는 우려가 있는 대상이어도 된다.).

[0158] 〔A5〕 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 섬유화 질환; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의, 〔1〕 ~ 〔5〕, 〔16〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 규정되는 항IL-8 항체의 사용.

[0159] 〔A6〕 인간 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 유착; 인간 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 불임증; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IL-8 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의 〔6〕 ~ 〔15〕, 〔23〕 ~ 〔25〕 중 어느 하나에 규정되는 IL-8 시그널 저해제의 사용.

[0160] 이들 중 어느 것에 기재된 1 또는 복수의 요소(element)의 일부 또는 전부를 임의로 조합한 것도, 당업자의 기술 상식에 근거하여 기술적으로 모순되지 않는 한 본 발명에 포함될 것이 의도되고, 또한 당업자에게는 당연히

이해되는 것으로서 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0161] 도 1은 천연 인간 IgG1의 Fc 영역을 갖는 Fv4-IgG1의, RA 환자의 혈청에 있어서의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 2는 Fv4-YTE의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 3은 Fv4-LS의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 4는 Fv4-N434H의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 5는 Fv4-F1847m의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 6은 Fv4-F1848m의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 7은 Fv4-F1886m의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 8은 Fv4-F1889m의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 9는 Fv4-F1927m의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 10은 Fv4-F1168m의, RA 환자의 혈청 중의 류마토이드 인자에 대한 결합의 정도를 나타낸다.

도 11은 Fv4-IgG1, 및, 각종 FcRn 결합 증대 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 각각에 대하여, RA 환자의 혈액에 있어서의 류마토이드 인자에 대한 결합성의 평균치를 나타낸다.

도 12는 항인간 IgE 항체인, 천연 인간 IgG1의 Fc 영역을 갖는 OHB-IgG1, 및, 각종 FcRn 결합 증대 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체(OHB-LS, OHB-N434A, OHB-F1847m, OHB-F1848m, OHB-F1886m, OHB-F1889m, OHB-F1927m)를 필리핀원숭이에게 각각 투여했을 경우의, 당해 필리핀원숭이의 혈장 중의 각종 항인간 IgE 항체의 농도 추이를 나타낸다.

도 13은 항인간 IL-6 리셉터 항체인 Fv4-IgG1과 당해 항체에 있어서 산성 pH에 있어서의 FcRn에 대한 결합성을 증대시킨 Fv4-F1718을 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에게 각각 투여했을 경우의, 당해 마우스 혈장 중의 항체의 농도 추이를 나타낸다.

도 14는 pH 7.4와 pH 5.8에 있어서의, H998/L63과 Hr9의 IL-8에 대한 결합을 Biacore로 측정했을 때에 얻어지는 센서그램을 나타낸다.

도 15는 인간 IL-8과 혼합시킨 H998/L63 및 H89/L118을, 마우스에게 각각 2mg/kg으로 투여했을 경우의, 당해 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 추이를 나타낸다.

도 16은 인간 IL-8과 혼합시킨 H89/L118을, 마우스에게 각각 2mg/kg 또는 8mg/kg으로 투여했을 경우의, 당해 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 추이를 나타낸다.

도 17은 인간 IL-8과 혼합시킨 H89/L118 및 H553/L118을, 마우스에게 각각 2mg/kg 또는 8mg/kg으로 투여했을 경우의, 당해 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 추이를 나타낸다.

도 18a는 Hr9, H89/L118, 및 H553/L118의, 혈장 중에서의 보존 전의 항체에 의한 화학발광량의 상대치의, 항체 농도에 의한 추이를 나타낸다.

도 18b는 Hr9, H89/L118, 및 H553/L118의, 혈장 중에서 1주간 보존한 후의 항체에 의한 화학발광량의 상대치의, 항체 농도에 의한 추이를 나타낸다.

도 18c는 Hr9, H89/L118, 및 H553/L118의, 혈장 중에서 2주간 보존한 후의 항체에 의한 화학발광량의 상대치의, 항체 농도에 의한 추이를 나타낸다.

도 19는 EpiMatrix로 예측된 각 IL-8 항체(hWS4, Hr9, H89/L118, H496/L118, H553/L118)의 ADA 발생 예측 빈도와 그 외 기존의 항체 의약의 ADA 발생 예측 빈도를 나타낸다.

도 20은 EpiMatrix로 예측된 각 IL-8 항체(H496/L118, H496v1/L118, H496v2/L118, H496v3/L118, H1004/L118, H1004/L395)의 ADA 발생 예측 빈도와 그 외 기존의 항체 의약의 ADA 발생 예측 빈도를 나타낸다.

도 21a는 Hr9, H89/L118, 및 H1009/L395-F1886s의, 혈장 중에서의 보존 전의 항체에 의한 화학발광량의 상대치의, 항체 농도에 의한 추이를 나타낸다.

도 21b는 Hr9, H89/L118, 및 H1009/L395-F1886s의, 혈장 중에서 1주간 보존한 후의 항체에 의한 화학발광량의 상대치의, 항체 농도에 의한 추이를 나타낸다.

도 21c는 Hr9, H89/L118, 및 H1009/L395-F1886s의, 혈장 중에서 2주간 보존한 후의 항체에 의한 화학발광량의 상대치의, 항체 농도에 의한 추이를 나타낸다.

도 22는 인간 IL-8과 혼합시킨 H1009/L395, H553/L118 및 H998/L63을, 마우스에게 각각 투여했을 경우의, 당해 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 추이를 나타낸다.

도 23은 Hr9, H89/L118 및 H1009/L395를, 단독으로 세포외 매트릭스에 첨가했을 경우와, 인간 IL-8과 혼합하여 첨가했을 경우의, 세포외 매트릭스에 대한 결합량을 나타낸다.

도 24는 H1009/L395의 가변 영역을 갖고, FcRn에 결합하지 않는 Fc 영역(F1942m)을 갖는 항체를, 단독으로 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에게 투여했을 경우와, 인간 IL-8과 혼합하여 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에게 투여했을 경우의, 당해 각 마우스의 혈장 중의 항체의 농도 추이를 나타낸다.

도 25는 EpiMatrix로 예측된 H1009/L395 및 H1004/L395의 ADA 발생 예측 빈도와 그 외 기존의 항체 의약의 ADA 발생 예측 빈도를 나타낸다.

도 26은 H89/L118의 가변 영역을 갖고, 천연 인간 IgG1의 Fc 영역을 갖는 H89/L118-IgG1, 및 각종 FcRn 결합 증대 Fc 영역 개변체를 갖는 항체(H89/L118-F1168m, H89/L118-F1847m, H89/L118-F1848m, H89/L118-F1886m, H89/L118-F1889m, H89/L118-F1927m)를 필리핀원숭이에게 각각 투여했을 경우의, 당해 필리핀원숭이의 혈장 중의 각종 항인간 IL-8 항체의 농도 추이를 나타낸다.

도 27은 H1009/L395의 가변 영역을 갖는 항체로서, Fc 영역이 개변체(F1886m, F1886s, F1974m)인 항체의, 각종 FcɣR에 대한 결합성을 나타낸다.

도 28은 인간 IL-8과 혼합시킨 항IL-8 항체를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에게 투여했을 경우의, 당해 마우스 혈장 중의 인간 IL-8의 농도 추이를 나타낸다. 당해 항IL-8 항체는, H1009/L395의 가변 영역 및 천연 인간 IgG1의 Fc 영역을 포함하는 H1009/L395-IgG1(2mg/kg)과, H1009/L395의 가변 영역 및 개편된 Fc 영역을 포함하는 H1009/L395-F1886s(2, 5 또는 10mg/kg)이다.

도 29는 천연 인간 IgG1의 Fc 영역을 포함하는, Hr9-IgG1, H89/L118-IgG1과 개편된 Fc 영역을 포함하는 H1009/L395-F1886s, H1009/L395-F1974m을 각각 필리핀원숭이에게 투여했을 경우의, 당해 필리핀원숭이의 혈장 중의 각 항체의 농도 추이를 나타낸다.

도 30은 자궁내막증 환자의 낭포액 중의 IL-8 농도를 나타내는 그래프이다.

도 31은 자궁내막 조직의 세절 후, 파종에 의해 형성된 병변 부위와 유착 및 봉합에 의해 형성된 병변 부위를 기록한 복강경 관찰 기록 용지를 나타내는 도면이다.

도 32는 유인 4개월 후 및 유인 12개월 후(투여 6개월 후)에 있어서의, 결정성 병변의 형성 및 유착의 형성을 나타내는 사진이다.

도 33은 유인 12개월 후(투여 6개월 후)에 있어서, 증식성을 나타내는 자궁내막증양 내막 상피 및 스트로마가 형성된 것을 나타내는 사진이다.

도 34a는 원숭이의 자궁내막증 모델에 있어서의 낭포액 중의 IL-8 농도와 adhesion r-AFS score의 높은 상관 관계를 나타내는 그래프이다.

도 34b는 Vehicle 또는 항체 H1009/L395-F1974m을 투여했을 때의, 자궁내막증의 결정성 병변의 상대 체적을 나타내는 그래프이다.

도 35a는 Vehicle 또는 항체 H1009/L395-F1974m 투여의 전후에 있어서의, total r-AFS score, adhesion r-AFS score, size r-AFS score의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 35b는 Vehicle 또는 항체 H1009/L395-F1974m 투여의 전후에 있어서의, total r-AFS score의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 36은 유인 12개월 후(투여 6개월 후)에 있어서, Vehicle군과 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서의, 이식부의 병리 조직상을 나타낸다. Vehicle군과 비교하여, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서, 증식성을 나타내는 상피 및 스트로마 세포의 위축이나 간질의 감소가 인정되었다.

도 37은 자궁선근증 병발 원숭이의 Vehicle군과 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서의, 자궁내막 조직을 나타내는 사진이다. Vehicle군과 비교하여, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서, 내막 상피의 위축 및 스트로마 세포의 감소와 위축이 인정되었다.

도 38은 외과적 수술 후의 유착에 관한, 원숭이의 자궁내막증 모델에 있어서의 Vehicle군과 항체 H1009/L395-F1974m 투여군의 대표적인 복강 내를 나타내는 사진이다.

도 39는 IL-8을 첨가하고 있지 않는 well에 있어서의 호중구의 유주능에 대한 각종 시약 첨가 시의 각 well에 있어서의 호중구의 유주능을 상대치로 평가한 결과를 나타낸다.

도 40은 자궁내막증 세포에 호중구 배양 상청을 첨가했을 경우의 아로마타제의 발현량을 해석한 결과를 나타낸다.

도 41은 IL-8이나 항IL-8 항체를 첨가했을 때의 호중구 배양액 중의 MCP-1의 농도를 해석한 결과를 나타낸다.

도 42는 IL-8이나 항IL-8 항체를 첨가했을 때의 매크로파지에 있어서의 CTGF의 발현을 해석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0162] 이하에, 본 개시의 바람직한 비한정적인 실시태양을 설명한다.

[0163] 후술하는 본 실시예에 기재되는 모든 요소(element)는, 본 특허출원의 권리화를 의도하는 국가에 있어서의, 실시예에 기재된 내용을 한정적으로 해석하려고 할 수 있는 어떠한 특허 실무, 관습, 법령 등의 제한에 얽매이지 않고, 본 「발명을 실시하기 위한 구체적인 내용」에 있어서도 동등하게 기재되어 있다고 당연히 간주되는 것을 의도하여 기재된다.

[0164] 본 개시에 있어서의 어느 것에 기재된 1 또는 복수의 요소(element)의 일부 또는 전부를 임의로 조합한 것도, 당업자의 기술 상식에 근거하여 기술적으로 모순되지 않는 한, 본 개시에 포함되는 것이 의도되고, 또한 당업자에게는 당연히 이해되는 것으로서 기재된다.

[0165] 본 명세서에 있어서 「항체」란 가장 넓은 의미에 있어서 사용되고, 한정은 되지 않지만, 소망하는 항원 결합 활성을 나타내는 한은, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체) 및 항체 단편을 포함한다.

[0166] 본 개시에 있어서, 소망하는 참조 항체(예를 들어 참조가 되는 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)에 대해서 「동일 에피토프에 결합하는 항체」란, 일 실시태양에 있어서, 소망하는 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)에 결합하는 참조 항체의 당해 항원에 대한 결합을 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%,90%, 95% 또는 그 이상 저지하는 항체를 가리키고, 반대로, 참조 항체는, 항체의 그 항원에 대한 결합을 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%,90%, 95% 또는 그 이상 저해한다. 여기에서, 전형적인 경합 어세이를 이용할 수도 있지만 이것으로 한정되지 않는다.

[0167] 본 명세서에 있어서 「모노클로날 항체」란, 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 얻어지는 항체를 의미하고, 즉, 예를 들어, 천연에 생기는 변이를 포함하고, 또는 모노클로날 항체 제제의 제조 시에 발생하는 것이며, 일반적으로 소량으로 존재하는 변이체 등의 잠재적인 변이체 항체를 제외하고는, 집단을 구성하는 개개의 항체는 동일하고, 및/또는 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정기(에피토프)에 대한 상이한 항체를 일반적으로 포함하는, 폴리클로날 항체 조제물과는 대조적으로, 모노클로날 항체 조제물의 각 모노클로날 항체는, 항원 상의 단일한 결정기에 대한 것이다. 따라서, 수식어 「모노클로날」은, 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 얻어지는 항체의 특징을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 산생을 필요로 하는 것으로서 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 개시에 있어서의 모노클로날 항체는, 한정되지 않지만, 하이브리도마법, 재조합 DNA법, 파지 디스플레이법, 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 포함하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하는 다양한 기술에 의해 제작되어도 된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체는 모노클로날 항체여도 된다.

[0168] 본 명세서에 있어서 「천연형 항체」란, 천연에 생기는 다양한 구조를 가지는 면역글로불린 분자를 가리킨다.

예를 들어, 일 측면에서의 천연형 IgG 항체는, 다이설파이드 결합하고 있는 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄로 이루어지는 약 150,000달톤의 헤테로사량체 당단백질이지만, 이것으로 한정되지 않는다. N 말단으로부터 C 말단으로 향해, 각 중쇄는, 가변 영역(VH)을 갖고, 3개의 정상 영역(CH1, CH2 및 CH3)이 계속된다. 마찬가지로, N 말단으로부터 C 말단으로 향해, 각 경쇄는, 가변 영역(VL)을 갖고, 정상 영역(CL)이 계속된다. 항체의 경쇄는, 그 정상 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ)와 람다(λ)로 불리는, 2개의 타입의 어느 하나에 할당할 수 있다. 여기에서 이용되는 정상 영역으로서는, 보고되어 있는 어떠한 알로타입(알렐) 또는 어떠한 서브클래스/아이소타입의 것이 이용되어도 된다. 예를 들어 중쇄 정상 영역으로서는, 한정은 되지 않지만, 천연형 IgG 항체(IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 정상 영역을 이용할 수 있다. 예를 들어 IgG1의 알렐로서는, IGHG1*01~05가 알려져 있지만(http://www.imgt.org/를 참조), 이들 모두가 인간 천연형 IgG1 서열로서 사용할 수 있다. 또한, 정상 영역의 서열은, 단일의 알렐 또는 서브클래스/아이소타입에서 유래해도 되고, 복수의 알렐 또는 서브클래스/아이소타입에서 유래해도 된다. 즉, 이것에 한정은 되지 않지만, 예를 들어 CH1은 IGHG1*01에서 유래하고, CH2는 IGHG1*02에서 유래하고, CH3은 IGHG1*01에서 유래한다고 하는 항체도 포함된다. 천연형 인간 IgG 항체의 중쇄 정상 영역의 일례로서는, 인간 IgG1 정상 영역(서열 번호: 100), 인간 IgG2 정상 영역(서열 번호: 101), 인간 IgG3 정상 영역(서열 번호: 102), 인간 IgG4 정상 영역(서열 번호: 103) 등을 들 수 있다. 또한, 천연형 인간 IgG 항체의 경쇄 정상 영역의 일례로서는, 인간 κ쇄 정상 영역(서열 번호: 104), 인간 λ쇄 정상 영역(서열 번호: 105) 등을 들 수 있다.

[0169] 본 명세서에 있어서 「프레임워크」 또는 「FR」은, 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 영역 부분을 가리킨다. 통상, 가변 영역의 FR은 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, FR4로 이루어진다. 따라서, HVR과 FR의 서열은, 통상, 다음과 같은 서열로, VH(또는 VL)에 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0170] 본 명세서에 있어서 「인간 컨센서스 프레임워크」란, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별에 있어서, 통상, 가장 공통되게 나타나는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 통상, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은, 가변 영역 서열의 서브그룹으로부터 선별된다. 통상, 서열의 서브그룹은, Kabat et al, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)에 의한 서브그룹이다. 일 실시태양에 있어서, VL에 관한 서브그룹은 위에서 게시한 Kabat et al에 의한 서브그룹 κI이어도 된다. 또한, 일 실시태양에 있어서, VH에 관한 서브그룹은 위에서 게시한 Kabat et al에 의한 서브그룹 III이어도 된다.

[0171] 본 명세서에 있어서의 「억셉터 인간 프레임워크」란, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 얻어지는 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 함유하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크「로부터 얻어지는」 억셉터 인간 프레임워크는, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크와 동일한 아미노산 서열을 함유하거나, 기존의 아미노산 치환을 함유해도 된다. 일 실시태양에 있어서, 기존의 아미노산 치환의 수는, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 이하이다. 일 실시태양에 있어서, VL 억셉터 인간 프레임워크는, VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0172] 본 명세서에 있어서 「가변 영역」이란, 소망하는 항원에 대한 항체의 결합에 관여하는, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 가리킨다. 천연의 항체의 중쇄와 경쇄의 가변 영역(각각 VH와 VL)은, 통상, 4개의 보존된 프레임워크 영역(FRs)과 3개의 초가변 영역(HVRs)을 포함하는 각 도메인과 함께 유사한 구조를 가진다(Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 2007 p. 91). 일 실시태양에 있어서, 하나의 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 제공하기에 충분하지만, 이것으로 한정되지 않는다. 더욱이, 어느 특정의 항원에 결합하는 항체는, VL 또는 VH 도메인의 상보적 라이브러리를 스크리닝하기 위해서 당해 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리되어도 된다(e.g., Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 1991 352:624-628).

[0173] 본 명세서에 있어서의 「초가변 영역」 또는 「HVR」이란, 서열에 있어서 초가변이고(「상보성 결정 영역」 또는 「CDR」(complementarity determining region)), 및/또는, 구조적으로 정해진 루프(「초가변 루프」)를 형성하고, 및/또는, 항원 접촉 잔기(「항원 접촉」)를 포함하는, 항체의 가변 도메인의 각 영역을 말한다. 통상, 항체는 6개의 HVR을 포함한다: VH에 3개(H1, H2, H3), 및 VL에 3개(L1, L2, L3). 예시적인 HVR로서는 이하를 들 수 있다:

[0174] (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 및 96-101(H3)의 장소에서 생기는 초가변 루프(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987));

[0175] (b) 아미노산 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2), 및 95-102(H3)의 장소에서 생기는 CDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991));

[0176] (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2), 및 93-101(H3)의 장소에서 생기는 항원 접촉(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745(1996)); 및,

[0177] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3), 및 94-102(H3)를 포함하는, (a), (b), 및/또는 (c)의 조합.

[0178] 특별히 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 영역 중의 다른 잔기(예를 들어, FR 잔기)는, 본 명세서에서는 상기의 Kabat et al에 따라 번호 붙여진다.

[0179] 본 명세서에 있어서 「개체」란 포유류를 가리킨다. 포유류는, 이것으로 한정되지 않지만, 길들여진 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개, 말), 영장류(예를 들어, 인간, 또는 원숭이와 같은 비인간 영장류), 토끼나, 설치류(마우스나 래트 등)를 포함한다. 일 실시태양에 있어서, 「개체」는 IL-8을 생체 내에 천연으로 갖는 포유류인 것이 바람직하고, 인간과 마찬가지의 월경을 갖는 동물, 예를 들어, 비인간 영장류가 보다 바람직하고, 인간이 한층 더 바람직하다. 본 명세서에 있어서, 문맥에 모순되지 않는 한, 개체는 「대상」과 호환 가능하게 이용된다.

[0180] 본 명세서에 있어서 「단리된」 항체란 그 천연의 환경의 구성 요소로부터 분리된 것이다. 일 실시태양에 있어서, 예를 들어 크로마토그래프적으로(예를 들어 이온 교환 또는 역상 HPLC), 또는 전기영동적으로(예를 들어 SDS-PAGE, 등전점 전기영동(IEF), 캐필러리 전기영동), 예를 들어 95% 또는 99% 이상의 순도까지 정제할 수 있다. 항체의 순도의 측정법은 예를 들어 Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87(2007)을 참조한다. 본 개시에 있어서의 「단리된」 항체는, 일 측면에 있어서, 「정제된」 항체라고 바꿔 말할 수 있다.

[0181] 본 명세서에 있어서 「단리된」 핵산이란 그 천연의 환경의 구성 요소로부터 분리된 핵산 분자를 가리킨다. 핵산에는, 통상, 핵산 분자를 포함하는 세포에 포함되는 당해 핵산 분자를 포함하지만, 염색체 밖에 존재하는 것이나 천연의 염색체의 위치와는 다른 위치에 존재하는 것도 포함한다.

[0182] 본 명세서에 있어서 「친화성」이란, 전형적으로는, 분자(예를 들어 항체 또는 화합물)의 단일 결합 부위와 그 결합 파트너(예를 들어 항원) 사이의 비공유결합적인 상호 작용의 총 합계적인 강도를 의미해도 된다. 특별히 나타내지 않는 한, 본 개시에 있어서 「결합 친화성」이란, 결합쌍의 멤버(예를 들어 항체 또는 화합물과 항원) 사이의 1:1의 상호 작용을 반영하는 고유의 결합 친화성을 의미한다. 분자 X의 그 파트너 Y에 대한 친화성은, 일반적으로, 해리 상수(KD)로서 나타낼 수 있다. 결합 친화성은 본 개시에 기재된 방법 등의 당업자에게 공지의 방법으로 측정해도 된다.

[0183] 일 실시태양에 있어서, IL-8, CXCR1 또는 CXCR2 등의 항원에 결합하는 항체는, 예를 들어 ≤1000nM, ≤100nM, ≤10nM, ≤1nM, ≤0.1nM, ≤0.01nM, 또는 ≤0.001nM(예를 들어, 10^{-8}M이나 그 이하, 10^{-8}M 내지 10^{-13}M, 10^{-9}M 내지 10^{-13}M 등)과 같은 해리 상수(KD)를 가질 수 있다.

[0184] 본 명세서에 있어서 「숙주 세포」, 「숙주 세포주」는, 서로 교환 가능하게 이용되고, 외래 핵산이 도입된 세포(그와 같은 세포의 자손을 포함한다)를 말한다. 숙주 세포는 「형질 전환체」 및 「형질 전환 세포」를 포함하고, 이것에는 초대의 형질 전환 세포 및 계대수에 상관 없이 그 세포에서 유래하는 자손을 포함한다. 자손은, 모세포와 핵산의 내용에 있어서 완전히 동일하지 않아도 되고, 변이를 포함하고 있어도 된다. 오리지날의 형질 전환 세포가 스크리닝되었을 또는 선택되었을 때에 이용된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손도 포함된다.

[0185] 본 명세서에 있어서 「벡터」란, 그것에 연결된 다른 핵산을 증폭할 수 있는 핵산 분자를 가리키고, 자기 복제 핵산 구조로서의 벡터, 및 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈 중에 도입된 벡터를 포함한다. 어느 벡터는, 자신에게 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 가져올 수 있다. 그와 같은 벡터는 본 명세서에 있어서 「발현 벡터」라고도 칭해진다.

[0186] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는 항체 단편이어도 된다. 항체 단편은, 예를 들어, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, scFv 단편, 다이아보디, 싱글 도메인 항체 등의 항체 단편을 포함해도 된다. 항체 단편의 총설로서 Hudson et al. Nat. Med. 9:129-

134(2003)을 참조한다. scFv 단편의 총설로서 예를 들어, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315(1994), WO93/16185, US Patent No. 5,571,894, US Patent No. 5,587,458을 참조한다.

[0187] 본 명세서에 있어서 「다이아보디」란, 2가 또는 이중특이적이고, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편이다(예를 들어, EP404,097; WO1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003); Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448(1993)). 트리아보디나 테트라보디는 예를 들어 Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003)에 기재된다.

[0188] 본 명세서에 있어서 「싱글 도메인 항체」란, 항체의 중쇄 가변 영역의 전부 또는 일부, 또는 경쇄 가변 영역의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체가 싱글 도메인 항체인 경우, 그것은 인간 싱글 도메인 항체여도 된다(예를 들어, Domantis, Inc., Waltham, MA; US Patent No. 6,248,516). 항체 단편은, 한정은 되지 않지만, 본 명세서에 기재된 재조합 숙주 세포를 이용한 산생에 더하여, 예를 들어 전장 항체를 효소 분해하는 등의 다양한 방법으로 제작할 수 있다.

[0189] 본 명세서에 있어서 「키메라 항체」란, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정의 유래 또는 종이며, 나머지의 부분이 상이한 유래 또는 종인 항체를 가리킨다.

[0190] 본 명세서에 있어서 「인간화」 항체란, 비인간 HVR에서 유래하는 아미노산 잔기와 인간 FR에서 유래하는 아미노산 잔기를 갖는 키메라 항체를 가리킨다. 일 실시태양에 있어서, 인간화 항체는, 실질적으로 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 영역을 포함하고, 당해 가변 영역에서는, 모든(또는 실질적으로 모든) HVR은, 비인간 항체의 HVR(예를 들어 CDR)에 상당하고, 모든(또는 실질적으로 모든) FR은, 인간 항체의 FR에 상당한다. 인간화 항체는, 경우에 따라서는, 적어도, 인간 항체에서 유래하는 항체 정상 영역의 부분을 포함해도 된다.

[0191] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는 키메라 항체여도 된다. 키메라 항체는, 예를 들어 US Patent No. 4,816,567이나 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)에 기재되어 있다. 키메라 항체는 비인간 가변 영역(예를 들어, 원숭이와 같은 비인간 영장류, 또는 마우스, 래트, 햄스터, 또는 토끼 등에서 유래하는 가변 영역)과 인간의 정상 영역을 포함해도 된다.

[0192] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는 인간화 항체여도 된다. 전형적으로는, 비인간 항체는, 부모인 비인간 항체의 특이성과 친화성을 유지하면서, 인간에서의 면역원성을 감소시키기 위해서 인간화된다. 전형적으로는, 인간화 항체는 1개 이상의 가변 영역을 포함하고, 그 중에는 HVR, 예를 들어 비인간 항체에서 유래하는 CDR(또는 그 일부)와 인간 항체 서열에서 유래하는 FR(또는 그 일부)이 존재한다. 인간화 항체는, 임의로, 인간 정상 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 일 실시태양에 있어서, 인간화 항체 내의 FR의 아미노산 잔기는, 예를 들어, 항체의 특이성이나 친화성을 유지 또는 개선시키기 위해서, 비인간 항체(예를 들어 HVR 잔기의 유래가 된 항체)의 대응하는 아미노산 잔기와 치환되어 있어도 된다.

[0193] 인간화 항체 및 그 제작 방법은, 예를 들어 이하에서 총설되어 있고(Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)), 더욱이 예를 들어 이하에 기재되어 있다: Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989); US Patent Nos. 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, and 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34(2005)(describing specificity determining region(SDR) grafting); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991)(describing "resurfacing"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60(2005)(describing "FR shuffling"); and Osbourn et al., Methods 36:61-68(2005) and Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260(2000)(describing the "guided selection" approach to FR shuffling).

[0194] 일 실시태양에 있어서, 인간화에 사용될 인간 프레임워크는, 예를 들어, 「베스트피트」법(Sims et al. J. Immunol. 151:2296(1993))을 이용하여 선택된 프레임워크, 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역이 있는 특정의 서브그룹의 인간 항체의 컨센서스 서열에서 유래하는 프레임워크(Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992) and Presta et al. J. Immunol., 151:2623(1993)), FR 라이브러리의 스크리닝에서 유래하는 프레임워크 영역을 포함하고 있어도 된다(Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997)과 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996)).

[0195] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는

인간 항체여도 된다. 인간 항체는 다양한 기술로 제작할 수 있다. 인간 항체는 예를 들어 van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-374(2001)이나 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008)에 개설된다. 인간 항체는 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)에 응답하여 완전 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 수반하는 완전 항체를 산생하도록 개변된 트랜스제닉 동물에 면역원을 투여하는 것에 의해 조제되어도 된다. 그와 같은 동물은, 전형적으로는 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부분을 포함하고, 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부분은, 내인성의 면역글로불린 유전자좌를 치환하거나, 또는 염색체 외에 또는 당해 동물의 염색체 내에 랜덤하게 도입된 상태로 존재한다. 그와 같은 트랜스제닉 마우스에 있어서, 내인성의 면역글로불린 유전자좌는, 통상 불활성화되어 있다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 얻는 방법의 총설로서 Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)를 참조한다. 또한, 예를 들어, XENOMOUSE(상표) 기술을 기재한 US Patent No. 6,075,181, 6,150,584호; HUMAB(등록상표) 기술을 기재한 US Patent No. 5,770,429; K-M MOUSE(등록상표) 기술을 기재한 US Patent No. 7,041,870; 및, VELOCIMOUSE(등록상표) 기술을 기재한 US2007/0061900을 참조한다. 이와 같은 동물에 의해 생성되는 완전 항체로부터의 인간 가변 영역은, 예를 들어, 다른 인간 정상 영역과 조합하는 등으로, 추가로 수식되어도 된다.

[0196] 다른 실시태양에 있어서, 인간 항체는 하이브리도마에 기초한 방법으로도 제작할 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 산생을 위한, 인간 미엘로마 세포 및 마우스-인간 헤테로미엘로마 세포주는 이하에 기술된다(예를 들어, Kozbor J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86(1991)). 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성되는 인간 항체는 Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006)에 기술된다. 그 외의 방법으로서는, 예를 들어 US Patent No. 7,189,826(하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 제조를 기재), 및 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006)(인간-인간 하이브리도마를 기재)을 들 수도 있다. 인간 하이브리도마 기술(트리오마 기술)은, Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937(2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005)에 기재된다.

[0197] 다른 실시태양에 있어서, 인간 항체는, 인간 유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택되는 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하는 것으로도 생성할 수 있다. 이와 같은 가변 영역 서열은, 다음에 소망하는 인간 정상 영역과 조합할 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 수법은 이하를 참조한다.

[0198] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는, 소망하는 1개 또는 복수의 활성을 갖는 항체에 대해 콤비나토리얼 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해 단리해도 된다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리의 제작 방법이나, 소망하는 결합 특성을 갖는 항체에 대해 그와 같은 라이브러리를 스크리닝하는 방법 등이 당해 기술 분야에 있어서 알려져 있다. 그와 같은 방법은, Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)에서 총설되어 있고, 추가로 예를 들어, McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628(1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597(1992); Marks and Bradbury, Molecular Biology 248:161-175(Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310(2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093(2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472(2004); Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)에 기재된다.

[0199] 일 실시태양에 있어서의 특정의 파지 디스플레이법에 있어서, VH 및 VL의 레퍼터리는, 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)에 의해 따로따로 클로닝할 수 있고, 무작위로 파지 라이브러리 중에서 재결합되며, 당해 파지 라이브러리는, Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)에 기재된 바와 같이, 항원 결합 파지에 대해 스크리닝되어도 된다. 파지는, 예를 들어 scFv나 Fab와 같은 항체 단편을 제시한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는, 하이브리도마를 구축하는 것을 필요로 하지 않고서 면역원에 대한 고친화성 항체를 제공할 수 있다. 다른 실시태양에 있어서, Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734(1993)에 기재되는 바와 같이, 면역화하지 않고, 나이브 레퍼터리를 (예를 들어, 인간으로부터) 클로닝하여, 광범위한 비자기 또는 자기 항원으로의 단일 유래의 항체를 제공할 수도 있다. 추가적인 다른 실시태양에 있어서, 나이브 라이브러리는, Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388(1992)에 기재되는 바와 같이, 줄기세포로부터 재편성 전의 V-유전자 세그먼트를 클로닝하여, 초가변 영역 CDR3을 코딩하고 또한 in vitro로 재구성을 달성하기 위한 무작위 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 이용하는 것에 의해, 합성적으로 만들 수도 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재한 특허문헌은, 예를 들어 US Patent No. 5,750,373, US2005/0079574,

US2005/0119455, US2005/0266000, US2007/0117126, US2007/0160598, US2007/0237764, US2007/0292936, US2009/0002360을 들 수 있다.

[0200] 인간 항체 라이브러리로부터 단리되는 항체 또는 항체 단편은, 본 명세서에 있어서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주한다.

[0201] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체)이다. 다중특이성 항체는, 적어도 2개의 상이한 부위에 결합 특이성을 갖는 항체(예를 들어 모노클로날 항체)이다. 일 실시태양에 있어서, 결합 특이성 중 1개는 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)에 대한 것이고, 다른 것은 그 이외의 항원에 대한 것이다. 다른 실시태양에 있어서, 이중특이성 항체는, 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)의 상이한 2개의 에피토프에 결합해도 된다. 이중특이성 항체는, 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)을 발현하는 세포에 세포 상해제를 국재화하기 위해서 사용되어도 된다. 이중특이성 항체는, 전장 항체로서 또는 항체 단편으로서 조제되어도 된다.

[0202] 다중특이성 항체의 제작 수법으로서는, 한정은 되지 않지만, 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 페어의 재조합 공발현(예를 들어 Milstein and Cuello, Nature 305: 537(1983), WO93/08829, 및 Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655(1991)), 및 knob-in-hole 기술(예를 들어 US Patent No. 5,731,168)을 들 수 있다. 다중특이성 항체는, Fc 헤테로이량체 분자를 제작하기 위해서 정전 스티어링 효과(electrostatic steering effects)를 조작하는 것(예를 들어 WO2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 항체 단편을 가교시키는 것(예를 들어 US Patent No. 4,676,980 및 Brennan et al., Science, 229: 81(1985)); 류신 지퍼를 이용하여 2개의 특이성을 갖는 항체를 작성하는 것(예를 들어 Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)); 「다이아보디」 기술을 이용하여 이중특이성 항체 단편을 제작하는 것(예를 들어 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)); scFv 다이머를 이용하는 것(예를 들어 Gruber et al., J. Immunol., 152:5368(1994)); 삼중특이성 항체를 조제하는 것(예를 들어 Tutt et al. J. Immunol. 147: 60(1991))에 의해 제작해도 된다. 또한, 「옥토퍼스 항체」를 포함하는, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖도록 조작된 항체여도 된다(예를 들어 US2006/0025576).

[0203] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체) 또는 그것의 항체 단편은, 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)과 다른 상이한 항원에 결합하는 1개의 항원 결합 부위를 포함하는, 「듀얼 액팅 Fab」 또는 「DAF」여도 된다(예를 들어 US2008/0069820).

[0204] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)의 아미노산 서열의 개변체(변이체)는, 항체의 분자를 코딩하는 핵산에 적당한 수식을 도입하거나, 또는 펩타이드를 합성함으로써 조제할 수 있다. 이와 같은 수식은, 아미노산 서열 중으로의, 임의의 아미노산(잔기)의 임의의 결실, 삽입, 치환을 1 또는 복수, 적절히 조합하여 행해도 된다. 최종 구축물이 원하는 특징(예를 들어, 항원 결합성)을 갖는 한, 결실, 삽입, 치환의 임의의 조합을 이용할 수 있다.

[0205] 일 실시태양에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산 치환을 행한 항체 개변체(변이체)가 제공되는 경우에는, 치환적 변이 도입의 목적 부위는, HVR 및 FR을 포함할 수 있다.

[0206] 일 실시태양에 있어서의 보존적 치환을, 표 1의 「바람직한 치환」으로서 나타내고, 보다 실질적인 변경을, 표 1의 「예시적인 치환」으로서 나타내고, 더욱이 아미노산 측쇄의 성질로 언급하면서 이하에서 기술한다. 아미노산 치환은 목적하는 항체에 도입되어도 되고, 그에 따른 산물은, 예를 들어, 유지/개선된 항원 결합성, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC 등의 소망하는 활성에 대해 스크리닝되어도 된다.

표 1

[0207]

원래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0208] 아미노산은 공통의 측쇄 특성에 기초하여 이하로 분류할 수 있다:

[0209] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0210] (2) 중성의 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0211] (3) 산성: Asp, Glu;

[0212] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0213] (5) 쇄 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0214] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe

[0215] 비보존적 치환은, 이들 분류 중의 1개의 멤버를 다른 분류로 교환하는 것을 의미한다.

[0216] 일 실시태양에 있어서, 아미노산의 삽입이란, 아미노산 서열 중으로의 1 또는 복수의 아미노산 잔기의 삽입을 가리켜도 되고, N 말단 및/또는 C 말단에, 1, 2, 또는 3~100, 또는 그 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩타이드를 융합시켜도 된다. 말단의 삽입의 예로서, N 말단에 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 들 수 있다. 그 외의 삽입 개변체(변이체)의 예로서는, 항체의 N 말단 및/또는 C 말단에, 효소(예를 들어, ADEPT를 위한 효소) 또는 항체의 혈장 반감기를 증가시키는 폴리펩타이드를 융합시킨 것을 들 수 있다.

[0217] 본 명세서에 있어서, 참조 폴리펩타이드 서열에 대한 「퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성」이란, 최대의 퍼센트 서열 동일성을 얻도록 서열을 정렬시키고 또한 필요하면 갭을 도입한 후의, 또한, 어떠한 보존적 치환도 서열 동일성의 일부라고 생각하지 않는다고 했을 때의, 참조 폴리펩타이드 서열 중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. % 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적하는 얼라인먼트는, 당해 기술 분야에 있어서의 다양한 방법, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign(DNASTAR) 소프트웨어,

또는 GENETYX(등록상표) 등의, 공적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것에 의해 달성 가능하다. 당업자는, 비교되는 서열의 전장에 걸쳐서 최대의 얼라인먼트를 달성하기 위해서 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열의 얼라인먼트를 취하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0218] ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨텍크사의 저작이며, 그 소스 코드는 미국 저작권청에 사용자용 서류와 함께 제출되어, 미국 저작권 등록번호 TXU510087로서 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은, 제넨테크사(Genentech, Inc., South San Francisco, California)로부터 공적으로 입수 가능하고, 소스 코드로부터 컴파일해도 된다. ALIGN-2 프로그램은, Digital UNIX V4.0D를 포함하는 UNIX(등록상표) 오퍼레이팅 시스템 상에서의 사용을 위해서 컴파일된다. 모든 서열 비교 파라미터는, ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변동하지 않는다.

[0219] 아미노산 서열 비교에 ALIGN-2가 이용되는 경우, 소여의 아미노산 서열 A의, 소여의 아미노산 서열 B로의, 또는 그것과의, 또는 그에 대한, % 아미노산 서열 동일성(또는, 소여의 아미노산 서열 B로의, 또는 그것과의, 또는 그에 대한, 어느 % 아미노산 서열 동일성을 갖는 또는 포함하는 소여의 아미노산 서열 A라고 할 수도 있다)은, 다음과 같이 계산된다: 분율 X/Y의 100배. 여기에서, X는 서열 얼라인먼트 프로그램 ALIGN-2에 의해, 당해 프로그램의 A 및 B의 얼라인먼트에 있어서 동일한 일치로서 스코어링된 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B 중의 아미노산 잔기의 전 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 상이한 경우, A의 B로의 % 아미노산 서열 동일성은 B의 A로의 % 아미노산 서열 동일성과 상이하다는 것이 이해된다. 특별히 명시하지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은, 상기 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 얻어진다.

[0220] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)의 CDR 영역, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 중쇄 정상 영역, 경쇄 정상 영역, 중쇄 전장 영역, 경쇄 전장 영역, 또는 이들의 임의의 특정 영역의 아미노산 서열에 있어서 1 또는 복수의 아미노산이 적절히 치환, 결실, 삽입되어 있고, 또한, 항원(예를 들어 IL-8, CXCR1, 또는 CXCR2)에 대한 결합 활성을 갖는 아미노산 서열은, 이와 같은 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열로 이루어지는 핵산에 스트린전트(stringent)한 조건하에서 하이브리다이즈 하는 핵산으로부터 얻는 것도 가능하다. 스트린전트한 조건하에서 하이브리다이즈 하는 핵산을 단리하기 위한 스트린전트한 하이브리다이제이션 조건으로서는, 6M 요소, 0.4% SDS, 0.5 x SSC, 37℃의 조건, 또는 이것과 동등 또는 준하는 조건이 예시된다. 보다 스트린전시가 높은 조건, 예를 들어, 6M 요소, 0.4% SDS, 0.1 x SSC의 조건, 42℃를 이용하면, 보다 상동성이 높은 핵산의 단리를 기대할 수 있다. 하이브리다이제이션 후의 세정 조건으로서는, 예를 들어, 0.5 x SSC(여기에서, 1 x SSC는 예를 들어 0.15M NaCL, 0.015M 시트르산 나트륨, pH 7.0이다.), 0.1% SDS, 60℃에 있어서의 세정, 보다 바람직하게는 0.2 x SSC, 0.1% SDS, 60℃에 있어서의 세정, 보다 바람직하게는 0.2 x SSC, 0.1% SDS, 62℃에 있어서의 세정, 보다 바람직하게는 0.2 x SSC, 0.1% SDS, 65℃에 있어서의 세정, 더 바람직하게는 0.1 x SSC, 0.1% SDS, 65℃에 있어서의 세정을 들 수 있다. 세정 시간이나 횟수는 적절히 조절 가능하고, 예를 들어 20분을 3회 실시해도 된다. 단리된 핵산의 서열의 결정은 공지의 방법에 의해 행할 수 있다.

[0221] 다른 실시태양에 있어서, 이와 같은 하이브리다이제이션 기술 대신에, CDR 영역, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 중쇄 정상 영역, 경쇄 정상 영역, 중쇄 전장 영역, 경쇄 전장 영역, 또는 이들 임의의 특정 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열 정보를 기초로 합성한 프라이머를 이용하는 유전자 증폭법, 예를 들어 PCR법을 이용하여, 해당 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열로 이루어지는 핵산과 스트린전트한 조건하에서 하이브리다이즈하는 핵산을 단리하는 것도 가능하다.

[0222] 이와 같이 하여 단리된 핵산은, 대상이 되는 영역의 염기 서열에 대해서, 염기 서열 전체로, 적어도 50% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상)의 서열의 동일성을 갖는다. 이와 같은 단리된 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 항체는, 대상이 된 영역의 아미노산 서열을 갖는 항체와 기능적으로 (실질적으로) 동등(예를 들어 항원 결합성 또는 혈중 체류성과 같은 임의의 하나 이상의 지표 또는 특성이 (실질적으로) 동등)하면 유리하지만 그것에 한정되지 않는다. 여기에서 실질적이란, 대상이 된 영역의 아미노산 서열을 갖는 항체가 갖는 기능(예를 들어 항원 결합성 또는 혈중 체류성 등의 임의의 하나 이상의 지표 또는 특성에 주목해도 된다)과 비교하여, 당업자 공지의 방법으로 측정했을 경우에, 적어도 50% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상)의 기능을 유지하고 있는 것을 의도한다.

[0223] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는

글리코실화되어 있어도 된다. 항체로의 글리코실화 부위의 추가 또는 결실은, 글리코실화 부위를 만들어 내거나, 또는 제거하도록 아미노산 서열을 개변함으로써 용이하게 달성할 수 있다.

[0224] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)가 Fc 영역을 포함하는 경우, 당해 영역에 부가될 수 있는 당쇄는 다양하게 될 수 있다. 동물세포에 의해 생성되는 나이브한 항체는, 전형적으로는, 분기한 2분지의 올리고당을 포함하고, 당해 올리고당은 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N 연결에 의해 부가되어 있다(Wright et al. TIBTECH 15:26-32(1997)). 올리고당은, 2분지의 올리고당 구조의 「줄기」에 있는 GlcNAc에 부가하고 있는 후코스에 더하여, 예를 들어 만노스, N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 갈락토스, 또는 시알산을 포함한다. 어느 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체의 올리고당의 수식은, 어느 개량된 특성을 갖는 항체 개변체의 제작에 이용되어도 된다.

[0225] 본 명세서에 있어서 「이펙터 기능」이란, 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)의 Fc 영역에 귀속되는 생물학적 활성을 의미하고, 항체의 아이소타입에 따라 변할 수 있다. 항체의 이펙터 기능의 예로서는, C1q 결합 또는 보체 의존성 세포 장애(CDC); Fc 리셉터 결합성; 항체 의존성 세포 매개성 세포 장애(ADCC); 탐식 작용; 세포 표면 리셉터(예를 들어, B 세포 리셉터)의 다운 레귤레이션; 또는 B 세포 활성화가 포함되지만 이것으로 한정되지 않는다.

[0226] 본 명세서에 있어서 「Fc 영역」이란, 적어도 정상 영역의 부분을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 정의하기 위해서 사용된다. 이 용어는 천연의 Fc 영역과 개변체의 Fc 영역(Fc 영역 개변체)의 양방을 포함한다. 천연의 Fc 영역이란, 천연형 항체의 Fc 영역을 나타낸다. 천연형 인간 IgG의 Fc 영역의 예로서는, 전술한, 인간 IgG1 정상 영역(서열 번호: 100), 인간 IgG2 정상 영역(서열 번호: 101), 인간 IgG3 정상 영역(서열 번호: 102), 또는 인간 IgG4 정상 영역(서열 번호: 103)에 포함되는 Fc 영역이어도 된다. 일 실시태양에 있어서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은, Cys226의 위치 또는 Pro230의 위치의 아미노산 잔기로부터 그 중쇄의 C 말단까지 신장된다. 그러나, Fc 영역의 C 말단의 리신(Lys447), 또는 C 말단의 글리신(Gly446) 및 리신(Lys447)은 존재하고 있어도 존재하고 있지 않아도 된다. 특별히 명기하지 않는 한, 본 명세서에 있어서 Fc 영역 또는 정상 영역의 아미노산 잔기의 번호 붙이기는, 이하의 출전, Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)에 의해 진술되고 있듯이, EU 인덱스라고도 불리는, EU 넘버링 시스템에 의한다.

[0227] 본 명세서에 있어서 「FcRn」이란, 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 FcγR과 달리, FcRn, 특히 인간 FcRn은 구조적으로는 주요 조직 부적합성 복합체(MHC) 클래스 I의 폴리펩타이드에 구조적으로 유사하여, 클래스 I의 MHC 분자와 22 내지 29%의 서열 동일성을 갖는다(Ghetie et al., Immunol. Today(1997) 18(12), 592-598). FcRn은, 가용성 β 또는 경쇄(β2 마이크로글로불린)와 복합체화된 막관통 α 또는 중쇄로 이루어지는 헤테로다이머로서 발현된다. MHC와 같이, FcRn의 α쇄는 3개의 세포외 도메인(α1, α2, α3)으로 이루어지고, 짧은 세포질 도메인은 단백질을 세포 표면에 매어둔다. α1 및 α2 도메인이 항체의 Fc 영역 중의 FcRn 결합 도메인과 상호 작용한다(Raghavan et al(Immunity(1994) 1, 303-315). FcRn은, 포유동물의 모성 태반 또는 난황낭에서 발현되고, 모친으로부터 태아에게로의 IgG의 이동에 관여한다. 게다가 FcRn이 발현하는 설치류 신생아의 소장에서는, FcRn이 섭취된 초유 또는 젖으로부터 모성 IgG의 솔가장자리 상피를 가로지르는 이동에 관여한다. FcRn은 다수의 종에 걸쳐서 다수의 다른 조직, 및 여러 가지 내피 세포계에 있어서 발현하고 있다. 그것은 인간 성인 혈관 내피, 근육 혈관계, 및 간장 동양(洞様) 모세혈관에서도 발현된다. FcRn은, IgG에 결합하여, 그것을 혈청으로 리사이클하는 것에 의해, IgG의 혈장 중 농도를 유지하는 역할을 맡고 있다고 생각되고 있다. FcRn의 IgG 분자에 대한 결합은, 통상, 엄격하게 pH에 의존적이고, 최적 결합은 7.0 미만의 산성 pH에 있어서 확인된다. 일례로서 인간 FcRn의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은, 각각 NM_004107.4 및 NP_004098.1(시그널 서열을 포함한다)에 기재된 전구체에서 유래해도 된다(괄호안은 RefSeq 등록 번호를 나타낸다.). 당해 전구체는, 생체 내에서 인간 β2-미크로글로불린과의 복합체를 형성한다. 따라서, 인간 β2-미크로글로불린과 복합체를 형성할 수 있는 가용형 인간 FcRn을 공지의 재조합 발현 수법을 이용하여 제조하여, 적절히, 각종 실험계에 사용해도 된다. 이와 같은 β2-미크로글로불린과 복합체를 형성 가능한 가용형 인간 FcRn을 이용하여, 항체 또는 Fc 영역 개변체의 FcRn에 대한 결합 활성이 평가되어도 된다. FcRn은, FcRn 결합 도메인에 결합할 수 있는 형태인 것이면 특별히 한정되지 않고, 인간 FcRn인 것이 바람직하다.

[0228] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서, 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체) 또는 그의 Fc 영역 개변체가 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 경우에는, 그것들은 「FcRn 결합 도메인」, 바람직하게는 인간 FcRn 결합 도메인을 갖는 것이 바람직하다. FcRn 결합 도메인은, 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)가 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서 FcRn에 대해서 결합 활성 또는 친화성을

갖고 있으면 특별히 한정되지 않고, 혹은, 직접 또는 간접적으로 FcRn에 대해서 결합 활성을 갖는 도메인이어도 된다. 그와 같은 도메인으로서는, 예를 들어, 직접적으로 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 IgG형 면역글로불린의 Fc 영역, 알부민, 알부민 domain3, 항FcRn 항체, 항FcRn 펩타이드, 항FcRn Scaffold 분자 등, 또는 간접적으로 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 IgG나 알부민에 결합하는 분자 등을 들 수 있지만 이것들로 한정되지 않는다. 또한, 예를 들어, 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서 FcRn 결합 활성을 갖는 도메인을 이용해도 된다. 당해 도메인은, 사전에 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서 FcRn 결합 활성을 갖고 있는 도메인이면 그대로 이용할 수도 있다. 당해 도메인이 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서 FcRn 결합 활성이 없거나 또는 약한 경우에는, 항체 또는 Fc 영역 개변체 내의 FcRn 결합 도메인 중의 아미노산 잔기를 개변하여, 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서의 FcRn 결합 활성을 얻어도 된다. 또한, 사전에 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서 FcRn 결합 활성을 갖고 있는 도메인 중의 아미노산을 개변하여, FcRn 결합 활성을 한층 더 높여도 된다. FcRn 결합 도메인의 아미노산 개변은, 아미노산 개변 전과 개변 후의 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서의 FcRn 결합 활성을 비교하는 것에 의해 목적하는 개변을 발견할 수 있다.

[0229] FcRn 결합 도메인은, 직접 FcRn과 결합하는 영역인 것이 바람직하다. FcRn 결합 영역의 바람직한 예로서, 항체의 정상 영역 또는 Fc 영역을 들 수 있다. 그렇지만, 알부민이나 IgG 등의 FcRn과의 결합 활성을 갖는 폴리펩타이드에 결합 가능한 영역은, 알부민이나 IgG 등을 개재하여 간접적으로 FcRn과 결합하는 것이 가능하다. 그 때문에, FcRn 결합 영역은, 알부민이나 IgG와의 결합 활성을 갖는 폴리펩타이드에 결합하는 영역이어도 된다. 한정은 되지 않지만, 혈장 중으로부터의 항원의 소실을 촉진하기 위해서는, FcRn 결합 도메인은, 중성 pH에 있어서의 FcRn 결합 활성이 높은 편이 바람직하고, 또한, 항체의 혈장 중의 체류성을 향상시키기 위해서는, FcRn 결합 도메인은, 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합 활성이 높은 편이 바람직하다. 예를 들어, 사전에, 중성 pH 또는 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합 활성이 높은 FcRn 결합 도메인을 선택하여 이용해도 되고, 혹은, 항체 또는 Fc 영역 중의 아미노산을 개변하여 중성 pH 또는 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합 활성을 부여해도 되고, 혹은, 중성 pH 또는 산성 pH에 있어서의 이미 존재하는 FcRn 결합 활성을 증대시켜도 된다.

[0230] 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체) 또는 Fc 영역(개변체)의 FcRn에 대한 결합 활성이, 개변되기 전의 항체 또는 Fc 영역(개변체)과 비교하여, 증대, (실질적으로) 유지, 또는 감소되었는지 여부는, 당업자에게 공지의 방법이면 특별히 한정되지 않고, 본 실시예에 기재된 방법을 이용해도 되고, 예를 들어, BIACORE, 스캐처드 플롯, 플로 사이토미터 등이 사용될 수 있다(WO2013/046722). 이들 어세이에는 인간 FcRn의 세포외 도메인이 가용성 항원으로서 이용되어도 된다. 항체 또는 Fc 영역(개변체)의 FcRn에 대한 결합 활성을 측정할 때의 pH 이외의 조건은 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하고, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, WO2009/125825에 기재된 바와 같이 MES 버퍼, 37℃의 조건에 있어서 측정하는 것이 가능하다. 항체 또는 Fc 영역(개변체)과 FcRn의 결합 활성의 측정은, 예를 들어, 항체를 고정화한 칩에 FcRn을 애널라이트로서 흐르게 하는 것 등으로 평가해도 된다.

[0231] 또한, 항체 또는 Fc 영역(개변체)의 FcRn에 대한 결합 활성은, KD(Dissociation constant: 해리 상수), 겉보기 KD(Apparent dissociation constant: 겉보기 해리 상수), 해리 속도인 kd(Dissociation rate: 해리 속도), 또는 겉보기 kd(Apparent dissociation: 겉보기 해리 속도) 등으로서 평가되어도 된다.

[0232] 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체) 또는 Fc 영역(개변체)에 포함되는 FcRn 결합 도메인과 FcRn의 결합 활성을 측정하는 pH의 조건은, 산성 pH 또는 중성 pH의 조건이 적절히 사용될 수 있다. 측정 조건에 사용되는 온도로서 FcRn 결합 도메인과 FcRn의 결합 활성(결합 친화성)은, 10℃～50℃의 임의의 온도에서 평가될 수 있다. 바람직하게는, 인간 FcRn 결합 도메인과 FcRn의 결합 활성(결합 친화성)을 결정하기 위해서, 15℃～40℃의 온도가 사용된다. 보다 바람직하게는, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35℃의 어느 하나와 같은 20℃에서 35℃까지의 임의의 온도도 마찬가지로, FcRn 결합 도메인과 FcRn의 결합 활성(결합 친화성)을 결정하기 위해서 사용되지만 이것들로 한정되지 않는다. 25℃라고 하는 온도는 비한정적인 일례이다.

[0233] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)의 아미노산 서열에 포함되는 아미노산은, 번역 후에 수식(예를 들어, N 말단의 글루타민의 파이로글루타밀화에 의한 파이로글루타민산으로의 수식은 당업자에게 잘 알려진 수식이다)을 받는 경우도 있지만, 그처럼 아미노산이 번역 후 수식되었을 경우에도, 본 개시에서 기재되는 아미노산 서열과 동등한 것으로서 당연히 포함된다.

[0234] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)는, 비단백질성 부분을 추가적으로 포함함으로써 추가로 유도체화되어 있어도 된다. 항체의 유도체화에 적합한 부

분(moiety)으로서는 예를 들어 수용성 폴리머를 들 수 있다. 수용성 폴리머의 예로서는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜이나 프로필렌 글리콜의 코폴리머, 카복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리바이닐 알코올, 폴리바이닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔레인, 폴리-1,3,6-트라이옥세인, 에틸렌/무수 말레산 코폴리머, 폴리아미노산(호모폴리머 또는 랜덤 코폴리머 모두), 덱스트란 또는 폴리(n-바이닐피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 호모폴리머, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 코폴리머, 폴리옥시에틸화 폴리올류(예를 들어 글리세롤), 폴리바이닐 알코올, 및 이들의 임의의 혼합물을 포함한다. 당해 부분(moiety)의 일례로서, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는, 그의 물에 대한 안정성 때문에 제조에 있어서 유리할 것이다. 폴리머는 어떠한 분자량이어도 되고, 분기하고 있어도 분기하고 있지 않아도 된다. 항체에 부가되는 폴리머의 수에는 폭이 있어도 되고, 1개 이상의 폴리머가 부가된다면 그것들은 동일한 분자여도 되고, 상이한 분자여도 된다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 폴리머의 수 및/또는 타입은, 예를 들어, 개선되어야 할 항체의 특정의 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정의 조건하에서의 요법에 사용되는지 여부 등을 고려하여 결정해도 된다.

[0235] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 또는 항CXCR2 항체)와, 방사선에 폭로하는 것에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질 부분의, 컨주게이트가 제공된다. 비단백질 부분은, 예를 들어 카본 나노튜브여도 된다(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605(2005)). 소망하는 목적을 달성하는 한 방사선은 어떠한 파장이어도 되고, 예를 들어, 통상의 세포에는 해를 주지 않지만 항체-비단백질 부분에 근접한 세포를 사멸시키는 온도까지 비단백질 부분을 가열하는 파장이어도 된다.

[0236] 본 개시에 있어서의 「IL-8」이란, 특별히 나타내지 않는 한, 모든 척추동물, 영장류(예를 들어 인간, 필리핀원숭이, 또는 히말라야원숭이), 또는 그 외의 포유류(예를 들어, 토끼 또는 개. 단, 마우스나 래트에게는 endogenous로는 IL-8은 존재하지 않는다.) 유래의 천연의 IL-8을 가리킨다. IL-8은, 전장의 IL-8, 생체 내에서 수식된 어떠한 형태의 IL-8, 천연에 존재하는 IL-8의 파생물, 예를 들어, 스플라이스 변이체나 알렐 변이체와 같은 것도 포함한다. 인간 IL-8의 아미노산 서열의 전형례를 서열 번호: 22에 나타낸다. 또한, 비한정적인 인간 IL-8의 아미노산 서열의 일례에 관하여, 인간 interleukin-8 precursor로서는 NCBI에 NP_000575.1로서 등록되어 있다. 또한, 비한정적인 필리핀원숭이 IL-8의 아미노산 서열의 일례로서는 NCBI에 XP_005555144.1로서 등록되어 있다.

[0237] CXCR1은 Interleukin 8 receptor, alpha, IL8RA 또는 CD181로서도 알려지고, 또한, CXCR2는 Interleukin 8 receptor, beta, 또는 IL8RB로서도 알려진, 케모카인 수용체이다. IL-8은, 수용체인 CXCR1, CXCR2와 결합함으로써 생리학적 작용이 생긴다는 것이 알려져 있다(Science. 1991;253:1278-80, Science. 1991;253:1280-3.). CXCR1은 IL-8 및 granulocyte chemotactic protein-2에 의해서만 활성화되고, CXCR2는 IL-8 외에 GROα, β, γ나 neutrophil-activating peptide, granulocyte chemotactic protein-2 등 복수의 분자에 결합하여 활성화된다는 것이 보고되어 있지만(Neuro-oncol. 2005;7:122-33), 현재까지 IL-8의 수용체는 CXCR1, CXCR2 이외에 보고되어 있지 않다. 본 실시예에 기재되는 바와 같이, 본 발명자들은, 호중구에 있어서 IL-8에 대한 유주능이 IL-8 중화 항체 및 CXCR2 저해제에 있어서도 마찬가지로 저해되는 것을 확인하고 있어, 본 실시예에서 기재한 자궁내막증이나, 유착, 자궁선근증에 대해서도, 항IL-8 항체에 한정하지 않고 CXCR1 저해제, CXCR2 저해제를 포함하는 IL-8 시그널 저해제가 유용하다는 것이 용이하게 예측된다.

[0238] 본 개시에 있어서의 「CXCR1」이란, 특별히 나타내지 않는 한, 모든 척추동물, 영장류(예를 들어 인간, 필리핀원숭이, 또는 히말라야원숭이), 또는 그 외의 포유류(예를 들어, 토끼 또는 개)에 존재하는 천연의 CXCR1을 가리킨다. CXCR1은, 전장의 CXCR1, 생체 내에서 수식된 어떠한 형태의 CXCR1, 천연에 존재하는 CXCR1의 파생물, 예를 들어, 스플라이스 변이체나 알렐 변이체와 같은 것도 포함한다. 비한정적인 인간 CXCR1의 아미노산 서열의 일례로서는 NCBI에 NP_000625.1로서 등록되어 있다.

[0239] 본 개시에 있어서의 「CXCR2」란, 특별히 나타내지 않는 한, 모든 척추동물, 영장류(예를 들어 인간, 필리핀원숭이, 또는 히말라야원숭이), 또는 그 외의 포유류(예를 들어, 토끼 또는 개)에 존재하는 천연의 CXCR2를 가리킨다. CXCR2는, 전장의 CXCR2, 생체내에서 수식된 어떠한 형태의 CXCR2, 천연에 존재하는 CXCR2의 파생물, 예를 들어, 스플라이스 변이체나 알렐 변이체와 같은 것도 포함한다. 비한정적인 인간 CXCR2의 아미노산 서열의 일례로서는 NCBI에 NP_001161770.1이나 NP_001548.1로서 등록되어 있다.

[0240] 단구, 매크로파지, 호중구, 림프구 등의 면역 세포, 피부 섬유아세포, 케라티노사이트, 혈관 내피 세포, 멜라노사이트, 간세포, 및 다종의 종양 세포주가 IL-8을 산생한다. IL-8은 강력한 호중구 케모카인이며, 호중구의 염증 부위로의 유주에 참여한다. 호중구의 표면 상에 존재하는 그의 고친화성 수용체(CXCR1 및 CXCR2)에 결합하

면, IL-8은, 탈과립을 촉진하여, 세포질 내의 유리 Ca^{2+} 농도를 상승시키는 것에 의해, 호중구를 활성화시킴과 함께, 호중구의 유주를 유도하여, 침윤된 조직을 파괴한다는 것이 보고되어 있다(WO2004/058797).

[0241] 본 실시예에 기재되는 바와 같이, 본 발명자들은, CXCR1 및 CXCR2가, 호중구, 단핵구, 매크로파지라고 하는 면역 세포, 자궁내막증 상피 세포, 및, 혈관 내피세포에서 발현되고 있지만, 스트로마 세포 및 근섬유아세포에서는 발현되고 있지 않다는 것을 발견했다. 더욱이, 자궁내막증 인간 환자로부터 채취하여 배양한 자궁내막증 유래의 스트로마 세포 및 근섬유아세포에 IL-8이나 항IL-8 항체를 첨가해도, 세포의 증식이나 위축 등의 변화는 전혀 보이지 않았다(data not shown).

[0242] 이들 결과는, Ulukus et al., Human Reproduction 2005 20(3):794-801에 있어서, CXCR1이 자궁내막증 조직의 상피, 스트로마, 섬유화된 부분에서 강발현되고 있다고 하는 보고와는 일치하지 않았다. Ulukus의 논문에서는, 전체적으로 염색 강도가 높았다. CXCR2에 있어서도 약양성이지만 혈관 내피세포와 함께 스트로마 세포도 염색되었다. 게다가, Iwabe et al., Fertility and Sterility 1998 69(5):924-930에 있어서, in vitro 실험으로 자궁내막증 환자 유래의 스트로마 세포의 증식이 IL-8에 의해 촉진되고 항IL-8 항체의 첨가에 의해 억제된 보고와는 일치하지 않았다. Iwabe의 논문에서는, 자궁내막증 인간 환자 유래 내막증 병변으로부터 상피 세포를 제거하여, 스트로마 세포로 한 후에, IL-8을 첨가하여 세포 증식을 조사하고 있지만, 20% 전후의 약한 반응이었다.

[0243] 다른 한편, 본 실시예에 기재되는 바와 같이, 본 발명자들은, 비인간 영장류 자궁내막증 모델에 있어서, 항체 H1009/L395-F1974m 투여라고 하는 IL-8 시그널 저해제의 투여에 의해 증식성을 나타내는 상피 세포 및 스트로마 세포의 위축성 변화가 보이는 것을 실증했다.

[0244] 이론에 구속되는 것을 의도하지 않지만, 일 측면에 있어서, Iwabe의 논문에서는, 세포 계대 후 곧바로 실험을 실시하고 있으므로, 면역 세포가 혼재하고 있을 가능성이 추정된다. CXCR1, CXCR2는 스트로마 세포에는 발현되고 있지 않으므로, CXCR1, CXCR2를 개재하는 IL-8 시그널은, 스트로마 세포를 표적으로 해서는 직접 작용하지 않고, 자궁내막 상피나 면역 세포를 직접적인 표적으로 하여 작용하고, 스트로마 세포에는 이들 자궁내막 상피나 면역 세포의 시그널을 개재하여 간접적으로 작용하고 있는 것이라고 생각되었다.

[0245] 본 개시에 있어서의 「IL-8 시그널 저해제」란, IL-8 시그널을 직접 또는 간접적으로, 부분적 또는 완전히 저해할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 핵산(예를 들어 siRNA 등의 이중쇄 핵산), 단백질(항체 또는 항체 단편을 포함한다), 펩타이드, 또는 그 이외의 화합물(예를 들어 저분자 화합물)이어도 된다. 어느 측면에 있어서, IL-8 시그널 저해제는 IL-8 저해제, CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제이면 되고, 이러한 경우, 그것들은, 예를 들어, 핵산(예를 들어 siRNA 등의 이중쇄 핵산), 단백질(항체 또는 항체 단편을 포함하고, 보다 구체적으로는, 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체, 항CXCR2 항체, 또는 그들의 기능을 부분적 또는 완전히 유지한 항체 단편이어도 된다.), 펩타이드, 또는 그 이외의 화합물(예를 들어 저분자 화합물)이어도 된다.

[0246] IL-8 시그널 저해제가 IL-8의 그 수용체인 CXCR1 및/또는 CXCR2에 대한 결합을 부분적 또는 완전히 저해시키는 경우에는, IL-8의 저해에 의해, 저해 없이 IL-8이 그 수용체에 결합했을 때에 생기는 정상적인 레벨 또는 종류의 활성이 저하 또는 변화되는 것이 바람직하다. 그 저하 또는 변화는, 예를 들어, IL-8 유도성 엘라스타제 방출 또는 칼슘 유속의 저해, IL-8 유도성의 CD11b(Mac-1) 발현 증가의 저해, 또는 L-셀렉틴 발현 감소의 저해 등으로서 관찰해도 된다. 이와 같은 저해는, IL-8 시그널 저해제 비존재하와 비교했을 경우에, 적어도, 예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 전술한 레벨 또는 종류의 활성의 저하 또는 변화를 포함한다.

[0247] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 CXCR1 저해제는, CXCR1에 결합하지(특이적이지)만 CXCR2에는 결합하지 않는 것이어도 되고, CXCR1과 CXCR2의 양방에 결합하는(특이적인) 것(CXCR1/CXCR2 저해제라고도 한다)이어도 된다.

[0248] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 CXCR2 저해제는, CXCR2에 결합하지(특이적이지)만 CXCR1에는 결합하지 않는 것이어도 되고, CXCR1과 CXCR2의 양방에 결합하는(특이적인) 것(CXCR1/CXCR2 저해제)이어도 된다.

[0249] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 CXCR1 저해제 및/또는 CXCR2 저해제의 구체예로서는, WO2010/056753에 개시되는 항CXCR1 항체, 또는 레파르탁신(Repartaxin) 또는 레파르탁신 유도체; WO2011/042466에 개시되는 CXCR1 및/또는 CXCR2 저해약; WO2005/113534나 WO2003/057676에 개시되는 CXCR1 또는 CXCR2 케모카인 안타고니스트; WO2012/062713 및 WO2013/168108에 개시되는 CXCR2 결합 폴리펩타이드; WO2008/061740, WO2008/061741,

WO2008/062026, WO2009/106539, WO2010/015613 및 WO2013/030803에 개시되는 CXCR2 저해제를 들 수 있다.

[0250] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 저해제의 구체예로서는, JP2006-117633A에 기재되는 IL-8 모방제; JP2013-180992A(또는 JP5496232B)에 개시되는 IL-8 발현 억제제; JPH9-2954A(또는 JP3008010B)에 개시되는 IL-8 산생 억제제; WO1998/037200에 개시되는 항체 프래그먼트-폴리머 복합체; WO1995/023865, WO2009/026117, WO2013/166099, WO2006/113643, WO2004/058797, WO2008/130969, WO2011/100271, WO98/58671, WO2014/149733, US2003/0077283 A1 등에 개시되는 항IL-8 항체, IL-8을 포함하는 항원에 결합하는 다중특이성 항체, 또는 이들의 개변체의 어느 것이어도 된다. 추가적인 다른 실시태양에 있어서, 이들 항IL-8 항체의 개변체로서는, 고기능 항IL-8 항체로서 기재되는 후술하는 특징의 1개 또는 복수가 추가로 부여되어 있어도 된다.

[0251] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 「항IL-8 항체」 또는 「IL-8에 결합하는 항체」란, 충분한 친화성으로 IL-8과 결합할 수 있는 항체이며, 그 결과, 그 항체가 IL-8을 표적으로 하는 것에 의해, 검출용, 진단용, 치료용, 및/또는 예방용 조성물로서 유용한 항체를 가리킨다.

[0252] 일 실시태양에 있어서, 비특이적인 무관계의 비IL-8 단백질에 대한 항IL-8 항체의 결합의 정도는, IL-8에 대한 항체의 결합의 정도의 예를 들어 10% 미만이어도 된다.

[0253] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, IL-8의 중화 활성을 갖는다. IL-8의 중화 활성이란, IL-8이 나타내는 생물학적 활성을 저해하는 활성을 가리켜도 되고, IL-8이 그 수용체(CXCR1 또는 CXCR2)에 결합하는 것을 저해하는 활성을 가리켜도 된다.

[0254] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체여도 된다.

[0255] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, IL-8을 내재적으로 갖는 동물(예를 들어 토끼)과 교차성을 갖는 것이 바람직하고, 더욱이, 경우에 따라, 항영장류 IL-8 항체(바람직하게는 인간과 마찬가지의 월경을 갖는, 예를 들어, 필리핀원숭이 또는 비비 등에 대한 항비인간 영장류 IL-8 항체 또는 항인간 IL-8 항체(예를 들어 항인간 IL-8 중화 항체)인 것이 보다 바람직하다.

[0256] 본 연구자들은, 한정은 되지 않지만, 본 실시예에 구현되는 바와 같이, 항체(예를 들어 항IL-8 항체, 항CXCR1 항체 또는 항CXCR2 항체)에 고기능을 부가할 수 있는 아미노산 개변 기술을 발견하여, 그것에 기초하여 고기능 항IL-8 항체에 상도 했지만, 그의 비한정적인 일례를 이하에 나타낸다:

[0257] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는 IL-8에 대해서 pH 의존적인 친화성을 가져도 되는 항IL-8 항체일 수 있고, 예를 들어, 당해 항IL-8 항체는 이하 (a) 내지 (f)의 아미노산 서열에 있어서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 또는 8개 이상의 아미노산의 치환을 포함하는 서열을 포함한다:

[0258] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0259] (b) 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0260] (c) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0261] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0262] (e) 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0263] (f) 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0264] 아미노산은, 특별한 지정이 없는 한, 다른 어떠한 아미노산으로 치환되어도 된다. 추가적인 실시태양에 있어서, 본 개시의 이러한 항IL-8 항체는, 이하의 위치로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에서의 다른 아미노산으로의 치환, 또는, 당해 위치에서의 하기에서 지정하는 아미노산으로의 치환을 각각 적어도 추가로 포함해도 된다:

[0265] (1) 서열 번호: 26의 서열의 8위의 세린, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴과 5위의 류신, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민;

[0266] (2) 서열 번호: 24의 서열의 6위의 알라닌의 아스파라긴산으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 및, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환;

[0267] (3) 서열 번호: 24의 서열의 8위의 글리신의 티로신으로의 치환과, 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환;

[0268] (4) 서열 번호: 24의 서열의 6위의 알라닌의 아스파라긴산으로의 치환, 8위의 글리신의 티로신으로의 치환, 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 및, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환;

[0269] (5) 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환;

[0270] (6) 서열 번호: 26의 서열의 8위의 세린의 글루타민산으로의 치환, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환;

[0271] (7) 서열 번호: 24의 서열의 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환; 및,

[0272] (8) 서열 번호: 24의 서열의 6위의 알라닌의 아스파라긴산으로의 치환, 8위의 글리신의 티로신으로의 치환, 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환.

[0273] 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8에 대해서 pH 의존적인 친화성을 가져도 되는 항IL-8 항체는, 이하로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1개 또는 임의의 복수의 아미노산 서열을 포함한다:

[0274] (a) 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-H1;

[0275] (b) 서열 번호: 24 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-H2;

[0276] (c) 서열 번호: 25 또는 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-H3;

[0277] (d) 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 또는, 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-L1;

[0278] (e) 서열 번호: 27, 31, 또는, 107의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 또는, 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-L2; 및,

[0279] (f) 서열 번호: 28 또는 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 또는, 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-L3.

[0280] 여기에서, 참조 아미노산 서열과 특정 %의 서열 동일성을 갖는 HVR은, 참조 아미노산 서열을 갖는 HVR과 기능적으로 동등할 수 있다. 또한, 예를 들어, 당해 항IL-8 항체는, 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함해도 되고, 및/또는, 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함해도 된다. 더욱이, 당해 항IL-8 항체는, 이하의 위치로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에서의 다른 아미노산으로의 치환, 또는 당해 위치에서의 하기에 지정하는 아미노산으로의 치환을 각각 적어도 추가로 포함해도 된다:

[0281] (1) 서열 번호: 26의 서열의 8위의 세린, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴과 5위의 류신, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민;

[0282] (2) 서열 번호: 24의 서열의 6위의 알라닌의 아스파라긴산으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 및, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환;

[0283] (3) 서열 번호: 24의 서열의 8위의 글리신의 티로신으로의 치환과, 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환;

[0284] (4) 서열 번호: 24의 서열의 6위의 알라닌의 아스파라긴산으로의 치환, 8위의 글리신의 티로신으로의 치환, 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 및, 서열 번호: 25의 서열의 3위의

티로신의 히스티딘으로의 치환;

[0285] (5) 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환;

[0286] (6) 서열 번호: 26의 서열의 8위의 세린의 글루타민산으로의 치환, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환;

[0287] (7) 서열 번호: 24의 서열의 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환; 및,

[0288] (8) 서열 번호: 24의 서열의 6위의 알라닌의 아스파라긴산으로의 치환, 8위의 글리신의 티로신으로의 치환, 9위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 11위의 아르기닌의 프롤린으로의 치환, 서열 번호: 25의 서열의 3위의 티로신의 히스티딘으로의 치환, 서열 번호: 27의 서열의 1위의 아스파라긴의 리신으로의 치환, 5위의 류신의 히스티딘으로의 치환, 및, 서열 번호: 28의 서열의 1위의 글루타민의 리신으로의 치환.

[0289] 여기에 기재되는, 상정되는 모든 아미노산 서열의 조합을 당연히 당업자는 이해한다.

[0290] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 「기능적으로 동등」이란, 특별히 지정되지 않는 한, 참조 아미노산 서열을 포함하는 항체가 갖는, 물리화학적 특성 및/또는 생물학적 활성 등으로 표시되는 기능(예를 들어 항원 결합성 또는 혈중 체류성 등의 임의의 하나 이상의 지표 또는 특성에 주목해도 된다)과 비교하여, 당업자 공지의 방법으로 측정했을 경우에, 적어도 50% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상)의 기능을 유지하고 있는 것을 의도한다.

[0291] 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8에 대해서 pH 의존적인 친화성을 가져도 되는 항IL-8 항체는, 이하로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1개 또는 임의의 복수의 아미노산 서열을 포함한다:

[0292] (A) 서열 번호: 33, 34, 또는 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및,

[0293] (B) 서열 번호: 35 또는 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역.

[0294] 여기에서, 참조 아미노산 서열과 특정 %의 서열 동일성을 갖는 가변 영역은, 참조 아미노산 서열을 갖는 가변 영역과 기능적으로 동등할 수 있다. 또한, 예를 들어, 당해 항IL-8 항체는, 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함해도 되고, 이러한 항체는 생체내(예를 들어 혈장 중)에서 IL-8 중화 활성이 안정되게 유지되므로 유리할 수 있고, 또는 면역원성이 낮으므로 유리할 수 있다. 더욱이, 당해 항IL-8 항체가 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 개변체를 포함하는 경우에는, 당해 항체는 이하의 위치로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 위치에서의 다른 아미노산으로의 치환, 또는, 당해 위치에서의 하기에 지정되는 아미노산으로의 치환을 적어도 추가로 포함해도 된다:

[0295] (i) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 55위의 알라닌의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 아스파라긴산으로의 치환;

[0296] (ii) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 57위의 글리신의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 티로신으로의 치환;

[0297] (iii) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 58위의 티로신의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 히스티딘으로의 치환;

[0298] (iv) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 60위의 아르기닌의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 프롤린으로의 치환;

[0299] (v) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 84위의 글루타민의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 트레오닌으로의 치환;

[0300] (vi) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 87위의 세린의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 아스파라긴산으로의 치환; 및

[0301] (vii) 서열 번호: 33의 아미노산 서열의 103위의 티로신의 다른 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 히스티딘으로의 치환.

[0302] 여기에 기재되는, 상정되는 모든 아미노산 서열의 조합을 당연히 당업자는 이해한다.

[0303] 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 이하의 (1)~(7)에 각각 기재되는 (a) 내지 (f)의 아미노산 서열의 적어도 1개 이상~6개를 포함하는 항체이거나, 또는, 각각 기재되는 (a) 내지 (f) 중 어느 것인가 적어도 1개 이상의 아미노산 서열에 있어서 적어도 1개의 아미노산의 치환을 포함하는 항체여도 된다. 당해 항체는, IL-8에 pH 의존적인 친화성을 갖는, 항IL-8 항체여도 된다. 아미노산은, 특별한 지정이 없는 한, 다른 어떠한 아미노산으로 치환되어도 된다.

[0304] (1) (a) 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0305] (b) 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0306] (c) 서열 번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0307] (d) 서열 번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0308] (e) 서열 번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0309] (f) 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0310] (2) (a) 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0311] (b) 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0312] (c) 서열 번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0313] (d) 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0314] (e) 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0315] (f) 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0316] (3) (a) 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0317] (b) 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0318] (c) 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0319] (d) 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0320] (e) 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0321] (f) 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0322] (4) (a) 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0323] (b) 서열 번호: 77의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0324] (c) 서열 번호: 78의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0325] (d) 서열 번호: 79의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0326] (e) 서열 번호: 80의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0327] (f) 서열 번호: 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0328] (5) (a) 서열 번호: 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0329] (b) 서열 번호: 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0330] (c) 서열 번호: 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0331] (d) 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0332] (e) 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0333] (f) 서열 번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0334] (6) (a) 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0335] (b) 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0336] (c) 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0337] (d) 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0338] (e) 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0339] (f) 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0340] (7) (a) 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0341] (b) 서열 번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,

[0342] (c) 서열 번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,

[0343] (d) 서열 번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0344] (e) 서열 번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0345] (f) 서열 번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0346] 본 명세서에 있어서 「산성 pH」란, 예를 들어 pH 4.0 내지 pH 6.5의 사이로부터 선택될 수 있는 pH를 가리킨다. 일 실시태양에 있어서, pH 4.0, pH 4.1, pH 4.2, pH 4.3, pH 4.4, pH 4.5, pH 4.6, pH 4.7, pH 4.8, pH 4.9, pH 5.0, pH 5.1, pH 5.2, pH 5.3, pH 5.4, pH 5.5, pH 5.6, pH 5.7, pH 5.8, pH 5.9, pH 6.0, pH 6.1, pH 6.2, pH 6.3, pH 6.4, 또는 pH 6.5를 가리키지만 이것들로 한정되지 않는다.

[0347] 본 명세서에 있어서 「중성 pH」란, 예를 들어 pH 6.7 내지 pH 10.0의 사이로부터 선택될 수 있는 pH를 가리킨다. 일 실시태양에 있어서, 예를 들어 pH 6.7, pH 6.8, pH 6.9, pH 7.0, pH 7.1, pH 7.2, pH 7.3, pH 7.4, pH 7.5, pH 7.6, pH 7.7, pH 7.8, pH 7.9, pH 8.0, pH 8.1, pH 8.2, pH 8.3, pH 8.4, pH 8.5, pH 8.6, pH 8.7, pH 8.8, pH 8.9, pH 9.0, pH 9.5, 또는 pH 10.0을 가리키지만 이것들로 한정되지 않는다.

[0348] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는 항IL-8 항체이다. 본 개시에 있어서의 일 측면에 있어서, pH 의존적으로 IL-8에 결합하는 항IL-8 항체라는 것은, 중성 pH에서의 IL-8에 대한 결합 친화성에 비해, 산성 pH에서의 IL-8에 대한 결합 친화성이 감소되어 있는 항체를 가리킨다. 예를 들어, pH 의존적인 항IL-8 항체에는, 산성 pH에 있어서보다 중성 pH에 있어서 쪽이 IL-8에 대해서 높은 친화성을 갖는 항체가 포함된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, IL-8에 대해서 산성 pH에 있어서의 친화성보다 중성 pH에 있어서의 친화성 쪽이, 적어도 2배, 3배, 5배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 55배, 60배, 65배, 70배, 75배, 80배, 85배, 90배, 95배, 100배, 200배, 400배, 1000배, 10000배, 또는 그 이상 높다. 결합 친화성을 측정하기 위해서, 한정은 되지 않지만, 표면 플라즈몬 공명법(BIACORE 등)이 이용될 수 있다. 결합 속도 상수(kon)와 해리 속도 상수(koff)는, 결합 및 해리의 센서그램을 동시에 피팅시키는 것에 의한 단순 일대일 랭뮤어 결합 모델(simple one-to-one Langmuir binding model) Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)를 이용하여 산출할 수 있다. 평형 해리 상수(KD)는, koff/kon비로서 산출된다. pH에 따라 결합 친화성이 상이한 항체를 스크리닝하기 위해서는, 특별히 한정은 되지 않지만, 표면 플라즈몬 공명법(BIACORE 등) 외에도, ELISA법이나 결합 평형 제외법(Kinetic Exclusion Assay; KinExA™) 등을 이용할 수도 있다. pH 의존적 IL-8 결합능이란, pH 의존적으로 IL-8에 결합한다고 하는 성질을 의미한다. 또한, 항체가 IL-8에 복수회 결합 가능한지 여부는, WO2009/125825에 기재된 방법에 의해 판단하는 것이 가능하다.

[0349] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 중성 pH(예를 들어 pH 7.4)에 있어서의 IL-8에 대한 해리 상수(KD)가 작은 것이 바람직하다. 예를 들어, 당해 항체는, 중성 pH(예를 들어 pH 7.4)에 있어서의 IL-8

에 대한 해리 상수가 0.3nM 이하, 0.1nM 이하, 또는 0.03nM 이하여도 된다.

[0350] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 산성 pH(예를 들어 pH 5.8)에 있어서의 IL-8에 대한 해리 상수(KD)가 큰 것이 바람직하다. 예를 들어, 당해 항체는, 산성 pH(예를 들어 pH 5.8)에 있어서의 IL-8에 대한 해리 상수가 3nM 이상, 10nM 이상, 또는 30nM 이상이어도 된다.

[0351] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 중성 pH(예를 들어 pH 7.4)에 있어서의 해리 상수에 대한 산성 pH(예를 들어 pH 5.8)에 있어서의 해리 상수의 비〔KD(산성 pH) /KD(중성 pH)〕(예를 들어, 〔KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)〕)가, 예를 들어 30 이상, 50 이상, 또는 예를 들어 100 이상, 예를 들어 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 또는 9500 이상이다.

[0352] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 산성 pH(예를 들어 pH 5.8)에 있어서의 해리 속도 상수(koff)가 큰 것이 바람직하다. 예를 들어, 당해 항체의 산성 pH(예를 들어 pH 5.8)에 있어서의 해리 속도 상수는, 예를 들어 0.003(1/s) 이상, 0.005(1/s) 이상, 또는, 0.01(1/s) 이상이어도 된다.

[0353] WO2013/046704에는 산성 pH하에 있어서의 FcRn에 대한 결합을 증대시키는 변이와 함께, 소정의 변이(대표적인 것으로서, EU 넘버링으로 표시되는, Q438R/S440E라고 하는 2잔기 개변)도 아울러 도입한 Fc 영역 개변체가, 류마토이드 인자 결합의 유의한 저하를 나타낸 것을 보고하고 있다. 그렇지만, WO2013/046704에는, Q438R/S440E의 개변에 의해 류마토이드 인자 결합을 저하시킨 Fc 영역 개변체가, 천연형 Fc 영역을 갖는 항체와 비교하여 혈장 중 체류성이 우수한 것까지는 나타나지는 않았다. 그 때문에, 기존의 ADA에 대한 결합을 나타내지 않고, 혈장 중 체류성을 더욱 향상시킬 수 있는, 안전하고 보다 유리한 Fc 영역 개변체가 요망되고 있었다. 본 연구자들은, 항의약품 항체(기존의 ADA 등)에 대한 결합을 나타내지 않고, 혈장 중 체류성을 더욱 향상시킬 수 있는, 안전하고 보다 유리한 Fc 영역 개변체로서, EU 넘버링으로 표시되는 434위의 아미노산을 Ala(A)로 치환시키고, 또한, 소정의 2잔기 변이(대표적인 것으로서, Q438R/S440E)를 아미노산 잔기의 변이의 조합으로서 포함하는 Fc 영역 개변체가 바람직하다는 것에 상도했다.

[0354] 따라서, 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, FcRn 결합 도메인을 포함하는 Fc 영역 개변체를 포함하고, 상기 FcRn 결합 도메인은, 예를 들어, 천연형 Fc 영역과 비교하여, EU 넘버링으로 표시되는, 434위에 Ala; 438위에 Glu, Arg, Ser 또는 Lys; 및, 440위에 Glu, Asp 또는 Gln을 포함하는 Fc 영역 개변체여도 된다. 당해 항IL-8 항체는, 산성 pH 및 중성 pH, 특히는 산성 pH에 있어서 FcRn 결합 활성이 증대된 FcRn 결합 도메인일 수 있다. 혹은, 당해 항체는, 그 FcRn 결합 도메인이, EU 넘버링으로 표시되는, 434위에 Ala; 438위에 Glu, Arg, Ser 또는 Lys; 및, 440위에 Glu, Asp 또는 Gln을 포함하는, Fc 영역 개변체를 포함하는 것이 바람직하고, 434위에 Ala; 438위에 Arg 또는 Lys; 및, 440위에 Glu 또는 Asp를 포함하는 것이 보다 바람직하다. 혹은, 추가로, EU 넘버링으로 표시되는, 428위에 Ile 또는 Leu; 및/또는, 436위에 Ile, Leu, Val, Thr 또는 Phe를 포함하는 것이 바람직하고, 428위에 Leu; 및/또는, 436위에 Val 또는 Thr를 포함하는 것이 보다 바람직하다.

[0355] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체는, 천연형 Ig항체의 Fc 영역 개변체인 것이 바람직하고, 천연형의 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 또는, IgG4형) 항체의 Fc 영역 개변체인 것이 보다 바람직하고, 천연형의 인간의 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4에서 유래하는 것이 더 바람직하다. 예를 들어, 그것은, 인간 IgG1 유래여도 된다.

[0356] 천연형의 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4형의 항체의 Fc 영역 중, 전술한 개변 부위인, EU 넘버링으로 표시되는, 428위, 434위, 436위, 438위, 440위에 있어서는, 436위 이외에는, 천연형의 인간의 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 타입의 항체의 Fc 영역에서 모두 공통되고 있다. 한편, 436위에서는, 천연형의 인간의 IgG1, IgG2, IgG4형의 항체의 Fc 영역에서는 모두 Tyr(Y)이지만, 천연형의 인간 IgG3형의 항체의 Fc 영역에서는 Phe(F)이다. 그렇지만, Stapleton et al., Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential, Nature Communications, 2011, Dec, number 599는, EU 넘버링으로 표시되는 R435H의 아미노산 치환을 갖는 인간 IgG3 알로타입이, IgG1에 필적하는 혈장 중 반감기를 인간에서 나타낸 것을 보고하고 있다. 따라서, 436위의 아미노산 치환에 더하여, R435H의 아미노산 치환을 도입함으로써, 산성 조건하에 있어서의 FcRn에 대한 결합을 증대시켜, 혈장 중 체류성을 향상시키는 것도 가능하다.

[0357] 또한, WO2013/046704에서는, 산성 pH하에서의 FcRn에 대한 결합을 증대시키는 것이 가능한 아미노산의 치환과 조합한 경우에, 류마토이드 인자 결합의 유의한 저하를 가져올 수 있었던 2잔기의 아미노산의 치환으로서, 구체

적으로, EU 넘버링으로 표시되는, Q438R/S440E, Q438R/S440D, Q438K/S440E, Q438K/S440D를 보고하고 있다.

[0358] 따라서, 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체의 아미노산 서열은, 천연형 Fc 영역과 비교하여, FcRn 결합 도메인이, EU 넘버링으로 표시되는,

[0359] N434A/Q438R/S440E; N434A/Q438R/S440D;

[0360] N434A/Q438K/S440E; N434A/Q438K/S440D;

[0361] N434A/Y436T/Q438R/S440E; N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0362] N434A/Y436T/Q438K/S440E; N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0363] N434A/Y436V/Q438R/S440E; N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0364] N434A/Y436V/Q438K/S440E; N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0365] N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;

[0366] N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E; N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;

[0367] N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E; N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;

[0368] N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E; N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;

[0369] M428L/N434A/Q438R/S440E; M428L/N434A/ Q438R/S440D;

[0370] M428L/N434A/Q438K/S440E; M428L/N434A/ Q438K/S440D;

[0371] M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;

[0372] M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E; M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;

[0373] M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;

[0374] M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E; 및, M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;

[0375] L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; 및,

[0376] L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E

[0377] 로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 치환된 아미노산의 조합을 포함해도 된다.

[0378] 혹은 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체는, 천연형 Fc 영역과 비교하여, EU 넘버링으로 표시되는, 235위, 236위, 239위, 327위, 330위, 331위, 428위, 434위, 436위, 438위, 및 440위로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1개 이상(예를 들어, 6개, 7개 또는 모두)의 위치에서 다른 아미노산으로의 치환을 포함해도 되고, 예를 들어, L235R, G236R, S239K, A327G, A330S, P331S, M428L, N434A, Y436T, Q438R, 및 S440E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 1개 이상(예를 들어, 6개, 7개 또는 모두) 포함해도 된다.

[0379] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체는, 천연형 IgG의 Fc 영역과 비교하여, 산성 pH하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 증대되고 있는 것이 바람직하다.

[0380] 어느 pH하에서의 FcRn에 대한 FcRn 결합 도메인의 결합 친화성의 증대는, 천연형의 FcRn 결합 도메인에 대해 측정된 FcRn 결합 친화성과 비교한, 측정된 FcRn 결합 친화성의 증대에 상당해도 된다. 이러한 경우, 결합 친화성의 차이인 KD(천연형 Fc 영역)/KD(본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체)는, 적어도 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배, 20배, 50배, 70배, 80배, 100배, 500배, 또는 1000배여도 된다. FcRn에 대한 FcRn 결합 도메인의 결합 친화성의 증대는, 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서의 것이어도 되지만, 특히는 산성 pH하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 증대되고 있는 것이 바람직하다.

[0381] 또한, 산성 pH하에서 FcRn에 대한 결합 친화성이 증대되고 있는 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체는, 천연형의 IgG의 Fc 영역보다 FcRn에 대한 결합 친화성이, 예를 들어 pH 6.0 및 25℃에 있어서, 예를 들어, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 50배, 75배, 100배, 200배, 500배, 1000배 이상 강해도 된다.

[0382] 본 명세서에 있어서 「항의약품 항체」 또는 「ADA」란, 치료용 항체 상에 위치하는 에피토프에 대한 결합 친화성(결합 활성)을 가져, 따라서 당해 치료용 항체와 결합할 수 있는 내인성 항체를 의미한다. 본 명세서에 있어서 「기존의 항의약품 항체」 또는 「기존의 ADA」란, 치료용 항체를 환자에게 투여하기 이전부터 환자의 혈중에 존재하여, 검출될 수 있는 항의약품 항체를 의미한다. 일 실시태양에 있어서, 기존의 ADA는 류마토이드 인자, 인간 IgG 항체의 Fc 영역에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 자기 항체이다. 류마토이드 인자의 에피토프는 CH2/CH3 계면 영역 및 CH3 도메인 중에 위치하지만, 클론에 따라 다를 수 있다. 기존의 ADA에 대한 결합 친화성이 낮은 Fc 영역 개변체란, 천연형의 IgG Fc 영역을 포함하는 항체의 ADA에 대한 결합 친화성과 비교하여, 예를 들어, 10분의 1 이하, 50분의 1 이하, 또는 100분의 1 이하로 저하되어 있어도 된다.

[0383] 일 실시태양에 있어서, 기존의 ADA에 대한 항체의 Fc 영역(개변체)의 결합 친화성은, 산성 pH 및/또는 중성 pH에 있어서의 전기화학발광(ECL) 반응으로 나타날 수 있다; 그렇지만, 당업자에게 공지인, 기존의 ADA에 대한 결합 친화성을 결정하기 위한 다른 적절한 방법을 이용해도 된다. ECL 어세이는 예를 들어, Moxness et al(Clin Chem, 2005, 51:1983-85)이나 본 실시예에 기재되어 있다. 측정은, 예를 들어, MES 버퍼 및 37℃의 조건하에서 행할 수 있다. 항체의 항원 결합 활성은, 예를 들어, Biacore를 이용해도 된다. 일 실시태양에 있어서, 기존의 ADA에 대한 결합 친화성은, 10℃～50℃의 임의의 온도에서 평가할 수 있다. 바람직하게는, 인간 Fc 영역과 인간의 기존의 ADA 사이의 결합 활성을 결정하기 위해서, 15℃～40℃의 온도가 사용된다. 당해 온도는 바람직하게는 20℃～25℃이며, 보다 바람직하게는 25℃이다. pH 7.4(또는 pH 7.0), 25℃에서 측정해도 된다.

[0384] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체는, 천연형 IgG의 Fc 영역과 비교하여, 중성 pH하에서 기존의 ADA, 바람직하게는 류마토이드 인자(RF)에 대한 결합 친화성이 유의하게 증대되지 않고, 및/또는, 산성 pH하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 증대되고 있음으로써, 혈장 중 클리어런스(CL)가 감소되고 있거나, 혈장 중 체류 시간이 증대되고 있거나, 또는, 혈장 중 반감기(t1/2)가 증대되고 있는 것이 바람직하다. 항체의 혈장 중 클리어런스(CL), 혈장 중 체류 시간, 혈장 중 반감기(t1/2)가 서로 상관하고 있는 것은 당업자에게 공지이다.

[0385] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체 중의 Fc 영역 개변체는, EU 넘버링으로 표시되는, N434Y/Y436V/Q438R/S440E의 치환된 아미노산의 조합을 포함하는 참조 Fc 영역 개변체와 비교하여, 혈장 중 체류성이 향상되고 있다.

[0386] 본 실시예 1～3에서는, WO2013/046704에 기재된 F1718이라고 하는 Fc 영역 개변체(Fc 영역에 N434Y/Y436V/Q438R/S440E라고 하는 4개소의 변이가 도입되고 있다.)와 Fc 영역 개변체 F1848m(N434A/Y436V/Q438R/S440E라고 하는 4개소의 변이가 도입되고 있다.)의 2개의 Fc 영역 개변체의 혈장 중 체류성이 비교되고 있다. 양자의 Fc 영역 개변체의 아미노산 변이의 차이는, EU 넘버링 434번에 도입되고 있는 아미노산 변이가, F1718은 Y(티로신)이며, F1848m은 A(알라닌)라고 하는 점뿐이었다. 그럼에도 불구하고, F1848m은 천연형 IgG1의 경우에 비해 혈장 중 체류성의 향상이 인정된 한편으로, F1718은 혈장 중 체류성의 향상이 인정되지 않았다(특히, 본 실시예 (3-2)를 참조). 또한, 본 실시예 (1-2) 및 본 실시예 (3-3)의 결과로부터, 각종 Fc 영역 개변체 중, F1848m보다, F1847m, F1886m, F1889m, F1927m이 혈장 중 체류성의 향상이 인정되었다. 따라서, F1848m뿐만 아니라, F1847m, F1886m, F1889m, F1927m을 포함하는 Fc 영역 개변체는, EU 넘버링으로 표시되는, N434Y/Y436V/Q438R/S440E의 치환된 아미노산의 조합을 포함하는 당해 참조 Fc 영역 개변체와 비교하여, 혈장 중 체류성이 향상되어 있는 것을 당업자이면 당연히 예기할 수 있다.

[0387] 혈중 반감기가 상승되고, 산성 pH에서의 FcRn에 대한 결합이 향상된 항체는, US2005/0014934(Hinton et al.)에도 기재되어 있다. 당해 항체는, Fc 영역의 FcRn에 대한 결합이 상승되는 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역 개변체를 포함하고, 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 및 434위(EU 넘버링) 중에서 선택되는 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 434위의 아미노산 치환을 포함해도 된다. Fc 영역 개변체의 그 외의 예에 대해서는, Duncan & Winter, Nature 322:738-40(1988); US Patent No. 5,648,260; US Patent No. 5,624,821; WO 94/29351을 참조한다. 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체의 Fc 영역(개변체)에는, 적절히, 이들 아미노산 잔기의 개변을 도입시켜도 된다.

[0388] FcγR 또는 보체 단백질에 대한 결합도 또한, 바람직하지 않은 영향(예를 들어, 부적절한 혈소판 활성화)을 야기할 수 있다. FcγRIIa 수용체 등의 이펙터 수용체에 결합하지 않는 Fc 영역 개변체는, 보다 안전하고, 또한/또는 보다 유효할 수 있다.

[0389] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 Fc 영역 개변체를 포함하는 항IL-8 항체는, 보체 단백질에 대해서

결합 활성이 낮거나 또는 보체 단백질에 결합하지 않는다. 바람직하게는, 보체 단백질은 C1q이다. 보체 단백질에 대한 낮은 결합 활성이란, 천연형의 IgG 또는 천연형의 IgG Fc 영역을 포함하는 항체의 보체 단백질에 대한 결합 활성과 비교하여, 예를 들어, 10분의 1 이하, 50분의 1 이하, 또는 100분의 1 이하로 저하되어 있는, 보체 단백질에 대한 결합 활성을 가리켜도 된다. 보체 단백질에 대한 Fc 영역(개변체)의 결합 활성은, 아미노산 치환, 삽입, 결실 등의 아미노산 서열의 개변에 의해 저하시킬 수 있다.

[0390] 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 Fc 영역 개변체를 포함하는 항IL-8 항체는, 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성이 낮거나 또는 결합 친화성을 갖지 않는 것이 바람직하다. 이펙터 수용체의 예에는, 활성화 FcγR, 특히 FcγRI, FcγRII, FcγRIII이 포함된다. FcγRI에는, 예를 들어, FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, 및 이들의 아류형이 포함된다. FcγRII에는, 예를 들어, FcγRIIa(2개의 알로타입 R131, H131) 및 FcγRIIb가 포함된다. FcγRIII에는, 예를 들어, FcγRIIIa(2개의 알로타입 V158, F158) 및 FcγRIIIb(2개의 알로타입 FcγIIIb-NA1, FcγIIIb-NA2)가 포함된다. 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성이 낮거나 또는 갖지 않는 항체는, 천연형의 IgG Fc 영역을 포함하는 항체의 결합 친화성과 비교하여, 예를 들어, 10분의 1 이하, 50분의 1 이하, 또는 100분의 1 이하로 저하되어 있는 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체를 가리켜도 된다. 구체예로서는, 예를 들어, 사일런트 Fc 영역을 포함하는 항체, 또는 Fc 영역을 포함하지 않는 항체(예를 들어, Fab, $F(ab)'_2$, scFv, $sc(Fv)_2$, diabody)를 들 수 있다.

[0391] 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성이 낮거나 또는 갖지 않는 Fc 영역 개변체의 예는, Strohl et al.(Current Opinion in Biotechnology (2009) 20(6), 685-691)에 기재되고, 예를 들어, 탈글리코실화된 Fc 영역(N297A, N297Q), 또는, 이펙터 기능이 사일런트화(또는 면역 억제)되도록 조작된 Fc 영역인 사일런트 Fc 영역의 예(IgG1-L234A/L235A, IgG1-H268Q/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, IgG4-L236E)가 기재되어 있다. WO2008/092117에는, 치환 G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R, 또는, N325L/L328R(EU 넘버링에 의한다)을 포함하는 사일런트 Fc 영역을 포함하는 항체가 개시되어 있다. WO2000/042072에는, EU 233위, EU234위, EU235위, 및 EU237위 중 1개 또는 복수로 치환을 포함하는 사일런트 Fc 영역을 포함하는 항체가 개시되어 있다. WO2009/011941에는, EU231~EU238의 잔기의 결실을 포함하는 사일런트 Fc 영역을 포함하는 항체가 개시되어 있다. Davis et al, Journal of Rheumatology (2007) 34(11): 2204-2210에는, 치환 C220S/C226S/C229S/P238S를 포함하는 사일런트 Fc 영역을 포함하는 항체가 개시되어 있다. Shields et al, Journal of Biological Chemistry (2001) 276 (9), 6591-6604에는, 치환 D265A를 포함하는 사일런트 Fc 영역을 포함하는 항체가 개시되어 있다. US Patent No. 6,737,056에는, EU238, EU265, EU269, EU270, EU297, EU327, EU329의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 이펙터 기능이 감소된 항체가 기재되어 있다. US Patent No. 7,332,581에서는 EU265와 EU297을 알라닌으로 치환한 소위 「DANA」 Fc 영역 개변체에 더하여, EU265, EU269, EU270, EU297, EU327의 2개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역 개변체가 기재되어 있다. 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체의 Fc 영역 개변체에는, 적절히, 이들 아미노산 잔기의 개변을 도입시켜도 된다.

[0392] 「이펙터 수용체에 대한 낮은 결합」이란, 이펙터 수용체에 대한 천연형 IgG(또는 천연형 IgG Fc 영역을 포함하는 항체)의 결합 활성의, 예를 들어, 95% 이하, 바람직하게는 90, 85, 80, 또는 75% 이하, 보다 바람직하게는 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1% 이하인 결합 활성을 의미한다. FcγR에 대한 결합 활성은, 이펙터 수용체에 대한 천연형의 IgG(또는 천연형의 IgG Fc 영역을 포함하는 항체)의 결합 활성과 비교하여, 예를 들어, 10분의 1 이하, 50분의 1 이하, 또는 100분의 1 이하로 저하되어도 된다.

[0393] 본 명세서에 있어서, 사일런트 Fc 영역이란, 천연형의 Fc 영역과 비교하여 이펙터 수용체에 대한 결합을 저하시키는 1개 또는 복수의 아미노산 치환, 삽입, 결실 등을 포함하는 Fc 영역 개변체이다. 이펙터 수용체에 대한 결합 활성은 크게 저하될 수 있기 때문에 Fc 영역 개변체는 이미 이펙터 수용체와 (실질적으로) 결합하지 않는다. 사일런트 Fc 영역의 예로서는, EU234, EU235, EU236, EU237, EU238, EU239, EU265, EU266, EU267, EU269, EU270, EU271, EU295, EU296, EU297, EU298, EU300, EU324, EU325, EU327, EU328, EU329, EU331, 및 EU332로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1개 또는 복수의 위치에 있어서 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역(개변체)이 포함된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체의 Fc 영역(개변체)에는, 적절히, 이들 아미노산 잔기의 개변을 도입시켜도 된다.

[0394] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체의 Fc 영역 개변체를 제작하기 위한 항체 정상 영역의

개변 방법으로서는, 예를 들어, 정상 영역의 아이소타입(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)을 복수 검토하여, 적절히 그 서열 중에 예를 들어 아미노산 치환을 도입함으로써, 산성 pH하에서의 항원 결합 활성이 저하되고, 및/또는, 산성 pH하에서의 해리 속도가 빨라지는 아이소타입을 선택해도 된다.

[0395] 다른 또는 추가적인 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는,

[0396] (A) 서열 번호: 36, 37 또는 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄; 및/또는,

[0397] (B) 서열 번호: 38 또는 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 또는 그것과 적어도 65%, 70%, 또는 75% 이상, 바람직하게는 80%, 85% 또는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄

[0398] 를 포함해도 된다. 여기에서, 참조 아미노산 서열과 특정 %의 서열 동일성을 갖는 중쇄 또는 경쇄는, 참조 아미노산 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄와 기능적으로 동등해도 된다. 더욱이, 당해 항IL-8 항체는, 이하의 5개의 성질 중 적어도 하나의 성질을 갖는 Fc 영역 개변체를 포함해도 된다:

[0399] (a) 산성 pH에서의 Fc 영역 개변체의 FcRn에 대한 결합 친화성이, 천연형의 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합 친화성보다 증대되어 있다,

[0400] (b) 기존의 ADA에 대한 Fc 영역 개변체의 결합 친화성이 천연형의 Fc 영역의 기존의 ADA에 대한 결합 친화성보다 저하되어 있다,

[0401] (c) Fc 영역 개변체의 혈장 중 반감기가 천연형의 Fc 영역의 혈장 중 반감기보다 증대되어 있다,

[0402] (d) Fc 영역 개변체의 혈장 중 클리어런스가 천연형의 Fc 영역의 혈장 중 클리어런스보다 감소되어 있다,

[0403] (e) Fc 영역 개변체의 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성이 천연형의 Fc 영역의 이펙터 수용체에 대한 결합 친화성보다 저하되어 있다,

[0404] (f) pH 의존적으로 IL-8에 결합할 수 있다.

[0405] 여기에 기재되는, 상정되는 모든 아미노산 서열의 조합을 당연히 당업자는 이해한다.

[0406] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 예를 들어 US Patent No. 4,816,567에 기재되는 방법을 이용하여 제작할 수 있다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이와 같은 핵산은, 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩하고 있어도 된다. 단리된 항IL-8 항체를 코딩하는 핵산은, 숙주 세포 내에서의 추가적인 클로닝 및/또는 발현을 위해서 1개 이상의 벡터에 삽입되어도 된다. 이와 같은 핵산은, 종래의 수법으로(예를 들어, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 올리고핵산 프로브를 이용하는 것으로) 용이하게 단리되어 서열 결정될 수 있다.

[0407] 추가적인 실시태양에서는, 이와 같은 핵산을 포함하는 1개 이상의 벡터(예를 들어 발현 벡터)가 제공된다. 일 실시태양에 있어서, 이와 같은 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 당해 숙주 세포는, (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는, (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 벡터와 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제 2 벡터를 포함한다(예를 들어, 이들 벡터로 세포는 형질 전환되고 있다).

[0408] 일 실시태양에 있어서, 숙주는 진핵생물(예를 들어 CHO 세포나 림프 세포(예를 들어 Y0, NS0, SP20 세포))이다.

[0409] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체의 제조 방법이 제공되고, 그 제조 방법은, 예를 들어, 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포를, 항체 발현에 적절한 조건에서 배양하고, 임의로 숙주 세포(또는 숙주 세포의 배양 배지)로부터 당해 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0410] 항체를 코딩하는 벡터의 발현이나 클로닝에 적절한 숙주 세포로서는, 예를 들어, 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한다. 글리코실화한 항체의 발현을 위해서는 다세포 생물(무척추 동물이나 척추동물) 유래의 세포를 이용해도 된다. 무척추 동물의 예는, 식물 세포나 곤충 세포이다.

[0411] 일 실시태양에 있어서, 항IL-8 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를, 항체 발현에 적절한 조건에서 배양함으로써 산생된 당해 항체는, 숙주 세포 내 또는 세포 외(배지, 유즙 등)로부터 단리되어, 실질적으로 순수하고 균일한 항체로서 정제될 수 있다. 항체의 분리, 정제는, 통상의 폴리펩타이드의 정제에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법이 적합하게 사용될 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 예를 들어, 크로마토그래피 컬럼, 필

터, 한외 여과, 염석, 용매 침전, 용매 추출, 증류, 면역 침강, SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동, 등전점 전기영동법, 투석, 재결정 등이 적절히 선택, 조합되어 항체가 적합하게 분리, 및 정제될 수 있다. 크로마토그래피로서는, 예를 들어, 어피니티 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 등을 들 수 있다. 이들 크로마토그래피는, 액상 크로마토그래피, 예를 들어 HPLC, FPLC 등의 액상 크로마토그래피를 이용하여 행할 수 있다. 어피니티 크로마토그래피에 이용하는 컬럼으로서는, 프로틴 A 컬럼, 프로틴 G 컬럼을 예를 들어 들 수 있다. 예를 들어, 프로틴 A를 이용한 컬럼으로서 Hyper D, POROS, Sepharose F. F.(Pharmacia제)를 들 수 있다.

[0412] 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, 세포외 매트릭스에 대한 결합성의 증대나, IL-8과 항IL-8 항체의 복합체의 세포 내로의 흡수의 증가라고 하는 항IL-8 항체의 성질에 주목하여, 세포외 매트릭스에 대한 결합이 증대된 항체나 세포내 흡수가 증가된 항체를 선택하는 방법에 관한 것이다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, IL-8에 대한 결합 활성이 pH 의존적인 가변 영역을 포함하는 항체의 제조 방법으로서, 이하의 공정을 포함하는 항IL-8 항체의 제조 방법에 관한 것이다: (i) 항IL-8 항체와 세포외 매트릭스의 결합을 평가하는 공정, (ii) 세포외 매트릭스와의 결합이 높은 항IL-8 항체를 선택하는 공정, (iii) 당해 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 숙주를 배양하는 공정, 및 (iv) 배양액(배양 상청 등)으로부터 당해 항체를 단리하는 공정. 세포외 매트릭스와의 결합의 평가는, 예를 들어, 세포외 매트릭스가 고상화된 플레이트에 항체를 첨가하고, 그 항체에 대한 표지 항체를 첨가하는 것에 의해, 항체와 세포외 매트릭스의 결합을 검출하는 ELISA계에 의해 측정할 수 있다. 혹은, 예를 들어, 세포외 매트릭스를 고상화한 플레이트에, 항체와 루테늄 항체의 혼합물을 첨가하여, 항체와 세포외 매트릭스의 결합을, 루테늄의 전기화학발광에 의해 측정하는 전기화학발광법(ECL법)에 의해 측정할 수 있다.

[0413] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 용액 중(예를 들어 PBS 중)에서 IL-8 중화 활성이 안정되게 유지되는 것이 바람직하다. 용액 중에서 당해 활성이 안정되게 유지되는지 여부는, 당해 용액에 첨가한 본 개시의 항체의 IL-8 중화 활성이, 어느 기간, 어느 온도에서 보관하기 전과 후에 변화되는지 여부를 측정함으로써 확인 가능하다. 일 실시태양에 있어서, 보관 기간은, 예를 들어, 1~4주간이며, 보관 온도는, 예를 들어, 25도, 30도, 35도, 40도, 또는 50도이다.

[0414] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 생체 내(예를 들어 혈장 중)에서 IL-8 중화 활성이 안정되게 유지되는 것이 바람직하다. 생체 내에서 당해 활성이 안정되게 유지되는지 여부는, 비인간 동물(예를 들어 마우스) 또는 인간의 혈장에 첨가한 본 개시의 항체의 IL-8 중화 활성이, 어느 기간, 어느 온도에서 보관하기 전과 후에 변화되는지 여부를 측정함으로써 확인 가능하다. 일 실시태양에 있어서, 보관 기간은, 예를 들어, 1~4주간이며, 보관 온도는, 예를 들어, 25도, 30도, 35도, 또는 40도이다.

[0415] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체의 세포 내에 흡수되는 속도는, 항체 단독 때보다, IL-8과 복합체를 형성했을 때 쪽이 크다.

[0416] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 항IL-8 항체는, 인간 숙주에 있어서 예측되는 면역원성이 저감되어 있는 것이 바람직하다. 「저면역원성」이란, 예를 들어, 치료 효과를 달성하는데 충분한 시간에 있어서, 충분한 양의 항체가 투여되는 개체의 적어도 과반수에 있어서, 투여된 항IL-8 항체가 생체에 의한 면역 응답을 야기하지 않는 것을 의미할 수 있다. 면역 응답의 야기에는 항의약품 항체의 산생이 포함될 수 있다. 「항의약품 항체의 산생이 적다」란 「면역원성이 낮다」라고 바꾸어 말하는 것도 가능하다. 인간에 있어서의 면역원성의 레벨은, T 세포 에피토프 예측 프로그램으로 예측하는 것도 가능하고, 이 T 세포 에피토프 예측 프로그램에는 Epibase(Lonza), iTope/TCED(Antitope), EpiMatrix(EpiVax) 등이 포함된다. 예를 들어, T 세포 에피토프 예측 프로그램을 이용하여 해석하여, 면역원성이 저감된 서열을 설계할 수 있다. 그와 같은 아미노산 개변 부위의 비한정의 예로서, 서열 번호: 34로 표시되는 항IL-8 항체의 중쇄 서열 중의 Kabat 넘버링으로 표시되는 81위 및/또는 82b위를 들 수 있다.

[0417] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 기재된 항IL-8 항체와의 기능의 비교에 있어서의 참조 항체는, 서열 번호: 39 및 40의 아미노산 서열을 포함하는 항체여도 된다. 특정의 실시태양에 있어서, PK 시험에 이용하기 위한 참조 항체는, 서열 번호: 43 및 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체여도 된다.

[0418] 복수의 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)는, 공지의 다양한 방법에 의해, 물리화학적 특성 및/또는 생물학적 활성을 지표로 동정되거나, 스크리닝되거나, 또는 특징지어진다.

[0419] 결합 측정, 그 외의 측정

[0420] 어느 측면에서는, 본 개시에 있어서의 항체는, 예를 들어, ELISA나 웨스턴 블로트, 결합 평형 제외법(Kinetic Exclusion Assay; KinExATM), 또는 BIACORE(GE Healthcare) 등의 장치를 이용한 표면 플라즈몬 공명법과 같은 방법으로 항원 결합 활성을 조사해도 된다.

[0421] 일 실시태양에 있어서, 결합 친화성은, Biacore T200(GE Healthcare)을 이용하여 이하와 같이 측정 가능하다. 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 보족용 단백질(예를 들어, 프로틴 A/G(PIERCE))을 적당량 고정화하고, 거기에 목적하는 항체를 포착시킨다. 다음에, 희석된 항원액과 러닝 버퍼(참조 용액으로서: 예를 들어 0.05% tween20, 20mM ACES, 150mM NaCl, pH 7.4)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착된 항체에, 항원 분자를 상호 작용시킨다. 센서 칩의 재생에는 10mM 글리신-HCl 용액(pH 1.5)이 이용되고, 측정은 지정 온도(예를 들어 37℃, 25℃, 또는 20℃)에서 실시된다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 카이네틱스 파라미터인 결합 속도 상수 kon(1/Ms), 및 해리 속도 상수 koff(1/s)를 기초로 각 항체의 항원에 대한 KD(M)가 산출된다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 이용된다.

[0422] 일 실시태양에 있어서, IL-8의 정량은 이하와 같이 실시 가능하다. 마우스 IgG 정상 영역을 갖는 항인간 IL-8 항체를 고상화한 플레이트를 작성한다. 상기 항인간 IL-8 항체와는 경합하지 않는 인간화 IL-8 항체와 결합하고 있는 IL-8을 포함하는 용액을, 상기 고상화 플레이트에 분주(分注)하고, 교반한다. 그 후, 비오틴화한 항인간 Igk 경쇄 항체를 첨가하여 일정 시간 반응시키고, 추가로 SULFO-Tag 라벨된 스트렙트아비딘을 첨가하여 일정 시간 반응시킨다. 측정용 완충액을 첨가 후, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 계측한다.

[0423] 활성 평가 어세이

[0424] 어느 측면에서는, 측정은 생물학적 활성을 갖는 항체를 동정하기 위해서 제공된다. 생물학적 활성에는, 예를 들어, 항원(예를 들어 IL-8)을 중화시키는 활성, 또는 항원(예를 들어 IL-8)의 시그널을 차단하는 활성이 포함된다.

[0425] 일 실시태양에 있어서, IL-8의 중화 활성의 정도를 결정하는 방법은, 예를 들어, 이하의 방법으로도 측정하는 것이 가능하다. PathHunter(상표) CHO-K1 CXCR2 β-Arrestin Cell Line(DiscoveRx사, Cat.# 93-0202C2)은, 인간 IL-8 수용체의 하나로서 알려져 있는 인간 CXCR2를 발현하여, 인간 IL-8에 의한 시그널이 전달되었을 때에 화학발광을 나타내도록, 인공적으로 작성된 세포주이다. 당해 세포의 배양액에 인간 IL-8을 첨가하면, 첨가한 인간 IL-8의 농도에 의존하여, 당해 세포는 화학발광을 나타낸다. 인간 IL-8과 항인간 IL-8 항체를 아울러 배양액 중에 첨가했을 경우, 항인간 IL-8 항체는, IL-8에 의한 시그널 전달을 차단할 수 있기 때문에, 당해 세포의 화학발광은, 항체를 첨가하고 있지 않는 경우에 비하면 약해지거나, 또는 전혀 검출되지 않는다. 즉, 항체가 갖는 인간 IL-8 중화 활성이 강할수록 화학발광의 정도는 약해지고, 항체가 갖는 인간 IL-8 중화 활성이 약할수록 화학발광의 정도는 강해진다. 이 차이를 확인하는 것에 의해, 항인간 IL-8 항체의, 인간 IL-8에 대한 중화 활성을 평가하는 것이 가능하다.

[0426] 본 명세서에 있어서, 「진단용 조성물」, 「치료용 조성물」, 「예방용 조성물」은 각각 「진단제」, 「치료제」, 「예방제」와 호환 가능하게 이용된다. 일 실시태양에 있어서, 치료용 조성물, 예방용 조성물이 소망하는 대상의 질환 또는 증상의 치료 또는 예방을 의도하고 있는 경우, 이들 조성물은 의약 조성물이라고도 칭해지고, 의약 조성물은, 통상, 질환 또는 증상의 치료 또는 예방을 위한 약제를 가리킨다.

[0427] 본 명세서에 있어서 「약학적으로 허용되는 담체」란, 의약 조성물 중에 존재하는 유효 성분 이외의 구성 요소를 가리키고, 대상에 대해서 무해한 것이 전형적으로는 선택되지만, 목적에 따른 리스크·베네피트를 감안하여 결정될 것이다. 약학적으로 허용되는 담체는, 예를 들어, 완충액, 부형제, 안정제, 또는 보존제를 포함한다.

[0428] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 치료용 조성물 또는 예방용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 동결건조 제제 또는 수용액 제제의 형태로 조제될 수 있다.

[0429] 일 실시태양에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체는, 전형적으로는, 이용되는 용량과 농도가 레시피언트에게 비독성이며, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 등의 버퍼; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 산화 방지제; 보존제(예를 들어 옥타데실다이메틸벤질암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 뷰틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르신올; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10잔기 미만)의 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린 등의 단백질; 폴리바이닐 피롤리돈 등의 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민,

아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신 등의 아미노산; 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물; EDTA 등의 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨 등의 당; 나트륨 등의 염형성 짝이온; 금속 착체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등의 비이온성 계면활성제를 포함한다. 혹은, 예를 들어, 가용성 하이알루로니다제 당단백질(sHASEGP)과 같은 간질성 약제 분산제를 포함해도 된다(US2005/0260186, US2006/0104968). sHASEGP는 콘드로키나제와 같은 1개 이상의 글리코사미노글리카나제와 조합되어도 된다.

[0430] 본 명세서에 있어서, 의약 조성물 중의 유효 성분(IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제 등의 IL-8 시그널 저해제)의 「유효량(effective amount)」이란, 소망되는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는데 필요한 기간, 필요한 용량에서의 유효량을 의미한다.

[0431] 어느 측면에 있어서, 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)가 의약 조성물로서 이용 가능한 것에 기초한다. 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)는, 예를 들어, IL-8이 과잉으로 존재하는 질환의 진단, 치료 또는 예방에 유익하다.

[0432] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)는, 비경구 투여, 폐내 투여, 비강내 투여, 국소 처치가 바람직한 경우에는 병소내 투여 등, 임의의 적합한 수단으로 투여된다. 비경구 주입의 예로서, 근육내 투여, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여 또는 피하 투여를 들 수 있다. 투여가 단기인지 아니면 장기인지 등에도 따르지만, 예를 들어, 정맥내 주사 또는 피하 주사와 같은 주사 등 적절한 경로로 투약해도 된다. 다양한 투약 스케줄을 행할 수 있다.

[0433] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제는, 의학적 실용성에 맞춘 양식으로, 제제화되고, 용량 설정되어, 투여될 수 있다.

[0434] 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, 본 명세서에 개시되는 질환을 위한 진단, 치료, 및/또는 예방에 유용한 IL-8 시그널 저해제를 포함하는 제품에 관한 것이다. 이 제품은, 용기와 당해 용기에 부수하는 라벨 또는 첨부 문서를 포함한다. 적절한 용기에는, 예를 들어, 병, 바이알, 정맥 주사용 용액 백이 포함된다.

[0435] 질환의 치료 또는 예방에 있어서의, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)의 적절한 투여량이나 투여 간격은, 치료 대상의 질환의 타입, 저해제의 타입, 질환의 중증도 및 경과, 투여 목적, 지금까지의 치료, 환자의 임상력 및 저해제에 대한 반응, 및 의사의 재량 등에 기초하여, 적절히 설정할 수 있다.

[0436] 일 실시태양에 있어서, 치료 효과로서는, 예를 들어, 질병의 발생 또는 재발의 방지, 증상의 완해, 질병의 임의의 직접적 또는 간접적인 병리적 결과의 저감, 전이의 방지, 질병의 진행 속도의 저감, 질병 상태의 회복, 완화, 완해 또는 개선된 예후가 포함된다.

[0437] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에서는, IL-8이 과잉으로 존재하는 질환 또는 증상, 또는, IL-8 시그널이 병태의 발증, 진행, 악화, 재발 등에 관여하거나 또는 관여할 수 있는 질환을, 포괄적으로, 「IL-8 관련 질환」이라고 한다.

[0438] 어느 측면에 있어서의 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)를 유효 성분으로서 함유하는, IL-8 관련 질환의 치료용 조성물 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 추가적인 실시태양에 있어서, 당해 조성물은, 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함해도 된다.

[0439] 어느 측면에 있어서의 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, IL-8 관련 질환(예를 들어, 자궁내막증, 자궁선근증, 월경 곤란증, 유착, 섬유화 질환)의 치료 또는 예방에 있어서의 사용을 위한, IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)에 관한 것이다.

[0440] 어느 측면에 있어서의 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, IL-8 관련 질환(예를 들어, 자궁내막증, 자궁선근증, 월경 곤란증, 유착, 섬유화 질환)에 대한 진단용 조성물, 치료용 조성물, 또는, 예방용 조성물로서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)의 사용에 관한 것이다.

[0441] 어느 측면에 있어서의 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제) 또는 그것을 포함하는 치료용 조성물 또는 예방용 조성물을, 그것을 필요로 하는 대상에게 (유효량으로) 투여하는 것을 포함하는, IL-8 관련 질환(예를 들어, 자궁내막증, 자궁선근증, 월경 곤란증, 유착, 섬유화 질환 등)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 여기에서, 그것을 필요로 하는 대상이란, 당해 IL-8 관련 질환으로 이환한, 또는, 이환하고 있을 우려가 있는 대상이어도 된다. 추가적인 실시태양에 있어서, 당해 조성물은, 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함해도 된다.

[0442] 어느 측면에 있어서의 일 실시태양에 있어서, 본 개시는, IL-8 관련 질환(예를 들어, 자궁내막증, 자궁선근증, 월경 곤란증, 유착, 섬유화 질환 등)의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서의, 본 개시의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제) 또는 그것을 포함하는 치료용 조성물 또는 예방용 조성물의 사용에 관한 것이다. 추가적인 실시태양에 있어서, 당해 조성물은, 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함해도 된다.

[0443] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어, IL-8 저해제(예를 들어 항IL-8 항체), CXCR1 저해제, 또는 CXCR2 저해제)에 의한 치료 또는 예방의 대상이 되는 IL-8 관련 질환으로서는, 예를 들어, 자궁내막증; 자궁선근증; 월경 곤란증; 아셔만 증후군 등의 유착; 불임증; 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증에 있어서의 동통; 및, 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통; 염증성 각화증, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 장척농포증, 마른 버짐 등의 염증성 피부 질환; 만성 관절 류머티즘, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 베쳇증 등의 만성 염증성 질환인 자기 면역 질환; 크론병, 궤양성 대장염 등의 염증성 장 질환; B형 간염, C형 간염, 알코올성 간염, 약물 알레르기성 간염 등의 염증성 간 질환; 사구체 신염, ANCA 관련 신장염 등의 염증성 신 질환; 기관지염, 천식 등의 염증성 호흡기 질환; 아테롬성 동맥경화 등의 염증성 만성 혈관 질환; 다발성 경화증; 구내염; 성대염; 장기 이식 시의 허혈재관류; 인공 장기·인공 혈관 사용 시에 일어나는 염증; 난소암, 폐암, 전립선암, 위암, 유방암, 멜라노마(악성 흑색종), 두경부암, 신장암, 방광암, 교아종(glioblastoma) 등의 악성 종양; 감염 등에 의한 패혈증(패혈증성 쇼크를 포함한다); 급성 폐손상; 자궁내막증 또는 자궁선근증에 있어서의 섬유화, 낭포성 섬유증, 간섬유증, 신장 섬유증, 및 만성 폐색폐질환(COPD) 등의 폐섬유증 등의 섬유화 질환; 뇌졸중, 뇌경색(예를 들어 허혈성 뇌경색), 뇌혈전증, 뇌색전증, 출혈성 뇌혈관 장애, 뇌내 출혈, 및 지주막하 출혈로부터 선택되는 뇌장애; 심근경색(급성 심근경색, 불안정 협심증, 심근 허혈재관류 장애를 포함한다) 등을 들 수 있다(참조로서 예를 들어, 본 실시예; 본 명세서에 기재된 문헌; Remo et al., Expert Rev. Clin. Immunol. 10(5), pp. 593-619, 2014; Mian et al., Clin Cancer Res. 2003 Aug 1;9(8):3167-75; Huang et al., Am J Pathol. 2002 Jul;161(1):125-34; WO97/49426; WO97/39775; JP10-045622; JP10-182488; JP10-053536). IL-8 관련 질환은 포유동물에 있어서의 질환일 수 있고, 영장류에 있어서의 질환인 것이 바람직하고, 인간에 있어서의 질환(예를 들어 자궁내막증이면 인간 자궁내막증; 자궁선근증이면 인간 자궁선근증 등, 이하 마찬가지이다.)인 것이 보다 바람직하다.

[0444] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제에 의한 치료 또는 예방의 대상이 되는 IL-8 관련 질환의 환자(대상)는, 당해 IL-8 관련 질환으로 이환한, 또는, 이환하고 있을 우려가 있는 대상이어도 된다. 여기에서, IL-8 관련 질환으로 이환하고 있을 우려가 있는 대상이란, 한정은 되지 않지만, IL-8 관련 질환으로 과거에 이환하고 있어, 증상이 재연될 우려가 있는 대상이어도 되고, 혹은, IL-8 관련 질환과의 예를 들어 병리 소견에 의한 확정 진단 등이 의사 등에 의해 내려지기 전의, IL-8 관련 질환을 발병하고 있다고 의심되고 있는 대상이어도 된다. 일 실시태양에 있어서, IL-8 관련 질환의 예방과 치료는 경우에 따라 동일한 의미로 이해되어도 된다. 혹은, IL-8 관련 질환의 예방이란, 적절한 경우에는, 당업자에게 주지의 일반적인 관념으로 이해되어도 된다.

[0445] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 관련 질환은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0446] 본 명세서에 있어서, 자궁내막증은, 한정을 의도하지 않지만, 자궁내막 조직과 동일 또는 유사한 형태와 기능을 가진 조직이, 자궁 외에 이소성(통상은 골반내, 가끔, 복강, 드물게 흉강)으로 발생하고, 증식하여 증후를 가져오는 질환이다(일본 산부인과 학회, 1993). 악성 종양은 아니기는 하지만, 경시적으로 진행되어, 종양 형성과 주위의 유착, 월경 시 및 그 이외에서의 중증의 복통이나 골반통, 성교통, 배변통, 및 불임증(임잉능 저하)을 초래하는 질환이다. 주로, 20세 이상의 생식 연령에 있는 여성에게 발생하여, 아픔 등에 의한 QOL의 저하, 유착의 중증화에 의한 동통의 만성화나 불임증에 이른다. 자궁내막증의 병변부(질환 부위) 중, 유착이 생기고 있는 부분의 병태가 진행되면 섬유화가 일어난다. 섬유화된 부분에는 콜라겐이 생성되어 있어, 섬유화의 원인이 되고 있다. 자궁내막증에 있어서의 섬유화의 진행은 일반적으로 불가역적이라고 이해되고 있다. 그 때문에, 자궁내막증에 있어서 섬유화의 진행을 멈추거나, 또는 개선하는 방법에 대해서는 지금까지 보고되어 있지 않았

다. 이와 같이, 자궁내막증이란, 병태의 발생으로부터 진행의 과정에서 다양한 병리적 소견을 제시하여 다양한 스테이지를 경과하면서 병세가 악화되어 가는 질환임에도 불구하고, 자궁내막증이라고 일괄하여 불리고 있었지만, 최근, 인간과 마찬가지의 월경을 갖는 비인간 영장류의 자궁내막증 in vivo 모델이 제작됨으로써, 병태의 해명이 간신히 진행되어 온 질환이다. 본 발명자들은, 인간과 마찬가지의 월경을 갖는 필리핀원숭이의 자궁내막증 in vivo 모델을 외과적으로 유발하여 제작하고, IL-8 시그널 저해제를 생체에 투여함으로써, 자궁내막증의 병변부에 있는 상피 세포나 스트로마 세포가 위축성 변화하거나, 또는 자궁내막증의 간질가 감소됨으로써 평활근까지도 축소되어 자궁내막증의 병변부의 증식을 억제할 수 있다는 것을, 신뢰할 수 있는 in vivo 모델을 사용하여 세계에서 처음으로 실증하는 것에 성공했다. 자궁내막증 조직, 특히 간질의 감소로부터, 이소성 신경 세포의 세소화(細小化)도 기대할 수 있다. 또한, 본 발명자들은, IL-8 시그널 저해제의 투여군에서는, vehicle군에서는 보이지 않았던 근 조직의 재생을 확인하여, 근층까지 침윤된 병변이 퇴축되어, 근육 조직으로 치환되어 돌아오고 있다고 고찰했다. 복벽 근층까지 침윤된 자궁내막증 선관의 유무로 심재성 병변(deep lesion)의 유무를 확인한 경우에도, IL-8 시그널 저해제가 심재성 병변의 형성을 억제할 수 있다는 것이 시사되었다. 더욱이 놀랍게도, 본 발명자들은, 당해 IL-8 시그널 저해제가 자궁내막증에 있어서의 유착이나 섬유화도 억제할 수 있다는 것도 처음으로 실증했다. 따라서, 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제는, 자궁내막증에 있어서의 특정의 스테이지에 있는 섬유화라고 하는, 섬유화 질환이라고 파악할 수 있는 증상을 치료 또는 예방할 수 있다. 또한, 필리핀원숭이 in vivo 모델에 있어서, 일례는 성 주기가 부정기였던 것의 모델 제작의 영향이라고 생각되어, 일례를 제외하고 성 주기가 정기적이며, IL-8 시그널 저해제는 성 주기에 영향을 주지 않았다고 판단했다(본 실시예 참조). 이것으로부터, 기존의 자궁내막증 치료제와 비교하여 IL-8 시그널 저해제는 유망한 치료제 또는 예방제이다. 더욱이, 호르몬제와의 병용에 의하지 않고도 IL-8 시그널 저해제 단일제로 자궁내막증을 치료 또는 예방할 수 있음은 놀랄만한 것이다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 자궁내막증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0447] 본 명세서에 있어서, 자궁선근증이란, 한정은 되지 않지만, 자궁 평활근층에 자궁내막 조직 즉 자궁내막선과 그것을 둘러싸는 자궁내막 간질(스트로마)이 존재하는 상태이며, 주위의 평활근의 비대와 과형성을 수반하는 질환으로, 중증의 월경통, 과다 월경 및 빈혈, 만성 동통을 초래한다. 자궁선근증 환자의 6-20%가 자궁내막증을 병발하고 있지만(다케타니 등, 1997년도 후생성 심신장애 연구 보고서. 1998:99-104), 자궁내막증과는 질병학 분류상 상이한 질환이며, 양자는 구별된 별개의 질환이라는 것이 근년의 당업자의 기술 상식이다(Frankl et al, 1925;10:680-4, Brosens et al, Lancet. 1993 Jan 16;341(8838):181-2, Benagiano et al, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2006 Aug;20(4):449-63.). 자궁내막이 이소성으로 발생·발육하는 점, 에스트로겐에 의존하여 변화하는 점, 월경통이 주증상인 점에서는 자궁내막증을 닮아 있지만, 자궁선근증은 역학적으로도 자궁내막증보다 비교적 고령의 경산부 여성에게 발생하는 경우가 많은 등 상이하다. 자궁내막과의 기저층과 근층 간의 경계가 파단되는 이유는 특정할 수 없지만, 자궁 손상(과도의 소파, 분만 외상)에 의해 자궁내막이 직접 근층 내로 밀려 들어간다고 하는 발생설이 제창되어 왔다(Pappas et al, Obset Gynecol. 1959;13:714, Benagiano et al, Fertil Steril. 2012 Sep;98(3):572-9). 한편, 내강측 근층 90%까지 자궁내막 조직이 존재하지 않고, 장막측의 근층에만 자궁내막 조직이 분포하는 예는 골반 복막 자궁내막증이라고 불린다(Bergeron et al, Best Pract Res Clin Obset Gynaecol 2006; 20(4):511-521).

[0448] 본 발명자들은, 전술한 필리핀원숭이 in vivo 모델이 자궁선근증을 자연 발병한 것을 확인, 동정하여, IL-8 시그널 저해제를 생체에 투여한 바, 자궁선근증의 병변부의 증식을 억제할 수 있음을 세계에서 처음으로 실증하는 것에 성공했다. 필리핀원숭이 in vivo 모델에 있어서, IL-8 시그널 저해제는 성 주기에 대한 영향을 주지 않았기 때문에(본 실시예 참조), 기존의 자궁선근증 치료제와 비교하여 IL-8 시그널 저해제는 유망한 치료제 또는 예방제이다. 더욱이, 호르몬제와의 병용에 의하지 않고도 IL-8 시그널 저해제 단일제로 자궁선근증을 치료 또는 예방할 수 있음은 놀랄만한 것이다. IL-8 시그널 저해제를 투여함으로써, 자궁선근증에 있어서의 비대한 자궁벽을 얇게 하는 것이 가능하고, 자궁선근증에 있어서의 섬유화에 대한 치료 또는 예방 효과가 상기된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 자궁선근증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0449] 본 명세서에 있어서, 월경 곤란증이란, 한정은 되지 않지만, 특히는 월경 시의 증상 중 일상 생활에 지장이 생길 정도의 증상을 가리켜도 된다. 월경 곤란증에는, 자궁내막증, 자궁선근증, 과다 월경 등이 관여할 수 있다는 것이 알려져 있고, 그 전형적인 증상으로서는, 예를 들어, 월경 시의 복통, 특히는 하복부통에 더하여, 요통, 두통, 구토, 빈혈, 권태감 등을 들 수 있다. 월경 곤란증은 그 원인으로부터 대략적으로는 기능성(원발성) 월경 곤란증과 기질성(속발성) 월경 곤란증의 2종류로 분류되고 있다. 기능성 월경 곤란증의 원인으로서는, 예를 들어, 프로스타글란딘의 과잉 분비이거나, 자궁근종, 자궁내막증 등의 질환의 진행에 수반하여 생기는 것을 들 수 있다. 기질성 월경 곤란증의 원인으로서는, 예를 들어, 자궁근종, 자궁내막증 등의 질

환의 진행에 수반하여 생기는 것을 들 수 있다. 또한, 월경 곤란증은 자궁 내외의 염증에 의해서도 생긴다는 것이 알려져 있는 바, IL-8은 항염증 사이토카인으로서 알려져 있다. 따라서, 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제는, 월경 곤란증을 치료 또는 예방할 수 있다. 비한정의 바람직한 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제는, 자궁내막증 또는 자궁선근증을 갖는 월경 곤란증, 자궁내막증 또는 자궁선근증이 의심되는 월경 곤란증, 염증을 수반하는 월경 곤란증, 또는 유착에 의해 동통을 수반하는 월경 곤란증을 치료 또는 예방할 수 있다. 혹은, 다른 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 월경 곤란증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0450] 여기에서, 「자궁내막증 또는 자궁선근증이 의심되는 월경 곤란증」이란, 한정은 되지 않지만, 자궁내막증 또는 자궁선근증으로 과거에 이환하고 있고, 증상이 재연될 우려가 있는 대상이어도 되고, 혹은, 자궁내막증 또는 자궁선근증이라는 예를 들어 병리 소견에 의한 확정 진단 등이 의사 등에 의해 내려지기 전의, 자궁내막증 또는 자궁선근증을 발병하고 있다고 의심되고 있는 대상이어도 된다.

[0451] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제가 자궁내막증 또는 자궁선근증을 수반하는 월경 곤란증, 또는 자궁내막증 또는 자궁선근증이 의심되는 월경 곤란증의 치료 또는 예방에 이용되는 경우, 전술한 바와 같이, IL-8 시그널 저해제는 성 주기에 대한 영향을 주지 않고, 호르몬제와의 병용에 의하지 않고도 단일제로 자궁내막증이나 자궁선근증을 치료 또는 예방할 수 있으므로 유리하다.

[0452] 또한, 본 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은, IL-8 시그널 저해제가, 자궁내막증, 자궁선근증에 더하여, 유착도 치료 또는 예방할 수 있다는 것을 실증 또는 상도했다. 월경 곤란증은 복통 등의 동통에 의해서도 특징지을 수 있는 바, 자궁내막증에 있어서의 유착뿐만 아니라, 그 이외의 증상 또는 질환에 의한 유착이어도 조직 또는 장기가 접착 등 하는 것에 의해 환자에게 동통을 일으키는 것이 당연하게 생각된다. 예를 들어 골반 내에 있어서의 유착에서는 생식 부속기끼리의 유착과 아픔은 상관하지 않기는 하지만, 더글라스와(窩)의 유착과 아픔은 상관하는 것(Porpora et al, The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists 1999; 6:429-434.)이나, 장기끼리가 유착함으로써 옥죄어서 동통이 생기는 것이 알려져 있다. 또한, 자궁내막증에서는 이소성의 신경 섬유 및 NGF의 산생이 동통 및 동통 악화의 원인이 된다는 것이 알려져 있다(Anaf et al, Hum Reprod 2000; 15:1744-1750., Berkley et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:11094-11098. Odagiri et al, Fertil Steril 2009; 92:1525-1531.). 또한 자궁내막증 주위에 있는 평활근이 발달한 간질이 수축 시의 아픔을 증강시킨다는 것을 시사하는 보고도 있다(Odagiri et al, Fertil Steril 2009; 92:1525-1531.). 본 실시예의 항IL-8 항체의 투약에 의해 자궁내막증 조직의 간질이 감소되어 있는 것이 확인되었던 것에 더하여, 이소성 신경의 감소를 기대할 수 있으므로, 동통 개선을 기대할 수 있다.

[0453] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제는, 자궁내막증 또는 자궁선근증에 있어서의 동통(만성 동통, 월경시의 동통 등), 월경 곤란증에 있어서의 동통, 또는 유착, 섬유화 또는 염증에 의한 동통을 치료 또는 예방할 수 있다. 여기에서, 당해 만성 동통으로서는, 한정을 의도하지 않지만, 만성 하복부통 또는 만성 골반통을 들 수 있다.

[0454] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 「성 주기에 대한 영향을 주지 않는다」란, 대상(인간이면 여성, 비인간 동물이면 암컷)에 있어서의 주기적인 월경 사이클 및 배란이 실질적으로 간섭을 받지 않는 것을 가리켜도 되고, 그 사이클의 주기성은, 본 실시예에서 관찰한 바와 같이 월경 시의 출혈의 유무로부터 결정해도 되고, 혈중 또는 요중 에스트로겐 농도의 변동이나 프로게스테론 농도의 변동으로부터 판정해도 된다. 호르몬(예를 들어 에스트로겐/프로게스테론 합제, 프로게스테론 제제, GnRH 아고니스트, 다나졸) 요법은 월경 사이클에 간섭하여 배란을 저해한다는 것이 알려져 있다. 한정은 되지 않지만, 실질적으로 간섭을 받는지 여부는, 예를 들어, 성 주기에 대한 영향을 주는 것이 알려져 있는 호르몬 요법을 받고 있는 대조군과 비교하여, IL-8 시그널 저해제의 투여를 받은 군에서는 통계적으로 또는 경향으로서 월경 사이클이 간섭을 받고 있지 않은지 여부로 판단해도 된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 IL-8 시그널 저해제는, 그것이 투여된 자궁내막증, 자궁선근증 또는 월경 곤란증의 대상에 있어서의 성 주기에 대한 영향을 주지 않으므로, 배란을 저해하지 않는 것 및 종래의 호르몬 요법과 달리 임신이 가능하다고 하는 것이 상기된다. 또한, 호르몬제를 이용하지 않는 것에 의해, 저에스트로겐 상태에 의한 갱년기 장애 등의 부작용 상태를 대상이 회피할 수 있는 것은 유리하다.

[0455] 생체는, 생체 내의 세포, 조직, 기관 또는 장기 등이 손상이나 창상을 입었을 때에, 당해 손상 또는 창상을 입은 부위를 치유하려고 하는 창상 치유 기능을 갖고 있다. 그렇지만, 창상 치유의 과정에서 본래이면 바람직하지 않은, 세포, 조직, 기관 또는 장기 사이의 접착이 생기는 경우가 있다. 한정은 의도하지 않지만, 전형적으로는 이와 같은 접착 상태를 유착이라고 한다. 유착이 생겨도 자각 증상이 없는 환자가 있는 한편으로, 동통이

나 불임증, 복부 팽만감 등의 증상을 수반하여 치료가 필요한 환자도 적지 않다. 유착의 예로서는, 수술 후에 생긴(생기는) 유착(예를 들어, 외과적 수술 시의 할면, 봉합 부위 주위, 가제 등의 찰과 부위 등에 직접 또는 간접적으로 생긴(생기는) 유착, 자궁내 소파(搔把) 처리에 의해 생긴(생기는) 자궁질내 유착증(아셔만 증후군)); 약제(예를 들어 장기에 대한 국소적인 약제의 투여)에 의한 유착; 질환(예를 들어, 자궁내막증, 자궁선근증, 또는 침윤 상태에 있는 암 세포 또는 암 조직, 감염에 수반하는 염증성 질환(난관염, 난소염, 골반 복막염 등))에 의한 유착; 유착을 수반하는 장폐색; 자연 발증적으로 생기는 유착 등을 들 수 있다. 본 발명자들은, 필리핀원숭이의 자궁내막증 in vivo 모델에 있어서, 개복 수술 후에 생긴 자궁내막증과는 별도의 개복 부위로의 유착이, IL-8 시그널 저해제를 생체에 투여함으로써 유착이 감소된 것을 우연히도 발견했다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 유착은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0456] 본 명세서에 있어서, 불임증이란, 한정을 의도하지 않지만, 임신을 바라는 건강한 남녀가 피임을 하지 않고 성교를 하고 있음에도 불구하고, 일정 기간(일반적으로는 1년) 임신되지 않는 것을 가리킨다(일본 산부인과 학회, 2016). 한정은 되지 않지만, 일 측면에 있어서, 당해 불임증은, 유착 후에 생기는(특히는 유착에 기인하는) 불임증, 또는 복강 내의 염증에 의한 불임증이어도 된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 불임증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0457] 본 명세서에 있어서, 장척농포증이란, 한정을 의도하지 않지만, 피진(농포)이 손바닥이나 발바닥에 무수하게 생기는 질환을 가리킨다. 농포는, 세균이나 곰팡이가 없는 무균성의 것으로, 호중구가 피부의 각질에 모인 상태로, IL-8이 고농도이다(Skov et al, J Immunol 2008; 181:669-679). 장기간 증상을 반복하여, 만성적으로 증상이 나타난다. 장척농포증을 대상으로 한 임상 시험에서, 항IL-8 항체인 HuMab10F8을 투여하면 병태가 개선되었다(Skov et al, J Immunol 2008; 181:669-679). 이상으로부터, 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 장척농포증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0458] 본 명세서에 있어서, ANCA 관련 신염이란, ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibody: 항호중구 세포질 항체)가 양성인 신염을 가리킨다. 이 중 ANCA 관련 신염은, 사구체 등 신장의 혈관에서 염증이 일어나는 질환으로, 전형적인 병리학적 소견은 괴사성 반월체 형성성 신염을 나타내고, 만성화되면 섬유화가 진행되어, 사구체가 경화되어 신부전에 이른다. (에비던스에 근거하는 급속 진행성 신염 증후군(RPGN) 진료 가이드라인 2014, Nature Review Rheumatology 10 (2014) 463). ANCA 관련 신염에서는 병변부에서 IL-8이 고발현이고, 환자 호중구는 ANCA 처리에 의해 유주능이 상승되고, 항IL-8 항체 처리에 의해 유주능이 억제되었다(Cockwell et al, Kidney Int. 1999 Mar;55(3):852-63.). 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 ANCA 관련 신장염은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0459] 본 명세서에 있어서, 낭포성 섬유증이란, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR)의 유전자 변이를 원인으로 하는 전신성의 상염색체 열성 유전성 질환이다. 기도 내액, 장관 내액, 췌액 등의 전신의 분비액 및 점액이 현저하게 점조(粘稠)해져, 관강이 폐색되어 감염되기 쉬워져, 태변성 일레우스나, 췌장이 위축되어 췌외분비 부전에 의한 소화 흡수 불량, 호흡기 감염을 반복하여 호흡 부전 등의 증상이 나타난다. 기도액이나 기관지 폐포 세정액 등 병변부 또는 그 주위에서는 IL-8이 고농도인 것(Marcos et al, Nat Med. 2010 Sep;16(9):1018-23, Khan et al, Am J Respir Crit Care Med. 1995 Apr;151(4):1075-82), IL-8에 의해 유주되는 호중구가 많이 존재하여, 과도한 염증이 계속되어 호중구가 elastase 등의 효소 산생이나 NETosis를 일으킴으로써 체액의 점성이 높아져 증상이 나타난다고 생각되고 있다(Cheng et al, Front Immunol. 2013 Jan 24;4:1.). CXCR2 저해제인 Elubrixin의 낭포섬유증을 대상으로 한 임상 시험에서 국소로의 호중구의 유주 억제가 관찰되었다(J Cyst Fibros. 2013 May;12(3):241-8.). IL-8 pathway의 저해에 의해 호중구의 유주를 저해시킴으로써, 효소 산생 억제 및 NETosis 억제함으로써 국소 점도가 저하되어, 증상이 완화되는 것이 상정된다. 이상으로부터, 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 낭포성 섬유증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0460] 본 명세서에 있어서, 마른 버짐이란, 한정을 의도하지 않지만, 염증성 질환으로서도 알려진다. 전형적으로 보여지는 증상은, 은색의 인설(鱗屑)로 덮인 경계 명료한 홍색의 구진 또는 국면이다. 자주 보이는 유인으로서 외상, 감염, 어떤 종의 약제를 들 수 있다. 통상, 증상은 거의 없고, 때로 경도의 가려움이 있지만, 미용적인 관점이 주요한 수소(愁訴)가 되는 경우가 있다. 동통이 있는 관절염을 합병하여 중증이 되는 사람도 있다. US2003/0077283 A1에는, 항IL-8 중화 항체를 이용한 마른 버짐의 국소 요법이 개시되어 있다. 또한, Abcream(등록상표)의 이름으로 항IL-8 중화 항체에 의한 감염의 치료약이 판매되고 있다. 이상으로부터, 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 마른 버짐은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0461] 섬유화의 기서는, 출혈이나 질환에 의한 상해에 의한 염증이 발단이 되어, IL-8을 포함하는 케모카인이나 사이

토카인에 의해 주위 조직으로부터 호중구나 단구 등 면역 세포가 유도되어, 추가로 사이토카인이나 케모카인이 산생되는 것에 의해 근섬유아세포(또는 섬유화 세포)의 활성화와 증식이나 콜라겐 등의 세포외 기질의 과잉 산생 또는 분해 저하가 일어나 섬유화가 생긴다. 이것은 다양한 장기에서 일어나는 섬유증에서 공통된 것이다(N Engl J Med 2015; 372:1138-1149 March 19, 2015).

[0462] 본 개시에 있어서, 이와 같은 섬유화를 수반하는 질환이나 상태를, 그 섬유화의 태양을 파악하여, 포괄적으로 「섬유화 질환」이라고 한다.

[0463] 필리핀원숭이 in vivo 모델에 있어서, IL-8 시그널 저해제는 면역 세포의 침윤을 억제한 것, 콜라겐 풍부한 간질 부위가 감소한 것(본 실시예 참조)에 더하여, in vitro 어세이에 있어서, IL-8 시그널 저해제는 MCP-1(매크로파지 유주 인자 및 섬유화 촉진 인자로서 알려져 있다.) 등을 산생하는 호중구의 유주 저해 작용을 나타낸 것이므로, IL-8 시그널 저해제는 유망한 섬유화 치료제 또는 예방제라는 것은 전술한 바와 같다.

[0464] 게다가, 실시예에 나타내는 바와 같이, in vitro 시험에 있어서 다양한 항IL-8 항체가, 섬유화 촉진 인자인 Connecting tissue growth factor(CTGF)의 발현 상승을 억제했다. 이 결과는, 항IL-8 항체 등의 IL-8 시그널 저해제가 섬유화 질환에 대한 유망한 치료제 또는 예방제라는 것을 뒷받침하는 것이다.

[0465] 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 자궁내막증에 있어서의 유착이나 섬유화란, 자궁 유래의 조직이, 자궁외(예를 들어, 골반내 장기, 복강내, 또는 흉강내)에 발생하여 증식하는 과정에서 생길 수 있다.

[0466] 본 명세서에 있어서, 간섬유증이란, 한정을 의도하지 않지만, 바이러스 감염 또는 지방화 등에 의한 만성 염증이 발단이 되어, 간장에서 콜라겐 등 세포외 매트릭스(ECM)가 과잉 산생 또는 분해 저하되어, 섬유화되는 질환을 가리킨다. 간섬유증으로서는, 예로서 바이러스성 간염, 알코올성 간염, 비알코올성 지방성 간질환(NAFLD), 원발성 담즙성 간경변(PBC) 등 만성적인 염증을 원인으로 하는 간경변을 들 수 있다.

[0467] A형 및 B형 바이러스성 간염, 알코올성 간염, 원발성 담즙성 간경변 등 만성 간질환에 있어서 IL-8이 상승하는 것(Mediators Inflamm. 2015;2015:276850), 만성 간질환으로 혈중 IL-8 농도가 높고 병태 진행한 환자에서는 특히 높은 것, 수용체인 CXCR1의 발현이 단구에서 높은 것, IL-8이 간장에서의 염증을 강하게 항진하는 것, 이들 결과로부터 IL-8의 섬유화 진행에 대한 기여가 시사되었다(PLoS One. 2011;6(6):e21381)고 보고되어 있다.

[0468] 또한 NASH 환자의 혈장 중 IL-8 농도는 섬유화를 수반한 환자에서 유의하게 높았다는(Gastroenterology. 2015 Sep;149(3):635-48. e14) 것으로부터, IL-8과 섬유화의 관련이 시사되었다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 간섬유증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0469] 본 명세서에 있어서, 신섬유증이란, 한정을 의도하지 않지만, 염증이 발단이 되어 신장에서 콜라겐 등 세포외 매트릭스가 과잉 산생 또는 분해 저하되어 섬유화되는 질환을 가리킨다. 신섬유증으로서는, 예로서 만성 신장염이나 당뇨병 등 만성적인 염증을 원인으로 하는 만성 신장병을 들 수 있다. 만성 신장병이 진행되면, 그 원인 질환에 상관 없이 신장의 섬유화를 초래하고, 일단 생긴 섬유화는 불가역적이어서, 신장에 관해서는 투석 도입이나 신장 이식을 강요받고 있다.

[0470] 신장 섬유아세포가 IL-1을 개재하여 IL-8의 산생을 증강시킨(Kidney Int. 1995 Mar;47(3):845-54.), MCP-1 시그널을 억제함으로써 신섬유증이 개선된(Kitagawa et al, Am J Pathol. 2004 Jul;165(1):237-46.), 인간 섬유세포를 이용하여, 당뇨병 상태에 있어서의 활성화 및 섬유화 기서를 검토한 바, 인간 섬유 세포는 고혈당 및 MCP-1/CCR2를 개재하여 당뇨병성 신부전의 진전에 관여한다는 것이 시사되었다(Clin Exp Nephrol. 2013 Dec;17(6):793-804)는 등의 보고가 있다. IL-8 시그널 저해제는 MCP-1을 산생하는 호중구가 병변부에 유주하는 것을 저해하므로(본 실시예 참조), MCP-1을 개재하여 신섬유증의 진전을 억제, 또는 개선하는 것이 상기된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 신섬유증은 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0471] 본 명세서에 있어서, 폐섬유증이란, 한정을 의도하지 않지만, 염증이 발단이 되어 폐 또는 기관지에서 콜라겐 등 세포외 매트릭스가 과잉 산생 또는 분해 저하되어 섬유화되는 질환을 가리킨다. 폐섬유증으로서는, 예로서 만성 폐색 폐질환(COPD), 기종 합병 폐섬유증(combined pulmonary fibrosis and emphysema; CPFE), 특발성 간질성 폐렴(idiopathic interstitial pneumonias: IIPs)이나 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis:IPF)을 들 수 있다.

[0472] 만성 폐색 폐질환(COPD)이란, 한정을 의도하지 않지만, 담배 연기를 주로 하는 유해 물질을 장기적으로 흡입 폭로함으로써 생긴 폐의 염증성 질환을 가리킨다(COPD(만성 폐색성 폐질환) 진단과 치료를 위한 가이드 라인 제4판). 만성적인 기도나 폐의 염증에 의해, 폐포의 탄성 저하나 기관지 내강의 협착이 일어나 폐로의 공기의 흐

름이 나빠져 기류 폐색 등이 일어나기 때문에, 호흡 곤란이나 만성 기침, 담 등이 나타난다. COPD에서는 환자 담 중에서 IL-8이 높고, 호중구가 많은 것, 환자 호중구 유주 어세이의 주화성 지수와 폐 기능 FEV1/FVC에 상관이 있다는 것이 보고되어 있다(Yamamoto et al, Chest. 1997 Aug;112(2):505-10., Wu et al, PLoS One. 2015 May 11;10(5):). 또한 CXCR2 저해제인 MK7123의 COPD 환자를 대상으로 한 임상 시험에서는 플라시보군에서 악화되는데 대해 실약군에서 폐 기능(FEV1)이 개선되는 것이 보고되어 있다(Am J Respir Crit Care Med. 2015 May 1;191(9):1001-11.).

[0473] 기종 합병 폐섬유증(combined pulmonary fibrosis and emphysema; CPFE)은 한정을 의도하지 않지만, 폐기종이라고 하는 폐가 널리 망가져 가는 병변과 폐섬유증이 합병한 예후 불량의 질환을 가리킨다(Cottin et al, Eur Respir J. 2005 Oct;26(4):586-93.). CPFE에서는 환자 기관지 폐포 세정액 중에서 IL-8이 높은 것, 기관지 폐포 세정액 중에서 IL-8 농도와 흉부 CT에 있어서의 기종성 병변을 나타내는 저농도 흡수치 영역(LAA)이 상관되는 것(Respirology. 2012 Jul;17(5):814-20.), 또한 흉부 CT에 있어서의 기종성 병변을 나타내는 LAA와 예후의 상관을 나타내는 보고도 있다(Johannessen A, et al. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 602-8).

[0474] IIPs란 원인을 특정할 수 없는 여러 가지 간질성 폐렴의 총칭으로, 폐포벽에 염증이나 손상이 일어나, 폐포벽이 두껍고 딱딱하게 섬유화되어, 가스 교환 기능이 저하되는 질환이다(특발성 간질성 폐렴 진단과 치료의 안내 개정 제2판; Travis et al, Am J Respir Crit Care Med. 2013 Sep 15;188(6):733-48). IPF는 IIPs 중 빈도가 높고 가장 치료가 어려우며, 만성이고 진행성인 경과를 더듬어서, 고도의 섬유화가 진행되어 불가역성의 벌집폐 형성을 초래하는 예후 불량의 폐질환이다(특발성 간질성 폐렴 진단과 치료의 안내 개정 제2판; Raghu et al, Am J Respir Crit Care Med. 2011 Mar 15;183(6):788-824). IPF에서는, 질환 환자의 혈청 및 기관지 폐포 세정액 중 IL-8이 높은 값인 것(Car et al, Am J Respir Crit Care Med 1994 ; 149 : 655-659, Ziegenhagen et al, Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 : 762-768), 기관지 폐포 세정액 중에서 IL-8에 의해 유주하는 호중구가 증가하고 있어 높은 값을 나타내는 것은 예후 불량이기(Haslam et al, Thorax 1980; 35: 328-339, Turner-Warwick M et al, Am Rev Respir Dis 1987; 135: 26-34) 때문에, IL-8 및 호중구는 IPF의 병태에 깊게 관여하고 있다는 것을 시사하고 있다. 또한 IPF 환자의 IL-8에 SNIP가 있어 국소 IL-8이 고농도인 것(Ahn et al, Respir Res. 2011 Jun 8;12:73)으로부터도, IL-8이 질환의 원인인 것이 추측된다. 일 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 폐섬유증, COPD, CPFE, IIPs 또는 IPF는 IL-8 시그널에 응답성을 나타낸다.

[0475] 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시는, 섬유화 인자의 산생 저해에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 대상으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에 있어서의 섬유화 인자의 산생 저해 방법, 또는 당해 방법에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 포함하는, 섬유화 인자의 산생 저해를 위한 의약 조성물에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 섬유화 인자의 산생 저해를 위한 의약의 제조에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, 섬유화 인자의 산생 저해에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)와 약학적으로 허용되는 담체를 혼합하는 공정을 포함하는, 섬유화 인자의 산생 저해를 위한 의약 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 어느 실시태양에 있어서, 섬유화 인자로서는, 예를 들어, MCP-1(Monocyte Chemotactic Protein-1)을 들 수 있다. 이와 같은 섬유화 인자의 산생 저해는, 예를 들어, 호중구 등의 면역 세포에서 생겨도 된다.

[0476] 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시는, 혈관 신생 저해에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 대상으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에 있어서의 혈관 신생 저해 방법, 또는 당해 방법에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 포함하는, 혈관 신생 저해를 위한 의약 조성물에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 혈관 신생 저해를 위한 의약의 제조에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, 혈관 신생 저해에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)와 약학적으로 허용되는 담체를 혼합하는 공정을 포함하는, 혈관 신생 저해를 위한 의약 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0477] 본 실시예에서 보인 바와 같이, in vitro 시험에서는, in vivo 실험에 사용한 항IL-8 항체에 더하여, 시판의 항IL-8 항체뿐만 아니라 IL-8 수용체의 저해제를 이용해도 호중구의 유주 저해를 확인할 수 있었다. 이것은, 본 실시예의 in vivo 모델에서의 지견을 일반화, 확장하여, IL-8 시그널 저해제 전반에까지 확장할 수 있다는 것을

당업자는 당연히 이해한다.

[0478] 따라서, 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시는, 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤(어느 측면에 있어서, 유주라고 바꿔 말할 수 있는 경우도 있다)의 억제에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 대상으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에 있어서의 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤의 억제 방법, 또는, 당해 방법에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 포함하는, 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤을 억제하기 위한 의약 조성물에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤을 억제하기 위한 의약의 제조에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤의 억제에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)와 약학적으로 허용되는 담체를 혼합하는 공정을 포함하는, 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부 또는 그 주변 환경으로의 침윤의 억제를 위한 의약 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0479] 어느 실시태양에 있어서, 면역 세포로서는, 예를 들어, 호중구, 매크로파지, 단구, 헬퍼 T 세포, 킬러 T 세포, 수상(樹狀) 세포, NK 세포 등을 들 수 있고, 한정은 의도하지 않지만, 호중구, 매크로파지, 단구가 바람직하다. 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 병변부으로의 침윤이라고 하는 경우, IL-8 관련 질환은 전술한 어느 질환이어도 되고, 예를 들어, 자궁내막증, 자궁선근증, 월경 곤란증, 유착, 섬유화 질환 등을 들 수 있고, 이와 같은 IL-8 관련 질환의 병변부(질환 부위) 또는 그 근방에 면역 세포가 침윤 또는 유주 등 하는 것이 기도될 것이다. 또한, 면역 세포의 IL-8 관련 질환의 주변 환경으로의 침윤이라고 하는 경우, 예를 들어 자궁내막증이면, 복강 내나 복수로의 침윤 또는 유주 등이 기도될 것이고, 예를 들어 폐섬유증이면, 흉강 내나 흉수로의 침윤 또는 유주 등이 기도될 것임이 당업자에게는 이해될 수 있다.

[0480] 추가적인 또는 다른 실시태양에 있어서, 본 개시는, 자궁내막증 또는 자궁선근증의 병변부의 아로마타제의 산생 저해에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 대상으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에 있어서의 아로마타제의 산생 저해 방법, 또는, 당해 방법에 있어서의 사용을 위한 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 유효량의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)를 포함하는, 아로마타제의 산생 저해를 위한 의약 조성물에 관한 것이다. 혹은, 본 개시는, 아로마타제의 산생 저해를 위한 의약의 제조에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, 자궁내막증 또는 자궁선근증의 병변부의 아로마타제의 산생 저해에 있어서의 IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)의 사용에 관한 것이다. 혹은 본 개시는, IL-8 시그널 저해제(예를 들어 항IL-8 항체)와 약학적으로 허용되는 담체를 혼합하는 공정을 포함하는, 자궁내막증 또는 자궁선근증의 병변부의 아로마타제의 산생 저해를 위한 의약 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0481] 본 명세서에 기재된 하나 또는 복수의 모든 태양의 일부 또는 전부를 임의로 조합한 것도, 당업자의 기술 상식에 기초하여 기술적으로 모순되지 않는 한, 본 개시에 포함되는 것이 당업자에게는 당연히 이해된다.

[0482] 본 명세서에 있어서 인용된 모든 선행 기술 문헌은, 당업자의 기술 상식을 참조하여 본 명세서에 원용할 수 있다.

[0483] 본 명세서에 있어서, 「및/또는」의 용어의 의의는, 성구 「및/또는」의 전후의 용어의 조합이며, 「및」과 「또는」이 적절히 조합된 모든 조합을 포함한다고 이해된다.

[0484] 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, · · ·등의 용어가 여러 가지의 요소를 표현하기 위해서 이용되는 경우, 이들 요소는 그들 용어에 의해 한정되어야 하는 것이 아님이 이해된다. 이들 용어는 1개의 요소를 다른 요소와 구별하기 위해서만 이용되고 있는 것이고, 예를 들어, 제 1 요소를 제 2 요소라고 기재하고, 마찬가지로, 제 2 요소를 제 1 요소라고 기재하는 것은, 본 개시의 범위를 일탈하지 않고 가능하다고 이해된다.

[0485] 본 명세서에서 이용되는 「1개의(a)」, 「1개의(an)」, 및 「그(The)」라고 하는 단어는, 그 밖에 구체적으로 지시가 없고, 문맥에 모순되지 않는 한, 「적어도 1개의」를 의미한다.

[0486] 본 명세서에서 이용되는 용어는, 특정의 실시태양을 설명하기 위해서 이용되고, 본 발명 또는 본 개시를 한정하는 의도로서 이해되어서는 안 된다. 다른 정의가 명시되어 있지 않은 한, 본 명세서에서 이용되는 용어(기술

용어 및 과학 용어를 포함한다.)는, 본 개시가 속하는 기술 분야에 있어서의 당업자에 의해 넓게 이해되는 것과 동일한 의미를 가지는 것으로서 해석되고, 또한, 이상화되거나 또는 과도하게 형식적인 의미에 있어서 해석되어서는 안 된다.

[0487] 본 명세서에서 이용되는 용어 「포함한다」는, 문맥상 분명하게 다른 이해를 해야 할 경우를 제외하고, 기술된 사항(부재, 공정, 요소, 숫자 등)이 존재하는 것을 의도하는 것이며, 그 이외의 사항(부재, 공정, 요소, 숫자 등)이 존재하는 것을 배제하지 않는다.

[0488] 본 개시의 실시태양은 모식도를 참조하면서 설명되는 경우가 있지만, 설명을 명확하게 하기 위해서 과장되어 표현되는 경우가 있다.

[0489] 본 명세서에 기재된 수치는, 문맥에 반하지 않는 한, 당업자의 기술 상식에 따라, 일정한 폭을 갖는 값이라고 이해되어도 된다. 예를 들어 「1mg」의 기재는 「약 1mg」이라고 기재되어 있는 것이라고 이해되고, 일정한 변동량을 포함하는 것으로서 이해된다. 또한, 본 명세서에 있어서, 예를 들어, 「1~5개」라고 기재되어 있는 경우, 문맥에 반하지 않는 한, 「1개, 2개, 3개, 4개, 5개」라고, 각각의 값이 개별 구체적으로 기재되어 있는 것으로 이해되어도 된다.

[0490] **실시예**

[0491] 〔실시예 1〕 혈장 중 체류성 개선을 위해서 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn 결합을 증대시킨 신규 Fc 영역 개변체의 제작

[0492] 세포 내에 흡수된 IgG 항체는, 엔도솜 내의 산성 pH의 조건하에 있어서, FcRn에 결합하는 것에 의해 혈장 중으로 되돌려지는 것이 알려져 있다. 그 때문에, IgG 항체는 일반적으로, FcRn에 결합하지 않는 단백질에 비해, 긴 혈장 중 반감기를 갖고 있다. 그 성질을 이용하여, 항체의 Fc 영역에 아미노산 개변을 도입함으로써, 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn에 대한 결합능(결합 친화성)을 증대시켜, 항체의 혈장 중 체류성을 향상시키는 방법이 이미 알려져 있다. 구체적으로는, M252Y/S254T/T256E(YTE) 개변(J Biol Chem 2006 281:23514-23524.)이나, M428L/N434S(LS) 개변(Nat Biotechnol, 2010 28:157-159.), N434H 개변(Clinical Pharmacology & Therapeutics (2011) 89(2):283-290.) 등의 아미노산 개변에 의해, 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn에 대한 결합능을 증대시켜, 항체의 혈장 중 체류성을 향상시키는 방법이 알려져 있다.

[0493] 한편으로, 상기와 같이, 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn에 대한 결합성을 증대시킨 Fc 영역 개변체는, 류마토이드 인자(RF)에 대한 결합성을 나타낸다는 것도 알려져 있다(WO2013046704). 그래서, 류마토이드 인자에 대한 결합을 나타내지 않고, 혈장 중 체류성을 개선하는 것이 가능한 Fc 영역 개변체의 제작을 목표로 하여, 이하와 같은 검토를 실시했다.

[0494] (1-1) Fc 영역 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 제작

[0495] 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn 결합능을 증대시킨 Fc 영역 개변체로서, 공지의 개변인 YTE, LS 및 N434H와, 새로이 발견된 어느 것인가의 Fc 영역 개변체(F1847m, F1848m, F1886m, F1889m, F1927m, F1168m)를, 이하에 나타내는 바와 같이 제작했다.

[0496] 항인간 IL-6 리셉터 항체인 Fv4-IgG1의 중쇄(VH3-IgG1m)의 Fc 영역에, 아미노산 개변을 도입한 유전자를, 참고 실시예 1의 방법으로 제작했다. 이들 중쇄를 이용하여, 참고 실시예 2의 방법에 의해, 이하의 항체를 제작했다.

[0497] 중쇄로서 VH3-IgG1m(서열 번호: 2), 경쇄로서 VL3-CK(서열 번호: 110)로 이루어지는 Fv4-IgG1,

[0498] 중쇄로서 VH3-YTE(서열 번호: 3), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-YTE,

[0499] 중쇄로서 VH3-LS(서열 번호: 4), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-LS,

[0500] 중쇄로서 VH3-N434H(서열 번호: 5), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-N434H,

[0501] 중쇄로서 VH3-F1847m(서열 번호: 6), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1847m,

[0502] 중쇄로서 VH3-F1848m(서열 번호: 7), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1848m,

[0503] 중쇄로서 VH3-F1886m(서열 번호: 8), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1886m,

[0504] 중쇄로서 VH3-F1889m(서열 번호: 9), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1889m,

[0505] 중쇄로서 VH3-F1927m(서열 번호: 10), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1927m,

[0506] 중쇄로서 VH3-F1168m(서열 번호: 11), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1168m

[0507] (1-2) 인간 FcRn에 대한 결합의 속도론적 해석

[0508] 중쇄로서 VH3-IgG1m 또는 상기의 개변체를 포함하고, 경쇄로서 L(WT)(서열 번호: 1)을 포함하는 항체가 참고 실시예 2에 나타낸 방법으로 제작되어, 하기와 같이 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 평가되었다.

[0509] Biacore T100(GE Healthcare)을 이용하여, 인간 FcRn과 각 항체의 속도론적 해석을 행했다. 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 프로틴 L(ACTIGEN)을 적당량 고정화하고, 거기에 목적하는 항체를 포착시켰다. 다음에, FcRn 희석액과 러닝 버퍼(참조 용액으로서)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착시킨 항체에 인간 FcRn을 상호 작용시켰다. 러닝 버퍼에는 50mM 인산 나트륨, 150mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, pH 6.0을 이용하고, FcRn의 희석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 센서 칩의 재생에는 10mM 글리신-HCl, pH 1.5가 이용되었다. 측정은 모두 25℃에서 실시되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 카이네틱스 파라미터인 결합 속도 상수 ka(1/Ms), 및 해리 속도 상수 kd(1/s)를 기초로 각 항체의 인간 FcRn에 대한 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)가 이용되었다.

[0510] 그 결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

[0511]

변이체명	아미노산 변이	pH6.0에 있어서의 hFcRn에 대한 KD치(nM)
IgG1		1382
LS	M428L/N434S	116
YTE	M252Y/S254T/T256E	148
F1847m	N434A/Y436T/Q438R/S440E	367
F1848m	N434A/Y436V/Q438R/S440E	295
F1886m	M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E	108
F1889m	M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E	103
F1927m	M428L/N434A/Q438R/S440E	125
F1168m	N434A/Q438R/S440E	410

[0512] 〔실시예 2〕 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn 결합을 증대시킨 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 류마토이드 인자에 대한 결합성 평가

[0513] 항의약품 항체(ADA)는 치료용 항체의 효과 및 약물 동태에 영향을 미쳐, 가끔 중한 부작용을 가져오는 일이 있기 때문에, 임상에 있어서의 치료용 항체의 유용성과 약효는 ADA의 산생에 의해 제한될 수 있다. 치료용 항체의 면역원성에는, 많은 요인이 영향을 미치지만, 이펙터 T 세포 에피토프의 존재가 그 요인의 하나이다. 게다가, 치료용 항체의 투여 전부터 환자가 갖고 있는 ADA(「Pre-existing ADA」라고도 한다)의 존재도 또한, 마찬가지로 문제가 있다고 생각된다. 특히, 관절 류머티즘(RA) 등의 자기 면역 질환의 환자에 대한 치료용 항체의 경우, 인간 IgG에 대한 자기 항체인 류마토이드 인자(RF)가 「Pre-existing ADA」의 문제가 될 수 있다. 최근, N434H(Asn434His) 변이를 갖는 인간화 항CD4 IgG1 항체가 현저한 류마토이드 인자 결합을 유발한다는 것이 보고되었다(Clin Pharmacol Ther. 2011 Feb;89(2):283-90). 상세한 연구에 의해, 인간 IgG1에 있어서의 N434H 변이가, 친인간 IgG1과 비교하여 항체의 Fc 영역에 대한 류마토이드 인자의 결합을 증대시킨다는 것이 확인되었다.

[0514] 류마토이드 인자는 인간 IgG에 대한 폴리클로날 자기 항체이며, 인간 IgG 중의 그들의 에피토프는 클론에 따라 상이하지만, 그들의 에피토프는, CH2/CH3 계면 영역 중, 및 FcRn 결합 에피토프와 중복할 수 있는 CH3 도메인 중에 위치하는 것 같다. 그 때문에, FcRn에 대한 결합 활성(결합 친화성)을 증대시키는 변이는, 류마토이드 인자의 특정 클론에 대한 결합 활성(결합 친화성)을 증대시킬 가능성이 있다.

[0515] 실제로, 산성 pH 또는 중성 pH에 있어서의 FcRn에 대한 결합성을 증대시킨 Fc에서는, N434H 개변에는 한정되지 않고, 그 이외의 많은 아미노산 개변에 의해서도 마찬가지로 류마토이드 인자에 대한 결합이 증대된다는 것이 알려져 있다(WO2013/046704).

[0516] 한편으로, 동일하게 WO2013/046704 중에서, FcRn에 대한 결합성에는 영향을 주지 않고 류마토이드 인자에 대한 결합성을 선택적으로 억제하는 몇몇의 아미노산 개변이 예시되고, 그 중에 2 아미노산 변이의 조합인 Q438R/S440E, Q438R/S440D, Q438K/S440E 또는 Q438K/S440D가 나타나고 있다. 그래서, 이번에 새로이 제작된, 산성 pH 조건에 있어서의 결합능이 증대된 Fc에 대해서도, Q438R/S440E를 도입함으로써 류마토이드 인자에 대한 결합성을 저하시키는 것이 가능한지 여부를 검증했다.

[0517] (2-1) 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 류마토이드 인자에 대한 결합 시험

[0518] 류마토이드 인자에 대한 결합 어세이는, 30명의 RA 환자의 개개의 혈청(Proteogenex)을 이용하여, pH 7.4에 있어서의 전기화학발광(ECL)에 의해 행했다. 50배 희석한 혈청 시료, 비오틴 표지한 각 시험 항체(1μg/mL), 및 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery) 표지한 각 시험 항체(1μg/mL)를 혼합하고, 실온에서 3시간 인큐베이트했다. 그 후, 혼합물을 Streptavidin으로 코팅된 MULTI-ARRAY 96 웰 플레이트(Meso Scale Discovery)에 가하고 플레이트를 실온에서 2시간 인큐베이트하고, 세정했다. Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)를 각 웰에 가한 후, 즉시 플레이트를 SECTOR imager 2400 Reader(Meso Scale Discovery)에 세팅하여, 화학발광을 측정했다.

[0519] 이 시험의 결과를 도 1 내지 도 10에 나타낸다. 천연 인간 IgG1을 갖는 Fv4-IgG1(도 1)은, 약한 류마토이드 인자 결합밖에 나타내지 않았는데 대해, 기존의 FcRn 결합 증대 Fc 영역 개변체인 Fv4-YTE(도 2), Fv4-LS(도 3), Fv4-N434H(도 4)는 모두, 복수의 도너에 있어서 류마토이드 인자 결합이 유의하게 증대되어 있었다. 한편, 신규의 FcRn 결합 증대 Fc 영역 개변체인 Fv4-F1847m(도 5), Fv4-F1848m(도 6), Fv4-F1886m(도 7), Fv4-F1889m(도 8), Fv4-F1927m(도 9), Fv4-F1168m(도 10)에 대해서는, 모두 약한 류마토이드 인자 결합밖에 나타내지 않아, FcRn 결합 증대 개변에 의한 류마토이드 인자 결합을 현저하게 억제할 수 있다는 것이 나타났다.

[0520] 또한, 도 11은, 각각의 개변체에 대해, 30명의 RA 환자의 혈액에 있어서의 류마토이드 인자에 대한 결합성의 평균치를 나타낸 것이다. 6종류의 신규한 개변체는 모두, 3종의 기존의 개변체(YTE, LS, N434H)보다 낮은 결합성을 나타내고, 또한 천연형 인간 IgG1과 비교해도, 보다 낮은 류마토이드 인자에 대한 결합성을 나타냈다. 이상으로부터, 관절 류머티즘 등의 자기 면역 질환 등에 대해, FcRn에 대한 결합능이 개선된 치료용 항체의 임상 개발을 고려하는 경우에, 기존의 Fc 영역 개변체에 있어서 염려되는 류마토이드 인자에 관련된 리스크는, 이번 신규하게 제작된 Fc 영역 개변체에 있어서는 억제되고 있어, 보다 안전하게 사용 가능하다는 것이 생각된다.

[0521] 〔실시예 3〕 산성 pH 조건에 있어서의 FcRn 결합을 증대시킨 신규 Fc 영역 개변체의, 필리핀원숭이에 있어서의 PK 평가

[0522] 실시예 3에 있어서, 류마토이드 인자에 대한 결합이 억제되고 있는 것이 확인된 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체를 이용하여, 필리핀원숭이에 있어서의 혈장 중 체류성의 개선 효과를 이하의 방법으로 평가했다.

[0523] (3-1) 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 제작

[0524] 이하의 항인간 IgE 항체를 제작했다.

[0525] 중쇄로서 OHBH-IgG1(서열 번호: 12), 경쇄로서 OHBL-CK(서열 번호: 13)로 이루어지는 OHB-IgG1,

[0526] 중쇄로서 OHBH-LS(서열 번호: 14), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-LS,

[0527] 중쇄로서 OHBH-N434A(서열 번호: 15), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-N434A

[0528] 중쇄로서 OHBH-F1847m(서열 번호: 16), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-F1847m,

[0529] 중쇄로서 OHBH-F1848m(서열 번호: 17), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-F1848m,

[0530] 중쇄로서 OHBH-F1886m(서열 번호: 18), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-F1886m,

[0531] 중쇄로서 OHBH-F1889m(서열 번호: 19), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-F1889m,

[0532] 중쇄로서 OHBH-F1927m(서열 번호: 20), 경쇄로서 OHBL-CK로 이루어지는 OHB-F1927m

[0533] (3-2) 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 원숭이 PK 시험

[0534] 필리핀원숭이에 항인간 IgE 항체를 투여한 후의, 혈장 중 항인간 IgE 항체의 체내동태를 평가했다. 항인간 IgE 항체의 용액을 2mg/kg으로 단회 정맥내 투여했다. 투여 후 5분, (2시간), 7시간, 1일, 2일, 3일, (4일), 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일, 49일, 56일에 채혈을 행했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000 rpm으로 5분간

원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지, -80℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다. 항인간 IgE 항체로서는, OHB-IgG1, OHB-LS, OHB-N434A, OHB-F1847m, OHB-F1848m, OHB-F1886m, OHB-F1889m, OHB-F1927m의 8종류를 사용했다.

[0535] (3-3) ELISA법에 의한 혈장 중 항인간 IgE 항체의 농도 측정

[0536] 필리핀원숭이 혈장 중의 항인간 IgE 항체 농도는 ELISA법으로 측정했다. 우선 항인간 IgG kappa chain 항체(Antibody Solution)를 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)에 분주하고, 4℃에서 하룻밤 정치하여 항인간 IgG kappa chain 항체 고상화 플레이트를 제작했다. 혈장 중 농도로서 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10ng/mL의 검량선 시료와 100배 이상 희석한 필리핀원숭이 혈장 측정 시료를 조제했다. 이들 검량선 시료 및 혈장 측정 시료에는 필리핀원숭이 IgE(사내 조제품)가 1μg/ml의 농도로 첨가되도록 제작되었다. 그 후, 항인간 IgG kappa chain 항체 고상화 플레이트에 분주하여 실온에서 2시간 정치했다. 그 후 HRP-항인간 IgG gamma chain 항체(Southern Biotech)를 분주하여 실온에서 1시간 정치했다. 그 후, TMB Chromogen Solution(Life Technologies)을 기질로서 이용하여 발색 반응을 행하고, 1N-Sulfuric acid(Wako)로 반응 정지 후, 마이크로플레이트 리더로 450nm의 흡광도를 측정했다. 원숭이 혈장 중 항인간 IgE 항체 농도는 검량선의 흡광도로부터 해석 소프트웨어 SOFTmax PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출했다. 측정한 원숭이 혈장 중 항인간 IgE 항체의 농도 추이는 도 12에 나타냈다. 또한 측정한 원숭이 혈장 중 항인간 IgE 항체의 농도 추이로부터 Phoenix WinNonlin Ver. 6.2(Pharsight Corporation)를 이용하여 모멘트 해석에 의해 소실 클리어런스를 산출했다. 산출한 약물 동태학적 파라미터는 표 3에 나타냈다. 혈장 중 항투여 검체 항체가 양성을 나타낸 개체는 원숭이 혈장 중 항인간 IgE 항체의 농도 추이 및 클리어런스의 산출로부터 제외했다.

표 3

항인간 IgE 항체를 투여 후의 각 투여 검체의 소실 클리어런스

[0537]

검체명	소실 클리어런스 (mL/day/kg)
OHB-IgG1	9.33
OHB-F1847m	2.83
OHB-F1848m	4.02
OHB-F1886m	1.92
OHB-F1889m	2.39
OHB-F1927m	1.51
OHB-LS	1.80
OHB-N434A	4.36

[0538] (3-4) 전기화학발광법에 의한 혈장 중 항투여 검체 항체의 측정

[0539] 원숭이의 혈장 중 항투여 검체 항체는 전기화학발광법으로 측정했다. SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)로 루테늄화한 투여 검체, EZ-Link Micro Sulfo-NHS-Biotinylation Kit(Pierce)로 비오틴화한 투여 검체 및 필리핀원숭이 혈장 측정 시료를 등량 혼합하고, 4℃에서 하룻밤 정치했다. MULTI-ARRAY 96-well Streptavidin Gold Plate(Meso Scale Discovery)에 시료를 첨가 후 실온에서 2시간 반응시키고 세정 후, Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)를 분주하여, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 측정을 행했다.

[0540] 그 결과, 신규 Fc 영역 개변체는 모두, 천연형 IgG1의 경우와 비교하여, 대폭적인 혈장 중 체류성의 개선이 확인되었다.

[0541] (3-5) Fc 영역 개변체의 마우스 PK 시험

[0542] 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합 증대를 위한 Fc 영역 개변체로서 WO2013/046704에 기재된 Fc 영역 개변체인 F1718과 이번에 신규하게 발견된 Fc 영역 개변체인 F1848m을 비교하기 위해서, 이하와 같은 실험을 실시했다.

[0543] 항인간 IL-6 리셉터 항체인 Fv4-IgG1의 중쇄(VH3-IgG1)의 Fc 영역에, 아미노산 개변을 도입한 유전자를, 참고

실시예 1의 방법으로 제작했다. 이들 중쇄를 이용하여, 참고 실시예 2의 방법에 의해, 이하의 항체를 제작했다.

[0544] 중쇄로서 VH3-IgG1, 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-IgG1,

[0545] 중쇄로서 VH3-F1718(서열 번호: 21), 경쇄로서 VL3-CK로 이루어지는 Fv4-F1718

[0546] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 32 +/+ mouse, Jackson Laboratories, Methods Mol. Biol. (2010) 602, 93-104)의 꼬리 정맥에, 상기 항인간 IL-6 리셉터 항체가 1mg/kg으로 단회 투여되었다. 항인간 IL-6 리셉터 항체의 투여 후 15분, 7시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일의 시점에서 채혈을 행했다. 채취된 혈액을 즉시 4℃, 15,000rpm으로 15분간 원심분리하는 것에 의해, 혈장이 얻어졌다. 분리된 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -20℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존되었다.

[0547] (3-6) ELISA법에 의한 혈장 중 항인간 IL-6 리셉터 항체의 농도 측정

[0548] 마우스 혈장 중의 항인간 IL-6 리셉터 항체의 농도는 ELISA법으로 측정되었다. 우선, Anti-Human IgG(gamma-chain specific) $F(ab')_2$ Fragment of Antibody(SIGMA)를 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)에 분주하여, 4℃에서 하룻밤 정치하는 것에 의해 Anti-Human IgG 고상화 플레이트가 제작되었다. 혈장 중 농도로서 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125μg/mL의 항인간 IL-6 리셉터 항체를 포함하는 검량선 시료와 100배 이상 희석된 마우스 혈장 측정 시료가 조제되었다. 이들 검량선 시료 및 혈장 측정 시료 100μL에 20ng/mL의 가용형 인간 IL-6 리셉터가 200μL 가해진 혼합액을, 실온에서 1시간 정치시켰다. 그 후, 당해 혼합액이 각 웰에 분주된 Anti-Human IgG 고상화 플레이트를 추가로 실온에서 1시간 정치시켰다. 그 후, Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D)와 실온에서 1시간 반응시키고, 추가로 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)을 실온에서 1시간 반응시킨 반응액의 발색 반응이, TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)를 기질로서 이용하여 행해졌다. 1N-Sulfuric acid(Showa Chemical)를 첨가하는 것에 의해 반응이 정지된 각 웰의 반응액의 450nm의 흡광도가, 마이크로플레이트 리더로 측정되었다. 마우스 혈장 중의 항체 농도는 검량선의 흡광도로부터 해석 소프트웨어 SOFTmax PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출되었다.

[0549] 결과를 도 13에 나타낸다. WO2013/046704에 기재가 있는, 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합 증대를 위한 Fc 영역 개변체인 F1718은, 항체 PK의 연장 효과를 나타내지 않고, 천연형 IgG1의 경우와 동등한 혈장 중 체류성을 나타냈다.

[0550] 여기에서, WO2013/046704에 기재된 F1718에는, Fc 영역에 N434Y/Y436V/Q438R/S440E라고 하는 4개소의 변이가 도입되어 있다. 한편, 이번에 새로이 발견된 F1848m에는, N434A/Y436V/Q438R/S440E라고 하는 4개소의 변이가 도입되어 있다. 이들 2종류의 Fc에 도입되어 있는 아미노산 변이의 차이는, EU 넘버링 434번에 도입되어 있는 아미노산 변이가, F1718은 Y(티로신)이며, F1848m은 A(알라닌)라고 하는 점뿐이다. 실시예 (3-2)에 있어서, F1848m은 천연형 IgG1의 경우에 비해 혈장 중 체류성의 향상이 인정된 한편으로, F1718은 혈장 중 체류성의 향상이 인정되지 않았다. 이것으로부터, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 혈장 중 체류성의 향상을 위해서 이용되는 아미노산 변이로서 434번째에 도입되는 아미노산 변이로서는, A(알라닌)가 바람직하다는 것이 시사된다.

[0551] 〔실시예 4〕 인간화 항인간 IL-8 항체의 제작

[0552] (4-1) 인간화 항인간 IL-8 항체 hWS-4의 제작

[0553] US6245894(WO1996/002576) 중에서 개시되어 있는 인간화 항IL-8 항체는, 인간 IL-8(이하, hIL-8이라고도 표기한다)과 결합하는 것에 의해, 그 생리 작용을 차단한다. 인간화 항IL-8 항체는, US6245894에 개시되어 있는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 서열과 임의의 인간 항체의 정상 영역 서열을 조합하여 작성 가능하다. 인간 항체의 정상 영역 서열로서는, 특별히 한정은 되지 않지만, 중쇄 정상 영역으로서 천연형 인간 IgG1 서열 또는 천연형 인간 IgG4 서열, 경쇄 정상 영역 서열로서 천연형 인간 Kappa 서열을 이용할 수 있다.

[0554] 여기에서, US6245894 중에서 개시되어 있는 인간화 IL-8 항체 중, 중쇄 가변 영역 RVHg와, 중쇄 정상 영역으로서 천연형 인간 항IgG1 서열을 조합한 hWS4H-IgG1(서열 번호: 39)의 유전자를, 참고 실시예 1의 방법으로 작성했다. 추가로, 경쇄 가변 영역 RVLa와, 경쇄 정상 영역으로서 천연형 인간 Kappa 서열을 조합한 hWS4L-k0MT(서열 번호: 40)의 유전자를, 참고 실시예 1의 방법으로 작성했다. 상기의 중쇄 및 경쇄를 조합한 항체를 제작하여, 인간화 WS-4 항체(이하, hWS-4)로 했다.

[0555] (4-2) 인간화 항인간 IL-8 항체 Hr9의 제작

[0556] hWS-4에서 사용되고 있는 FR과는 상이한 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 이용하여, 새로운 인간화 항체를 제작했다.

[0557] 구체적으로는, 중쇄의 FR1로서 VH3-23과 VH3-64의 하이브리드 서열, FR2로서 VH3-15나 VH3-49 등에서 보이는 서열, FR3으로서 VH3-72에서 보이는 서열(단 Kabat 넘버링 82a를 제외한다), FR4로서는 JH1 등에서 보이는 서열을 이용하여, 이것들을 hWS-4 중쇄의 CDR 서열과 연결하여, 신규의 인간화 항체의 중쇄인 Hr9-IgG1(서열 번호: 41)을 제작했다.

[0558] 다음에, 중쇄로서 hWS4H-IgG1, 경쇄로서 hWS4L-kOMT를 갖는 hWS-4와, 중쇄로서 Hr9-IgG1, 경쇄로서 hWS4L-kOMT를 갖는 Hr9의 2종류의 항체를 제작했다. 한편, 본 개시에 있어서, 특별히 경쇄를 명기하고 싶은 경우에 있어서는, Hr9(그 중쇄 가변 영역의 서열을 서열 번호: 33으로 나타낸다.)는 Hr9/hWS4L로도 표기된다. 항체는, FreeStyle 293F 세포(Invitrogen)를 이용하여, 제품에 첨부된 프로토콜에 따라 발현시켰다. 배양 상청으로부터의 항체의 정제는 참고 실시예 2의 방법으로 행했다. 그 결과, 표 4에 나타내는 양의 항체가 취득되었다. 놀랍게도, Hr9의 발현량은, hWS-4의 발현량에 비해 약 8배였다.

표 4

[0559]

	배지 1mL 당의 항체 수량 (μg)
hWS-4	6.4
Hr9	50

[0560] (4-3) hWS-4 및 Hr9의 인간 IL-8 결합 활성

[0561] hWS-4 및 Hr9의 인간 IL-8에 대한 결합 친화성을, Biacore T200(GE Healthcare)을 이용하여 이하와 같이 측정했다.

[0562] 러닝 버퍼는, 0.05% tween20, 20mM ACES, 150mM NaCl(pH 7.4)의 조성의 것을 이용했다.

[0563] 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 프로틴 A/G(PEIRCE)를 적당량 고정화하고, 거기에 목적하는 항체를 포착시켰다. 다음에, 인간 IL-8 희석액과 러닝 버퍼(참조 용액으로서)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착시킨 항체에 인간 IL-8을 상호 작용시켰다. 한편, 러닝 버퍼는 상기의 조성의 용액이 이용되고, 인간 IL-8의 희석에도 당 버퍼가 사용되었다. 센서 칩의 재생에는 10mM 글리신-HCl, pH 1.5가 이용되었다. 측정은 모두 37℃에서 실시되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 카이네틱스 파라미터인 결합 속도 상수 kon(1/Ms), 및 해리 속도 상수 koff(1/s)를 기초로 각 항체의 인간 IL-8에 대한 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 이용되었다.

[0564] 결과를 표 5에 나타낸다. hWS-4와 Hr9는, 인간 IL-8에 대해서 동등한 결합 친화성을 갖는다는 것이 확인되었다.

표 5

[0565]

항체명	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
hWS-4	9.74E+05	2.03E-04	2.09E-10
Hr9	1.11E+06	2.17E-04	1.95E-10

[0566] 항체 의약품의 개발에 있어서, 항체 분자의 산생량은 중요한 인자이며, 일반적으로 높은 산생량이 바람직하다. 상기의 검토에 의해, hWS-4의 HVR 서열과 조합해야 할, 보다 적절한 인간 컨센서스 프레임워크 유래의 서열이 선택되어, 인간 IL-8에 대한 결합 친화성을 유지한 채로 산생량이 개선된 Hr9가 얻어졌다는 것은 특필해야 할 점이다.

[0567] 〔실시예 5〕 pH 의존적 IL-8 결합능을 갖는 항체의 취득

[0568] (5-1) pH 의존성 부여를 위한 Hr9 개변 항체의 제작

[0569] 실시예 4에서 얻어진 Hr9에 대해서 pH 의존적 IL-8 결합능을 부여하는 것을 목적으로 하여, 검토를 행했다.

[0570] 특정의 이론에 구속되는 것은 아니지만, IL-8에 대한 pH 의존적 결합능을 갖는 항체는, 생체 내에 있어서 다음과 같은 거동을 나타낸다고 생각할 수 있다. 생체에 투여된 당해 항체는, 중성 pH로 유지되고 있는 환경(예를 들어 혈장 중)에 있어서, IL-8에 대해서 강하게 결합하여, 그 기능을 차단할 수 있다. 이와 같은 IL-8과 항체의 복합체의 일부는, 세포막과의 비특이적인 상호 작용(피노사이토시스)에 의해 세포 내로 흡수된다(이하, 비특이적인 흡수이라고 한다). 엔도솜 내의 산성 pH의 조건하에 있어서는, 상기 항체의 IL-8에 대한 결합 친화성이 약해지기 때문에, 상기 항체는 IL-8을 해리한다. 그 후, IL-8을 해리한 상기 항체는, FcRn을 개재하여 세포 외로 돌아올 수 있다. 이와 같이 세포 외(혈장 중)로 돌아온 상기 항체는, 재차 다른 IL-8에 결합하여, 그 기능을 차단하는 것이 가능하다. IL-8에 대해서 pH 의존적 결합능을 갖는 항체는, 상기와 같은 메커니즘에 의해서도, IL-8에 대해서 복수회 결합하는 것이 가능하게 된다고 생각할 수 있다.

[0571] 한편, 상기 항체와 같은 성질을 갖지 않는 항체의 경우, 1분자의 항체는 1번만 항원을 중화시키는 것이 가능하고, 항원을 복수회 중화시킬 수 없다. 통상, IgG 항체는 2개의 Fab를 갖기 때문에, 1개의 항체 분자는 2분자의 IL-8을 중화시킬 수 있다. 한편, IL-8에 복수회 결합할 수 있는 항체는, 생체 내에 체류하고 있는 한, 몇 번이라도 IL-8에 결합할 수 있다. 예를 들어, 투여되고 나서 소실될 때까지에, 세포 내에 10회 흡수된 pH 의존적 IL-8 결합 항체는, 1분자로도 최대로 20분자의 IL-8을 중화시키는 것이 가능하다. 그 때문에, 복수회 IL-8에 결합할 수 있는 항체는, 보다 적은 항체량이어도, 많은 IL-8을 중화시킬 수 있다고 하는 이점을 가진다. 다른 관점에서는, 복수회 IL-8에 결합할 수 있는 항체는, 동일한 양의 항체를 투여했을 경우에, 보다 장기간에 걸쳐서 IL-8을 중화시키는 것이 가능한 상태를 유지할 수 있다고 하는 이점을 가진다. 또한, 추가로 다른 관점에서는, 복수회 IL-8에 결합할 수 있는 항체는, 동일한 양의 항체를 투여했을 경우에, 보다 강하게 IL-8의 생물학적 활성을 차단할 수 있다고 하는 이점을 가진다.

[0572] 이들 이점을 실현하기 위해서, 복수회 IL-8에 결합할 수 있는 항체를 창제하는 것을 목적으로 하여, Hr9-IgG1 및 WS4L-kOMT의 가변 영역에 대해서, 히스티딘을 중심으로 한 아미노산 개변을 도입했다. 구체적으로는, 표 6에 나타내는 개변체를 참고 실시예 1 및 2의 방법으로 제작했다.

[0573] 한편, 표 6에 있어서 나타나고 있는 「Y97H」와 같은 표기는, Kabat 넘버링에 의해 정의되는 변이 도입 개소와 변이 도입 전의 아미노산, 변이 도입 후의 아미노산을 나타낸 것이다. 구체적으로는, 「Y97H」라고 표기했을 경우, Kabat 넘버링 97번의 아미노산 잔기를, Y(티로신)로부터 H(히스티딘)로 치환한 것을 나타내고 있다. 더욱이, 복수의 아미노산 치환을 조합하여 도입했을 경우에는, 「N50H/L54H」와 같이 기재한다.

표 6

[0574]

항체명	중쇄에 도입된 변이	경쇄에 도입된 변이
Hr9/WS4L	없음	없음
Hr9/L16	없음	L54H
H89/WS4L	Y97H	없음
H89/L12	Y97H	N50H
H89/L16	Y97H	L54H

[0575] (5-2) pH 의존적 IL-8 결합능

[0576] 실시예 5-1에서 작성된 항체의 인간 IL-8 결합 친화성을, Biacore T200(GE Healthcare)을 이용하여 이하와 같이 측정했다. 러닝 버퍼는 이하의 2종을 이용했다.

[0577] · 0.05% tween20, 20mM ACES, 150mM NaCl, pH 7.4

[0578] · 0.05% tween20, 20mM ACES, 150mM NaCl, pH 5.8

[0579] 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 프로틴 A/G(PIERCE)를 적당량 고정화하고, 거기에 목적하는 항체를 포착시켰다. 다음에, 인간 IL-8 희석액과 러닝 버퍼(참조 용액으로서)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착시킨 항체에 인간 IL-8을 상호 작용시켰다. 한편, 러닝 버퍼는 상기 중 한쪽이 이용되고, 인간 IL-8의 희석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 센서 칩의 재생에는 10mM 글리신-HCl, pH 1.5가 이용되었다. 측정은 모두 37℃에서 실시되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 카이네틱스 파라미터인 결합 속도 상수 kon(1/Ms), 및 해리 속도 상수 koff(1/s)를 기초로 각 항체의 인간 IL-8에 대한 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 이용되었다.

[0580] 결과를 표 7에 나타낸다. 우선, 경쇄에 L54H 개변을 포함하는 Hr9/L16은, 중성 pH(pH 7.4)에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성이 Hr9보다 약간 증강되어 있는 한편으로, 산성 pH(pH 5.8)에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성이 저하되어 있었다. 한편, 중쇄에 Y97H 개변을 포함하는 H89와 각종 경쇄를 조합한 항IL-8 항체(H89/WS4L, H89/L12, 및 H89/L16)는 모두, 산성 pH에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성은 저하되어 있음과 동시에, 중성 pH에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성도 저하되어 있었다.

표 7

[0581]

항체명	pH	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)	kon 비 (pH7.4/pH5.8)	koff 비 (pH5.8/pH7.4)	KD 비 (pH5.8/pH7.4)
Hr9	pH 7.4	8.59E+05	2.11E-04	2.46E-10			
(Hr9/WS4L)	pH 5.8	3.23E+05	4.69E-04	1.45E-09	2.7	2.2	5.9
Hr9/L16	pH 7.4	8.90E+05	9.57E-05	1.08E-10			
	pH 5.8	3.91E+04	1.97E-04	5.04E-09	22.8	2.1	46.8
H89/WS4L	pH 7.4	8.51E+05	7.65E-04	8.99E-10			
	pH 5.8	1.62E+05	7.27E-03	4.48E-08	5.2	9.5	49.8
H89/L12	pH 7.4	5.95E+05	2.48E-04	4.17E-10			
	pH 5.8	1.19E+05	3.52E-03	2.96E-08	5.0	14.2	71.0
H89/L16	pH 7.4	6.02E+05	4.21E-04	6.99E-10			
	pH 5.8	1.20E+05	4.22E-03	3.51E-08	5.0	10.0	50.3
H89/L63	pH 7.4	5.37E+05	1.13E-04	2.10E-10			
	pH 5.8	2.62E+05	2.10E-03	8.04E-09	2.1	18.7	38.3
H89/L118	pH 7.4	5.80E+05	2.13E-05	3.67E-11			
	pH 5.8	1.79E+05	3.84E-03	2.15E-08	3.2	180.3	585.0

[0582] (5-3) pH 의존성 부여를 위한 새로운 개변 항체의 제작과 평가

[0583] 그래서 다음에, 5-2에서 발견된 유망한 개변의 조합과, 새로운 아미노산 변이의 탐색을 행하여, 그 결과, 이하의 조합이 발견되었다.

[0584] [표 7-2]

[0585]

항체명	중쇄에 도입된 변이	경쇄에 도입된 변이
H89/L63	Y97H	N50H/L54H
H89/L118	Y97H	N50H/L54H/Q89K

[0586] 이들 개변체를 참고 실시예 1 및 2의 방법으로 작성하여, 실시예 5-2와 마찬가지의 방법으로 인간 IL-8에 대한 결합 친화성을 평가했다.

[0587] 그 결과를 표 7에 아울러 기재했다. 중쇄로서 H89-IgG1(서열 번호: 42), 경쇄로서 L63-kOMT(서열 번호: 43)를 갖는 H89/L63은, 중성 pH(pH 7.4)에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성이 Hr9와 동등한 채로, 산성 pH(pH 5.8)에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성이 저하되어 있었다. 구체적으로는, H89/L63은, pH 5.8에 있어서의 koff(해리 속도 상수) 및 KD(해리 상수)의 양방이, Hr9보다 커지고 있었다. 이것은, 엔도솜 내의 산성 pH 조건하에 있어서, H89/L63은 인간 IL-8을 해리하기 쉬운 성질을 갖고 있다는 것을 의미하고 있다.

[0588] 더욱이, 놀랍게도, 중쇄로서 H89-IgG1, 경쇄로서 L118-kOMT(서열 번호: 44)를 갖는 H89/L118은, 중성 pH 조건에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성(KD)은 Hr9보다 증강되어 있는데 대해, 산성 pH 조건에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성(KD)은 Hr9보다 감약되어 있었다. 특별히 한정은 되지 않지만, 일반적으로 항원에 복수회 결합할 수 있는 항체를 의약품으로서 사용할 때에는, pH 의존적 항원 결합 항체는, 중성 pH 조건하(예를 들어, 혈장 중)에서 항원을 강하게 중화시키는 것이 가능하도록, 강한 결합 친화성을 갖는(KD가 작은) 것이 바람직하다. 한편, 산성 pH 조건하(예를 들어, 엔도솜 내)에서, 항원을 신속하게 해리하는 것이 가능하도록, 해리 속도 상수

(koff)가 큰 것, 및/또는 약한 결합 친화성을 갖는(KD가 큰) 것이 바람직하다. H89/L118은, 이들 중성 pH와 산성 pH의 어느 것에 있어서도, Hr9와 비교하여 바람직한 성질을 획득하고 있었다.

[0589] 즉, Hr9의 중쇄에 대해서 Y97H, 경쇄에 대해서 N50H/L54H/Q89K라고 하는 유용한 아미노산 개변이 발견되었다. 특별히 한정되는 것은 아니지만, 이들 중으로부터 선택되는 아미노산 개변을 단독, 또는 복수 조합하여 도입하는 것에 의해서도, 의약품으로서 우수한 pH 의존적 IL-8 결합 항체가 제작 가능하다는 것이 나타났다.

[0590] 특정의 이론에 구속되는 것은 아니지만, pH 의존적 항원 결합 항체를 의약품으로서 이용할 때에 중요한 점은, 생체 내에 투여된 항체가, 엔도솜 내에 있어서 항원을 해리할 수 있는지 여부라고 생각된다. 그를 위해서는 산성 pH 조건하에 있어서, 충분히 결합이 약한(해리 상수; KD가 큰) 것, 또는 충분히 해리 속도가 빠른(해리 속도 상수; koff가 큰) 것이 중요하다고 생각된다. 그래서, Biacore에 의해 얻어진 H89/L118의 KD 또는 koff가, 생체 내의 엔도솜 내에 있어서 항원을 해리하기 위해서 충분한 것인지 여부를, 다음에 나타내는 실험으로 검증했다.

[0591] 〔실시예 6〕 마우스 PK 시험을 위한 고친화성 항체의 제작

[0592] 항체에 의한, 인간 IL-8의 소실 속도에 대한 효과를 마우스에 있어서 확인하는 방법으로서는, 특별히 한정은 되지 않지만, 예를 들어, 항체를 인간 IL-8과 혼합한 상태로 마우스에 투여하고, 그 후의 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8의 소실 속도를 비교하는 방법이 있다.

[0593] 여기에서, 마우스의 PK 시험에 이용하기 위한 참조 항체는, 중성 pH 및 산성 pH의 조건하에 있어서, 모두 충분히 강한 결합 친화성을 갖는 것이 바람직하다. 그래서, Hr9에 대해서 고친화성을 부여하는 개변을 탐색한 결과, 중쇄로서 H998-IgG1(서열 번호: 45), 경쇄로서 L63-k0MT를 갖는 H998/L63이 창제되었다.

[0594] H998/L63을 이용하여, 인간 IL-8의 결합 친화성을 실시예 5-2와 마찬가지의 방법으로 평가했다. 결과로서 얻어진 센서그램을 도 14에 나타낸다.

[0595] H998/L63은, 중성 pH와 산성 pH의 어느 조건에 있어서도, 현저하게 해리 속도가 늦고, Hr9보다 강한 IL-8 결합 친화성을 갖는다는 것이 나타났다. 단, Biacore의 장치상의 한계에서, 이와 같이 해리 속도가 늦은 단백질-단백질간 상호 작용의 경우, 해리 속도 상수(koff), 해리 상수(KD) 등의 해석치를 정확하게 산출하지 못한다는 것이 알려져 있다. H998/L63에 있어서도, 정확한 해석치를 취득할 수 없었기 때문에, 여기에서는 해석치를 나타내지 않았다. 그렇지만, 당 실험의 결과로부터, H998/L63이 중성과 산성의 어느 pH에 있어서도 매우 강한 결합 친화성을 갖고 있어, 마우스 PK 시험에 있어서의 비교 대상으로서 이용하는 항체로서 적절하다는 것이 확인되었다.

[0596] 〔실시예 7〕 pH 의존적 IL-8 결합 항체 H89/L118을 이용한 마우스 PK 시험

[0597] (7-1) H89/L118을 이용한 마우스 PK 시험

[0598] 실시예 5에서 작성한 H89/L118과 실시예 6에서 작성한 H998/L63을 이용하여, in vivo에서의 인간 IL-8 소실 속도의 평가를 실시했다.

[0599] 마우스(C57BL/6J, Charles river)에게, 인간 IL-8과 항인간 IL-8 항체를 동시에 투여한 후의 인간 IL-8의 체내 동태를 평가했다. 인간 IL-8, 항인간 IL-8 항체의 혼합 용액(각각 10μg/mL, 200μg/mL)을 꼬리 정맥에 10mL/kg으로 단회 투여했다. 이 때, 인간 IL-8에 대해서 항인간 IL-8 항체는 충분량 과잉으로 존재하므로, 인간 IL-8은 거의 모두 항체에 결합하고 있다고 생각된다. 투여 5분 후, 2시간 후, 4시간 후, 7시간 후, 1일 후, 2일 후, 3일 후, 7일 후, 14일 후, 21일 후, 28일 후에 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000rpm으로 15분 원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -20℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다.

[0600] (7-2) 혈장 중의 인간 IL-8 농도의 측정

[0601] 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도는 전기화학발광법으로 측정되었다. 우선, 마우스 IgG의 정상 영역을 갖는 항인간 IL-8 항체(사내 조제품)를, MULTI-ARRAY 96-well Plate(Meso Scale Discovery)에 분주하여, 실온에서 1시간 정치한 후에, 5% BSA(w/v)를 함유한 PBS-Tween 용액을 이용하여 실온에서 2시간 블로킹하는 것에 의해 항인간 IL-8 항체 고상화 플레이트가 작성되었다. 혈장 중 농도로서 275, 91.7, 30.6, 10.2, 3.40, 1.13, 0.377ng/mL의 인간 IL-8을 포함하는 검량선 시료와 25배 이상으로 희석된 마우스 혈장 측정 시료가 조제되고, hWS-4와 혼합시키고 나서 37℃에서 하룻밤 반응시킨 후, 항인간 IL-8 항체 고상화 플레이트의 각 웰에 50 μL로

분주하고 나서, 실온에서 1시간 교반시켰다. hWS-4의 종농도는 25μg/mL가 되도록 조제되었다. 그 후, Biotin Mouse Anti-Human Ig k Light Chain(BD Pharmingen)을 실온에서 1시간 반응시키고, 추가로 SULFO-TAG Labeled Streptavidin(Meso Scale Discovery)을 실온에서 1시간 반응시킨 후, Read Buffer T(×1)(Meso Scale Discovery)를 분주하고, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 측정을 행했다. 인간 IL-8 농도는 검량선의 리스폰스로부터 해석 소프트웨어 SOFT Max PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출했다.

[0602] 결과로서 얻어진, 혈장 중 인간 IL-8 농도의 데이터를 도 15에, 또한 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 클리어런스(CL)의 수치를 표 8에 나타낸다.

표 8

[0603]

	인간 IL-8 CL (mL/d/kg)	
	H998/L63	H89/L118
#1	21.4	472.2
#2	27.5	447.2
#3	24.7	476.0
평균 (N=3)	24.5	465.1
표준 편차	3.0	15.6

[0604] 도 15에 있어서 분명한 바와 같이, H998/L63과 동시에 투여된 인간 IL-8과 비교하여, H89/L118과 동시에 투여된 인간 IL-8은, 마우스 혈장 중으로부터의 소실이 현저하게 빠르다는 것이 나타났다. 또한, 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 소실 속도를 정량적으로 나타내고 있는 CL의 수치로부터는, H89/L118은, H998/L63과 비교하여, 인간 IL-8의 소실 속도를 19배 정도로 증가시키고 있다는 것이 나타났다.

[0605] 특정의 이론에 구속되는 것은 아니지만, 이번 얻어진 데이터로부터, 다음과 같이 고찰하는 것도 가능하다. 항체와 동시에 투여된 인간 IL-8은, 혈장 중에 있어서 대부분이 항체와 결합하여, 복합체 상태로 존재한다. H998/L63과 결합한 인간 IL-8은, 산성 pH 조건하인 엔도솜 내에 있어서도, 강한 친화성에 의해 항체와 결합한 상태로 존재한다. 그 후, H998/L63은, 인간 IL-8과의 복합체를 형성한 채의 상태로 FcRn을 개재하여 혈장 중에 되돌려지기 때문에, 그 때에 인간 IL-8도 동시에 혈장 중에 되돌려지게 된다. 그 때문에, 세포 내에 흡수된 인간 IL-8 중 대부분은, 다시 혈장 중으로 돌아오게 된다. 즉, 인간 IL-8의 혈장 중으로부터의 소실 속도는, H998/L63과 동시에 투여하는 것에 의해, 현저하게 저하된다. 한편, 전술한 바와 같이, pH 의존적 IL-8 결합 항체인 H89/L118과 복합체를 형성한 상태로 세포 내에 흡수된 인간 IL-8은, 엔도솜 내의 산성 pH 조건하에 있어서, 항체로부터 해리된다. 항체로부터 해리된 인간 IL-8은, 라이소솜으로 이행하여 분해된다. 그 때문에, pH 의존적 IL-8 결합 항체는, H998/L63과 같은, 산성 pH 및 중성 pH에서 모두 강한 결합 친화성을 갖는 IL-8 결합 항체와 비교하여, 현저하게 인간 IL-8의 소실을 앞당기는 것이 가능하다.

[0606] (7-3) H89/L118의 투여량을 증가시킨 마우스 PK 시험

[0607] 다음에, H89/L118의 투여량을 변화시켰을 경우의 영향을 검증하는 실험을, 이하와 같이 실시했다. 마우스(C57BL/6J, Charles river)에게, 인간 IL-8과 H89/L118(2mg/kg 또는 8mg/kg)을 동시에 투여한 후의 인간 IL-8의 체내동태를 평가했다. 인간 IL-8(2.5μg/mL), 항인간 IL-8 항체(200μg/mL 또는 800μg/mL)의 혼합 용액을 꼬리 정맥에 10mL/kg으로 단회 투여했다. 이 때, 인간 IL-8에 대해서 항인간 IL-8 항체는 충분량 과잉으로 존재하므로, 인간 IL-8은 거의 모두 항체에 결합하고 있다고 생각된다. 투여 5분 후, 7시간 후, 1일 후, 2일 후, 3일 후, 7일 후, 14일 후, 21일 후, 28일 후에 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000rpm으로 15분 원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -20℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다.

[0608] 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 측정은, 실시예 7-2와 마찬가지의 방법으로 실시했다. 결과로서 얻어진, 혈장 중 인간 IL-8 농도의 데이터를 도 16에, 또한 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 클리어런스(CL)의 수치를 표 9에 나타낸다.

표 9

[0609]

	인간 IL-8 CL (mL/d/kg)	
항체명	H89/L118	H89/L118
항체 투여량	2 mg/kg	8 mg/kg
#1	181.2	93.0
#2	237	101.6
#3	247	114.5
평균 (N=3)	221.8	103.0
표준 편차	35.6	10.8

[0610] 결과로서, H89/L118을 2mg/kg으로 투여한 군과 비교하여, 8mg/kg의 항체를 투여한 군은, 인간 IL-8의 소실 속도가 2배 정도로 늦어지는 것이 확인되었다.

[0611] 이하, 이론에 구속되는 것은 의도하지 않지만 상기의 결과를 가져올 가능성이 있는 요인의 하나를 추측한 내용을 기술한다.

[0612] 엔도솜 내로부터 FcRn을 개재하여 혈장 중에 되돌려지는 항체 중, 인간 IL-8이 결합하고 있는 것의 비율은 낮은 편이 바람직하다. 한편, 엔도솜 내에 존재하는 인간 IL-8에 주목하면, 이쪽은 항체와 결합하고 있지 않는 프리형의 비율이 높은 것이 바람직하다. pH 의존적 IL-8 결합능을 갖지 않는 항체와 함께 투여되었을 경우는, 엔도솜 내에 있어서, 대부분의(100%에 가까운) 인간 IL-8은 항체와 복합체를 형성한 상태로 존재한다고 생각되고, 프리형은 적다(0%에 가깝다)고 생각된다. 한편, pH 의존적 IL-8 결합 항체(예를 들어 H89/L118)와 함께 투여되었을 경우는, 엔도솜 내에 있어서, 어느 정도의 비율의 인간 IL-8은 프리형으로서 존재하고 있을 것이다. 이때의 프리형의 비율은, 가상적으로이지만, 이하와 같이 이해하는 것도 가능하다.

[0613] [엔도솜 내에 있어서의 프리형 인간 IL-8의 비율(%)]=[엔도솜 내의 프리형 인간 IL-8 농도]÷[엔도솜 내의 전 인간 IL-8 농도]×100

[0614] 상기 식과 같이 이해되는, 엔도솜 내에 있어서의 프리형 인간 IL-8의 비율은, 보다 높은 것이 바람직하고, 예를 들어 0%보다는 20%가 바람직하고, 20%보다는 40%가 바람직하고, 40%보다는 60%가 바람직하고, 60%보다는 80%가 바람직하고, 80%보다는 100%가 바람직하다.

[0615] 상기와 같은 엔도솜 내에 있어서의 프리형 인간 IL-8의 비율과, 산성 pH에 있어서의 인간 IL-8에 대한 결합 친화성(KD) 및/또는 해리 속도 상수(koff)에는, 상관이 있다고 생각하는 것이 이치에 맞는다. 즉, 산성 pH에 있어서의 인간 IL-8에 대한 결합 친화성이 약할수록, 및/또는 해리 속도가 빠를수록, 엔도솜 내에 있어서 프리형 인간 IL-8의 비율이 증가할 것이다. 그렇지만, 엔도솜 내에 있어서의 프리형 인간 IL-8의 비율이 이미 100%에 가깝게 되어 있는 pH 의존적 IL-8 결합 항체에 있어서는, 그 이상으로 산성 pH에 있어서의 결합 친화성을 약하게 하는 것, 및/또는 해리 속도를 빠르게 하는 것은, 반드시 프리형 인간 IL-8의 비율을 효과적으로 증가시키는 것으로는 이어지지 않는다. 예를 들어, 프리형 인간 IL-8의 비율을, 99.9% 상태로부터 99.99%로 개선했다고 해도, 그 개선의 정도는 현저한 것은 아닐 것임은 용이하게 이해할 수 있다.

[0616] 또한, 일반적인 화학 평형의 이론에 준거하면, 항IL-8 항체와 인간 IL-8이 공존하고, 그들의 결합 반응과 해리 반응이 평형 상태에 이르고 있는 경우에 있어서, 프리형 인간 IL-8의 비율은, 항체 농도와 항원 농도, 해리 상수(KD)의 3자에 의해 일의적으로 결정된다. 여기에서, 항체 농도가 높은 경우, 항원 농도가 높은 경우, 또는 해리 상수(KD)가 작은 경우에는, 복합체의 형성이 되기 쉬워져, 프리형 인간 IL-8의 비율은 저하된다. 한편, 항체 농도가 낮은 경우, 항원 농도가 낮은 경우, 또는 해리 상수(KD)가 큰 경우에는, 복합체의 형성이 되기 어려워져, 프리형 인간 IL-8의 비율은 증가한다.

[0617] 여기에서, 이번 시험에 있어서, H89/L118을 8mg/kg 투여했을 경우의 인간 IL-8의 소실 속도는, 2mg/kg의 항체를 투여했을 경우에 비해 늦어지고 있었다. 이것은 즉, 엔도솜 내에 있어서, 8mg/kg의 항체를 투여했을 경우의 프리형 인간 IL-8의 비율이, 2mg/kg의 항체를 투여했을 경우에 비해 저하된 것을 시사하고 있다. 그 이유는, 항체의 투여량을 4배로 증가시킨 것에 의해, 엔도솜 내의 항체 농도가 증가하여, 엔도솜 내에서의 IL-8과 항체의

복합체의 형성이 되기 쉬워졌기 때문이라고 추측된다. 즉, 항체의 투여량을 증가시킨 투여군에 있어서는, 엔도솜 내의 프리형 인간 IL-8의 비율이 저하되었기 때문에, 인간 IL-8의 소실 속도가 저하되었다고 생각된다. 이것은 또한, 8mg/kg의 항체 투여 시에는, H89/L118의 산성 pH 조건하에 있어서의 해리 상수(KD)의 크기가, 프리형 인간 IL-8을 100%에 가깝게 하기 위해서는 불충분하다는 것을 시사하고 있다. 즉, 산성 pH 조건하에 있어서, 보다 큰 해리 상수(KD)를 갖는(보다 결합이 약한) 항체이면, 8mg/kg의 항체를 투여했을 경우에 있어서도, 프리형 IL-8의 비율이 100%에 가까운 상태를 실현하여, 2mg/kg의 항체를 투여했을 경우와 동등한 인간 IL-8 소실 속도를 나타낸다고 생각된다.

[0618] 이상으로부터, 목적하는 pH 의존적 IL-8 결합 항체가, 상기와 같은 프리형 인간 IL-8의 비율을 100% 가까이까지 달성할 수 있는지 여부를 확인하기 위해서는, 특별히 한정은 되지 않지만, in vivo에 있어서의 항원 소실 효과의 정도를 상승시킬 여지가 있는지 여부를 검증하는 것에 의해서도 가능하다. 예를 들어, H89/L118 이상으로 산성 pH에 있어서의 결합 친화성을 약하게 한, 및/또는 산성 pH에 있어서의 해리 속도를 빠르게 한 새로운 pH 의존적 IL-8 항체를 이용했을 때의 인간 IL-8 소실 속도를, H89/L118 이용했을 때의 IL-8 소실 속도와 비교한다고 하는 방법이 있다. 상기의 새로운 pH 의존적 IL-8 항체가, H89/L118과 동등한 인간 IL-8 소실 속도를 나타냈을 경우, H89/L118의 산성 pH에 있어서의 결합 친화성 및/또는 해리 속도는, 엔도솜 내에 있어서 프리형 인간 IL-8의 비율을 100% 가까이로 하기 위해서 이미 충분한 레벨에 있음을 시사하고 있다고 말할 수 있다. 한편, 상기의 새로운 pH 의존적 IL-8 항체가, 보다 높은 인간 IL-8 소실 속도를 나타냈을 경우, H89/L118의 산성 pH에 있어서의 결합 친화성 및/또는 해리 속도는, 개선의 여지가 있음을 시사하고 있다고 말할 수 있다.

[0619] 〔실시예 8〕 pH 의존적 IL-8 결합 항체 H553/L118의 제작과 평가

[0620] (8-1) pH 의존적 IL-8 결합능을 갖는 새로운 H553/L118의 제작

[0621] 그래서, H89/L118보다도 더욱, 산성 pH 조건하에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성을 약하게 한, 및/또는 해리 속도를 빠르게 한 항체의 제작을 시도했다.

[0622] H89/L118을 기초로 하여, 히스티딘을 중심으로 한 아미노산 개변을 도입하여, 표 10에 나타내는 개변 항체를 실시예 5와 마찬가지의 방법으로 제작했다. 또한, 실시예 5-2와 마찬가지의 방법으로, 이들 항체의 인간 IL-8 결합 친화성을 측정했다.

[0623] 결과의 일부를 표 10에 나타낸다. 중쇄로서 H553-IgG1(서열 번호: 46), 경쇄로서 L118-k0MT를 갖는 H553/L118과, 중쇄로서 H496-IgG1(서열 번호: 57), 경쇄로서 L118-k0MT를 갖는 H496/L118이, H89/L118보다 더욱 pH 의존성이 증대되어 있음이 나타났다.

표 10

[0624]

항체명	pH	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)	kon 비 (pH7.4/pH5.8)	koff 비 (pH5.8/pH7.4)	KD 비 (pH5.8/pH7.4)
H89/L118	pH 7.4	9.45E+05	1.14E-04	1.21E-10			
	pH 5.8	1.23E+05	3.90E-03	3.18E-08	7.7	34.2	263.0
H496/L118	pH 7.4	1.29E+06	5.03E-05	3.91E-11			
	pH 5.8	1.78E+05	5.47E-03	3.07E-08	7.2	108.6	785.0
H553/L118	pH 7.4	1.15E+06	1.13E-04	9.76E-11			
	pH 5.8	6.14E+05	3.05E-02	4.97E-08	1.9	270.7	509.3

[0625] 여기에서, 취득된 H553/L118은, H89/L118의 중쇄에 대해서 Y55H와 R57P라고 하는 2종류의 아미노산 개변이 도입되어 있다. 한편, H89/L118의 중쇄에 대해서 R57P만이 도입되어 있는 H496/L118은, H89/L118과 비교하면 중성 pH에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성은 증강되어 있지만, 산성 pH에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성은 거의 변화하고 있지 않다. 즉, H89/L118에 도입된 R57P 개변은, 산성 pH에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성은 변화시키지 않고, 중성 pH에 있어서의 결합 친화성만을 증강시키는 개변이다. 더욱이, H496/L118의 중쇄에 대해서 Y55H 개변이 도입된 H553/L118은, H89/L118과 비교하면, 중성 pH에 있어서의 결합 친화성은 유지 또는 약간 증강되어 있는 한편으로, 산성 pH에 있어서의 결합 친화성은 저하되어 있었다. 즉, Y55H와 R57P라고 하는 2종류의 아미노산 개변을 조합하여 H89/L118에 도입하는 것은, 중성 pH에 있어서의 결합 친화성은 유지 또는 약간 증강시키면서, 산성 pH에 있어서의 결합 친화성은 저하시킨다고 하는 성질을 보다 한층 증강시키는 것을 가능하게 했다.

[0626] (8-2) H553/L118을 이용한 마우스 PK 시험

[0627] H553/L118을 이용하여, 마우스에 있어서의 인간 IL-8 소실 속도의 평가를, 실시예 7-2와 마찬가지의 방법으로 실시했다. 결과로서 얻어진, 혈장 중 인간 IL-8 농도의 데이터를 도 17에, 또한 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 클리어런스(CL)의 수치를 표 11에 나타낸다.

표 11

[0628]

	인간 IL-8 CL (mL/d/kg)			
항체명	H89/L118	H89/L118	H553/L118	H553/L118
항체 투여량	2 mg/kg	8 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg
#1	181.2	93.0	250	256.6
#2	237	101.6	245	248.4
#3	247	114.5	249	244.1
평균 (N=3)	**221.8**	**103.0**	**248**	**249.7**
표준 편차	35.6	10.8	3	6.4

[0629] 결과로서, 2mg/kg의 항체를 투여한 군의 비교에 있어서는, H553/L118과 H89/L118 사이에서 큰 차이는 보이지 않았지만, 8mg/kg의 항체를 투여한 군의 비교에 있어서는, H553/L118은, H89/L118과 비교하여, 2.5배 정도로 인간 IL-8의 소실을 앞당기고 있음이 확인되었다. 다른 관점에서는, H553/L118은, 2mg/kg과 8mg/kg의 비교에 있어서, 인간 IL-8 소실 속도의 차이가 보이지 않고, H89/L118에서 보였던 것과 같은 항체의 투여량을 증가시켰을 때의 항원 소실 속도의 저하는 보이지 않았다.

[0630] 특별히 한정은 되지 않지만, 이와 같은 결과가 얻어진 이유의 하나로서, 다음과 같이 고찰하는 것도 가능하다.

[0631] H553/L118은, 2mg/kg의 항체를 투여했을 경우와 8mg/kg의 항체를 투여했을 경우에서 동등한 인간 IL-8 소실 속도를 나타내고 있었다. 이것은, H553/L118은 산성 pH에 있어서의 IL-8 결합이 충분히 약하기 때문에, 8mg/kg 투여의 조건에 있어서도, 엔도솜 내의 프리형 IL-8의 비율을 100%에 가까운 레벨로 달성하고 있음을 나타내고 있다. 즉, H89/L118은, 2mg/kg 정도의 용량에 있어서는, 최대한의 인간 IL-8 소실 효과를 달성하는 것이 가능하지만, 8mg/kg 정도의 고용량이 되면, 그 효과는 감약되어 버릴 가능성을 시사하고 있다. 한편, H553/L118은, 8mg/kg 정도의 고용량에 있어서도 여전히, 최대한의 인간 IL-8 소실 효과를 달성하는 것이 가능하다.

[0632] (8-3) H553/L118을 이용한 안정성 평가

[0633] H553/L118은, 마우스에 있어서 현저하게 H89/L118보다 인간 IL-8의 소실을 앞당기는 것이 가능한 항체인 것이 나타났다. 한편, 이 항체가 생체 내에 있어서 장기간에 걸쳐서 인간 IL-8의 저해 효과를 지속하기 위해서는, 투여된 항체가 생체내(예를 들어 혈장 중)에 존재하고 있는 기간 중, IL-8 중화 활성이 안정되게 유지되는 것(당해 항체의 IL-8 중화 활성에 있어서의 안정성)도 또한 중요하다. 그래서, 이하에 나타내는 방법으로, 이들 항체의 마우스 혈장 중에 있어서의 당해 안정성을 평가했다.

[0634] 마우스 혈장은, C57BL/6J(Charles river)의 혈액으로부터 당업자 공지의 방법으로 채취했다. 마우스 혈장 800 μL에 대해, 200mM PBS(Sigma, P4417)를 200 μL 첨가하여 1mL로 했다. 또한, 방부제로서 아자이드화 나트륨을 종농도 0.1% 첨가했다. 추가로, 각 항체(Hr9, H89/L118, H553/L118)를 종농도 0.2mg/mL가 되도록, 상기의 마우스 혈장에 첨가했다. 이 시점에서 일부를 채취하여, Initial 샘플로 했다. 나머지의 샘플은 40℃에서 보관했다. 보관 개시부터 1주간 및 2주간이 경과한 시점에서, 각각 일부를 채취하여, 1주간 보존 샘플 및 2주간 보존 샘플로 했다. 한편, 모든 샘플은 각 분석까지 -80℃에서 동결 보관했다.

[0635] 다음에, 마우스 혈장 중에 포함되는 항IL-8 항체의, 인간 IL-8에 대한 중화 활성의 평가를 다음과 같이 행했다.

[0636] 인간 IL-8의 수용체로서 CXCR1 및 CXCR2가 알려져 있다. PathHunter(r) CHO-K1 CXCR2 β-Arrestin Cell Line(DiscoveRx사, Cat.# 93-0202C2)는, 인간 CXCR2를 발현하여, 인간 IL-8에 의한 시그널이 전달되었을 때에 화학발광을 나타내도록, 인공적으로 작성된 세포주이다. 특별히 한정은 되지 않지만, 이 세포를 이용해도, 항인간 IL-8 항체가 갖는 인간 IL-8에 대한 중화 활성을 평가하는 것이 가능하다. 우선, 당해 세포의 배양액 중에, 인간 IL-8을 첨가하면, 첨가한 인간 IL-8의 농도에 의존하여, 어느 양의 화학발광을 나타낸다. 여기에서, 인간 IL-8과 항인간 IL-8 항체를 아울러 배양액 중에 첨가했을 경우는, 항인간 IL-8 항체는 인간 IL-8과 결합하는 것에 의해, 인간 IL-8의 시그널 전달을 차단할 수 있다. 그 결과로서, 인간 IL-8의 첨가에 의해 일어나는 화학발광은 항인간 IL-8 항체에 의해 저해되어, 항체를 첨가하고 있지 않는 경우에 비하면 약한 화학발광을 나

타내거나, 또는 전혀 화학발광을 나타내지 않게 된다. 그 때문에, 항체가 갖는 인간 IL-8 중화 활성이 강할수록 화학발광의 정도는 약해지고, 항체가 갖는 인간 IL-8 중화 활성이 약할수록 화학발광의 정도는 강해지게 된다.

[0637] 이것은, 마우스 혈장 중에 첨가하여 일정 기간 보존한 항체에 있어서도 마찬가지이다. 마우스 혈장 중에서 보존하는 것에 의해, 중화 활성이 변화되지 않는 항체이면, 상기의 화학발광의 정도는 보존의 전후에서 변화하지 않을 것이다. 한편, 마우스 혈장 중에서 보존하는 것에 의해, 중화 활성이 저하되는 항체의 경우는, 보존 후의 항체를 이용했을 경우의 화학발광의 정도는, 보존 전에 비해 증가하게 된다.

[0638] 그래서, 상기의 세포주를 이용하여, 마우스 혈장 중에 보존한 항체가, 중화 활성을 유지하고 있는지 여부를 검증했다. 우선, 세포주를 AssayComplete(tm) Cell Plating 0 Reagent에 현탁하고, 384well plate에 5000cells/well씩 파종했다. 세포의 배양 개시부터 1일 후에, 인간 IL-8의 첨가 농도를 결정하기 위한 시험을 이하와 같이 행했다. 최종 인간 IL-8 농도로서 45nM(400ng/mL) 내지 0.098nM(0.1ng/mL)을 포함하도록, 인간 IL-8 용액을 단계 희석한 것을 세포 배양액에 첨가했다. 다음에, 제품 프로토콜에 따라 검출 시약을 첨가하여, 화학발광 검출 장치를 이용하여 상대 화학발광량을 검출했다. 그것에 의해, 세포의 인간 IL-8에 대한 반응성을 확인하여, 항인간 IL-8 항체의 중화 활성을 확인하기 위해서 적절한 인간 IL-8 농도를 설정했다. 여기에서는, 인간 IL-8 농도는 2nM로 했다.

[0639] 다음에, 전술한 항인간 IL-8 항체를 첨가한 마우스 혈장을 이용하여, 거기에 포함되는 항체의 중화 활성의 평가를 행했다. 상기에서 결정한 농도의 인간 IL-8과 전술한 항인간 IL-8 항체를 포함하는 마우스 혈장을 세포 배양액에 첨가했다. 여기에서, 첨가하는 마우스 혈장의 양은, 항인간 IL-8 항체 농도로서 2μg/mL(13.3nM) 내지 0.016μg/mL(0.1nM)의 범위에서 단계적으로 포함되도록 결정되었다. 다음에, 제품 프로토콜에 따라 검출 시약을 첨가하고, 화학발광 검출 장치를 이용하여 상대 화학발광량을 검출했다.

[0640] 여기에서, 인간 IL-8 및 항체를 첨가하고 있지 않은 well의 상대 화학발광량 평균을 0%, 인간 IL-8만을 첨가하고, 항체를 첨가하고 있지 않은 well의 상대 화학발광량 평균을 100%로 했을 때의, 각 항체 농도에 있어서의 상대 화학발광량의 상대치를 산출했다.

[0641] 인간 CXCR2 발현 세포를 이용한 인간 IL-8 저해 어세이의 결과를, Initial(마우스 혈장 중의 보존 처리 없음)을 도 18a에, 40℃에서 1주간 보존한 샘플의 결과를 도 18b에, 40℃에서 2주간 보존한 샘플의 결과를 도 18c에, 각각 나타냈다.

[0642] 그 결과, Hr9 및 H89/L118은, 마우스 혈장 중에서 보존한 전후에서 인간 IL-8 중화 활성에 차이는 보이지 않았다. 한편, H553/L118은 2주간의 보존에 의해, 인간 IL-8 중화 활성의 저하가 보였다. 이것으로부터, H553/L118은, Hr9나 H89/L118과 비교하여, 마우스 혈장 중에 있어서 인간 IL-8 중화 활성이 저하되기 쉽고, IL-8 중화 활성의 면에서 불안정한 성질을 갖는 항체임이 나타났다.

[0643] 〔실시예 9〕 in silico 시스템에 의한 면역원성 예측 스코어를 저감시킨 항체의 제작

[0644] (9-1) 각종 IL-8 결합 항체의 면역원성 예측 스코어

[0645] 항의약품 항체(ADA)의 산생은, 치료용 항체의 효과 및 약물 동태에 영향을 미쳐, 가끔 중한 부작용을 가져오는 경우가 있기 때문에, 임상에 있어서의 치료용 항체의 유용성이나 약효는, ADA의 산생에 의해 제한될 수 있다. 치료용 항체의 면역원성은, 많은 요인에서 영향을 받음이 알려져 있지만, 특히 치료용 항체가 갖는 이펙터 T 세포 에피토프의 중요성이 다수 보고되어 있다.

[0646] T세포 에피토프를 예측하기 위한 in silico 툴로서는, Epibase(Lonza), iTope/TCED(Antitope), 및 EpiMatrix(EpiVax) 등이 개발되어 있다. 이들 in silico 툴을 이용하여, 각 아미노산 서열 중의 T 세포 에피토프를 예측할 수 있어(Expert Opin Biol Ther. 2007 Mar;7(3):405-18), 치료용 항체의 잠재적인 면역원성 평가가 가능해진다.

[0647] 여기에서, EpiMatrix를 이용하여, 각 항IL-8 항체의 면역원성 스코어를 산출했다. EpiMatrix는, 면역원성을 예측하고자 하는 단백질의 아미노산 서열을 9 아미노산마다 단락지은 펩타이드 단편의 서열을 기계적으로 설계하여, 그것들에 대해서, 8종류의 주요한 MHC Class II 알렐(DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501)에 대한 결합능을 계산하여, 목적 단백질의 면역원성을 예측하는 시스템이다. (Clin Immunol. 2009 May;131(2):189-201.)

[0648] 상기와 같이 산출된, 각 IL-8 항체의 중쇄 및 경쇄의 면역원성 스코어가, 표 12의 「EpiMatrix Score」의 난에

나타나 있다. 추가로, EpiMatrix Score에 대해, Tregitope의 함유를 고려하여 보정된 면역원성 스코어가, 「tReg Adjusted Epx Score」의 난에 나타나 있다. Tregitope란, 주로 천연형의 항체 서열 중에 많이 포함되어 있는 펩타이드 단편 서열이며, 억제성 T 세포(Treg)를 활성화하는 것에 의해, 면역원성을 억제한다고 생각되고 있는 서열이다.

[0649] 또한, 이들 스코어에 대해, 중쇄와 경쇄의 스코어를 합계한 것이, 합계의 난에 나타나 있다.

표 12

[0650]

	중쇄		경쇄		합계	
항체명	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어
hWS-4	62.44	12.18	22.64	-23.89	85.08	-11.71
Hr9	56.52	6.27	22.64	-23.89	79.16	-17.62
H89/L118	57.99	7.74	7.16	-39.36	65.15	-31.62
H496/L118	54.13	3.87	7.16	-39.36	61.29	-35.49
H553/L118	47.88	-2.37	7.16	-39.36	55.04	-41.73

[0651] 이 결과로부터, 「EpiMatrix Score」 및 「tReg Adjusted Epx Score」의 어느 것을 봐도, H89/L118, H496/L118 및 H553/L118의 면역원성 스코어는, 공지의 인간화 항인간 IL-8 항체인 hWS-4와 비교하여 저하되어 있었다.

[0652] 더욱이, EpiMatrix에서는, 중쇄와 경쇄의 스코어를 고려한 데다가, 항체 분자 전체로서 예측되는 ADA 발생 빈도를, 각종 시판 항체의 실제의 ADA 발생 빈도와 비교하는 것도 가능하다. 그러한 해석을 실시한 결과가, 도 19에 나타나 있다. 한편, 시스템의 관계상, 도 19에 있어서는, hWS-4는 「WS4」, Hr9는 「HR9」, H89/L118은 「H89L118」, H496/L118은 「H496L118」, H553/L118은 「H553L118」라고 각각 표기되어 있다.

[0653] 도 19에 나타나 있는 바와 같이, 각종의 시판 항체의 인간에 있어서의 ADA의 발생 빈도는, Campath(Alemtuzumab)는 45%, Rituxan(Rituximab)은 27%, Zenapax(Daclizumab)는 14%라고 하는 값임이 알려져 있다. 한편, 공지의 인간화 항인간 IL-8 항체인 hWS-4의 아미노산 서열로부터 예측된 ADA 발생 빈도는 10.42%였지만, 이번에 새로이 발견된 H89/L118(5.52%), H496/L118(4.67%), H553/L118(3.45%)은, hWS-4와 비교하면 유의하게 저하되어 있었다.

[0654] (9-2) 면역원성 예측 스코어를 저감시킨 개변 항체의 제작

[0655] 상기한 바와 같이, H89/L118, H496/L118 및 H553/L118의 면역원성 스코어는, hWS-4와 비교하여 저하되어 있었지만, 표 12로부터 분명한 바와 같이, 중쇄의 면역원성 스코어는 경쇄에 비하면 높고, 특히 중쇄의 아미노산 서열은, 면역원성의 관점에서 아직 개선의 여지가 있음을 시사하고 있다. 그래서, H496의 중쇄 가변 영역으로부터, 면역원성 스코어를 저하시키는 것이 가능한 아미노산 개변의 탐색을 행했다. 예의 탐색을 행한 결과, Kabat 넘버링 52c번의 알라닌이 아스파라긴산으로 치환된 H496v1, 81번의 글루타민이 트레오닌으로 치환된 H496v2, 82b번의 세린이 아스파라긴산으로 치환된 H496v3의 3종류의 개변체가 발견되었다. 또한, 이들 3종의 개변을 모두 도입한 H1004가 작성되었다.

[0656] 실시예 9-1과 마찬가지의 방법으로, 면역원성 스코어를 산출한 결과를 표 13에 나타낸다.

표 13

[0657]

	중쇄		경쇄		합계	
항체명	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어
H496/L118	54.13	3.87	7.16	-39.36	61.29	-35.49
H496v1/L118	32.17	-18.08	7.16	-39.36	39.33	-57.44
H496v2/L118	45.26	-5.00	7.16	-39.36	52.42	-44.36
H496v3/L118	38.27	-11.98	7.16	-39.36	45.43	-51.34
H1004/L118	10.79	-39.47	7.16	-39.36	17.95	-78.83
H1004/L395	10.79	-39.47	7.79	-38.74	18.58	-78.21

[0658] 단독 개변을 포함하는 H496v1, H496v2, H496v3의 3종류의 중쇄는, 모두 H496과 비교하여 면역원성 스코어가 저

하되어 있었다. 더욱이, 3종류의 개변을 조합하여 도입된 H1004에 있어서는, 현저한 면역원성 스코어의 개선을 달성하고 있었다.

[0659] 여기에서, H1004와 조합되는 적절한 경쇄로서는, L118에 더하여 L395도 또한 발견되었다. 그 때문에, 면역원성 스코어의 산출에 있어서는, L118 및 L395의 양자를 조합한 것을 산출했다. 표 13에 나타나 있는 바와 같이, 중쇄와 경쇄를 조합했을 때의 면역원성 스코어라고 해도, H1004/L118 및 H1004/L395는, 매우 낮은 면역원성 스코어를 나타내고 있었다.

[0660] 다음에, 이것들에 대해 실시예 9-1과 마찬가지로 ADA 발생 빈도를 예측했다. 그 결과를 도 20에 나타낸다. 한편, 도 20에 있어서는, H496v1/L118은 「V1」, H496v2/L118은 「V2」, H496v3/L118은 「V3」, H1004/L118은 「H1004L118」, H1004/L395는 「H1004L395」라고 각각 표기되어 있다.

[0661] 놀랍게도, 면역원성 스코어를 현저하게 저감시킨 H1004/L118 및 H1004/L395는, ADA 발생 빈도의 예측치에 대해서도 개선되어 있어, 0%라고 하는 예측치를 나타내고 있었다.

[0662] (9-3) H1004/L395의 IL-8 결합 친화성의 측정

[0663] 중쇄로서 H1004-IgG1m(서열 번호: 47), 경쇄로서 L395-kOMT(서열 번호: 38)를 갖는 항체인 H1004/L395를 제작했다. H1004/L395의 인간 IL-8에 대한 결합 친화성을, Biacore T200(GE Healthcare)을 이용하여 이하와 같이 측정했다.

[0664] 러닝 버퍼는, 이하의 2종을 이용하여 각각의 온도로 설정하여 측정을 행했다.

[0665] · 0.05% tween20, 40mM ACES, 150mM NaCl, pH 7.4, 40℃

[0666] · 0.05% tween20, 40mM ACES, 150mM NaCl, pH 5.8, 37℃

[0667] 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 프로틴 A/G(PIERCE)를 적당량 고정화하고, 거기에 목적하는 항체를 포착시켰다. 다음에, 인간 IL-8 희석액과 러닝 버퍼(참조 용액으로서)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착시킨 항체에 인간 IL-8을 상호 작용시켰다. 한편, 러닝 버퍼는 상기 중 한쪽이 이용되고, 인간 IL-8의 희석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 센서 칩의 재생에는 25mM NaOH 및 10mM 글리신-HCl, pH 1.5가 이용되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 카이네틱스 파라미터인 결합 속도 상수 kon(1/Ms), 및 해리 속도 상수 koff(1/s)를 기초로 각 항체의 인간 IL-8에 대한 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 이용되었다.

[0668] 측정 결과를 표 14에 나타낸다. 면역원성 스코어를 저감시킨 H1004/L395는, H89/L118과 비교하여, 중성 pH에 있어서의 인간 IL-8에의 KD는 동등했지만, 산성 pH에 있어서의 KD 및 koff는 증가하고 있어, 엔도솜 내에 있어서 IL-8을 해리하기 쉬운 성질을 갖고 있음이 나타났다.

표 14

[0669]

항체명	pH	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)	kon 비 (pH7.4/pH5.8)	koff 비 (pH5.8/pH7.4)	KD 비 (pH5.8/pH7.4)
H89/L118	pH 7.4	7.51E+05	1.29E-04	1.72E-10			
	pH 5.8	1.29E+05	6.28E-03	4.88E-08	5.8	48.7	283.7
H1004/L395	pH 7.4	1.02E+06	1.55E-04	1.51E-10			
	pH 5.8	3.06E+05	3.38E-02	1.10E-07	3.3	218.1	728.5

[0670] 〔실시예 10〕 pH 의존적 IL-8 결합 항체 H1009/L395의 제작과 평가

[0671] (10-1) 각종 pH 의존적 IL-8 결합 항체의 제작

[0672] 실시예 9에 나타낸 검토에 의해, pH 의존적 IL-8 결합능을 갖고, 또한 면역원성 스코어가 저감된 H1004/L395가 취득되었다. 다음에, 이들 바람직한 성질과 마우스 혈장 중에 있어서의 안정성을 양립한 개변체의 창제를 목표로 하여, 예의 검토를 행했다.

[0673] H1004/L395를 기초로, 각종의 개변을 도입하여, 이하의 개변 항체를 제작했다.

[0674] [표 14-2]

중쇄

H1004	A52cD/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H0932	A52cD/G54H/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1000	D31E/A52cD/G54H/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1009	A52cD/G54Y/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1022	A52cD/G54H/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1023	A52cD/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1028	A52cD/G54Y/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1029	S30D/D31K/A52cD/G54H/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1031	S30D/D31K/A52cD/G54H/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1032	S30D/D31K/A52cD/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1037	S30D/D31K/A52cD/G54Y/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1040	D31E/A52cD/G54H/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1041	D31E/A52cD/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1046	D31E/A52cD/G54Y/Y55H/T56H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1047	S30D/D31K/A52cD/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1048	D31E/A52cD/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1049	S30D/D31K/A52cD/G54Y/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H
H1050	D31E/A52cD/G54Y/Y55H/R57P/Q81T/S82bD/Y97H

[0675]

[0676] [표 14-3]

L395	N50K/L54H/Q89K
L442	S31E/N50K/L54H/Q89K

[0677]

[0678] 추가로, 상기의 18종류의 중쇄를 2종의 경쇄를 조합하여, 합계 36종류의 항체를 제작했다. 이들 항체에 대해, 이하에 나타내는 바와 같이 각종의 평가를 실시했다.

[0679] 중성 및 산성 pH 조건하에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성을, 실시예 9-3의 방법과 마찬가지로 측정했다. 그 결과 중, pH 7.4에 있어서의 KD, pH 5.8에 있어서의 KD 및 koff의 값에 대해, 표 15에 나타낸다.

[0680] 다음에, 이하에 나타내는 방법으로 PBS 중에서 보존했을 경우의 IL-8의 결합에 있어서의 안정성 평가를 실시했다.

[0681] 각각의 항체를 DPBS(Sigma-Aldrich)에 대해서 하룻밤 투석을 행한 후, 각 항체의 농도를 0.1mg/mL가 되도록 조제했다. 이 시점에서 일부를 채취하여, Initial 샘플로 했다. 나머지의 샘플은 50℃에서 1주간 보관한 후, 회수하여 열가속 시험용 샘플로 했다.

[0682] 다음에, Initial 샘플 및 열가속 시험용 샘플을 이용하여, Biacore에 의한 IL-8 결합 친화성의 측정을 이하와 같이 실시했다.

[0683] Biacore T200(GE Healthcare)을 이용하여, 개변 항체에 대한 인간 IL-8의 결합량 해석을 행했다. 러닝 버퍼로서 0.05% tween20, 40mM ACES, 150mM NaCl, pH 7.4를 이용하여 40℃에서 측정을 행했다.

[0684] 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 프로틴 A/G(PIERCE)를 적당량 고정화하고, 거기에 목적하는 항체를 포착시켰다. 다음에, 인간 IL-8 희석액과 러닝 버퍼(참조 용액으로서)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착시킨 항체에 인간 IL-8을 상호 작용시켰다. 인간 IL-8의 희석에도 러닝 버퍼가 사용되었다. 센서 칩의 재생에는 25mM NaOH 및 10mM 글리신-HCl, pH 1.5가 이용되었다. 측정으로 얻어진 인간 IL-8의 결합량과 그 결합량을 얻었을 때의 항체 포착량을 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)를 이용하여 추출했다.

[0685] Initial 샘플 및 열가속 시험용 샘플에 관해서, 항체 포착량 1000RU당의 인간 IL-8의 결합량을 산출했다. 추가로, Initial 샘플의 인간 IL-8의 결합량에 대한 열가속 시험용 샘플의 인간 IL-8의 결합량의 비를 산출했다.

[0686] 결과로서 얻어진, Initial 샘플과 열가속 시험용 샘플의 IL-8 결합량의 비를, 표 15에 아울러 나타낸다.

표 15

[0687]

항체	pH7.4 KD	pH5.8 KD	pH5.8 koff	IL-8결합량비 (열가속/Initial)
H0089/L0118	1.7E-10	4.9E-08	6.3E-03	0.61
H0932/L0395	1.6E-10	1.1E-07	5.7E-02	0.56
H0932/L0442	2.1E-10	7.9E-08	2.2E-02	0.56
H1000/L0395	1.4E-10	8.9E-08	2.0E-02	0.57
H1000/L0442	2.0E-10	7.1E-08	1.7E-02	0.57
H1004/L0395	1.5E-10	1.1E-07	3.4E-02	0.58
H1004/L0442	2.2E-10	7.7E-08	2.0E-02	0.59
H1009/L0395	7.1E-11	8.7E-08	1.0E-02	0.64
H1009/L0442	1.1E-10	6.3E-08	6.0E-03	0.64
H1022/L0395	2.7E-10	2.9E-07	1.2E+01	0.47
H1022/L0442	3.6E-10	1.8E-07	2.0E-02	0.46
H1023/L0395	7.6E-11	9.2E-08	1.8E-02	0.54
H1023/L0442	1.2E-10	7.1E-08	1.7E-02	0.55
H1028/L0395	1.8E-10	2.1E-07	1.0E+01	0.55
H1028/L0442	2.4E-10	1.4E-07	1.3E-01	0.56
H1029/L0395	8.6E-11	5.5E-08	8.0E-03	0.59
H1029/L0442	1.4E-10	4.8E-08	8.5E-03	0.58
H1031/L0395	1.5E-10	9.9E-08	4.6E-02	0.48
H1031/L0442	2.1E-10	8.9E-08	3.9E-02	0.47
H1032/L0395	4.2E-11	5.0E-08	4.1E-03	0.61
H1032/L0442	7.8E-11	4.3E-08	5.9E-03	0.61
H1037/L0395	9.4E-11	7.0E-08	1.5E-02	0.55
H1037/L0442	1.3E-10	6.1E-08	1.5E-02	0.57
H1040/L0395	2.6E-10	2.4E-07	4.6E-02	0.44
H1040/L0442	3.4E-10	1.4E-07	2.1E+01	0.49
H1041/L0395	8.0E-11	7.1E-08	1.3E-02	0.55
H1041/L0442	1.2E-10	6.1E-08	1.5E-02	0.56
H1046/L0395	1.8E-10	1.6E-07	1.2E-02	0.56
H1046/L0442	2.3E-10	1.1E-07	1.2E-02	0.55
H1047/L0395	9.5E-11	4.7E-08	6.0E-03	0.65
H1047/L0442	1.5E-10	4.7E-08	4.6E-03	0.64
H1048/L0395	1.5E-10	9.0E-08	6.4E-03	0.59
H1048/L0442	2.1E-10	6.7E-08	1.5E-02	0.59
H1049/L0395	2.5E-11	3.8E-08	4.0E-03	0.65
H1049/L0442	5.3E-11	3.3E-08	4.5E-03	0.65
H1050/L0395	6.6E-11	7.7E-08	5.0E-03	0.64
H1050/L0442	9.9E-11	5.4E-08	7.6E-03	0.64

[0688] 상기 검토에 의해, 중쇄로서 H1009-IgG1m(서열 번호: 48)과, 경쇄로서 L395-k0MT를 갖는 항체인, H1009/L395가 얻어졌다.

[0689] 표 15에 나타나 있는 바와 같이, H1009/L395는, H89/L118과 비교하여 중성 pH에 있어서의 인간 IL-8 결합 친화성은 약간 증강되어 있는 한편으로, 산성 pH에 있어서의 결합 친화성은 저하되어 있어, pH 의존성이 보다 강하게 되어 있었다. 또한, PBS 중에서 50℃라고 하는 과혹한 조건에 노출했을 경우의, IL-8 결합에 있어서의 안정성에 있어서, H1009/L395는 H89/L118보다 약간 개선되어 있었다.

[0690] 이들로부터, H1009/L395는, pH 의존적 IL-8 결합능을 가지면서, 마우스 혈장 중에서의 중화 활성도 안정되게 유지될 가능성이 있는 항체로서 선정되었다.

[0691] (10-2) H1009/L395의 안정성 평가

[0692] 다음에, 실시예 8-3의 방법과 마찬가지로, H1009/L395의 IL-8 중화 활성이, 마우스 혈장 중에 있어서 안정되게 유지되는지 여부를 평가했다. 여기에서는, 후에 실시예 15에 있어서, 그 상세가 기술되는 H1009/L395-F1886s를 이용했다. 이 항체는, H1009/L395와 동일한 가변 영역을 갖고, 정상 영역은, 천연형 인간 IgG1에 비해, 산성 pH 조건하에 있어서의 FcRn 결합을 증강시키는 개변과, FcγR에 대한 결합을 저감시키기 위한 개변을 갖는 정상 영역을 갖는다. H1009/L395의 인간 IL-8에 대한 결합 및 IL-8의 중화 활성은, 이 항체의 가변 영역, 특히 HVR을 중심으로 한 영역이 담당하고 있고, 정상 영역에 도입된 개변이 영향을 주는 경우는 없다고 생각된다.

[0693] 마우스 혈장 중에 있어서의 안정성 평가는, 다음과 같이 실시했다. 마우스 혈장 585μL에 대해, 200mM 인산 완충액(pH 6.7)을 150μL 첨가했다. 또한, 방부제로서 아자이드화 나트륨을 종농도 0.1%가 되도록 첨가했다. 각 항체(Hr9, H89/L118, H1009/L395-F1886s)에 대해 종농도 0.4mg/mL가 되도록, 상기의 마우스 혈장에 첨가했다. 이 시점에서 일부를 채취하여, Initial 샘플로 했다. 나머지의 샘플은 40℃에서 보관했다. 보관 개시부터 1주간 및 2주간이 경과한 시점에서, 각각 일부를 채취하여, 1주간 보존 샘플 및 2주간 보존 샘플로 했다. 한편, 모든 샘플은 각 분석까지 -80℃에서 동결 보관했다.

[0694] 인간 CXCR2 발현 세포를 이용한 인간 IL-8 중화 활성 측정은, 실시예 8-3과 마찬가지의 방법으로 실시했다. 단, 항인간 IL-8 항체의 중화 활성을 확인하기 위한 인간 IL-8 농도는, 이번에는 1.2nM로 실시했다.

[0695] 상기의 항체를 이용하여 얻어진, 인간 CXCR2 발현 세포를 이용한 인간 IL-8 저해 어세이의 결과로서, Initial (마우스 혈장 중의 보존 처리 없음)의 결과를 도 21a에, 40℃에서 1주간 보존한 샘플의 결과를 도 21b에, 40℃에서 2주간 보존한 샘플의 결과를 도 21c에, 각각 나타냈다.

[0696] 그 결과, 놀랍게도, H1009/L395-F1886s는, 마우스 혈장 중에서 40℃에서 2주간 보존했을 경우에 있어서도, 인간 IL-8의 중화 활성이 유지되고 있어, H553/L118보다 IL-8 중화 활성이 안정되게 유지되고 있었다.

[0697] (10-3) H1009/L395를 이용한 마우스 PK 시험

[0698] H1009/L395의 마우스에 있어서의 인간 IL-8 소실 속도의 평가를, 다음에 나타내는 방법으로 실시했다. 항체로서는 H1009/L395, H553/L118 및 H998/L63을 이용했다. 마우스에게의 투여 및 채혈, 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 측정은 실시예 7에 나타낸 방법으로 실시했다.

[0699] 결과로서 얻어진, 혈장 중 인간 IL-8 농도의 데이터를 도 22에, 또한 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 클리어런스(CL)의 수치를 표 16에 나타낸다.

표 16

[0700]

	인간 IL-8 CL (mL/d/kg)		
항체명	H998/L63	H553/L118	H1009/L395
#1	21.4	773.2	705.0
#2	27.5	497.6	777.3
#3	24.7	879.8	737.7
평균 (N=3)	24.5	716.9	740.0
표준 편차	3.0	197.2	36.2

[0701] 그 결과, H1009/L395는, 마우스에 있어서의 인간 IL-8 소실 속도가 2mg/kg 투여 시에 있어서, H553/L118과 동일한 정도이며, 엔도솜 내에 있어서의 프리형 IL-8을 100% 가까이까지 달성할 수 있음이 나타났다. 또한, 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 소실 속도를 정량적으로 나타내는 클리어런스(CL)의 값은, H998/L63보다 30배 정도 높음이 나타났다.

[0702] 특별히 한정은 되지 않지만, 인간 IL-8의 소실 속도를 증가시키는 효과에 대해서는, 다음과 같이 해석하는 것이 가능하다. 일반적으로, 항원 농도가 거의 일정하게 유지되고 있는 생체 내에 있어서는, 항원의 산생 속도와 소실 속도도 또한, 거의 일정하게 유지되고 있게 된다. 이 상태에 항체를 투여하면, 항원의 산생 속도는 영향을 받지 않는 경우에 있어서도, 항원의 소실 속도는, 항원이 항체와의 복합체를 형성하는 것에 의해 변화할 수 있다. 일반적으로는, 항원의 소실 속도는 항체의 소실 속도에 비해 크기 때문에, 그와 같은 경우는, 항체와 복합체를 형성한 항원의 소실 속도는 저하된다. 항원의 소실 속도가 저하되면, 혈장 중의 항원 농도가 상승되지만, 그 때의 상승 정도는 항원 단독 시의 소실 속도와 복합체 형성 시의 소실 속도의 비에 의해서도 규정될 수 있다. 즉, 항원 단독 시의 소실 속도에 비해, 복합체 형성 시의 소실 속도가 10분의 1로 저하되었을 경우는, 항체가 투여된 생체의 혈장 중의 항원 농도는 항체 투여 전의 약 10배까지 상승될 수 있다. 여기에서, 이들의 소실 속도로서 클리어런스(CL)를 이용하는 것도 가능하다. 즉, 생체에 대해서 항체를 투여한 후에 일어나는 항원 농도의 상승(항원의 축적)은, 항체 투여 전과 투여 후 각각의 상태에 있어서의 항원 CL에 의해 규정된다고 생각할 수 있다.

[0703] 여기에서, H998/L63과 H1009/L395를 투여했을 때의 인간 IL-8의 CL에 약 30배의 차이가 있었다고 하는 것은, 인

간에게 이들 항체를 투여했을 때에 일어나는, 혈장 중 인간 IL-8 농도의 상승 정도에, 약 30배의 차이가 생길 수 있음을 시사하고 있다. 더욱이, 혈장 중 인간 IL-8 농도에 30배의 차이가 생긴다고 하는 것은, 각각의 상황에 있어서 인간 IL-8의 생물학적 활성을 완전히 차단하기 위해서 필요한 항체의 양도 또한, 약 30배의 차이가 생길 수 있다고 하는 것이 된다. 즉, H1009/L395는, H998/L63에 비해, 30분의 1 정도의 극히 소량의 항체로, 혈장 중 IL-8의 생물학적 활성을 차단하는 것이 가능하다. 또한, H1009/L395와 H998/L63 각각을 동일한 투여량으로 인간에게 투여했을 경우에는, H1009/L395가 보다 강하고, 또한 보다 장기간에 걸쳐 IL-8의 생물학적 활성을 차단하는 것이 가능하게 된다. 또한, 장기간에 걸쳐 IL-8의 생물학적 활성을 차단하기 위해서는, 그 IL-8 중화 활성이 안정되게 유지되는 것이 필요하다. 실시예 10에 있어서 나타난 바와 같이, H1009/L395는 마우스 혈장을 이용한 실험으로부터, 장기간에 걸쳐서 그 인간 IL-8 중화 활성을 유지할 수 있음이 분명해지고 있다. 이들 특필해야 할 성질을 포함하는 H1009/L395는, 생체 내에 있어서의 IL-8을 중화시키는 효과라고 하는 관점에서도 우수한 효과를 갖는 항체임이 나타났다.

[0704] 〔실시예 11〕 pH 의존적 IL-8 결합 항체 H1009/L395를 이용한 세포외 매트릭스 결합성 평가

[0705] 실시예 10에서 나타난, H1009/L395의 30배의 우수한 인간 IL-8 소실 효과는, 놀랄만한 효과였다. pH 의존성 항원 결합 항체를 투여했을 때의 항원 소실 속도는, 항체와 항원의 복합체가 세포 내에 흡수되는 속도에 의존하는 것이 알려져 있다. 즉, 항원과의 복합체를 형성했을 때에, 형성하지 않을 때와 비교하여 세포 내에 흡수되는 속도가 증대되면, pH 의존성 항체에 의한 항원 소실 효과를 높이는 것도 가능하다. 세포 내에 항체가 흡수되는 속도를 증강시키는 방법으로서, 중성 pH 조건에서의 FcRn 결합능을 항체에 부여하는 방법(WO 2011/122011)이나 항체의 FcγR에 대한 결합능을 증강시키는 방법(WO 2013/047752), 다가의 항체와 다가의 항원을 포함하는 복합체의 형성의 촉진을 이용한 방법(WO 2013/081143) 등이 알려져 있다.

[0706] 그렇지만, H1009/L395의 정상 영역에 있어서 상기 기술은 이용되고 있지 않다. 또한, IL-8은 homo dimer를 형성하는 것이 알려져 있지만, H1009/L395는 인간 IL-8의 homo dimer의 형성면을 인식하기 때문에, H1009/L395가 결합한 인간 IL-8은 monomer 상태가 되는 것이 밝혀져 있다. 그 때문에, 이들 항체는 다가의 복합체를 형성하는 경우는 없다.

[0707] 즉, H1009/L395에 대해서는, 상기 기술이 사용되고 있지 않지만, H1009/L395는 30배의 인간 IL-8 소실 효과를 나타내고 있었다.

[0708] 이하, 이론에 구속되는 것은 의도하지 않지만, H1009/L395로 대표되는 pH 의존적 IL-8 결합 항체의 상기 특성을 가져올 가능성이 있는 요인의 하나를 든다.

[0709] 인간 IL-8은, 높은 등전점(pI)을 갖는 단백질이며, 공지의 방법으로 계산되는 이론 등전점은 대략 10이다. 즉, 중성 pH의 조건하에 있어서는, 인간 IL-8은 양전하측에 치우친 전하를 갖는 단백질이다. H1009/L395로 대표되는 pH 의존적 IL-8 결합 항체도 또한, 양전하측에 치우친 전하를 갖는 단백질이며, H1009/L395의 이론 등전점은 대략 9이다. 즉, 원래 높은 등전점을 가져, 양전하가 풍부한 단백질인 H1009/L395가, 높은 등전점을 갖는 인간 IL-8과 결합하여 생기는 복합체는, H1009/L395 단독보다 등전점이 상승된다.

[0710] 항체의 양전하의 수를 증가시키는 것, 및/또는, 음전하의 수를 감소시키는 것을 포함하는, 항체의 등전점의 증가는, 항체·항원 복합체의 세포 내로의 비특이적인 흡수를 증가시킨다고 생각하는 것도 가능하다. 항IL-8 항체와 높은 등전점을 갖는 인간 IL-8의 복합체는, 항IL-8 항체 단독보다 등전점이 증대되어, 세포 내로 흡수되기 쉬워지고 있다고 할 가능성도 생각되었다.

[0711] 또한, 전술한 바와 같이, 세포외 매트릭스에 대한 결합성도 또한, 세포내 흡수에 영향을 줄 가능성이 있는 인자의 하나이다. 그래서, 세포외 매트릭스에 대한 항체 단독의 결합성과, 인간 IL-8과 항체의 복합체의 결합성이 상이한지 여부를 검증했다.

[0712] (11-1) ECL(전기화학발광)법에 의한 세포외 매트릭스에 대한 항체 결합량의 평가

[0713] TBS(Takara, T903)를 이용하여, 세포외 매트릭스(BD 마트리겔 기저막 매트릭스/BD사제)를 2mg/mL로 희석했다. 희석한 세포외 매트릭스를 MULTI-ARRAY 96well Plate, High bind, Bare(Meso Scale Discovery: MSD사제)에 1well당 5μL 분주하고, 4℃에서 하룻밤 고상화했다. 그 후, 블로킹은, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.5% BSA, 0.01% NaN_3를 포함하는 20mM ACES buffer, pH 7.4를 이용하여 행했다.

[0714] 또한, 평가에 제공하는 항체를 다음과 같이 조정했다. 항체 단독의 첨가 샘플로서는, 각 항체를 이하에 나타내는 Buffer-1을 이용하여 9μg/mL로 각각 희석한 후, Buffer-2를 이용하여 추가로 희석하여, 최종 농도를 각각 3

μg/mL로 했다.

[0715] Buffer-1: 150mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.01% NaN_3를 포함하는 20mM ACES buffer, pH 7.4

[0716] Buffer-2: 150mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.1% BSA, 0.01% NaN_3를 포함하는 20mM ACES buffer, pH 7.4

[0717] 한편, 항체와 인간 IL-8의 복합체의 첨가 샘플은, 항체의 10배의 몰 농도의 인간 IL-8을 항체 샘플에 첨가한 다음에, Buffer-1을 이용하여 항체 농도가 9μg/mL가 되도록 각각 희석된 후, 최종 항체 농도가 각각 3μg/mL가 되도록, Buffer-2에 의해 더욱 희석되었다. 한편, 이 때 인간 IL-8은 약 0.6μg/mL가 되고 있다. 복합체를 형성시키기 위해서, 실온에서 1시간 진탕했다.

[0718] 다음에, 블로킹 용액을 제거한 플레이트에, 항체 단독 또는 복합체의 용액을 첨가하고, 실온에서 1시간 진탕했다. 그 후, 항체 단독 또는 복합체의 용액을 제거하고, 0.25% Glutaraldehyde를 포함하는 Buffer-1을 첨가하여 10분간 정치한 후, 0.05% Tween20을 포함하는 DPBS(와코준야쿠공업사제)로 세정했다. ECL 검출용 항체는, Goat anti-human IgG(gamma)(Zymed Laboratories사제)를 Sulfo-Tag NHS Ester(MSD사제)를 이용하여 Sulfo-Tag화시켜 조제했다. ECL 검출용 항체를 1μg/mL가 되도록 Buffer-2로 희석하여 플레이트에 첨가하고, 차광하, 실온에서 1시간 진탕했다. ECL 검출용 항체를 제거하고, MSD Read Buffer T(4x)(MSD사제)를 초순수로 2배 희석한 용액을 첨가한 후, SECTOR Imager 2400(MSD사제)을 이용하여 발광량을 측정했다.

[0719] 결과를 도 23에 나타낸다. 흥미롭게도, H1009/L395 등의 항IL-8 항체는 모두, 항체 단독(-IL8)으로는 거의 세포외 매트릭스에 대한 결합이 보이지 않았지만, 인간 IL-8(+hIL8)과의 복합체를 형성하여, 세포외 매트릭스에 대한 결합이 보인다는 것이 밝혀졌다.

[0720] 항IL-8 항체가, 상기와 같이 인간 IL-8과 결합하는 것에 의해, 세포외 매트릭스에 대해서 결합성을 갖게 된다고 하는 성질은, 선행 기술 정보로부터는 밝혀지지 않았다. 또한, 한정은 되지 않지만, 이와 같은 성질을 pH 의존적 IL-8 결합 항체와 조합하여, 보다 효율적으로 IL-8의 소실 속도를 증대시키는 것도 가능하다.

[0721] 〔실시예 12〕 FcRn 비결합 항체를 이용한 마우스 PK 시험

[0722] 마우스의 생체 내에 있어서, pH 의존적 IL-8 결합 항체가 인간 IL-8과의 복합체를 형성하여, 그 복합체의 세포 내로의 흡수가 증가하는지 여부를, 이하에 나타내는 방법으로 확인했다.

[0723] 우선, H1009/L395의 가변 영역과, 각종 Fc 수용체에 대한 결합 친화성을 결손하고 있는 Fc 영역을 갖는 변이체를 작성했다. 구체적으로는, 산성 pH 조건하에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합능을 결실시키는 개변으로서, 중쇄인 H1009-IgG1에 대해서, EU 넘버링 253번째의 아이소류신을 알라닌으로, 254번째의 세린을 아스파라긴산으로 치환했다. 또한, 마우스 FcγR에 대한 결합을 결실시키는 개변으로서, 235번째의 류신을 아르기닌으로, 236번째의 글리신을 아르기닌으로, 239번째의 세린을 리신으로 치환했다. 이들 4개의 개변을 포함하는 중쇄로서, 1009-F1942m(서열 번호: 49)을 제작했다. 또한, 중쇄로서 H1009-F1942m, 경쇄로서 L395-k0MT를 갖는, H1009/L395-F1942m을 제작했다.

[0724] 이 Fc 영역을 갖는 항체는, 산성 pH 조건하에 있어서의 FcRn 결합 친화성을 결손하고 있기 때문에, 엔도솜 내로부터 혈장 중으로의 이행이 일어나지 않는다. 그 때문에, 이와 같은 항체는 생체 내에 있어서, 천연형 Fc 영역을 갖는 항체에 비해, 신속하게 혈장 중으로부터 소실된다. 이 때, 천연형 Fc 영역을 갖는 항체는 세포 내에 흡수된 후, FcRn에 의한 샐비지를 받지 않았던 일부의 항체만이 라이소솜으로 이행하여 분해되지만, FcRn에 대한 결합 친화성을 갖지 않는 Fc 영역을 갖는 항체의 경우는, 세포 내에 흡수된 항체의 모두가 라이소솜으로 분해된다. 즉, 이와 같은 개변 Fc 영역을 갖는 항체의 경우는, 투여한 항체의 혈장 중으로부터의 소실 속도는, 세포 내에 흡수되는 속도와 동일하다고 생각할 수도 있다. 즉, FcRn에 대한 결합 친화성을 결손시킨 항체의 혈장 중으로부터의 소실 속도를 측정하는 것에 의해서도, 당해 항체의 세포 내에 흡수되는 속도를 확인하는 것이 가능하다.

[0725] 그래서, 이 H1009/L395-F1942m과 인간 IL-8이 결합한 복합체의 세포 내로의 흡수가, H1009/L395-F1942m의 흡수보다 증가하는지 여부를 검증했다. 구체적으로는, 당해 항체를 단독으로 투여했을 경우와 인간 IL-8과의 복합체를 형성시켜 투여했을 경우에서, 당해 항체의 혈장 중으로부터의 소실 속도가 변화하는지 여부를 검증했다.

[0726] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 32 +/+ mouse, Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. (2010) 602, 93-104)에, 항인간 IL-8 항체만을 투여했을 경우와, 인간 IL-8과 항인간 IL-8 항체를 동시에 투여했을 경우의 각각에서, 항인간 IL-8 항체의 체내동태를 평가했다. 항인간 IL-8 항체 용액(200μg/mL)

및, 인간 IL-8(10μg/mL)과 항인간 IL-8 항체(200μg/mL)의 혼합 용액의 각각을, 꼬리 정맥에 10mL/kg으로 단회 투여했다. 이 때, 인간 IL-8에 대해서 항인간 IL-8 항체는 충분량 과잉으로 존재하므로, 인간 IL-8은 거의 모두 항체에 결합하고 있다고 생각된다. 투여 5분 후, 2시간 후, 7시간 후, 1일 후, 2일 후에 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000rpm으로 15분 원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -20℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다.

[0727] 마우스 혈장 중의 항인간 IL-8 항체 농도는 전기화학발광법에 의해 측정되었다. 우선, 5% BSA(w/v)를 함유한 PBS-Tween 용액을 이용하여 실온에서 하룻밤 블로킹된 Streptavidin Gold Multi-ARRAY Plate(Meso Scale Discovery)에, Anti-Human Kappa Light Chain Goat IgG Biotin(IBL)을 실온에서 1시간 반응시키는 것에 의해 항인간 항체 고상화 플레이트가 작성되었다. 혈장 중 농도로서 3.20, 1.60, 0.800, 0.400, 0.200, 0.100, 0.0500μg/mL의 항인간 IL-8 항체를 포함하는 검량선용 시료와 100배 이상으로 희석된 마우스 혈장 측정용 시료가 조제되었다. 각 시료는, 인간 IL-8과 혼합된 후에 항인간 항체 고상화 플레이트의 각 웰에 50μL로 분주되어, 실온에서 1시간 교반되었다. 인간 IL-8의 종농도는 333ng/mL가 되도록 조제되었다.

[0728] 그 후, 상기 플레이트에, 마우스 IgG의 정상 영역을 갖는 항인간 IL-8 항체(사내 조제품)를 가하여, 실온에서 1시간 반응시켰다. 추가로 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)로 루테늄화한 Anti-Mouse IgG(BECKMAN COULTER)를 상기 플레이트에 가하여 1시간 반응시킨 후, Read Buffer T(×1)(Meso Scale Discovery)를 분주하여, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 측정을 행했다. 항인간 IL-8 항체 농도는 검량선의 리스폰스로부터 해석 소프트웨어 SOFTmax PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출했다.

[0729] 결과로서 얻어진, 마우스 혈장 중의 항체 농도를 도 24에, 또한 각각의 조건에 있어서의 항체의 클리어런스를 표 17에 나타냈다.

표 17

[0730]

항체명	IL8	CL
	μg/kg	mL/d/kg
H1009/L395-F1942m	-	134
H1009/L395-F1942m	100	291

[0731] H1009/L395-F1942m과 인간 IL-8의 복합체의 세포 내로의 흡수 속도가 H1009/L395-F1942m의 흡수 속도보다 적어도 2.2배로 상승하고 있음이 나타났다. 한편, 여기에서 「적어도 2.2배」라고 표기한 것은, 실제로는 5배, 10배, 또는 30배라고 하는 수치일 가능성의 하나로서 이하와 같은 이유도 들 수 있기 때문이다. 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8의 소실 속도는, H1009/L395-F1942m의 소실 속도에 비해 매우 빠르기 때문에, 혈장 중에 있어서 인간 IL-8이 결합한 H1009/L395-F1942m의 비율은, 투여 후 신속하게 저하되어 버린다. 즉, 인간 IL-8과 동시에 투여했을 경우에 있어서도, 혈장 중에 존재하는 H1009/L395-F1942m의 모두가 인간 IL-8에 결합한 상태에 있는 것은 아니고, 오히려, 투여 후 7시간 정도의 시점에서 이미, 대부분은 프리형 항체로서 존재하게 된다. 그와 같은 조건에서 흡수 속도의 평가가 실시되고 있기 때문에, H1009/L395-F1942m과 인간 IL-8의 복합체의 세포내 흡수 속도가 H1009/L395-F1942m의 흡수 속도보다, 실제로는 5배, 10배, 또는 30배 증대되어 있었다고 해도, 이 실험계에 있어서는 그 일부만이 결과에 반영되기 때문에, 2.2배 정도의 효과로서 나타나 버릴 가능성도 생길 수 있다. 즉, 여기에서 얻어진 결과로부터, H1009/L395와 IL-8의 복합체의 세포 내로의 흡수 속도는, 생체 내에 있어서의 실제의 H1009/L395의 세포 내로의 흡수 속도보다 증가하는 것이 나타났지만, 한편, 그 효과가 2.2배라고 하는 수치로 하등 한정될 수 있는 것은 아니다.

[0732] 특별히 한정은 되지 않지만, 지금까지 얻어진 지견으로부터, 다음과 같은 해석을 행할 수도 있다. pH 의존적 IL-8 결합 항체인 H1009/L395는, 인간 IL-8과 복합체를 형성하면, 그 복합체는, 항체 단독으로 존재하는 경우와 비교하여, 보다 등전점이 높고, 양전하에 치우친 상태가 된다. 동시에, 그 복합체의 세포외 매트릭스에 대한 결합성이 항체 단독의 결합성보다 증대되어 있다. 등전점의 상승이나, 세포외 매트릭스에 대한 결합 증강이라고 하는 성질은, 생체 내에 있어서, 세포 내로의 흡수를 촉진시키는 인자로서 생각할 수 있다. 더욱이, 마우스를 이용한 실험으로부터, H1009/L395와 인간 IL-8의 복합체의 세포 내로의 흡수 속도가 H1009/L395의 흡수 속도보다 2.2배 이상으로 증대한다는 것도 나타났다. 이상으로부터, 이론적인 설명과 in vitro에서의 성질, in vivo에서의 현상이 일관적으로, H1009/L395가 인간 IL-8과 복합체를 형성하여, 세포 내로의 흡수가 촉진되어 인

간 IL-8의 소실을 현저하게 증가시키고 있다는 가설을 지지하고 있다.

[0733] 지금까지도, IL-8에 대한 항체는 몇 가지 보고가 있지만, IL-8과의 복합체를 형성했을 때의 세포외 매트릭스에 대한 결합성의 증대나, 상기 복합체의 세포 내로의 흡수의 증가는 지금까지 보고가 없다.

[0734] 또한, 항IL-8 항체의 세포 내로의 흡수의 증가가 IL-8과의 복합체를 형성했을 때에 보인다고 하는 것은, 혈장 중에 있어서 IL-8과 복합체를 형성한 항IL-8 항체는 신속하게 세포 내에 흡수되는 한편으로, IL-8과의 복합체를 형성하고 있지 않은 프리형의 항체는, 세포 내에는 흡수되지 않고 체류하기 쉽다고 생각하는 것도 가능하다. 이 경우, 항IL-8 항체가 pH 의존성일 때는, 일단 세포 내에 흡수된 항IL-8 항체가 세포 내에서 IL-8 분자를 해리 후에 다시 세포 외로 돌아가, 별도의 IL-8 분자와 결합하는 것이 가능해지기 때문에, 복합체 형성 시의 세포 내로의 흡수 증가는, IL-8을 보다 강하게 제거한다고 하는 추가적인 효과를 갖는다고 생각하는 것도 가능하다. 즉, 세포외 매트릭스에 대한 결합이 증대한 항IL-8 항체나 세포내 흡수가 증가한 항IL-8 항체를 선택하는 것도, 본 개시의 별도의 측면이다.

[0735] 〔실시예 13〕 pH 의존적 IL-8 결합 항체 H1009/L395의 in silico 시스템에 의한 면역원성 예측

[0736] 다음에, H1009/L395에 대해 실시예 9-1과 마찬가지의 방법으로 면역원성 스코어 및 ADA 발생 빈도의 예측을 행했다. 그 결과를 표 18 및 도 25에 나타낸다. 한편, 도 25에 있어서, H1009/L395는, 「H1009L395」라고 표기되어 있다.

표 18

[0737]

	중쇄		경쇄		합계	
항체명	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어	EpiMatrix 스코어	tReg Adjusted Epx 스코어
hWS-4	62.44	12.18	22.64	-23.89	85.08	-11.71
H1004/L395	10.79	-39.47	7.79	-38.74	18.58	-78.21
H1009/L395	9.62	-40.64	7.79	-38.74	17.41	-79.38

[0738] 표 18의 결과로부터, H1009/L395는, H1004/L395와 동일한 정도로, 면역원성 스코어가 낮다는 것이 나타났다. 또한, 도 25의 결과로부터, H1009/L395에 있어서 예측된 ADA 발생 빈도는 0%이며, 이쪽도 H1004/L395와 마찬가지였다.

[0739] 이상으로부터, H1009/L395에 있어서 예측되는 면역원성은, 공지의 항인간 IL-8 항체인 hWS-4와 비교하여, 큰폭으로 저하되어 있었다. 이것으로부터, H1009/L395는 인간에 있어서의 면역원성이 극히 낮고, 장기에 걸쳐 안전하게, 항IL-8 중화 활성을 지속하는 것이 가능하다고 생각된다.

[0740] 〔실시예 14〕 산성 pH 조건하에 있어서의 FcRn 결합능을 증강시킨 H89/L118 개변체를 이용한 필리핀원숭이 PK 시험

[0741] 지금까지의 실시예에 기재된 바와 같이, pH 의존적 IL-8 결합 항체 H1009/L395는, 천연형 IgG1의 정상 영역을 갖는 경우에 있어서, 매우 우수한 성질을 갖는 항체이다. 그렇지만, 아미노산 치환을 정상 영역에 포함하는 항체, 예를 들어 실시예 5에서 예시된, 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합을 증강시킨 Fc 영역을 포함하는 항체로서도 이용 가능하다. 그래서, 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합을 증강시킨 Fc 영역이 pH 의존적 IL-8 결합 항체에 있어서도 기능한다는 것을, H89/L118을 이용하여 확인했다.

[0742] (14-1) 산성 pH에 있어서의 FcRn 결합을 증강시킨 H89/L118의 Fc 영역 개변 항체의 제작

[0743] H89/L118의 Fc 영역에 대해서, 실시예 5-1에 기재된, 각종 FcRn 결합 증강 개변을 도입했다. 구체적으로는, H89-IgG1의 Fc 영역에 대해서, F1847m, F1848m, F1886m, F1889m, F1927m, F1168m에 이용되고 있는 개변을 도입하여, 이하의 개변체를 제작했다.

[0744] 중쇄로서 H89-IgG1m(서열 번호: 50), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-IgG1,

[0745] 중쇄로서 H89-F1168m(서열 번호: 51), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-F1168m,

[0746] 중쇄로서 H89-F1847m(서열 번호: 52), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-F1847m,

[0747] 중쇄로서 H89-F1848m(서열 번호: 53), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-F1848m,

[0748] 중쇄로서 H89-F1886m(서열 번호: 54), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-F1886m,

[0749] 중쇄로서 H89-F1889m(서열 번호: 55), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-F1889m,

[0750] 중쇄로서 H89-F1927m(서열 번호: 56), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는 H89/L118-F1927m,

[0751] 이것들을 이용한 필리핀원숭이 PK 시험을, 다음에 나타내는 방법으로 실시했다.

[0752] 한편, 후술하는 실시예에서 기재하는 H89/L118-F22도 마찬가지로 제작했다(중쇄로서 H89-F22(서열 번호: 106), 경쇄로서 L118-KOMT를 갖는다).

[0753] (14-2) 신규 Fc 영역 개변체를 포함하는 항체의 필리핀원숭이 PK 시험

[0754] 필리핀원숭이에게, 항인간 IL-8 항체를 투여한 후의 항인간 IL-8 항체의 체내동태를 평가했다. 항인간 IL-8 항체 용액을 2mg/kg으로 단회 정맥내 투여했다. 투여 5분 후, 4시간 후, 1일 후, 2일 후, 3일 후, 7일 후, 10일 후, 14일 후, 21일 후, 28일 후, 35일 후, 42일 후, 49일 후, 56일 후에 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000rpm으로 10분 원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -60℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다.

[0755] 필리핀원숭이 혈장 중의 항인간 IL-8 항체 농도는 전기화학발광법에 의해 측정되었다. 우선, Anti-hKappa Capture Ab(Antibody Solutions)가 MULTI-ARRAY 96-well Plate(Meso Scale Discovery)에 분주되어 실온에서 1시간 교반되었다. 그 후, 5% BSA(w/v)를 함유한 PBS-Tween 용액을 이용하여 실온에서 2시간 블로킹함으로써 항인간 항체 고상화 플레이트가 작성되었다. 혈장 중 농도로서 40.0, 13.3, 4.44, 1.48, 0.494, 0.165, 0.0549 μg/mL의 항인간 IL-8 항체를 포함하는 검량선용 시료와 500배 이상으로 희석된 필리핀원숭이 혈장 측정용 시료가 조제되어 항인간 항체 고상화 플레이트의 각 웰에 50μL로 분주되고 나서, 실온에서 1시간 교반되었다. 그 후, 상기 플레이트에, Anti-hKappa Reporter Ab, Biotin conjugate(Antibody Solutions)를 가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 추가로 SULFO-TAG Labeled Streptavidin(Meso Scale Discovery)을 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, Read Buffer T(×1)(Meso Scale Discovery)를 분주하여, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 측정을 행했다. 항인간 IL-8 항체 농도는 검량선의 리스폰스로부터 해석 소프트웨어 SOFT Max PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출했다.

[0756] 결과로서 얻어진 각 항체의 반감기(t1/2) 및 클리어런스(CL)를 표 19에, 필리핀원숭이 혈장 중 항체 농도 추이를 도 26에 각각 나타냈다.

표 19

[0757]

항체명	t1/2 day	CL mL/d/kg
H89/L118-IgG1	11.9	2.95
H89/L118-F1168m	24.1	3.21
H89/L118-F1847m	27.9	2.09
H89/L118-F1848m	25.3	1.74
H89/L118-F1886m	45.1	1.34
H89/L118-F1889m	39.5	1.75
H89/L118-F1927m	30.3	2.13

[0758] 이상의 결과로부터, 어느 Fc 영역 개변체도, 천연형 IgG1의 Fc 영역을 갖는 항체에 비해 혈장 중 체류성의 개선이 확인되었다. 특히, H89/L118-F1886m이 가장 바람직한 혈중 동태를 나타냈다.

[0759] 〔실시예 15〕 FcγR에 대한 결합능을 저하시킨 Fc 영역

[0760] 천연형 인간 IgG1은, 그 Fc 영역이 각종의 면역계 세포 상의 Fcγ 수용체(이하, FcγR이라고 표기한다)와 결합

하여, 대상으로 하는 세포에 대해서 ADCC나 ADCP라고 하는 이펙터 기능을 나타낸다는 것이 알려져 있다.

[0761] 한편, IL-8은 가용형 사이토카인이며, 의약품으로서 사용되는 항IL-8 항체는, 주로 IL-8이 과잉으로 존재하고 있는 부위에 있어서 그 기능을 중화시켜, 약리 작용을 나타낼 것이 기대된다. 이와 같은 IL-8이 과잉으로 존재하고 있는 부위로서는, 특별히 한정은 되지 않지만, 예를 들어 염증 부위가 상정될 수 있다. 일반적으로, 이와 같은 염증 부위에 있어서는, 각종의 면역계 세포가 모이고, 게다가 활성화되고 있음이 알려져 있다. 이와 같은 면역계 세포에 대해서, Fc 수용체를 개재하여 의도하지 않는 활성화 시그널을 전달해 버리는 것이나, 의도하지 않는 세포에 대해서 ADCC, ADCP라고 하는 활성을 일으켜 버리는 것은, 반드시 바람직하지는 않다. 그 때문에, 특별히 한정은 되지 않지만, 안전성의 관점에서는, 생체에 투여되는 항IL-8 항체는, FcγR에 대한 결합능은 낮은 편이 바람직하다고 생각될 수 있다.

[0762] (15-1) FcγR에 대한 결합을 저하시킨 개변 항체의 제작

[0763] 각종의 인간 및 필리핀원숭이 FcγR에 대한 결합능을 저하시키는 것을 목적으로 하여, H1009/L395-F1886m의 Fc 영역에 대해서 추가로 아미노산 개변을 도입했다. 구체적으로는, 중쇄인 H1009-F1886m에 대해서, EU 넘버링 235번째의 L을 R로, 236번째의 G를 R로, 239번째의 S를 K로, 각각 치환을 행하여 H1009-F1886s(서열 번호: 37)를 제작했다. 마찬가지로, H1009-F1886m에 대해서, EU 넘버링 235번째의 L을 R로, 236번째의 G를 R로 치환하고, 추가로 EU 넘버링 327번째에서 331번째까지의 영역을 인간 천연형 IgG4 서열로 하여, H1009-F1974m(서열 번호: 36)을 제작했다. 이들 중쇄와 경쇄로서 L395-kOMT를 갖는 항체로서, H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m을 제작했다.

[0764] (15-2) 각종 인간 FcγR에 대한 결합성의 확인

[0765] 다음에, 제작된 H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m의, 인간 및 필리핀원숭이 각각의 가용형 FcγRIa 및 FcγRIIIa에 대한 결합성을, 다음에 나타내는 방법으로 확인했다.

[0766] 제작된 H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m에 관해서, Biacore T200(GE Healthcare)을 이용하여, 인간 및 필리핀원숭이 각각의 가용형 FcγRIa 및 FcγRIIIa와의 결합 실험을 행했다. 인간 및 필리핀원숭이 각각의 가용형 FcγRIa 및 FcγRIIIa는, 당업자에게 공지의 방법으로 His 태그를 부여한 분자형으로서 제작했다. 센서 칩 CM4(GE Healthcare) 상에 아민 커플링법으로 rProtein L(BioVision)을 적당량 고정화하고, 거기에 항체를 포착시켰다. 다음에, 가용형 FcγRIa 또는 FcγRIIIa와 러닝 버퍼(참조 용액으로서)를 인젝트하여, 센서 칩 상에 포착시킨 항체에 상호 작용시켰다. 한편, 러닝 버퍼는 HBS-EP+(GE Healthcare)를 이용하고, 가용형 FcγRIa 또는 FcγRIIIa의 희석에도 HBS-EP+가 이용되었다. 센서 칩의 재생에는 10mM 글리신-HCl, pH 1.5가 이용되었다. 측정은 모두 20℃에서 실시되었다.

[0767] 결과를 도 27에 나타낸다. 여기에서, 인간 FcγRIa, 인간 FcγRIIIa, 필리핀원숭이 FcγRIa, 필리핀원숭이 FcγRIIIa의 순서로, hFcγRIa, hFcγRIIIa, cynoFcγRIa, cynoFcγRIIIa라고 기재되어 있다. H1009/L395-F1886m은 어느 FcγR에 대해서도 결합하는 것이 나타난 것에 대해, 새로이 제작된 H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m은, 어느 FcγR에 대해서도 결합하지 않음이 확인되었다.

[0768] (15-3) Fc 영역 개변체의 마우스 IL-8 소실 시험

[0769] 다음에, 제작된 H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m의 마우스에 있어서의 인간 IL-8 소실 속도나 항체의 혈장 중 체류성을, 이하에 나타내는 실험으로 확인했다. 한편, 여기에서는, H1009/L395-F1886s의 항체 투여량을 증가시키는 것에 의한 영향도 포함하여 평가하기 위해서, H1009/L395-F1886s에 관해서는 투여량을 2mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg의 3점으로 평가를 행했다.

[0770] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 32 +/+ mouse, Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. (2010) 602, 93-104)에게, 인간 IL-8과 항인간 IL-8 항체를 동시에 투여한 후의 인간 IL-8의 체내동태를 평가했다. 인간 IL-8(10μg/mL), 항인간 IL-8 항체(200μg/mL, 500μg/mL 또는 1000μg/mL)의 혼합 용액을 꼬리 정맥에 10mL/kg으로 단회 투여했다. 이 때, 인간 IL-8에 대해서 항인간 IL-8 항체는 충분량 과잉으로 존재하므로, 인간 IL-8은 거의 모두 항체에 결합하고 있다고 생각된다. 투여 5분 후, 2시간 후, 4시간 후, 7시간 후, 1일 후, 2일 후, 3일 후, 7일 후, 14일 후, 21일 후, 28일 후에 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000rpm으로 15분 원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -20℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다.

[0771] 마우스 혈장 중의 인간 IL-8 농도 측정은, 실시예 7과 마찬가지의 방법으로 실시했다. 결과로서 얻어진, 혈장

중 인간 IL-8 농도의 데이터를 도 28에, 또한 마우스 혈장 중으로부터의 인간 IL-8 클리어런스(CL)의 수치를 표 20에 나타낸다.

[0772] 우선, 2mg/kg의 투여군의 비교에 있어서, 천연형 IgG1의 Fc 영역을 갖는 H1009/L395와, 개변 Fc 영역을 갖는 H1009/L395-F1886s는, 동등한 인간 IL-8 소실 효과를 갖는다는 것이 나타났다.

[0773] 다음에, H1009/L395-F1886s의 항체 투여량을 변화시켰을 경우는, 투여 후 1일의 시점에서의 혈장 중 IL-8 농도에는 약간의 차이가 보였지만, 인간 IL-8 클리어런스의 값으로서는 2mg/kg과 10mg/kg에서 유의한 차이는 보이지 않았다. 이것은, H1009/L395의 가변 영역을 포함하는 항체는, 고용량으로 투여되었을 경우에도 충분한 IL-8 소실 효과를 나타낸다는 것을 강하게 시사한다.

표 20

[0774]

항체명	투여량	인간IL-8 CL(mL/d/kg)
H1009/L395	2 mg/kg	740
H1009/L395-F1886s	2 mg/kg	628
H1009/L395-F1886s	5 mg/kg	458
H1009/L395-F1886s	10 mg/kg	560

[0775] (15-4) Fc 영역 개변체의 필리핀원숭이 PK 시험

[0776] 다음에, H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m을 이용하여, 필리핀원숭이에 있어서의 항체의 혈장 중 체류성을 이하에 나타내는 방법으로 검증했다.

[0777] 필리핀원숭이에게, 항인간 IL-8 항체 단독, 또는 인간 IL8 및 항인간 IL-8 항체를 동시에 투여한 후의, 항인간 IL-8 항체의 체내동태를 평가했다. 항인간 IL-8 항체 용액(2mg/mL) 또는, 인간 IL-8(100μg/kg) 및 항인간 IL-8 항체(2mg/kg)의 혼합 용액을 1mL/kg으로 단회 정맥내 투여했다. 투여 5분 후, 4시간 후, 1일 후, 2일 후, 3일 후, 7일 후, 10일 후, 14일 후, 21일 후, 28일 후, 35일 후, 42일 후, 49일 후, 56일 후에 혈액을 채취했다. 채취한 혈액은 즉시 4℃, 15,000rpm으로 10분 원심분리하여, 혈장을 얻었다. 분리한 혈장은, 측정을 실시할 때까지 -60℃ 이하로 설정된 냉동고에 보존했다.

[0778] 필리핀원숭이 혈장 중의 항인간 IL-8 항체 농도의 측정은, 실시예 14에 기재된 방법으로 실시했다. 결과로서 얻어진, 혈장 중 항인간 IL-8 항체 농도의 데이터를 도 29에, 또한 필리핀원숭이 혈장 중으로부터의 항인간 IL-8 항체의 반감기(t1/2) 및 클리어런스(CL)의 수치를 표 21에 나타낸다.

[0779] 우선, 천연형 인간 IgG1의 Fc 영역을 갖는 Hr9 및 H89/L118과 비교하여, 기능이 개량된 Fc 영역을 갖는 H1009/L395-F1886s는, 혈장 중 체류성이 유의하게 향상되고 있음이 나타났다.

[0780] 더욱이, H1009/L395-F1886s는, 인간 IL-8과 동시에 투여되었을 경우에 있어서도, 항체 단독으로 투여되었을 경우와 동등한 혈장 중 농도 추이를 나타냈다. 특별히 한정되지는 않지만, 이것으로부터, 다음과 같이 고찰하는 것도 가능하다. 전술한 바와 같이, H1009/L395와 인간 IL-8의 복합체의 세포 내로의 흡수는 H1009/L395 단독의 흡수보다 증가하고 있음이 나타나고 있다. 일반적으로, 고분자량의 단백질은, 비특이적 또는 수용체 의존적으로 세포 내에 흡수된 후, 라이소솜으로 이행하여, 라이소솜에 존재하는 각종의 분해 효소에 의해 분해된다고 생각되고 있다. 그 때문에, 당해 단백질의 세포 내로의 흡수 속도가 상승하면, 그 혈장 중 체류성도 악화되는 방향으로 나아갈 것이 생각된다. 그렇지만, 항체의 경우는, 엔도솜 내에 존재하는 FcRn에 의해 혈장 중으로 되돌려지는 성질을 갖기 때문에, FcRn에 의한 샐비지 기능이 충분히 작용하고 있는 한에 있어서, 세포내 흡수 속도가 증가했을 경우에 있어서도, 혈장 중 체류성에는 영향을 주지 않을 것이 생각된다. 여기에서, H1009/L395-F1886s는, 인간 IL-8과 동시에 필리핀원숭이에 투여되었을 경우에 있어서도, 혈장 중 체류성에의 영향은 나타나지 않았다. 이것은, H1009/L395-F1886s는, 항체의 세포내 흡수 속도는 증가해도, FcRn에 의해 충분히 샐비지되어 혈장 중으로 돌아오는 것이 되어 있을 가능성을 나타내고 있다.

[0781] 더욱이, 또 한 종류의 Fc 영역 개변체인 H1009/L395-F1974m도, H1009/L395-F1886s와 동등한 혈장 중 체류성을 나타내고 있었다. 전술한 바와 같이, 이들 Fc 영역 개변체는 각종 FcγR에 대한 결합능을 저하시키기 위한 개변으로서, 상이한 것이 도입되고 있지만, 그것들은 항체 자신의 혈장 중 체류성에 영향을 주지 않음을 나타내고 있다. 이상으로부터, H1009/L395-F1886s 및 H1009/L395-F1974m 모두, 필리핀원숭이에 있어서의 혈장 중 체류

성은, 천연형 IgG1의 Fc 영역을 갖는 항체와 비교하여 현저하게 개선되어, 극히 양호하다는 것이 나타났다.

표 21

[0782]

	t1/2	CL
	day	mL/d/kg
Hr9	20.26	3.72
H89/L118	11.88	2.95
H1009/L395-F1886s	35.75	1.64
H1009/L395-F1886s +hIL-8	72.24	1.11
H1009/L395-F1974m +hIL-8	43.78	1.60

[0783] 이상의 실시예로부터 나타난 바와 같이, H1009/L395는, pH 의존성 IL-8 결합능을 갖고, 또한 IL-8과의 복합체가 세포 내에 신속하게 흡수된다고 하는 성질을 갖는 것에 의해, 인간 IL-8의 생체 내에서의 소실 속도를 현저하게 상승시키는 것이 가능한 항체로서, 처음으로 실현된 것이다. 더욱이, 중성 pH 조건하에 있어서의 IL-8에 대한 결합 친화성도 또한 공지의 hWS-4 항체와 비교하면 상승되어 있어, 혈장 중 등의 중성 pH 조건하에 있어서 보다 강하게 인간 IL-8을 중화시키는 것이 가능하다. 게다가, 혈장 중의 조건하에 있어서 우수한 안정성을 가져, 생체 내에 투여된 후에도 IL-8 중화 활성이 저하되지 않는 항체이다. 또한, hWS-4와 비교하면 산생량이 큰폭으로 개선된 Hr9를 기본으로 제작된 H1009/L395는, 산생량의 관점에서 제조에 적절한 항체가 되고 있다. 더욱이, in silico의 면역원성 예측에서는, 그 면역원성은 매우 낮은 스코어를 나타내고 있어, 공지의 hWS-4 항체나 기존의 시판 항체의 어느 것과 비교해도 큰폭으로 낮다. 즉, H1009/L395는 인간에 있어서 ADA가 되기 어려워, 장기에 걸쳐 안전하게 사용하는 것이 가능한 항체라고 기대된다. 이러하므로, H1009/L395는, 공지의 항인간 IL-8 항체와 비교하여, 다양한 관점으로부터의 개선이 나타난 항체이며, 의약품으로서 매우 유용하다.

[0784] 천연형 IgG의 Fc 영역을 갖는 H1009/L395는, 상기한 바와 같이 충분히 유용하지만, 기능이 개량된 Fc 영역을 포함하는 H1009/L395의 개변체도 또한, 그 유용성이 높여진 항체로서 적절히 사용하는 것이 가능하다. 구체적으로는, 산성 pH 조건하에 있어서의 FcRn 결합을 증강시켜, 혈장 중 체류성을 개선하여, 보다 장기간에 걸쳐 효과를 지속하는 것도 가능하게 된다. 또한, FcγR에 대한 결합능을 저하시키는 개변이 도입된 Fc 영역을 포함하는 개변체는, 투여된 생체 내에서의 의도하지 않는 면역계 세포의 활성화나 세포 상해 활성 등의 발생을 회피하여, 안전성이 높은 항체 의약품으로서 사용하는 것이 가능해진다. 이와 같은 Fc로서는, 당 명세서 중에서 실시된 F1886s 또는 F1974m을 이용하는 것이 특히 바람직하지만, 이들 Fc로 한정되는 것은 아니고, 마찬가지의 기능을 갖고 있는 한, 다른 개변 Fc 영역을 포함하는 항체 의약품도 본 개시의 일 실시태양으로서 사용된다.

[0785] 결과로서, H1009/L395-F1886s, H1009/L395-F1974m 등을 포함하는 본 개시에 있어서의 항체는, 장기간에 걸쳐서, 또한 안전하게, 인간 IL-8의 생물학적 활성을 강하게 저해시킬 수 있는 상태를 유지하는 것이 가능하다. 이것은, 기존의 항IL-8 항체에서는 달성할 수 없는 레벨을 실현하고 있어, 극히 완성도가 높은 항 IL-8 항체 의약품으로서 그 사용이 기대되는 것이다.

[0786] 〔실시예 16〕 자궁내막증 환자의 낭포액 중의 IL-8 농도 측정

[0787] 자궁내막증에 있어서의 IL-8의 관여를 확인하기 위해, 자궁내막증 환자의 낭포액 중의 IL-8 농도를 측정했다. 샘플은, 지치의과대학에서 수술 적응의 자궁내막증 환자로부터 수술후 조직의 낭포액을 회수하여, 1차 익명화 후, 추가이제약에서 2차 익명화를 행했다. 낭포액 중의 IL-8 농도는 전기화학발광법으로 측정되었다. 우선, 항인간 IL-8 항체(Hycult Biotech)를 비오틴 표지한 후에, 5% BSA(w/v)를 함유한 PBS-Tween 용액을 이용하여 2시간 블로킹된 MSD GOLD 96-Well Streptavidin SECTOR Plate(Meso Scale Discovery)에 분주하여 실온·암소(暗所)에서 1시간 교반하는 것에 의해, 항인간 IL-8 항체 고상화 플레이트가 작성되었다. 낭포액 중 농도로서 900, 300, 100, 33.3, 11.1, 3.70, 1.23pg/mL의 인간 IL-8 (NP_000575.1을 참조하여 사내 조정)을 포함하는 검량선 시료와 5배 이상 희석된 인간 낭포액 측정 시료가 조제되어, 항인간 IL-8 항체 고상화 플레이트의 각 웰에 25μL로 분주되고 나서, 실온·암소에서 1시간 교반시켰다. 그 후, SULFO-TAG Labeled 항인간 IL-8 항체(사내 조제품)를 실온·암소에서 1시간 반응시킨 후, Read Buffer T(×1)(Meso Scale Discovery)를 분주하여, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 측정을 행했다. 인간 IL-8 농도는 검량선의 리스폰스로부터

해석 소프트웨어 SOFT Max PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출했다.

[0788] 그 결과, 도 30에 나타내는 바와 같이, 자궁내막증 환자의 낭포액 중의 IL-8 농도는 10000pg/mL 이상으로 매우 고농도인 것이 판명되어, 자궁내막증에 있어서의 IL-8의 중요성이 시사되었다.

[0789] 〔실시예 17〕 자궁내막증 외과적 유인 원숭이 모델의 제작과 병태 평가

[0790] 자궁내막증에 있어서의 항IL-8 항체의 약효를 평가하기 위해, 자궁내막증 외과적 유인 모델을 제작하여, 평가를 행했다. 병태 모델의 제작은 이하와 같이 행했다.

[0791] 성 주기가 정기적인 8-14세령의 암컷 필리핀원숭이(의약 기반·건강·영양 연구소 영장류 의과학 연구 센터에서 입수)에 대해, 황체기 해당 기간 중에 마취하에서 개복을 행하여, 자궁체부를 V자로 절개하여 절제했다. 다음에 자궁의 평활근층을 남겨 5㎜～10㎜각으로 트리밍하여, 자궁내막 부분이 복막에 접하도록 우복벽 복막에 1개소, 좌복벽 복막에 2개소(두측, 미측)에 흡수사로 봉합하여, 이식부로 했다. 절제 후의 자궁은 흡수사로 봉합했다. 추가로 나머지의 내막 조직을 세절하여 5mL의 2ng/mL Hepatocyte Growth Factor 용액(R&D systems사제)에 현탁하고, 복강 내에 파종 이식하여, 폐복했다. 마취는 케타민 자일라진의 밸런스 마취(2:1의 비율을 기준으로 혼합)를 이용하지만, 마취 유지 시간에 따라서는 아이소플루렌으로 유지했다. 수술 중에는 히팅 패드에 의해 체온 유지 관리를 행하고, 심전도에 의해 상태를 관리했다. 수술 후의 각성 시에는 길항약인 안티세단(자일라진량과 동량을 기준으로)과 항생제의 세파라진을 투여, 진통제인 자르반을 수술후 2일간 투여하고, 매일의 정기 관찰로 수술 후의 이상이 없는 것을 확인했다. 또한 복강경 관찰 시에도 마찬가지로 마취와 수술후 관리를 실시했다.

[0792] 전술한 수술에 의한 자궁내막증의 외과적인 유인 4개월 후, 9개월 후(투여 3개월 후), 12개월 후(투여 6개월 후)에 복강경 관찰을 행하여, 자궁내막증의 병태를 이하와 같이 평가했다.

[0793] 복강경 관찰은, 복부 정중을 마취하에서 절개하고, 트로카를 자입하여, 복강경을 삽입했다. 복강경은 비디오 시스템(칼스톨츠사제) 및 모니터에 접속되고, 복강 내의 관찰은 모니터로 행하고, 기록은 비디오 시스템으로 행했다. 다음에, 고속 기복 장치(OLYMPUS사제)를 이용하여 이산화탄소 가스를 복강 내에 충만시켜 복부를 확장하여, 눈금 달린 바나 겸자를 복측부로부터 삽입했다. 병변의 사이즈는 눈금이 달린 바 또는 눈금이 달린 겸자를 이용하여 측정했다.

[0794] 자궁내막 조직의 봉합에 의해 형성된 결정성 병변(nodular lesion)의 사이즈(세로, 가로, 높이)를 측정하여, 세로(㎜) x 가로(㎜) x 높이(㎜)로부터 체적을 산출했다. 자궁내막 조직의 세절 후, 파종에 의해 형성된 병변 부위와 유착에 대해서는, 임상에서 사용되고 있는 r-AFS score를 원숭이용으로 개변한 modified r-AFS score에 준거하여, 유착의 장소, 범위, 깊이 및 병변의 사이즈를 복강경 관찰 시에 평가했다. Modified r-AFS score는, 도 31에 나타내는 바와 같이, 원숭이용으로 이하 2점의 개변을 행했다.

[0795] 1. 원숭이 모델에서는 방광으로의 유착 빈도가 인간보다 높기 때문에, 방광 자궁와(窩)로의 유착 항목을 추가했다. 방광으로의 유착의 평가 방법은, 더글라스와의 유착과 마찬가지의 스코어링으로 했다.

[0796] 2. 원숭이는 인간보다 몸과 장기의 크기가 작기 때문에, 병변 사이즈의 판단 조건을 <3㎜, 3-10㎜, >10㎜로 변경하여 스코어링했다.

[0797] 후일 비디오 시스템을 이용하여 녹화한 복강경 관찰 동영상을 확인하여 복강경에 의한 평가를 최종화했다.

[0798] 유인 4개월 후의 복강경 관찰 결과를 기초로, 기준을 만족시킨 개체를 선택하여, 군나누기를 행했다. 채용 기준은 이하와 같다.

[0799] 1. 유인 4개월 후에 복강경 관찰을 행하여 이식 내막의 생착을 확인할 수 있는 것

[0800] 2. 유인 후 투여 전 기간 중에 3회 이상의 월경 출혈을 확인할 수 있는 것

[0801] 군나누기는, 2회로 나누어 실시하여, 개체마다의 결정성 병변의 평균 체적과 측정 가능했던 병변수를 기초로 랜더마이즈를 행하여, 최종적으로 vehicle군에게 6두, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에게 7두 할당했다. 최종적으로 할당된 전 개체의 데이터를 이용하여, 군 사이에 편차가 없음을 Kraskal-Wallis 검정에 의해 확인했다. 항목은 결정성 병변의 체적(병변마다), 체중, size r-AFS score, adhesion r-AFS score를 확인했다.

표 22

[0802]

Group	Dose	투여 방법	Animal ID
Vehicle 군	—	s.c., q4w	#101, #102, #103, #110, #115, #120
H1009/L395-F1974m 군	10 mg/kg	i.v., q4w	#105, #106, #112, #117, #119, #121, #123

[0803] 유인 6개월 후부터 투여를 개시하여 4주마다, 6개월, 6회 투여를 행했다. 항체 투여군으로서 H1009/L395-F1974m을 10mg/kg 정맥 주사, Vehicle군으로서 His Buffer(20mM His-Asp, 150mM Arg-Asp(pH 6.0))를 피하 투여했다. 투여 개시부터 3개월마다의 초회 투여 후 3개월, 6개월 시에 복강경 관찰을 행하여, 자궁내막증의 병태를 평가했다.

[0804] 투여 개시부터 6개월 후의 최종 복강경 관찰 후, 추가 마취하여 방혈, 안락사 처치한 후, 부검을 행하여, 이식부를 포함하는 골반내 장기(좌우 난소, 좌우 난관, 좌우 난관간막, 좌우 난관채, 좌우 자궁광간막, 자궁, 질, 더글라스와, 방광 자궁와)를 채취했다. 채취한 조직은 10% 중성 완충 포르말린액으로 고정하여, 파라핀 포매 박절 조직 표본으로 헤마톡실린·에오신[H·E] 염색을 실시했다. 조직 및 봉합 유래 병변에 중개자를 넣어 낭포액이 저류되어 있는 경우는 낭포액도 채취했다.

[0805] 복강경 관찰의 결과, Vehicle 대조군에 있어서, 유인 4개월 후에는 자궁내막 조직의 봉합에 의해 형성된 결정성 병변의 형성, 추가로 유인 12개월 후(투여 6개월 후)에는, 결정성 병변과 그 근방에 흑색의 낭포 형성이 관찰되었다. 또한, 자궁내막 조직의 세절 후, 파종한 것에 의해, 더글라스와나 방광에 있어서 유착의 형성이 확인되었다(도 32). 또한, 유인 12개월 후의 부검 시에 채취한 Vehicle군의 조직 표본을 H·E 염색했는데, 도 33에 나타내는 바와 같이, 이식한 자궁내막 조직(초기 이식편)의 근방에 증식성을 나타내는 내막 상피가 고도로 형성되어, 복벽근층에까지 형성되고 있음이 확인되었다. 내막 상피의 주위는 다층의 스트로마 세포 및 교원 섬유가 풍부한 간질에 의해 구성되어, 인간의 자궁내막증 조직 구조와 유사한 구조 형태가 관찰되었다. 이들 결과로부터, 본 모델이 자궁내막증 모델로서 유용함을 확인했다(12th World Congress on Endometriosis, 2014, P-221). 마찬가지로, 자궁내막증의 외과적 유인 모델로서 비비를 이용한 방법도 보고되어 있다(Fertil Steril. 2013;99(3):783-789, Fertil Steril. 2013;100(4):1144-50).

[0806] 또한, 유인 12개월 후(투여 6개월 후)의 최종 복강경 관찰 후, 부검을 행하고, 저류되어 있던 낭포액을 채취하여, Vehicle군의 낭포액 중의 IL-8 농도를 전기화학발광법에 의해 측정했다. 우선, 항체 H1009/L395-F1974m 용액을 MULTI-ARRAY 96-well Plate(Meso Scale Discovery)에 분주하여 4℃에서 하룻밤 정치하는 것에 의해, 항체 H1009/L395-F1974m 고상화 플레이트를 제작했다. 버퍼 중 농도로서 269, 108, 43.0, 17.2, 6.89, 2.75, 1.10pg/mL의 원숭이 IL-8(XM_005555087.1을 참조하여 사내 조정)을 포함하는 검량선 시료와 50배 이상 희석된 원숭이 낭포액 측정 시료를 조제하여, 항체 H1009/L395-F1974m 고상화 플레이트의 각 웰에 분주하고 나서, 실온·암소에서 2시간 교반시켰다. 그 후, 토끼 항IL-8 항체(Hycult Biotech)를 실온·암소에서 1시간 반응시켰다. 계속하여, SULFO-TAG Labeled 항토끼 항체(Meso Scale Discovery)를 실온·암소에서 1시간 반응시킨 후, Read Buffer T(×1)(Meso Scale Discovery)를 분주하여, 즉시 SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)으로 측정을 행했다. 원숭이 IL-8 농도는 검량선의 리스폰스로부터 해석 소프트웨어 SOFT Max PRO(Molecular Devices)를 이용하여 산출했다. 그 결과, 표 23에 나타내는 바와 같이 자궁내막증 외과적 유인 원숭이 모델의 낭포액에 있어서도, 인간 자궁내막증 환자의 낭포액과 마찬가지로 IL-8이 매우 고농도인 것이 확인되었다. 본 소견은, 본 원숭이 모델이 인간 자궁내막증으로의 외삽성이 높다는 것을 지지한다. 더욱이, 각 개체의 낭포액 중의 IL-8 농도와 adhesion r-AFS score의 상관성을 조사한 바, 흥미롭게도, 도 34a와 같이, 낭포액 중의 IL-8 농도와 adhesion r-AFS score에 있어서 상관하는 경향이 나타났다. 한편, 각 개체에서 복수의 낭포액 중 IL-8 농도를 측정할 수 있었던 경우는, 가장 높은 값을 대표치로 했다. 이 결과로부터, 자궁내막증의 유착에 대한 IL-8의 관여가 나타났다.

표 23

[0807]

	낭포액 중 IL-8 농도(ng/mL)		
#101	46.4		
#102	0.726		
#103	9.83		
#110	58.3		
#115	476	28.8	25.0
#120	417		

[0808] 항체 H1009/L395-F1974m 투여군과 Vehicle군에 있어서, 투여 개시 6개월 후, 복강경 관찰에 의해 약효를 검토했다. 해석에 임하여, 6개월의 투여 기간 중에 월경 출혈의 확인이 3회에 못 미쳤던 개체에 관해서는, 해석의 대상 외로 했다. 본 시험의 개체 중, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군 #117(10mg/kg군)의 1두가 해당되어, 해석으로부터 제외했다. 한편, 당업자에게 공지의 방법에 따라, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서 항항체의 검출을 행한 바, 6두 중 2두에 있어서 항항체가 검출되어, 혈중 트랩 API 농도의 저하가 인정되었다. 이하의 해석은, 항항체 양성의 개체도 포함하여, 실시했다.

[0809] 우선, 자궁내막 조직의 봉합에 의해 형성된 각 결정성 병변 하나씩의 체적을 산출하여, 계시적(繼時的)인 변화 및 크기에 따라 이하의 표 24와 같이 분류했다. 유착에 의해 평가할 수 없는 등, 경시적인 평가가 되어 있지 않은 경우는, 해당 개소를 해석에 포함하지 않았다.

표 24

[0810]

Type	
A: Proliferative, ≧ 500 mm^3	투여 6개월 시에 500mm^3 이상으로 크게 증식한다
B: Proliferative, <500 mm^3	투여 6개월 시에 500mm^3 미만으로,투여 전에 대하여 투여 후에 증식 경향을 나타낸다
C: No change	투여 기간 중에 증감은 있지만 큰 변화가 없다
D: Decreased	투여 전에 대하여 투여 후에 감소 경향을 나타낸다

[0811] 그 결과, 표 25에 나타내는 바와 같이, vehicle군에서는 증식을 나타내는 type A 및 type B의 빈도가 54%(7/13 병변)로 높고, 감소를 나타내는 type D는15%(2/13 병변)로 낮았는데 대해, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서는 감소를 나타내는 type D의 빈도가 58%(7/12 병변)로 높다고 하는 결과가 얻어져, 항체 H1009/L395-F1974m 투여에 의한 결정성 병변의 축소 효과가 나타났다.

표 25

[0812]

group	A: proliferative, ≥500 mm3	B: proliferative, <500 mm^3	C: no change	D: decreased
Vehicle	8% (1/13)	46% (6/13)	31% (4/13)	15% (2/13)
H1009/L395-F1974m 10 mg/kg	0% (0/12)	8% (1/12)	33% (4/12)	58% (7/12)

[0813] 또한, 개체마다의 결정성 병변의 상대 체적을, 다음의 계산 방법으로 산출하여, 항체 H1009/L395-F1974m의 결정성 병변에 대한 약효에 대해 평가했다(결정성 병변의 상대 체적(%)=투여 개시부터 6개월의 채용 병변의 체적의 합계/투여 개시 2개월 전의 채용 병변의 체적의 합계)×100). 그 결과를 도 34b에 나타낸다. Vehicle군의 결정성 병변의 상대 체적은, 141%(67-331)(중앙치(최소치-최대치))였다. 또한, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군은 49%(15-156)였다. Vehicle군과 비교하여 항체 H1009/L395-F1974m의 투여에 의해, 결정성 병변의 유의한 축

소가 인정되었다(P=0.0492). 한편, 통계 해석으로서, 파라메트릭한 t 검정(유의 수준은 P<0.05)을 사용했다. 이 결과로부터, 항IL-8 항체에 의한 결정성 병변의 체적의 증식 억제 효과가 나타났다.

[0814] 계속하여, 자궁내막 조직의 세절 후, 파종에 의해 형성된 병변 부위와 유착에 대해서, modified r-AFS score에 준거하여 평가를 행하여, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군(N=6)과 Vehicle군(N=6)에 있어서 약효를 검토했다. 각 개체에서 항체 투여 전과 항체 투여 후에 있어서 어느 정도 변화했는지, Change of modified r-AFS score를 하기와 같이 산출하여, 그 결과를 도 35a에 나타냈다.

[0815] Change of total r-AFS score=total r-AFS score(투여 후) - total r-AFS score(투여 전)

[0816] Change of adhesion r-AFS score=adhesion r-AFS score(투여 후) - adhesion r-AFS score(투여 전)

[0817] Change of size r-AFS score=size r-AFS score(투여 후) - size r-AFS score(투여 전)

[0818] 항체 H1009/L395-F1974m 투여군의 Change of total r-AFS score와 Change of adhesion score는, vehicle군과 비교하여 분명하게 감소를 나타냈다(p=0.0070, p= 0.0096). Change of size r-AFS score에 대해서도, vehicle군과 비교하여, 항체 H1009/L395-F1974m군에서는 감소 경향이 보였다. 통계 해석은, 통계 해석 소프트웨어(SAS Institute사제)를 이용하여 논파라메트릭 Steel 검정(유의 수준은 양측5%)으로 해석했다. 본 결과에서, 항체 H1009/L395-F1974m 투여에 의해 Change of adhesion score에 유의한 감소가 보였던 것, 및 앞서의 도 34a에서 나타냈던 바와 같이 낭포액 중의 IL-8 농도와 adhesion r-AFS score에 상관 경향이 보였던 것으로부터, 자궁내막증의 유착에 IL-8이 강하게 관여하고 있어, 자궁내막증의 유착 개선에 대한 항IL-8 항체의 유용성이 나타났다.

[0819] 도 35a에는, 복강경 수술 시에 촬영한 화상에 기초하여 평가한 change of modified r-AFS score를 나타냈다. 복강경 수술 시에 시술자에 의해 기록된 스코어치에 기초하는 total modified r-AFS score를 도 35b에 나타낸다. 한편, 초회 투여 2개월 전의 스코어치를, 투여 전 스코어로서 사용했다. 군마다의 투여 전후의 total modified r-AFS score의 변화에 대해, 대응이 있는 페어에 대한 Wilcoxon 부호 순위 검정으로 통계 해석을 실시한 결과(유의 수준은 P<0.05), vehicle군에서 투여 후의 스코어가 유의하게 증가하고 있었지만(P=0.0313), 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서는 스코어에 변화가 없었다(P=0.875). Total modified r-AFS score는 자궁내막증의 병태의 악성도를 나타내므로, 이 결과로부터, 항IL-8 항체에 의한, 자궁내막증의 병태 악화에 대한 억제 효과가 나타났다.

[0820] 최종 복강경 관찰 후, 부검 시에 채취한 이식부 및 이식편을 H·E 염색하여, 광학 현미경으로 병리 조직학적으로 관찰했다. 그 결과, 도 36에 나타내는 바와 같이, Vehicle군과 비교하여, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서는 증식성을 나타내는 상피 및 스트로마 세포의 위축성 변화나 교원 섬유를 주체로 하는 간질의 감소가 확인되고, 특히 항항체 음성의 혈중 API 농도를 유지할 수 있던 개체에서 효과가 강하게 나타났다(표 26). Vehicle군 중에는 결정성 병변의 체적이 감소 경향을 나타내는 type D의 병변(#102-L2, #115-R)이 있었지만, 결정성 병변의 병리 결과로부터는 위축이나 간질 감소는 확인되지 않고, 병변은 유지되고 있었다. 항체 H1009/L395-F1974m 투여군 중에서 결정성 병변의 체적이 증가 경향을 나타내는 type B를 나타내는 것이 있었지만, 결정성 병변의 병리 결과로부터 #106-L1는 스트로마의 위축성 변화나 간질 감소가 확인되어, 병태의 개선을 확인할 수 있었다. 또한, 헤모시데린은 Vehicle군에서 56%(9/16)로 관찰되고, 항체 투여군에서는 24%(4/17)밖에 보이지 않았던 것으로부터, 매크로파지 또는 단구가 항체 투여에 의해 침윤 억제되고 있는 것이 시사되었다. 더욱이 항체 투여군에서는 vehicle군에서는 보이지 않는 근 조직의 재생이 보였으므로, 근층까지 침윤된 병변이 퇴축하여, 근육 조직으로 치환되어 돌아오고 있는 것을 시사하는 데이터가 얻어졌다. 복벽근층까지 침윤한 자궁내막증 선관의 유무로, 심재성 병변(deep lesion)의 유무를 확인한 바, vehicle군과 항항체 양성 개체도 포함하는 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서 그다지 차이는 보이지 않았지만, 항항체 양성 개체를 제외하면, Vehicle군에서 5/18 병변으로 확인된 것에 대해, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서는 1/11 병변으로 빈도가 적었다. 심재성 병변의 형성에 대해서도 억제 효과가 있음이 시사되었다.

표 26

Nodular lesion의 병리학적 해석 결과

Data of monkeys with regular mensetrual cycles during treatment

| Article | | Vehicle | | |

핀원숭이에서 인정된 자궁내막 조직은, 자궁 근층 내에 있어서 자궁내막 선과 그것을 둘러싸는 자궁내막 스트로마가 존재하여, 인간 자궁에서 보여지는 자궁선근증의 병리학적 특징을 가지고 있었으므로 인간 자궁선근증 병발 모델이라고 판단하여, 이들 1예씩의 자궁 근층 내의 자궁내막 조직을 비교했다. 도 37에 나타내는 바와 같이, Vehicle군과 비교하여, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서 자궁선근증 병변부의 내막 상피의 위축 및 스트로마 세포의 감소와 위축이 인정되었다. 본 소견에 의해, 항IL-8 항체가 자궁선근증에 대해서도 억제 효과가 있음이 나타났다. 이 결과로부터, IL-8 시그널 저해제가 자궁선근증의 치료제 또는 예방제로서 유용하다는 것을 당업자는 당연히 이해할 수 있을 것이다.

[0826] 〔실시예 19〕 자궁내막증 조직에 있어서의 CXCR1, CXCR2 발현 해석

[0827] 인간 IL-8의 수용체로서 CXCR1 및 CXCR2가 알려져 있다. 자궁내막증 병변부에 있어서, IL-8이 작용하는 세포를 조사하기 위해, 마우스 항인간 CXCR1 모노클로날 항체(R&D Systems, 카탈로그 번호: 42705) 및 마우스 항인간 CXCR2 모노클로날 항체(Abcam, 카탈로그 번호: 19)를 이용하여, 수술 적출 인간 자궁내막증 조직의 파라핀 포매 블록을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 행했다. 이들 파라핀 블록으로부터 박절 조직 절편을 작성하여, 상기 항CXCR1 및 2 항체를 1차 항체로서 인큐베이션한 후, 2차 항체로서 폴리머-HRP와 결합한 염소 항마우스 IgG 항체(Dako)와 반응시켜, 다이아미노벤지딘(와코준야쿠공업주식회사)으로 가시화했다. 그 결과, 표 27에 나타내는 바와 같이, CXCR1와 CXCR2가 스트로마 세포에 있어서 음성이라는 것이 확인되었다. 한편, 조직 내에 침윤되어 있는 호중구나 헤모시데린 침착된 매크로파지, 단핵구에 있어서는 CXCR1, CXCR2 모두 양성인 것, 상피 세포에 있어서도 발현이 약양성~양성인 것이 확인되었다. 또한, 혈관 내피 세포에 있어서도, CXCR1, CXCR2 모두 약양성이 확인되었다. 본 소견은, 자궁내막증 상피 세포에 대한 IL-8의 직접적인 약리 작용과 호중구나 매크로파지 등의 침윤 면역 세포를 개재한 약리 작용이 있을 가능성을 나타내고 있다.

표 27

	CXCR1 (IL-8RA)			CXCR2 (IL-8RB)		
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Endometrial epithelium with the stromal cell	±	±	-	-	±	-
Endometrial epithelium without the stromal cell	+	+	+	+	+	+
Stromal cell	-	-	-	-	-	-
Neutrophilis	+	+	+	+	+	+
Hemosiderin-laden macrophage	+	+	+	+	+	+
Mononuclear cell*	+	+	+	+	+	+
Vascular endothelial cell	±	±	±	±	±	±

*: Macrophage-like cell
NA: No application
-:Negative, +:Positive, ±:Partly positive

[0828]

[0829] 〔실시예 20〕 외과적 수술 후의 유착에 대한 항IL-8 항체의 약효

[0830] 전술한 자궁내막증 외과적 유인 필리핀원숭이 모델에 있어서, 유인을 위한 개복 수술 후에 생긴, 자궁내막증에 의한 유착과는 상이한 복벽 절개 부위 주위로의 유착이, 유인 4개월 후(항체 투여 2개월전)의 복강경 관찰 시에 전 개체에서 보였다. 외과적 수술 후의 유착에 대한 항IL-8 항체의 약효를 조사하기 위해, 개체 번호를 익명화하여, 투여 2개월 전의 복강경 관찰 소견과 투여 개시부터 6개월 후의 최종 복강경 관찰의 사진을 비교하여, 복벽 절개 부위 주위로의 유착의 평가를 실시했다. 구체적으로는 복벽 절개 부위 주위로의 유착을 투여 전후에서 비교하여, (1) 개선(Improved), (2) 불변(Stable), (3) 악화(Progressed)의 3단계 평가를 5명의 평가자로 행했다. 판정은 평가자 5명중 3명 이상에서 평가가 일치한 것을 채용하고, 그 이외의 것은 (2) 불변으로 했다. Vehicle군 6두와 항체 H1009/L395-F1974m 투여군 7두에 대해 평가했다. 도 38에 Vehicle군과 항체 H1009/L395-F1974m 투여군의 대표적인 복강내 사진을 나타낸다. 표 28에 나타내는 바와 같이, Vehicle군에서는 6두 중 5두가 불변, 1두가 악화된 것에 대해, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서는 7두 중 1두가 악화되고 6두가 개선되었다. 악화된 1두는 항항체가 산생되고 혈중의 H1009/L395-F1974m 항체 농도가 저하된 개체였다. 본 소견에 의해, 항IL-8 항체가 외과적 수술 후의 유착 개선 치료약 또는 유착 예방제로서 유용하다는 것이 시사되었다. 이 결과로부터, IL-8 시그널 저해제가 유착 치료제 또는 예방제로서 유용하다는 것을 당업자는 당연히 이해할 수 있을 것이다.

표 28

[0831]

Group	Improved	Stable	Progressed
Vehicle	0/6	5/6	1/6
H1009/L395-F1974m 10mg/kg	6/7	0/7	1/7

[0832] 〔실시예 21〕 호중구의 단리 및 IL-8에 의한 호중구의 유주성 평가

[0833] IL-8은 호중구 주화능을 가져, 손상 조직에서 산생되는 IL-8은 혈관 내피 세포에 접착한 호중구의 조직으로의 유주를 촉진하여, 호중구 침윤에 수반하는 염증이 야기된다고 말해지고 있다. 표 27에서 나타내는 대로, 자궁내막증 병변 부위에 있어서도, 호중구나 매크로파지, 단핵공의 침윤이 확인되어, 이들 면역 세포에 있어서 CXCR1, CXCR2는 발현이 함께 양성이었다. 또한, 상피 세포에 있어서도 발현이 약양성~양성이므로, 자궁내막증 상피 세포에 대한 IL-8의 직접적인 약리 작용과 호중구나 매크로파지 등의 침윤 면역 세포를 개재한 약리 작용이 있을 가능성이 나타났다. 그래서, 우선, 호중구에 있어서의 IL-8에 대한 유주성을 평가했다. 호중구를 건상인(健常人)의 말초혈로부터 채취하여, 단리, 정제를 다음과 같이 행했다.

[0834] 헤파린 처리한 전체 혈에 1/5양의 HetaSep(STEMCELL Technologies사제)를 가하여 제품 프로토콜에 따라, 유핵 세포를 포함하는 상청을 회수 후, ACK solution(GIBCO사제)을 가하여 용혈했다. 용혈 후, 0.1% BSA/PBS에 현탁하고, 세포수를 계측했다. 세포수 계측 후, 세포수를 조정하고, EasySep(등록상표) Human Neutrophil Enrichment Kit(STEMCELL technologies사제)를 사용하여, 제품 프로토콜에 따라 EasySep(등록상표) Magnet(STEMCELL technologies사제)에 의해 호중구를 단리했다. 단리 후의 호중구는, 항CD66b 항체, 항CD45RA 항체를 사용하여, FACS에 의해 정제도에 문제없음을 확인했다.

[0835] 단리한 호중구는, CytoSelect(등록상표) 96-Well Cell Migration Assay(Cell Biolabs사제, 카탈로그 번호: CBA-104)의 Migration Plate를 사용하여 유주성을 평가했다. 멤브레인 하층의 feeder tray에 1% FBS 또는 1% FBS+IL-8(100ng/mL)에, 각종 항체, 화합물, 또는 용매 대조를 첨가한 RPMI-1640 배지(SIGMA사제)를 150μL 가했다. 평가 대상으로서, 항체는 H1009/L395-F1974m 외에, 항IL-8 중화 항체인 Anti-IL-8 항체[807](abcam사제, 카탈로그 번호: ab18672), Anti-IL-8 항체[6217] (abcam사제, 카탈로그 번호: ab10768), 음성 대조로서 IgG1(시그마사제, 카탈로그 번호: I5154)을 각각 10μg/mL, 화합물은 CXCR2 저해제인 SRT3109(Shanghai Haoyuan Chemexpress사제, 카탈로그 번호: HY-15462)를 10μM, 용매 대조로서 PBS, DMSO를 놓았다. 멤브레인 상층의 membrane chamber에는 무혈청의 RPMI-1640 배지에 현탁한 호중구 세포를 50000cells/well이 되도록 파종했다. 2시간의 incubation 후, 하층의 feeder tray에 유주한 생세포수(호중구)를 CellTiter-Glo(등록상표) Luminescent Cell Viability Assay(Promega사제)를 이용하여 상대 화학발광량으로부터 검출했다. IL-8을 첨가하고 있지 않는 well의 상대 화학발광량 평균을 1로 하여, 각 시약 첨가 시에 있어서의 상대 화학발광량의 상대치를 산출한 결과를 도 39에 나타냈다.

[0836] 그 결과, IL-8에 의한 호중구의 유주 촉진과 각종 항IL-8 중화 항체 및 CXCR2 저해제에 의한 호중구의 유주 저해가 확인되었다. 본 결과로부터, IL-8 저해제뿐만 아니라, IL-8 시그널 저해에 관여하는 것이 알려져 있는 CXCR1 저해제나 CXCR2 저해제 등의 IL-8 시그널 저해제가 폭넓게 호중구 유주를 억제한다는 것이 높은 개연성을 갖고 지지되었다. 따라서, IL-8 시그널 저해제는, 자궁내막증을 비롯하여 IL-8이 고농도인 병변부에 침윤하는 호중구에 대해서도 이와 같이 침윤 억제한다는 것이 높은 개연성을 갖고 시사되었다. 따라서, 당업자는, IL-8 시그널 저해제가 자궁내막증 및 IL-8이 고농도로 알려진 염증성 질환을 예방할 수 있음을 이들 결과로부터 일반화하고, 확장화하여 충분히 이해할 수 있을 것이다.

[0837] 〔실시예 22〕 자궁내막증 세포에 대한 호중구의 작용

[0838] 다음에, 자궁내막증 병변부에 침윤한 호중구가 자궁내막증 세포에 대해 어떻게 작용하는지를 조사했다. 자궁내막증 세포는, 다음과 같이 얻었다. 수술 적출 인간 자궁내막증 조직을 0.5mg/mL 콜라게나제, 0.1mg/mL DNase1을 포함하는 DMEM/F-12, HEPES(GIBCO사제) 배지 내에서 세절하고, 37℃에서 인큐베이션하여 세포를 회수했다. 세포 현탁액을 100μm 셀 스트레이너에 통과시킨 후, Lysing Buffer(BD Biosciences)에 의해 용혈했다. 용혈 후, 세포를 파종하여, 계대한 것을 자궁내막증 세포로서 액체 질소 중에서 동결 보존했다. 배양에는 DMEM/F-12, HEPES에 10% FBS, 2.5μg/mL 암포테리신 B, 100U/mL 페니실린, 100μg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 것을 사용했다. 실험에는, 동결 보존한 세포를 기면시켜 사용했다.

[0839] 상기의 방법으로 얻은 자궁내막증 세포에 대해, 호중구 배양 상청을 첨가하여, 자궁내막증 세포에 있어서의 반응성을 조사했다. 호중구 배양 상청은, 호중구를 단리 후, 1% FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지에 현탁하고, 6well plate에 3.0 x10^6 cells/well로 파종하여, 1일 배양한 배양 상청을 회수했다. 96well plate에 자궁내막증 세포를 10000 cells/well로 파종하여, 배지의 반량을 회수한 호중구 배양 상청이 되도록 첨가했다. 대조군(본 실시예에 있어서, 「Ctrl」이라고도 한다.)에는 마찬가지로 배지의 반량을, 1% FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지가 되도록 첨가했다. 8시간 후, 배지를 제거하고, RNeasy 96 Kit(QIAGEN사제)를 사용하여, 제품 프로토콜에 따라 RNA를 정제했다. 정제 RNA는 SuperScript(등록상표) VILO(등록상표) MasterMix(Invitrogen사제)를 사용하여 cDNA를 합성하여, 리얼타임 PCR법에 의해 아로마타제의 mRNA 발현량을 비교했다. 아로마타제의 프로브에는, Taqman 프로브의 Hs00903411_m1(Thermo Fisher사제)을 사용하고, GAPDH의 측정에는 Human GAPD(GAPDH) Endogenous Control(Applied Biosystems사제, 카탈로그 번호: 4326317E)을 사용했다.

[0840] 도 40에, 아로마타제의 발현량을 GAPDH로 보정 후, Ctrl을 1로 했을 때의 아로마타제의 상대 발현량을 나타냈다. 호중구 배양 상청을 첨가한 자궁내막증 세포에서는, 아로마타제의 발현량의 항진이 확인되었다.

[0841] 아로마타제는 에스트로겐 합성 효소이며, 에스트로겐이 자궁내막증 상피 세포의 증식을 촉진한다는 것이 알려져 있다. 호중구 배양 상청의 첨가에 의해, 자궁내막증 세포 중의 아로마타제 발현이 항진하고 있었으므로, 호중구가 자궁내막증 병변부에 침윤함으로써, 자궁내막증 세포에 있어서의 아로마타제 발현량이 항진되어, 자궁내막증 상피 세포의 증식이 항진된다는 것이 시사되었다. 따라서, IL-8 시그널 저해제에 의해, 자궁내막증 병변부로의 호중구 침윤을 억제함으로써, 자궁내막증 상피 세포의 증식이 억제되는 것이 추측된다. 자궁내막증의 외과적 유인 원숭이 모델에 있어서도, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에서는 증식성을 나타내는 상피 세포의 위축이 확인된 것으로부터도, 상기 고찰이 지지되었다.

[0842] 〔실시예 23〕 호중구 산생 케모카인, 사이토카인의 해석

[0843] 다음에, 호중구에 있어서 어떠한 케모카인이나 사이토카인, 증식 인자가 산생되고 있는지를 IL-8 첨가·비첨가시, 항IL-8 항체 첨가 시에서, 해석했다. 단리한 호중구를, 1% FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지에 현탁하고, 6well plate에 1.5x10^6 cells/well씩 파종했다. 이것에, IL-8을 첨가·비첨가, 또는 IL-8과 각종 항체를 첨가하여, 1일 배양했다. 항체는, H1009/L395-F1974m, Anti-IL-8 항체[807](ab18672), IgG1을 각각 종농도 10μg/mL, IL-8은 종농도 100ng/mL가 되도록 첨가했다. 1일 후, 세포 배양액을 회수하여, Cytokine Human Magnetic 30-Plex Panel for the Luminex(등록상표) platform(Thermo Fisher사제)을 이용하여, 제품 프로토콜에 따라 세포 배양액 중의 복수의 각종 사이토카인, 케모카인 및 증식 인자의 농도를 조사했다.

[0844] 그 결과, 도 41에 나타내는 바와 같이, 세포 배양액 중의 MCP-1(monocyte chemoattractant protein 1) 농도에 있어서, IL-8 첨가에 의해 강한 상승이 보이고 항IL-8 중화 항체에 의해 상승이 억제되었다.

[0845] MCP-1은 CCL2라고도 불리고, 단구 주화능을 가져, 염증 국소로의 단구의 유주 및 침윤을 촉진한다고 말해지고 있다. 표 26에서 나타낸 바와 같이, 자궁내막증의 외과적 유인 원숭이 모델의 결정성 병변부에 있어서, 헤모시데린이 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서 감소되어 있었으므로, 매크로파지 또는 단구가 항체 투여에 의해 침윤 억제되고 있음이 시사되었다. 본 결과에 의해, 호중구를 IL-8 자극함으로써 단구 주화능을 갖는 MCP-1이 산생되었으므로, IL-8에 의해 자궁내막증 병변부에 호중구가 침윤하여, 추가로 MCP-1을 산생함으로써, 단구 및 매크로파지가 병변 부위에 더욱 유주, 침윤할 가능성이 나타났다.

[0846] 더욱이, MCP-1은, 섬유아세포에 작용하여 콜라겐 산생을 촉진하는 기능이 알려져 있어(J Biol Chem. 1996 Jul 26;271(30):17779-84.), 조직의 섬유화를 항진한다는 것이 in vivo에 있어서도 다수 보고되어 있다(J Immunol. 1994 Nov 15;153(10):4733-41, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 May;286(5):L1038-44, J Invest Dermatol. 2003 Sep;121(3):510-6.). IL-8에 의해 자궁내막증 병변부에 호중구가 침윤하여, 추가로 호중구가 MCP-1을 산생함으로써, 단구 및 매크로파지의 유주, 침윤의 촉진에 더하여, 자궁내막증 병변부의 섬유화에 대해서도 촉진할 가능성이 나타났다. 본 결과로부터, IL-8 시그널 저해제에 의해, 호중구 침윤을 억제하는 것에 의해, 자궁내막증 병변부에 있어서의 섬유화가 개선된다는 것이 시사되었다. 실제로, 자궁내막증 외과적 유인 원숭이 모델의 결정성 병변부에 있어서도, 도 36 및 표 26에서 나타낸 바와 같이, 항체 H1009/L395-F1974m 투여군에 있어서 교원 섬유를 주체로 하는 간질의 감소가 확인되어, 섬유화 개선에 대해서 약효를 갖는다는 것이 확인되었다. 이상으로부터, IL-8 시그널 저해제가 자궁내막증의 섬유화에 대해서 유용하다는 것이 높은 개연성을 갖고 지지되었다. 당업자는, IL-8 시그널 저해제가, 자궁내막증의 섬유화, 또한 각종 섬유화증에 대해서도 치료 또는 예방할 수 있음을 이들 결과로부터 일반화하고, 확장화하여 충분히 이해할 수 있을 것이다.

[0847] 〔실시예 24〕 수술후 유착 유인 원숭이 모델의 제작과 병태 평가

[0848] (24-1) 수술후 유착 유인 원숭이 모델의 제작

[0849] 수술후 유착 유인 모델을 제작하기 위해서, 9-16세령의 암컷 필리핀원숭이(의약 기반·건강·영양 연구소 영장류 의과학 연구 센터에서 입수)에 대해, 마취하에서 이하의 작업을 행했다. 마취는 케타민 자일라진의 밸런스 마취(2:1의 비율을 기준으로 혼합)와 아이소플루렌을 이용했다. 복벽 정중선을 5cm~6cm 절개하여 개복 후, 자궁체부를 1cm 절개하여 단사로 4침 봉합한 후 가제로 자궁 전체를 5회 닦았다. 다음에 절개한 복벽 정중선으로부터 2cm의 우복벽 복막 부분을 1cm 절개하여, 흡수사로 4침 연속 봉합했다. 또한, 봉합 후는 가제로 봉합 부분을 5회 닦았다. 마찬가지로 좌복벽 복막도 절개, 봉합, 가제로 닦았다. 최후는 복벽 정중선을 연속 봉합으로 10침~11침 봉합하여, 모든 작업을 1시간 이내에 종료했다. 수술 후의 각성 시에는 길항약인 안티세단(자일라진량과 동량을 기준으로)과 항생제인 세프라딘을 투여했다. 또한, 진통제인 자르반을 수술 후 2일간 투여하고, 매일의 정기 관찰로 수술 후의 이상이 없는 것을 확인했다. 또한 복강경 관찰 시에도 마찬가지로 마취와 수술후 관리를 실시했다.

[0850] (24-2) 수술후 유착 유인 모델에 있어서의 항IL-8 항체의 약효 평가

[0851] 항IL-8 항체 투여군의 동물에 대해, 전술한 수술후 유착 유인 수술 후, 1시간 이내에 항IL-8 항체인 H1009/L395-F1974m을 10mg/kg 정맥내 투여했다. 컨트롤군은 무처치로 했다. 항IL-8 항체의 투여로부터 24일~35일 후에 복강경 관찰을 행하여, 절개, 봉합, 가제의 닦는 작업에 의해 형성된 유착을 관찰했다. 복강경 관찰은, 복부 정중을 마취하에서 절개하여, 트로카를 자입하고, 복강경을 삽입했다. 복강경은 비디오 시스템(칼스 툴츠사제)과 모니터에 접속되고, 기록은 비디오 시스템으로, 복강 내의 관찰은 모니터로 행했다. 유착의 사이즈는 눈금이 달린 바 또는 눈금이 달린 겸자를 이용하여 측정했다. 유착의 유무, 범위 및 유착의 장소를 복강경 관찰 시에 평가했다. 결과를 표 29에 나타낸다. 복강경 관찰의 결과, 무처치군의 2두의 원숭이에서, 절개 부위 모두에 있어서 유착이 확인되었다. 항IL-8 항체 투여군에 있어서, 개체 No. 206에서는 유착이 인정되었지만, 개체 No. 201에 있어서 좌우 복벽 복막과 자궁 절개부에서 유착이 인정되지 않고, 항IL-8 항체에 의한 유착 예방 효과가 나타났다. 이 결과로부터, 항IL-8 항체가 유착 예방제로서 유용하다는 것이 나타났다. 당업자이면, 투여 시점 등을 적절히 변경함으로써, 항IL-8 항체에 의한, 보다 높은 유착 형성 예방 효과가 발휘될 수 있음을 당연히 이해할 수 있을 것이다. 또한, 이 결과에 의해, IL-8 시그널 저해제가 유착 예방제로서 유용하다는 것을, 당업자는 당연히 이해할 수 있을 것이다.

표 29

		절개 부위			
		복벽			자궁
		정중선	복막(R)	복막(L)	
무처치	#202	○	○	○	○
	#204	○	○	○	○
항IL-8 항체	#201	○	×	×	×
	#206	○	○	○	○

○=유착 있음
×=유착 없음

[0852]

[0853] 〔실시예 25〕 단구로부터 분화시킨 매크로파지에 있어서의 IL-8의 기능 해석과 항IL-8 항체의 약효 평가

[0854] 건상인 말초혈로부터 CD14 양성 획분으로서 분리된 단구(All Cells사, 카탈로그 번호: PB011-P-F-2)를 구입하여, -80℃에서 보관했다. 실험에 사용할 때, 다음과 같이 세포를 해동하여 사용했다. 37℃ 워터 배쓰로 해동한 세포에 DNaseI(STEMCELL Technologies사제, 카탈로그 번호: 07900) 및 10% FBS를 포함하는 배지를 첨가하여, 고속 원심기로 원심한 후, 상청을 제거했다. 이 작업을 반복한 후, 적당량의 배지에 세포를 현탁하고, 세포수를 계측했다. 단구는, in vitro로 매크로파지로의 분화 배양을 행하여, IL-8 존재하 및 비존재하에서의 Connecting tissue growth factor(CTGF)의 발현 변화를 조사했다. CTGF는 섬유화를 촉진하는 인자이다. 단구는 10% FBS, 및 25ng/mL GM-CSF(SIGMA사제)를 포함하는 RPMI-1640(SIGMA사제) 배지에 현탁하고, 배양용 플레이트에 파종했다. 2일 또는 3일 간격으로 배양 상청을 반량씩 교환하여, 7일간 배양했다. 7일 후, 배양 상청을 제거하고, 10% FBS 및 20ng/mL IFN-γ(SIGMA사제), 10pg/mL LPS(와코준야쿠공업사제)를 포함하는 RPMI-1640 배

지에 100ng/mL의 IL-8과 각종 항체를 첨가하여 3일간 배양했다.

[0855] 평가한 항체는, H1009/L395-F1974m 항체, Anti-IL-8 항체 [807] (abcam사제, 카탈로그 번호: ab18672), Anti-IL-8 항체 [6217] (abcam사제, 카탈로그 번호: ab10768), Anti-IL-8 항체(Becton Dickinson사제, 카탈로그 번호: BD554726), Anti-IL-8 항체(Becton Dickinson사제, 카탈로그 번호: BD555717)로, 10μg/mL의 농도로 사용했다. 음성 대상으로서 IgG1(SIGMA사제, 카탈로그 번호: I5154)을 10μg/mL의 농도로 사용했다.

[0856] 배양 3일 후, 세포를 회수하고 RNeasy Mini Kit(QIAGEN사제)를 사용하여, 제품 프로토콜에 따라 RNA를 정제했다. 정제 RNA는 SuperScript VILO MasterMix(Thermo Fisher사제)를 사용하여 cDNA를 합성하여, 리얼타임 PCR법에 의해 CTGF의 mRNA 발현량을 평가했다. CTGF의 프로브에는, Taqman 프로브의 Hs00170014_m1(Thermo Fisher사제)을 사용하고, 18SrRNA의 측정에는 Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control(Thermo Fisher사제, 카탈로그 번호: E4319413E)을 사용했다.

[0857] 도 42에, CTGF의 발현량을 18S rRNA로 보정한 값을 나타낸다. IL-8 무첨가 조건에서는, 단구로부터 분화시킨 매크로파지에 있어서 CTGF의 발현이 전혀 인정되지 않았다. 한편, IL-8을 첨가한 조건에서는, 분화시킨 매크로파지에 있어서 CTGF 발현 상승이 인정되었다. 이 결과로부터, IL-8은 단구로부터 분화시킨 매크로파지에 대해서, CTGF의 발현 상승을 유도하는 기능을 갖는다는 것이 나타났다. 더욱이 IL-8과 동시에 항IL-8 항체를 가하면, CTGF의 발현 상승은 인정되지 않았다. IL-8에 의한 CTGF의 발현 상승은, 다양한 항IL-8 항체에 의해 억제된다는 것이 나타났다. 이 결과로부터, IL-8이 섬유화의 진행에 관여하는 인자인 것, 및 항IL-8 항체 등의 IL-8 시그널 저해제가 섬유화 질환에 대한 치료 또는 예방제로서 유용하다는 것을, 당업자는 당연히 이해할 수 있을 것이다.

[0858] 〔참고 실시예 1〕 아미노산이 치환된 IgG 항체의 발현 벡터의 구축

[0859] QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)를 이용하여, 첨부 설명서 기재의 방법으로 제작된 변이체를 포함하는 핵외 유전자 단편을 동물세포 발현 벡터에 삽입하는 것에 의해, 목적하는 H쇄 발현 벡터 및 L쇄 발현 벡터가 제작되었다. 얻어진 발현 벡터의 염기 서열은 당업자에게 공지의 방법으로 결정되었다.

[0860] 〔참고 실시예 2〕 IgG 항체의 발현과 정제

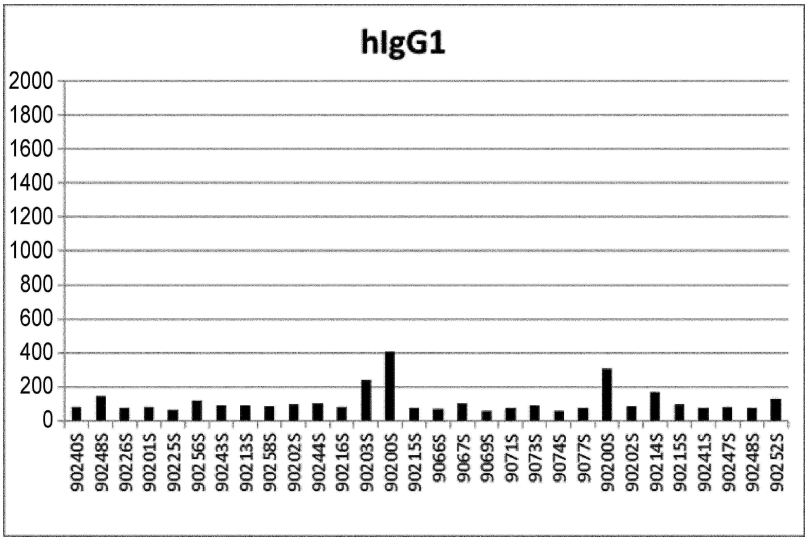
[0861] 항체의 발현은 이하의 방법을 이용하여 행해졌다. 인간 태아 신장암 세포 유래 HEK293H주(Invitrogen)를 10% Fetal Bovine Serum(Invitrogen)을 포함하는 DMEM 배지(Invitrogen)에 현탁하고, 5~6 × 10^5 세포/mL의 세포 밀도로 접착 세포용 디쉬(직경 10cm, CORNING)의 각 디쉬에 10mL씩 뿌려 넣고 CO_2 인큐베이터(37℃, 5% CO_2) 내에서 하루 동안 배양한 후에, 배지를 흡인 제거하고, CHO-S-SFM-II(Invitrogen) 배지 6.9mL를 첨가했다. 조제한 핵외 유전자를 lipofection법에 의해 세포에 도입했다. 얻어진 배양 상청을 회수한 후, 원심분리(약 2000g, 5분간, 실온)하여 세포를 제거하고, 추가로 0.22μm 필터 MILLEX(R)-GV(Millipore)를 통과시켜 멸균하여 배양 상청을 얻었다. 얻어진 배양 상청에 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)를 이용하여 당업자에게 공지의 방법으로 정제했다. 정제 항체의 농도는, 분광 광도계를 이용하여 280nm에서의 흡광도를 측정했다. 얻어진 값으로부터 Protein Science 1995; 4 : 2411-2423에 기재된 방법에 의해 산출된 흡광 계수를 이용하여 항체 농도를 산출했다.

산업상 이용가능성

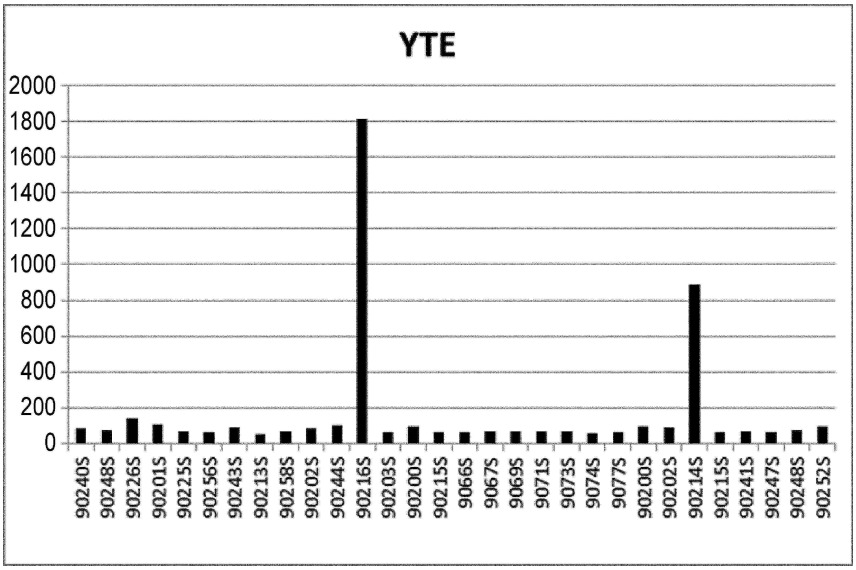
[0862] 본 발명에 의해, 항IL-8 항체 등이 자궁내막증 등의 치료제 및/또는 예방제로서 유용하다는 것이 나타났다. 본 발명은, 자궁내막증 병변 체적의 축소, 유착의 개선, 상피 및 스트로마 세포의 위축성 변화, 면역 세포의 침윤 감소, 섬유화의 개선 등에 있어서 유용하다.

도면

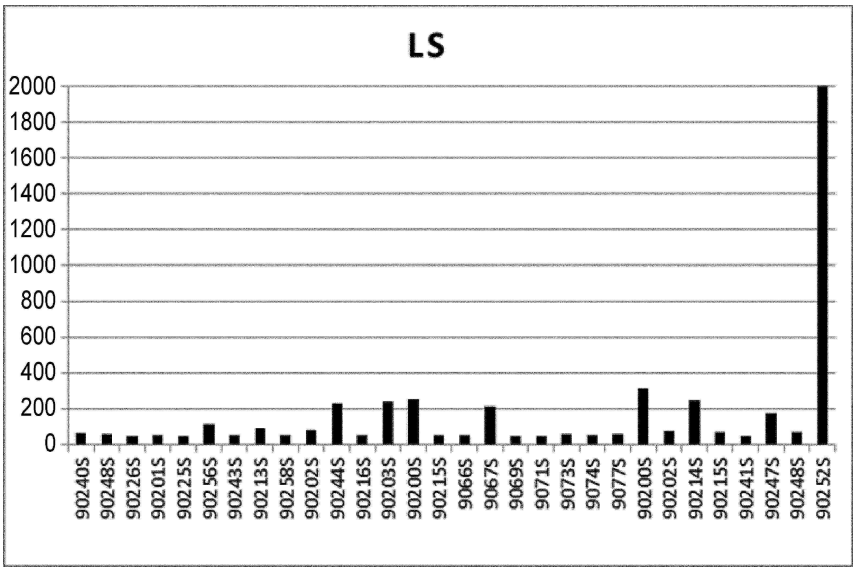
도면1


hIgG1
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

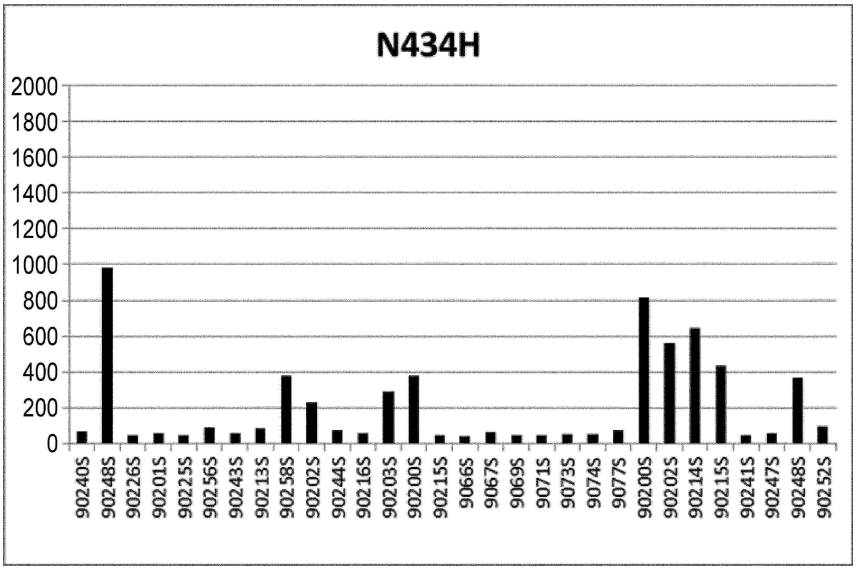
도면2


YTE
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

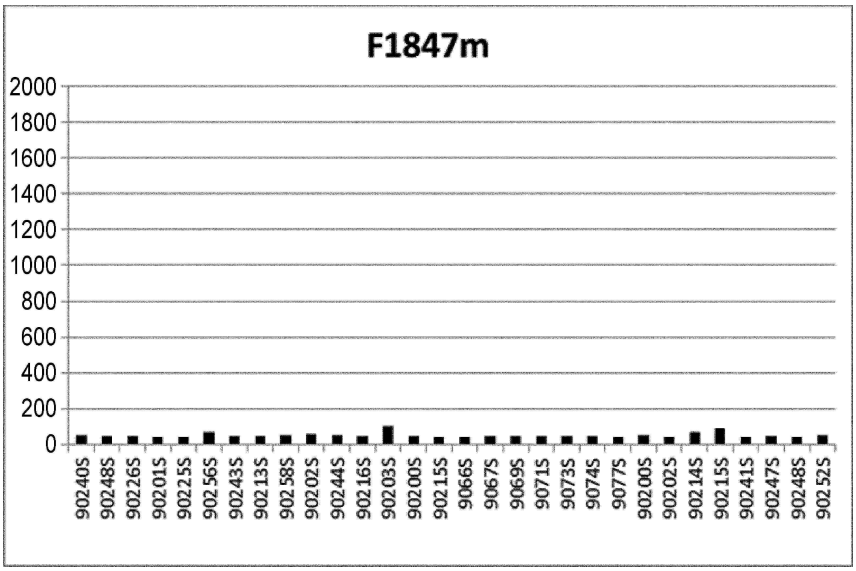
도면3


LS
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

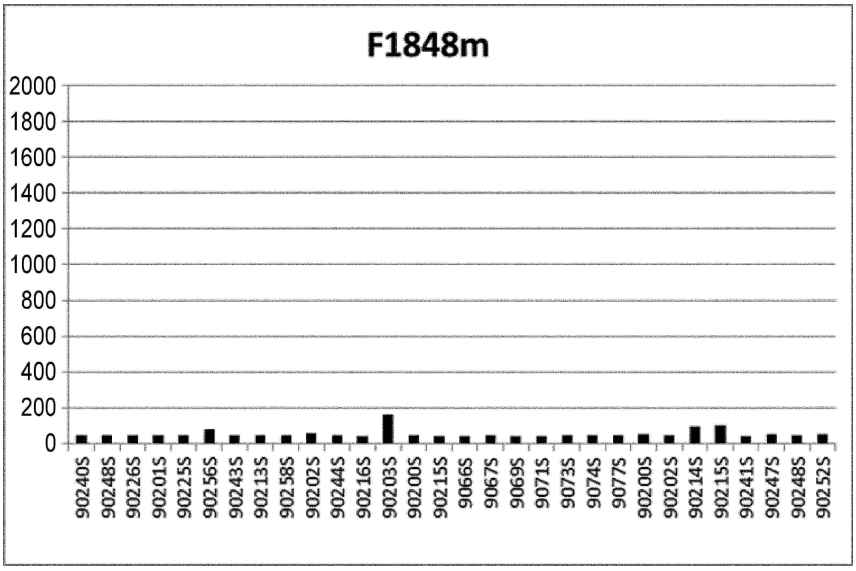
도면4


N434H
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

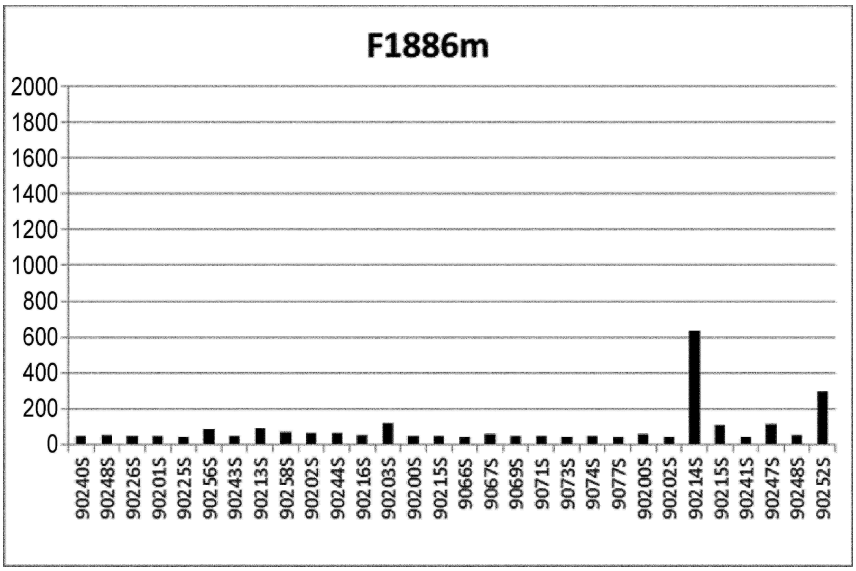
도면5


F1847m
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

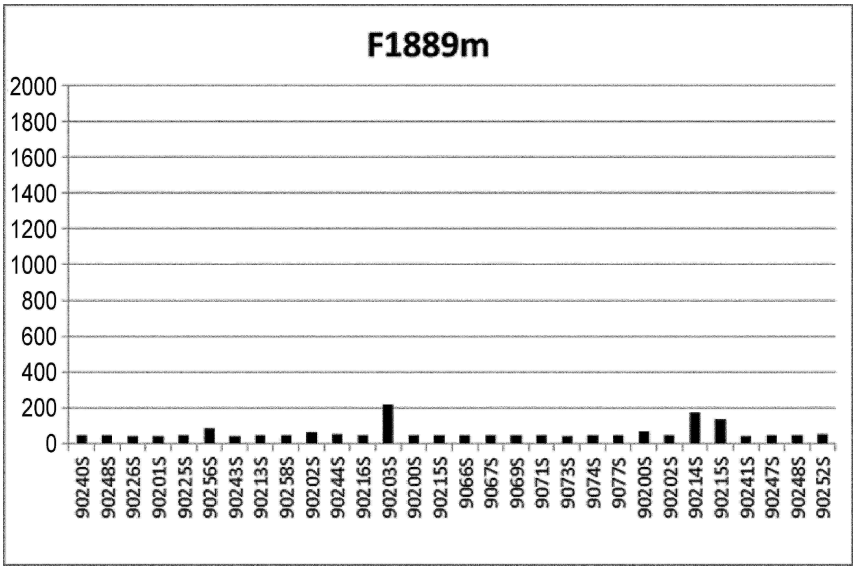
도면6


F1848m
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

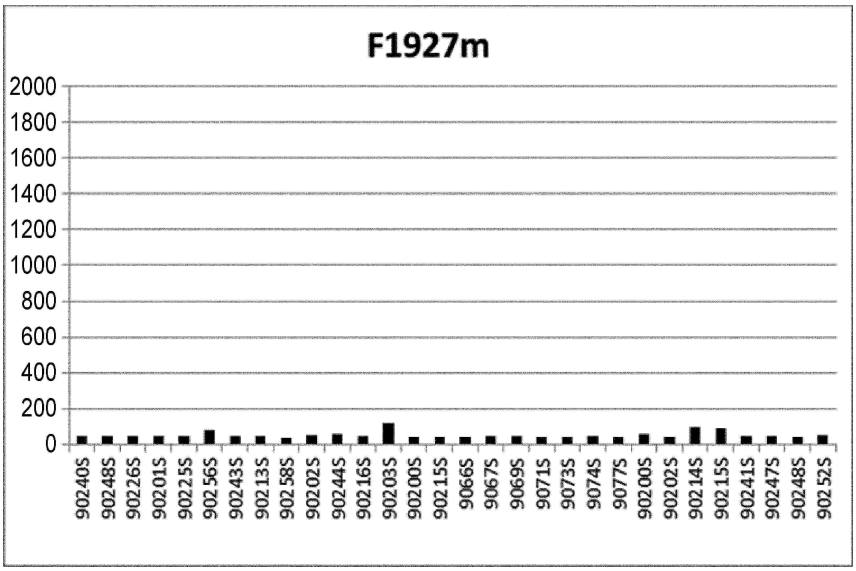
도면7


F1886m
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

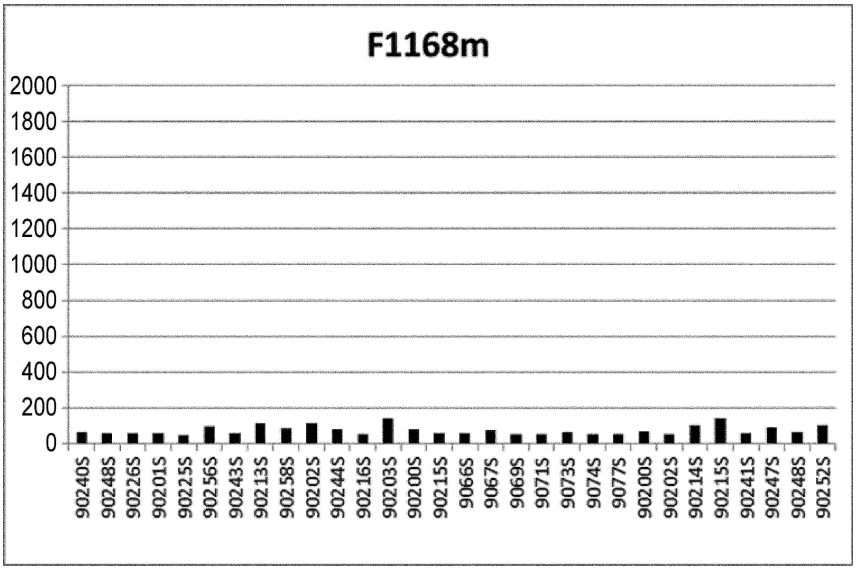
도면8


F1889m
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

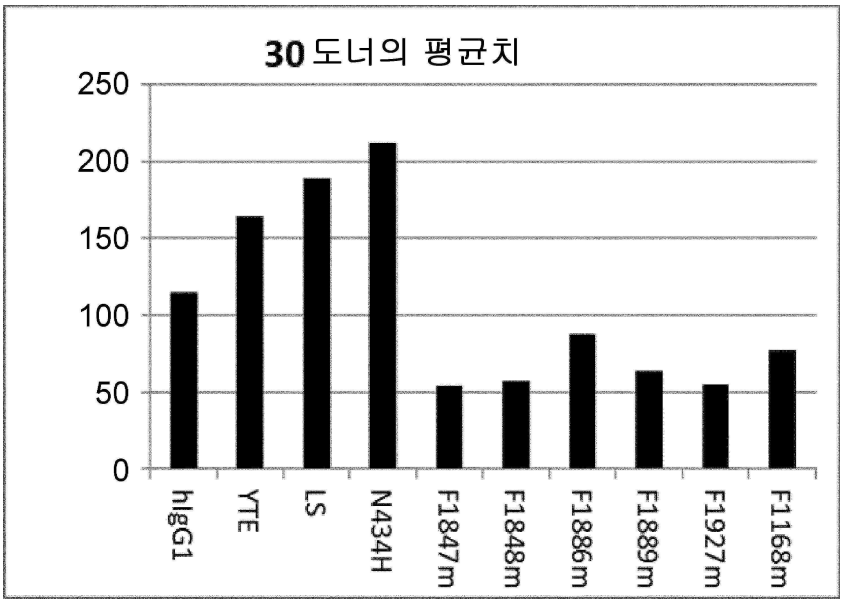
도면9


F1927m
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

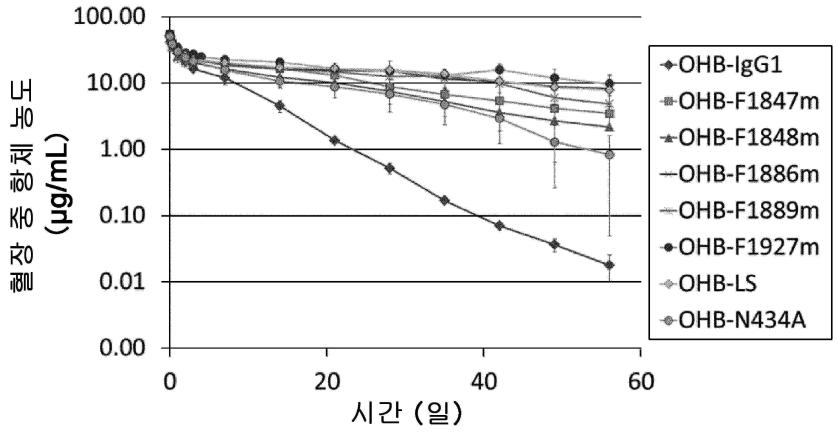
도면10


F1168m
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
902405
902485
902265
902015
902255
902565
902435
902135
902585
902025
902445
902165
902035
902005
902155
90665
90675
90695
90715
90735
90745
90775
902005
902025
902145
902155
902415
902475
902485
902525

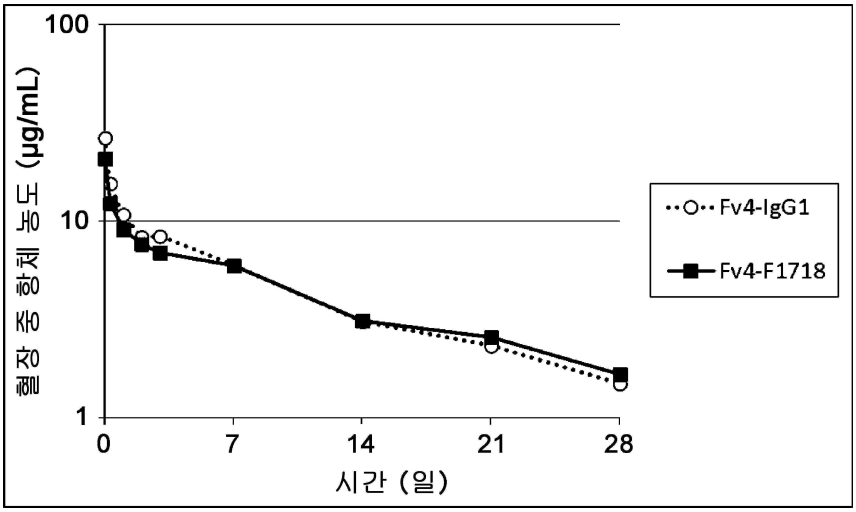
도면11



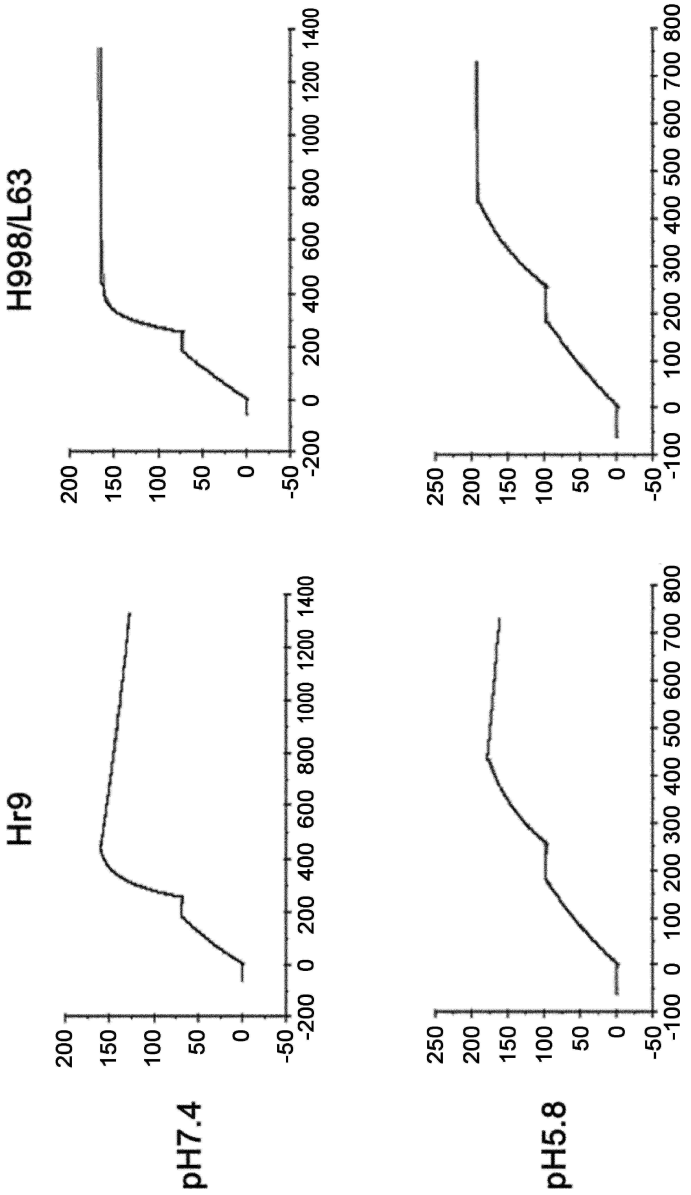
도면12



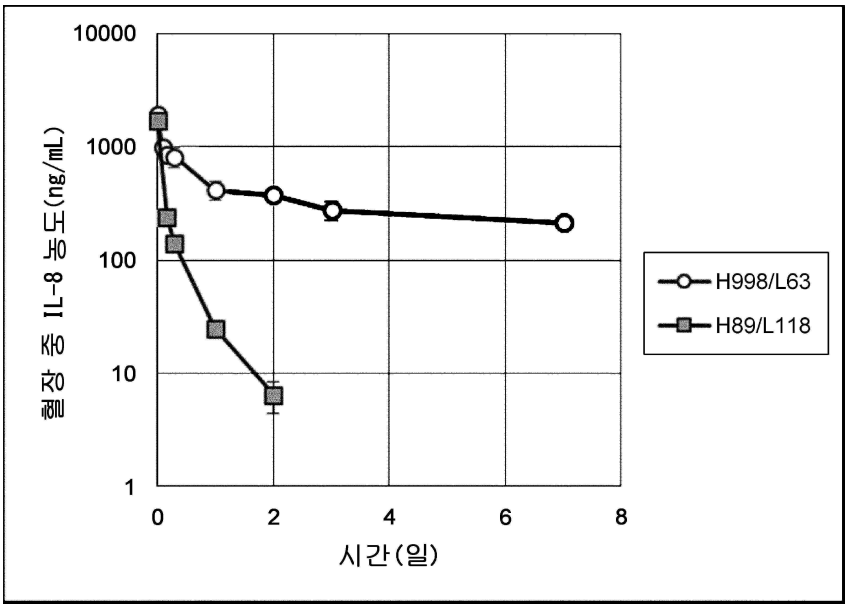
도면13



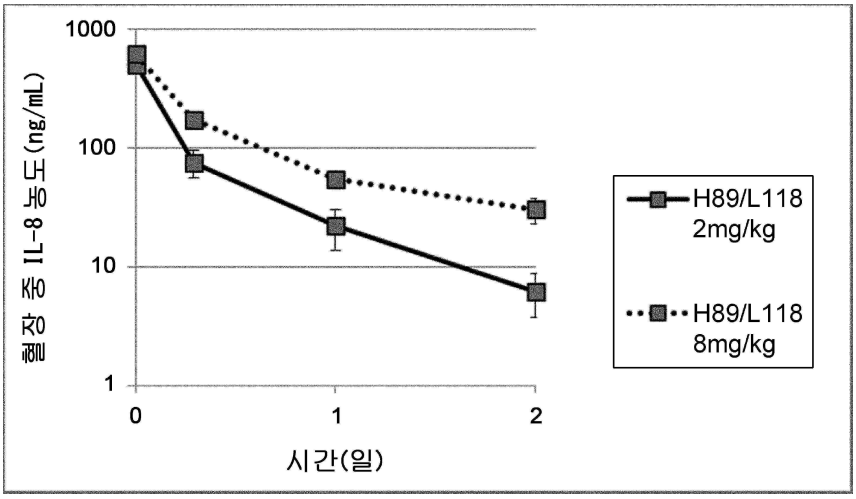
도면14


H998/L63
Hr9
pH7.4
pH5.8
200
150
100
50
0
-50
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
250
-100
100
300
500
700

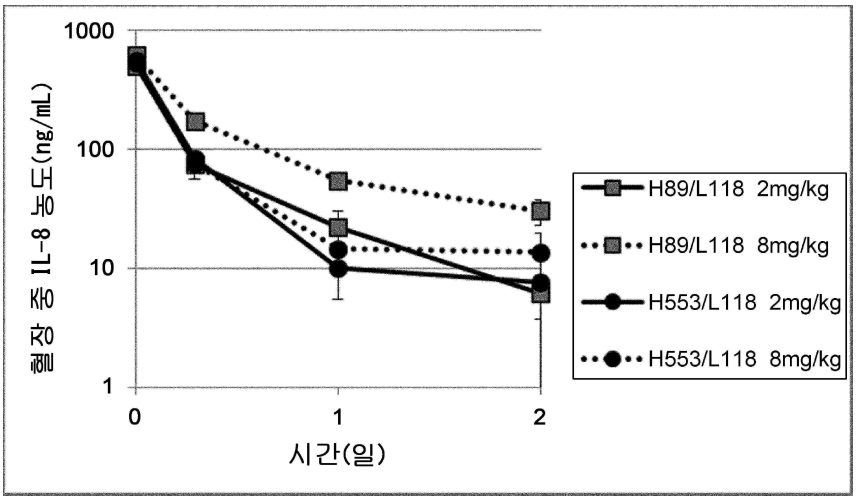
도면15



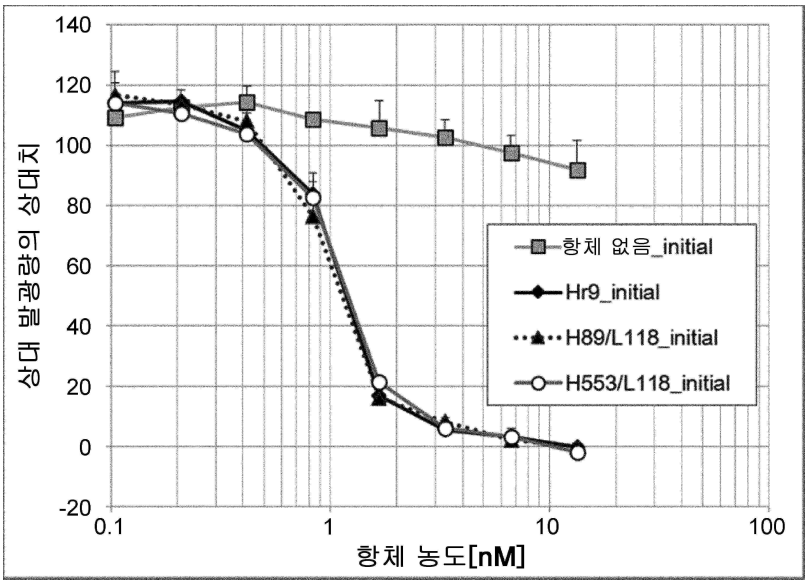
도면16



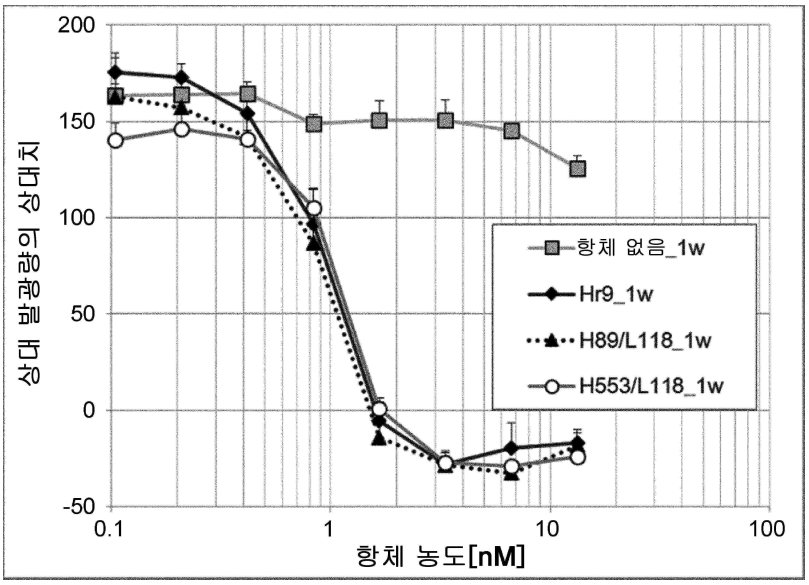
도면17



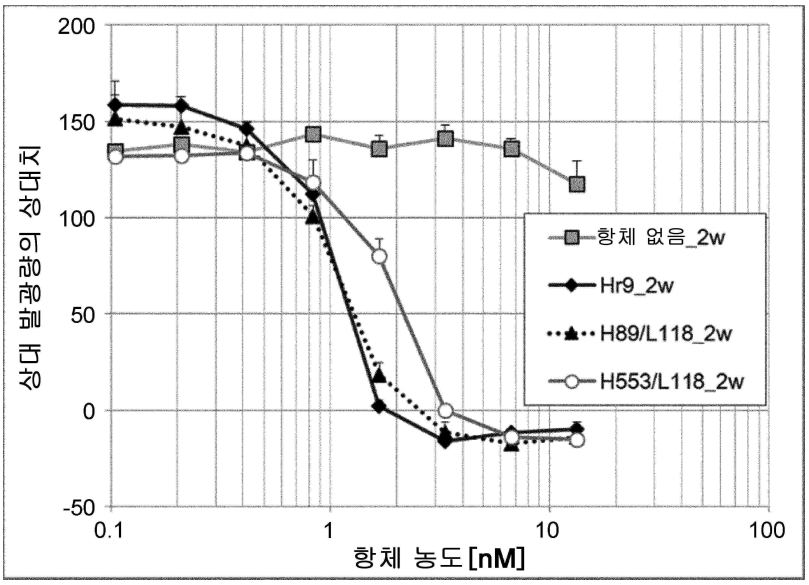
도면18a


140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
상대 발광량의 상대치
항체 농도[nM]
항체 없음_initial
Hr9_initial
H89/L118_initial
H553/L118_initial

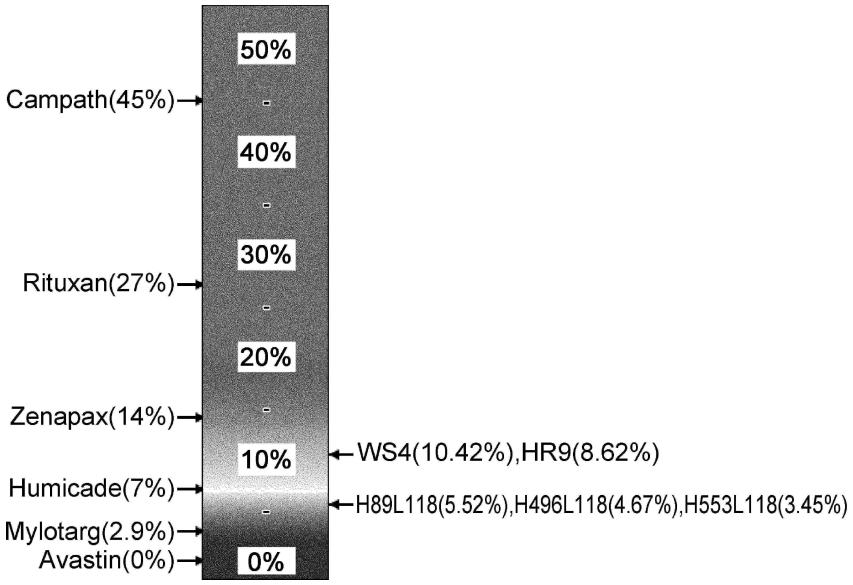
도면18b


200
150
100
50
0
-50
0.1
1
10
100
상대 발광량의 상대치
항체 농도[nM]
항체 없음_1w
Hr9_1w
H89/L118_1w
H553/L118_1w

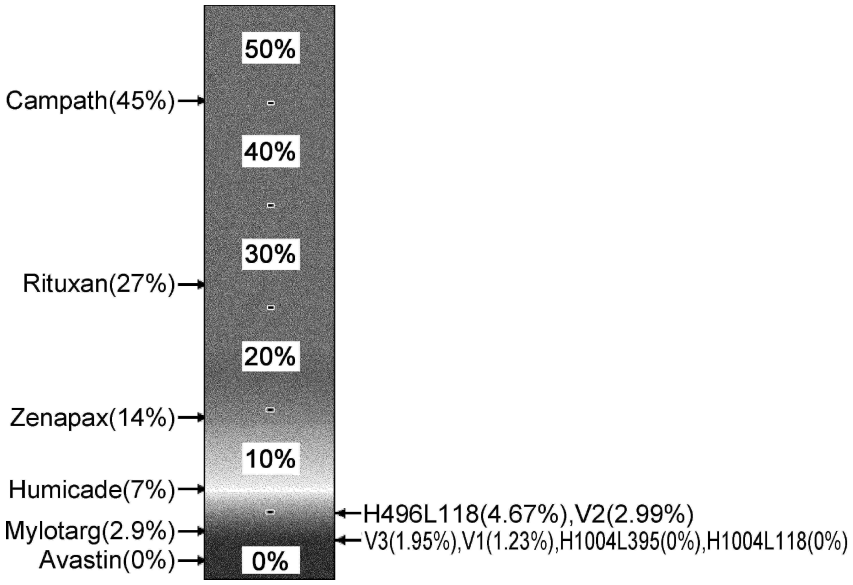
도면18c


200
150
100
50
0
-50
0.1
1
10
100
상대 발광량의 상대치
항체 농도 [nM]
항체 없음_2w
Hr9_2w
H89/L118_2w
H553/L118_2w

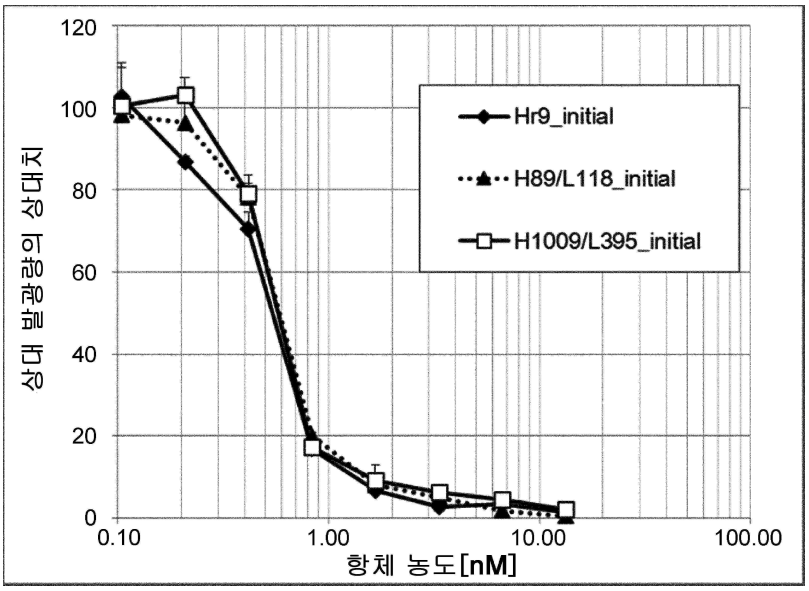
도면19


50%
40%
30%
20%
10%
0%
Campath(45%)
Rituxan(27%)
Zenapax(14%)
Humicade(7%)
Mylotarg(2.9%)
Avastin(0%)
WS4(10.42%),HR9(8.62%)
H89L118(5.52%),H496L118(4.67%),H553L118(3.45%)

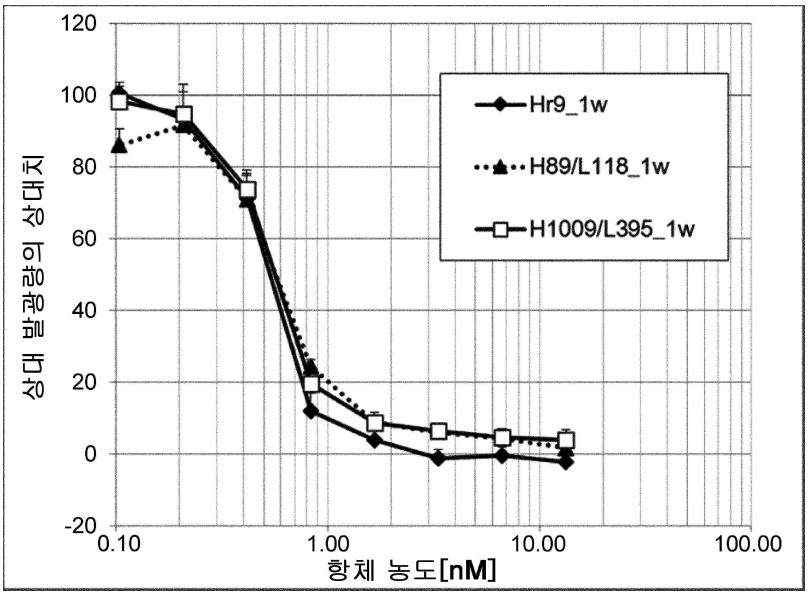
도면20


50%
40%
30%
20%
10%
0%
Campath(45%)
Rituxan(27%)
Zenapax(14%)
Humicade(7%)
Mylotarg(2.9%)
Avastin(0%)
H496L118(4.67%),V2(2.99%)
V3(1.95%),V1(1.23%),H1004L395(0%),H1004L118(0%)

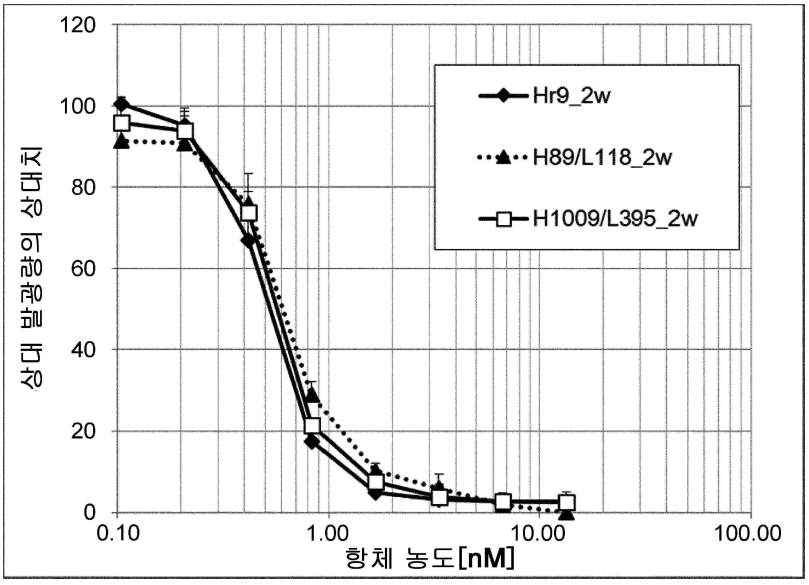
도면21a


120
100
80
60
40
20
0
0.10
1.00
10.00
100.00
상대 발광량의 상대치
항체 농도[nM]
Hr9_initial
H89/L118_initial
H1009/L395_initial

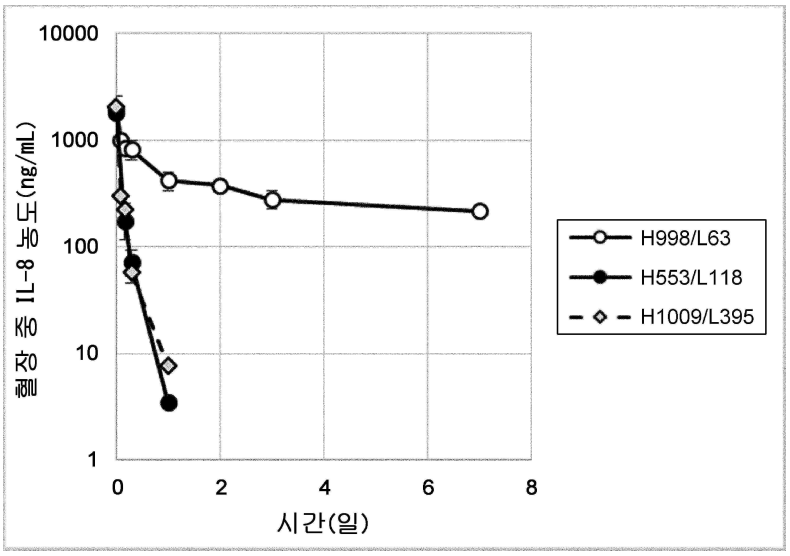
도면21b


120
100
80
60
40
20
0
-20
0.10
1.00
10.00
100.00
상대 발광량의 상대치
항체 농도[nM]
Hr9_1w
H89/L118_1w
H1009/L395_1w

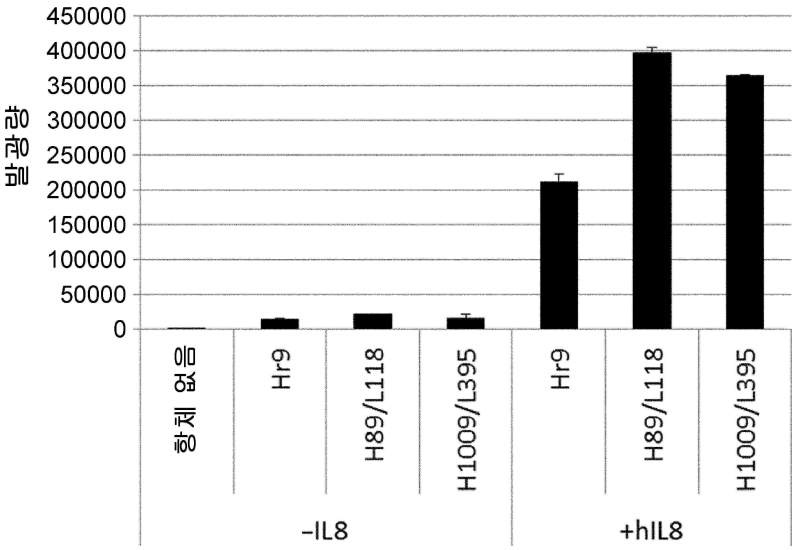
도면21c


120
100
80
60
40
20
0
0.10
1.00
10.00
100.00
상대 발광량의 상대치
항체 농도[nM]
Hr9_2w
H89/L118_2w
H1009/L395_2w

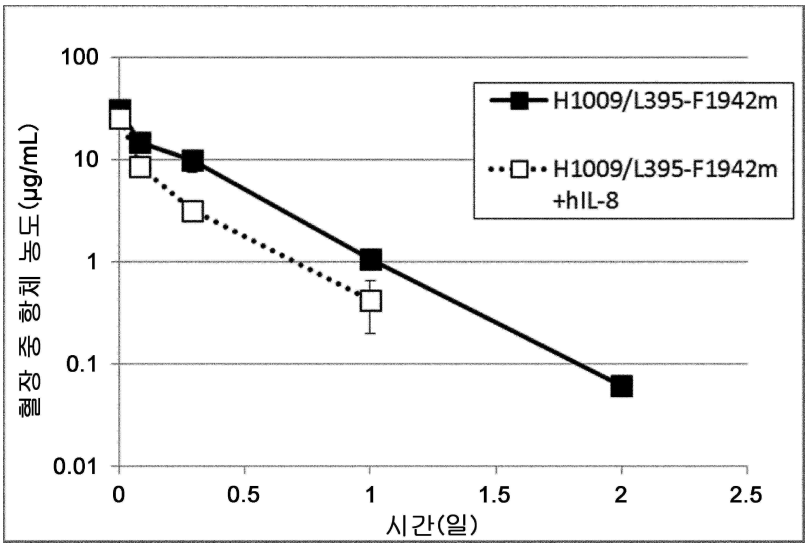
도면22


10000
1000
100
10
1
혈장 중 IL-8 농도(ng/mL)
0
2
4
6
8
시간(일)
H998/L63
H553/L118
H1009/L395

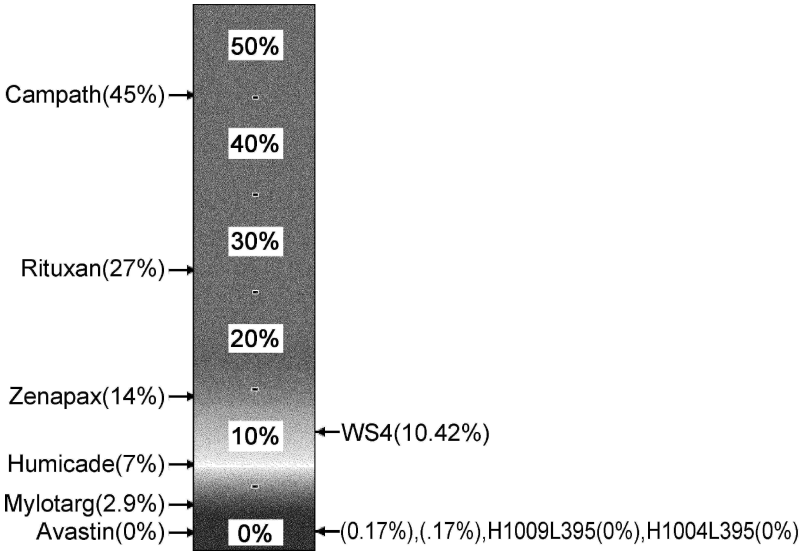
도면23


450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
발광량
항체 없음
Hr9
H89/L118
H1009/L395
Hr9
H89/L118
H1009/L395
-IL8
+hIL8

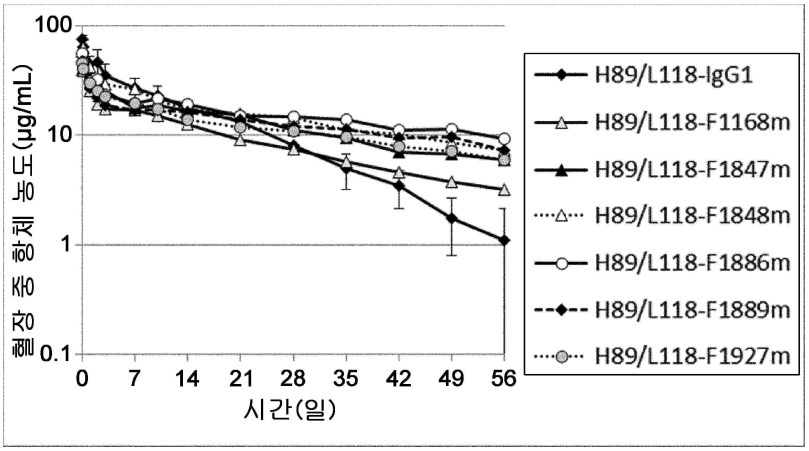
도면24



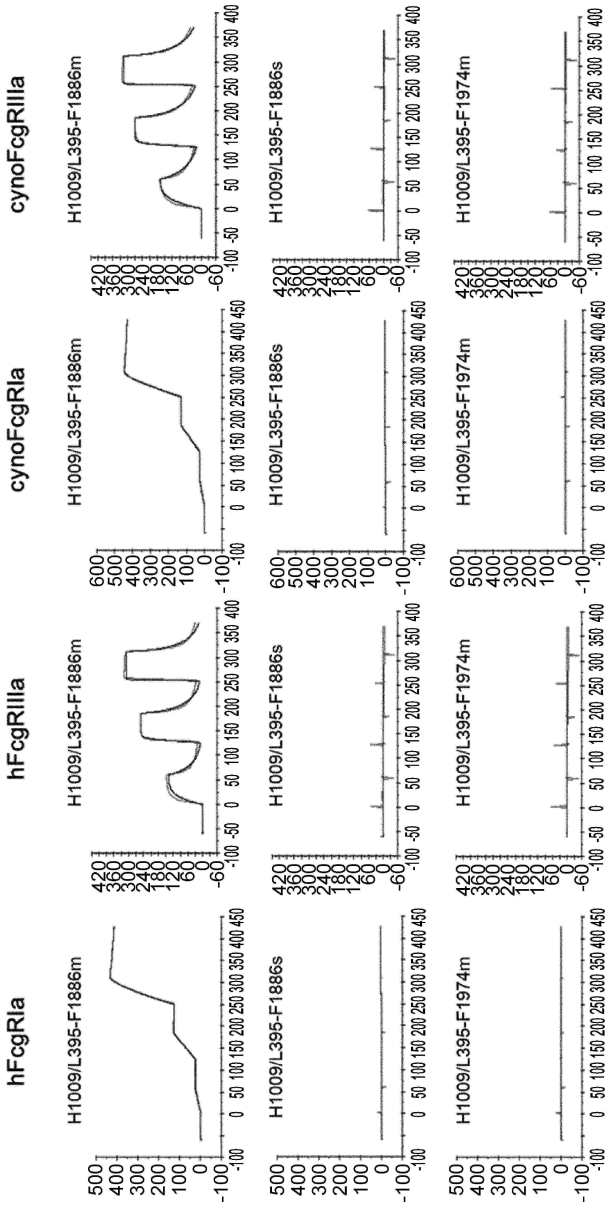
도면25



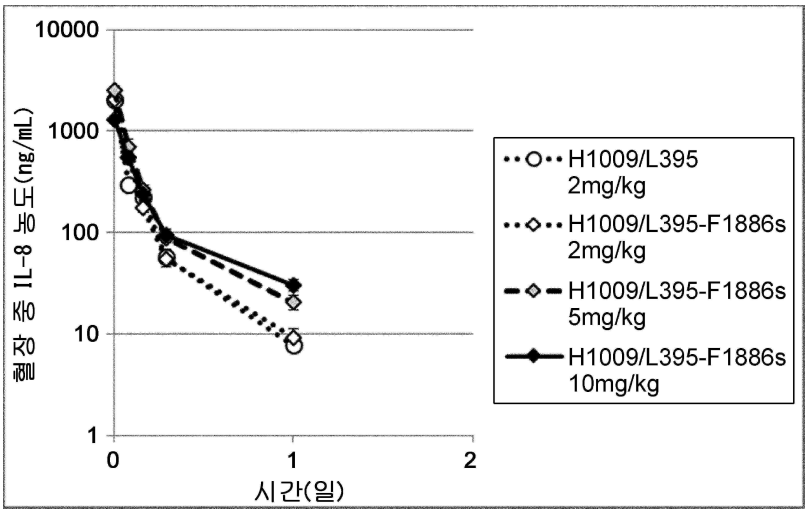
도면26



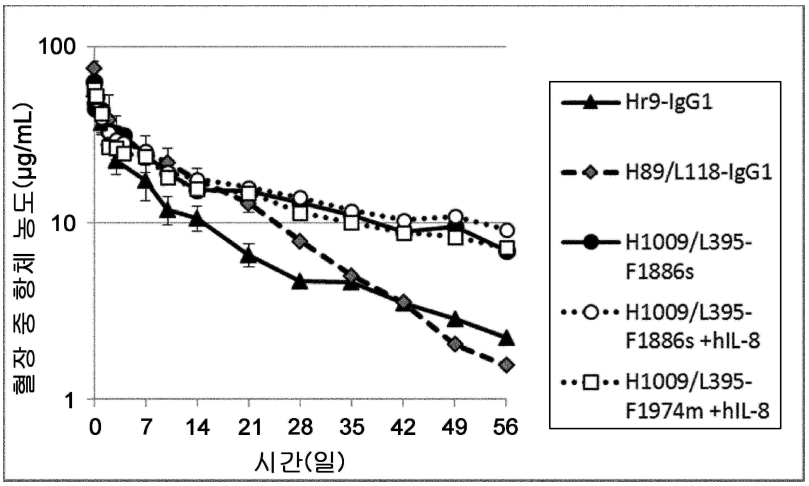
도면27


hFcgRIa
hFcgRIIIa
cynoFcgRIa
cynoFcgRIIIa
H1009/L395-F1886m
H1009/L395-F1886s
H1009/L395-F1974m

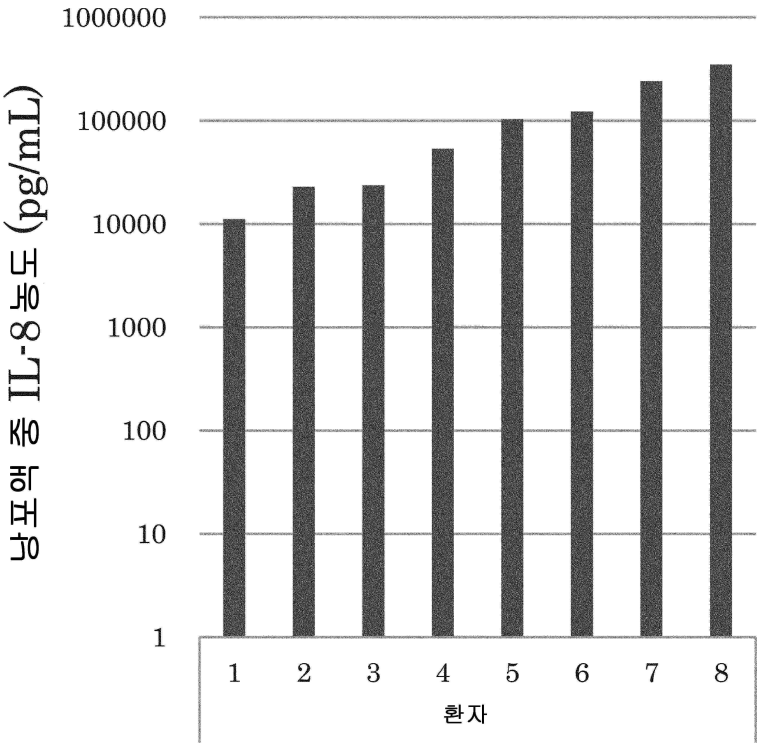
도면28


혈장 중 IL-8 농도(ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0
1
2
시간(일)
H1009/L395 2mg/kg
H1009/L395-F1886s 2mg/kg
H1009/L395-F1886s 5mg/kg
H1009/L395-F1886s 10mg/kg

도면29


100
10
1
혈장 중 항체 농도(μg/mL)
0
7
14
21
28
35
42
49
56
시간(일)
Hr9-IgG1
H89/L118-IgG1
H1009/L395-F1886s
H1009/L395-F1886s +hIL-8
H1009/L395-F1974m +hIL-8

도면30


1000000
100000
10000
1000
100
10
1
낭포액 중 IL-8 농도 (pg/mL)
1
2
3
4
5
6
7
8
환자

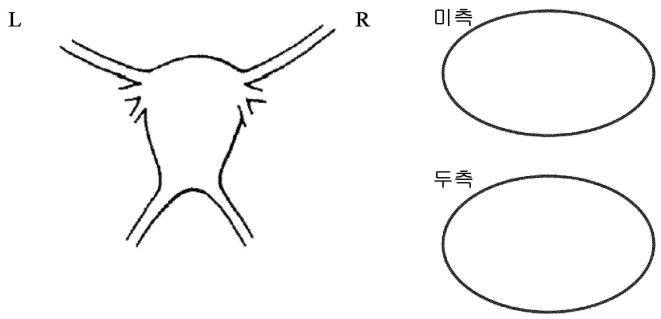
도면31

사이즈

범위		깊이	사이즈			토탈 스코어
			<3mm	3-10mm	>10mm	
다른 복막벽		천재성	1	2	4	
		심재성	2	4	6	
난소	좌	천재성	1	2	4	
		심재성	4	16	20	
	우	천재성	1	2	4	
		심재성	4	16	20	

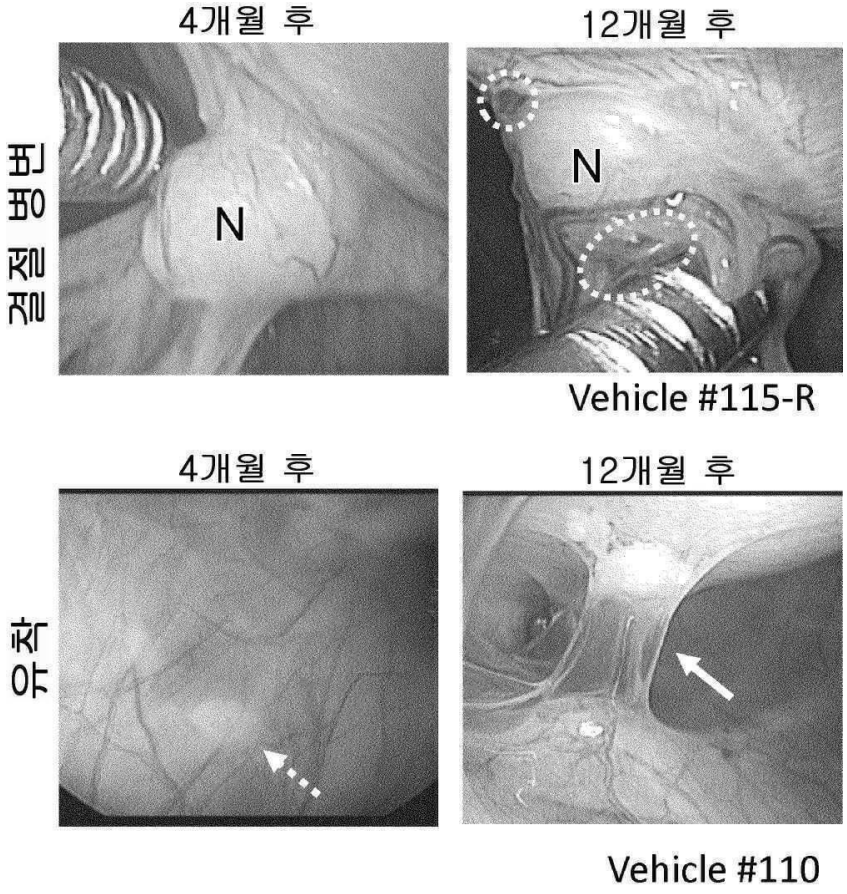
유착

범위			비폐색	부분 폐색	폐색	토탈 스코어
더글러스와			0	4	40	
방광 자궁와			0	4	40	
범위		깊이	<1/3	1/3-2/3	>2/3	
난소	좌	필름양	1	2	4	
		강고	4	8	16	
	우	필름양	1	2	4	
		강고	4	8	16	
난관	좌	필름양	1	2	4	
		강고	4	8	16	
	우	필름양	1	2	4	
		강고	4	8	16	



복강경 관찰 기록 용지

도면32



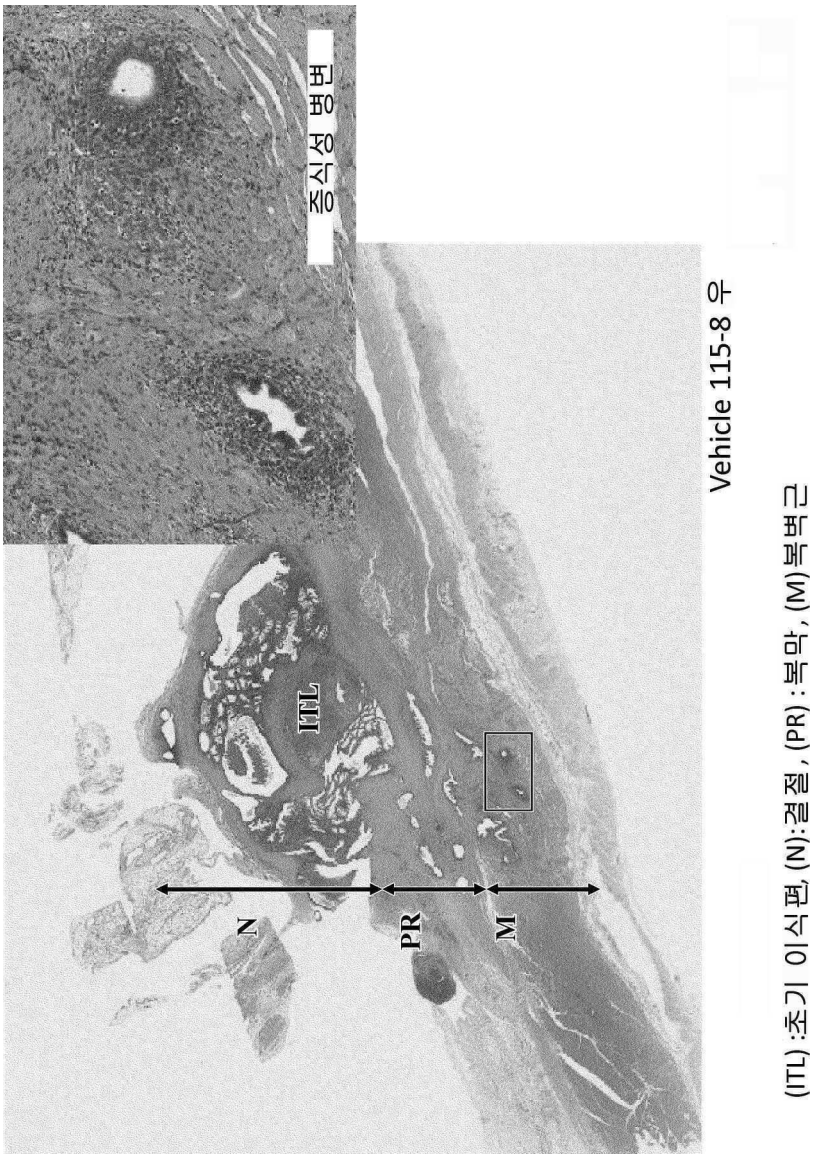
N: 결절 병변

점선: 낭포 유착

굵은 화살표: 유착

점화살표: 표재성 병변

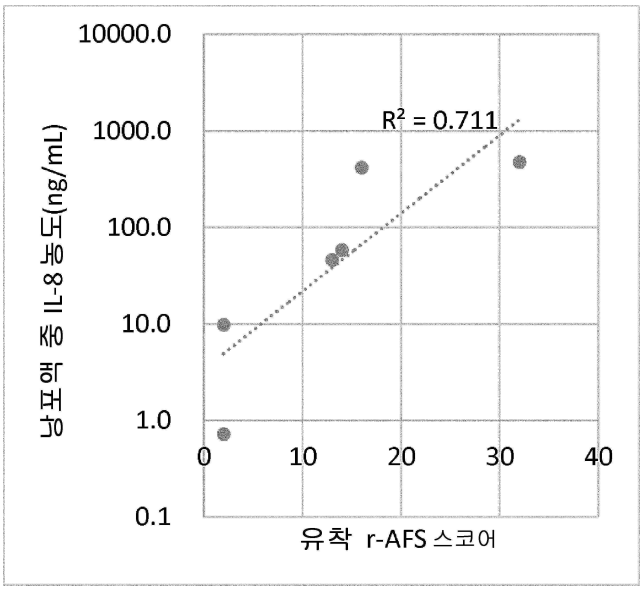
도면33



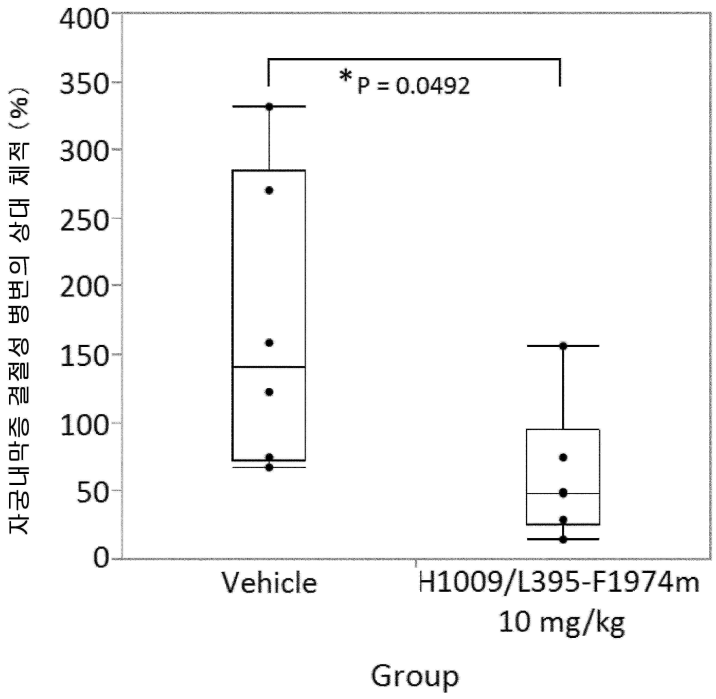
Vehicle 115-8 우

(ITL) :초기 이식편, (N):결절, (PR) :복막, (M)복벽근

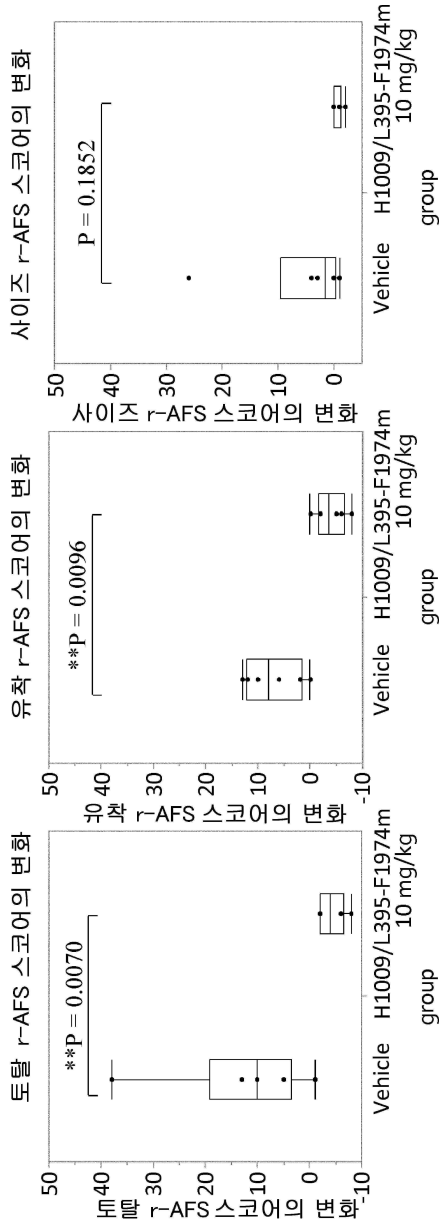
도면34a


10000.0
1000.0
100.0
10.0
1.0
0.1
낭포액 중 IL-8 농도(ng/mL)
R² = 0.711
0
10
20
30
40
유착 r-AFS 스코어

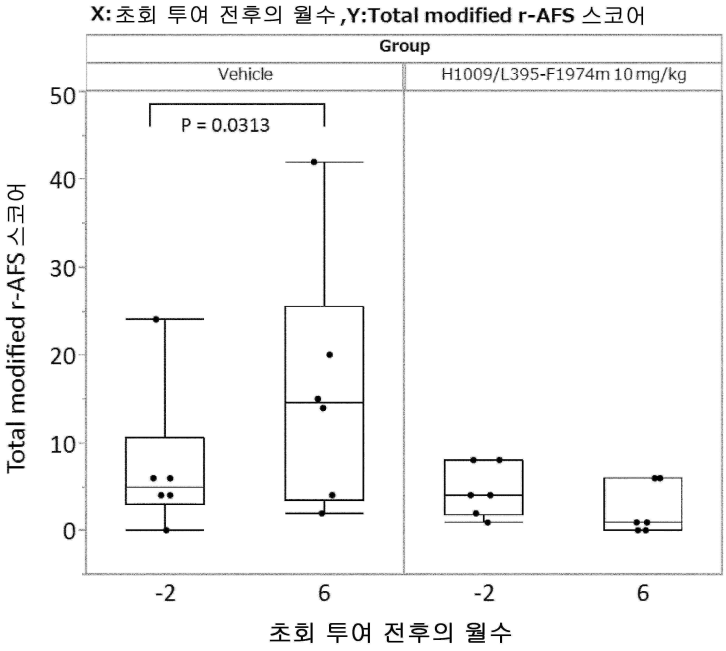
도면34b


400
350
300
250
200
150
100
50
0
자궁내막증 결절성 병변의 상대 체적 (%)
*P = 0.0492
Vehicle
H1009/L395-F1974m
10 mg/kg
Group

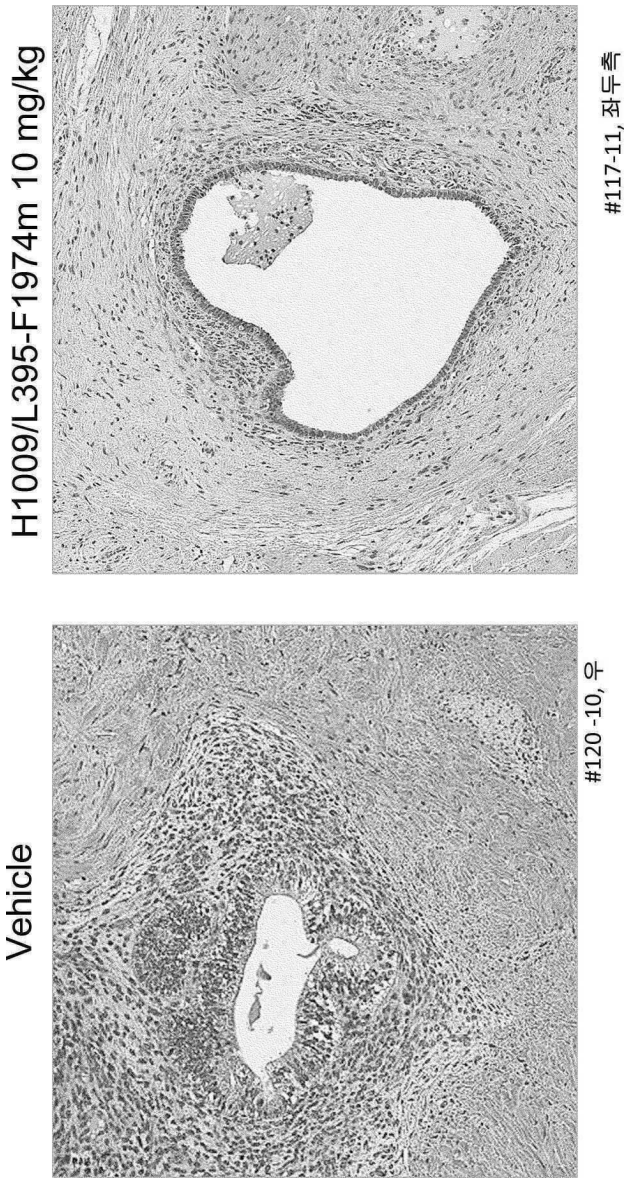
도면35a


토탈 r-AFS 스코어의 변화
**P = 0.0070
토탈 r-AFS 스코어의 변화
50
40
30
20
10
0
-10
Vehicle
H1009/L395-F1974m 10 mg/kg
group
유착 r-AFS 스코어의 변화
**P = 0.0096
유착 r-AFS 스코어의 변화
50
40
30
20
10
0
-10
Vehicle
H1009/L395-F1974m 10 mg/kg
group
사이즈 r-AFS 스코어의 변화
P = 0.1852
사이즈 r-AFS 스코어의 변화
50
40
30
20
10
0
Vehicle
H1009/L395-F1974m 10 mg/kg
group

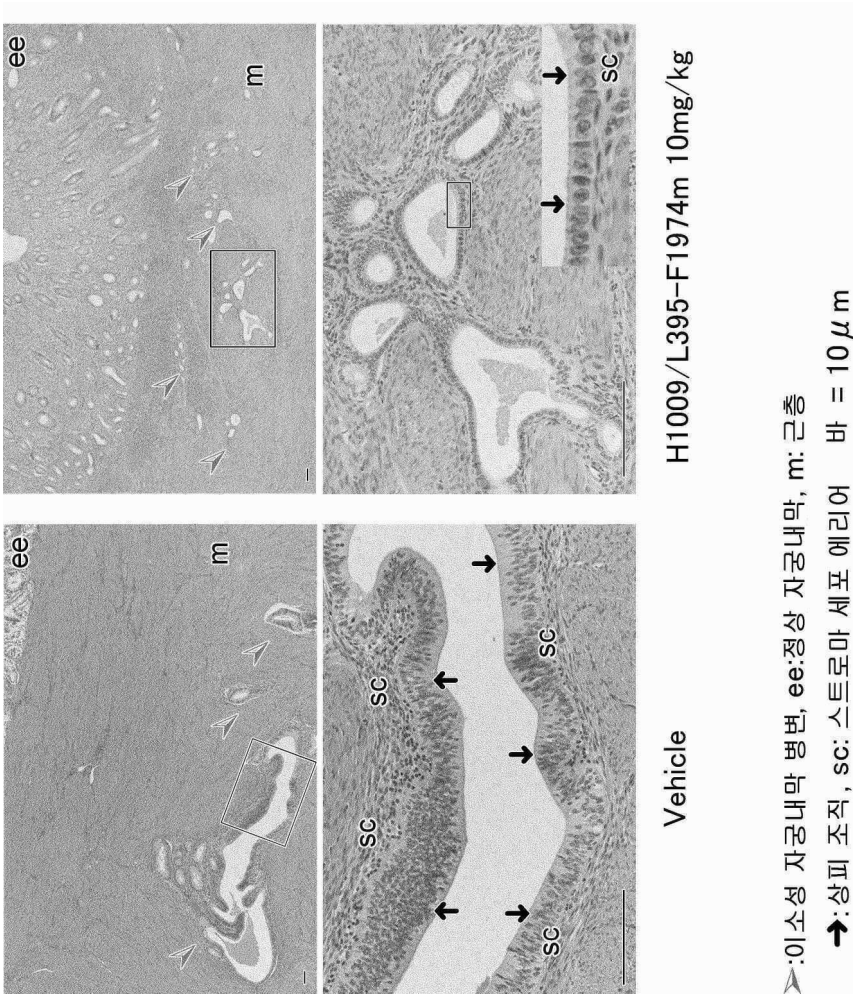
도면35b


X: 초회 투여 전후의 월수, Y: Total modified r-AFS 스코어
Group
Vehicle
H1009/L395-F1974m 10 mg/kg
P = 0.0313
Total modified r-AFS 스코어
50
40
30
20
10
0
-2
6
-2
6
초회 투여 전후의 월수

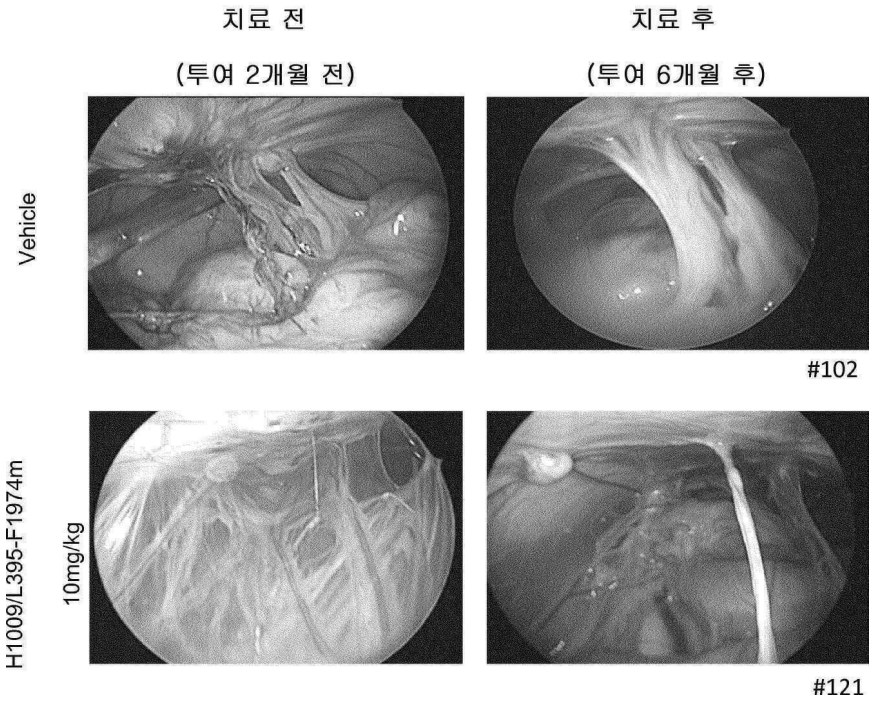
도면36



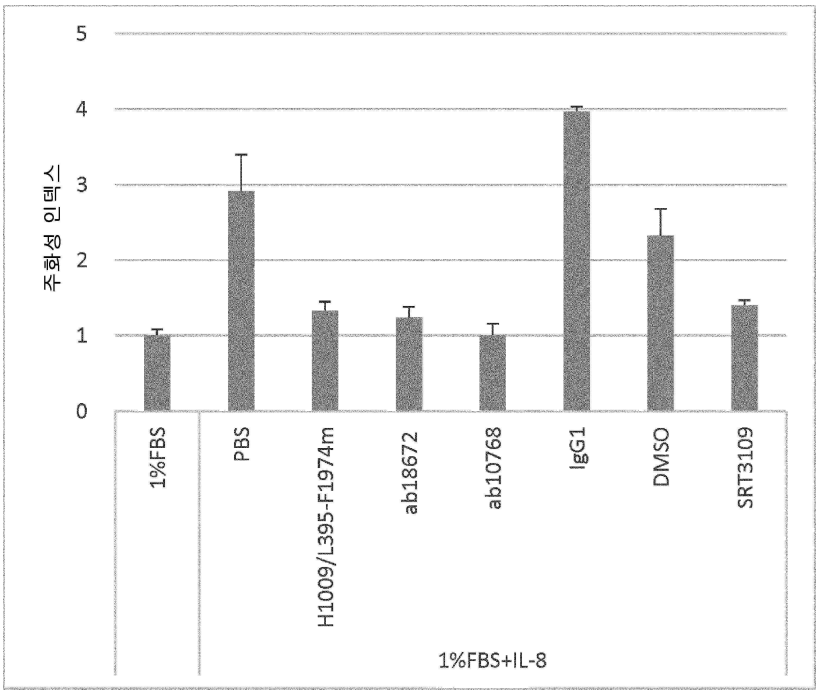
도면37


ee
m
sc
Vehicle
H1009/L395-F1974m 10mg/kg
:이소성 자궁내막 병변, ee:정상 자궁내막, m: 근층
:상피 조직, sc: 스트로마 세포 에리어 바 = 10 μm

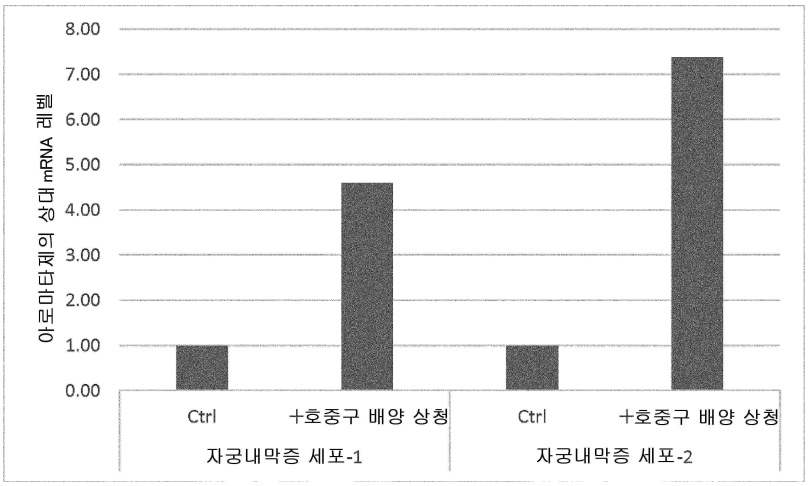
도면38


치료 전
(투여 2개월 전)
치료 후
(투여 6개월 후)
Vehicle
H1009/L395-F1974m
10mg/kg
#102
#121

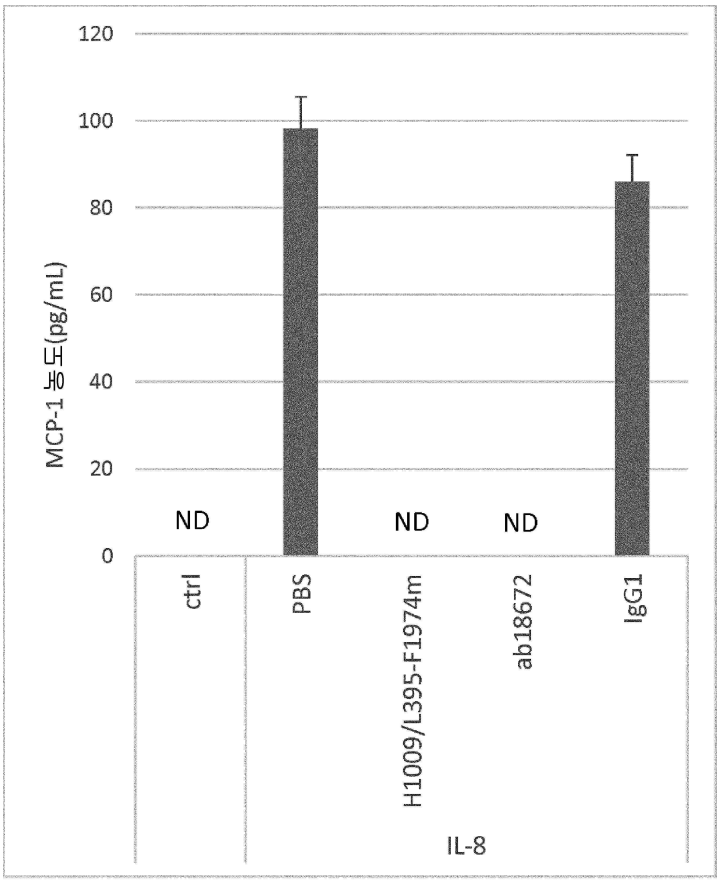
도면39


5
4
3
2
1
0
주화성 인덱스
1%FBS
PBS
H1009/L395-F1974m
ab18672
ab10768
IgG1
DMSO
SRT3109
1%FBS+IL-8

도면40

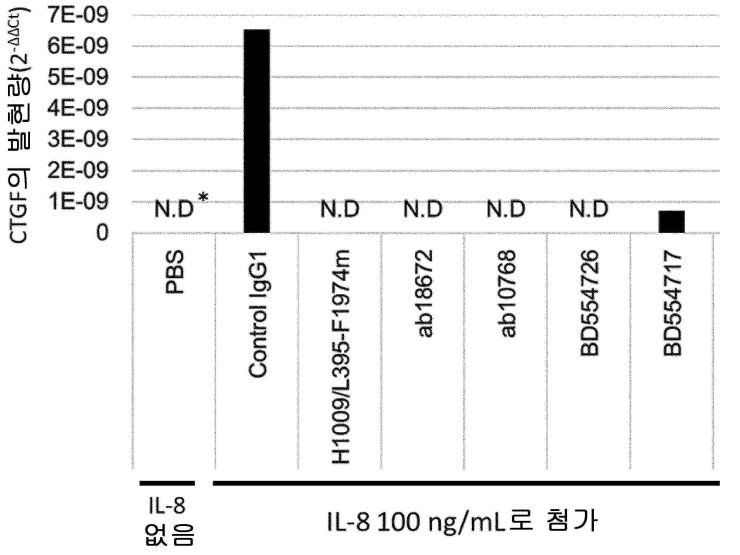

8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
아로마타제의 상대 mRNA 레벨
Ctrl
+호중구 배양 상청
Ctrl
+호중구 배양 상청
자궁내막증 세포-1
자궁내막증 세포-2

도면41



ND: 비검출

도면42



*N.D: CTGF의 발현이 전혀 검출되지 않았다

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

JICHI MEDICAL UNIVERSITY

NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION

<120> Composition for treating or preventing an IL-8 associated disease

<130> C1-A1608P

<150> JP 2016-154174

<151> 2016-08-05

<160> 110

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 2

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 2

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

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 3

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
245 250 255
Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 4

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400>

4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp

20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 5
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 5
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His His His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 6
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 6

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 7

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ala His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 8

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400>

8

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu

420 425 430

Ala Leu His Ala His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 10

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp

20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 11
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 11
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 12

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400

> 12

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 13

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ser

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Phe Ile Ser Ser

85 90 95

Thr Asp Phe Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 14
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 14
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu

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

65 70 75 80
Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu

420 425 430

Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 15

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 15

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 16
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 16
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe
20 25 30
Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 17

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 17

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Ala His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 18

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 18

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 19
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 19
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe
20 25 30
Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys

50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu

420 425 430

Ala Leu His Ala His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 20

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 20

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Phe

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Val Ser Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Val Asp Ser Ser Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu

420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 21

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp

20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Tyr His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 22

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys
1 5 10 15

Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val
20 25 30

Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu
35 40 45

Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln
50 55 60

Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
65 70 75

<210>

23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 23

Asp Tyr Tyr Leu Ser
1 5

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 24

Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 25

Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 26

Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 27

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 28

Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 29

Leu Ile Arg Asn Lys Asp Asn Tyr His Thr Pro Glu Tyr Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 30

Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 31

Lys Ala Lys Thr His Ala Asp

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 32

Lys His His Phe Gly Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 36

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg
225 230 235 240
Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Asp Asn Tyr His Thr Pro Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Thr Met Ser Asp Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg

225 230 235 240

Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 38

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Lys Thr His Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys His His Phe Gly Phe Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 39

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 41

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 41

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

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 42
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 42
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 43

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr His Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr His Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys His His Phe Gly Phe Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 45

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Leu Arg Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Thr Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 46
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 46

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

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 47

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Asp Asn Gly Tyr Thr Pro Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Thr Met Ser Asp Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 48
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Leu Ile Arg Asn Lys Asp Asn Tyr His Thr Pro Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Thr Met Ser Asp Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 49

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

```
            20                  25                  30
Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Asp Asn Tyr His Thr Pro Glu Tyr Ser Ala
    50                  55                  60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80
Leu Tyr Leu Thr Met Ser Asp Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
    130                 135                 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
            180                 185                 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
        195                 200                 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
    210                 215                 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg
225                 230                 235                 240

Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255
Met Ala Asp Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270
```

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 50
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 51

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 52

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 53
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Ala His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 54
<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 55

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Leu His Glu Ala Leu His Ala His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro

450

<210> 56

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 56

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Leu His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 57
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 57

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 58

Ser Tyr Gly Met Leu

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 59

Asp Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 60

Asp Arg Ile Ala Val Ala Asp Tyr

1 5

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 62

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 63

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr

1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 64

Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 65

Val Ile Tyr Phe Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Asn Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 66

Ser Pro Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr

1 5

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Asp Tyr Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 68

Gly Thr Phe Ile Arg Ala Thr

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 69

Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 70

Ser Tyr Gly Met Leu

1 5

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 71

Asp Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 72

Asp Arg Ile Ala Val Ala Asp Tyr

1 5

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> An artificially synthesized sequence

<400> 74

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 75

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Phe Thr

1 5

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 76

Gly Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 77

<211> 16

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 77

Glu Val Ile His His Gly Ser Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 78

Gly Gly Ala Ala Ala Ala Leu Asp Ser

1 5

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> An artificially synthesized sequence

<400> 79

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asn Asn Arg Lys Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 80

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 81

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

Glu Leu Leu His Ala Val Tyr
1 5

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Thr Ala Ser Gln Asp Ile His Lys Tyr Ile Ser

1 5 10

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 87

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 88

Asn Tyr Trp Ile Val

1 5

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 89

Asp Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Ser Gly Tyr Asp Arg Thr Trp Phe Ala His

1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Glu Ser Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Pro Thr

1 5

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

His Tyr Gly Met Tyr

1 5

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Tyr Glu Tyr Asn Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Asp Arg Val Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5

<210> 97

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gly Pro Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Gln Gln Tyr Ala Gly Ser Leu Thr
1 5

<210> 100

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 101

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 102

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys

130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr

195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln

260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn

305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile

340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375

<210> 103

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 104

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 105

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 106

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 106

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 107
His Ala Lys Thr His Ala Asp
1 5

<210> 108
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> An artificially synthesized sequence
<400> 108
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Asn His Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr His Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys His His Phe Gly Phe Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 110

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized sequence

<400> 110

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210