(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-520989
(P2011-520989A)
(43)公表日　平成23年7月21日(2011.7.21)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4H045
A61P 37/02	(2006.01)	A61K	39/395	N	
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	37/02		
A61P 27/08	(2006.01)	A61P	29/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 182 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-510745 (P2011-510745)
(86)(22)出願日　平成21年5月26日 (2009.5.26)
(85)翻訳文提出日　平成23年1月24日 (2011.1.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/045188
(87)国際公開番号　WO2009/143526
(87)国際公開日　平成21年11月26日 (2009.11.26)
(31)優先権主張番号　61/055,543
(32)優先日　平成20年5月23日 (2008.5.23)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/099,476
(32)優先日　平成20年9月23日 (2008.9.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　309040701
ワイス・エルエルシー
アメリカ合衆国　ニュージャージー州０７９４０．マジソン，フアイブ　ジラルダ　フアームズ
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100128750
弁理士　廣瀬　しのぶ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インターロイキン－２１受容体の結合性タンパク質を利用する治療法

(57)【要約】
本願発明は、ヒトのインターロイキン－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）に特異的に結合する、ヒトの抗体を含む、結合性タンパク質およびその抗原結合性断片、及びそれを使用する方法を提供する。当該結合性タンパク質は、例えば、ＩＬ－２１Ｒ活性のアンタゴニストとして作用することができ、それにより一般的な免疫応答、および特にＩＬ－２１Ｒにより媒介される免疫応答、を調節する。開示した組成物および方法は、例えば、ＩＬ－２１Ｒが関連する疾患、例えば炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー、移植片拒絶、およびその他の免疫系疾患、の診断、治療ならびに／または予防に用いてもよい。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象にヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、該対象の免疫細胞活性を阻害または減少させるのに十分な量で投与することを含み、それにより該疾患を治療または予防する、
ここで、該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む、
前記方法。
【請求項２】
結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、抗体である、請求項１に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。
【請求項３】
結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、ｓｃＦｖである、請求項１に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。
【請求項４】
結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、V_Hである、請求項１に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。
【請求項５】
結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、V_Lである、請求項１に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。
【請求項６】
結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、ＣＤＲである、請求項１に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。
【請求項７】
対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象にヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、該対象の免疫細胞活性を阻害または減少させるのに十分な量で投与することを含み、それにより該疾患を治療または予防する、
ここで、該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５および２４７、からなる群より選択されるヌクレオチド配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列を含む、
前記方法。
【請求項８】
結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、配列番号１４、１６、１８、２０、２

２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８、からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項９】

対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象にヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、該対象の免疫細胞活性を阻害または減少させるのに十分な量で投与することを含み、それにより該疾患を治療または予防する、

ここで、該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２～１９５、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含み、そして

ここで当該結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号６、８、１０、１２、１６３、１６４、１６９、１７０、１９４および１９５からなる群より選択される配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む場合は、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列をも含まなければならない、前記方法。

【請求項１０】

対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象にヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、該対象の免疫細胞活性を阻害または減少させるのに十分な量で投与することを含み、それにより該疾患を治療または予防する、

ここで、該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３

、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５および２４７、からなる群より選択されるヌクレオチド配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列を含み、そして

ここで当該結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号５、７、９および１１からなる群より選択される配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列を含む場合は、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５および２４７、からなる群より選択されるヌクレオチド配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列をも含まなければならない、

前記方法。

【請求項１１】

結合性タンパク質または抗原結合断片が、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２～１９５、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８、からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、

ここで当該結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号６、８、１０、１２、１６３、１６４、１６９、１７０、１９４および１９５からなる群より選択される配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む場合は、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列をも含まなければならない、

請求項９に記載の方法。

【請求項１２】

対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象にヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ここで該結合性タンパク質またはその抗原結合断片は軽鎖及び重鎖を含み、そしてここで該重鎖は配列番号１４、１６、１８、２０、６８、７０、７２、８８、９０、９２、９４、２１３、２１８、２１９、２４０、および２４２からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法。

【請求項１３】

対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象

にヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ここで該結合性タンパク質またはその抗原結合断片は軽鎖及び重鎖を含み、そしてここで該軽鎖は配列番号２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、２１４～２１７、２２０～２２９、２４４、２４６、および２４８からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法。

【請求項１４】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がV_LドメインおよびV_Hドメインを含み、そしてここでV_Hドメインが配列番号１４、１６、１８、および２０からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１５】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がV_LドメインおよびV_Hドメインを含み、そしてここでV_Lドメインが配列番号２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、２１５、２１７、２２１、２２３、２２５、２２７および２２９からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の方法。

【請求項１６】

重鎖が配列番号８８、９０、９２、９４、２１３、２１８、２１９、２４０、および２４２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、そして軽鎖が配列番号９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、２１４、２１６、２２０、２２２、２２４、２２６、２２８、２４４、２４６および２４８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１２または１３に記載の方法。

【請求項１７】

対象におけるＩＬ－２１Ｒに関連する疾患と治療または予防する方法であって、該対象に、該対象中の免疫細胞活性を阻害または減少させるのに十分な量で、ＡｂＡ－ＡｂＷ、Ｈ３－Ｈ６、Ｌ１－Ｌ６、Ｌ８－Ｌ２１、およびＬ２３－Ｌ２５からなる群より選択される結合性タンパク質によって認識されるヒトＩＬ－２１Ｒエピトープに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与することを含み、それにより該疾患を治療または予防する、ここで該結合性タンパク質またはその抗原結合断片はＡｂＡ－ＡｂＷ、Ｈ３－Ｈ６、Ｌ１－Ｌ６、Ｌ８－Ｌ２１、およびＬ２３－Ｌ２５からなる群より選択される結合性タンパク質のヒトＩＬ－２１Ｒへの結合を競合的に阻害する、前記方法。

【請求項１８】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６および２４８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖、軽鎖、またはF_v断片を含む、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１

４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５および２４７からなる群より選択されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖、軽鎖またはF_v断片を含む、請求項１７に記載の方法。

【請求項２０】

結合性タンパク質が、ＡｂＯ、ＡｂＰ、ＡｂＱ、ＡｂＲ、ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＵ、ＡｂＶ、および／またはＡｂＷにより認識されるＩＬ－２１Ｒエピトープに特異的に結合し、そしてここで該結合性タンパク質はＡｂＯ、ＡｂＰ、ＡｂＱ、ＡｂＲ、ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＵ、ＡｂＶ、および／またはＡｂＷのヒトＩＬ－２１Ｒへの結合を競合的に阻害する、請求項１７に記載の方法。

【請求項２１】

ＩＬ－２１Ｒに関連する疾患が、自己免疫疾患、炎症性の状態、アレルギー、移植片拒絶、および血液の増殖過剰疾患、からなる群より選択される、請求項１、９、１２、１３および１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】

ＩＬ－２１Ｒに関連する疾患が、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、乾癬、移植片拒絶、関節リウマチ、およびその他の関節炎疾患からなる群より選択される、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、少なくとも約$10^5 M^{-1} s^{-1}$のヒトＩＬ－２１Ｒに対する結合定数を有する、請求項１、９、１２、１３、および１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２４】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、ＩＬ－２１により媒介されるＢａＦ３細胞の増殖を、約１．７５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で阻害する、そしてここで当該ＢａＦ細胞はヒトＩＬ－２１Ｒを含む、請求項１、９、１２、１３および１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２５】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、ＩＬ－２１により媒介されるＴＦ１細胞の増殖を、約１４ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で阻害する、そしてここで当該ＴＦ１細胞はヒトＩＬ－２１Ｒを含む、請求項１、９、１２、１３および１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２６】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、ＩＬ－２１により媒介される初代ヒトＢ細胞の増殖を、約１．９ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で阻害する、そしてここで当該Ｂ細胞はヒトＩＬ－２１Ｒを含む、請求項１、９、１２、１３および１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２７】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、ＩＬ－２１により媒介される初代ヒト$CD4^+$細胞の増殖を、約１．５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で阻害する、そしてここで当該$CD4^+$細胞はヒトＩＬ－２１Ｒを含む、請求項１、９、１２、１３および１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】

抗ＩＬ－２１Ｒ抗体が治療的な抗ＩＬ－２１Ｒ抗体であるか否かを決定する方法であって、以下の工程：

（ａ）対象由来の第一の血液試料をＩＬ－２１リガンドと接触させる；

（ｂ）ＩＬ－２１リガンドと接触させた第一の血液試料中の少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定する；

（ｃ）抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の存在下で、対象由来の第二の血液試料をＩＬ－２１リガンドと接触させる；

（ｄ）抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の存在下でＩＬ－２１リガンドと接触させた第二の血液試料中の少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定する；および
（ｅ）工程（ｂ）および（ｄ）で決定した少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを比較する；
を含み、ここで、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルの変化は、該抗ＩＬ－２１Ｒ抗体が、治療的な抗体であることを指し示す、前記方法。
【請求項２９】
少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子が、ＴＮＦ、ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１９、ＳＴＡＴ３、ＴＢＸ２１、ＣＳＦ１、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、およびＩＬ－２１Ｒからなる群より選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子がＩＬ－２αである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の薬力学的活性を決定する方法であって、対象の血液試料中の少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルの調節を検出することを含む、前記方法。
【請求項３２】
少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルの調節を検出することが、以下の工程：
（ａ）対象に抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を投与する、ここで該対象は抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処置される；
（ｂ）抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処置された該対象からの血液試料をＩＬ－２１リガンドと接触させる；
（ｃ）抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処置された該対象からの血液試料であってＩＬ－２１リガンドと接触させた血液試料中の少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定する；
（ｄ）工程（ｃ）で決定した少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを、ＩＬ－２１と接触させた異なる血液試料中の少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルと比較し、ここで該異なる血液試料は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処置されていない対象からのものである；
を含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子が、ＴＮＦ、ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１９、ＳＴＡＴ３、ＴＢＸ２１、ＣＳＦ１、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、およびＩＬ－２１Ｒからなる群より選択される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子が、ＣＤ１９、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、ＩＮＦγおよびＩＬ－６からなる群より選択される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子がＩＬ－２Ｒαである、請求項３４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
[0001]本出願は、２００８年５月２３日出願の米国仮特許出願第６１／０５５，５４３号、および２００８年９月２３日出願の米国仮特許出願第６１／０９９，４７６号の優先権の恩典を請求し、当該出願の内容は、その全体が本明細書に援用される。
【０００２】

発明の分野

[0002]本発明は、インターロイキン－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）、特にヒトＩＬ－２１Ｒに結合する結合性タンパク質およびその抗原結合性断片、ならびにＩＬ－２１Ｒが関連する活性、例えばＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルに対するＩＬ－２１の影響を制御する際のその使用に関する。本明細書に開示する結合性タンパク質は、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害、例えば炎症性障害、自己免疫疾患、アレルギー、移植片拒絶、血液の過剰増殖障害、ならびに他の免疫系障害の治療および／または診断に有用である。本発明はさらに、本発明の抗体の薬力学的および薬物動態学的特性を決定するための方法を提供する。

【背景技術】

【０００３】

[0003]抗原は、免疫応答を開始し、そしてリンパ球の２つの最大集団：Ｔ細胞およびＢ細胞を活性化する。抗原と出会った後、Ｔ細胞は増殖し、そしてエフェクター細胞に分化し、一方、Ｂ細胞は増殖し、そして抗体を分泌する形質細胞に分化する。これらのエフェクター細胞は、リンパ球および他の細胞種によって分泌される小タンパク質（約３０ｋＤａ未満）である、サイトカインを分泌し、そして／またはサイトカインに応答する。

【０００４】

[0004]ヒトＩＬ－２１は、ＩＬ－２、ＩＬ－４およびＩＬ－１５に配列相同性を示すサイトカインである（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）Ｎａｔｕｒｅ　４０８：５７－６３）。インターロイキン・サイトカイン間では配列相同性が低いにもかかわらず、サイトカインは、ファミリーを代表する「４－ヘリックスバンドル」構造への共通のフォールディングを共有する。大部分のサイトカインは、クラスＩまたはクラスＩＩサイトカイン受容体のいずれかに結合する。クラスＩＩサイトカイン受容体には、ＩＬ－１０およびインターフェロンの受容体が含まれ、一方、クラスＩサイトカイン受容体には、ＩＬ－２からＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、およびＩＬ－１５、ならびに造血増殖因子、レプチン、および成長ホルモンの受容体が含まれる（Ｃｏｓｍａｎ（１９９３）Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　５：９５－１０６）。

【０００５】

[0005]ヒトＩＬ－２１Ｒはクラスサイトカイン受容体である。ヒトＩＬ－２１およびその受容体（ＩＬ－２１Ｒ）をコードするヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、国際出願公報第ＷＯ　００／０５３７６１号および第ＷＯ　０１／０８５７９２号；　Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）上記；ならびにＯｚａｋｉら（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９７：１１４３９－４４に記載される。ＩＬ－２１Ｒは、ＩＬ－２受容体β鎖およびＩＬ－４受容体α鎖に対して最も高い配列相同性を有する（Ｏｚａｋｉら（２０００）上記）。リガンド結合に際して、ＩＬ－２１Ｒは、共通のガンマ・サイトカイン受容体鎖（γｃ）と会合し、このγｃは、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１３およびＩＬ－１５の受容体複合体によって共有される（Ｏｚａｋｉら（２０００）上記；　Ａｓａｏら（２００１）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１６７：１－５）。

【０００６】

[0006]ＩＬ－２１Ｒは、リンパ系組織において、特に、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、樹状細胞（ＤＣ）およびマクロファージ上に発現され（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）上記）、これによって、これらの細胞がＩＬ－２１に応答することが可能になる（ＬｅｏｎａｒｄおよびＳｐｏｌｓｋｉ（２００５）Ｎａｔ．　Ｒｅｖ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　５：６８８－９８）。ＩＬ－２１Ｒが広くリンパ系に分布していることは、ＩＬ－２１が免疫制御に重要な役割を果たすことを示している。Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究によって、ＩＬ－２１が、Ｂ細胞、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞、ならびにＮＫ細胞の機能を有意に調節することが示されてきている（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）上記；　Ｋａｓａｉａｎら（２００２）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１６：５５９－６９）。最近の証拠によって、ＩＬ－２１により媒介されるシグナル伝達が、抗腫

瘍活性を有することが可能であり（Ｓｉｖａｋｕｍａｒら（２００４）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１１２：１７７－８２）、そしてＩＬ－２１が、マウスにおいて抗原が誘導する喘息を防止しうる（Ｓｈａｎｇら（２００６）Ｃｅｌｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２４１：６６－７４）ことが示唆されている。

【０００７】

[0007]自己免疫において、ＩＬ－２１遺伝子の破壊および組換えＩＬ－２１の注射が、それぞれ、実験的自己免疫性重症筋無力症（ＥＡＭＧ）および実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）の進行を調節することが示されてきている（Ｋｉｎｇら（２００４）Ｃｅｌｌ　１１７：２６５－７７；　Ｏｚａｋｉら（２００４）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１７３：５３６１－７１；　Ｖｏｌｌｍｅｒら（２００５）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１７４：２６９６－２７０１；　Ｌｉｕら（２００６）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１７６：５２４７－５４）。これらの実験系において、ＩＬ－２１により媒介されるシグナル伝達を操作すると、ＣＤ８$^{+}$細胞、Ｂ細胞、Ｔヘルパー細胞、およびＮＫ細胞の機能が直接改変されることが示唆されてきている。

【０００８】

[0008]したがって、本発明は、例えば、ＩＬ－２１シグナル伝達経路を遮断することによって作用する自己免疫疾患を治療するための新規療法剤、すなわち抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を提供する。療法剤、例えば抗ＩＬ－２１Ｒ抗体がｉｎ　ｖｉｖｏで有効であるためには、ＩＬ－２１反応を調節するのに必要な抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の最低血清濃度を決定しなければならず；したがって、こうした最低血清濃度の正確な決定を可能にする方法が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】第ＷＯ　００／０５３７６１号
【特許文献２】第ＷＯ　０１／０８５７９２号

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）Ｎａｔｕｒｅ　４０８：５７－６３
【非特許文献２】Ｃｏｓｍａｎ（１９９３）Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　５：９５－１０６
【非特許文献３】Ｏｚａｋｉら（２０００）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９７：１１４３９－４４
【非特許文献４】Ａｓａｏら（２００１）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１６７：１－５
【非特許文献５】ＬｅｏｎａｒｄおよびＳｐｏｌｓｋｉ（２００５）Ｎａｔ．　Ｒｅｖ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　５：６８８－９８
【非特許文献６】Ｋａｓａｉａｎら（２００２）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１６：５５９－６９
【非特許文献７】Ｓｉｖａｋｕｍａｒら（２００４）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１１２：１７７－８２
【非特許文献８】Ｓｈａｎｇら（２００６）Ｃｅｌｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２４１：６６－７４
【非特許文献９】Ｋｉｎｇら（２００４）Ｃｅｌｌ　１１７：２６５－７７
【非特許文献１０】Ｏｚａｋｉら（２００４）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１７３：５３６１－７１
【非特許文献１１】Ｖｏｌｌｍｅｒら（２００５）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１７４：２６９６－２７０１
【非特許文献１２】Ｌｉｕら（２００６）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１７６：５２４７－５４

【発明の概要】

【００１１】

[0009]本発明は、ヒトおよびネズミＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する、結合性タンパク質、例えばヒト抗体およびその断片の単離および性質決定を記載する。本明細書記載の結合性タンパク質は、米国特許第７，４９５，０８５号に開示される抗体１８Ａ５に由来し、当該特許の全体は本明細書に援用される。本発明の結合性タンパク質は、親１８Ａ５抗体よりも、ヒトおよび／またはネズミＩＬ－２１Ｒに対してはるかにより高い度合いのアフィニティを有する。

【００１２】

[0010]本発明は、少なくとも部分的に、ＩＬ－２１Ｒ、特にヒトＩＬ－２１Ｒに、高いアフィニティおよび特異性で結合する、ＩＬ－２１Ｒ結合性剤（結合性タンパク質およびその抗原結合性断片など）を提供する。本発明の結合性タンパク質およびその抗原結合性断片はまた、本明細書において、それぞれ、「抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質」および「その断片」とも称される。１つの態様において、結合性タンパク質またはその断片は、ＩＬ－２１Ｒ活性を減少させるか、阻害するか、またはアンタゴナイズする。こうした結合性タンパク質を用いて、ＩＬ－２１Ｒ活性をアンタゴナイズすることによって、免疫応答またはＩＬ－２１Ｒが関連する障害を制御してもよい。他の態様において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を診断に、あるいはＩＬ－２１Ｒ発現細胞に療法剤または細胞傷害剤を送達するためのターゲティング結合性タンパク質として、用いてもよい。したがって、本発明の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質は、本明細書により詳細に記載するように、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害、例えば炎症性障害、自己免疫疾患、アレルギー、移植片拒絶、血液の過剰増殖障害、および他の免疫系障害を診断し、そして治療するのに有用である。

【００１３】

[0011]したがって、１つの側面において、本発明の結合性タンパク質は、ＩＬ－２１Ｒ、特にヒトＩＬ－２１Ｒに結合する単離された結合性タンパク質（例えば単離された抗体）またはその抗原結合性断片を特徴とする。特定の態様において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質（例えば抗体）は、１以上の以下の特性を有してもよい：（１）モノクローナル性または単一特異性結合性タンパク質である；（２）ヒト結合性タンパク質である；（３）ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生成結合性タンパク質である；（４）ｉｎ　ｖｉｖｏ生成（例えばトランスジェニックマウス系）結合性タンパク質である；（５）ＩＬ－２１ＲへのＩＬ－２１の結合を阻害する；（６）ＩｇＧ１である；（７）少なくとも約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$の結合定数でヒトＩＬ－２１Ｒに結合する；（８）少なくとも約$5x10^{4}M^{-1}s^{-1}$の結合定数でネズミＩＬ－２１Ｒに結合する；（９）約$10^{-3}s^{-1}$またはそれ未満の解離定数でヒトＩＬ－２１Ｒに結合する；（１０）約$10^{-2}s^{-1}$またはそれ未満の解離定数でネズミＩＬ－２１Ｒに結合する；（１１）約１．７５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ヒトＩＬ－２１Ｒにより媒介されるヒトＩＬ－２１Ｒ発現性ＢａＦ３細胞の増殖を阻害する；（１２）約０．５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ネズミＩＬ－２１Ｒにより媒介されるネズミＩＬ－２１Ｒ発現性ＢａＦ３細胞の増殖を阻害する；（１３）約１４．０ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ヒトＩＬ－２１Ｒにより媒介されるヒトＩＬ－２１Ｒ発現性ＴＦ１細胞の増殖を阻害する；（１４）約１．９ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ＩＬ－２１Ｒにより媒介されるヒト初代Ｂ細胞の増殖を阻害する；（１５）約１．５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ＩＬ－２１により媒介されるヒト初代$CD4^{+}$　Ｔ細胞の増殖を阻害する；（１６）約５．０ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ＩＬ－２１により媒介されるネズミ初代$CD4^{+}$　Ｔ細胞の増殖を阻害する；（１７）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えば静脈内（ｉ．ｖ．）投与後、約０．１～７．５ｍｌ／時間／ｋｇの平均全身クリアランスを有する；（１８）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．、皮下（ｓ．ｃ．）、または腹腔内（ｉ．ｐ．）投与後、約２０～７００時間の平均排除半減期を有する；（１９）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類において、約４０～１５００ｍｌ／ｋｇの平均定常状態分布体積を有する；（２０）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｓ．ｃ．投与後、約３５～

１００％の生物学的利用能を有する；（２１）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．、ｓ．ｃ．、またはｉ．ｐ．投与後、約２００～１０，０００μｇ＊時間／ｍｌ（１ｍｇ／ｋｇ投薬量あたり）の平均用量規準化ＡＵＣを有する；（２２）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．、ｓ．ｃ．、またはｉ．ｐ．投与後、約０．５～３０μｇ／ｍｌの平均用量規準化Ｃｍａｘ（最大血清濃度）を有する；および（２３）ＩＬ－２１応答性サイトカインまたはＩＬ－２１応答性遺伝子の発現を調節する。

【００１４】

[0012]本発明の結合性タンパク質の限定されない例示的な態様（用語「結合性タンパク質」はまた、適切なように、その抗原結合性断片も含み、そして当該断片も指す）は、本明細書において、ＡｂＡ～ＡｂＺと称され、そしてこれらの用語と、米国仮特許出願第６１／０５５，５４３号で用いる用語の相関を表２Ａに示す。本発明の結合性タンパク質の他の例示的態様、すなわちｓｃＦｖは、本明細書において、表２Ｂに詳述されるように、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、およびＬ２３～Ｌ２５と称される。

【００１５】

[0013]１つの態様において、本発明の結合性タンパク質は抗体である。さらなる態様において、抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多重特異性、非特異性、ヒト化、ヒト、一本鎖、キメラ、合成、組換え、ハイブリッド、突然変異、移植（grafted）、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生成、および／または多重特異性（例えば少なくとも２つの損なわれていない（ｉｎｔａｃｔ）抗体から形成される二重特異性抗体）である。

【００１６】

[0014]本発明の１つの態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、当該被験体に、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、当該被験体における免疫細胞活性を阻害するかまたは減少させるのに十分な量で投与して、それによって当該障害を治療するかまたは防止する工程を含み、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法である。

【００１７】

[0015]本発明の態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、例えば、抗体、ｓｃＦｖ、V_H、V_L、および／またはＣＤＲであってもよい。

[0016]本発明の別の態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、当該被験体に、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、当該被験体における免疫細胞活性を阻害するかまたは減少させるのに十分な量で投与して、それによって当該障害を治療するかまたは防止する工程を含み、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１

５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５、および２４７、からなる群より選択されるヌクレオチド配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法である。

【００１８】

[0017]本発明の１つの態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む。

【００１９】

[0018]本発明の別の態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、当該被験体に、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、当該被験体における免疫細胞活性を阻害するかまたは減少させるのに十分な量で投与して、それによって当該障害を治療するかまたは防止する工程を含み、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２～１９５、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含み、そしてここで当該結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号６、８、１０、１２、１６３、１６４、１６９、１７０、１９４、および１９５からなる群より選択される配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む場合は、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列をも含まなければならない、前記方法である。

【００２０】

[0019]本発明の別の態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、当該被験体に、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、当該被験体における免疫細胞活性を阻害するかまたは減少させるのに十分な量で投与して、それによって当該障害を治療するかまたは防止する工程を含み、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号５

、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５、および２４７、からなる群より選択されるヌクレオチド配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列を含み、そしてここで当該結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号５、７、９、および１１からなる群より選択される配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列を含む場合は、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５、および２４７、からなる群より選択されるヌクレオチド配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一であるヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１のアミノ酸配列をも含まなければならない、前記方法である。

【００２１】

[0020]本発明の１つの態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２～１９５、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含み、ここで当該結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号６、８、１０、１２、１６３、１６４、１６９、１７０、１９４、および１９５からなる群より選択される配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む場合は、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列をも含まなければならない。

【００２２】

[0021]本発明のさらなる態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、当該被験体に、ＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結

合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与する工程を含み、ここで当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は軽鎖および重鎖を含み、そしてここで当該重鎖は、配列番号１４、１６、１８、２０、６８、７０、７２、８８、９０、９２、９４、２１３、２１８、２１９、２４０、および２４２からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法である。１つの態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片はV_LドメインおよびV_Hドメインを含み、そして当該V_Hドメインは配列番号１４、１６、１８、および２０からなる群より選択される少なくとも１の配列を含む。

【００２３】

[0022]本発明の別の態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、当該被験体に、ＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与する工程を含み、ここで当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は軽鎖および重鎖を含み、そしてここで当該軽鎖は、配列番号２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、２１４～２１７、２２０～２２９、２４４、２４６、および２４８からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法である。１つの態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片はV_LドメインおよびV_Hドメインを含み、そして当該V_Lドメインは配列番号２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、２１５、２１７、２２１、２２３、２２５、２２７、および２２９からなる群より選択される少なくとも１の配列を含む。

【００２４】

[0023]本発明の方法の別の態様において、当該重鎖は配列番号８８、９０、９２、９４、２１３、２１８、２１９、２４０、および２４２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、そして当該軽鎖は配列番号９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、２１４、２１６、２２０、２２２、２２４、２２６、２２８、２４４、２４６、および２４８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２５】

[0024]本発明の１つの態様は、被験体において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害を治療するかまたは防止する方法であって、ＡｂＡ～ＡｂＷ、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、またはＬ２３～Ｌ２５からなる群より選択される結合性タンパク質によって認識されるヒトＩＬ－２１Ｒエピトープに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、ＡｂＡ～ＡｂＷ、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、およびＬ２３～Ｌ２５からなる群より選択される結合性タンパク質のヒトＩＬ－２１Ｒへの結合を競合的に阻害する前記結合性タンパク質または抗原結合性断片を、当該被験体における免疫細胞活性を阻害するかまたは減少させるのに十分な量で、当該被験体に投与して、それによって当該障害を治療するかまたは防止する工程を含む、前記方法である。別の態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖、軽鎖、またはF_v断片を含む。さらに別の態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、

５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、２３９、２４１、２４３、２４５、および２４７からなる群より選択されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖、軽鎖、またはＦ$_v$断片を含む。さらに別の態様において、当該結合性タンパク質は、ＡｂＯ、ＡｂＰ、ＡｂＱ、ＡｂＲ、ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＵ、ＡｂＶ、および／またはＡｂＷによって認識されるＩＬ－２１Ｒエピトープに特異的に結合し、そして当該結合性タンパク質は、ＡｂＯ、ＡｂＰ、ＡｂＱ、ＡｂＲ、ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＵ、ＡｂＶ、および／またはＡｂＷのヒトＩＬ－２１Ｒへの結合を競合的に阻害する。

【００２６】

[0025]本発明の方法の１つの態様において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害は、自己免疫障害、炎症性状態、アレルギー、移植片拒絶、および血液の過剰増殖障害からなる群より選択される。別の態様において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害は、免疫障害、血液の過剰増殖障害、移植片拒絶、移植片対宿主病、アレルギー（アトピー性アレルギーを含む）、糖尿病、関節炎障害（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎、強直性脊髄炎を含む）、脊椎関節症、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、皮膚エリテマトーデス、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎、湿疹性皮膚炎を含む）、乾癬、シェーグレン症候群、ＩＢＤ（クローン病、潰瘍性大腸炎を含む）、喘息（内因性喘息、アレルギー性喘息を含む）、強皮症および血管炎からなる群より選択される。さらなる態様において、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害は、多発性硬化症、全身エリテマトーデス、乾癬、移植片拒絶、関節リウマチ、および他の関節炎障害からなる群より選択される。

【００２７】

[0026]本発明の方法の１つの態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、ヒトＩＬ－２１Ｒに対して、少なくとも$10^5 M^{-1} s^{-1}$の結合定数を有する。別の態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、ＩＬ－２１により媒介されるＢａＦ３細胞の増殖を、約１．７５ｎＭまたはそれ未満のＩＣ$_{50}$で阻害し、ここで当該ＢａＦ３細胞はヒトＩＬ－２１受容体を含む。別の態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、ＩＬ－２１により媒介されるＴＦ１細胞の増殖を、約１４ｎＭまたはそれ未満のＩＣ$_{50}$で阻害し、ここで当該ＴＦ１細胞はヒトＩＬ－２１受容体を含む。さらに別の態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、ＩＬ－２１により媒介される初代ヒトＢ細胞の増殖を、約１．９ｎＭまたはそれ未満のＩＣ$_{50}$で阻害し、ここで当該Ｂ細胞はヒトＩＬ－２１Ｒを含む。さらに別の態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、ＩＬ－２１により媒介される初代ヒトＣＤ４$^+$細胞の増殖を、約１．５ｎＭまたはそれ未満のＩＣ$_{50}$で阻害し、ここで当該ＣＤ４$^+$細胞はヒトＩＬ－２１Ｒを含む。本発明のさらなる態様において、これらのパラメータに関する、ならびに他の薬物動態学的および薬力学的パラメータに関する、他の範囲および値が、本明細書に提供される。

【００２８】

[0027]１つの態様において、本発明は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体が療法的抗ＩＬ－２１Ｒ抗体であるかどうかを決定する方法であって：被験体由来の第一の血液試料をＩＬ－２１リガンドと接触させ；ＩＬ－２１リガンドと接触させた第一の血液試料における、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定し；被験体由来の第二の血液試料を、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の存在下で、ＩＬ－２１リガンドと接触させ；抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の存在下で、ＩＬ－２１リガンドと接触させた第二の血液試料における、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定し；そして上で決定した少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを比較する、ここで少なくとも１つのＩＬ－２１応

答性遺伝子の発現レベルが変化していれば、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体が療法的抗体であることの指標となる、前記方法を提供する。本発明の別の態様において、被験体は哺乳動物、例えばサルまたはヒトである。別の態様において、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子は、ＴＮＦ、ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１９、ＳＴＡＴ３、ＴＢＸ２１、ＣＳＦ１、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、およびＩＬ－２１Ｒからなる群より選択される。さらなる態様において、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子はＩＬ－２Ｒαである。

【００２９】

[0028]１つの態様において、本発明は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の薬力学的活性を決定する方法であって、被験体の血液試料における、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルにおける調節を検出する工程を含む、前記方法を提供する。さらなる態様において、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルにおける調節を検出する工程は：被験体に抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を投与し、ここで被験体は抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で治療され；抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で治療した被験体由来の血液試料を、ＩＬ－２１リガンドと接触させ；抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で治療し、そしてＩＬ－２１リガンドと接触させた、被験体由来の血液試料における、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定し；そして上で決定した少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを、ＩＬ－２１リガンドと接触させた異なる血液試料における、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルと比較する、ここで異なる血液試料は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で治療していない被験体由来である、工程を含む。本発明の別の態様において、被験体は哺乳動物、例えばサルまたはヒトである。別の態様において、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子は、ＴＮＦ、ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１９、ＳＴＡＴ３、ＴＢＸ２１、ＣＳＦ１、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、およびＩＬ－２１Ｒからなる群より選択される。さらなる態様において、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子は、ＣＤ１９、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、ＩＦＮγおよびＩＬ－６からなる群より選択される。別のさらなる態様において、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性遺伝子はＩＬ－２Ｒαである。

【００３０】

[0029]１つの態様において、本発明は、被験体において、急性期反応を減少させるか、阻害するか、または縮小させる方法であって、当該被験体に、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、当該被験体における急性期反応を減少させるか、阻害するか、または縮小させるのに十分な量で投与する工程を含み、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法を提供する。さらなる態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を局所的に投与する。

【００３１】

[0030]本発明の１つの態様は、被験体を免疫するのに用いるワクチン配合物の有効性を増加させる方法であって、当該被験体に、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片の療法的有効量を投与する工程を含み、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５

２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法である。いくつかの態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を免疫前、免疫中および／または免疫後に投与する。

【００３２】

[0031]本発明の別の態様は、試料中のＩＬ－２１Ｒの存在をｉｎ　ｖｉｔｒｏで検出するための方法であって、（ａ）試料を、ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片と接触させ、そして（ｂ）当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片および試料間の複合体の形成を検出する工程を含み、対照または参照試料またはレベルと比較して、試料中の複合体の形成に有意な相違があれば、試料中にＩＬ－２１Ｒが存在する指標となり、そして当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法を提供する。さらなる態様において、試料は血清、血漿、または組織である。

【００３３】

[0032]本発明のさらに別の態様は、ＩＬ－２１Ｒの存在をｉｎ　ｖｉｖｏで検出するための方法であって、（ａ）ヒトＩＬ－２１Ｒに特異的に結合する結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片がＩＬ－２１Ｒに結合するのを可能にする条件下で、被験体に投与し、そして（ｂ）当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片およびＩＬ－２１Ｒ間の複合体の形成を検出する工程を含み、対照または参照試料またはレベルと比較して、被験体中の複合体の形成に有意な相違があれば、ＩＬ－２１Ｒが存在する指標となり、そして当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、配列番号１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６５～１６８、１７１～１９３、２１３～２２９、２４０、２４２、２４４、２４６、および２４８、からなる群より選択されるアミノ酸配列（単数または複数）と少なくとも約９５％同一である少なくとも１のアミノ酸配列を含む、前記方法を提供する。いくつかの態様において、当該結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、結合または非結合抗体の検出を容易にするため、検出可能物質で、直接または間接的に標識する。さらなる態様において、検出可能物質は、酵素、補欠分子族（prosthetic group）、蛍光物質、発光物質、または放射性物質である。

【００３４】

[0033]いくつかの態様において、本発明は、サイトカイン阻害剤、増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞傷害剤、および細胞分裂阻害剤からなる群より選択される別の療法剤を被験体に投与する工程をさらに含む方法を提供する。さらなる態様において、療法剤は、ＴＮＦアンタゴニスト、ＩＬ－１２アンタゴニスト、ＩＬ－１５アンタゴニスト、ＩＬ－１７アンタゴニスト、ＩＬ－１８アンタゴニスト、ＩＬ－１９アンタゴニスト、ＩＬ－２０アンタゴニスト、ＩＬ－２１アンタゴニスト、ＩＬ－２３アンタゴニスト、Ｔ細胞枯渇剤、Ｂ細胞枯渇剤、メトトレキセート、レフルノミド、シロリムス（ラパマイシン）またはその類似体、ｃｏｘ２阻害剤、ｃＰＬＡ２阻害剤、ＮＳＡＩＤ、およびｐ３８阻害剤からなる群より選択される。本発明の他の方法におけるように、いくつかの態様において、被験体は哺乳動物、例えばヒトである。

【００３５】

[0034]本発明の別の態様は、抗産物抗体、例えば抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質に対する抗産物抗体およびその抗原結合性断片の産生レベルを測定し、決定し、および／または評価するための方法を提供する。

【００３６】

[0035]本開示のさらなる側面は、一部は、説明に示され、そして一部は、説明から明らかであろうし、または本発明を実施することによって学ぶことも可能である。本発明は、請求項において示され、そして特に指摘され、そして本開示は、請求項の範囲を限定すると見なされてはならない。以下の詳細な説明には、本発明の多様な態様の例示的な提示が含まれ、これは請求されるような本発明を制限するものではない。付随する図は、本明細書の一部を構成し、そして説明と併せて、態様を例示するためのみにはたらき、そして本発明を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【００３７】

【図１ａ】[0036]図１（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）（Promega Corporation, Madison, WI）により測定した。

【図１ｂ】図１（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）（Promega Corporation, Madison, WI）により測定した。

【図１ｃ】図１（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）（Promega Corporation, Madison, WI）により測定した。

【図２ａ】[0037]図２（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）により測定した。

【図２ｂ】図２（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）により測定した。

【図２ｃ】図２（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）により測定した。

【図３ａ】[0038]図３（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞

増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）により測定した。

【図３ｂ】図３（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）により測定した。

【図３ｃ】図３（ａ－ｃ）は、ｓｃＦｖによるマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、次に４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１とインキュベートした。４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）により測定した。

【図４ａ】[0039]図４（ａ－ｃ）は、マウスＩＬ－２１Ｒへの結合についての、親抗体１８Ａ５ＩｇＧとｓｃＦｖの競合を示している。ｓｃＦｖをビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆと混合し、混合物を、ＥＬＩＳＡプレート上に固定化した抗体１８Ａ５に加えた。ｍＩＬ－２１Ｒの捕捉は、ＨＲＰ－ストレプトアビジンで検出し、ｍＩＬ－２１Ｒへの結合についての競合はＡ４５０シグナルの減少により示されている。

【図４ｂ】図４（ａ－ｃ）は、マウスＩＬ－２１Ｒへの結合についての、親抗体１８Ａ５ＩｇＧとｓｃＦｖの競合を示している。ｓｃＦｖをビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆと混合し、混合物を、ＥＬＩＳＡプレート上に固定化した抗体１８Ａ５に加えた。ｍＩＬ－２１Ｒの捕捉は、ＨＲＰ－ストレプトアビジンで検出し、ｍＩＬ－２１Ｒへの結合についての競合はＡ４５０シグナルの減少により示されている。

【図４ｃ】図４（ａ－ｃ）は、マウスＩＬ－２１Ｒへの結合についての、親抗体１８Ａ５ＩｇＧとｓｃＦｖの競合を示している。ｓｃＦｖをビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆと混合し、混合物を、ＥＬＩＳＡプレート上に固定化した抗体１８Ａ５に加えた。ｍＩＬ－２１Ｒの捕捉は、ＨＲＰ－ストレプトアビジンで検出し、ｍＩＬ－２１Ｒへの結合についての競合はＡ４５０シグナルの減少により示されている。

【図５ａ】[0040]図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ａ－ｃ）に対して実施した。

【図５ｂ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ａ－ｃ）に対して実施した。

【図５ｃ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ａ－ｃ）、に対して実施した。

【図５ｄ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図５ｄ－ｆ）に対して実施した。

【図５ｅ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図５ｄ－ｆ）に対して実施した。

【図５ｆ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図５ｄ－ｆ）に対して実施した。

【図５ｇ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１を加えたマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ｇ－ｉ）に対して実施した。

【図５ｈ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１を加えたマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ｇ－ｉ）に対して実施した。

【図５ｉ】図５は、２１の重鎖／軽鎖対によるＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。図に示されている抗体を細胞に加えた。ＩＬ－２１を続けて加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１を加えたマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ｇ－ｉ）に対して実施した。

【図６ａ】[0041]図６は、ヒトＩＬ－２１Ｒ（図６ａ－ｃ）、ラットＩＬ－２１Ｒ（図６ｄ－ｆ）、カニクイザルＩＬ－２１Ｒ（図６ｇ－ｉ）及びヒトガンマ共通鎖（図６ｊ－ｌ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｂ】図６は、ヒトＩＬ－２１Ｒ（図６ａ－ｃ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｃ】図６は、ヒトＩＬ－２１Ｒ（図６ａ－ｃ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｄ】図６は、ラットＩＬ－２１Ｒ（図６ｄ－ｆ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｅ】図６は、ラットＩＬ－２１Ｒ（図６ｄ－ｆ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｆ】図６は、ラットＩＬ－２１Ｒ（図６ｄ－ｆ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｇ】図６は、カニクイザルＩＬ－２１Ｒ（図６ｇ－ｉ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｈ】図６は、カニクイザルＩＬ－２１Ｒ（図６ｇ－ｉ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｉ】図６は、カニクイザルＩＬ－２１Ｒ（図６ｇ－ｉ）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。

【図６ｊ】図６は、ヒトガンマ共通鎖（図６ｊ－１）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。
【図６ｋ】図６は、ヒトガンマ共通鎖（図６ｊ－１）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。
【図６ｌ】図６は、ヒトガンマ共通鎖（図６ｊ－１）を一過性に発現しているＣＨＯ細胞に対する２１の抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの結合を示している。ＣＨＯ細胞をＩＬ－２１Ｒ又は対照ガンマ共通鎖で一過性にトランスフェクトし、細胞に基づいたＥＬＩＳＡにおいて、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧで結合を検出した。
【図７ａ】[0042]図７（ａ－ｃ）は、特定の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（図７ａ、ＡｂＳ；図７ｂ、ＡｂＱ、ＡｂＴ、ＡｂＯ；図７ｃ、ＡｂＲ、ＡｂＰ、及びＡｂＵ）の結合特異性を示しており、表面プラズモン共鳴により測定した。抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は抗ヒトＩｇＧ上に捕捉され、マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－１３－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－２Ｒβ、又はヒト可溶性ＩＬ－４Ｒへの続いての結合は、BIACORE（商標）（GE Healthcare, Piscataway, NJ）装置で測定した。図７ｄは、ヒトＩＬ－２Ｒβ及びヒト可溶性ＩＬ－４Ｒが、それぞれ特異的抗ＩＬ－２Ｒβ及び抗ＩＬ－４Ｒ抗体により捕捉されることを示している（対照）。
【図７ｂ】図７（ａ－ｃ）は、特定の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（図７ａ、ＡｂＳ；図７ｂ、ＡｂＱ、ＡｂＴ、ＡｂＯ；図７ｃ、ＡｂＲ、ＡｂＰ、及びＡｂＵ）の結合特異性を示しており、表面プラズモン共鳴により測定した。抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は抗ヒトＩｇＧ上に捕捉され、マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－１３－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－２Ｒβ、又はヒト可溶性ＩＬ－４Ｒへの続いての結合は、BIACORE（商標）（GE Healthcare, Piscataway, NJ）装置で測定した。図７ｄは、ヒトＩＬ－２Ｒβ及びヒト可溶性ＩＬ－４Ｒが、それぞれ特異的抗ＩＬ－２Ｒβ及び抗ＩＬ－４Ｒ抗体により捕捉されることを示している（対照）。
【図７ｃ】図７（ａ－ｃ）は、特定の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（図７ａ、ＡｂＳ；図７ｂ、ＡｂＱ、ＡｂＴ、ＡｂＯ；図７ｃ、ＡｂＲ、ＡｂＰ、及びＡｂＵ）の結合特異性を示しており、表面プラズモン共鳴により測定した。抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は抗ヒトＩｇＧ上に捕捉され、マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－１３－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－２Ｒβ、又はヒト可溶性ＩＬ－４Ｒへの続いての結合は、BIACORE（商標）（GE Healthcare, Piscataway, NJ）装置で測定した。図７ｄは、ヒトＩＬ－２Ｒβ及びヒト可溶性ＩＬ－４Ｒが、それぞれ特異的抗ＩＬ－２Ｒβ及び抗ＩＬ－４Ｒ抗体により捕捉されることを示している（対照）。
【図７ｄ】図７（ａ－ｃ）は、特定の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（図７ａ、ＡｂＳ；図７ｂ、ＡｂＱ、ＡｂＴ、ＡｂＯ；図７ｃ、ＡｂＲ、ＡｂＰ、及びＡｂＵ）の結合特異性を示しており、表面プラズモン共鳴により測定した。抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は抗ヒトＩｇＧ上に捕捉され、マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－１３－Ｈ／Ｆ、ヒトＩＬ－２Ｒβ、又はヒト可溶性ＩＬ－４Ｒへの続いての結合は、BIACORE（商標）（GE Healthcare, Piscataway, NJ）装置で測定した。図７ｄは、ヒトＩＬ－２Ｒβ及びヒト可溶性ＩＬ－４Ｒが、それぞれ特異的抗ＩＬ－２Ｒβ及び抗ＩＬ－４Ｒ抗体により捕捉されることを示している（対照）。
【図８ａ】[0043]図８（ａ－ｄ）は、ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。示されたヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ａ～ｂ）及びマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ｃ－ｄ）の濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。
【図８ｂ】図８（ａ－ｄ）は、ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体

の結合を示している。示されたヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ａ～ｂ）及びマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ｃ－ｄ）の濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。

【図８ｃ】図８（ａ－ｄ）は、ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。示されたヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ａ～ｂ）及びマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ｃ－ｄ）の濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。

【図８ｄ】図８（ａ－ｄ）は、ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。示されたヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ａ～ｂ）及びマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（図８ｃ－ｄ）の濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。

【図９ａ】[0044]図９は、ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧの濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。図９ａは、ＡｂＳへのカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ結合を示している。

【図９ｂ】図９は、ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧの濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。図９ｂは、ＡｂＳへのヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ結合を示している。

【図９ｃ】図９は、ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧの濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。図９ｃは、ＡｂＴへのカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ結合を示している。

【図９ｄ】[0044]図９は、ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒに対する抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合を示している。ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、BIACORE（商標）チップに固定化された抗ヒトＩｇＧ上に捕捉された。ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧの濃度を変動させることでチップから流れ出させ、結合及び解離をモニターした。図９ｄは、ＡｂＴへのヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ結合を示している。

【図１０ａ】[0045]図１０は、ＩＬ－２１Ｒ抗体のエピトープ評価を示している。図１０ａ（Ｙ軸の左の説明も参照されたい）に示した実験において、マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ（Ｈｉｓ－Ｆｌａｇ融合タンパク質）はBIACORE（商標）チップ上に固定化された抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳにより捕捉された。追加の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（ＡｂＳ、ＡｂＴ、Ｄ５（Ｄ５－２０、中和抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体）及び７Ｃ２（非中和抗マウスＩＬ－２１Ｒ対照抗体））をチップ上に流し、捕捉されたＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへのそれらの結合をモニターした。

【図１０ｂ】図１０は、ＩＬ－２１Ｒ抗体のエピトープ評価を示している。図１０ｂに示した実験において、ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／ＦはBIACORE（商標）チップ上に固定化された抗ＩＬ－２１Ｒ抗体により捕捉された。追加の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（ＡｂＳ、ＡｂＴ、及び９Ｄ２（非中和抗ヒトＩＬ－２１Ｒ対照抗体））をチップ上に流し、捕捉されたＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへのそれらの結合をモニターした。

【図１１ａ】[0046]図１１は、示された抗体による、ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞及

びマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞の増殖の中和を示している。抗体を細胞に加えた。続いてＩＬ－２１を加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図１１ａ）について実施した。

【図１１ｂ】図１１は、示された抗体による、ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞及びマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞の増殖の中和を示している。抗体を細胞に加えた。続いてＩＬ－２１を加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、２００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１を加えたマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図１１ｂ）について実施した。

【図１１ｃ】図１１は、示された抗体による、ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞及びマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞の増殖の中和を示している。抗体を細胞に加えた。続いてＩＬ－２１を加え、４８時間後、増殖をCELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図１１ｃ）について実施した。

【図１２ａ】[0047]図１２は、ヒト初代Ｂ細胞のＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。示された抗体を、抗ＣＤ４０抗体及びヒトＩＬ－２１とともにヒト初代Ｂ細胞に加えた。^{3}Ｈチミジンの取り込みを３日後に測定した。図１２ａは、ＡｂＱ、ＡｂＲ、ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＵ、ＩＬ－１３三重変異体及び１８Ａ５親抗体間の比較を示している。

【図１２ｂ】図１２は、ヒト初代Ｂ細胞のＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。示された抗体を、抗ＣＤ４０抗体及びヒトＩＬ－２１とともにヒト初代Ｂ細胞に加えた。^{3}Ｈチミジンの取り込みを３日後に測定した。図１２ｂは、ＡｂＴ、ＡｂＶ、ＡｂＷ、ＡｂＵ及びヒトＩｇＧ１対照（ｈＩｇ１）間の比較を示している。

【図１３】[0048]図１３は、ヒト初代ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。示された抗体をヒトＩＬ－２１とともに、活性化ヒト初代ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞へ加え、^{3}Ｈチミジンの取り込みを３日後に測定した。

【図１４】[0049]図１４は、マウス初代ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のＩＬ－２１依存性増殖の中和を示している。示された抗体をヒトＩＬ－２１とともに、活性化初代マウスＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に加え、^{3}Ｈチミジンの取り込みを３日後に測定した。

【図１５】[0050]図１５は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体により誘発された抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）の測定を示している。示された抗ＩＬ－２１Ｒ抗体でコートされたＣＦＳＥ標識ＢＪＡＢ細胞のＰＢＭＣ依存性死滅は、ヨウ化プロピジウムの取り込みにより測定した。抗ＣＤ２０抗体リツキシマブ（RITUXAN(登録商標), Genentech, Inc., South San Francisco, CA)を陽性対照として含ませ、抗ＩＬ－１３抗体を陰性対照として含ませた。

【図１６】[0051]図１６は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による相補的Ｃｌｑ結合を示している。示された抗ＩＬ－２１Ｒ抗体をＥＬＩＳＡプレートに固定化し、ヒト血清とのインキュベーション後、Ｃｌｑ結合をニワトリ抗ヒトＣｌｑ及びＨＲＰコンジュゲート抗ニワトリＩｇＹ抗体で測定した。抗ＣＤ２０抗体リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））を陽性対照として含ませ、抗ＩＬ－１３抗体を陰性対照として含ませた。

【図１７ａ】[0052]図１７（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＱのアミノ酸配列を示している。

【図１７ｂ】図１７（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＱのアミノ酸配列を示している。

【図１７ｃ】図１７（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＱのアミノ酸配列を示している。

【図１８ａ】[0053]図１８（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＲのアミノ酸配列を示している。

【図１８ｂ】図１８（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＲのアミノ酸配列を示している。

【図１８ｃ】図１８（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＲのアミノ酸配列を示している。

【図１９ａ】[0054]図１９（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＷのアミノ酸配列を示している。
【図１９ｂ】図１９（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＷのアミノ酸配列を示している。
【図１９ｃ】図１９（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＷのアミノ酸配列を示している。
【図２０ａ】[0055]図２０（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＳのアミノ酸配列を示している。
【図２０ｂ】図２０（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＳのアミノ酸配列を示している。
【図２０ｃ】図２０（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＳのアミノ酸配列を示している。
【図２１ａ】[0056]図２１（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＴのアミノ酸配列を示している。
【図２１ｂ】図２１（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＴのアミノ酸配列を示している。
【図２１ｃ】図２１（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＴのアミノ酸配列を示している。
【図２２ａ】[0057]図２２（ａ－ｃ）はV_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＯのアミノ酸配列を示している。
【図２２ｂ】図２２（ａ－ｃ）はV_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＯのアミノ酸配列を示している。
【図２２ｃ】図２２（ａ－ｃ）はV_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＯのアミノ酸配列を示している。
【図２３ａ】[0058]図２３（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＰのアミノ酸配列を示している。
【図２３ｂ】図２３（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＰのアミノ酸配列を示している。
【図２３ｃ】図２３（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＰのアミノ酸配列を示している。
【図２４ａ】[0059]図２４（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈｌ、Ｈ２、Ｈ３、Ｌｌ、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＵのアミノ酸配列を示している。
【図２４ｂ】図２４（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈｌ、Ｈ２、Ｈ３、Ｌｌ、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＵのアミノ酸配列を示している。
【図２４ｃ】図２４（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈｌ、Ｈ２、Ｈ３、Ｌｌ、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＵのアミノ酸配列を示している。
【図２５ａ】[0060]図２５（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＶのアミノ酸配列を示している。
【図２５ｂ】図２５（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＶのアミノ酸配列を示している。
【図２５ｃ】図２５（ａ－ｃ）は、V_H及びV_Lドメイン、ＣＤＲ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３）及び定常領域を含むＡｂＶのアミノ酸配列を示している。
【図２６ａ】[0061]図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している。
【図２６ｂ】図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している。
【図２６ｃ】図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している

。
【図２６ｄ】図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している。
【図２６ｅ】図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している。
【図２６ｆ】図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している。
【図２６ｇ】図２６（ａ－ｇ）は、図５、１１、１２、１３及び１４（上記）に示した結果を得るために実施された研究と同様に実施された、追加の研究からの結果を示している。
【図２７ａ】[0062]図２７ａは、マウスＩＬ－２１Ｒへの結合についての抗体ＡｂＴとＩＬ－２１サイトカインの競合を示している。ビヒクル又は量を増加させたＩＬ－２１を、ビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧと混合し、混合物をＥＬＩＳＡプレートに固定化されたＡｂＴに加えた。ｍＩＬ－２１Ｒの捕捉をＨＲＰ－ストレプトアビジンで検出し、ｍＩＬ－２１Ｒへの結合についての競合は、Ａ４５０シグナルの減少により示されている。
【図２７ｂ】図２７ｂは、マウスＩＬ－２１Ｒへの結合についてのＡｂＳ及びＩＬ－２１の競合を示している。ＡｂＳ及びｍＩＬ－２１を混合し、ＥＬＩＳＡプレートに固定化されたｍＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃに加え、ＡｂＳ（黒菱形）、アイソタイプ対照抗体（白三角）又はｍＩＬ－２１（四角）の結合を モニターした。
【図２８】[0063]図２８は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ、ＡｂＵ、ＡｂＶ又はＡｂＷ又はアイソタイプ対照抗体、ｈＩｇＧ１－ＴＭ存在下での、ラットＣＤ３　Ｔ細胞内へのＩＬ－２１依存性 ^{3} Ｈチミジン取り込みを示している。
【図２９ａ】[0064]図２９は、ウサギＩＬ－２１含有１０％条件培地の不存在（図２９ａ）又は存在（図２９ｂ）下での、固定化された抗マウスＩｇＧ抗体により示されるウサギＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃの二つのアイソフォームのいずれかへのＡｂＳの結合を示している。
【図２９ｂ】図２９は、ウサギＩＬ－２１含有１０％条件培地の不存在（図２９ａ）又は存在（図２９ｂ）下での、固定化された抗マウスＩｇＧ抗体により示されるウサギＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃの二つのアイソフォームのいずれかへのＡｂＳの結合を示している。
【図３０ａ】[0065]図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ａは、ＮＰ特異的ＩｇＧ応答を示している。
【図３０ｂ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｂは、ＮＰ特異的ＩｇＭ応答を示している。
【図３０ｃ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｃ－ｆは、図３０ａに示されている実験の繰り返しにおける、ＮＰ特異的ＩｇＧサブクラス応答を示しており、ＥＬＩＳＡデータが個々の動物について示されている：総ＩｇＧ（図３０ｃ）、ＩｇＧ１（図３０ｄ）、ＩｇＧ２ａ（図３０ｅ）及びＩｇＧ２ｃ（図３０ｆ）。
【図３０ｄ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｃ－ｆは、図３０ａに示されている実験の繰り返しにおける、ＮＰ特異的ＩｇＧサブクラス応答を示しており、ＥＬＩＳＡデータが個々の動物について示されている：総ＩｇＧ（図３０ｃ）、ＩｇＧ１（図３０ｄ）、ＩｇＧ２ａ（図３０ｅ）及びＩｇＧ２ｃ（図３０ｆ）。
【図３０ｅ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｃ－ｆは、図３０ａに示されている実験の繰り返しにおける、ＮＰ特異的ＩｇＧサブクラス応答を示しており、ＥＬＩＳＡデータが個々の動物について示されている：総ＩｇＧ（図３０ｃ）、ＩｇＧ１（図３０ｄ）、ＩｇＧ２ａ（図３０

ｅ）及びＩｇＧ２ｃ（図３０ｆ）。
【図３０ｆ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｃ－ｆは、図３０ａに示されている実験の繰り返しにおける、ＮＰ特異的ＩｇＧサブクラス応答を示しており、ＥＬＩＳＡデータが個々の動物について示されている：総ＩｇＧ（図３０ｃ）、ＩｇＧ１（図３０ｄ）、ＩｇＧ２ａ（図３０ｅ）及びＩｇＧ２ｃ（図３０ｆ）。
【図３０ｇ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｇは、２カ月間にわたるＮＰ特異的ＩｇＧ応答を示している。
【図３０ｈ】図３０は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理された動物における、ＮＰ特異的一次抗体応答を示している。図３０ｈは、二ヶ月の研究期間の終わりに骨髄において発見されたＮＰ特異的ＩｇＧ抗体分泌細胞（ＡＳＣ）を示している。
【図３１ａ】[0066]図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ａは、処理後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ａ及び３１ｃ－ｇにおいて、アステリスクは、生理食塩水及びＩＬ－１３対照両方と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。
【図３１ｂ】図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ｂは、プレブリード（prebleed）抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ｂにおいて、アステリスクは、他の３群と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。図３１ｂ－ｇ中の点線は、検出のレベルを示している。
【図３１ｃ】図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ｃは、投与２週間後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ａ及び３１ｃ－ｇにおいて、アステリスクは、生理食塩水及びＩＬ－１３対照両方と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。図３１ｂ－ｇ中の点線は、検出のレベルを示している。
【図３１ｄ】図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ｄは、投与４週間後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ａ及び３１ｃ－ｇにおいて、アステリスクは、生理食塩水及びＩＬ－１３対照両方と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。図３１ｂ－ｇ中の点線は、検出のレベルを示している。

【図３１ｅ】図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ｅは、投与６週間後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ａ及び３１ｃ－ｇにおいて、アステリスクは、生理食塩水及びＩＬ－１３対照両方と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。図３１ｂ－ｇ中の点線は、検出のレベルを示している。

【図３１ｆ】図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ｆは、投与８週間後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ａ及び３１ｃ－ｇにおいて、アステリスクは、生理食塩水及びＩＬ－１３対照両方と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。図３１ｂ－ｇ中の点線は、検出のレベルを示している。

【図３１ｇ】図３１は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）抗体を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理し（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１（ＩＬ－１３ＴＭ）に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。隔週で血清を採取し、抗ｄｓＤＮＡの存在についてＥＬＩＳＡで試験した。図３１ｇは、投与１０週間後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３１ａ及び３１ｃ－ｇにおいて、アステリスクは、生理食塩水及びＩＬ－１３対照両方と比較した時の有意差を示している（ｐ＜０．０１）。図３１ｂ－ｇ中の点線は、検出のレベルを示している。

【図３２ａ】[0067]図３２は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理したＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓のＩｇＧ沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、腎臓におけるＩｇＧ沈着を免疫細胞化学により同定した（図３２ｂ；糸球体は、点線の円により示されている；ＩｇＧ沈着の例は、矢印により示されている）。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した（図３２ａ）。

【図３２ｂ】図３２は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理したＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓のＩｇＧ沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.,３Ｘ／週）；マウスＩＬ－２１に対して反応性のない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７三重変異体抗体を、アイソタイプ対照として使用した。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、腎臓におけるＩｇＧ沈着を免疫細胞化学により同定した（図３２ｂ；糸球体は、点線の円により示されている；ＩｇＧ沈着の例は、矢印により示されている）。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した（図３２ａ）。

【図３３ａ】[0068]図３３は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるＩｇＭ及び補体Ｃ３沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,i.ｐ.，３Ｘ／週）。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、腎臓におけるＩｇ

Ｍ（図３３ａ）及び補体Ｃ３（図３３ｂ）沈着物を、免疫細胞化学により同定した。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。

【図３３ｂ】図３３は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるＩｇＭ及び補体Ｃ３沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、腎臓におけるＩｇＭ（図３３ａ）及び補体Ｃ３（図３３ｂ）沈着物を、免疫細胞化学により同定した。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。

【図３４ａ】[0069]図３４は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの脳内でのＩｇＧ、ＩｇＭ及び補体Ｃ３沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、脳中のＩｇＧ（図３４ａ）、ＩｇＭ（図３４ｂ）及び補体Ｃ３（図３４ｃ）沈着を、免疫細胞化学により同定した。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。

【図３４ｂ】図３４は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの脳内でのＩｇＧ、ＩｇＭ及び補体Ｃ３沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、脳中のＩｇＧ（図３４ａ）、ＩｇＭ（図３４ｂ）及び補体Ｃ３（図３４ｃ）沈着を、免疫細胞化学により同定した。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。

【図３４ｃ】図３４は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの脳内でのＩｇＧ、ＩｇＭ及び補体Ｃ３沈着を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、脳中のＩｇＧ（図３４ａ）、ＩｇＭ（図３４ｂ）及び補体Ｃ３（図３４ｃ）沈着を、免疫細胞化学により同定した。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。

【図３５ａ】[0070]図３５は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるリンパ球性浸潤を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、ヘマトキシリン／エオシン（Ｈ／Ｅ）染色腎臓切片は、皮質間質（糸球体の支持構造）（図３５ａ）、皮質血管周囲（図３５ｂ）及び骨盤周囲（尿管の起点付近）（図３５ｃ）の３ゾーンにおけるリンパ球浸潤について検査した。リンパ球数は１－５のスケールでスコア化した。

【図３５ｂ】図３５は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるリンパ球性浸潤を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、ヘマトキシリン／エオシン（Ｈ／Ｅ）染色腎臓切片は、皮質間質（糸球体の支持構造）（図３５ａ）、皮質血管周囲（図３５ｂ）及び骨盤周囲（尿管の起点付近）（図３５ｃ）の３ゾーンにおけるリンパ球浸潤について検査した。リンパ球数は１－５のスケールでスコア化した。

【図３５ｃ】図３５は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるリンパ球性浸潤を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、ヘマトキシリン／エオシン（Ｈ／Ｅ）染色腎臓切片は、皮質間質（糸球体の支持構造）（図３５ａ）、皮質血管周囲（図３５ｂ）及び骨盤周囲（尿管の起点付近）（図３５ｃ）の３ゾーンにおけるリンパ球浸潤について検査した。リンパ球数は１－５のスケールでスコア化した。

【図３６】[0071]図３６は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの肺におけるリンパ球性浸潤を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ

.ｐ., ３Ｘ／週）。処理の１０週間後、マウスを屠殺し、Ｈ／Ｅ染色肺切片をリンパ球浸潤について検査した。リンパ球数は１－５のスケールでスコア化した。

【図３７ａ】[0072]図３７ａ－ｂは、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおけるマウス抗ヒト抗体（ＭＡＨＡ）応答を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）。隔週で採取した血清を、同一のヒト抗体へ結合できるマウス抗体（それでマウスが処理される）の存在について（図３７ａ）又は他の抗ＩＬ－２１ヒト抗体に結合できるマウス抗体の存在について（図３７ｂ）ＥＬＩＳＡで試験する。図３７ａ中のアステリスクは、抗ＩＬ－１３処理群と比較した場合の有意差を示している（ｐ＜０．０５）。

【図３７ｂ】図３７ａ－ｂは、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおけるマウス抗ヒト抗体（ＭＡＨＡ）応答を示している。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを、示された三重変異体抗体で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ,ｉ.ｐ., ３Ｘ／週）。隔週で採取した血清を、同一のヒト抗体へ結合できるマウス抗体（それでマウスが処理される）の存在について（図３７ａ）又は他の抗ＩＬ－２１ヒト抗体に結合できるマウス抗体の存在について（図３７ｂ）ＥＬＩＳＡで試験する。図３７ａ中のアステリスクは、抗ＩＬ－１３処理群と比較した場合の有意差を示している（ｐ＜０．０５）。

【図３８ａ】[0073]図３８は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗ｄｓＤＮＡ抗体の発生を示している。図３８ａは、ＡｂＳで処理されたマウスの抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。

【図３８ｂ】図３８は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗ｄｓＤＮＡ抗体の発生を示している。図３８ｂは、ＡｂＴで処理されたマウスの抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している。図３８ｃ－ｄは、ＡｂＳ及びＡｂＴで処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける、腎臓の病理及び腎臓炎症巣を示している。

【図３８ｃ】図３８は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗ｄｓＤＮＡ抗体の発生を示している。図３８ｃ－ｄは、ＡｂＳ及びＡｂＴで処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける、腎臓の病理及び腎臓炎症巣を示している。

【図３８ｄ】図３８は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗ｄｓＤＮＡ抗体の発生を示している。図３８ｃ－ｄは、ＡｂＳ及びＡｂＴで処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける、腎臓の病理及び腎臓炎症巣を示している。

【図３９ａ】[0074]図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ａ－ｅ：３ｍｌの空気をＢＡＬＢ／Ｃマウスの背面皮膚下に注入３日後、空気嚢を作るため、嚢を再膨張させた。２日後、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体を腹腔内に注入した。抗体注入２４時間後、１００ｎｇのマウスＩＬ－２１を空気嚢中に注入した。６時間後、嚢を３ｍｌのＰＢＳで洗い流し、全細胞数（図３９ａ）、単球（図３９ｂ）、リンパ球（図３９ｃ）及び 好中球（図３９ｄ）を決定した。図３９ｅは、図３９ａ－ｄに示されている実験の繰り返しにおける全細胞数を示している。

【図３９ｂ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ａ－ｅ：３ｍｌの空気をＢＡＬＢ／Ｃマウスの背面皮膚下に注入３日後、空気嚢を作るため、嚢を再膨張させた。２日後、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体を腹腔内に注入した。抗体注入２４時間後、１００ｎｇのマウスＩＬ－２１を空気嚢中に注入した。６時間後、嚢を３ｍｌのＰＢＳで洗い流し、全細胞数（図３９ａ）、単球（図３９ｂ）、リンパ球（図３９ｃ）及び 好中球（図３９ｄ）を決定した。図３９ｅは、図３９ａ－ｄに示されている実験の繰り返しにおける全細胞数を示している。

【図３９ｃ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ａ－ｅ：３ｍｌの空気をＢＡＬＢ／Ｃマウスの背面皮膚下に注入３日後、空気嚢を作るため、嚢を再膨張させた。２日後、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体を腹腔内に注入した。抗体注入２４時間後、１００ｎｇ

のマウスＩＬ－２１を空気嚢中に注入した。６時間後、嚢を３ｍｌのＰＢＳで洗い流し、全細胞数（図３９ａ）、単球（図３９ｂ）、リンパ球（図３９ｃ）及び 好中球（図３９ｄ）を決定した。図３９ｅは、図３９ａ－ｄに示されている実験の繰り返しにおける全細胞数を示している。

【図３９ｄ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ａ－ｅ：３ｍｌの空気をＢＡＬＢ／Ｃマウスの背面皮膚下に注入３日後、空気嚢を作るため、嚢を再膨張させた。２日後、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体を腹腔内に注入した。抗体注入２４時間後、１００ｎｇのマウスＩＬ－２１を空気嚢中に注入した。６時間後、嚢を３ｍｌのＰＢＳで洗い流し、全細胞数（図３９ａ）、単球（図３９ｂ）、リンパ球（図３９ｃ）及び 好中球（図３９ｄ）を決定した。図３９ｅは、図３９ａ－ｄに示されている実験の繰り返しにおける全細胞数を示している。

【図３９ｅ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ａ－ｅ：３ｍｌの空気をＢＡＬＢ／Ｃマウスの背面皮膚下に注入３日後、空気嚢を作るため、嚢を再膨張させた。２日後、生理食塩水（対照）あるいは示された三重変異体抗体を腹腔内に注入した。抗体注入２４時間後、１００ｎｇのマウスＩＬ－２１を空気嚢中に注入した。６時間後、嚢を３ｍｌのＰＢＳで洗い流し、全細胞数（図３９ａ）、単球（図３９ｂ）、リンパ球（図３９ｃ）及び 好中球（図３９ｄ）を決定した。図３９ｅは、図３９ａ－ｄに示されている実験の繰り返しにおける全細胞数を示している。

【図３９ｆ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ｆ－ｊは、マウスＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による処理後のラットにおける空気嚢内の全細胞浸潤を示している。図３９ｆは、ＡｂＳ又は対照抗体の存在下又は不存在下、２０μｇのｍＩＬ－２１で６時間あるいは１μｇのｍＩＬ－２１投与２０時間後の細胞浸潤を示している。

【図３９ｇ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ｆ－ｊは、マウスＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による処理後のラットにおける空気嚢内の全細胞浸潤を示している。図３９ｇ－ｈは、１、３又は１０μｇ／ｋｇのＡｂＳ又は対照抗体の存在下、２０μｇのｍＩＬ－２１が６時間投与された繰り返し実験における、ラット空気嚢内への細胞浸潤を示している。

【図３９ｈ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ｆ－ｊは、マウスＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による処理後のラットにおける空気嚢内の全細胞浸潤を示している。図３９ｇ－ｈは、１、３又は１０μｇ／ｋｇのＡｂＳ又は対照抗体の存在下、２０μｇのｍＩＬ－２１が６時間投与された繰り返し実験における、ラット空気嚢内への細胞浸潤を示している。

【図３９ｉ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ｆ－ｊは、マウスＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による処理後のラットにおける空気嚢内の全細胞浸潤を示している。図３９ｉに示した実験において、ラットは、２０μｇのｍＩＬ－２１及び１ｍｇ／ｋｇ抗体（ＡｂＳ又はアイソタイプ対照のいずれか）、単独で又は組み合わせて、ならびに、２０μｇのｍＩＬ－２１及び１０ｍｇ／ｋｇ抗体の組み合わせで６時間処理した。

【図３９ｊ】図３９は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体で処理されたマウス又はラットの背側空気嚢中の細胞浸潤を示している。図３９ｆ－ｊは、マウスＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による処理後のラットにおける空気嚢内の全細胞浸潤を示している。図３９ｊにおいては、１０、２０又は４０μｇのｍＩＬ－２１を、１あるいは１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳと組み合わせて試験した。

【図４０】[0075]図４０は、単回静脈内又は皮下投与後のＣＤ－１マウスにおけるＡｂＳの濃度－時間プロファイルを示している。定量限界以下の濃度は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各データポイントについてＮ＝４－８。

【図４１】[0076]図４１は、単回腹腔内投与後の、ＤＢＡ及びＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウ

スにおけるＡｂＳ濃度－時間プロファイルを示している。定量限界以下の濃度は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各データポイントについてＮ＝４－８。

【図４２ａ】[0077]図４２ａ及びｂは、１０、５及び２．５ｍｇ／ｋｇ用量、３Ｘ／週で１０週間、複数回腹腔内投与後、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおいて観察された及び推定されたＡｂＳ濃度を示している。定量限界以下の濃度は、平均値及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。時点当たりＮ＝７－８。

【図４２ｂ】図４２ａ及びｂは、１０、５及び２．５ｍｇ／ｋｇ用量、３Ｘ／週で１０週間、複数回腹腔内投与後、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおいて観察された及び推定されたＡｂＳ濃度を示している。定量限界以下の濃度は、平均値及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。時点当たりＮ＝７－８。

【図４３ａ】[0078]図４３ａ及びｂは、示された投与後の、カニクイザルにおけるＡｂＳの濃度－時間プロファイルを示している。定量限界以下の濃度（＜３０ｎｇ／ｍｌ）は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各群についてＮ＝３。図４３ａのＳＡＮは研究動物番号である。

【図４３ｂ】図４３ａ及びｂは、示された投与後の、カニクイザルにおけるＡｂＳの濃度－時間プロファイルを示している。定量限界以下の濃度（＜３０ｎｇ／ｍｌ）は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各群についてＮ＝３。図４３ａのＳＡＮは研究動物番号である。

【図４４ａ】[0079]図４４は、マウスへ単回投与後の、ＡｂＳ及びＡｂＴの濃度－時間プロファイルを示している。図４４ａは、ＣＤ－１マウスにおける、１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後のプロフィールを示している。定量限界以下の濃度は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各データポイントについてＮ＝４－８。

【図４４ｂ】図４４は、マウスへ単回投与後の、ＡｂＳ及びＡｂＴの濃度－時間プロファイルを示している。図４４ｂは、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける、１０ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後のプロフィールを示している。定量限界以下の濃度は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各データポイントについてＮ＝４－８。

【図４４ｃ】図４４は、マウスへ単回投与後の、ＡｂＳ及びＡｂＴの濃度－時間プロファイルを示している。図４４ｃは、ＤＢＡマウスにおける、８ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後のプロフィールを示している。定量限界以下の濃度は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各データポイントについてＮ＝４－８。

【図４５】[0080]図４５は、２０ｍｇ／ｋｇ用量、３Ｘ／週、で１０週間の複数回腹腔内投与後の、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおいて観察された及び推定されたＡｂＴ濃度を示している。定量限界以下の濃度は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。時点当たりＮ＝６－８。

【図４６ａ】[0081]図４６ａ及びｂは、示された投与後の、カニクイザルにおけるＡｂＴ及びＡｂＳの濃度－時間プロファイルを示している。定量限界以下の濃度（＜３０ｎｇ／ｍｌ）は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各群についてＮ＝３。

【図４６ｂ】図４６ａ及びｂは、示された投与後の、カニクイザルにおけるＡｂＴ及びＡｂＳの濃度－時間プロファイルを示している。定量限界以下の濃度（＜３０ｎｇ／ｍｌ）は、平均値及び標準偏差の計算にはゼロとして処理した。各群についてＮ＝３。

【図４７】[0082]図４７は、オスＤＢＡマウスにおける、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ、ＡｂＴ及び^{125}Ｉ－Ｄ５（８ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）の濃度－時間プロファイルを示している。ヒト抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、抗ヒトＩｇＧ　ＥＬＩＳＡにより定量し、^{125}Ｉ標識化マウス抗体Ｄ５は、放射標識をモニタリングすることにより定量した。

【図４８ａ】[0083]図４８ａは、単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、スプラーグドーリー（Ｓ－Ｄ）ラットにおけるＡｂＳ、ＡｂＴ及びアイソタイプ対照の平均血清濃度（Ｙ軸；ｎｇ／ｍｌ）を示している。

【図４８ｂ】図４８ｂは、Ｓ－Ｄラットに単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ－ＡｂＷを示している。＜ＬＯＱ（４５ｎｇ／ｍＬ）の個々のデータポイントは、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。もし平均値が、ＬＯＱ以下であれ

ば（例えば、すべての動物が＜ＬＯＱの値を有する場合）データポイントは示されていない。

【図４９】[0084]図４９は、単回静脈内、腹腔内又は皮下投与後の、Ｓ－Ｄラットにおけるａｂｓの平均血清濃度（Ｙ軸；ｎｇ／ｍｌ）を示している。

【図５０ａ】[0085]図５０は、単回２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、ＩＬ－２１Ｒノックアウト及び野生型Ｃ５７ＢＬ／６（対照）マウスにおける、^{125}Ｉ－ＡｂＳの体内分布を示している。図５０ａは、対照Ｃ５７ＢＬ／６マウスの組織における^{125}Ｉ－ＡｂＳの濃度を示している。ＬＯＱ以下の濃度は、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。各血清又は組織データポイントについてＮ＝９－１０；各尿データポイントについてＮ＝５－１０。

【図５０ｂ】図５０は、単回２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、ＩＬ－２１Ｒノックアウト及び野生型Ｃ５７ＢＬ／６（対照）マウスにおける、^{125}Ｉ－ＡｂＳの体内分布を示している。図５０ｂは、ＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの濃度を示している。ＬＯＱ以下の濃度は、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。各血清又は組織データポイントについてＮ＝９－１０；各尿データポイントについてＮ＝５－１０。

【図５０ｃ】図５０は、単回２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、ＩＬ－２１Ｒノックアウト及び野生型Ｃ５７ＢＬ／６（対照）マウスにおける、^{125}Ｉ－ＡｂＳの体内分布を示している。図５０ｃは、対照Ｃ５７ＢＬ／６及びＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの血清濃度を示している。ＬＯＱ以下の濃度は、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。各血清又は組織データポイントについてＮ＝９－１０；各尿データポイントについてＮ＝５－１０。

【図５０ｄ】図５０は、単回２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、ＩＬ－２１Ｒノックアウト及び野生型Ｃ５７ＢＬ／６（対照）マウスにおける、^{125}Ｉ－ＡｂＳの体内分布を示している。図５０ｄは、対照Ｃ５７ＢＬ／６及びＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの累積尿カウント数を示している。ＬＯＱ以下の濃度は、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。各血清又は組織データポイントについてＮ＝９－１０；各尿データポイントについてＮ＝５－１０。

【図５１ａ】[0086]図５１は、単回２．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後の、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの体内分布を示している。図５１ａは、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの組織における^{125}Ｉ－ＡｂＳの濃度を示している。

【図５１ｂ】図５１は、単回２．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後の、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの体内分布を示している。図５１ｂは、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの尿カウント数を示している。

【図５２】[0087]図５２は、単回２．５及び１０ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後の、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの血清濃度を示している。ＬＯＱ以下の濃度は、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。各データポイントについてＮ＝４－８。

【図５３ａ】[0088]図５３ａは、倍数変化から計算された、ヒト全血試料において、増加するＡｂＳの濃度（Ｘ軸）によるＩＬ－２１誘発ＩＬ－２Ｒα（ＩＬ２ＲＡ）、ＰＲＦ１、ＩＬ－６及びＣＤ１９発現のパーセント阻害（Ｙ軸）を示している。

【図５３ｂ】図５３ｂは、ヒト全血試料において、増加するＡｂＳ濃度（Ｘ軸；Ａｂ濃度（ｎＭ））に応答したＩＬ－６のＩＬ－２１誘発相対的発現レベル（ＲＱ；Ｙ軸）の阻害を示している。

【図５４】[0089]図５４は、アッセイのための特別注文ＴＬＤＡ（TaqMan（登録商標）低密度アレイ）に含まれている遺伝子を示している；内在性（Ｅｎｄｏ）対照が示されている。

【図５５】[0090] 図５５は、２、４、６あるいは２４時間時点（Ｘ軸）で、ＩＬ－２１の異なった濃度での６つの試験された遺伝子（ＣＤ１９、ＧＺＭＢ、ＩＦＮγ（ＩＦＮＧ）、ＩＬ－２Ｒα（ＩＬ２ＲＡ）、ＩＬ－６及びＰＲＦ１）の遺伝子発現の相対的定量化

（ＲＱ；Ｙ軸）を示している。
【図５６ａ】[0091]図５６ａは、ＩＬ－２１及び異なった濃度のＡｂＳあるいはＩｇＧ１　ＴＭ対照（Ｘ軸）とインキュベーション後の、６つの試験された遺伝子（ＣＤ１９、ＧＺＭＢ、ＩＦＮγ、ＩＬ－２Ｒα、ＩＬ－６、及びＰＲＦ１）の遺伝子発現相対的定量化（ＲＱ；Ｙ軸）を示している。
【図５６ｂ】図５６ｂ－ｃは、異なった濃度のＡｂＳ又は対照ＩｇＧ１　ＴＭ（Ｘ軸）で処理後の、同一遺伝子のＩＬ－２１応答のパーセント阻害（Ｙ軸）を示している。
【図５６ｃ】図５６ｂ－ｃは、異なった濃度のＡｂＳ又は対照ＩｇＧ１　ＴＭ（Ｘ軸）で処理後の、同一遺伝子のＩＬ－２１応答のパーセント阻害（Ｙ軸）を示している。
【図５７ａ】[0092]図５７は、組み換えヒトＩＬ－２１によるエキソビボ刺激後の、メスカニクイザルの全血におけるＩＬ－２Ｒα遺伝子発現についての相対的定量化（ＲＱ）値の分布を示している。図５７ａは、ＲＱ値（Ｘ軸）についてのヒストグラム解析（Ｙ軸）を示している。実線はガウス分布を示している。点線は、式：ｌｏｇ｛ＲＱカットオフ｝＝対数変換されたＲＱ値の平均－対数変換されたＲＱ値のＳＤ、を使用して定義された、インビボ研究への登録のためのカットオフＲＱを示している。
【図５７ｂ】図５７は、組み換えヒトＩＬ－２１によるエキソビボ刺激後の、メスカニクイザルの全血におけるＩＬ－２Ｒα遺伝子発現についての相対的定量化（ＲＱ）値の分布を示している。図５７ｂは、統計ソフトウェアパッケージを使用して得られたｌｏｇ２変換ＲＱ値（Ｘ軸）についてのヒストグラム解析（Ｙ軸）を示している。実線はガウス分布を示している。点線は、式：ｌｏｇ｛ＲＱカットオフ｝＝対数変換されたＲＱ値の平均－対数変換されたＲＱ値のＳＤ、を使用して定義された、インビボ研究への登録のためのカットオフＲＱを示している。
【図５７ｃ】図５７は、組み換えヒトＩＬ－２１によるエキソビボ刺激後の、メスカニクイザルの全血におけるＩＬ－２Ｒα遺伝子発現についての相対的定量化（ＲＱ）値の分布を示している。図５７ｃは、個々の動物及びＩＬ－２１刺激単独（丸）と比較した、ＩＬ－２１及びＡｂＴ（三角形）又はＩＬ－２１及び対照ＩｇＧ（四角）で刺激した全血分割量の中央値（実線）ＲＱ値（Ｙ軸）を比較している。
【図５８】[0093]図５８は、ＡｂＳについては１４８日目までそしてＡｂＴについては３６日目まで集められた（Ｘ軸）、メスカニクイザルへの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ（「Ａ」）又はＡｂＴ（「Ｂ」）の単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の血清濃度（Ｙ軸）を示している。より低いＬＯＱ以下の血清濃度（３０ｎｇ／ｍＬ）を有するデータポイントは示されていない。
【図５９ａ】[0094]図５９は、投与前及び後の多様な時点で測定された（Ｘ軸；時間（日））、メスカニクイザルへの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳの単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、抗体血清濃度（第二Ｙ軸）、薬力学的（ＰＤ）活性（「ＲＱ」；第一Ｙ軸）及び中和抗生成物抗体応答（「ＡＮ」により示される）を含む抗生成物抗体応答（「Ａ」により示される）の相関を示している。図５９ａ－ｃは、動物１－３についてのそれぞれの結果を示している。
【図５９ｂ】図５９は、投与前及び後の多様な時点で測定された（Ｘ軸；時間（日））、メスカニクイザルへの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳの単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、抗体血清濃度（第二Ｙ軸）、薬力学的（ＰＤ）活性（「ＲＱ」；第一Ｙ軸）及び中和抗生成物抗体応答（「ＡＮ」により示される）を含む抗生成物抗体応答（「Ａ」により示される）の相関を示している。図５９ａ－ｃは、動物１－３についてのそれぞれの結果を示している。
【図５９ｃ】図５９は、投与前及び後の多様な時点で測定された（Ｘ軸；時間（日））、メスカニクイザルへの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳの単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の、抗体血清濃度（第二Ｙ軸）、薬力学的（ＰＤ）活性（「ＲＱ」；第一Ｙ軸）及び中和抗生成物抗体応答（「ＡＮ」により示される）を含む抗生成物抗体応答（「Ａ」により示される）の相関を示している。図５９ａ－ｃは、動物１－３についてのそれぞれの結果を示している。

【図６０ａ】[0095]図６０は、ＡｂＴ（単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与）について図５９の項目と同様の相関を示している。図６０ａ－ｃは、動物４－６についてのそれぞれの結果を示している。
【図６０ｂ】図６０は、ＡｂＴ（単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与）について図５９の項目と同様の相関を示している。図６０ａ－ｃは、動物４－６についてのそれぞれの結果を示している。
【図６０ｃ】図６０は、ＡｂＴ（単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与）について図５９の項目と同様の相関を示している。図６０ａ－ｃは、動物４－６についてのそれぞれの結果を示している。
【図６１】[0096] 図６１は、単回静脈内投与後の、カニクイザルにおける、ＡｂＳ－ＡｂＷの濃度－時間プロファイルを示している。定量限界濃度以下（＜３０ｎｇ／ｍｌ）は、計算にはゼロとして処理した。ＡｂＳ（黒丸、研究１；白菱形、研究２）、ＡｂＴ（白丸）、ＡｂＶ（黒菱形）及びＡｂＵ（白三角）、ｎ＝３；１０ｍｇ／ｋｇ投与． ＦｏｒＡｂＷ（白四角）、ｎ＝２；１ｍｇ／ｋｇ投与。
【図６２ａ】[0097]図６２は、破傷風トキソイド曝露オス及びメスカニクイザルへ２（図６２ａ）又は１０ｍｇ／ｋｇ（図６２ｂ）週３回、静脈内投与（矢印）後の、ＡｂＳの個々の濃度（ｎｇ／ｍｌ）を示している。
【図６２ｂ】図６２は、破傷風トキソイド曝露オス及びメスカニクイザルへ２（図６２ａ）又は１０ｍｇ／ｋｇ（図６２ｂ）週３回、静脈内投与（矢印）後の、ＡｂＳの個々の濃度（ｎｇ／ｍｌ）を示している。
【図６３ａ】[0098]図６３は、静脈内投与後のＡｂＳ ＰＫパラメータのアロメトリックスケーリングを示している。体重（Ｗ）；最長寿命（年；ＭＬＰ）：図６３ａは、体重（Ｘ軸）に対してプロットされたＣＬ・ＭＬＰ（Ｙ軸）を示している。実線は、マウス、ラット及びカニクイザルからのデータを使用して線形回帰に基づいた近似曲線を示している。点線は、９５％信頼区間を示している。
【図６３ｂ】図６３は、静脈内投与後のＡｂＳ ＰＫパラメータのアロメトリックスケーリングを示している。体重（Ｗ）；最長寿命（年；ＭＬＰ）：図６３ｂは、体重（Ｘ軸）に対してプロットされた分布容積（Ｙ軸）を示している。実線は、マウス、ラット及びカニクイザルからのデータを使用して線形回帰に基づいた近似曲線を示している。点線は、９５％信頼区間を示している。
【図６４ａ】[0099]図６４は、静脈内投与後のＡｂＴ ＰＫパラメータのアロメトリックスケーリングを示している。体重（Ｗ）；脳重量（「ＢＷ」）。図６４ａは、体重（Ｘ軸）に対してプロットされたＣＬ＊ＢＷ（Ｙ軸）を示している。
【図６４ｂ】図６４は、静脈内投与後のＡｂＴ ＰＫパラメータのアロメトリックスケーリングを示している。体重（Ｗ）；脳重量（「ＢＷ」）。図６４ｂは、体重（Ｘ軸）に対してプロットされた分布容積（Ｙ軸）を示している。
【図６５ａ】[0100]図６５（ａ－ｂ）は、ＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスにおけるタンパク尿の発生（図６５ａ）及び抗ｄｓＤＮＡ ＩｇＧ血清抗体価（図６５ｂ）に対するＡｂＳの効果を示している。メス２６週齢ＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスに、４００μｇの生理食塩水、抗Ｅ．テネラ抗体、ｍＣＴＬＡ－４Ｉｇ、ｈｌｇＧＴｍ抗体又はＡｂＳ抗体を３Ｘ／週で１０週間投与した。尿中タンパクレベル及び抗ｄｓＤＮＡ ＩｇＧ血清抗体価は研究の始めに測定し、その後１０週にわたって２週間ごとに測定した。ＣＴＬＡ４－Ｉｇで処理された動物は、４－１０週で抗ｄｓＤＮＡ力価（ アステリスク；ｐ＜．０５）の有意な減少を示している。
【図６５ｂ】図６５（ａ－ｂ）は、ＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスにおけるタンパク尿の発生（図６５ａ）及び抗ｄｓＤＮＡ ＩｇＧ血清抗体価（図６５ｂ）に対するＡｂＳの効果を示している。メス２６週齢ＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスに、４００μｇの生理食塩水、抗Ｅ．テネラ抗体、ｍＣＴＬＡ－４Ｉｇ、ｈｌｇＧＴｍ抗体又はＡｂＳ抗体を３Ｘ／週で１０週間投与した。尿中タンパクレベル及び抗ｄｓＤＮＡ ＩｇＧ血清抗体価は研究の始めに測定し、その後１０週にわたって２週間ごとに測定した。ＣＴＬＡ４－Ｉｇで処理された動物

は、４－１０週で抗ｄｓＤＮＡ力価（ アステリスク；ｐ＜．０５）の有意な減少を示している。

【図６６ａ】[0101]図６６は、関節リウマチの半治療的ＣＩＡマウスモデルにおける疾患結果に対する抗ＩＬ－２１Ｒ中和の効果を示している。メスＤＢＡ／１マウスをウシＩＩ型コラーゲンで免疫化し、ブーストした；本研究の動物の１０％が足膨潤を示した時、３Ｘ／週、３０日にわたって８ｍｇ／ｋｇのマウスＩｇＧ２ａアイソタイプ対照抗体、抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体Ｄ５（マウスＩｇＧ２ａ抗体）、ｍＴＮＦＲＩＩ－Ｆｃ（陽性対照、マウスＩｇＧ２ａアイソタイプ）（図６６ａ）；又は抗ＩＬ－１３ＴＭ抗体（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体）、ＡｂＴ又はＡｂＳ（図６６ｂ）を投与した。研究の３０日目での、個々の動物スコアは図６６ｃに示されている。

【図６６ｂ】図６６は、関節リウマチの半治療的ＣＩＡマウスモデルにおける疾患結果に対する抗ＩＬ－２１Ｒ中和の効果を示している。メスＤＢＡ／１マウスをウシＩＩ型コラーゲンで免疫化し、ブーストした；本研究の動物の１０％が足膨潤を示した時、３Ｘ／週、３０日にわたって８ｍｇ／ｋｇのマウスＩｇＧ２ａアイソタイプ対照抗体、抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体Ｄ５（マウスＩｇＧ２ａ抗体）、ｍＴＮＦＲＩＩ－Ｆｃ（陽性対照、マウスＩｇＧ２ａアイソタイプ）（図６６ａ）；又は抗ＩＬ－１３ＴＭ抗体（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体）、ＡｂＴ又はＡｂＳ（図６６ｂ）を投与した。研究の３０日目での、個々の動物スコアは図６６ｃに示されている。

【図６６ｃ】図６６は、関節リウマチの半治療的ＣＩＡマウスモデルにおける疾患結果に対する抗ＩＬ－２１Ｒ中和の効果を示している。メスＤＢＡ／１マウスをウシＩＩ型コラーゲンで免疫化し、ブーストした；本研究の動物の１０％が足膨潤を示した時、３Ｘ／週、３０日にわたって８ｍｇ／ｋｇのマウスＩｇＧ２ａアイソタイプ対照抗体、抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体Ｄ５（マウスＩｇＧ２ａ抗体）、ｍＴＮＦＲＩＩ－Ｆｃ（陽性対照、マウスＩｇＧ２ａアイソタイプ）（図６６ａ）；又は抗ＩＬ－１３ＴＭ抗体（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体）、ＡｂＴ又はＡｂＳ（図６６ｂ）を投与した。研究の３０日目での、個々の動物スコアは図６６ｃに示されている。

【図６７ａ】[0102]図６７は、ＡｂＳの存在下、カニクイザルにおける破傷風トキソイドへのアムネスティック破傷風特異的ＩｇＭ及びＩｇＧ血清抗体応答の発生を示している。９匹のオス及び９匹のメスカニクイザルを破傷風トキソイドで免疫し、４３日休ませる。４３日後、オス及びメスザルを３群に無作為に分け、生理食塩水（ビヒクル）、２ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳ又は１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳで１Ｘ／週、３週間処理した。ビヒクル又はＡｂＳ（矢印）の初回投与から２４時間後、サルを２回目の破傷風トキソイドで免疫した。サルは研究の期間を通してルーチン的に採血し、破傷風特異的ＩｇＭ（図６７ａ）及びＩｇＧ（図６７ｂ）血清抗体価について試験した。

【図６７ｂ】図６７は、ＡｂＳの存在下、カニクイザルにおける破傷風トキソイドへのアムネスティック破傷風特異的ＩｇＭ及びＩｇＧ血清抗体応答の発生を示している。９匹のオス及び９匹のメスカニクイザルを破傷風トキソイドで免疫し、４３日休ませる。４３日後、オス及びメスザルを３群に無作為に分け、生理食塩水（ビヒクル）、２ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳ又は１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳで１Ｘ／週、３週間処理した。ビヒクル又はＡｂＳ（矢印）の初回投与から２４時間後、サルを２回目の破傷風トキソイドで免疫した。サルは研究の期間を通してルーチン的に採血し、破傷風特異的ＩｇＭ（図６７ａ）及びＩｇＧ（図６７ｂ）血清抗体価について試験した。

【発明を実施するための形態】

【００３８】

[0103]本発明の結合性タンパク質は、最初に親抗体１８Ａ５に由来したが、重鎖および／または軽鎖相補性決定領域３（ＣＤＲ３）の部分のアミノ酸配列が１８Ａ５とは異なる。さらに、本発明の結合性タンパク質は、同等の形式（例えばｓｃＦｖまたはＩｇＧ）の１８Ａ５と比較した際、ヒトおよびネズミＩＬ－２１Ｒの両方に結合し、そしてこれらを中和する強度の改善を示す。単一の結合性タンパク質による、両種（ヒトおよびマウス）由来のＩＬ－２１Ｒの高い強度の中和は、以前は報告されてきていない。親抗体よりも高

い中和強度を有する本発明の結合性タンパク質は、先に記載される剤に比較した際、より高い効率で翻訳されうる。さらに、V_HおよびV_Lフレームワーク領域のアミノ酸配列が、ヒトゲノム配列にコードされる配列にマッチするように改変されてきており、それによって、本発明の結合性タンパク質で治療される患者において、ヒト抗ヒト抗体応答の潜在的可能性が減少してきている。

【００３９】

定義

[0104]本発明がより容易に理解可能になるように、特定の用語をまず定義する。さらなる定義は、詳細な説明全体および本明細書の別の箇所に示される。

【００４０】

[0105]用語「結合性タンパク質」には、本明細書において、抗原、ターゲットタンパク質、またはペプチド、あるいはその断片（単数または複数）に結合する、任意の天然存在、組換え、合成、または遺伝子操作されたタンパク質、あるいはその組み合わせが含まれる。本発明の結合性タンパク質には、抗体が含まれてもよく、または当該結合性タンパク質は、少なくとも１つの抗体断片に由来してもよい。当該結合性タンパク質には、天然存在タンパク質および／または合成的に操作されたタンパク質が含まれてもよい。本発明の結合性タンパク質は、抗原またはその断片に結合して、複合体を形成し、そして生物学的応答を誘発する（例えば特定の生物学的活性をアゴナイズするかまたはアンタゴナイズする）ことも可能である。結合性タンパク質には、単離抗体断片、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Ｆｖ」断片、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結されている組換え一本鎖ポリペプチド分子（「ｓｃＦｖタンパク質」）、ならびに超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位が含まれてもよい。結合性タンパク質断片にはまた、抗体の機能性断片、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、Ｆｃ、Ｆｄ、Ｆｄ’、Ｆｖ、および抗体の単一可変ドメイン（ｄＡｂ）なども含まれてもよい。結合性タンパク質は、二重鎖または一本鎖であってもよく、そして単一結合性ドメインまたは多重結合性ドメインを含んでもよい。

【００４１】

[0106]結合性タンパク質にはまた、結合性ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質も含まれてもよく、免疫グロブリン・ヒンジまたはヒンジ作用領域ポリペプチドに融合したかまたは別の方式で連結された結合性ドメインポリペプチドが含まれ、これは次に、ＣＨ１以外の免疫グロブリン重鎖由来の１以上の天然または操作定常領域、例えば、ＩｇＧおよびＩｇＡのＣＨ２およびＣＨ３領域、またはＩｇＥのＣＨ３およびＣＨ４領域を含む領域に融合したかまたは別の方式で連結される（より完全な説明に関しては、例えばＬｅｄｂｅｔｔｅｒら、米国特許公報２００５／０１３６０４９を参照されたい）。結合性ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質にはさらに、ヒンジ領域ポリペプチドに融合したかまたは別の方式で連結された天然または操作免疫グロブリン重鎖ＣＨ２定常領域ポリペプチド（あるいはＩｇＥに完全にまたは部分的に由来する構築物の場合、ＣＨ３）、およびＣＨ２定常領域ポリペプチド（あるいはＩｇＥに完全にまたは部分的に由来する構築物の場合、ＣＨ３）に融合したかまたは別の方式で連結された天然または操作免疫グロブリン重鎖ＣＨ３定常領域ポリペプチド（あるいはＩｇＥに完全にまたは部分的に由来する構築物の場合、ＣＨ４）を含む領域が含まれてもよい。典型的には、こうした結合性ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質は、抗体に依存し細胞に媒介される細胞傷害性、補体結合、および／またはターゲット、例えばターゲット抗原への結合からなる群より選択される、少なくとも１つの免疫学的活性が可能である。本発明の結合性タンパク質は、限定されるわけではないが、マウス、ラット、ヒト、ラクダ、ラマ、魚、サメ、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、およびウシを含む、任意の種に由来してもよい。

【００４２】

[0107]用語「抗体」は、本明細書において、指定されたタンパク質またはペプチドあるいはその断片に反応性である免疫グロブリンを指す。適切な抗体には、限定されるわけではないが、ヒト抗体、霊長類化（ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ）抗体、キメラ抗体、モノクロー

ナル抗体、単一特異性抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体、非特異性抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、突然変異抗体、移植コンジュゲート化抗体（すなわち他のタンパク質、放射標識、細胞毒素にコンジュゲート化されたかまたは融合した抗体）、およびｉｎ　ｖｉｔｒｏ生成抗体が含まれる。抗体は、限定されるわけではないが、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、およびＩｇＥを含む任意のクラスの抗体、ならびに抗体の任意のサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４）に由来してもよい。抗体は、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４より選択される重鎖定常領域を有してもよい。抗体はまた、例えば、カッパ（κ）またはラムダ（λ）より選択される軽鎖も有してもよい。本発明の抗体は、限定されるわけではないが、マウス、ラット、ヒト、ラクダ、ラマ、魚、サメ、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、およびウシを含む任意の種に由来してもよい。抗体の定常領域を改変して、例えば突然変異させて、抗体の特性を修飾してもよい（例えば：Ｆｃ受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能、または補体機能の１以上を増加させるかまたは減少させてもよい）。典型的には、抗体は、あらかじめ決定される抗原、例えば障害、例えば炎症性、免疫、自己免疫、神経変性性、代謝性および／または悪性腫瘍障害と関連する抗原に特異的に結合する。

【００４３】

[0108]用語「単一ドメイン結合性タンパク質」には、本明細書において、抗原、タンパク質、またはポリペプチドに結合する、任意の単一ドメイン結合性足場が含まれる。単一ドメイン結合性タンパク質には、抗原またはその断片に結合して、複合体を形成し、そして生物学的応答を誘発する（例えば特定の生物学的活性をアゴナイズするかまたはアンタゴナイズする）、任意の天然、組換え、合成、または遺伝子操作タンパク質足場、あるいはその組み合わせが含まれてもよい。単一ドメイン結合性タンパク質は、天然存在タンパク質または抗体に由来してもよいし、あるいはこれらは組換え技術によって合成的に操作されるかまたは産生されてもよい。単一ドメイン結合性タンパク質は、当該技術分野にある任意のものまたは任意の将来の単一ドメイン結合性タンパク質であってもよく、そして限定されるわけではないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、魚、サメ、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、およびウシを含む、任意の種に由来してもよい。本発明のいくつかの態様において、単一ドメイン結合性タンパク質足場は、魚に見られる免疫グロブリンの可変領域由来であってもよく、例えばサメの血清に見られる新規抗原受容体（ＮＡＲ）として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由来であってもよい。ＮＡＲの可変領域由来の単一ドメイン結合性足場（「ＩｇＮＡＲ」）を産生する方法が、国際出願公報第ＷＯ　０３／０１４１６１号およびＳｔｒｅｌｔｓｏｖ（２００５）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．　１４（１１）：２９０１－０９に記載される。

【００４４】

[0109]他の態様において、単一ドメイン結合性タンパク質は、当該技術分野において、軽鎖を欠く重鎖抗体と記載されてきている、天然存在単一ドメイン結合性タンパク質である。こうした単一ドメイン結合性タンパク質は、例えば、国際出願公報第ＷＯ　９４／００４６７８号に開示される。明確にするため、天然に軽鎖を欠く重鎖抗体由来の可変ドメイン結合性タンパク質は、本明細書において、四鎖免疫グロブリンの慣用的なＶＨと区別するため、ＶＨＨまたは「ナノボディ」として知られる。こうしたＶＨＨ分子は、ラクダ科（Ｃａｍｅｌｉｄａｅ）種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ（ｄｒｏｍｅｄａｒｙ）、アルパカ、およびグアナコ（ｇｕａｎａｃｏ）において作製された抗体由来であってもよい。また、ラクダ科以外の他の科を用いて、天然に軽鎖を欠く重鎖結合性タンパク質を産生してもよい。ＶＨＨ分子は、伝統的なＩｇＧ分子よりもおよそ１０倍小さい。これらは単一ポリペプチドであり、そして非常に安定で、極端なｐＨおよび温度条件に耐性である。さらに、これらは、プロテアーゼの作用に耐性であり、これは慣用的な抗体には当てはまらない。さらに、ＶＨＨをｉｎ　ｖｉｔｒｏで発現させると、適切にフォールディングされた、高収量の機能性ＶＨＨが生じうる。さらに、ラクダ科で生成される結合性タンパク質は、抗体ライブラリーを介して、またはラクダ科以外の哺乳動物の免疫を介し

て生成される抗体によって認識されるもの以外のエピトープを認識してもよい（例えば、どちらも本明細書に援用される、国際出願公報第ＷＯ　９７／０４９８０５号および第ＷＯ　９４／００４６７８号を参照されたい）。

【００４５】

[0110]用語「抗原結合性ドメイン」および「抗原結合性断片」は、結合性タンパク質および抗原間の特異的結合の原因となるアミノ酸を含む、結合性タンパク質の部分を指す。結合性タンパク質によって特異的に認識されそして結合される抗原の部分は、「エピトープ」と呼ばれる。抗原結合性ドメインは、抗体の軽鎖可変領域（V_L）および重鎖可変領域（V_H）を含んでもよい；が、両方を含まなければならないわけではない。例えば、Ｆｄ断片は、２つのV_H領域を有し、そしてしばしば、損なわれていない抗原結合性ドメインの抗原結合性機能を保持する。結合性タンパク質の抗原結合性断片の例には、限定されるわけではないが：（１）V_L、V_H、C_LおよびC_H1ドメインを有する一価断片である、Ｆａｂ断片；（２）ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結される２つのＦａｂ断片を有する二価断片である、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片；（３）２つのV_Hおよび１つのC_H1ドメインを有するＦｄ断片；（４）抗体の単一アームのV_LおよびV_Hドメインを有するＦｖ断片；（５）V_Hドメインを有するｄＡｂ断片（例えば、Ｗａｒｄら（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６を参照されたい）；（６）単離されたＣＤＲ；ならびに（７）一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）が含まれる。Ｆｖ断片の２つのドメイン、V_LおよびV_Hは、別個の遺伝子にコードされているが、組換え法を用い、V_LおよびV_H領域を対形成させて一価分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製することを可能にする合成リンカーによって、これらを連結することも可能である（ｓｃＦｖとして知られる）（例えば、Ｂｉｒｄら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－２６；　Ｈｕｓｔｏｎら（１９８８）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５：５８７９－８３を参照されたい）。当業者に知られる慣用的技術を用いてこれらの結合性ドメイン断片を得て、そして損なわれていない結合性タンパク質、例えば抗体などの場合と同じ方式で、機能に関して断片を評価する。

【００４６】

[0111]用語「中和」は、シグナル伝達経路または抗原、例えばＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒシグナル伝達経路またはＩＬ－２１Ｒ抗原の活性を減少させるかまたは遮断する、結合性タンパク質またはその抗原結合性断片（例えば抗体）を指す。「抗産物抗体」は、本明細書において、外因性タンパク質、例えば抗ＩＬ－２１Ｒ抗体に反応して形成される抗体を指す。「中和抗産物抗体」は、本明細書において、外因性に導入されたタンパク質、例えば抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を遮断する抗産物抗体を指す。本発明のいくつかの態様において、中和抗産物抗体は、ＩＬ－２１Ｒ抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ活性、例えばＩＬ－２１Ｒ抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ薬力学的（ＰＤ）活性（抗ＩＬ－２１Ｒ抗体がＩＬ－２１応答性サイトカインまたは遺伝子の発現を調節する能力など）を減少させる。

【００４７】

[0112]用語「有効量」は、ＩＬ－２１Ｒ活性を制御して、臨床的症状の重症度を回復させるかまたは減少させる、あるいは所望の生物学的帰結、例えばＴ細胞および／またはＢ細胞活性の減少、自己免疫の抑制、移植片拒絶の抑制を達成するのに十分である、投薬量または量を指す。

【００４８】

[0113]用語「ヒト結合性タンパク質」には、当該技術分野に知られるヒト生殖系列免疫グロブリン配列に実質的に対応する可変および定常領域を有する結合性タンパク質が含まれ、例えば、Ｋａｂａｔら（第５版　１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，　米国保険社会福祉省，　ＮＩＨ公報第９１－３２４２号に記載されるものが含まれる。本発明のヒト抗体には、例えばＣＤＲ、そして特にＣＤＲ３において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基（例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏでランダムまたは部位特異的突然変異誘発によって、あるいはｉｎ　ｖｉｖｏで体細胞突然変異によって導入される突然変異）

が含まれてもよい。ヒト抗体は、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、またはそれより多い位が、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基で置換されていてもよい。

【００４９】

[0114]句、ＩＬ－２１Ｒ活性およびその同族を「阻害する」、「アンタゴナイズする」、「遮断する」または「中和する」は、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体への結合によるＩＬ－２１Ｒの少なくとも１つの活性の減少、阻害、または別の方式での縮小を指し、ここで、減少は、同じ抗体の非存在下でのＩＬ－２１Ｒの活性に対する。ＩＬ－２１Ｒ活性は、当該技術分野に知られる任意の技術を用いて測定可能である。阻害またはアンタゴニズムは、ＩＬ－２１Ｒ生物学的活性の完全な除去を必ずしも示さない。活性減少は、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれより多くてもよい。

【００５０】

[0115]用語「インターロイキン－２１受容体」または「ＩＬ－２１Ｒ」等は、ＩＬ－２１リガンドに結合する、クラスＩサイトカインファミリー受容体を指し、ＭＵ－１（例えば、米国特許出願第０９／５６９，３８４号、ならびに米国出願公報第２００４／０２６５９６０号；第２００６／０１５９６５５号；第２００６／００２４２６８号；および第２００８／０２４１０９８号を参照されたい）、ＮＩＬＲまたはザルファ（ｚａｌｐｈａ）１１（例えば、国際出願公報第ＷＯ　０１／０８５７９２号；　Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）上記；　Ｏｚａｋｉら（２０００）上記を参照されたい）としても知られる。ＩＬ－２１Ｒは、ＩＬ－２およびＩＬ－１５受容体、ならびにＩＬ－４αに共有されるβ鎖に相同である（Ｏｚａｋｉら（２０００）上記）。リガンドが結合すると、ＩＬ－２１Ｒは、共通のガンマサイトカイン受容体鎖（γｃ）と相互作用し、そしてＳＴＡＴ１およびＳＴＡＴ３（Ａｓａｏら（２００１）上記）またはＳＴＡＴ５（Ｏｚａｋｉら（２０００）上記）のリン酸化を誘導することが可能である。ＩＬ－２１Ｒは、広範囲のリンパ組織分布を示す。用語「インターロイキン－２１受容体」または「ＩＬ－２１Ｒ」等はまた、ＩＬ－２１（好ましくは哺乳動物起源のＩＬ－２１、例えばネズミまたはヒトＩＬ－２１）と相互作用することが可能であり、そして以下の特徴の少なくとも１つを有する、ポリペプチド（好ましくは哺乳動物起源のもの、例えばネズミまたはヒトＩＬ－２１Ｒ）、または文脈が必要とする場合、こうしたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す：（１）天然存在哺乳動物ＩＬ－２１Ｒポリペプチドのアミノ酸配列またはその断片、例えば配列番号２（ヒト－ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）（米国保険社会福祉省、メリーランド州ベセスダ）寄託番号ＮＰ＿０６８５７０に対応する）もしくは配列番号４（ネズミ－ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）寄託番号ＮＰ＿０６８６８７に対応する）に示すアミノ酸配列、またはその断片；（２）配列番号２もしくは配列番号４に示すアミノ酸配列に実質的に相同である、例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、もしくは９９％相同であるアミノ酸配列、またはその断片；（３）天然存在哺乳動物ＩＬ－２１ＲヌクレオチドＲ配列によってコードされるアミノ酸配列またはその断片（例えば配列番号１（ヒト－ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）寄託番号ＮＭ＿０２１７９８に対応する）もしくは配列番号３（ネズミ－ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）寄託番号ＮＭ＿０２１８８７に対応する）、またはその断片）；（４）配列番号１もしくは配列番号３に示すヌクレオチド配列に、実質的に相同である、例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、もしくは９９％相同であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列、またはその断片；（５）天然存在ＩＬ－２１Ｒヌクレオチド配列もしくはその断片、例えば配列番号１もしくは配列番号３に縮重しているヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列、またはその断片；あるいは（６）ストリンジェントな条件、例えば非常にストリンジェントな条件下で、前述のヌクレオチド配列の１つにハイブリダイズするヌクレオチド配列。さらに、他の非ヒトおよび非哺乳動物ＩＬ－２１Ｒが、開示する方法において有用と意図される。

【００５１】

[0116]用語「インターロイキン－２１」または「ＩＬ－２１」は、ＩＬ－２、ＩＬ－４およびＩＬ－１５に配列相同性を示し（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）上記）、そしてＩＬ－２１Ｒに結合するサイトカインを指す。こうしたサイトカインは、ファミリーを代表する「４－ヘリックスバンドル」構造への共通のフォールディングを共有する。ＩＬ－２１は、活性化ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞において主に発現され、そしてＮＫ、ＢおよびＴ細胞に対して影響を有すると報告されてきている（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋら（２０００）上記；　Ｋａｓａｉａｎら（２００２）上記）。ＩＬ－２１がＩＬ－２１Ｒに結合すると、ＩＬ－２１Ｒが活性化されて、例えばＳＴＡＴ５またはＳＴＡＴ３シグナル伝達につながる（Ｏｚａｋｉら（２０００）上記）。用語「インターロイキン－２１」または「ＩＬ－２１」はまた、ＩＬ－２１Ｒ（好ましくは哺乳動物起源のもの、例えばネズミまたはヒトＩＬ－２１Ｒ）と相互作用することが可能であり、そして以下の特徴の少なくとも１つを有する、ポリペプチド（好ましくは哺乳動物起源のもの、例えばネズミまたはヒトＩＬ－２１）、または文脈が必要とする場合、こうしたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも指す：（１）天然存在哺乳動物ＩＬ－２１のアミノ酸配列またはその断片、例えば配列番号２１２（ヒト）に示すアミノ酸配列、またはその断片；（２）配列番号２１２に示すアミノ酸配列に実質的に相同である、例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、もしくは９９％相同であるアミノ酸配列、またはその断片；（３）天然存在哺乳動物ＩＬ－２１ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列またはその断片（例えば配列番号２１１（ヒト）、またはその断片）；（４）配列番号２１１に示すヌクレオチド配列に、実質的に相同である、例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、もしくは９９％相同であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列、またはその断片；（５）天然存在ＩＬ－２１ヌクレオチド配列に縮重しているヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列、またはその断片；あるいは（６）ストリンジェントな条件、例えば非常にストリンジェントな条件下で、前述のヌクレオチド配列の１つにハイブリダイズするヌクレオチド配列。

【００５２】

[0117]用語「ＩＬ－２１Ｒ活性」等（例えば「ＩＬ－２１Ｒの活性」、「ＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒ活性」）は、ＩＬ－２１Ｒ結合の結果として開始されるかまたは中断される、少なくとも１つの細胞プロセスを指す。ＩＬ－２１Ｒ活性には、限定されるわけではないが：（１）リガンド、例えばＩＬ－２１ポリペプチドとの相互作用、例えば該分子への結合；（２）シグナル伝達（また「シグナリング」とも呼ばれ、特定の刺激に応答して生じる細胞内カスケードを指す）およびシグナル伝達分子（例えばガンマ鎖（γｃ）およびＪＡＫ１）との会合または活性化、ならびに／あるいはＳＴＡＴタンパク質、例えばＳＴＡＴ５および／またはＳＴＡＴ３のリン酸化および／または活性化の刺激；（３）増殖、分化、エフェクター細胞機能、細胞溶解活性、サイトカイン分泌、および／または免疫細胞、例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）および巨核球の生存の調節；ならびに（４）ＩＬ－２１応答性遺伝子またはサイトカインの発現の調節、例えばＩＬ－２１の調節は、例えばＴＮＦ、ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１９、ＳＴＡＴ３、ＩＣＡＭ－１、ＴＢＸ２１、ＣＳＦ１、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、ＩＬ－２１Ｒ等の発現レベルに対して影響する。

【００５３】

[0118]本明細書において、「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生成抗体」は、可変領域のすべてまたは一部（例えば少なくとも１つのＣＤＲ）が非免疫細胞選択（例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏファージディスプレイ、タンパク質チップ、または抗原に結合する能力に関して候補配列を試験可能である任意の他の方法）で生成される抗体を指す。

【００５４】

[0119]用語「単離された」は、天然環境を実質的に含まない分子を指す。例えば、単離されたタンパク質は、由来する細胞または組織供給源由来の細胞物質または他のタンパク質を実質的に含まない。当該用語はまた、単離されたタンパク質が、医薬組成物のために十分に純粋であるか、または少なくとも７０～８０％（ｗ／ｗ）純粋、少なくとも８０～

９０％（ｗ／ｗ）純粋、少なくとも９０～９５％（ｗ／ｗ）純粋、あるいは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％（ｗ／ｗ）純粋である、調製物を指す。

【００５５】

[0120]句「同一パーセント」または「同一性パーセント」は、少なくとも２つの異なる配列間の類似性を指す。この同一性パーセントは、標準的整列アルゴリズム、例えば、Ａｌｔｓｈｕｌら（（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－１０）によって記載されるＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）；Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら（（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－５３）のアルゴリズム；またはＭｅｙｅｒｓら（（１９８８）Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４：１１－１７）のアルゴリズムによって決定可能である。パラメータセットは、ギャップペナルティ１２、ギャップ伸長ペナルティ４、およびフレームシフトギャップペナルティ５を伴うＢｌｏｓｕｍ ６２スコアリングマトリックスであってもよい。また、ＰＡＭ１２０加重残基表、ギャップ長ペナルティ１２、およびギャップペナルティ４を用いるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に取り込まれている、ＭｅｙｅｒｓおよびＭｉｌｌｅｒ（（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ ４：１１－１７）のアルゴリズムを用いて、２つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間の同一性パーセントも決定可能である。同一性パーセントは通常、類似の長さの配列を比較することによって計算される。

【００５６】

[0121]用語「レパートリー」は、少なくとも１つの免疫グロブリンをコードする少なくとも１つの配列に完全にまたは部分的に由来する、少なくとも１つのヌクレオチド配列を指す。当該配列（単数または複数）は、重鎖のＶ、Ｄ、およびＪセグメント、ならびに軽鎖のＶおよびＪセグメントのｉｎ ｖｉｖｏでの再編成によって生成されうる。あるいは、再編成が起こる、例えばｉｎ ｖｉｔｒｏ刺激に反応した細胞から、配列（単数または複数）が生成されうる。あるいは、ＤＮＡスプライシング、ヌクレオチド合成、突然変異誘発、または他の方法によって、配列（単数または複数）の一部またはすべてを得てもよい（例えば、米国特許第５，５６５，３３２号を参照されたい）。レパートリーには、１つの配列のみが含まれてもよいし、または遺伝的に多様なコレクション中のものを含む、多数の配列が含まれてもよい。

【００５７】

[0122]用語「特異的結合」、「特異的に結合する」等は、生理学的条件下で比較的安定な複合体を形成する２つの分子を指す。通常、中程度から高い容量で低いアフィニティを有する非特異的結合とは区別されるように、特異的結合は、高いアフィニティおよび低いか中程度の容量によって特徴付けられる。典型的には、結合は、結合定数Ｋａが約10^{6} M^{-1} s^{-1}より高い場合、特異的と見なされる。必要な場合、結合条件を変化させることによって、特異的結合に実質的に影響を及ぼすことなく、非特異的結合を減少させることも可能である。適切な結合条件、例えば、結合性タンパク質の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合のために許される時間、ブロッキング剤（例えば血清アルブミンまたはミルク・カゼイン）の濃度等は、ルーチンの技術を用いて、当業者によって改善可能である。例示的な条件を本明細書に示すが、一般の当業者に知られる他の条件が、本発明の範囲内に属する。

【００５８】

[0123]本明細書において、用語「ストリンジェント」、「ストリンジェンシー」等は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載する。本発明の単離されたポリヌクレオチドを、ハイブリダイゼーション・プローブおよびプライマーとして用いて、開示するポリヌクレオチドをコードするものと同一または類似の配列を有する核酸を同定し、そして単離してもよい。したがって、この方式で単離されたポリヌクレオチドを用いて、ＩＬ－２１Ｒに対する結合性タンパク質を産生するかまたはこうした結合性タンパク質を発現する細胞を同定してもよい。核酸を同定し、そして単離するためのハイブリダイゼー

ション法には、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、サザンハイブリダイゼーション、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーションが含まれ、そしてこれらは当業者に周知である。

【００５９】

[0124]異なるストリンジェンシー条件下で、ハイブリダイゼーション反応を行ってもよい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーには、任意の２つの核酸分子が互いにハイブリダイズすることの困難さ、およびこれらがハイブリダイズしたままであろう条件が含まれる。好ましくは、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドは各々、減少したストリンジェンシー条件下、より好ましくはストリンジェントな条件下、そして最も好ましくは非常にストリンジェントな条件下で、対応するポリヌクレオチドにハイブリダイズする。ストリンジェントな条件は当業者に知られ、そして例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，　ニューヨーク（１９８９）６．３．１－６．３．６に見出されうる。水性および非水性法が、この参考文献中に記載され、そしてどちらを用いてもよい。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、約４５℃での６ｘ塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中のハイブリダイゼーション、その後、０．２ｘＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ中、５０℃での少なくとも１回の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件はまた、例えば、０．２ｘＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ中、５５℃、６０℃、または６５℃での洗浄（単数または複数）でも達成される。非常にストリンジェントな条件には、例えば、０．５Ｍリン酸ナトリウム／７％ＳＤＳ中、６５℃でのハイブリダイゼーション、その後、０．２ｘＳＳＣ／１％ＳＤＳ、６５℃での少なくとも１回の洗浄が含まれる。ストリンジェンシー条件のさらなる例を以下の表１に示す：非常にストリンジェントな条件は、少なくとも、例えば条件Ａ～Ｆと同程度にストリンジェントなものであり；ストリンジェントな条件は、少なくとも、例えば条件Ｇ～Ｌと同程度にストリンジェントなものであり；そして減少したストリンジェンシーの条件は、少なくとも、例えば条件Ｍ～Ｒと同程度にストリンジェントである。

【００６０】

表１：ハイブリダイゼーション条件

【００６１】

【表１－１】

条件	ハイブリッド	ハイブリッド長 (bp)[1]	ハイブリダイゼーション温度および緩衝剤[2]	洗浄温度および緩衝剤[2]
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1X SSC または 42°C; 1X SSC, 50% ホルムアミド	65°C; 0.3X SSC
B	DNA:DNA	< 50	T_B*; 1X SSC	T_B*; 1X SSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1X SSC または 45°C; 1X SSC, 50% ホルムアミド	67°C; 0.3X SSC
D	DNA:RNA	< 50	T_D*; 1X SSC	T_D*; 1X SSC
E	RNA:RNA	> 50	70°C; 1X SSC または 50°C; 1X SSC, 50% ホルムアミド	70°C; 0.3X SSC
F	RNA:RNA	< 50	T_F*; 1X SSC	T_F*; 1X SSC
G	DNA:DNA	> 50	65°C; 4X SSC または 42°C; 4X SSC, 50% ホルムアミド	65°C; 1X SSC
H	DNA:DNA	< 50	T_H*; 4X SSC	T_H*; 4X SSC
I	DNA:RNA	> 50	67°C; 4X SSC または 45°C; 4X SSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1X SSC
J	DNA:RNA	< 50	T_J*; 4X SSC	T_J*; 4X SSC
K	RNA:RNA	> 50	70°C; 4X SSC または 50°C; 4X SSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1X SSC
L	RNA:RNA	< 50	T_L*; 2X SSC	T_L*; 2X SSC
M	DNA:DNA	>50	50°C; 4X SSC または 40°C; 6X SSC, 50% ホルムアミド	50°C; 2X SSC
N	DNA:DNA	< 50	T_N*; 6X SSC	T_N*; 6X SSC

【００６２】

【表１－２】

条件	ハイブリッド	ハイブリッド長 (bp)[1]	ハイブリダイゼーション温度および緩衝剤[2]	洗浄温度および緩衝剤[2]
O	DNA:RNA	> 50	55°C; 4X SSC または 42°C; 6X SSC, 50% ホルムアミド	55°C; 2X SSC
P	DNA:RNA	< 50	T_P*; 6X SSC	T_P*; 6X SSC
Q	RNA:RNA	> 50	60°C; 4X SSC または 45°C; 6X SSC, 50% ホルムアミド	60°C; 2X SSC
R	RNA:RNA	< 50	T_R*; 4X SSC	T_R*; 4X SSC

【００６３】

[1]ハイブリッド長は、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドのハイブリダイズした領域（単数または複数）に関して予期されるものである。ポリヌクレオチドを未知の配列のターゲットポリヌクレオチドにハイブリダイズさせる場合、ハイブリッド長は、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドのものと仮定される。既知の配列のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる場合、ハイブリッド長は、ポリヌクレオチドの配列を整列させ、そして最適配列相補性の単数または複数の領域を同定することによって、決定可能である。

【００６４】

[2]ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液において、ＳＳＣ（１ｘＳＳＣは、０．１５Ｍ　ＮａＣｌおよび１５ｍＭクエン酸ナトリウムである）の代わりに、ＳＳＰＥ（１ｘＳＳＰＥは、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　NaH_2PO_4、および１．２５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４である）を用いてもよい；洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後、１５分間行う。

【００６５】

T_B*～T_R*：長さ５０塩基対未満であると予期されるハイブリッドに関しては、ハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融点（T_m）より５～１０℃低くなくてはならず、ここでT_mは、以下の等式にしたがって決定される。長さ１８塩基対未満であるハイブリッドに関しては、T_m（℃）＝２（Ａ＋Ｔ塩基の数）＋４（Ｇ＋Ｃ塩基の数）である。長さ１８～４９塩基対の間のハイブリッドに関しては、T_m（℃）＝８１．５＋１６．６（$\log_{10}Na^+$）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－（６００／Ｎ）であり、式中、Ｎはハイブリッド中の塩基の数であり、そしてNa^+は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である（１ｘＳＳＣに関して、Na^+＝０．１６５Ｍ）。

【００６６】

ポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーションに関するストリンジェンシー条件のさらなる例は、本明細書に援用される、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，第９章および第１１章，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、およびＡｕｓｕｂｅｌら監修（１９９５），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，セクション２．１０および６．３－６．４，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．に提供される。

【００６７】

[0125]本発明の単離されたポリヌクレオチドを、ハイブリダイゼーション・プローブおよびプライマーとして用いて、開示するポリヌクレオチドのアレル変異体をコードする配

列を有するＤＮＡを同定し、そして単離してもよい。アレル変異体は、開示するポリヌクレオチドの天然存在代替型であり、開示するポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドと同一であるか、または該ポリペプチドに有意な類似性を有するポリペプチドをコードする。好ましくは、アレル変異体は、開示するポリヌクレオチドと、少なくとも約９０％の配列同一性（より好ましくは、少なくとも約９５％の同一性；最も好ましくは、少なくとも約９９％の同一性）を有する。また、本発明の単離されたポリヌクレオチドを、ハイブリダイゼーション・プローブおよびプライマーとして用いて、開示するポリヌクレオチドと相同のポリペプチドをコードする配列を有するＤＮＡを同定し、そして単離してもよい。これらの相同体は、開示するポリペプチドおよびポリヌクレオチドのものと異なる種より単離されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドであるか、または同じ種内であるが、開示するポリヌクレオチドおよびポリペプチドと有意な配列類似性を持つものである。好ましくは、ポリヌクレオチド相同体は、開示するポリヌクレオチドと、少なくとも約５０％の配列同一性（より好ましくは、少なくとも約７５％の同一性；最も好ましくは、少なくとも約９０％の同一性）を有し、一方、ポリペプチド相同体は、開示する結合性タンパク質／ポリペプチドと、少なくとも約３０％の配列同一性（より好ましくは、少なくとも約４５％の同一性；最も好ましくは、少なくとも約６０％の同一性）を有する。好ましくは、開示するポリヌクレオチドおよびポリペプチドの相同体は、哺乳動物種より単離されるものである。本発明の単離されたポリヌクレオチドをさらに、ハイブリダイゼーション・プローブおよびプライマーとして用いて、本発明の結合性タンパク質を発現する細胞および組織、ならびに当該タンパク質が発現される条件を同定してもよい。

【００６８】

[0126]句「実質的に示すように」、「実質的に同一の」、および「実質的に相同な」は、適切なアミノ酸またはヌクレオチド配列（例えば、ＣＤＲ（単数または複数）、V_H、またはV_Lドメイン（単数または複数））が、示すような配列に比較して、同一であるかまたは（例えば保存されるアミノ酸置換を通じて）わずかな（ｉｎｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌ）相違しか持たないであろうことを意味する。わずかな相違には、重要でないアミノ酸変化、例えば、明記する領域の５つのアミノ酸配列中の１つまたは２つの置換が含まれる。抗体の場合、第二の抗体は、第一の抗体と同じ特異性を有し、そして第一の抗体のアフィニティの少なくとも約５０％を有する。

【００６９】

[0127]本明細書に開示する配列に実質的に同一または相同である配列もまた、本出願の一部である。いくつかの態様において、配列同一性は、約８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれより高くてもよい。あるいは、核酸セグメントが、選択的ハイブリダイゼーション条件（例えば非常にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）下で、鎖の相補体にハイブリダイズする場合に、実質的な同一性または相同性が存在する。核酸は、全細胞中、細胞溶解物中、あるいは実質的に精製されたかまたは実質的に純粋な型で存在してもよい。

【００７０】

[0128]用語「療法剤」等は、医学的障害またはその症状を治療するかまたは治療を補助する物質である。療法剤には、限定されるわけではないが、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の使用を補足する方式で、免疫細胞または免疫応答を調節する物質が含まれてもよい。本発明の１つの態様において、療法剤は、療法的抗体、例えば抗ＩＬ－２１Ｒ抗体である。本発明の別の態様において、療法剤は、療法的結合性タンパク質、例えば抗ＩＬ－２１Ｒナノボディである。療法剤の限定されない例および使用を本明細書に記載する。

【００７１】

[0129]本明細書において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質（例えば抗体）の「療法的有効量」は、単回または多数回用量を被験体（例えばヒト患者）に投与した際、障害の少なくとも１つの症状または再発性障害を治療し、防止し、治癒させ、遅延させ、その重症度を減少させ、そして／または回復させるか、あるいはこうした治療の非存在下で予期されるよりも、被験体の生存を延長させるのに有効である結合性タンパク質の量を指す。１

つの態様において、療法的有効量は、少なくとも１つのＩＬ－２１応答性サイトカインまたは遺伝子の発現を調節するのに十分な抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の量であってもよい。

【００７２】

[0130]用語「治療」は、療法的または防止的手段を指す。障害または再発性障害の１つまたはそれより多い症状を防止し、治癒させ、遅延させ、その重症度を減少させ、そして／または回復させるため、あるいはこうした治療の非存在下で予期されるよりも、被験体の生存を延長させるため、医学的障害を有する被験体または当該障害を最終的に獲得しうる被験体に、治療を投与してもよい。

【００７３】

抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質

[0131]本出願の開示は、新規抗原結合性断片を含む新規抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を提供する。結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を得るために、当業者に知られる多くの方法が利用可能である。例えば、組換えＤＮＡ法を用いて、抗体を含む抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を産生してもよい（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）。また、既知の方法にしたがって、ハイブリドーマを生成することによって、モノクローナル抗体を産生してもよい（例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－９９を参照されたい）。次いで、標準法、例えば酵素連結免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）および表面プラズモン共鳴（ＢＩＡＣＯＲＥ^{TM}）分析を用いて、この方式で形成されるハイブリドーマをスクリーニングして、特定の抗原と特異的に結合する抗体を産生する１以上のハイブリドーマを同定する。明記する抗原の任意の型、例えば組換え抗原、天然存在型、その任意の変異体または断片、およびその抗原性ペプチドを免疫原として用いてもよい。

【００７４】

[0132]抗体を含む結合性タンパク質を作製する１つの例示的な方法には、タンパク質発現ライブラリー、例えばファージまたはリボソームディスプレイライブラリーをスクリーニングすることが含まれる。ファージディスプレイは、例えば、米国特許第５，２２３，４０９号；Ｓｍｉｔｈ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１３１５－１７；Ｃｌａｃｋｓｏｎら（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－２８；Ｍａｒｋｓら（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－９７；ならびに国際出願公報第ＷＯ ９２／０１８６１９号；第ＷＯ ９１／０１７２７１号；第ＷＯ ９２／０２０７９１号；第ＷＯ ９２／０１５６７９号；第ＷＯ ９３／００１２８８号；第ＷＯ ９２／００１０４７号；第ＷＯ ９２／００９６９０号；および第ＷＯ ９０／００２８０９号に記載される。

【００７５】

[0133]ディスプレイライブラリーの使用に加えて、明記する抗原を用いて、非ヒト動物、例えばカニクイザル（ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ ｍｏｎｋｅｙ）、ニワトリ、またはげっ歯類（例えばマウス、ハムスター、またはラット）を免疫してもよい。１つの態様において、非ヒト動物には、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部が含まれる。例えば、ヒトＩｇ遺伝子座の巨大断片を用いて、マウス抗体産生が欠損しているマウス系統を操作することが可能である。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を持つ遺伝子に由来する、抗体などの抗原特異的モノクローナル結合性タンパク質を産生し、そして選択してもよい（例えば、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ^{TM}（Ａｍｇｅｎ Ｉｎｃ．，カリフォルニア州サウザンドオークス）；Ｇｒｅｅｎら（１９９４）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．７：１３－２１；米国特許第７，０６４，２４４号；ならびに国際出願公報第ＷＯ ９６／０３４０９６号および第ＷＯ ９６／０３３７３５号を参照されたい）。

【００７６】

[0134]本発明の１つの態様において、当該結合性タンパク質は、非ヒト動物から得られ、そして次いで、当該技術分野に知られる組換えＤＮＡ技術を用いて修飾される（例えばヒト化、脱免疫化、またはキメラ）モノクローナル抗体である。キメラ抗体を作製するた

めの多様なアプローチが記載されてきている（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎら（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８１（２１）：６８５１－５５；Ｔａｋｅｄａら（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１４（６０１０）：４５２－５４；米国特許第４，８１６，５６７号および第４，８１６，３９７号；欧州出願公報第ＥＰ ０ １７１ ４９６号および第ＥＰ ０ １７３ ４９４号；ならびに英国特許第ＧＢ ２ １７７ ０９６号を参照されたい）。また、例えば、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現するが、内因性マウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することが出来ないトランスジェニックマウスを用いて、ヒト化結合性タンパク質を産生してもよい。Ｗｉｎｔｅｒ（米国特許第５，２２５，５３９号）は、本明細書記載のヒト化結合性タンパク質を調製するのに使用可能な、例示的なＣＤＲ移植法を記載する。特定のヒト結合性タンパク質のＣＤＲをすべて、非ヒトＣＤＲの少なくとも一部と交換してもよいし、またはいくつかのＣＤＲのみを非ヒトＣＤＲと交換してもよい。あらかじめ決定された抗原に対するヒト化結合性タンパク質の結合に必要な数のＣＤＲを交換すればよい。

【００７７】

[0135]ヒトＦｖ可変ドメイン由来の同等な配列との抗原結合に直接関与しないＦｖ可変ドメインの配列を交換することによって、ヒト化結合性タンパク質またはその断片を生成してもよい。ヒト化結合性タンパク質またはその断片を生成するための例示的な方法は、例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２－０７；Ｏｉら（１９８６）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４；ならびに米国特許第５，５８５，０８９号；第５，６９３，７６１号；第５，６９３，７６２号；第５，８５９，２０５号；および第６，４０７，２１３号に提供される。これらの方法には、重鎖または軽鎖の少なくとも１つ由来の免疫グロブリンＦｖ可変ドメインのすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離し、操作し、そして発現する工程が含まれる。上述のように、あらかじめ決定されたターゲットに対する抗体を産生するハイブリドーマから、ならびに他の供給源から、こうした核酸を得てもよい。次いで、ヒト化抗体分子をコードする組換えＤＮＡを適切な発現ベクター内にクローニングしてもよい。

【００７８】

[0136]特定の態様において、ヒト化結合性タンパク質は、保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖系列置換および／または逆突然変異の導入によって改善される。こうした改変された免疫グロブリン分子は、当該技術分野に知られるいくつかの技術のいずれによって作製してもよい（例えば、Ｔｅｎｇら（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８０：７３０８－７３；Ｋｏｚｂｏｒら（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ４：７２７９；Ｏｌｓｓｏｎら（１９８２）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．９２：３－１６）；国際出願公報第ＷＯ ９２／００６１９３号；および欧州特許第ＥＰ ０ ２３９ ４００号を参照されたい）。

【００７９】

[0137]また、例えば、国際出願公報第ＷＯ ９８／０５２９７６号および第ＷＯ ００／０３４３１７号に開示される方法により、ヒトＴ細胞エピトープの特異的欠失または「脱免疫化」によって、結合性タンパク質またはその断片を修飾してもよい。簡潔には、結合性タンパク質（例えば抗体由来の結合性タンパク質など）の重鎖および軽鎖可変ドメインを、ＭＨＣクラスＩＩに結合するペプチドに関して分析してもよく；これらのペプチドは、潜在的なＴ細胞エピトープ（国際出願公報第ＷＯ ９８／０５２９７６号および第ＷＯ ００／０３４３１７号に定義されるようなもの）に相当する。潜在的なＴ細胞エピトープの検出のため、「ペプチド・スレッディング（ｐｅｐｔｉｄｅ ｔｈｒｅａｄｉｎｇ）」と称されるコンピュータモデリングアプローチを適用してもよく、そしてさらに、国際出願公報第ＷＯ ９８／０５２９７６号および第ＷＯ ００／０３４３１７号に記載されるような、V_HおよびV_L配列中に存在するモチーフに関して、ヒトＭＨＣクラスＩＩ結合性ペプチドのデータベースを検索してもよい。これらのモチーフは、１８の主要なＭＨＣクラスＩＩ ＤＲアロタイプのいずれにも結合し、そしてしたがって、潜在的なＴ細胞エピトープを構成する。可変ドメイン中の少数のアミノ酸残基を置換することによって

、または単一アミノ酸置換によって、検出された潜在的なＴ細胞エピトープを取り除いてもよい。典型的には、保存的置換を行う。排他的にではないが、しばしば、ヒト生殖系列抗体配列中の位に一般的なアミノ酸を用いてもよい。ヒト生殖系列配列は、例えば、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６－９８；Ｃｏｏｋら（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １６（５）：２３７－４２；Ｃｈｏｔｈｉａら（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７９９－８１７；およびＴｏｍｌｉｎｓｏｎら（１９９５）ＥＭＢＯ Ｊ．１４：４６２８－３８に開示される。Ｖ ＢＡＳＥディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的なディレクトリ（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら，ＭＲＣ Ｃｅｎｔｒｅ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，英国ケンブリッジによってコンパイルされた）を提供する。これらの配列を、例えばフレームワーク領域およびＣＤＲに関するヒト配列の供給源として用いてもよい。また、コンセンサスヒトフレームワーク領域を、例えば米国特許第６，３００，０６４号に記載されるように、用いてもよい。

【００８０】

[0138]特定の態様において、結合性タンパク質は、改変された免疫グロブリン定常またはＦｃ領域を含有してもよい。例えば、本明細書の解説にしたがって産生される結合性タンパク質は、エフェクター分子、例えば補体および／またはＦｃ受容体に、より強くまたはより特異性を持って結合可能であり、これが、エフェクター細胞活性、溶解、補体により媒介される活性、結合性タンパク質クリアランス、および結合性タンパク質半減期などの、結合性タンパク質のいくつかの免疫機能を調節しうる。結合性タンパク質（例えばＩｇＧ抗体）のＦｃ領域に結合する典型的なＦｃ受容体には、限定されるわけではないが、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃＲｎサブクラスの受容体が含まれ、これらの受容体のアレル変異体および選択的スプライシング型が含まれる。Ｆｃ受容体は、例えば、ＲａｖｅｔｃｈおよびＫｉｎｅｔ（１９９１）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－９２；Ｃａｐｅｌら（１９９４）Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２５－３４；およびｄｅ Ｈａａｓら（１９９５）Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０－４１に概説される。さらなる結合性タンパク質／抗体産生技術に関しては、例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）Ｈａｒｌｏｗら監修，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙを参照されたい。本発明は、必ずしも、いかなる特定の供給源、産生法、あるいは結合性タンパク質または抗体の他の特別な性質にも限定されない。

【００８１】

[0139]抗体（免疫グロブリン）を含む結合性タンパク質は、典型的には、各々およそ２５ｋＤａの２つの軽（Ｌ）鎖および各々およそ５０ｋＤａの２つの重（Ｈ）鎖で構成される、四量体グリコシル化タンパク質である。ラムダ（λ）およびカッパ（κ）と称される２つのタイプの軽鎖が抗体中で見られうる。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを５つの主なクラス：Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、およびＭに割り当てることも可能であり、そしてこれらのいくつかをさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２に分けることも可能である。各軽鎖には、Ｎ末端可変（Ｖ）ドメイン（$Ｖ_{Ｌ}$）および定常（Ｃ）ドメイン（$Ｃ_{Ｌ}$）が含まれる。各重鎖には、Ｎ末端Ｖドメイン（$Ｖ_{Ｈ}$）、３つまたは４つのＣドメイン（$Ｃ_{Ｈ}$）、およびヒンジ領域が含まれる。$Ｖ_{Ｈ}$に最も近位の$Ｃ_{Ｈ}$ドメインを$Ｃ_{Ｈ}１$と称する。$Ｖ_{Ｈ}$および$Ｖ_{Ｌ}$ドメインは、フレームワーク領域と呼ばれる比較的保存された配列の４つの領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４）からなり、これがＣＤＲと呼ばれる超可変配列の３つの領域のための足場を形成する。ＣＤＲは、抗体と抗原の特異的相互作用に関与する残基の大部分を含有する。ＣＤＲは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３と呼ばれる。重鎖上のＣＤＲ構成要素は、Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３（また、本明細書において、それぞれ、ＣＤＲ Ｈ１、ＣＤＲ Ｈ２、およびＣＤＲ Ｈ３とも呼ばれる）と呼ばれ、一方、軽鎖上のＣＤＲ構成要素は、Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３（また、本明細書において、それぞれ、ＣＤＲ Ｌ１、ＣＤＲ Ｌ２、およびＣＤＲ Ｌ３とも呼ばれる）と呼ば

れる。

【００８２】

[0140]ＣＤＲ３は、典型的には、抗原結合性部位内の分子多様性の最大の供給源である。ＣＤＲ Ｈ３は、例えば、２アミノ酸残基と同程度に短くてもよいし、または２６アミノ酸より大きくてもよい。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は、当該技術分野に周知である。抗体構造の概説に関しては、例えば、Ｈａｒｌｏｗら（１９８８）上記を参照されたい。当業者は、各サブユニット構造、例えばC_H、V_H、C_L、V_L、ＣＤＲ、および／またはＦＲ構造は、活性断片、例えば抗原に結合するV_H、V_L、またはＣＤＲサブユニットの部分、すなわち抗原結合性断片、または例えば、Ｆｃ受容体および／または補体に結合しそして／またはこれを活性化するC_Hサブユニットの部分を含むことを認識するであろう。ＣＤＲは、典型的には、Ｋａｂａｔ ＣＤＲ（Ｋａｂａｔら（１９９１）上記に記載されるようなもの）を指す。抗原結合性部位を性質決定するための別の基準は、例えば、Ｃｈｏｔｈｉａら（１９９２）上記、およびＴｏｍｌｉｎｓｏｎら（１９９５）上記に記載されるような超可変ループに注意を向けることである。さらに別の基準は、Ｏｘｆｏｒｄ ＭｏｌｅｃｕｌａｒのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアによって用いられる「ＡｂＭ」定義である（一般的には、例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｄｏｍａｉｎｓ：Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（２００１）ＤｕｅｂｅｌおよびＫｏｎｔｅｒｍａｎｎ監修，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，ハイデルベルグ中を参照されたい）。Ｃｈｏｔｈｉａ超可変ループまたはＡｂＭ定義ループに関して記載されるのと類似の関係を用いて、Ｋａｂａｔ ＣＤＲに関して記載される態様を実行してもよい。

【００８３】

[0141]Ｆａｂ断片は、定常領域間のジスルフィド結合によって共有結合される、V_H－C_H１およびV_L－C_Lドメインからなる。F_v断片はより小さく、そして非共有的に連結されたV_HおよびV_Lドメインからなる。非共有的に連結されたドメインが解離する傾向を克服するため、ｓｃＦｖを構築してもよい。ｓｃＦｖは、（１）V_HのＣ末端をV_LのＮ末端に、あるいは（２）V_LのＣ末端をV_HのＮ末端に連結する、柔軟なポリペプチドを含有する。例えば、１５量体$(Gly_4Ser)_3$ペプチドがリンカーとして使用可能であるが、他のリンカーが当該技術分野に知られる。

【００８４】

[0142]アセンブリーおよび体細胞突然変異後の抗体遺伝子の配列は、非常に多様であり、そしてこれらの多様な遺伝子は、10^{10}の異なる抗体分子をコードすると概算される（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｇｅｎｅｓ（第２版 １９９５）Ｊｏｎｉｏら監修，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，カリフォルニア州サンディエゴ）。

【００８５】

[0143]本発明の特定の態様において、結合性タンパク質は、単一ドメイン結合性タンパク質である。単一ドメイン結合性タンパク質には、ＣＤＲが単一ドメインポリペプチドの一部である、結合性タンパク質が含まれる。例には、限定されるわけではないが、重鎖結合性タンパク質、天然に軽鎖を欠く結合性タンパク質、慣用的な四鎖抗体由来の単一ドメイン結合性タンパク質、操作結合性タンパク質、および抗体由来のもの以外の単一ドメインタンパク質足場が含まれる。単一ドメイン結合性タンパク質には、当該技術分野に知られる任意のもの、ならびに将来決定されるかまたは学ばれる単一ドメイン結合性タンパク質が含まれる。

【００８６】

[0144]単一ドメイン結合性タンパク質は、任意の種に由来してもよく、こうした種には、限定されるわけではないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、魚、サメ、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、およびウシが含まれる。本発明の１つの側面において、単一ドメイン結合性タンパク質は、魚に見られる免疫グロブリンの可変領域由来であってもよく、例えばサメの血清に見られる新規抗原受容体（ＮＡＲ）として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由

来である。ＮＡＲの可変領域由来の単一ドメイン結合性タンパク質（「ＩｇＮＡＲ」）を産生する方法が、国際出願公報第ＷＯ　０３／０１４１６１号およびＳｔｒｅｌｔｓｏｖ（２００５）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．　１４：２９０１－０９に記載される。単一ドメイン結合性タンパク質にはまた、当該技術分野において、軽鎖を欠く重鎖抗体として知られる、天然存在単一ドメイン結合性タンパク質も含まれる。天然に軽鎖を欠く重鎖抗体由来のこの可変ドメインは、本明細書において、四鎖免疫グロブリンの慣用的なV_Hと区別するため、ＶＨＨまたはナノボディとして知られる。こうしたＶＨＨ分子は、ラクダ科種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、およびグアナコで作製された抗体由来であってもよく、そしてときに、ラクダ科またはラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）可変ドメインと呼ばれる（例えば、本明細書に援用される、Ｍｕｙｌｄｅｒｍａｎｓ（２００１）Ｊ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　７４（４）：２７７－３０２を参照されたい）。ラクダ科のもの以外の他の種もまた、天然に軽鎖を欠く重鎖結合性タンパク質を産生しうる。ＶＨＨ分子は、ＩｇＧ分子よりも約１０倍小さい。これらは単一ポリペプチドであり、そして非常に安定で、極端なｐＨおよび温度条件に耐性である。さらに、これらは、プロテアーゼの作用に耐性であり、これは慣用的な抗体には当てはまらない。さらに、ＶＨＨをｉｎ　ｖｉｔｒｏで発現させると、適切にフォールディングされた、高収量の機能性ＶＨＨが生じうる。さらに、ラクダ科で生成される結合性タンパク質は、抗体ライブラリーを介して、またはラクダ科以外の哺乳動物の免疫を介して生成される抗体によって認識されるもの以外のエピトープを認識するであろう（例えば、本明細書に援用される、国際出願公報第ＷＯ　９７／０４９８０５号および第ＷＯ　９４／００４６７８号を参照されたい）。

【００８７】

[0145]「二重特異性」または「二重官能性」結合性タンパク質は、２つの異なる重鎖／軽鎖対および２つの異なる結合性部位を有する、人工的なハイブリッド結合性タンパク質である。ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’断片の連結を含む多様な方法によって、二重特異性結合性タンパク質を産生してもよい（例えば、ＳｏｎｇｓｉｖｉｌａｉおよびＬａｃｈｍａｎｎ（１９９０）Ｃｌｉｎ．　Ｅｘｐ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　７９：３１５－２１；　Ｋｏｓｔｅｌｎｙら（１９９２）Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１４８：１５４７－５３を参照されたい）。１つの態様において、二重特異性結合性タンパク質は、免疫グロブリン定常領域を介して、第二の結合性ドメインポリペプチドに連結された、第一の結合性ドメインポリペプチド、例えばＦａｂ’断片を含む。

【００８８】

[0146]本発明記載の別の結合性タンパク質は、例えば、免疫グロブリン・ヒンジまたはヒンジ作用領域ポリペプチドに融合したかまたは別の方式で連結され、これが続いて、C_H１以外の免疫グロブリン重鎖由来の１以上の天然または操作定常領域、例えば、ＩｇＧおよびＩｇＡ１のC_H２およびC_H３領域またはＩｇＥのC_H３およびC_H４領域に融合したか、または別の方式で連結された、結合性ドメインポリペプチドを含む結合性ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質を含んでもよい（より完全な説明に関しては、例えば、本明細書に援用される、米国出願公報第２００５／０１３６０４９号を参照されたい）。結合性ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質には、さらに、ヒンジ領域ポリペプチドに融合したか、または別の方式で連結された天然または操作免疫グロブリン重鎖C_H２定常領域ポリペプチド（あるいはＩｇＥに完全にまたは部分的に由来する構築物の場合、C_H３）、および当該C_H２定常領域ポリペプチド（あるいはＩｇＥに完全にまたは部分的に由来する構築物の場合、C_H３）に融合したか、または別の方式で連結された、天然または操作免疫グロブリン重鎖C_H３定常領域ポリペプチド（あるいはＩｇＥに完全にまたは部分的に由来する構築物の場合、C_H４）を含む領域が含まれてもよい。典型的には、こうした結合性ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、補体結合、および／またはターゲット、例えばヒトＩＬ－２１Ｒなどのターゲット抗原からなる群より選択される、少なくとも１つの免疫学的活性が可能である。

【００８９】

[0147]本発明の結合性タンパク質はまた、ペプチド模倣体も含んでもよい。ペプチド模倣体は、タンパク質二次構造の要素を模倣する、ペプチド含有分子である（例えば、本明細書にその全体が援用される、Ｊｏｈｎｓｏｎら，　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｔｕｒｎ　Ｍｉｍｅｔｉｃｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｐｈａｒｍａｃｙ（１９９３）Ｐｅｚｚｕｔｏら監修，　Ｃｈａｐｍａｎ　ａｎｄ　Ｈａｌｌ，　ニューヨークを参照されたい）。ペプチド模倣体の使用の背後にある論理的根拠は、タンパク質のペプチド主鎖が、抗体および抗原間のものなどの分子相互作用を容易にする方式で、主にアミノ酸側鎖を配向させるために存在することである。ペプチド模倣体は、天然分子に類似の分子相互作用を可能にするよう期待される。これらの原理を用いて、本明細書に開示するターゲティングペプチドの天然特性の多くを有するが、改変され、そして潜在的に改善された特性を持つ、第二世代分子を操作してもよい。

【００９０】

[0148]本発明を実施するのに有用な結合性タンパク質の他の態様には、融合タンパク質が含まれる。これらの分子は、一般的に、Ｎ末端またはＣ末端で、第二のポリペプチドまたはタンパク質のすべてまたは一部に連結された、ターゲティングペプチド、例えばＩＬ－２１Ｒまたは抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のすべてまたは実質的な部分を有する。例えば、融合タンパク質は、異種宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にするため、他の種由来のリーダー（またはシグナル）配列を使用してもよい。例えば、リーダー（またはシグナル）配列を含む、本発明の結合性タンパク質およびその抗原結合性断片のアミノ酸配列、またはこうしたアミノ酸配列をコードする核酸配列を、配列番号８７～１０９および２３９～２４８から選択してもよい。別の有用な融合体には、融合タンパク質の精製を容易にする、結合性タンパク質エピトープなどの、免疫学的活性ドメインの付加が含まれる。融合接合部またはその近傍に切断部位が含まれると、精製後の外来性ポリペプチドの除去が容易になるであろう。他の有用な融合には、機能ドメイン、例えば酵素由来の活性部位、グリコシル化ドメイン、細胞ターゲティングシグナル、または膜貫通領域の連結が含まれる。融合タンパク質内に取り込まれてもよいタンパク質またはペプチドの例には、限定されるわけではないが、細胞分裂阻害タンパク質、細胞破壊性タンパク質、アポトーシス促進剤、抗血管形成剤、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、ペプチド薬剤、抗体、抗体のＦａｂ断片、抗原、受容体タンパク質、酵素、レクチン、ＭＨＣタンパク質、細胞接着タンパク質、および結合性タンパク質が含まれる。融合タンパク質を生成する方法は、当業者に周知である。こうしたタンパク質は、例えば、二重官能性架橋試薬を用いて化学的に付着させることによって、完全融合タンパク質をｄｅ　ｎｏｖｏ合成することによって、あるいはターゲティングペプチドをコードするＤＮＡ配列を、第二のペプチドまたはタンパク質をコードするＤＮＡ配列に付着させた後、損なわれていない融合タンパク質を発現することによって、産生可能である。

【００９１】

[0149]１つの態様において、２つの定常領域ドメインおよびヒンジ領域を含有するが、可変領域を欠く、免疫グロブリン重鎖定常領域、例えばＦｃ断片に、ターゲティングペプチド、例えばＩＬ－２１Ｒを融合させる（例えば本明細書に援用される、米国特許第６，０１８，０２６号および第５，７５０，３７５号を参照されたい）。Ｆｃ領域は、天然存在Ｆｃ領域であってもよいし、または特定の品質、例えば療法的品質、循環時間、凝集減少が改善されるように改変されていてもよい。Ｆｃ領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、典型的には、融合されない対応物よりも、ｉｎ　ｖｉｖｏでより高い半減期を示す。さらに、Ｆｃ領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化／多量体化を可能にする。

【００９２】

[0150]本発明の１つの側面は、ＩＬ－２１Ｒに結合する結合性タンパク質およびその抗原結合性断片を含む。本開示は、ヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーに由来する新規ＣＤＲを提供する。ＣＤＲを所持するために一般的に用いられるタンパク質構造は、抗体

重鎖または軽鎖あるいはその一部であり、ここでＣＤＲは、天然存在ＣＤＲと会合する領域に位置する。可変ドメインの構造および位置は、Ｋａｂａｔら（（１９９１）上記）に記載されるように決定可能である。

【００９３】

[0151]本発明の結合性タンパク質（およびその抗原結合性断片）の例示的態様は、ＡｂＡ～ＡｂＵ、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、およびＬ２３～Ｌ２５と同定される。本発明の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の限定されない例示的態様のＤＮＡおよびアミノ酸配列を配列番号５～１９５、２１３～２２９、および２３９～２４８に示す。本発明の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質のいくつかの例示的な態様のＤＮＡおよびアミノ酸配列を、そのｓｃＦｖ断片、V_HおよびV_Lドメイン、およびＣＤＲ、ならびにその現在のコードおよび以前の名称を含めて、図１７～２５、および表２Ａおよび２Ｂに示す。

【００９４】

表２Ａ：現在の抗体コードおよび以前の名称の相関

【００９５】

【表２－１】

現在のコード	以前の名称
AbA	VHP/VL2
AbB	VHP/VL3
AbC	VHP/VL11
AbD	VHP/VL13
AbE	VHP/VL14
AbF	VHP/VL17
AbG	VHP/VL18
AbH	VHP/VL19
AbI	VHP/VL24
AbJ	VH3/VLP
AbK	VH3/VL3
AbL	VH3/VL13
AbM	VH6/VL13
AbN	VH6/VL24
AbO	VHP/VL16; VHPTM/VL16
AbP	VHP/VL20; VHPTM/VL20
AbQ	VH3/VL2; VH3DM/VL2
AbR	VH3/VL18; VH3DM/VL18
AbS	VHP/VL6; VHPTM/VL6; VL6
AbT	VHP/VL9; VHPTM/VL9; VL9
AbU	VHP/VL25; VHPTM/VL25
AbV	VH3TM/VL2
AbW	VH3TM/VL18
AbX	VHPDM/VL9
AbY	VHPg4/VL9
AbZ	VHPWT/VL9

【００９６】

表２Ｂ：本発明の例示的な結合性タンパク質のV_HおよびV_Lドメイン、ｓｃＦｖ、ならびにＣＤＲのアミノ酸およびヌクレオチド配列

【００９７】

【表２－２】

領域	タイプ	H3 配列番号	H4 配列番号	H5 配列番号	H6 配列番号	L1 配列番号
V_H	AA	14	16	18	20	6
V_L	AA	10	10	10	10	22
scFv	AA	110	112	114	116	118
CDR H1	AA	163	163	163	163	163
CDR H2	AA	164	164	164	164	164
CDR H3	AA	165	166	167	168	169
CDR L1	AA	194	194	194	194	194
CDR L2	AA	195	195	195	195	195
CDR L3	AA	170	170	170	170	171
V_H	DNA	13	15	17	19	5
V_L	DNA	9	9	9	9	21
scFv	DNA	109	111	113	115	117

表２Ｂ（続き）

領域	タイプ	L2 配列番号	L3 配列番号	L4 配列番号	L5 配列番号	L6 配列番号
V_H	AA	6	6	6	6	6
V_L	AA	24	26	28	30	32
scFv	AA	120	122	124	126	128
CDR H1	AA	163	163	163	163	163
CDR H2	AA	164	164	164	164	164
CDR H3	AA	169	169	169	169	169
CDR L1	AA	194	194	194	194	194
CDR L2	AA	195	195	195	195	195
CDR L3	AA	172	173	174	175	176
V_H	DNA	5	5	5	5	5
V_L	DNA	23	25	27	29	31
scFv	DNA	119	121	123	125	127

【００９８】

【表２－３】

表２Ｂ（続き）

領域	タイプ	L8 配列番号	L9 配列番号	L10 配列番号	L11 配列番号	L12 配列番号
V_H	AA	6	6	6	6	6
V_L	AA	34	36	38	40	42
scFv	AA	130	132	134	136	138
CDR H1	AA	163	163	163	163	163
CDR H2	AA	164	164	164	164	164
CDR H3	AA	169	169	169	169	169
CDR L1	AA	194	194	194	194	194
CDR L2	AA	195	195	195	195	195
CDR L3	AA	177	178	179	180	181
V_H	DNA	5	5	5	5	5
V_L	DNA	33	35	37	39	41
scFv	DNA	129	131	133	135	137

表２Ｂ（続き）

領域	タイプ	L13 配列番号	L14 配列番号	L15 配列番号	L16 配列番号	L17 配列番号
V_H	AA	6	6	6	6	6
V_L	AA	44	46	48	50	52
scFv	AA	140	142	144	146	148
CDR H1	AA	163	163	163	163	163
CDR H2	AA	164	164	164	164	164
CDR H3	AA	169	169	169	169	169
CDR L1	AA	194	194	194	194	194
CDR L2	AA	195	195	195	195	195
CDR L3	AA	182	183	184	185	186
V_H	DNA	5	5	5	5	5
V_L	DNA	43	45	47	49	51
scFv	DNA	139	141	143	145	147

【００９９】

【表２－４】

表２Ｂ（続き）

領域	タイプ	L18 配列番号	L19 配列番号	L20 配列番号	L21 配列番号	L23 配列番号
V_H	AA	6	6	6	6	6
V_L	AA	54	56	58	60	62
scFv	AA	150	152	154	156	158
CDR H1	AA	163	163	163	163	163
CDR H2	AA	164	164	164	164	164
CDR H3	AA	169	169	169	169	169
CDR L1	AA	194	194	194	194	194
CDR L2	AA	195	195	195	195	195
CDR L3	AA	187	188	189	190	191
V_H	DNA	5	5	5	5	5
V_L	DNA	53	55	57	59	61
scFv	DNA	149	151	153	155	157

表２Ｂ（続き）

領域	タイプ	L24 配列番号	L25 配列番号
V_H	AA	6	6
V_L	AA	64	66
scFv	AA	160	162
CDR H1	AA	163	163
CDR H2	AA	164	164
CDR H3	AA	169	169
CDR L1	AA	194	194
CDR L2	AA	195	195
CDR L3	AA	192	193
V_H	DNA	5	5
V_L	DNA	63	65
scFv	DNA	159	161

【０１００】

[0152]本発明の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質は、抗体定常領域またはその一部を含んでもよい。例えば、V_Lドメインが、そのＣ末端で、ＣκまたはＣλのような軽鎖定常ドメインに付着していてもよい。同様に、V_Hドメインまたはその一部が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭ、ならびに任意のアイソタイプサブクラスのような、重鎖のすべてまたは一部に付着していてもよい。定常領域は当該技術分野に知られる（例えば、Ｋａｂａｔら（１９９１）上記を参照されたい）。したがって、本発明の範囲内の結合性タンパク質には、当該技術分野に知られる定常領域と組み合わされた、V_HおよびV_Lドメイン、またはその一部が含まれる。

【０１０１】
[0153]特定の態様は、ＡｂＡ～ＡｂＺ、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、および／またはＬ２３～Ｌ２５由来のＦｖ断片のV_Hドメイン、V_Lドメイン、またはその組み合わせを含む。さらなる態様は、V_HおよびV_Lドメイン由来の１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つのＣＤＲを含む。ＣＤＲ配列（単数または複数）が、配列番号５～１９５、２１３～２２９、および２３９～２４８に示す配列内に存在する１以上のＣＤＲ配列（単数または複数）と同じであるかまたは類似である（すなわち不十分にしか異ならない）結合性タンパク質が、本発明の範囲内に含まれる。
【０１０２】
[0154]特定の態様において、V_Hおよび／またはV_Lドメインは生殖系列であってもよく、すなわち、これらのドメインのＦＲは、生殖系列細胞によって産生されるものとマッチするように、慣用的な分子生物学的技術を用いて、突然変異される。他の態様において、ＦＲ配列は、コンセンサス生殖系列配列から異なったままである。
【０１０３】
[0155]１つの態様において、突然変異誘発を用いて、結合性タンパク質を１以上の生殖系列配列により類似のものにする。これは、突然変異が、体細胞突然変異誘発を通じて、またはエラープローンＰＣＲを通じて、結合性タンパク質（例えば抗体）のＦＲ内に導入される場合、望ましい可能性もある。V_HおよびV_Lドメインの生殖系列配列は、ＶＢＡＳＥデータベース（ＭＲＣ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、英国）に対してアミノ酸および核酸配列整列を行うことによって、同定可能である。ＶＢＡＳＥは、ＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）およびＥＭＢＬデータライブラリーの現在のリリース中のものを含む、千の公開された配列に渡ってコンパイルされたすべてのヒト生殖系列可変領域配列の包括的ディレクトリである。いくつかの態様において、ｓｃＦｖのＦＲは、ＶＢＡＳＥデータベース中の最も近いマッチと一致して突然変異されており、そしてＣＤＲ部分は損なわれないままである。
【０１０４】
[0156]特定の態様において、本発明の結合性タンパク質は、これらが、ヒトＩＬ－２１ＲへのＡｂＡ～ＡｂＺ、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、またはＬ２３～Ｌ２５の結合を競合的に阻害するように、ＡｂＡ～ＡｂＺ、Ｈ３～Ｈ６、Ｌ１～Ｌ６、Ｌ８～Ｌ２１、またはＬ２３～Ｌ２５によって認識されるエピトープと同じエピトープと、特異的に反応する。こうした結合性タンパク質を、競合的結合アッセイにおいて決定してもよい。１つの態様において、ヒトＩＬ－２１Ｒに関するこれらの結合性タンパク質の結合定数（K_A）は、少なくとも$10^5 M^{-1} s^{-1}$である。当該技術分野に知られる技術、例えばＥＬＩＳＡ、バイオセンサー技術（生物特異的相互作用分析など）または本出願に記載するものを含む他の技術を用いて、結合アフィニティを決定してもよい。
【０１０５】
[0157]本発明の結合性タンパク質は、他のタンパク質、例えばＩＬ－２１Ｒのすべてまたは一部を含む組換えタンパク質などに結合してもよい。
[0158]一般の当業者は、開示する結合性タンパク質を用いて、ＩＬ－２１Ｒと幾分異なるタンパク質を検出し、測定し、そして／または阻害することも可能であることを認識するであろう。例えば、これらのタンパク質は、ＩＬ－２１Ｒの相同体であってもよい。抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質は、配列番号２または４に示す配列中の少なくとも１００、８０、６０、４０、または２０の連続アミノ酸の任意の配列に、少なくとも約６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれより同一である配列を含むタンパク質に結合すると予期される。
【０１０６】
[0159]配列相同性分析に加えて、エピトープマッピング（例えば、Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（１９９６）Ｍｏｒｒｉｓ監修, Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓを参照されたい）、ならびに二次および三次構造分析を行って、ここに開示する結合性タンパク質および抗原との複合体によって仮定される特異的３Ｄ構造を同定しても

よい。こうした方法には、限定されるわけではないが、ｘ線結晶学（Ｅｎｇｓｔｏｍ（１９７４）Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｅｘｐ．　Ｂｉｏｌ．　１１：７－１３）および本発明の結合性タンパク質のバーチャル提示のコンピュータモデリング（Ｆｌｅｔｔｅｒｉｃｋら（１９８６）Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒａｐｈｉｃｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｍｏｄｅｌｉｎｇ，　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，　ニューヨーク州コールドスプリングハーバー中）が含まれる。

【０１０７】

[0160]本開示は、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を得るための方法を提供する。当該方法は、本明細書開示の配列から改変されたV_Hおよび／またはV_L配列（単数または複数）を持つ結合性タンパク質を生成する工程を含む。こうした結合性タンパク質は、当該技術分野に知られる技術を用いて、当業者によって得られうる。例えば、アミノ酸置換、欠失、または付加を、ＦＲおよび／またはＣＤＲ領域中に導入してもよい。ＦＲ変化は、通常、結合性タンパク質の安定性および免疫原性を改善するように設計され、一方、ＣＤＲ変化は、典型的には、その抗原に対する結合性タンパク質のアフィニティを増加させるよう設計される。１以上のＣＤＲ配列を改変し、そしてターゲットに対する結合性タンパク質のアフィニティを測定することによって、アフィニティを増加させる変化を試験してもよい（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（第２版　１９９５）Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ監修，　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓを参照されたい）。

【０１０８】

[0161]ＣＤＲ配列が、配列番号５～１９５、２１３～２２９、および２３９～２４８に示すか、またはこれらの配列内に含まれるものと、不十分にしか異ならない結合性タンパク質が、本発明の範囲内に含まれる。典型的には、こうした不十分な相違（単数または複数）は、アミノ酸を、類似の電荷、疎水性、または立体化学特性を有するアミノ酸で置換することを伴う。結合性タンパク質の結合特性に不都合に影響しない（例えば非置換結合性タンパク質に比較した際、５０％より多くアフィニティを減少させない）ならば、ＣＤＲ領域とは対照的に、ＦＲ領域において、より徹底的な置換もまた行ってもよい。また、結合性タンパク質を生殖系列化するため、またはその抗原結合性部位を安定化させるために、置換を行ってもよい。

【０１０９】

[0162]保存的修飾は、こうした修飾を行う分子のものと類似の機能的および化学的特性を有する分子を生じるであろう。対照的に、分子の機能的および／または化学的特性における実質的な修飾は、（１）例えばシートまたはらせんコンホメーションとしての、置換領域中の分子主鎖の構造、（２）ターゲット部位での分子の電荷または疎水性、および／または（３）分子のサイズ、を維持する際の効果が有意に異なる、アミノ酸配列中の置換を選択することによって、達成可能である。

【０１１０】

[0163]例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位のアミノ酸残基の極性または電荷にほとんどまたはまったく影響がないように、天然アミノ酸残基を規範的残基で置換することを伴ってもよい（例えば、ＭａｃＬｅｎｎａｎら（１９９８）Ａｃｔａ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｓｃａｎｄ．　Ｓｕｐｐｌ．　６４３：５５－６７；　Ｓａｓａｋｉら（１９９８）Ａｄｖ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　３５：１－２４を参照されたい）。

【０１１１】

[0164]望ましいアミノ酸置換は（保存的であれまたは非保存的であれ）、置換が所望される時点の当業者によって、決定可能である。例えば、アミノ酸置換を用いて、分子配列の重要な残基を同定するか、あるいは本明細書記載の分子のアフィニティを増加させるかまたは減少させることも可能である。例示的なアミノ酸置換には、限定されるわけではないが、表３に示すものが含まれる。

【０１１２】

表３．例示的なアミノ酸置換

【０１１３】

【表３】

元来の残基	例示的置換	より保存的な置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala, Gly	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

【０１１４】

[0165]特定の態様において、保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成よりも、典型的には化学的ペプチド合成によって取り込まれる、非天然存在アミノ酸残基も含む。

【０１１５】

[0166]１つの態様において、変異体V_Hドメインを作製するための方法は、開示するV_Hドメインにおいて、少なくとも１つのアミノ酸を付加するか、欠失させるか、または置換し、あるいは開示するV_Hドメインを少なくとも１つのV_Lドメインと組み合わせて、そしてＩＬ－２１Ｒ結合またはＩＬ－２１Ｒ／ＩＬ－２１活性の調節に関して、変異体V_Hドメインを試験する工程を含む。

【０１１６】

[0167]変異体V_Lドメインを作製するための類似の方法は、開示するV_Lドメインにおいて、少なくとも１つのアミノ酸を付加するか、欠失させるか、または置換し、あるいは開示するV_Lドメインを少なくとも１つのV_Hドメインと組み合わせて、そしてＩＬ－２１Ｒ結合またはＩＬ－２１Ｒ活性の調節に関して、変異体V_Lドメインを試験する工程を

含む。

【０１１７】

[0168]いくつかの別の態様において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を、化学的架橋または組換え法によって、タンパク質（例えばアルブミン）に連結してもよい。また、米国特許第４，６４０，８３５号；第４，４９６，６８９号；第４，３０１，１４４号；第４，６７０，４１７号；第４，７９１，１９２号；および第４，１７９，３３７号に示される方式で、開示する結合性タンパク質を、多様な非タンパク質性ポリマー（例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン）に連結してもよい。結合性タンパク質を、例えばポリマーに共有コンジュゲート化することによって化学的に修飾して、血液循環中の半減期を増加させてもよい。例示的なポリマーおよび付着法が、米国特許第４，７６６，１０６号；第４，１７９，３３７号；第４，４９５，２８５号；および第４，６０９，５４６号に示される。

【０１１８】

[0169]開示する結合性タンパク質を修飾してグリコシル化を改変してもよく；すなわち少なくとも１つの炭水化物部分を除去するかまたは当該結合性タンパク質に付加してもよい。グリコシル化部位の欠失または付加は、当該技術分野に周知のグリコシル化コンセンサス部位が欠失するかまたは生成されるようにアミノ酸配列を変化させることによって、達成可能である。炭水化物部分を付加する別の手段は、結合性タンパク質、例えば抗体のアミノ酸残基にグリコシドを化学的または酵素的にカップリングすることである（例えば、国際出願公報第ＷＯ　８７／０５３３０号およびＡｐｌｉｎら（１９８１）ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　２２：２５９－３０６を参照されたい）。また、炭水化物部分の除去を化学的または酵素的に達成してもよい（例えば、Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎら（１９８７）Ａｒｃｈ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　２５９：５２；　Ｅｄｇｅら（１９８１）Ａｎａｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　１１８：１３１；およびＴｈｏｔａｋｕｒａら（１９８７）Ｍｅｔｈ．　Ｅｎｚｙｍｏｌ．　１３８：３５０を参照されたい）。Ｆｃドメインのアミノ酸を変化させると、医薬組成物の免疫原性が増進される可能性もあるため、炭水化物構造の修飾が好ましい可能性もある（例えば、国際出願公報第ＷＯ　２００８／０５２０３０号を参照されたい）。免疫グロブリン分子に関して、ＣＨ２ドメインのＡｓｎ－２９７へのＮ連結炭水化物の付着は、ＡＤＣＣ活性に非常に重要であることが立証されてきている。酵素的にまたはＮ連結コンセンサス部位の突然変異によってこれを除去すると、ＡＤＣＣ活性は、ほとんどまたはまったくなくなる。糖タンパク質において、炭水化物は、トリペプチドモチーフ、Ａｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒ／Ｓｅｒ中のアスパラギン側鎖のアミド窒素原子に付着しうる。Ｎ連結グリコシル化と称されるこのタイプのグリコシル化は、小胞体（ＥＲ）で始まり、複数の単糖をドリコールリン酸に付加して、１４残基分枝炭水化物複合体を形成する。次いで、この炭水化物複合体は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ（ＯＳＴ）複合体によってタンパク質にトランスファーされる。糖タンパク質がＥＲ管腔を離れる前に、１４残基オリゴ糖から３つのグルコース分子が除去される。酵素ＥＲグルコシダーゼＩ、ＥＲグルコシダーゼＩＩおよびＥＲマンノシダーゼがＥＲプロセシングに関与する。続いて、当該ポリペプチドは、ゴルジ複合体に輸送され、ここでＮ連結糖鎖が多くの異なる方式で修飾される。ゴルジ複合体のシス区画および中間区画において、元来の１４糖Ｎ連結複合体は、マンノース（Ｍａｎ）残基の除去を通じて切り取られ、そしてＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮａｃ）および／またはフコース（Ｆｕｃ）残基の付加を通じて伸長される。多様な型のＮ連結炭水化物は、一般的に、共通して、３つのマンノースおよび２つのＮ－アセチルグルコサミン残基からなる五糖コアを有する。最後に、トランスゴルジにおいて、他のＧｌｃＮａｃ残基が付加される可能性もあり、その後、ガラクトース（Ｇａｌ）および末端シアル酸（Ｓｉａｌ）が続く。ゴルジ複合体における炭水化物プロセシングは、ＥＲで行われる「コアグリコシル化」と区別するため、「末端グリコシル化」と称される。最終複合体炭水化物単位は、多くの型および構造を取ることも可能であり、このうちあるものは、２つ、３つまたは４つの分枝（二分岐、三分岐または四分岐と称される）を有する。多くの酵素がゴルジプロセ

シングに関与し、これには、ゴルジマンノシダーゼＩＡ、ＩＢおよびＩＣ、ＧｌｕｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ、ゴルジマンノシダーゼＩＩ、ＧｌｃＮａｃトランスフェラーゼＩＩ、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびシアリルトランスフェラーゼが含まれる。

【０１１９】

[0170]結合性タンパク質の定常領域（例えば抗体の定常領域など）を改変するための方法が当該技術分野に知られる。定常部分中の少なくとも１つのアミノ酸残基を異なる残基で置換することによって、改変された機能（例えば、細胞上のＦｃＲまたは補体のＣ１構成要素などのエフェクターリガンドに対する改変されたアフィニティ）を持つ結合性タンパク質を産生してもよい（例えば、欧州出願公報第ＥＰ　０　３８８　１５１号、ならびに米国特許第５，６２４，８２１号および第５，６４８，２６０号を参照されたい）。結合性タンパク質のネズミまたは他の種に適用された場合、類似の機能を減少させるかまたは除去するであろう、類似のタイプの改変を記載することも可能である。

【０１２０】

[0171]例えば、ＦｃＲ（例えばＦｃガンマＲ１）またはＣ１ｑに対する、結合性タンパク質（例えばヒトＩｇＧなどのＩｇＧ）のＦｃ領域のアフィニティを改変することが可能である。少なくとも１つの明記する残基を、側鎖上に適切な官能性を有する少なくとも１つの残基で置換することによって、あるいはグルタミン酸もしくはアスパラギン酸などの荷電官能基、またはおそらくフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンもしくはアラニンなどの芳香族非極性残基を導入することによって、アフィニティを改変することも可能である（例えば、米国特許第５，６２４，８２１号を参照されたい）。

【０１２１】

[0172]例えば、ＩｇＧ定常領域中の残基２９７（アスパラギン）をアラニンで置換すると、エフェクター細胞の補充が有意に阻害される一方、ＣＩｑに対するアフィニティはわずかにしか減少しない（約３倍弱い）（例えば米国特許第５，６２４，８２１号を参照されたい）。重鎖中の残基の番号付けは、ＥＵインデックスのものである（Ｋａｂａｔら（１９９１）上記を参照されたい）。この改変によって、グリコシル化部位が破壊され、そして、炭水化物の存在がＦｃ受容体結合に必要であると考えられる。グリコシル化部位を破壊する、この部位でのいかなる他の置換も、溶解活性の類似の減少を引き起こすと考えられる。他のアミノ酸置換、例えば、残基３１８（Ｇｌｕ）、３２０（Ｌｙｓ）および３２２（Ｌｙｓ）の任意の１つのＡｌａへの変化もまた、ＩｇＧ抗体のＦｃ領域へのＣ１ｑ結合を無効にすることが知られる（例えば、米国特許第５，６２４，８２１号を参照されたい）。

【０１２２】

[0173]Ｆｃ受容体との相互作用が減少した、修飾された結合性タンパク質を産生してもよい。例えば、ヒトＦｃガンマＲ１受容体に結合するヒトＩｇＧ$_3$において、Ｌｅｕ２３５をＧｌｕに変化させると、受容体との相互作用が破壊されることが示されてきている。また、結合性タンパク質のヒンジ連結領域中の隣接するまたは近接する部位に対する突然変異（例えば残基２３４、２３５および２３７のＡｌａでの置換）を用いて、ＦｃガンマＲ１受容体に対する結合性タンパク質アフィニティに影響を及ぼしてもよい。重鎖中の残基の番号付けは、ＥＵインデックスに基づく（Ｋａｂａｔら（１９９１）上記を参照されたい）。したがって、本発明のいくつかの態様において、本発明の結合性タンパク質のＦｃ領域は、例えば、２３４位でのＬｅｕからＡｌａへの変化（Ｌ２３４Ａ）、２３５位でのＬｅｕからＡｌａへの変化（Ｌ２３５Ａ）、および／または２３７位でのＧｌｙからＡｌａへの変化（Ｇ２３７Ａ）などの、少なくとも１つの定常領域突然変異を含有する。１つの態様において、結合性タンパク質のＦｃ領域は、２つの定常領域突然変異、Ｌ２３４ＡおよびＧ２３７Ａを含有する（すなわち「二重突然変異体」または「ＤＭ」）。別の態様において、結合性タンパク質のＦｃ領域は、３つの定常領域突然変異、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５ＡおよびＧ２３７Ａを含有する（すなわち「三重突然変異体」または「ＴＭ」）。例えば、ヒトＩｇＧ定常領域三重突然変異体を配列番号１９６に示す。

【０１２３】

[0174]例えばＣＨ２ドメインのＮ末端領域中の少なくとも１つのアミノ酸を改変することによって、結合性タンパク質の溶解活性を改変するためのさらなる方法が、国際出願公報第ＷＯ　９４／０２９３５１号および米国特許第５，６２４，８２１号に記載される。

【０１２４】

[0175]本発明の結合性タンパク質を、検出可能または官能性標識でタグ化してもよい。これらの標識には、放射標識（例えば^{131}Ｉおよび^{99}Ｔｃ）、酵素標識（例えば西洋ワサビ（ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ）ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼ）、および他の化学的部分（例えばビオチン）が含まれる。

【０１２５】

[0176]本発明はまた、ＩＬ－２１Ｒ、特にヒトＩＬ－２１Ｒに結合する、単離結合性タンパク質またはその抗原結合性断片も特徴としてもよい。特定の態様において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質は、以下の特性の少なくとも１つを有してもよい：（１）モノクローナル性または単一特異性結合性タンパク質である；（２）ヒト結合性タンパク質である；（３）ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生成結合性タンパク質である；（４）ｉｎ　ｖｉｖｏ生成結合性タンパク質（例えばトランスジェニックマウス系）である；（５）ＩＬ－２１ＲへのＩＬ－２１の結合を阻害する；（６）ＩｇＧ１である；（７）少なくとも約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$の結合定数でヒトＩＬ－２１Ｒに結合する；（８）少なくとも約$5x10^{4}M^{-1}s^{-1}$の結合定数でネズミＩＬ－２１Ｒに結合する；（９）約10^{-3}（１／ｓ）またはそれ未満の解離定数でヒトＩＬ－２１Ｒに結合する；（１０）約10^{-2}（１／ｓ）またはそれ未満の解離定数でネズミＩＬ－２１Ｒに結合する；（１１）約１．７５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ヒトＩＬ－２１Ｒにより媒介されるヒトＩＬ－２１Ｒ発現性ＢａＦ３細胞の増殖を阻害する；（１２）約０．５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ネズミＩＬ－２１Ｒにより媒介されるネズミＩＬ－２１Ｒ発現性ＢａＦ３細胞の増殖を阻害する；（１３）約１４．０ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ヒトＩＬ－２１Ｒにより媒介されるヒトＩＬ－２１Ｒ発現性ＴＦ１細胞の増殖を阻害する；（１４）約１．９ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ＩＬ－２１Ｒにより媒介されるヒト初代Ｂ細胞の増殖を阻害する；（１５）約１．５ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ＩＬ－２１により媒介されるヒト初代$CD4^{+}$　Ｔ細胞の増殖を阻害する；（１６）約５．０ｎＭまたはそれ未満のIC_{50}で、ＩＬ－２１により媒介されるネズミ初代$CD4^{+}$　Ｔ細胞の増殖を阻害する；（１７）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．投与後、約０．１～７．５ｍｌ／時間／ｋｇの平均全身クリアランスを有する；（１８）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．、ｓ．ｃ．、またはｉ．ｐ．投与後、約２０～７００時間の平均排除半減期を有する；（１９）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類において、約４０～１５００ｍｌ／ｋｇの平均定常状態分布体積を有する；（２０）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｓ．ｃ．投与後、約３５～１００％の生物学的利用能を有する；（２１）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．、ｓ．ｃ．、またはｉ．ｐ．投与後、約２００～１０，０００μｇ＊時間／ｍｌ（１ｍｇ／ｋｇ投薬量あたり）の平均用量規準化ＡＵＣを有する；（２２）動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類への、例えばｉ．ｖ．、ｓ．ｃ．、またはｉ．ｐ．投与後、約０．５～３０μｇ／ｍｌの平均用量規準化Ｃｍａｘ（最大血清濃度）を有する；および（２３）ＩＬ－２１応答性サイトカインまたはＩＬ－２１応答性遺伝子の発現を調節する。

【０１２６】

[0177]当業者は、上述の修飾が排他的でないことを認識するであろうし、そして本開示の解説を踏まえると、当業者には多くの他の修飾が明らかであろう。

核酸、クローニングおよび発現系

[0178]本開示は、開示する結合性タンパク質をコードする単離核酸を提供する。核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡを含んでもよく、そしてこれらは合成（完全または部分的）であってもまたは組換え（完全または部分的）であってもよい。本明細書に示すようなヌクレオ

チド配列に対する言及は、特定された配列を含むＤＮＡ分子を含み、そしてＵがＴに置換された特定された配列を含むＲＮＡ分子を含む。

【０１２７】

[0179]やはり意図されるのは、本明細書に開示するように、１つ、２つ、または３つのＣＤＲ、$Ｖ_{Ｈ}$ドメイン、$Ｖ_{Ｌ}$ドメインのコード配列、またはその組み合わせ、あるいは当該配列に実質的に同一の配列（例えば、当該配列に少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれより高い同一性の配列、あるいは当該配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な配列）を含む核酸である。

【０１２８】

[0180]１つの態様において、単離核酸は、配列番号１６３～１９５のアミノ酸配列から選択される少なくとも１つのＣＤＲを含む抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の重鎖および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列、あるいは本明細書記載の配列から１つまたは２つまたは３つまたは４つのアミノ酸が異なるＣＤＲをコードする配列を有する。

【０１２９】

[0181]核酸は、軽鎖または重鎖可変領域のみをコードしてもよいし、あるいは対応する可変領域に機能可能であるように連結された結合性タンパク質軽鎖または重鎖定常領域をコードしてもよい。１つの態様において、軽鎖可変領域は、カッパまたはラムダ定常領域から選択される定常領域に連結される。軽鎖定常領域はまた、ヒト・カッパまたはラムダ型であってもよい。別の態様において、重鎖可変領域は、ＩｇＧ（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、およびＩｇＥより選択される結合性タンパク質アイソタイプの重鎖定常領域に連結される。重鎖定常領域は、ＩｇＧ（例えばＩｇＧ１）アイソタイプであってもよい。

【０１３０】

[0182]本発明の核酸組成物は、修飾制限部位等を除いて、しばしば天然配列（ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡあるいはその混合物）であるが、これを標準技術にしたがって突然変異させて、遺伝子配列を提供してもよい。コード配列に関しては、これらの突然変異は、望ましいように、アミノ酸配列に影響を及ぼしうる。特に、本明細書記載の天然Ｖ、Ｄ、Ｊ、定常、スイッチおよび他のこうした配列に実質的に同一であるか、または該配列に由来する、ヌクレオチド配列が意図される（「由来する」が、配列が別の配列と同一であるかまたは別の配列から修飾されていることを示す場合）。

【０１３１】

[0183]１つの態様において、核酸は提供する配列のものと（例えば、１０、２０、３０、または４０ヌクレオチド未満であるが、少なくとも１つ；対象核酸中のヌクレオチドの１％、５％、１０％または２０％未満であるが少なくとも１つ）異なる（例えば置換、挿入、または欠失により異なる）。この分析のために必要であれば、配列を、最大相同性のために整列させなければならない。欠失または挿入、あるいはミスマッチにより「ループ」状にはみ出した配列は、相違と見なされる。相違は、非必須残基（単数または複数）をコードするヌクレオチド（単数または複数）の箇所であってもよいし、また相違は、保存的置換（単数または複数）であってもよい。

【０１３２】

[0184]本開示はまた、本明細書に記載するような少なくとも１つの核酸を含む、プラスミド、ベクター、および転写または発現カセットの形の核酸構築物も提供する。

[0185]本開示はさらに、本明細書記載の少なくとも１つの核酸構築物を含む宿主細胞を提供する。

【０１３３】

[0186]やはり提供するのは、本明細書記載の配列（単数または複数）を含む核酸（単数または複数）から、コードされるタンパク質（単数または複数）を作製する方法である。当該方法は、細胞が核酸からタンパク質を発現するのに適した条件下で、宿主細胞を培養する工程を含む。発現および産生後、任意の適切な技術を用いて、$Ｖ_{Ｈ}$または$Ｖ_{Ｌ}$ドメイ

ン、あるいは特異的結合メンバーを単離し、そして／または精製してもよい。当該方法にはまた、ｓｃＦｖをコードする核酸を、結合性タンパク質のＦｃ部分をコードする核酸と融合させ、そして細胞において、融合した核酸を発現させる工程も含まれてもよい。当該方法にはまた、生殖系列化工程も含まれてもよい。

【０１３４】

[0187]抗原結合性断片、V_Hおよび／またはV_Lドメイン、ならびにコードする核酸分子およびベクターを、実質的に純粋なまたは均質な型で、あるいは核酸の場合、必要な機能を持つポリペプチドをコードする配列以外の起源核酸または遺伝子を含まないかまたは実質的に含まずに、天然環境から単離し、そして／または精製してもよい。

【０１３５】

[0188]多様な宿主細胞において、ポリペプチドをクローニングしそして発現するための系が当該技術分野に知られる。結合性タンパク質を産生するのに適した細胞は、例えば、Ｆｅｒｎａｎｄｅｚら（１９９９）Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓに記載される。簡潔には、適切な宿主細胞には、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞、または原核細胞、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）が含まれる。異種ポリペプチド発現のため、当該技術分野で入手可能な哺乳動物細胞には、リンパ球細胞株（例えば、ＮＳＯ）、ＨＥＫ２９３細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＣＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、卵母細胞、およびトランスジェニック動物由来の細胞、例えば乳腺上皮細胞が含まれる。他の態様において、本発明の結合性タンパク質をコードする核酸を、組織特異的プロモーター（例えば乳腺特異的プロモーター）の調節下に置き、そして結合性タンパク質をトランスジェニック動物において産生する。例えば、結合性タンパク質は、トランスジェニック動物、例えばトランスジェニックウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、またはげっ歯類のミルク中に分泌される。

【０１３６】

[0189]プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、および他の配列を含む、適切な制御配列を含有するように、適切なベクターを選択するかまたは構築してもよい。ベクターはまた、プラスミドまたはウイルス主鎖も含有してもよい。詳細に関しては、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版 １９８９）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。ＤＮＡの操作、調製、突然変異誘発、配列決定、およびトランスフェクションを含めて、ベクターとともに用いる多くの確立された技術が、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（第２版 １９９２）Ａｕｓｕｂｅｌら監修，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓに記載される。

【０１３７】

[0190]本開示のさらなる側面が、核酸を宿主細胞内に導入する方法を提供する。真核細胞に関しては、適切なトランスフェクション技術には、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介性トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス（単数または複数）、例えばワクシニアまたはバキュロウイルスを用いた形質導入が含まれてもよい。細菌細胞に関しては、適切な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを用いたトランスフェクションが含まれてもよい。ＤＮＡ導入の後に、選択法（例えば薬剤耐性）を行って、核酸を含有する細胞を選択してもよい。

【０１３８】

抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の使用

[0191]ＩＬ－２１Ｒに対するアンタゴニストとして作用する抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質（例えば、本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片）を用いて、少なくとも１つのＩＬ－２１Ｒ媒介性免疫応答、例えば細胞増殖、サイトカイン発現または分泌、ケモカイン分泌、およびＴ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、または滑膜細

胞の細胞溶解活性の１以上を制御してもよい。したがって、本発明の結合性タンパク質を用いて、免疫または造血細胞（例えば骨髄系、リンパ系、または赤血球系譜の細胞、あるいはその前駆細胞）の活性（例えば増殖、分化、および／または生存）を阻害してもよく、そしてしたがって、当該タンパク質を用いて、多様な免疫障害および血液の過剰増殖障害を治療してもよい。治療可能な、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害／免疫障害の例には、限定されるわけではないが、移植片拒絶、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、アレルギー（例えばアトピー性アレルギー）、および自己免疫疾患が含まれる。自己免疫疾患には、限定されるわけではないが、糖尿病、関節炎障害（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎、および強直性脊髄炎を含む）、脊椎関節症、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、皮膚エリテマトーデス、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎）、乾癬、シェーグレン症候群、ＩＢＤ（クローン病および潰瘍性大腸炎を含む）、喘息（内因性喘息およびアレルギー性喘息を含む）、強皮症および血管炎が含まれる。本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体において、例えばヒトにおいて、ＩＬ－２１Ｒが関連する障害／免疫障害を治療するかまたは防止する方法において、用いてもよい。

【０１３９】

[0192]多発性硬化症は、炎症およびミエリン鞘（神経を防護し、そして適切な神経機能に必要な脂肪性物質）の喪失によって特徴付けられる、中枢神経系疾患である。ＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒに依存する免疫応答から生じる炎症は、本発明の結合性タンパク質および組成物で治療可能である。多発性硬化症のための実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）マウスモデル（例えば、Ｔｕｏｈｙら（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：１１２６－３０；Ｓｏｂｅｌら（１９８４）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３２：２３９３－４０１；およびＴｒａｕｇｏｔｔ（１９８９）Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１９：１１４－２９を参照されたい）において、ＥＡＥ誘導前（および連続して誘導後）にＩＬ－２１Ｒ抗体を注射してマウスを治療すると、疾患の開始が顕著に遅延された。本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体において、例えばヒトにおいて、多発性硬化症を治療するかまたは防止する方法において、用いてもよい。

【０１４０】

[0193]関節炎は、関節の炎症によって特徴付けられる疾患である。関節リウマチ（ＲＡ）は、関節炎の最も頻繁な型であり、結合組織、および関節の裏打ちをする膜である滑膜の炎症を伴う。炎症を起こした滑膜は、しばしば、関節に浸潤し、そして関節の軟骨および骨に損傷を与える。研究によって、滑膜細胞およびマクロファージをＩＬ－２１で処置すると、これらの細胞が、炎症と関連するサイトカインおよびケモカインを分泌するように誘導されることが示されている。関節リウマチのためのコラーゲン誘導性関節炎（ＣＩＡ）マウスモデル（例えば、Ｃｏｕｒｔｅｎａｙら（１９８０）Ｎａｔｕｒｅ ２８３：６６６－２８；およびＷｉｌｌｉａｍｓら（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｌ．８４：４３３－３９を参照されたい）において、ＣＩＡ誘導後に（そして連続して）マウスをＩＬ－２１で処置すると、疾患が悪化する。炎症性サイトカインおよびケモカインの分泌の増加、ならびににより重要なことに、ＩＬ－２１に依存する免疫応答から生じる疾患レベルの増加は、本発明の結合性タンパク質で治療可能である。同様に、本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体において、例えばヒトにおいて、ＲＡまたは他の関節炎疾患を治療するかまたは防止する方法において、用いてもよい。

【０１４１】

[0194]移植片拒絶は、ドナー由来の組織が、宿主の免疫細胞によって特異的に「攻撃される」免疫学的現象である。主な「攻撃」細胞は、そのＴ細胞受容体がドナーのＭＨＣ分子を「外来（ｆｏｒｅｉｇｎ）」と認識するＴ細胞である。この認識によって当該Ｔ細胞が活性化され、増殖し、そして多様なサイトカインおよび細胞溶解性タンパク質を分泌して、これらが最終的に移植片を破壊する。移植片拒絶のｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイである混合リンパ球反応（ＭＬＲ）において、Ｔ細胞は、ＩＬ－２１を補充されるとより強力に増殖する。ＭＬＲおよび移植モデルは、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉ

mmunology（第2版 1994）Coliganら監修, John Wiley & Sonsに記載されてきている（また、Kasaianら（2002）上記；Fulmerら（1963）Am. J. Anat. 113：273－85；およびLenschowら（1992）Science 257：789－92も参照されたい）。本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体において、例えばヒトにおいて、MLRを減少させるかまたは防止する、ならびに／あるいは移植片拒絶およびIL－21に依存する関連疾患（例えばGVHD）を治療するかまたは防止する方法において、用いてもよい。

【0142】

[0195]全身性エリテマトーデス（SLE）は、DNA、核抗原、およびリボヌクレオタンパク質に対する抗体を含む、自己抗体の存在によって特徴付けられる自己免疫疾患である。これらの自己抗体は、組織および臓器損傷に関連する。SLEの原因は未知であるが、自己抗体が存在することから、自己反応性T細胞またはB細胞の阻害が不適切であることが示唆される。本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体において、例えばヒトにおいて、またはMRL－Fas^{lpr}マウス（SLEのためのマウスモデル）（Immunologic Defects in Laboratory Animals（1981）Gershwinら監修, Plenum Press）において、IL－21により媒介される自己反応性T細胞およびB細胞の活性を阻害する、ならびに／あるいはSLEまたは関連疾患を治療するかまたは防止する方法において、用いてもよい。

【0143】

[0196]また、本発明の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体において、例えばヒトにおいて、IL－21応答性細胞およびIL－21R応答性細胞の異常な活性と関連する血液の過剰増殖障害を治療するかまたは防止する方法において、用いてもよい。こうした細胞の例には、造血起源の新生物細胞、例えば骨髄、リンパまたは赤血球細胞系譜から生じる細胞、あるいはその前駆細胞が含まれる。こうした新生物障害の例には、白血病性の癌、ならびに血液、骨髄（例えば骨髄腫）、およびリンパ組織（例えばリンパ腫）の腫瘍が含まれる。特定の態様において、本発明は、限定されるわけではないが、急性前骨髄白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）および慢性骨髄性白血病（CML）を含む多様な白血病性の癌（Vaickus（1991）Crit. Rev. Oncol.／Hemotol. 11：267－97に概説される）の治療に関する。本発明によって治療可能なリンパ系悪性腫瘍の例には、限定されるわけではないが、急性リンパ芽球性白血病（B細胞系譜ALLおよびT細胞系譜ALLを含むALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、毛様細胞白血病（HCL）、およびワルデンストレームマクログロブリン血症（WM）が含まれる。本発明によって治療可能な悪性リンパ腫のさらなる型には、限定されるわけではないが、非ホジキンリンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大顆粒リンパ球性白血病（LGL）、ホジキンリンパ腫、およびその変形が含まれる。

【0144】

[0197]別の側面において、本発明は、被験体において、急性期反応を減少させるか、阻害するか、または縮小させる方法を特徴とする。急性期反応は、急性期タンパク質（例えばC反応性タンパク質および血清アルブミン）レベルの調節を含む、炎症に対する応答である。当該方法には、被験体に、本明細書に記載するような抗IL－21R結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を、被験体における急性期反応を減少させるか、阻害するか、または縮小させるのに十分な量で、投与する工程が含まれる。1つの態様において、被験体は、本明細書に記載するようなIL－21Rが関連する障害、例えば呼吸器障害、炎症性障害および自己免疫障害を含む障害を患う哺乳動物、例えばヒトである。

【0145】

併用療法

[0198]１つの態様において、少なくとも１つの抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質またはその抗原結合性断片および少なくとも１つの療法剤を含む医薬組成物を、併用療法で投与する。当該療法は、免疫および炎症性障害などの病的状態または障害を治療するのに有用である。用語「併用」は、この文脈において、結合性タンパク質組成物および療法剤が、同時にまたは連続してのいずれかで、実質的に同時期に投与されることを意味する。連続して投与される場合、第二の化合物の投与開始時に、２つの化合物の第一のものは、治療部位に、有効濃度で検出可能なままであってもよい。

【０１４６】

[0199]例えば、併用療法には、少なくとも１つのさらなる療法剤と同時配合され、そして／または同時投与される、少なくとも１つの抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質、例えば抗ＩＬ－２１Ｒ抗体が含まれてもよい。さらなる剤には、以下により詳細に記載するような、少なくとも１つのサイトカイン阻害剤、増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞傷害剤、および／または細胞分裂阻害剤が含まれてもよい。こうした併用療法は、投与される療法剤をより少ない投薬量で好適に利用することも可能であり、したがって、多様な単一療法に関連するありうる毒性または合併症を回避することも可能である。さらに、本明細書に開示する療法剤は、ＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒ経路とは異なる経路に作用し、そしてしたがって、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の効果を増進し、そして／または当該効果と相乗作用すると期待される。

【０１４７】

[0200]抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用する療法剤は、自己免疫およびそれに続く炎症反応において、異なるステージで干渉する剤であってもよい。１つの態様において、本明細書記載の少なくとも１つの抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質は、少なくとも１つのサイトカインおよび／または増殖因子アンタゴニストと同時配合され、そして／または同時投与されてもよい。アンタゴニストには、可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子、リガンド融合体、抗体（サイトカインもしくは増殖因子、またはその受容体あるいは他の細胞表面分子に結合する）、および「抗炎症性サイトカイン」ならびにそのアゴニストが含まれてもよい。

【０１４８】

[0201]本明細書記載の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用可能な剤の例には、限定されるわけではないが、少なくとも１つのインターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、およびＩＬ－２２）、サイトカイン（例えば、ＴＮＦ－α、ＬＴ、ＥＭＡＰ－ＩＩ、およびＧＭ－ＣＳＦ）、または増殖因子（例えば、ＦＧＦおよびＰＤＧＦ）が含まれる。当該剤にはまた、限定されるわけではないが、インターロイキン、サイトカイン、または増殖因子に対する少なくとも１つの受容体のアンタゴニストが含まれてもよい。また、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９０、またはそのリガンド（例えば、ＣＤ１５４（ｇｐ３９、ＣＤ４０Ｌ））、あるいはＬＦＡ－１／ＩＣＡＭ－１またはＶＬＡ－４／ＶＣＡＭ－１（Ｙｕｓｕｆ－Ｍａｋａｇｉａｎｓａｒら（２００２）Ｍｅｄ．　Ｒｅｓ．　Ｒｅｖ．　２２（２）：１４６－６７を参照されたい））などの細胞表面分子に対する阻害剤（例えば抗体）と併用してもよい。本明細書記載の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用してもよいアンタゴニストには、ＩＬ－１、ＩＬ－１２、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２２、およびその受容体のアンタゴニストが含まれてもよい。

【０１４９】

[0202]ＩＬ－１２アンタゴニストの例には、ＩＬ－１２に結合する抗体（例えば、国際出願公報第ＷＯ　００／０５６７７２号を参照されたい）；　ＩＬ－１２受容体阻害剤（例えば、ＩＬ－１２受容体に対する抗体）、ならびに可溶性ＩＬ－１２受容体及びその断片が含まれる。ＩＬ－１５アンタゴニストの例には、ＩＬ－１５またはその受容体に対す

る抗体、ＩＬ－１５受容体の可溶性断片、およびＩＬ－１５結合性タンパク質が含まれる。ＩＬ－１８アンタゴニストの例には、ＩＬ－１８に対する抗体、ＩＬ－１８受容体の可溶性断片、およびＩＬ－１８結合性タンパク質（ＩＬ－１８ＢＰ、Ｍａｌｌｅｔら（２００１）Ｃｉｒｃ．　Ｒｅｓ．　２８）が含まれる。ＩＬ－１アンタゴニストの例には、インターロイキン－１変換酵素（ＩＣＥ）阻害剤（Ｖｘ７４０など）、ＩＬ－１アンタゴニスト（例えば、ＩＬ－１ＲＡ（アナキンラ、Ａｍｇｅｎ））、ｓＩＬ－１ＲＩＩ（Ｉｍｍｕｎｅｘ）、および抗ＩＬ－１受容体抗体が含まれる。

【０１５０】

[0203]ＴＮＦアンタゴニストの例には、ＴＮＦ（例えば、ヒトＴＮＦ－α）に対する抗体、例えばＤ２Ｅ７（ヒト抗ＴＮＦ－α抗体、米国特許第６，２５８，５６２号、ＨＵＭＩＲＡ™、ＢＡＳＦ、ニュージャージー州パーシッパニー）、ＣＤＰ－５７１／ＣＤＰ－８７０／ＢＡＹ－１０－３３５６（ヒト化抗ＴＮＦ－α抗体、Ｃｅｌｌｔｅｃｈ／Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ｃＡ２（キメラ抗ＴＮＦ－α抗体、ＲＥＭＩＣＡＤＥ™、Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）、および抗ＴＮＦ抗体断片（例えばＣＰＤ８７０）が含まれる。他の例には、可溶性ＴＮＦ受容体（例えば、ヒトｐ５５またはｐ７５）断片および誘導体、例えばｐ５５ｋｄＴＮＦＲ－ＩｇＧ（５５ｋＤ　ＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質、ＬＥＮＥＲＣＥＰＴ™）および７５ｋｄＴＮＦＲ－ＩｇＧ（７５ｋＤ　ＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質、ＥＮＢＲＥＬ™、Ｉｍｍｕｎｅｘ；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９４）３７：Ｓ２９５およびＪ．　Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｍｅｄ．（１９９６）４４：２３５Ａを参照されたい）が含まれる。さらなる例には、酵素アンタゴニスト（例えば、ＴＮＦ－α変換酵素阻害剤（ＴＡＣＥ）、例えばアルファ－スルホニルヒドロキサム酸誘導体（ＷＯ　０１／０５５１１２）またはＮ－ヒドロキシホルムアミド阻害剤（ＧＷ　３３３３、－００５、または－０２２））およびＴＮＦ－ｂｐ／ｓ－ＴＮＦＲ（可溶性ＴＮＦ結合性タンパク質；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）３９（９）：Ｓ２８４およびＡｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｈｅａｒｔ　Ｃｉｒｃ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．（１９９５）２６８：３７－４２を参照されたい）が含まれる。

【０１５１】

[0204]他の態様において、本明細書記載の抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を、以下の少なくとも１つと併用投与してもよい：　ＩＬ－１３アンタゴニスト、例えば可溶性ＩＬ－１３受容体および／または抗ＩＬ－１３抗体；ならびにＩＬ－２アンタゴニスト、例えばＩＬ－２融合タンパク質（例えば、ＤＡＢ　４８６－ＩＬ－２および／またはＤＡＢ　３８９－ＩＬ－２、Ｓｅｒａｇｅｎ（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９３）３６：１２２３を参照されたい））および抗ＩＬ－２Ｒ抗体（例えば抗Ｔａｃ（ヒト化抗体、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄｅｓｉｇｎ　Ｌａｂｓ（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．（１９９０）５０（５）：１４９５－５０２を参照されたい））。別の併用には、非枯渇性抗ＣＤ４阻害剤、例えばＩＤＥＣ－ＣＥ９．１／ＳＢ　２１０３９６（抗ＣＤ４抗体、ＩＤＥＣ／ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）と併用した抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質が含まれる。さらに他の併用には、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質とＣＤ８０（Ｂ７．１）およびＣＤ８６（Ｂ７．２）共刺激経路アンタゴニスト（例えば、抗体、可溶性受容体、またはアンタゴニスト性リガンド）、Ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）、および／または抗炎症性サイトカインおよびそのアゴニスト（例えば抗体）が含まれる。抗炎症性サイトカインには、ＩＬ－４（ＤＮＡＸ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ、カリフォルニア州パロアルト）、ＩＬ－１０（ＳＣＨ　５２０００、組換えＩＬ－１０、ＤＮＡＸ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ）、ＩＬ－１３、およびＴＧＦが含まれてもよい。

【０１５２】

[0205]他の態様において、少なくとも１つの抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を、少なくとも１つの炎症性薬剤、免疫抑制剤、代謝阻害剤、および酵素阻害剤と同時配合し、そして／または同時投与してもよい。本明細書記載のＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用してもよい薬剤または阻害剤の限定されない例には、限定されるわけではないが：非ステ

ロイド抗炎症性薬剤（ＮＳＡＩＤ）（例えば、イブプロフェン、テニダップ（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）３９（９）：Ｓ２８０を参照されたい）、ナプロキセン（例えば、ＮｅｕｒｏＲｅｐｏｒｔ（１９９６）７：１２０９－１３を参照されたい）、メロキシカム、ピロキシカム、ジクロフェナク、およびインドメタシン）；スルファサラジン（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）３９（９）：Ｓ２８１を参照されたい））；コルチコステロイド（例えばプレドニゾロン）；サイトカイン抑制性抗炎症薬剤（ＣＳＡＩＤ）；およびヌクレオチド生合成の阻害剤（例えば、プリン生合成の阻害剤（例えば葉酸アンタゴニスト、例えばメトトレキセート）およびピリミジン生合成の阻害剤（例えばジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ（ＤＨＯＤＨ）阻害剤、例えばレフルノミド（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）３９（９）：Ｓ１３１およびＩｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（１９９６）４５：１０３－７を参照されたい））の少なくとも１つが含まれる。

【０１５３】

[0206]さらなる阻害剤の例には：コルチコステロイド（経口、吸入および局所注射）；免疫抑制剤（例えば、シクロスポリンおよびタクロリムス（ＦＫ－５０６））；ｍＴＯＲ阻害剤（例えばシロリムス（ラパマイシン）またはラパマイシン誘導体（例えばエステルラパマイシン誘導体、例えばＣＣＩ－７７９（Ｅｌｉｔ（２００２）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ. Ｄｒｕｇｓ ３（８）：１２４９－５３およびＨｕａｎｇら（２００２）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ. Ｄｒｕｇｓ ３（２）：２９５－３０４を参照されたい））；ＴＮＦ－αおよびＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインのシグナル伝達に干渉する剤（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８、またはＭＡＰキナーゼ阻害剤）；ｃｏｘ２阻害剤（例えばセレコキシブおよびその変異体（ＭＫ－９６６）；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）３９（９）：Ｓ８１を参照されたい）；ホスホジエステラーゼ阻害剤（例えば、Ｒ９７３４０１；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）３９（９）：Ｓ２８２を参照されたい）；ホスホリパーゼ阻害剤（例えば、細胞質ホスホリパーゼ２（ｃＰＬＡ２）の阻害剤、例えばトリフルオロメチルケトン類似体；米国特許第６，３５０，８９２号を参照されたい）；血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤；ＶＥＧＦ受容体の阻害剤；ならびに血管形成の阻害剤の少なくとも１つが含まれる。

【０１５４】

[0207]本明細書に開示する抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を他の療法剤と併用して、以下にさらに詳細に論じるような特定の免疫障害を治療してもよい。

[0208]抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用してもよい、関節炎障害（例えば関節リウマチ、炎症性関節炎、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症および乾癬性関節炎）を治療するための剤の限定されない例には、以下の少なくとも１つが含まれる：

ＴＮＦアンタゴニスト（例えば、抗ＴＮＦ抗体）；ＴＮＦ受容体の可溶性断片（例えばヒトｐ５５およびｐ７５）およびその誘導体（例えばｐ５５ｋｄＴＮＦＲ－ＩｇＧ（５５ｋＤ ＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質、ＬＥＮＥＲＣＥＰＴ™）および７５ｋｄＴＮＦＲ－ＩｇＧ（７５ｋＤ ＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質、ＥＮＢＲＥＬ™））；ＴＮＦ酵素アンタゴニスト（例えばＴＡＣＥ阻害剤）；ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、およびＩＬ－２２のアンタゴニスト；Ｔ細胞枯渇剤およびＢ細胞枯渇剤（例えば抗ＣＤ４抗体または抗ＣＤ２２抗体）；小分子阻害剤（例えばメトトレキセートおよびレフルノミド）；シロリムス（ラパマイシン）およびその類似体（例えばＣＣＩ－７７９）；ｃｏｘ２およびｃＰＬＡ２阻害剤；ＮＳＡＩＤ；ｐ３８、ＴＰＬ－２、Ｍｋ－２、およびＮＦκＢ阻害剤；ＲＡＧＥまたは可溶性ＲＡＧＥ；

Ｐ－セレクチンまたはＰＳＧＬ－１阻害剤（例えば当該分子に対する抗体および小分子阻害剤）；エストロゲン受容体ベータ（ＥＲＢ）アゴニスト；ならびにＥＲＢ－ＮＦκＢアンタゴニスト。少なくとも１つのＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒアンタゴニストと同時投与

および／または同時配合してもよい療法剤には：　ＴＮＦ受容体の可溶性断片（例えばヒトｐ５５またはｐ７５）、例えば７５ｋｄＴＮＦＲ－ＩｇＧ（７５ｋＤ　ＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質、ＥＮＢＲＥＬ^{TM}）；メトトレキセート；レフルノミド；およびシロリムス（ラパマイシン）またはその類似体（例えば、ＣＣＩ－７７９）の少なくとも１つが含まれうる。

【０１５５】

[0209]抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用してもよい、多発性硬化症を治療するための剤の限定されない例には、インターフェロン－β（例えば、ＩＦＮβ－１ａおよびＩＦＮβ－１ｂ）、コパキソン、コルチコステロイド、ＩＬ－Ｉ阻害剤、ＴＮＦ阻害剤、ＣＤ４０リガンドに対する抗体、ＣＤ８０に対する抗体、およびＩＬ－１２アンタゴニストが含まれる。

【０１５６】

[0210]抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質と併用してもよい、炎症性腸疾患またはクローン病を治療するための剤の限定されない例には、以下の少なくとも１つが含まれる；ブデノシド；上皮増殖因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチル酸；６－メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジド；酸化防止剤；トロンボキサン阻害剤；　ＩＬ－１受容体アンタゴニスト；抗ＩＬ－１モノクローナル抗体；抗ＩＬ－６モノクローナル抗体；増殖因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル－イミダゾール化合物；本明細書に記載するようなＴＮＦアンタゴニスト；　ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、および／またはＴＧＦβまたはそのアンタゴニスト（例えばアンタゴニスト性抗体）；　ＩＬ－１１；プレドニゾロン、デキサメタゾンまたはブデソニドの、グルクロニドまたはデキストランにコンジュゲート化されたプロドラッグ；　ＩＣＡＭ－１アンチセンスホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド（ＩＳＩＳ　２３０２；　Ｉｓｉｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，　Ｉｎｃ．）；可溶性補体受容体１（ＴＰ１０；　ＴＣｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｉｎｃ．）；徐放性メサラジン；メトトレキセート；血小板活性化因子（ＰＡＦ）のアンタゴニスト；シプロフロキサシン；およびリグノカイン。

【０１５７】

[0211]他の態様において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を、免疫応答、例えば移植片拒絶またはＧＶＨＤを制御する際に関与する他のターゲットに向けられる少なくとも１つの抗体と併用してもよい。ＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒアンタゴニストと併用してもよい、免疫応答を治療するための剤の限定されない例には、細胞表面分子に対する以下の抗体（例えばＣＤ２５（ＩＬ－２受容体α）、ＣＤ１１ａ（ＬＦＡ－１）、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）、ＣＤ４、ＣＤ４５、ＣＤ２８／ＣＴＬＡ４、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、またはその組み合わせ）が含まれる。別の態様において、抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質を、シクロスポリンＡまたはＦＫ５０６などの、少なくとも１つの一般的な免疫抑制剤と併用する。

【０１５８】

[0212]本発明の別の側面は、他の療法剤との抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の併用投与を実行するためのキットに関する。１つの態様において、当該キットは、医薬キャリアー中で配合された少なくとも１つの抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質、および１以上の別個の医薬調節物中で適切なように配合された少なくとも１つの療法剤を含む。

【０１５９】

診断使用

[0213]また、本発明の結合性タンパク質を用いて、生物学的試料中のＩＬ－２１Ｒの存在を検出してもよい。これらのタンパク質の存在またはレベルを、医学的状態と相関させることによって、当業者は、関連する医学的状態を診断することも可能である。例えば、刺激されたＴ細胞は、ＩＬ－２１Ｒの発現を増加させ、そして関節においてＴ細胞が異常に高濃度のＩＬ－２１Ｒを発現していれば、関節の炎症およびおそらく関節炎の指標とな

りうる。本発明の結合性タンパク質によって診断されうる例示的な医学的状態には、限定されるわけではないが、多発性硬化症、関節リウマチ、および移植片拒絶が含まれる。

【０１６０】

[0214]結合性タンパク質に基づく検出法、例えば抗体に関して一般的に用いられるものは、当該技術分野に周知であり、そしてこれには、ＥＬＩＳＡ、ラジオイムノアッセイ、イムノブロット、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫沈降、および他の関連技術が含まれる。ＩＬ－２１Ｒを検出するこれらの方法の少なくとも１つを取り込む診断キットにおいて、当該結合性タンパク質を提供してもよい。当該キットは、他の構成要素、パッケージング、説明書、試薬、ならびに／あるいはタンパク質の検出およびキットの使用を補助する他の材料を含有してもよい。

【０１６１】

[0215]リガンド基（例えばビオチン）、フルオロフォア、発色団、放射性同位体、高電子密度試薬、または酵素を含む検出可能マーカーを用いて、結合性タンパク質を修飾してもよい。酵素は活性によって検出される。例えば、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼは、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を、分光光度計で定量化可能な青い色素に変換する能力によって検出される。他の適切な結合性パートナーには、ビオチンおよびアビジン、ＩｇＧおよびプロテインＡ、ならびに当該技術分野に知られる他の受容体－リガンド対が含まれる。

【０１６２】

[0216]また、結合性タンパク質を、少なくとも１つの他の分子実体、例えば、とりわけ、別の結合性タンパク質（例えば二重特異性または多重特異性結合性タンパク質）、毒素、放射性同位体、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤に機能可能であるように連結してもよい（例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有会合、またはその他によって）。他の順列および可能性は、一般の当業者に明らかであり、そしてこれらは本発明の範囲内で同等と見なされる。

【０１６３】

医薬組成物および投与法

[0217]本発明の特定の態様には、開示する結合性タンパク質を含む組成物が含まれる。当該組成物は、医薬使用および患者への投与に適していてもよい。当該組成物は、本発明の結合性タンパク質および医薬賦形剤を含む。本明細書において、「医薬賦形剤」には、医薬投与と適合する、溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。医薬的に活性である物質のためのこれらの剤の使用が当該技術分野に周知である。当該組成物はまた、補充的、追加的、または増進された療法機能を提供する他の活性化合物も含有してもよい。医薬組成物はまた、投与のための説明書とともに、容器、パック、またはディスペンサー中に含まれていてもよい。

【０１６４】

[0218]本発明の医薬組成物は、投与の意図される経路と適合するように配合される。投与を達成する方法は、一般の当業者に知られる。医薬組成物は、局所または経口投与されてもよいし、あるいは粘膜を渡って透過可能であってもよい。医薬組成物の投与例には、口腔摂取または吸入が含まれる。投与はまた、静脈内、腹腔内、筋内、腔内、皮下、皮膚、または経皮であってもよい。

【０１６５】

[0219]皮内または皮下適用に用いる溶液または懸濁物には、典型的には、以下の構成要素の少なくとも１つが含まれる：水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）などのキレート剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性剤。当該技術分野に知られる方法によって、酸または塩基を用いて、ｐＨを調整してもよい。こうした調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、または多数用量バ

イアル中に封入されてもよい。

【０１６６】

[0220]静脈内投与に用いる溶液または懸濁物には、生理学的生理食塩水、静菌水、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ　ＥＬ（登録商標）（ＢＡＳＦ社、ドイツ・ルートヴィヒスハーフェン）、エタノール、またはポリオールなどのキャリアーが含まれる。すべての場合で、組成物は無菌であり、そして容易に注射可能（ｓｙｒｉｎｇａｂｉｌｉｔｙ）であるために液体でなければならない。適切な流動性は、しばしば、レシチンまたは界面活性剤を用いて得られうる。組成物はまた、製造および保存の条件下で安定でなければならない。微生物の防止は、抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等で達成可能である。多くの場合、等張剤（糖）、多価アルコール（例えばマンニトールおよびソルビトール）、または塩化ナトリウムが組成物中に含まれてもよい。吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを添加することによって、組成物の持続性吸収を達成してもよい。

【０１６７】

[0221]経口組成物には、不活性希釈剤または食用キャリアーが含まれる。経口投与のため、結合性タンパク質を賦形剤とともに取り込んで、そして例えば、錠剤、トローチ、カプセル、またはゼラチン中に入れてもよい。医薬的に適合しうる結合剤またはアジュバント物質が組成物中に含まれてもよい。当該組成物は、（１）微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；（２）デンプンまたはラクトースなどの賦形剤、（３）アルギン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、またはコーンスターチなどの崩壊剤；（４）ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；（５）コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；および／または（６）甘味剤またはフレーバー剤を含有してもよい。

【０１６８】

[0222]また、当該組成物を経粘膜または経皮経路によって投与してもよい。例えば、Ｆｃ部分を含む結合性タンパク質（例えば抗体）は、腸、口、または肺における粘膜を横断することも可能でありうる（Ｆｃ受容体を介する）。ロゼンジ、鼻スプレー、吸入装置、または座薬によって、経粘膜投与を達成してもよい。当該技術分野に知られる軟膏（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏（ｓａｌｖｅ）、ジェル、またはクリームを含有する組成物を用いて、経皮投与を達成してもよい。経粘膜または経皮投与のため、浸透しようとするバリアに適した浸透剤を用いる。吸入による投与には、噴霧剤（例えば液体または気体）を含有する加圧容器またはディスペンサー、あるいは噴霧装置から、エアロゾルスプレー中で、当該結合性タンパク質を送達してもよい。

【０１６９】

[0223]特定の態様において、本発明の結合性タンパク質をキャリアーとともに調製して、体からの迅速な除去に対して、当該結合性タンパク質を保護する。生体分解性ポリマー（例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）がしばしば用いられる。こうした配合物の調製法が当業者に知られる。リポソーム懸濁物もまた、医薬的に許容されうるキャリアーとして使用可能である。当業者に知られる確立された方法にしたがって、リポソームを調製してもよい（例えば米国特許第４，５２２，８１１号を参照されたい）。

【０１７０】

[0224]本発明の結合性タンパク質または結合性タンパク質組成物を、記載するように療法的有効量で投与する。療法的有効量は、被験体の年齢、状態、性別、および医学的状態の重症度にしたがって多様でありうる。臨床的徴候に基づいて、医師が適切な投薬量を決定してもよい。最長の期間に渡って結合性タンパク質の循環レベルを最大にするため、結合性タンパク質または組成物をボーラス用量として投与してもよい。連続注入もまた使用可能である。

【０１７１】

[0225]本明細書において、用語「被験体」は、ヒトおよび非ヒト動物を含むよう意図される。被験体には、ＩＬ－２１Ｒを発現する細胞、例えば癌細胞または免疫細胞によって

特徴付けられる障害を有するヒト患者が含まれてもよい。用語、本発明の「非ヒト動物」には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などのすべての脊椎動物が含まれる。

【０１７２】

[0226]被験体に投与可能な投薬量範囲の例は：１μｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ～１００μｇ／ｋｇ、１００μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、２５０μｇ／ｋｇ～２ｍｇ／ｋｇ、２５０μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、５００μｇ／ｋｇ～２ｍｇ／ｋｇ、５００μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ～２ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ～２５ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ～２５ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ～２５ｍｇ／ｋｇ、および２０ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇ（またはそれより高い）より選択可能である。投薬量、投与法、治療しようとする障害または症状（単数または複数）、および個々の被験体の特性に応じて、これらの投薬量を毎日、毎週、隔週、毎月、またはそれより頻繁でなく、例えば隔年で投与してもよい。

【０１７３】

[0227]特定の状況において、投与の容易さおよび投薬の均一性のため、投薬単位型で、組成物を配合することが好適でありうる。投薬単位型は、本明細書において、患者に適した物理的に別個の単位を指す。各投薬量単位は、キャリアーと会合して療法効果を生じるよう計算された、あらかじめ決定された量の結合性タンパク質を含有する。投薬単位は、結合性タンパク質の特性および達成しようとする特定の療法効果に応じる。

【０１７４】

[0228]組成物の毒性および療法有効性は、細胞培養または実験動物において、標準的医薬的方法によって決定可能であり、例えばLD_{50}（集団の５０％に対して致死的である用量）およびED_{50}（集団の５０％において療法的に有効である用量）を決定することによる。毒性および療法効果の間の用量比は療法指数であり、そしてこれは、比LD_{50}／ED_{50}として表されうる。大きな療法指数を示す結合性タンパク質は、より毒性でなく、そして／またはより療法的に有効でありうる。

【０１７５】

[0229]細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを用いて、ヒトにおける投薬範囲を配合してもよい。これらの化合物の投薬量は、血液中の循環結合性タンパク質濃度の範囲内にあることも可能であり、これにはほとんどまたはまったく毒性がないED_{50}が含まれる。投薬量は、使用する投薬組成物型および投与経路に応じて、この範囲内で多様でありうる。本発明で用いる任意の結合性タンパク質に関して、まず細胞培養アッセイを用いて、療法的有効用量を概算してもよい。動物モデルにおいて、用量を配合して、IC_{50}（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する結合性タンパク質濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成してもよい。任意の特定の投薬量の効果を適切なバイオアッセイによって監視してもよい。適切なバイオアッセイの例には、ＤＮＡ複製アッセイ、転写に基づくアッセイ、遺伝子発現アッセイ、ＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒ結合アッセイ、および他の免疫学的アッセイが含まれる。

【０１７６】

[0230]本発明の１つの態様において、用量をｅｘ　ｖｉｖｏ全血細胞アッセイにおいて配合してもよい。こうした態様において、特定の投薬量を決定し、そして監視するのに適したバイオアッセイには、ＩＬ－２１Ｒ活性を阻害するかまたは減少させる、例えばＩＬ－２１応答性遺伝子の発現を調節するのに必要な抗ＩＬ－２１Ｒ結合性タンパク質の最低血清濃度を決定する方法が含まれる。本発明の１つの態様において、ＩＬ－２１応答性遺伝子は、以下の限定されないリストより選択される：　ＴＮＦ、ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１９、ＳＴＡＴ３、ＴＢＸ２１、ＣＳＦ１、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＩＬ－２Ｒα、およびＩＬ－２１Ｒ。好ましい態様において、ＩＬ－２１応答性遺伝子は、ＣＤ１９、ＧＺＭＢ、ＩＦＮγ、ＩＬ－２Ｒα、ＩＬ６、およびＰＲＦ－１より選

択される。最も好ましい態様において、ＩＬ－２１応答性遺伝子はＩＬ－２Ｒαである。したがって、ＩＬ－２１Ｒ活性を阻害するかまたは減少させるのに必要な抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の最低血清濃度を決定する方法には、１より多いＩＬ－２１応答性遺伝子、例えば２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＩＬ－２１応答性遺伝子の発現レベルを決定する工程が含まれてもよい。

【０１７７】

[0231]本出願全体に引用するすべての参考文献、特許出願、および特許の全内容は、本明細書に援用される。

【実施例】

【０１７８】

[0232]本発明は、以下の非制限例によりさらに例示されるであろう。これらの実施例は本発明の理解を助けるために示されており、決してその範囲を制限すると解釈してはならない。本実施例は、当業者には公知であろう従来の方法の詳細な記述は含んでいない。

実施例１：ファージディスプレイによる結合タンパク質の作成

[0233] 米国特許第７、４９５、０８５号（本明細書において参照文献として組み入れられる）に記載されているｓｃＦｖ親クローン１８Ａ５は、ラウンド１及び３において標的としてヒトＩＬ－２１Ｒを発現するＢａＦ３細胞を、及びラウンド２において標的としてビオチン化ＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ融合タンパク質を使用し、標準ファージディスプレイ法によりＣＳヒトｓｃＦｖライブラリーから得た。

実施例２：ライブラリー構築

[0234]ファージディスプレイライブラリーは、ｓｃＦｖがその３’末端で無傷の遺伝子ＩＩＩに融合されているｐＣＡＮＴＡＢβベクターを使用した親１８Ａ５　ｓｃＦｖに基づいていた。種々のＣＤＲ３配列は当該技術分野では既知の技術を使用して誘導された。

【０１７９】

[0235]六つの連続したコドンの二つの重複しているブロックを、V_H及びV_LのＣＤＲ３中にランダム化し、総計で四つのライブラリーを生成させた：Ｈ３Ｂ１、Ｈ３Ｂ２、Ｌ３Ｂ１、及びＬ３Ｂ２。以下は同定された各々のヌクレオチド及びアミノ酸配列である：ＩＬ－２１Ｒ：１８Ａ５　V_HＣＤＲ３［配列番号１９９及び２００］；Ｈ３Ｂ１（ライブラリーサイズ１．４０ｘ10^9）［配列番号２０１及び２０２］；Ｈ３Ｂ２（ライブラリーサイズ１．００ｘ10^9）［配列番号２０３及び２０４］；ＩＬ－２１Ｒ：１８Ａ５　ＶＬＣＤＲ３［配列番号２０５及び２０６］；Ｌ３Ｂ１（ライブラリーサイズ９．００ｘ10^9）［配列番号２０７及び２０８］；Ｌ３Ｂ２（ライブラリーサイズ６．４０ｘ10^9）［配列番号２０９及び２１０］。

実施例３：ファージ選択

[0236]１８Ａ５の全ての誘導体は、溶液相でビオチン化ヒトＩＬ－２１Ｒ細胞外ドメインＨｉｓ－Ｆｌａｇ融合タンパク質（“ビオチン－ｈＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ”）及びビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ細胞外ドメインＨｉｓ－Ｆｌａｇ融合タンパク質（“ビオチン－ｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ”）に結合可能なファージの選択により、上記ｓｃＦｖライブラリーから単離され；選択に関する全ての手順及び技術は当業者には公知である。総計で２７の抗ＩＬ－２１Ｒ　ｓｃＦｖがファージ選択法により単離された。

実施例４：ライブラリースクリーニング

[0237]ｓｃＦｖフォーマットで生じた結合タンパク質は、ビオチン－ｈＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ及びビオチン－ｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへの結合についてのヒトＩｇＧ１フォーマットにおいて、親１８Ａ５と競合する、ヒトＩＬ－２１Ｒを発現している遺伝子工学処理された細胞株のｈＩＬ－２１依存性増殖及びマウスＩＬ－２１Ｒを発現している遺伝子工学処理された細胞株のｍＩＬ－２１依存性増殖を妨げる、それらの能力に基づいて選択された。

実施例４．１：スクリーニングアッセイにおける使用のための粗ペリプラスム材料（“ｐｅｒｉ－ｐｒｅｐｓ”）の調製

[0238]使用した増殖条件に依存し、ｓｃＦｖを細菌ペリプラスム空間中の溶液に発現し

得る。ペリプラスム内へのｓｃＦｖの放出を誘導するため、０．１％グルコース／１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含む９９０μｌの２ｘＴＹ培地を含有する９６深底ウェルプレートに、ＱＰｉｘ２コロニーピッカー（Genetix, New Milton, England）を使用して、融解したグリセロール保存液を接種し（ウェル当たり１クローン）、３７℃（９９９ｒｐｍ）で約４時間増殖させた。培養物を、０．０２ｍＭの最終濃度のＩＰＴＧで誘導し、３０℃（９９９ｒｐｍ）で一晩増殖させた。細菌ペリプラスム（ｐｅｒｉ－ｐｒｅｐｓ）の内容物は浸透圧ショックにより放出させた。簡単に言えば、プレートを遠心分離し、ペレットを１５０μｌのＴＥＳペリプラスム緩衝液（５０ｍＭトリス／ＨＣｌ（ｐＨ８．０）／１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）／２０％ スクロース）に再懸濁し、続いて１５０μｌの１：５　ＴＥＳ：水を加え、氷上で３０分インキュベートした。プレートを遠心分離し、ｓｃＦｖ含有上清を採取した。

実施例４．２：ライブラリースクリーニングのためのエピトープ競合アッセイ

[0239]ヒト又はマウスＩＬ－２１Ｒへの結合について親１８Ａ５抗体と競合することができるｓｃＦｖは、均一時間分解蛍光（HTRF（登録商標））アッセイにより、選択されたファージから同定した。HTRF（登録商標）クリプテート標識キット（Cisbio, Bedford, MA）の使用説明書に従い、精製した親１８Ａ５抗体を、ユーロピウムの誘導体であるクリプテートと共有結合で結合させた。ｓｃＦｖのｐｅｒｉ－ｐｒｅｐｓを前述のように調製し、ＰＢＳ／０．４Ｍフッ化カリウム／０．１％ＢＳＡ（ＨＴＲＦ（登録商標）緩衝液）で０．２５％に希釈した；次に、混合物の１０μｌを黒色３８４－浅底ウェルプレート（Nunc, Rochester, NY）に移した。次に５μｌのクリプテートコンジュゲート１８Ａ５抗体、続いて、１：８００希釈したストレプトアビジン－ＸＬ６６５コンジュゲート（Cisbio）及び４．８ｎＭビオチン－ｈＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆあるいは４０ｎＭビオチン－ｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆの混合物５μｌを各ウェルに加えた。混合物を室温で２時間インキュベートし、時間分解蛍光測定を行った（３４０ｎｍ励起、６１５ｎｍ及び６６５ｎｍ発光）。１８Ａ５抗体との競合は、６６５ｎｍでの発光及び６１５ｎｍでの発光のバックグラウンド補正比の減少により示された。

【０１８０】

[0240]総計で８２８０の、独立して単離されたｓｃＦｖを、ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆを使用するHTRF（登録商標）アッセイにおいてスクリーニングし、ビオチン－ｈＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへの結合について親１８Ａ５抗体と競合することができる３７６クローンを、さらなる分析のために選択した。

実施例５：ライブラリー由来ｓｃＦｖのＤＮＡ配列分析－配列分析のためのｓｃＦｖ領域のＰＣＲ増幅

[0241]親１８Ａ５　ｓｃＦｖ分子よりも改良されたＩＬ－２１Ｒ結合を有する２８７の１８Ａ５ｓｃＦｖ変異体の配列を決定し、各位置に見出されたアミノ酸の頻度を決定した。V_Hクローンの中で、二つ（１．７％）のみが、例えば、配列番号１６９の最後の六つのアミノ酸（V_H　ＣＤＲ３のＣ末端での）が変異したライブラリーに由来しており、一方、残りは、例えば、配列番号１６９の最初の六つのアミノ酸が変異したライブラリーに由来していた。V_Lクローンの中で、一つ（０．６％）のみが、例えば、配列番号１７０の最後の六つのアミノ酸（V_L　ＣＤＲ３のＣ末端での）が変異したライブラリーに由来しており、一方、大多数は、例えば、配列番号１７０の最初の六つのアミノ酸（V_L　ＣＤＲ３のＮ末端での）の変化に由来していた。

【０１８１】

[0242]ｓｃＦｖのＰＣＲ増幅は、製造元の使用説明書に従い、ＨＮ緩衝液（Epicentre Biotechnologies, Madison, WI）中、VENT（登録商標）ＤＮＡ ポリメラーゼ（New England Biolabs, Ispwich, MA）を使用して実施した。定常期バクテリア培養物の１：１０希釈液５μｌを、２０μｌの最終反応容量の鋳型として使用した。使用したサイクリング条件は、９４℃で２分の加熱開始、９４℃（１分）での変性、５５℃でのプライマーアニーリング（２分）及び７２℃での伸長（１分）を３０サイクル、続いての７２℃（５分）での最終伸長であった。ＰＣＲ生成物を、アガロースゲル電気泳動法により検証し、Ｍ１３

ｒｅｖプライマーでの配列決定に先だって、ＥｘｏＩ／ＳＡＰ（エビアルカリホスファターゼ）で精製した。

【０１８２】

[0243]２７ｓｃＦｖのＣＤＲ３配列の配列番号については表４に記載されている。これらのｓｃＦｖを、実施例６に記載のアッセイに基づいたさらなる分析に使用した。

【０１８３】

【表４】

表４：改良された18A5由来scFvのCDR3配列番号

scFv	重鎖CDR3	軽鎖CDR3
H3	165	170
H4	166	170
H5	167	170
H6	168	170
L1	169	171
L2	169	172
L3	169	173
L4	169	174
L5	169	175
L6	169	176
L8	169	177
L9	169	178
L10	169	179
L11	169	180
L12	169	181
L13	169	182
L14	169	183
L15	169	184
L16	169	185
L17	169	186
L18	169	187
L19	169	188
L20	169	189
L21	169	190
L23	169	191
L24	169	192
L25	169	193

【０１８４】

実施例６：ライブラリー由来ｓｃＦｖの特徴付け

実施例６．１：定量分析のための精製ｓｃＦｖの調製

[0244]個々のｓｃＦｖクローンはPHYTTP（登録商標）カラム（PhyNexus, Inc., San Jose, CA）でのＮｉ－ＮＴＡ精製により小規模に精製した。単一コロニーは、５０ｍｌ円錐チューブ中、０．１％グルコース／１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含む２０ｍｌの２ｘＴＹ培地において、２５０ｒｐｍで振盪しながら３７℃にて中期対数増殖期まで増殖させた。ｓｃＦｖの発現は０．０２ｍＭの最終濃度のＩＰＴＧで誘導し、培養物を３０℃で一晩増殖させた。細胞を遠心分離により回収し、１ｍｌのＴＥＳペリプラスム緩衝液に再懸濁し、続いて１ｍｌのＴＥＳ：水　１：５溶液を加え、氷上で３０分インキュベーションした。溶菌液を３２００ｒｐｍで１０分、４℃にて遠心分離し、上清を２ｍＭ　$MgCl_2$とした。ｓｃＦｖは、Perkin Elmer (Waltham, MA) MINITRAK（商標）ＩＸ液体処理ロボットを用いた上清のPHYTIP（登録商標）繰り返し通過によりＮｉ－ＮＴＡ PHYTTP（登

録商標）（PhyNexus）上に捕捉し、続いてＩＭＡＣ洗浄緩衝液で洗浄し、２００ｍＭイミダゾール、５０ｍＭトリス、３００ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）で溶出した。緩衝液をＰＢＳ内に１：１０で３サイクル希釈することによりＰＢＳに交換し、続いて、１０、０００分子量カットオフフィルタープレート（Millipore MULTISCREEN（登録商標）ULTRACEL（商標）９６ウェル限外濾過プレート、Millipore, Billerica, MA）上に濃縮した。製造元のウシ血清アルブミン標品を用いるMicro BCA（商標）キット（Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL）を使用して試料を定量した。

実施例６．２：ヒト又はマウスＩＬ－２１Ｒを過剰発現している細胞のＩＬ－２１依存性増殖についてのアッセイ

[0245]１８Ａ５由来結合タンパク質（ｓｃＦｖ及びＩｇＧ）で阻害アッセイを実施し、ヒト又はマウスＩＬ－２１Ｒでトランスフェクトされた細胞株のＩＬ－２１依存性増殖のそれらの遮断を測定した。マウス前Ｂ細胞株であるＢａＦ３細胞、及びヒト赤血球細胞株であるＴＦ１細胞に、ＩＬ－２１Ｒ及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をレトロウイルスにより形質導入した。細胞を、１０％ＦＢＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン及び０．０００３６％β－メルカプトエタノールを含有するＲＰＭＩ１６４０中でルーチン的に増殖させた。ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞培養液には、５０ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を補給し；マウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞培養液には、１０Ｕ／ｍｌのＩＬ－３を補給し；ＴＦ１細胞培養液には、５０ｎｇ／ｍｌのＧＭ－ＣＳＦを補給した。アッセイに先だって、増殖因子を補給していないアッセイ培地で細胞を３回洗浄し、アッセイ培地に再懸濁し、３７℃／５％CO_2で６時間インキュベートした。アッセイプレートを調製するには、５０００細胞を９６ウェル平底白色組織培養プレート（Thermo Scientific, Waltham, MA）の中央の６０ウェルに、５５μｌ／ウェルの容量で加えた。試験ｓｃＦｖ又はＩｇＧ試料は、保存試料をアッセイ培地に希釈することにより調製し、連続的に３倍希釈した。２５μｌの結合タンパク質試料を細胞に加え、３７℃／５％CO_2で３０分インキュベートした。１００－４００ｐｇ／ｍｌのヒト又はマウスＩＬ－２１を含有する２０μｌのアッセイ培地を各ウェルに加え、細胞をさらに４８時間インキュベートした。プレートを室温とし、１５μｌ／ウェルのCELLTITER-GLO（登録商標）を添加し、室温で１０分インキュベートし、Perkin Elmer ENVISION（商標）プレートリーダーで発光を測定することにより増殖を測定した。PhyNexus IMACチップで精製後、１０８のｓｃＦｖを、三つすべての細胞株のＩＬ－２１依存性増殖の中和について試験した。すべて、親１８Ａ５　ｓｃＦｖのIC_{50}より低い又は同等の値でヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞の中和を示した。一部は、マウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞増殖及びヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞の強い中和を示した。２７の最も強力なクローンからのデータが図１－３に示されており、表５に要約されている。

【０１８５】

[0246]図１－３は、ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図１ａ－ｃ）；ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図２ａ－ｃ）及びマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図３ａ－ｃ）のｓｃＦｖによる増殖の中和を示している。細胞を示されたｓｃＦｖと混合し、１００ｐｇ／ｍｌ（図１－２）又は４００ｐｇ／ｍｌ（図３）のヒトＩＬ－２１とインキュベートした。

実施例６．３：定量的エピトープ競合アッセイ

[0247]精製したｓｃＦｖは、酵素連結免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）においてマウスＩＬ－２１Ｒへの結合について、親１８Ａ５抗体と競合するそれらの能力を定量的に分析した。９６ウェル Nunc MAXISORP（登録商標）プレートを、ＰＢＳ中０．７５μｇ／ｍｌの濃度の親１８Ａ５抗体を用いて、４℃で一晩コートした。プレートはＰＢＳを使用して３回洗浄し、次に、ＰＢＳ／１％ＢＳＡ／０．０５％ツイーン２０中、室温で３時間ブロックした。ｓｃＦｖを、３６ｎＭビオチン化ｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆと混合し、室温で１０分インキュベートした。ブロックしたプレートはＰＢＳで３回洗浄し、５０μｌ／ウェルのｓｃＦｖ／ＩＬ－２１Ｒ混合物を適したプレートに移し、室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳで５回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲー

トストレプトアビジン（Southern Biotech, Birmingham, AL）二次抗体の１：６０００希釈液を添加し、結合されたビオチン化ｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆを検出した。プレートを次に室温で１時間インキュベートし、ＰＢＳで７回洗浄した。３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を使用してシグナルを発生させ、H_2SO_4で反応を停止し、ENVISION（商標）プレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて４５０ｎｍで吸光度を読み取った。PhyNexus　IMACチップにより精製された１０８のｓｃＦｖをこのアッセイで試験し、ほとんどが、親１８Ａ５　ｓｃＦｖのIC_{50}より低い値で、ビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへの結合について親１８Ａ５抗体と競合した。細胞に基づいた中和アッセイにおいて、最も高い効力を有する２７のクローンについてのエピトープ競合データが図４ａ－ｃに示されており、表５に要約されている。

【０１８６】

【表５】

表５：　細胞に基づいたアッセイにおけるヒト及びマウス IL-21R の中和、及びマウス IL-21R 結合についての 18A5 抗体との競合

	ヒト IL-21R-BaF3 中和アッセイにおける IC_{50} (nM)	ヒト IL-21R-TF1 中和アッセイにおける IC_{50} (nM)	マウス IL-21R-BaF3 中和アッセイにおける IC_{50} (nM)	マウス IL-21R エピトープ競合 ELISA における IC_{50} (nM)
H3	7.7	98.1	25.68	14
H4	3.8	9.3	nd	nd
H5	7.9	178.5	53.66	17
H6	13.8	150 (推定)	nd	13
L1	3.7	55 (推定)	28.77	7
L2	3.1	37.5	2.41	5
L3	27.6	7 (推定)	13.78	100
L4	2.1	60 (推定)	nd	8
L5	2.1	20 (推定)	38.52	7
L6	5.9	150 (推定)	0.29	4
L8	4.1	51.3	715.27	7
L9	2.8	27.7	3.61	7
L10	15.1	7	nd	40
L11	4.2	38.3	10.03	6
L12	2.6	54.9	87.77	8
L13	11.0	257.4	1.25	7
L14	3.2	33.5	6.49	6
L15	3.3	30.3	53.49	14
L16	3.7	67.4	4.71	6
L17	1.6	60.3	2.66	12
L18	3.7	54.4	8.34	8
L19	4.5	35.3	13.59	15
L20	3.1	57.5	15.39	5
L21	9.4	100 (推定)	162.27	28
L23	1.5	15.3	nd	12
L24	2.4	18.7	3.73	6
L25	3.7	33.1	15.55	9

【０１８７】

実施例７：親１８Ａ５　ＩｇＧの生殖細胞系列（germline）配列への変換

[0248]修飾されたV_L領域を有する以下の１５のｓｃＦｖを、生殖細胞系列化親１８Ａ５　V_Lとともに（以下を参照されたい）、完全長ヒトＩｇＧラムダ：Ｌ２、Ｌ３、Ｌ６、Ｌ９、Ｌ１１、Ｌ１３、Ｌ１４、Ｌ１６、Ｌ１７、Ｌ１８、Ｌ１９、Ｌ２０、Ｌ２３、Ｌ２４及びＬ２５への変換に選択した。修飾されたV_H領域を有する４つのｓｃＦｖ、Ｈ３、Ｈ４、Ｈ５及びＨ６を、生殖細胞系列化親１８Ａ５　V_Hとともに（以下を参照されたい）、完全長ヒトＩｇＧ１への変換に選択した。

[0249]親１８Ａ５抗体のV_H及びV_Lアミノ配列は、ＣＤＲ領域の外側の配列が最も近いヒト生殖細胞系列配列と一致するように修飾された：V_Hの場合、ＤＰ６７／ＶＨ４Ｂ＋（ＶＢＡＳＥ＿ＡＡ：ＷＡＰ００ＣＥＡＺ＿１）及びＪＨ１／ＪＨ４／ＪＨ５、そしてV_Lの場合、ＤＰＬ１６／ＶＬ３．１（ＶＢＡＳＥ＿ＡＡ：ＷＡＰ００ＣＥＭＩ＿１）。修飾は、GENEART(Regensburg, Germany)での遺伝子合成及びＰＣＲにより導入される部位特異的変異の組み合わせにより行った。加えて、配列は、それらの独自方法を使用するGENEARTにより、哺乳類細胞での発現にコドン最適化された。親１８Ａ５配列及び生殖細胞系

列修正１８Ａ５配列のアラインメントが以下に示されている：

１８Ａ５重鎖比較

【０１８８】

【化１】

親18A5 V_H

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGACTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCT
GTCTCTGGTTACTCCATCAGCAGTGGTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGGTTG
GAGTGGATTGGGAGTATCTCTCATACTGGGAACACCTACTACAACCCGCCCCTCAAGAGTCGCGTCACC
ATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGCGAGGTGGGGGAATTAGCAGGCCGGAGTACTGGGGCAAAGGCACCCTGGTCACC
GTCTCGAGT （配列番号５）

【０１８９】

【化２】

生殖細胞系列化18A5 V_H

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCC
GTGTCCGGCTACTCCATCTCCTCCGGCTACTACTGGGGCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGATCGGCTCCATCTCTCACACCGGCAACACCTACTACAACCCCCCTCTGAAGTCCAGAGTGACC
ATCTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCTGTGACCGCTGCCGATACCGCC
GTGTACTACTGTGCCAGAGGCGGCGGAATCTCCAGACCTGAGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACC
GTGTCCTCT （配列番号７）

【０１９０】

【化３】

生殖細胞系列化18A5 V_H x親18A5 V_H

```
          .         .         .         .         .
  1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCCGAGAC 50
    |||||||||||||||||||| ||||| || |||||||| |||| |||||
  1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGACTTCGGAGAC 50
          .         .         .         .         .

 51 CCTGTCTCTGACCTGTGCCGTGTCCGGCTACTCCATCTCCTCCGGCTACT 100
    |||||| || ||||| || || || || ||||||||| |  || ||||
 51 CCTGTCCCTCACcTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCAGCAGTGGTTACT 100
          .         .         .         .         .

101 ACTGGGGCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGC 150
    |||||||||||||| | ||||| || || ||||| |||||||||| ||
101 ACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGGTTGGAGTGGATTGGG 150
          .         .         .         .         .

151 TCCATCTCTCACACCGGCAACACCTACTACAACCCCCCTCTGAAGTCCAG 200
      |||||||| || || |||||||||||||||| || || |||   |
151 AGTATCTCTCATACTGGGAACACCTACTACAACCCGCCCCTCAAGAGTCG 200
          .         .         .         .         .

201 AGTGACCATCTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGT 250
    || ||||| || || ||||| |||||||||||||||||||||| |||
201 CGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGA 250
          .         .         .         .         .

251 CCTCTGTGACCGCTGCCGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCGGC 300
    |||||||||||| || || || |||||||| |||||||  |||| ||
251 GCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGAGGTGGG 300
          .         .         .         .         .

301 GGAATCTCCAGACCTGAGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTC 350
    |||||   ||| || |||||||||||| | |||||||||| ||||| ||
301 GGAATTAGCAGGCCGGAGTACTGGGGCAAAGGCACCCTGGTCACCGTCTC 350

351 CTCT 354   (配列番号7)
      |
351 GAGT 354   (配列番号5)
```

【０１９１】

１８Ａ５軽鎖比較

【０１９２】

【化４】

親18A5 V_L

```
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTCCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCACGCTCACATGCCAA
GGAGACAGCCTCAGAACCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGACAGGCCCCTATACTTCTC
CTCTATGGTAAACACAAACGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGCTTCTCTGGCTCCACCTCAGGAGACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGACGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGGACTCC
AGTGGCAACCCCCATGTTCTGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTA  (配列番号9)
```

【０１９３】

【化５】

生殖細胞系列化18A5 V_L

```
TCCTCTGAGCTGACCCAGGATCCTGCTGTGTCTGTGGCCCTGGGCCAGACCGTCAGGATCACCTGCCAG
GGCGATAGCCTGAGAACCTACTACGCCTCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCCCCTGTGCTGGTG
ATCTACGGCAAGCACAAGAGGCCATCCGGCATCCCTGACAGATTCTCCGGCTCCTCCTCTGGCAATACC
GCCTCCCTGACCATCACCGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAACTCCCGGGACTCT
TCCGGCAACCCTCACGTGCTGTTTGGCGGCGGAACCCAGCTGACCGTGCTA （配列番号11）
```

【０１９４】

【化６】

生殖細胞系列化18A5 V_L x 親18A5 V_L

```
          .         .         .         .         .
  1 TCCTCTGAGCTGACCCAGGATCCTGCTGTGTCTGTGGCCCTGGGCCAGAC 50
    || ||||||||||| ||||| ||| |||||||||||||| |||| |||||
  1 TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTCCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGAC 50
          .         .         .         .         .

 51 CGTCAGGATCACCTGCCAGGGCGATAGCCTGAGAACCTACTACGCCTCCT 100
     |||| | |||| ||||| || || ||||| |||||||| || ||   ||
 51 AGTCACGCTCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCTATTATGCAAGCT 100
          .         .         .         .         .

101 GGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCCCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAG 150
    |||| ||||||||| | |||||||||||| | ||  |  |||| || ||
101 GGTACCAGCAGAAGTCAGGACAGGCCCCTATACTTCTCCTCTATGGTAAA 150
          .         .         .         .         .

151 CACAAGAGGCCATCCGGCATCCCTGACAGATTCTCCGGCTCCTCCTCTGG 200
    |||||  |||| || || ||||| ||| | ||||| |||||| |||| ||
151 CACAAACGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGCTTCTCTGGCTCCACCTCAGG 200
          .         .         .         .         .

201 CAATACCGCCTCCCTGACCATCACCGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCCG 250
     | || || ||| ||||||||| || |||||||| || |||||||| |
201 AGACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGACGAGGCTG 250
          .         .         .         .         .

251 ACTACTACTGTAACTCCCGGGACTCTTCCGGCAACCCTCACGTGCTGTTT 300
    |||| |||||||||||||||||||    |||||||| || || |||||
251 ACTATTACTGTAACTCCCGGGACTCCAGTGGCAACCCCCATGTTCTGTTC 300
          .         .

301 GGCGGCGGAACCCAGCTGACCGTGCTA 327   (配列番号11)
    ||||| || |||||||| |||||  ||
301 GGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTA 327   (配列番号9)
```

【０１９５】

生殖細胞系列修正V_H配列（親配列からの変化はボールド体であり、そして下線が付けられている）

【０１９６】

【化７】

親(配列番号６) QVQLQESGPGLVKTSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKG

生殖細胞系列化(配列番号８) QVQLQESGPGLVK**P**SETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKG

親 LEWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGGISRP

生殖細胞系列化 LEWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGGISRP

親 EYWGKGTLVTVSS

生殖細胞系列化 EYWG**Q**GTLVTVSS

【０１９７】

生殖細胞系列修正V_L配列（親配列からの変化はボールド体であり、そして下線が付けられている）

【０１９８】

【化８】

親(配列番号 10) SSELTQDPPVSVALGQTVTLTCQGDSLRTYYASWYQQKSGQAPIL

生殖細胞系列化(配列番号 12) SSELTQDP**A**VSVALGQTV**RI**TCQGDSLRTYYASWYQQK**P**GQAP**V**L

親 LLYGKHKRPSGIPDRFSGSTSGDTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPHVLFGGGTQ

生殖細胞系列化 **VI**YGKHKRPSGIPDRFSGS**S**SG**N**TASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPHVLFGGGTQ

親 LTVL

生殖細胞系列化 LTVL

【０１９９】

実施例８：ライブラリー由来ｓｃＦｖのＩｇＧへの変換

[0250]改良された１８Ａ５ ｓｃＦｖ誘導体のV_L及びV_HドメインのＣＤＲ３領域を、ＰＣＲ及び下記の方法による親１８Ａ５の生殖細胞系列修正V_L及びV_Hフレームワーク内にサブクローン化することにより増幅した。生殖細胞系列化１８Ａ５ V_H遺伝子の５’部分を包含するＰＣＲ断片は、プライマーＢｓｓＨＩＩ＿ＩＩ＿V_H＿Ｆ（５’－ＧＣＴＴＧＧＣＧＣＧＣＡＣＴＣＴＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＧＧＡＧ－３’）［配列番号２３０］及びＧV_H＿Ｒ＿ｆｏｒ＿ＢｓｓＨＩＩ（５’－ＴＣＡＧＧＧＡＧＡＡＣＴＧＧＴＴＣＴＴＧＧ－３’）［配列番号２３１］でのプラスミドｐＳＭＥＤ２＿ＯＰ１８Ａ５Ｇ＿ｈｕＩｇＧ１の増幅により発生させた。改良されたｓｃＦｖクローンＶＨ３からのV_H遺伝子の３’部分を包含するＰＣＲ断片は、以下のプライマーで増幅した：Ｇ＿V_H＿Ｅ＿ｆｏｒ＿ＳａｌＩ（５’－ＴＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＴＴＣＴＣＣＣＴＧ－３’）［配列番号２３２］及びｓｃＦｖ＿ＳａｌＩ＿V_H＿Ｒ（５’－ＧＣＧＡＣＧＴＣＧＡＣＡＧＧＡＣＴＣＡＣＣＡＣＴＣＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＧＣＣ－３’）［配列番号２３３］。断片をゲル精製し、次に二つを混合し、外側プライマーセットＢｓｓＨＩＩ＿Ｇ＿V_H＿Ｆ及びＳａｌＩ＿V_H＿Ｒで増幅して完全V_H遺伝子断片を発生させた。これをＢｓｓＨＩＩ及びＳａｌＩで消化し、三重変異体ヒンジ領域を有するヒトＩｇＧ１の定常領域を含有するベクター内へライゲートした。挿入物は、V_HＪセグメントのコード配列を変化させるため、ＢｓｓＨＩＩ＿ＩＩ＿V_H＿Ｆ及び新規プライマー（Ｓａｌ＿V_H＿Ｒ＿ＲＪ（５’－ＧＣＧＡＣＧＴＣＧＡＣＡＧＧＡＣＴＣＡＣＣＡＣＴＣＧＡ

ＧＡＣＧＧ－３’））［配列番号２３４］で再増幅し、ＪＨｌ生殖細胞系列配列を一致させ、そしてヒトＩｇＧｌ－三重変異体定常領域ベクター内にライゲートした。

【０２００】

[0251]改良されたｓｃＦｖからのＶ$_{L}$遺伝子は、同様の方法によりサブクローン化した。１８Ａ５　Ｖ$_{L}$遺伝子の５’部分を包含するＰＣＲ断片は、プライマーＢｓｓＨＩＩ＿ＩＩ＿Ｖ$_{L}$＿Ｆ（５’－ＧＣＴＴＧＧＣＧＣＧＣＡＣＴＣＴＴＣＣＴＣＴＧＡＧＣＴＧＡＣＣＣＡＧ－３’）［配列番号２３５］及びｓｃＦｖ＿Ｖ$_{L}$＿Ｒ＿ｆｏｒ＿ＢｓｓＨＩＩ（５’－ＧＣＣＴＧＡＧＣＣＣＣＡＧＴＧＡＴＧＧＴＣＡ－３’）［配列番号２３６］でのプラスミドｐＳＭＥＮ２＿ＯＰ１８Ａ５Ｇ＿ｈｕラムダの増幅により発生させた。改良されたｓｃＦｖクローンからのＶ$_{L}$遺伝子の３’部分を包含するＰＣＲ断片は、プライマーＧＶ$_{L}$＿Ｆ＿ｆｏｒ＿ＸｂａＩ（５’－ＡＣＣＧＣＣＴＣＣＣＴＧＡＣＣＡＴＣＡＣ－３’）［配列番号２３７］及びｓｃＦｖ＿ＸｂａＩ＿Ｖ$_{L}$＿Ｒ（５’－ＧＣＧＣＣＧＴＣＴＡＧＡＧＴＴＡＴＴＣＴＡＣＴＣＡＣＣＴＡＡＡＡＣＧＧＴＧＡＧＣＴＧＧＧＴＣＣＣＴＣ－３’）［配列番号２３８］で増幅した。断片をゲル精製し、次に各遺伝子の５’及び３’部分に相当する断片を混合し、外側プライマーセットＢｓｓＨＩＩ＿ＩＩ＿Ｖ$_{L}$＿Ｆ及びｓｃＦｖ＿ＸｂａＩ＿Ｖ$_{L}$＿Ｒで増幅して、完全Ｖ$_{L}$遺伝子断片を発生させた。これらをＢｓｓＨＩＩ及びＸｂａＩで消化し、ヒトラムダ遺伝子の定常領域を含有するベクター内にライゲートした。

実施例９：インビトロでの改良ＩｇＧの特徴付け

実施例９．１：結合タンパク質の一過性小規模発現

[0252]クローンは、ｃｏｓ－７細胞での一過性発現後、完全ＩｇＧ形式で機能について試験した。１６の試験配列（生殖細胞系列化親１８Ａ５　Ｖ$_{L}$及びＬ２、Ｌ３、Ｌ６、Ｌ９、Ｌ１ｌ、Ｌ１３、Ｌ１４、Ｌ１６、Ｌ１７、Ｌ１８、Ｌ１９、Ｌ２０、Ｌ２３、Ｌ２４及びＬ２５）の組における各軽鎖を５つの試験配列（Ｈ３、Ｈ４、Ｈ５及びＨ６、ならびにＶ$_{H}$＿Ｐ、生殖細胞系列化親１８Ａ５Ｖ$_{H}$ドメイン）の組における各重鎖と対を形成させた。各対の各プラスミド（１．４μｇ）を製造元の使用説明書に従って、TRANSIT（登録商標）トランスフェクション試薬（Minis, Madison, WI）と混合し、ＤＮＡ：TRANSIT（登録商標）試薬複合体を、６－ウェル組織培養プレート中、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）／１０％熱不活性化ウシ胎仔血清／ペニシリン／ストレプトマイシン／２ｍＭ　Ｌ－グルタミン中で増殖しているｃｏｓ－７細胞の単層に加えた。２４時間後、培養液を無血清培地（ＲｌＣＤｌ）と交換し、４８時間後に採取した。現在では完全長抗体を含む結合タンパク質を抗ヒトＩｇＧ　ＥＬＩＳＡにより定量した。

実施例９．２：細胞増殖の中和における抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧの活性

[0253] 血清を含まない条件培地中の８０の一過性に発現されたＩｇＧは、上記の３つの細胞株でのＩＬ－２１依存性増殖アッセイにおける活性について試験した：（１）ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞、（２）マウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞、及び（３）ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞。８０対すべてがヒトＩＬ－２１Ｒ発現ＢａＦ３細胞の増殖の中和を示し、ＶＨ４を含んでいるものを除いたすべての対がヒトＩＬ－２１Ｒ発現ＴＦ１細胞の中和を示した（データは示さない）。８０対すべてがマウスＩＬ－２１Ｒ発現ＢａＦ３細胞の増殖の中和も示し、最も強い中和は一般に親重鎖と対形成した軽鎖と関係し、そして最も弱い中和は一般にＶＨ４重鎖と関係していた（データは示さない）。最も強力な２１のＩｇＧ組み合わせ（ＡｂＡ－ＡｂＵ）は図５に示されており、ＩＣ$_{50}$データは、表６に要約されている。

【０２０１】

[0254]アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ａ－ｃ）、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図５ｄ－ｆ）、又は、４００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１を加えたマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図５ｇ－ｉ）に対して実施した。ＩＬ－２１は示された抗体の後で細胞に加えた；増殖は４８時間後、CELLTITER-GLO（登録商標）で測定した。図２６ａ－ｃは、同一の３細胞株において同様の阻害を示している追加の研究である。

実施例９．３：一過性に発現されたラット及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒへの抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧ結合

[0255]結合タンパク質のサブセットを、ＣＨＯ－ＰＡ－Ｄｕｋｘ細胞の表面上に一過性に発現されたラット、カニクイザル、ヒトＩＬ－２１Ｒ又はヒトＩＬ－２Ｒ－γ共通サブユニットへの結合について試験した。細胞はアッセイの４８時間前にトランスフェクトした。アッセイの日に、細胞を自動プレート洗浄器（Titertek, Huntsville, AL）を使用し、０．９ｍＭ　$CaCl_2$及び０．４５ｍＭ　$MgCl_2$含有ＰＢＳ（ＰＢＳ／ＣａＭｇ）で穏やかに５回洗浄し、ＰＢＳ／ＣａＭｇ／５％脱脂粉乳中、室温で１時間ブロックした。一過性に発現された抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧからの条件培地をブロッキング緩衝液に連続的に希釈し、ブロックされたプレート中の細胞に室温で１時間加えた。細胞をＰＢＳ／ＣａＭｇで５回洗浄し、次に西洋ワサビペルオキシダーゼ－コンジュゲート抗ヒトＩｇＧと、室温で１時間インキュベートした。次に細胞をＰＢＳ／ＣａＭｇで１０回洗浄し、すべての洗浄緩衝液を除去した。発色反応が飽和に達するまで、細胞を１００μｌ　ＴＭＢとインキュベートし、１００μｌの０．１８Ｍ　H_2SO_4で停止させ、Perkin Elmer ENVISION（商標）プレートリーダー上、Ａ４５０で読み取った。

【０２０２】

[0256]２１のＩｇＧすべてが、ヒト（図６ａ－ｃ）、ラット（図６ｄ－ｆ）又はカニクイザル（図６ｇ－ｉ）ＩＬ－２１Ｒを一過性に発現しているＣＨＯ細胞に結合した。大部分は、ＣＨＯ細胞上に一過性に発現された対照タンパク質（ヒトガンマ（γ）共通鎖）へのバックグラウンドを超える結合を示さなかったが、ＩｇＧのサブセット（ＡｂＤ、ＡｂＥ、ＡｂＦ、ＡｂＨ、ＡｂＬ、及びＡｂＭ）は、バックグラウンドを超え１３ｎＭ又はより上で結合した（図６ｊ－ｌ）。データは、表６に要約されている。

【０２０３】

【表６】

表６：細胞増殖アッセイにおけるヒト及びマウス IL-21R 活性の中和及び CHO 細胞上に発現されたヒト、ラット及びカニクイザル IL-21R への結合の概要

結合タンパク質	ヒト IL-21R-BaF3 増殖 IC_{50} (nM)	ヒト IL-21R-TF1 増殖 IC_{50} (nM)	マウス IL-21R-BaF3 増殖 IC_{50} (nM)	ヒト IL-21R 結合 (細胞 ELISA において 13 nM Ab; A450)	ラット IL-21R 結合 (細胞 ELISA において 13 nM Ab; A450)	サル IL-21R 結合 (細胞 ELISA において 13 nM Ab; A450)	ヒトγ共通 結合 (細胞 ELISA において 13 nM Ab; A450)
AbA	0.97	3.80	0.08	1.196	1.124	1.352	0.111
AbB	1.14	3.34	0.421	1.147	1.09	1.333	0.107
AbC	0.82	3.36	0.03	1.218	0.999	1.277	0.137
AbD	0.91	2.67	0.01	1.247	0.874	1.375	0.197
AbE	0.56	2.28	0.04	1.257	1.111	1.423	0.223
AbF	0.54	2.41	0.304	1.347	1.001	1.458	0.433
AbG	0.77	3.84	0.07	1.35	1.112	1.304	0.108
AbH	0.94	3.64	0.327	1.35	1.097	1.324	0.152
AbI	1.00	3.80	0.224	1.237	1.088	1.209	0.107
AbJ	0.65	4.60	0.4	1.217	1.261	1.273	0.126
AbK	0.98	4.00	0.079	1.364	1.175	1.338	0.108
AbL	0.68	4.25	0.227	1.454	1.257	1.514	0.219
AbM	1.08	4.22	0.125	1.197	0.78	1.45	0.224
AbN	0.50	1.59	0.435	1.214	0.702	1.497	0.136
AbO	0.52	2.91	0.065	1.107	1.101	1.358	0.108
AbP	0.75	3.48	0.03	1.308	1.03	1.313	0.112
AbQ	0.68	4.62	0.153	1.255	1.161	1.31	0.125
AbR	0.87	3.94	0.302	1.334	1.108	1.35	0.109
AbS	1.53	5.00	0.04	1.017	1.166	1.224	0.118
AbT	0.67	3.26	0.093	1.078	0.994	1.219	0.102
AbU	0.73	3.13	0.184	1.289	0.927	1.314	0.104

【０２０４】

実施例９．４：ヒトＩＬ－２１Ｒへの抗ＩＬ－２１Ｒ　ＩｇＧ結合の選択性のBIACORE（商標）分析

[0257]一過性に発現された抗ＩＬ－２１Ｒ結合タンパク質（ここでは抗体）のサブセットの結合特異性は、BIACORE（商標）２０００表面プラズモン共鳴装置で試験した。抗ヒ

トＩｇＧ、抗マウス免疫グロブリン抗体及びマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆを、標準アミンカップリングを使用してリサーチグレードのカルボキシメチルデキストランチップ（ＣＭ５）上に固定化した。センサーチップ表面を、２０μｌ／分の流量で７分、ＥＤＣ／ＮＨＳで活性化した。第一のフローセルは容積屈折率、マトリックス効果及び非特異的結合を補正するための参照表面として使用した。捕捉抗体（フローセル２の抗ヒトＦｃ抗体（Invitrogen Corporation, Carlsbad,CA）の７，１５０レゾナンスユニット（ＲＵ）及びフローセル３の抗マウスＦｃ抗体の７，５００ＲＵ）は、酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ５．０）で１０μｇ／ｍｌまで希釈し、活性化表面に注入した。残存活性化基は、１．０Ｍエタノールアミン（ｐＨ８．０）でブロックした。抗ヒトＩｇＧ及び抗マウスＩｇＧの分子量は、両方とも１５０ｋＤであり、ＩＬ－２１Ｒモノマーの分子量は、２７ｋＤであった。

【０２０５】

[0258]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体及び抗体対照（マウス抗ヒトＩＬ－２Ｒβ及びマウス抗ヒトＩＬ－４Ｒ（R&D Systems, Minneapolis, MN）；ヒト抗ヒトＩＬ－１３（Wyeth, Cambridge, MA））を含有する条件培地は、０．２％ウシ血清を補給したＨＢＳ／ＥＰ緩衝液で希釈し、BIACORE（商標）チップの４つすべてのフローセルに注入し、種に適した捕捉抗体上に５００－７００（ＲＵ）の抗体を捕捉させた。５秒の洗浄時間に続き、陽性対照タンパク質（マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ）、ＩＬ－２１Ｒに関連する２つのヒトタンパク質（ヒトＩＬ－２Ｒβ及びヒトｓＩＬ－４Ｒ（R&D Systems））の５０ｎＭ溶液、又は非関連Ｈｉｓ／ＦＬＡＧタグ付けタンパク質（ヒトＩＬ－１３－Ｈ／Ｆ）を、チップ上の捕捉された抗体の上に注入した。会合及び解離フェーズは、それぞれ１２０及び１８０秒モニターし、続いてグリシン（ｐＨ１．５）５μｌを２回注入して、完全に活性な捕捉表面を再生させた。すべての結合実験はＨＢＳ／ＥＰ緩衝液中、２５℃で行った。ブランク及び緩衝液効果は、二重参照を使用し、各センサーグラムについて差し引いた。

【０２０６】

[0259]試験された抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のすべて（１８Ａ５抗体及びＡｂＡ－ＡｂＵ）が、マウスＩＬ－２１Ｒへの明白な結合を示したが、ＩＬ－２１Ｒ関連タンパク質ヒトＩＬ－２Ｒβ及びヒト可溶性ＩＬ－４Ｒには、又は非関連Ｈｉｓ／ＦＬＡＧタグ付けタンパク質ヒトＩＬ－１３－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧには結合しなかった（図７ａ－ｃ）。対照は、ＩＬ－２Ｒβ及びヒト可溶性ＩＬ－４Ｒが特異的抗ＩＬ－２Ｒβ及び抗ＩＬ－４Ｒ抗体により捕捉され得ることを示した（図７ｄ）。

実施例９．５：一過性に発現された抗体の精製

[0260]７抗体（ヒトＩｇＧ１三重変異体バージョン：ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＯ、ＡｂＰ、及びＡｂＵ；及び二重変異体バージョン：ＡｂＱ及びＡｂＲ）をｃｏｓ－７細胞中で一過性に発現させ、さらなる分析のために精製した。加えて、Ｆｃレセプター結合の異なったレベルを有すると予測される、ヒトＩｇＧテイルを有するＡｂＴの３つのバージョン（野生型ＩｇＧ１、ＩｇＧ４、及びＩｇＧ１二重変異体）も作製した。８つのＴ－１７５フラスコ中の各々の細胞をトランスフェクトするため２５μｇの各プラスミドを使用することを除いて、上記TRANSIT（登録商標）プロトコルに従った。条件培地の第一の採取に続いて、新鮮なＲ１ＣＤ１を加え、さらに７２時間後、採取した。条件培地をプールし、０．２２μｍフィルターで濾過した。抗体をプロテインＡ樹脂にロードし、２０ｍＭクエン酸／１５０ｍＭ塩化ナトリウム（ｐＨ２．５）で溶出し、トリス（ｐＨ８．５）で中和し、ＰＢＳ内に透析した。

実施例９．６：ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒへの抗体結合のBIACORE（商標）分析

[0261]ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の結合の動力学は、BIACORE（商標）表面プラズモン共鳴装置で試験した。抗ヒトＩｇＧ抗体（Invitrogen Corporation）は、標準アミンカップリングを使用してリサーチグレードのカルボキシメチルデキストランチップ（ＣＭ５）上に固定化した。表面を、２０μｌ／分の流量で７分、ＥＤＣ／ＮＨＳで活性化した。第一のフローセルは容積屈折率、マトリックス効果及び非特異的結合を補正するための参照表面として使用した。抗ヒトＦｃ抗体は、２０μｇ／

ｍｌに１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ５．０）で希釈し、２９５０－３４０５レゾナンスユニット（ＲＵ）を４つのフローセルの各々に捕捉させた。残存活性化基は、１．０Ｍエタノールアミン－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）でブロックした。

【０２０７】

[0262]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は、０．２％ウシ血清アルブミンを補給したＨＢＳ／ＥＰ緩衝液で０．１－０．２μｇ／ｍｌに希釈し、BIACORE（商標）チップにロードした。短い洗浄時間に続き、０－１００ｎＭヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ又は１０－５００ｎＭマウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆの溶液を５０μｌ／分の流量でチップ上に注入した。会合フェーズをヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒ動力学について３分間実施し、そしてｈＩＬ－２１Ｒについては１５分及びｍＩＬ－２１Ｒについて５分間解離フェーズをモニターし、続いてグリシン（ｐＨ１．５）１０μｌの２回注入及び３０μｌの１回注入により、完全に活性な捕捉表面を再生した。すべての結合実験はＨＢＳ／ＥＰ緩衝液中２５℃で実施し、試料ラックは１５℃に維持した。ブランク及び緩衝液効果は、二重参照を使用し、各センサーグラムについて差し引いた。センサーグラムは図８ａ－ｂ（ヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ）及び８ｃ－ｄ（マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ）に示されている。結合動力学的パラメータは、表７Ａに示されており、反復した実験からの追加の動力学的データは表７Ｂに示されている。

【０２０８】

[0263]加えて、上記プロトコルにより、カニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧへの結合動力学についてＡｂＳ及びＡｂＴを試験した。ヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆの結合プロファイルはＡｂＳ及びＡｂＴ両方について同様であった（図９）。図９は、ＡｂＳ（９ａ）及びＡｂＴ（９ｃ）に対するカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧの結合；及びＡｂＳ（９ｂ）及びＡｂＴ（９ｄ）に対するヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧの結合を示している。

【０２０９】

【表７Ａ】

表７Ａ：抗 IL-21R 抗体結合ヒト及びマウス IL-21R-His/FLAG の動力学的パラメータ

	ヒト IL-21R			マウス IL-21R		
抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
18A5	2.43E+05	1.08E-03	4.43E-09	2.12E+05	1.53E-02	7.20E-08
AbO	2.41E+05	1.14E-04	4.75E-10	1.12E+05	5.49E-03	4.92E-08
AbP	1.94E+05	1.19E-04	6.15E-10	9.99E+04	5.08E-03	5.08E-08
AbQ	4.39E+05	9.34E-05	2.13E-10	3.01E+05	2.07E-02	6.88E-08
AbR	1.70E+05	9.61E-05	5.67E-10	7.65E+04	4.93E-03	6.45E-08
AbS	1.44E+05	2.91E-04	2.02E-09	1.99E+05	3.32E-03	1.67E-08
AbT	1.79E+05	6.78E-05	3.79E-10	2.11E+05	3.31E-03	1.57E-08
AbU	1.86E+05	8.18E-05	4.40E-10	9.81E+04	4.34E-03	4.42E-08

【０２１０】

【表７Ｂ】

表７Ｂ：抗 IL-21R 抗体結合ヒト IL-21R-His/FLAG の動力学的パラメータ

	ヒト IL-21R		
抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
18A5	3.04E+05	1.34E-03	4.40E-09
AbP	2.33E+05	1.02E-04	4.36E-10
AbQ	4.39E+05	9.34E-05	2.13E-10
AbR	2.48E+05	9.76E-05	3.94E-10
AbS	2.02E+05	3.05E-04	1.51E-09
AbT	2.73E+05	7.42E-05	2.72E-10
AbU	2.38E+05	7.83E-05	3.29E-10

【０２１１】

実施例９．７：BIACOREエピトープ競合アッセイ

[0264]抗体ＡｂＳ及びＡｂＴ及び親抗体１８Ａ５を直接ＣＭ５　BIACORE（商標）チップ上に固定化した。マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ（１００ｎＭ）を３００秒間チップ上に流し、続いて洗浄し（１００秒）、そして次にＡｂＳ、ＡｂＴ、Ｄ５あるいは非中和抗ｍＩＬ－２１Ｒ抗体（７Ｃ２）の５μｇ／ｍｌ溶液を表面に流した。ＡｂＳ、ＡｂＴ及びＤ５では追加の結合は観察されず、ｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆ上のそれらの結合部位がＡｂＳ、ＡｂＴ又は１８Ａ５抗体への同時発生的結合によりブロックされたことを示している（図１０ａ）。対照的に、非中和対照抗ＩＬ－２１Ｒ抗体７Ｃ２は、ＡｂＳ、ＡｂＴ又は１８Ａ５抗体上に捕捉されたｍＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆに結合することが可能であり、この対照抗体は捕捉抗体により結合されたエピトープとは異なったエピトープで結合することを示している。

【０２１２】

[0265]同様に、ＡｂＳ及びＡｂＴは、ＣＭ５　BIACORE（商標）チップ上に固定化されたＡｂＳ又はＡｂＴにより捕捉されたヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへ結合しないが、一方、対照抗ヒトＩＬ－２１Ｒ抗体（９Ｄ２）はＡｂＳ又はＡｂＴにより捕捉されたヒトＩＬ－２１Ｒ－Ｈ／Ｆへ結合することが可能であった（図１０ｂ）。この観察は、ＡｂＳのための結合部位が、ＡｂＴによる同時発生的結合によりブロックされることを示しており、逆の場合も同様である。

実施例９．８：細胞に基づいた増殖アッセイ

[0266]精製したＩｇＧは、前記の３細胞株：ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞、マウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞及びヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞における、ＩＬ－２１依存性増殖アッセイでの活性を試験した。すべてが、ヒト及びマウスＩＬ－２１Ｒ－依存性増殖両方の強力な阻害を示し、親１８Ａ５　ＩｇＧの阻害よりも大きな効力であった（図１１、表８）。アッセイは、１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図１１ａ）、２００ｐｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２１を加えたマウスＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞（図１１ｂ）及び１００ｐｇ／ｍｌのヒトＩＬ－２１を加えたヒトＩＬ－２１Ｒ－ＴＦ１細胞（図１１ｃ）で実施した。図２６ｄは、ヒトＩＬ－２１Ｒ－ＢａＦ３細胞に対するこれらの抗体の効果の追加の研究結果を示している。

【０２１３】

【表８】

表８：ヒトIL-21R-BaF3細胞、マウスIL-21R-BaF3細胞及びヒトIL-21R-TF-1細胞の増殖の中和

抗体	ヒト IL-21R-BaF3 中和 IC_{50} (nM)	マウス IL-21R-BaF3 中和 IC_{50} (nM)	ヒト IL-21R-TF1 中和 IC_{50} (nM)
18A5 抗体	1.71	177.23	13.99
AbR	0.56	0.34	1.63
AbS	0.68	0.04	6.67
AbT	0.30	0.05	2.32
AbX	0.54	nd	nd
IL21R-Fc	0.20 (ヒト IL-21R-Fc)	0.04 (マウス IL-21R-Fc)	7.22 (ヒト IL-21R-Fc)

【０２１４】

実施例９．９：初代ヒトＢ細胞増殖アッセイ

[0267]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を、初代ヒトＢ細胞のＩＬ－２１依存性増殖を阻害するそれらの能力について試験した。健常ヒトドナーからのバフィーコート（buffy coat）細胞はMassachusetts General Hospital (Boston, MA)から得た。該細胞をROSETTESEP（商標）Ｂ細胞濃縮カクテル（StemCell Technologies, Vancouver, Canada）とインキュベートし、製造元の使用説明書に従ってＢ細胞を単離した。得られた集団（６０～８０％ＣＤ１９$^{+}$Ｂ細胞）は、９６ウェル平底プレートにおいて、１０％ＦＢＳ、５０Ｕ／ｍｌペニシリン、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン及び２ｍＭ　Ｌ－グルタミン含有ＲＰＭＩ中、１ｘ１０^{5}／ウェルで培養した。Ｂ細胞は、５％CO_2に調整した３７℃インキュベーターにおいて３０分、連続的に希釈した抗ヒトＩＬ－２１Ｒ抗体で前処理した。処理したＢ細胞は、５％CO_2に調整した３７℃インキュベーターにおいて３日間、０．５μｇ／ｍｌの抗ＣＤ４０ｍＡｂ（BD Biosciences,San Jose, CA）及び１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１サイトカインで刺激した。３日目、培養液を０．５μＣｉ／ウェル^{3}Ｈ－チミジン（Perkin Elmer (NEN)）で瞬間標識し、５時間後、ガラス繊維フィルターマット上に回収した。^{3}Ｈ－チミジン取り込みは、液体シンチレーション計測により決定した。改良された抗体のすべてが親１８Ａ５抗体より強い効力でＩＬ－２１依存性増殖を中和した（図１２ａ－ｂ、表９；図２６ｅも参照されたい）。

【０２１５】

【表９】

表９：ヒト初代Ｂ細胞増殖の中和

抗体	Ｂ細胞増殖の中和 IC_{50} (nM)
AbQ	0.16
AbR	0.22
AbS	0.44
AbT	0.14
AbU	0.13
18A5 抗体	1.86

【０２１６】

実施例９．１０：初代ヒトＴ細胞増殖アッセイ

[0268]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を、初代ヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のＩＬ－２１依存性増殖を阻害するそれらの能力について試験した。健常ヒトドナーからのバフィーコート細胞はMassachusetts General Hospitalから得た。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、製造元の使用説明書に従ってROSETTESEP（商標）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞濃縮カクテル（StemCell Technologies）を使用する陰性選択により単離した。得られた集団は、～８０－９０％ＣＤ４$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞であった。濃縮したヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、５％CO_2に調整した３７℃インキュベーターにおいて、１０％ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン及びＨＥＰＥＳを含有するＲＰＭＩ中、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８でコートしたミクロスフェアで３日間活性化した。活性化後、ミクロスフェアを除去し、細胞を洗浄し、培地中、およそ１ｘ１０^{6}細胞／ｍｌで一晩静止させた。静止させた細胞は次に、アッセイプレートへの添加に先だって再度洗浄した。抗ヒトＩＬ－２１レセプター抗体の連続希釈を平底９６ウェルプレート中の培地で行い、続いてヒトＩＬ－２１（２０ｎｇ／ｍｌ最終濃度）及び活性化及び静止ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（１０^{5}細胞／ウェル）を逐次添加した。プレートは次にさらに３日間インキュベートし、アッセイの最後の６時間の間、１μＣｉ／ウェルの^{3}Ｈ－チミジン（Perkin Elmer (NEN)）で瞬間標識した。細胞をガラス繊維フィルターマット上に回収し、^{3}Ｈ－チミジン取り込みは、液体シンチレーション計測により決定した。改良された抗体のすべてが親１８Ａ５抗体より強い効力でＩＬ－２１依存性増殖を中和した（図１３、表１０Ａ；図２６ｆも参照されたい）。

【０２１７】

【表１０Ａ】

表１０Ａ：ヒト初代Ｔ細胞増殖の中和

抗体	Ｔ細胞増殖の中和 IC_{50} (nM)
AbO	0.06
AbP	0.02
AbQ	0.08
AbR	0.04
AbS	0.06
AbT	0.03
AbU	0.03
18A5 抗体	1.42

【０２１８】

実施例９．１１：初代マウスＴ細胞増殖アッセイ

[0269]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を、初代マウスＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のＩＬ－２１依存性増殖を阻害するそれらの能力について試験した。１２週齢メスＢＡＬＢ／Ｃマウスからの膝窩、腋窩、上腕及び鼠径リンパ節及び脾臓を採取した。脾臓細胞の単細胞懸濁液は、０．１６Ｍ　NH_4Clを含有する０．０１７Ｍトリス（ｐＨ７．４）を使用し、赤血球を枯渇させた。脾臓及びリンパ節細胞をプールし、マウスＴ細胞ＣＤ８サブセットカラムキット（R&D Systems）を使用してＣＤ８$^{+}$細胞を濃縮した。マウスＣＤ８$^{+}$細胞（３ｘ１０^{4}；１０％ウシ胎仔血清を含有し、そして０．０５ｍＭ　β－メルカプトエタノール、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、０．１ｍＭ非必須アミノ酸、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン及び５０μｇ／ｍｌゲンタマイシンを補給したＤＭＥＭに懸濁）を９６ウェル、抗ｍＣＤ３活性化プレート（BD Biosciences）に蒔き；ｍＩＬ－２１（５０ｎｇ／ｍｌ）を、すべてのウェルに加えた。試験抗体は２０μｇ／ｍｌから始めて、三重に力価を測定した。細胞は、３７℃／１０％CO_2イン

キュベーター中で３日間増殖させた。培養の最後の５時間の間に細胞を０．５μＣｉのメチル－^{3}Ｈ－チミジン／ウェル（GE Healthcare）で標識した。細胞をMach IIIセルハーベスター（TomTec, Hamden, CT）で採取し、Triluxマイクロベータカウンター（Perkin Elmer）で計数した。ＡｂＰは別として、改良された抗体のすべてが、親１８Ａ５抗体より強い効力でＩＬ－２１依存性増殖を中和した（図１４、表１０Ｂ；図２６ｇも参照されたい）。

【０２１９】

【表１０Ｂ】

表１０Ｂ：マウス初代Ｔ細胞増殖の中和

抗体	Ｔ細胞増殖の中和 IC_{50} (nM)
AbO	4.92
AbP	阻害無し
AbQ	0.85
AbR	0.13
AbS	0.02
AbT	0.61
AbU	1.79
18A5 抗体	>85

【０２２０】

実施例９．１２：ＡＤＣＣアッセイ

[0270]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は、標的細胞に結合した場合に抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）を誘発するそれらの能力について試験した。実験の前日、バフィーコートをＰＢＳで１：１に希釈し、それをFICOLL（登録商標）（GE Healthcare）に層積し、１２００ｇで２０分遠心分離することによりＰＢＭＣを単離した。FICOLL（登録商標）層の上層からＰＢＭＣを除き、１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－２及び１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－１２（R&D Systems）で一晩刺激した。実験当日、遠心分離によりＰＢＭＣを回収し、１ｘ１０^{8}細胞／ｍｌで培地に再懸濁した。ＢＪＡＢ細胞は、０．５μＭ　ＣＦＳＥ（MOLECULAR PROBES(登録商標),Invitrogen Corporation）を用いて３７℃で１０分標識し、次にウシ胎仔血清で１回及びＰＢＳで２回洗浄した。細胞は次に、１００μｌの培地中、２ｘ１０^{5}細胞／ウェルで９６ウェル平底プレートに蒔いた。５０μｌの４ｘ抗体、続いて５０μｌの５ｘ１０^{6}ＰＢＭＣをＢＪＡＢ細胞に加えると、最終１：２５標的：エフェクター細胞比を得た。細胞を３７℃で６時間インキュベートし、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）で染色して、死滅した及び死にかかっている細胞を標識した。標的細胞の死滅（ＣＦＳＥ$^{+}$）は、FACSCALIBUR（商標）フローサイトメーター（BD Biosciences）においてＰＩ染色を測定することにより評価した。野生型ヒトＩｇＧ１定常領域を有するただ一つの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体、ＡｂＺのみが、標的細胞結合しない対照抗ＩＬ－１３抗体により示されたバックグラウンドレベルより上のＡＤＣＣを示した。ヒトＩｇＧ４（ＡｂＹ）を有する形態及びヒトＩｇＧ１の二重変異体（ＡｂＸ）及び三重変異体（ＡｂＴ）を有する形態を含み、ＡｂＺと同一の可変ドメインを有するすべての抗体が、ＡＤＣＣのバックグラウンドレベルしか示さなかった（図１５）。試験された他の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のすべてがヒトＩｇＧ１の三重変異体形を含んでおり、バックグラウンドＡＤＣＣを示した。陽性対照抗体、リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））は、すべての実験においてＡＤＣＣを誘発した。

実施例９．１３：Ｃｌｑ　ＥＬＩＳＡ

[0271]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体による細胞表面結合が補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を導き易いかどうかを決定するため、ＥＬＩＳＡにおいて、相補的成分Ｃｌｑへ結合するそれら

の能力について抗体を試験した。ＩＬ－２１Ｒ抗体及びリツキシマブ（RITUXAN（登録商標））をＰＢＳで５μｇ／ｍｌに希釈した。希釈した抗体（１００μｌ）でCOSTAR（登録商標）高結合ＥＬＩＳＡプレート（Corning Life Sciences, Lowell, MA）を４℃で一晩コートした。プレートをＰＢＳ／ツイーン２０で３回洗浄し、室温にて１時間、２００μｌのブロッキング緩衝液（０．１Ｍ　$NaPO_4$、０．１Ｍ　ＮａＣｌ、０．１％ゼラチン、０．０１％ツイーン）でブロックした。Ｃｌｑを含むと前もって決定されたヒト血清（Quidel, San Diego, CA）をＰＢＳで１：５０に希釈した。１時間のブロッキング後、プレートを洗浄し、１００μｌの希釈血清を各ウェルに加え、振盪機上、室温で２時間インキュベートした。３回の洗浄に続き、１００μｌの０．１μｇ／ｍｌニワトリポリクローナル抗ヒトＣｌｑ抗体（AbCam, Cambridge, MA）を、各ウェルに加え、室温で１時間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、１：４０００に希釈したニワトリＩｇ－Ｙ－ＨＲＰ（AbCam）に対する１００μｌのウサギポリクローナル抗体と、室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ＴＭＢで５分発色させ、続いて５０μｌの１Ｍ　H_2SO_4で反応を停止させ、４５０ｎｍで読み取った。野生型ヒトＩｇＧ１定常領域を有するただ一つの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体、ＡｂＺのみが、Ｃｌｑ結合を欠くことが以前に示されている三重変異体ヒトＩｇＧ１定常領域を有する対照抗体により示されたバックグラウンドレベルより上のＣｌｑ結合を示した。ヒトＩｇＧ４（ＡｂＹ）を有する形態及びヒトＩｇＧ１の二重変異体（ＡｂＸ）及び三重変異体（ＡｂＴ）を有する形態を含む、ＡｂＺと同一の可変ドメインを有するすべての抗体が、Ｃｌｑ結合のバックグラウンドレベルしか示さなかった（図１６）。試験された他の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のすべてがヒトＩｇＧ１の三重変異体形を含んでおり、バックグラウンドＣｌｑ結合を示した。

実施例９．１４：サイトカイン競合アッセイ

[0272]抗体ＡｂＴがマウスＩＬ－２１ＲにＩＬ－２１サイトカインと競合する様式で結合することを立証するため、サイトカイン競合アッセイを実施した。１μｇ／ｍｌの抗体ＡｂＴでＥＬＩＳＡプレートをコートし、次に１％ＢＳＡのＰＢＳ／．０５％ツイーン溶液でブロックした。単独であるいは濃度を増加させたマウスＩＬ－２１の存在下で、ウェルにビオチン化マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｈｉｓ／ＦＬＡＧ（１．５ｎｇ／ｍｌ）を加え、固定化された抗体へのレセプターの結合を、ＨＲＰ－コンジュゲートストレプトアビジンそしてその後のＴＭＢ検出試薬とのインキュベーションで検出した。マウスＩＬ－２１は４ｎｇ／ｍｌより上でほとんど完全にＡｂＴへのｍＩＬ－２１Ｒの結合をブロックすることができ、該抗体及び該サイトカインがマウスＩＬ－２１Ｒへの結合について競合することを示している（図２７ａ）。

【０２２１】

[0273]第二のアッセイは、抗体ＡｂＳがＩＬ－２１サイトカインと競合する様式でマウスＩＬ－２１Ｒに結合することを示すために実施した。マウスＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃを、抗マウスＩｇＧ２ａ抗体でコートしたＥＬＩＳＡプレート上に捕捉した。プレートを１％ＢＳＡを含むＰＢＳでブロックし、洗浄し、そして１０μｇ／ｍｌのｍＩＬ－２１存在下、変化させた濃度のＡｂＳをプレートに加えた。レセプターへのｍＩＬ－２１の結合は、ＨＲＰコンジュゲート抗His_6抗体によって検出し、そしてレセプターへのＡｂＳの結合は、抗ヒトＩｇ抗体によって検出した。およそ２μｇ／ｍｌより高いＡｂＳの濃度は、ｍＩＬ－２１のｍＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃへの結合を完全に妨げ、該抗体及び該サイトカインはマウスＩＬ－２１Ｒへの結合について競合することを示している（図２７ｂ）。

実施例９．１５：抗ＩＬ－２１Ｒ抗体によるラットＴ細胞増殖の阻害

[0274]ルイス（Lewis）メスラット脾臓Ｔ細胞は、製造元の使用説明書に従ってラット細胞濃縮カラム（RTCC-25;R&D Systems）を使用し、９５％$CD3^+$まで精製した。抗ヒトＩＬ－２１Ｒ抗体及びアイソタイプ対照タンパク質の連続希釈は、１μｇの抗ラットＣＤ３抗体（BD Pharmingen Cat# 554829）で前もってコートされた平底９６ウェル組織培養プレートにおいて、培地（１０％ＦＣＳ、Ｌ－グルタミン、ベーターメルカプトエタノール、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシン及びゲンタマイシンを含有するダルベッコ変法イーグル培地）にて行い、続いて、５ｎｇ／ｍｌ

ラットＩＬ－２１及びウェル当たり２０、０００のＣＤ３Ｔ細胞を加えた。細胞は、１０％CO_2、３７℃、加湿インキュベーター中で３日間増殖させた。培養の最後の５時間、細胞を０．５μＣｉの^{3}Ｈ－チミジン（GE Amersham Cat# TRA-120）で標識した。プレートは、Tomtec Mach IIIプレートハーベスターによりガラス繊維フィルターマット上に回収し、Perkin Elmer 1450 Microbeta Counterで計数した。

【０２２２】

[0275]５ｎｇ／ｍｌラットＩＬ－２１へのラットＴ細胞の応答は、１μｇの抗ＣＤ３単独へのバックグラウンド応答よりも６倍以上であった。抗体ＡｂＳ、ＡｂＵ、ＡｂＶ及びＡｂＷは、５ｎｇ／ｍｌラットＩＬ－２１により刺激される^{3}Ｈ－チミジン取り込みを阻害することができた（抗体処理なしでは５７、０００ｃｐｍ；図２８）。二つの独立した実験における中和のIC_{50}値は、表１１中に示されている。

【０２２３】

【表１１】

表１１：抗 IL-21R 抗体による IL-21 依存性ラット T 細胞増殖の妨害

抗体	IC50 (nM) 実験 1	IC50 (nM) 実験 2
AbS	35.98	27.07
AbU	172.79	105.46
AbV	70.55	59.23
AbW	159.06	94.74

【０２２４】

実施例９．１６：ウサギＩＬ－２１ＲへのＡｂＳの結合

[0276]抗体ＡｂＳがウサギＩＬ－２１Ｒに結合することを立証するため、ウサギＩＬ－２１Ｒの二つのアイソフォームの細胞外ドメインをＦｃ融合物としてサブクローン化し、ＨＥＫ２９３細胞において一過性に発現させた。ウサギＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ（アイソフォーム１又はアイソフォーム２のいずれか）を、抗マウスＩｇＧ２ａでコートしたＥＬＩＳＡプレート上に条件培地から捕捉した。変化させた濃度のＡｂＳを加え、プレートを洗浄し、抗体結合をＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧ抗体で検出した。ＡｂＳは、ウサギＩＬ－２１Ｒ　Ｆｃの両方のアイソフォームに明瞭な結合を示した（図２９ａ）。ウサギＩＬ－２１Ｒ－ＦｃへのＡｂＳの結合を、ウサギＩＬ－２１含有１０％条件培地の存在下で実施した場合、両方のレセプターアイソフォームへのＡｂＳの結合はおよそ１０分の１に減少し、ウサギＩＬ－２１Ｒへの結合について、ＡｂＳがウサギＩＬ－２１と競合することを示している（図２９ｂ）。

実施例１０：インビボでの改良ＩｇＧの特徴付け

実施例１０．１：インビボにおいて、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体、ＡｂＳ及びＡｂＴでのＩＬ－２１Ｒの中和は、Ｔ細胞依存性抗原へのＩｇＧ抗体応答の発生を阻害する

[0277]ＩＬ－２１は、Ｂ細胞アイソタイプのＩｇＧサブクラスへの転換そして形質細胞（plasma cell）への分化に重要である。それ故、インビボでの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体、ＡｂＳ及びＡｂＴの有効性を決定するため、Ｔ細胞依存性抗原、ＮＰ－ニワトリガンマグロブリン（ＮＰ－ＣＧＧ）に対するＩｇＭ及びＩｇＧ抗体応答を阻害するこれらの抗体の能力をＣ５７ＢＬ／６マウスにおいて試験した。マウスを、ＮＰ－ＣＧＧで免疫化する前日から、１０ｍｇ／ｋｇの抗ＩＬ－２１Ｒ抗体又はアイソタイプ対照で３Ｘ／週、処理した。ＮＰ特異的ＩｇＧ及びＩｇＭは、ＥＬＩＳＡにより検出した。ＮＰ特異的ＩｇＭ及びＩｇＧ抗体は、免疫化後７日以内にアイソタイプ処理対照動物の血清中に容易に検出され、これらの応答は１４日目まで強度が増加した（図３０ｂ）。ＡｂＳあるいはＡｂＴでの処理は、この研究においてＩｇＭ応答の強度には影響しなかった。７日目、アイソタイプ対

照と比較して減少した応答により示されるように、ＡｂＳ又はＡｂＴ処理細胞においてはＮＰ特異的ＩｇＧ抗体応答が遅延していた。１４日目では、ＮＰ特異的ＩｇＧ抗体応答は、アイソタイプ対照、ＡｂＳ及びＡｂＴ処理マウスにおいて類似していた（図３０ａ）。これらのデータは、ＡｂＳあるいはＡｂＴのいずれかを使用した、インビボでのＩＬ－２１Ｒの中和が、Ｔ細胞依存性抗原への早期ＩｇＧ抗体応答の誘導を一時的に阻害できることを示している。

【０２２５】

[0278]ＡｂＳ及びＡｂＴを試験する第二の研究でも同様の結果を得た（図３０ｃ－ｆ）。ＮＰ特異的ＩｇＧ応答は、ＡｂＳ又はＡｂＴのいずれかで処理したマウスの免疫化の７日目に一時的に減少したが、その後の時点ではアイソタイプ処理対照マウスと同様であった。アイソタイプ特異的ＥＬＩＳＡは、ＩｇＧ２ｂ及びＩｇＧ２ｃが７日目には対照と比較してＡｂＳ及びＡｂＴにより有意に減少減少していることを示した（図３０ｅ－ｆ）。これらのデータは、ＡｂＳ又はＡｂＴのいずれかを使用した、インビボでのＩＬ－２１Ｒの中和が、Ｔ細胞依存性抗原への早期ＩｇＧ抗体応答の誘導を一時的に阻害できることを示している。

【０２２６】

[0279]確立された長期体液性免疫の維持に対するＩＬ－２１Ｒ中和の影響を試験するため、Ｃ５７ＢＬ／６マウスをＮＰ－ＣＧＧで免疫し、そして少なくとも一ヶ月休止し、長期ＩｇＧ血清抗体価を生じるメモリーＢ細胞及び長寿命形質細胞を発生させた。免疫化およそ一ヶ月後、マウスを二ヶ月間、生理食塩水又は１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳ又はＡｂＴ、又はアイソタイプ対照抗体で３Ｘ／週、腹腔内注入処理した。ＮＰ特異的ＩｇＧ血清抗体価を、ＥＬＩＳＡで２週間ごとにモニターした。天然のＣ５７ＢＬ／６マウスと比較した場合、Ｃ５７ＢＬ／６マウスはＮＰ特異的ＩｇＧ血清抗体の高い力価を有しており、ＮＰに対する長期体液性免疫の形成と一致する。ＮＰ特異的ＩｇＧ血清抗体価は、アイソタイプ対照抗体で処理された両方のマウスにおいて研究期間を通して安定しており、ＡｂＳ又はＡｂＴいずれかによる処理は、これらの抗体価に影響しなかった（図３０ｇ）。免疫化後、Ｂ細胞は、長期血清抗体価を生じさせる形質細胞を発生する（骨髄において）。本研究の最後に、マウスの骨髄におけるＮＰ特異的ＩｇＧ形質細胞の数を測定したが、該細胞数は、ＡｂＳ又はＡｂＴによる処理に影響されなかった（図３０ｈ）。これらのデータは、この処理計画において、ＡｂＳ及びＡｂＴによるＩＬ－２１Ｒの中和が確立された長期血清抗体価の維持に影響しなかったことを示している。

実施例１０．２：ＳＬＥのモデルにおける抗ＩＬ－２１Ｒの抗体機能

[0280]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）のＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスモデルにおいて疾患を寛解させるそれらの能力について試験した。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスは、ヒトループスに観察される症状に似た症状を自然に発症し、循環系に高い力価の抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）自己抗体、糸球体に沈着した免疫グロブリン及び補体Ｃ３、腎臓及び肺におけるリンパ球性浸潤の存在、そして重症疾患においてはタンパク尿、リンパ節腫脹及び皮膚病変を含む。Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から入手し、１２週齢から開始したオスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスに、ＡｂＳ、ＡｂＴ、生理食塩水又は同一の三重変異体ヒトＩｇＧ１定常部を有する対照抗ヒトＩＬ－１３抗体を、４００μｇ／マウス（１０ｍｇ／ｋｇ）の用量で、１０週にわたり３Ｘ／週、腹腔内注入により与えた。血清試料を隔週採取し、ＥＬＩＳＡにより抗ｄｓＤＮＡ抗体について試験した。尿を隔週採取し、タンパク質（タンパク質試験紙を使用）を検査した；対照動物も処理動物も有意なタンパク尿を発生しなかった。動物は、リンパ節腫脹及び皮膚病変についてもモニターした；対照動物も処理動物も異常を示さなかった。処理１０週後、動物を屠殺し、免疫組織化学によりＩｇ及びＣ３沈着について腎臓及び脳切片を検査した。腎臓及び肺内への細胞浸潤は、Ｈ／Ｅ染色組織切片の検査により測定した。

【０２２７】

[0281]ＩＬ－２１Ｒブロッキング抗体ＡｂＳで処理したＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスは

、生理食塩水又は対照抗ヒトＩＬ－１３抗体で処理した動物と比較して、抗ｄｓＤＮＡＩｇＧ血清抗体レベルが有意に減少し、処理２週間後に始まり、処理１０週間後まで続いた（図３１）。抗ｄｓＤＮＡ抗体は、生理食塩水及びＩＬ－１３対照抗体処理動物と比較して（すべての対照マウスは検出可能な抗ｄｓＤＮＡ抗体価を有していた）、ＡｂＳ処理により４週で８／１０（図３１ｄ）、６週で５／１０（図３１ｅ）及び８週で７／１０マウス（図３１ｆ）において、検出不能なレベルまで減少していた。ＩＬ－２１Ｒブロッキング抗体ＡｂＴによる処理は、抗ｄｓＤＮＡ　ＩｇＧ血清抗体レベルに有意な影響を及ぼさなかった。

【０２２８】

[0282]図３１ａは、処理後の抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している（ＡｂＳ処理群は、生理食塩水及び抗ＩＬ－１３処理群両方と有意に異なっている（ｐ＜０．０１））。図３１ｂは、プレブリード（prebleed）抗ｄｓＤＮＡ抗体価を示している（生理食塩水処理群は、ＡｂＳ、ＡｂＴ及び抗ＩＬ－１３処理群と有意に異なっている（ｐ＜０．０１））。ＡｂＳ処理群は、投与２週（図３１ｃ）；４週（図３１ｄ）；６週（図３１ｅ）；８週（図３１ｆ）及び１０週（図３１ｇ）間後、生理食塩水及び抗ＩＬ－１３処理群の両方と有意に異なっている（ｐ＜０．０１）。

【０２２９】

[0283]ＡｂＳによる処理は、抗ＩＬ－１３抗体処理対照と比較して、Ｉｇ及びＣ３免疫複合体沈着及び腎臓病態も有意に減少させた（ｐ＜０．０１）（図３２、３３）。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを生理食塩水（対照）又は示された三重変異体抗体（マウスＩＬ－２１と反応性がない抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧ１　Ａ２３４　Ａ２３５　Ａ２３７変異体抗体をアイソタイプ対照として使用した）で処理した（１０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内、３Ｘ／週）。処理１０週後、マウスを屠殺し、腎臓内のＩｇ及びＣ３沈着を、免疫細胞化学により同定した。図３２は、示されたように処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるＩｇＧ沈着を示している（図３２ｂにおいて、糸球体は、破線の円により示され、ＩｇＧ沈着を示しているびまん性染色の例は、白抜き矢印で示されている）。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した（図３２ａ）。ＡｂＳで処理された動物における腎臓ＩｇＧ沈着は、ＩＬ－１３三重変異体処理対照におけるものよりも有意に低かった（ｐ＜０．０１）。図３３は、示されたように処理されたＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓におけるＩｇＭ（図３３ａ）及び補体Ｃ３（図３３ｂ）沈着を示している。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。腎臓におけるＩｇＭ及び補体Ｃ３沈着は、抗ＩＬ－１３対照抗体と比較して、ＡｂＳにより有意に減少した（ｐ＜０．０５）（図３３）。図３４は、処理マウスの脳におけるＩｇＧ（図３４ａ）、ＩｇＭ（図３４ｂ）及びＣ３（図３４ｃ）の沈着を示している。抗ＩＬ－１３抗体処理対照と比較して、ＡｂＳ処理マウスの脳においてＩｇＧ（ｐ＜０．０５；図３４ａ）沈着が減少していたが、ＩｇＭ（図３４ｂ）又はＣ３（図３４ｃ）沈着は減少していなかった。染色強度は、１－５のスケールでスコア化した。ＡｂＴによる処理は、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓又は脳における免疫複合体を減少させなかった（図３２－３４）。

【０２３０】

[0284]ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓及び肺内へのリンパ球浸潤も組織学的に試験した。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを生理食塩水（対照）又は示された三重変異体抗体のいずれかで処理した（１０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内、３Ｘ／週）。処理１０週後、マウスを屠殺し、Ｈ／Ｅ染色腎臓及び肺切片をリンパ球浸潤について検査した。リンパ球数は、１－５のスケールでスコア化した。腎臓において、ＡｂＳは３つの区域：皮質－間質（糸球体の支持構造）（図３５ａ）、皮質－血管周囲領域（図３５ｂ）及び骨盤周囲領域（尿管の起点付近）（図３５ｃ）におけるリンパ球浸潤を有意に減少させたが（ｐ＜０．０１）、ＡｂＴは減少させなかった。ＡｂＳ及びＡｂＴ処理の両方が、生理食塩水処理及び抗ＩＬ－１３抗体処理の対照と比較して、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの肺で測定されたリンパ球の数を有意に減少させた（それぞれｐ＜０．０１及びｐ＜０．０５；図３６）。

【０２３１】

[0285]まとめると、これらのデータは、ＡｂＳによる処理はＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおけるループス様疾患を寛解させるが、一方、ＡｂＴによる処理は、このＳＬＥのモデルにおいてはほとんど効果がないようである。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスのＡｂＳ及びＡｂＴ処理の有効性の相違を検討するため、これらのマウスからの血清を、抗生成物（anti-product）抗体応答についてＥＬＩＳＡにより検討した。１２週齢オスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスを示された三重変異体抗体処理した（１０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内、３Ｘ／週）。隔週で採取した血清を、同一のヒト抗体へ結合できるマウス抗体の存在についてＥＬＩＳＡで試験し、それでマウスを処理した。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスは、早ければ処理後２週間で三つの試験された抗体に対する抗ヒト抗体（ＭＡＨＡ）応答を発生した（図３７ａ）。しかしながら、抗生成物ＩｇＧ抗体応答は、ＡｂＳに対するよりもＡｂＴ又は対照抗体に対しては１０以上であった（ＡｂＳについてｐ＜０．０５、ＩＬ－１３対照に対して）。ＡｂＳ及びＡｂＴの両方について、抗生成物抗体の大多数は両方の分子に共通のエピトープを認識するので、ＡｂＳ　ＣＤＲ配列がＡｂＴのそれより免疫原性であることはありそうもない（図３７ｂ）。

【０２３２】

[0286]ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}モデルにおける疾患発症に対するＩＬ－２１Ｒ中和の用量依存性を評価するため、８週齢メスマウスに、ＡｂＳ（１０、５又は２．５ｍｇ／ｋｇ用量）、ＡｂＴ（２０ｍｇ／ｋｇ用量）又はアイソタイプ対照抗体（２０、１０、５、又は２．５ｍｇ／ｋｇ用量）のいずれかを１０週間、３Ｘ／週で腹腔内投与した。マウスは、抗ｄｓＤＮＡ血清抗体について試験し、２週間ごとにタンパク尿、リンパ節腫脹、及び皮膚病変について検査した。投与１０週間後、動物を屠殺し、腎臓切片を免疫組織化学により免疫グロブリン沈着を検査し、そして免疫細胞浸潤は、Ｈ＆Ｅ染色腎臓切片の検査により測定した。

【０２３３】

[0287]ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスは、研究の開始時に抗ｄｓＤＮＡ　ＩｇＧ抗体の検出可能なレベルを有しており、これらの抗体の力価は、全処理群において研究を通して増加した。しかしながら、試験されたすべての用量（１０、５及び２．５ｍｇ／ｋｇ）でのＡｂＳによる処理は、アイソタイプ処理対照マウス血清と比較した場合、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける抗体価を用量依存的様式で有意に減少させた（図３８ａ）。ＡｂＴ（２０ｍｇ／ｋｇ）はまた、１つの時点（投与２週間目）でのみ、これらのマウスにおいて抗ｄｓＤＮＡ抗体価を減少させた（図３８ｂ）。

【０２３４】

[0288]ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける疾患進行に対するＩＬ－２１Ｒ中和の影響をさらに評価するため、該マウスは疾患の臨床徴候について検査した。この研究に使用した非常に少数のＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスしか皮膚病変又は臨床的に有意なタンパク尿を発生せず、疾患のこれらの側面に対するＡｂＳ及びＡｂＴ処理の効果を評価することができなかった。試験されたすべての用量でのＳ及びＡｂＴによる処理は、本研究においてリンパ節腫脹の発生には影響しなかった。しかしながら、ＩｇＧ沈着及び免疫細胞浸潤が、アイソタイプ処理対照マウスからの腎臓において容易に観察され、これらのマウスにおけるループス腎炎の発生と一致した。１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳによる処理は、腎臓における平均浸潤細胞数及びＩｇＧ沈着を有意に減少させ、一方、５及び２．５ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳによる処理は、本研究においてこれらのパラメータには効果がなかった（図３８ｃ－ｄ）。２０ｍｇ／ｋｇ用量でのＡｂＴによる処理は、平均浸潤細胞数を増加させ、この研究においてはＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスの腎臓のＩｇＧ沈着には影響しなかった（図３８ｃ－ｄ）。

実施例１０．３：ＩＬ－２１Ｒ抗体はマウス空気嚢アッセイにおいて細胞浸潤を阻止する

[0289]インビボでＩＬ－２１Ｒ機能を中和するＡｂＳ及びＡｂＴの能力を、短期マウス空気嚢アッセイで試験した。空気嚢は、８－１０週齢ＢＡＬＢ／Ｃマウスの背面皮膚下に３ｍｌの空気を注入することにより作った。３日後、嚢を再膨張させた。再膨張２日後、

生理食塩水（対照）あるいは示された抗体を、示された投与量で、腹腔内に注入した。抗体注入２４時間後、空気嚢内にマウスＩＬ－２１（１００ｎｇ）を注入した。６時間後、嚢を３ｍｌ　ＰＢＳで流し出し、総細胞（図３９ａ）、単球（図３９ｂ）、リンパ球（図３９ｃ）及び好中球（図３９ｄ）数を、CELL-D YN（登録商標）（Abbott, Abbott Park,IL）で決定した。

【０２３５】

[0290]空気嚢内へのマウスＩＬ－２１の注入は、生理食塩水と比較して６時間後の空気嚢中の全細胞（Ｐ＝０．０００２）、単球（Ｐ＝０．０１３７）、リンパ球（Ｐ＝０．００３５）及び好中球（Ｐ＝０．０００４）の有意な増加を導いた（図３９ａ）。ＡｂＳ又はＡｂＴのいずれかによる処理は、対照ＩｇＧ１（抗ＩＬ－１３）による処理と比較して、空気嚢内への細胞浸潤の有意な減少を導いた。総細胞浸潤は、対照ＩｇＧと比較して、ＡｂＳ（１０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００３１；１ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００４２６）及びＡｂＴ（１０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．０１９８）の両方で有意に減少した（図３９ａ）。単核球浸潤は有意に減少した：ＡｂＳ（５ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００３１；２ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．０２３９；１ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．０００８）及びＡｂＴ（１０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．０００２；５ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００６６；１ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．０００９）（図３９ｂ）。リンパ球浸潤も有意に減少した：ＡｂＳ（１ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００４９）及びＡｂＴ（１０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．０２２２）（図３９ｃ）。好中球浸潤はＡｂＳ（１０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００３２）により有意に減少したが、ＡｂＴでは減少しなかった。

【０２３６】

[0291]同様の結果が、マウス空気嚢モデルにおけるＡｂＳ及びＡｂＴの能力を試験するための二次の研究においても得られた。空気嚢内への全細胞浸潤は、１０（Ｐ＝０．０１１３）、５（Ｐ＝０．００２７）及び２ｍｇ／ｋｇ（Ｐ＝０．０２９）で投与した場合のＡｂＳにより及び１０ｍｇ／ｋｇ（Ｐ＝０．０００７）でのＡｂＴにより有意に減少した（図３９ｅ）。

【０２３７】

[0292]ラット空気嚢モデルにおいて、ＩＬ－２１に応答する細胞浸潤に対するＡｂＳの効果は、これらの抗体がラットにおいてＩＬ－２１Ｒを中和することができるかどうかを決定するためにも試験した。８週齢メスＳ－Ｄラットに２０ｍｌの空気を背中の皮下組織内へ注入することにより、嚢を作製した。３日後、追加の１０ｍＬの空気を嚢内に注入することにより嚢を再膨張させた。２日後、ラットに指定された量のアイソタイプ対照又はＡｂＳ抗体を注入した。翌日、生理食塩水又は１－２０μｇのマウスＩＬ－２１のいずれかを嚢内に注入し、６時間後、嚢内容物を洗い出し、Cell Dyne装置を使用して総細胞を計数した。

【０２３８】

[0293]空気嚢内への１μｇのマウスＩＬ－２１の注入は、嚢内への有意な細胞浸潤をもたらさなかった。しかしながら、２０μｇのマウスＩＬ－２１の投与は、生理食塩水と比較して、６時間後、空気嚢中の総細胞の増加を導き、１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳによる処理は、これらの条件下、嚢内へのＩＬ－２１仲介細胞浸潤を有意に減少させた（ｐ＜０．０５）（図３９ｆ）。このラットモデルにおいて、空気嚢内への細胞浸潤を阻害できるＡｂＳの最少投与量を決定するため追加の研究を実施し、そこでは、２０μｇのマウスＩＬ－２１及び１０ｍｇ／ｋｇのアイソタイプ対照又は１０、３又は１ｍｇ／ｋｇのＡｂＳのいずれかをラットに投与した。１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳの投与は、ラット空気嚢内への細胞浸潤を有意に減少させた（ｐ＜０．０５）。３ｍｇ／ｋｇのＡｂＳで処理したラットにおいては、空気嚢内への細胞浸潤の有意ではない増加が認められた。１ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳによる処理は、アイソタイプ処理対照ラットと比較して嚢内への細胞浸潤は有意に増加した（ｐ＜０．０５）（図３９ｇ）。これらの観察は二回目の研究において繰り返され、１０ｍｇ／ｋｇによる処理は、２０μｇのマウスＩＬ－２１により誘発されるラット空気嚢内への細胞浸潤を有意に減少させた（ｐ＜０．０５）；この研究において、３及び１ｍｇ

／ｋｇ　ＡｂＳ両方での処理が、嚢内への細胞浸潤を有意に増加させた（ｐ＜０．０５）（図３９ｈ）。

【０２３９】

[0294]ＡｂＳによる処理は、ＡｂＳを低用量（例えば、１ｍｇ／ｋｇ）で投与した場合、ＩＬ－２１に応答した嚢内への細胞浸潤を著しく増加させた。低濃度（１ｍｇ／ｋｇ）での嚢内への抗体単独の投与が嚢内への細胞移動を惹起するかどうかを決定するため追加の研究を実施し、そこでは、ＩＬ－２１処理なしに、ラットを１ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳ又はアイソタイプ対照抗体で処理した。従来の研究で観察されているように、１０ｍｇ／ｋｇでのＡｂＳの投与は、嚢内へのＩＬ－２１駆動細胞浸潤を有意に減少させるが（Ｐ＝０．００７５）、一方、１ｍｇ／ｋｇでのＡｂＳの投与は嚢内へのＩＬ－２１誘発細胞浸潤を著しく増加させた（Ｐ＝０．０２５７）。ＩＬ－２１処理なしでは、１ｍｇ／ｋｇでのＡｂＳ又はアイソタイプ対照抗体による処理は嚢内への細胞浸潤を増加させず、１ｍｇ／ｋｇでのＡｂＳによる処理により惹起される増加した嚢内への細胞浸潤が、このモデルにおいてはマウスＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体両方の投与に依存していることを示している（図３９ｉ）。

【０２４０】

[0295]ラット空気嚢モデルにおいて細胞の増加がマウスＩＬ－２１（２０μｇ）の投与量に依存しているかどうかを決定するため実験を行い、そこでは、ラットは１０、２０又は４０μｇのマウスＩＬ－２１及び１又は１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳで処理した。１０（Ｐ＝０．００３）及び２０μｇ（Ｐ＝０．００３）マウスＩＬ－２１両方に応答した嚢内への細胞浸潤の有意な阻害が、１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳで観察された。１０ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳによる処理は、この研究においては４０μｇマウスＩＬ－２１に応答した細胞浸潤に影響しなかった。以前に観察されているように、１ｍｇ／ｋｇのＡｂＳによる処理は、２０μｇマウスＩＬ－２１に応答した嚢内への細胞浸潤を有意に増加させた（Ｐ＝０．０４５４）。しかしながら、１ｍｇ／ｋｇ　ＡｂＳによる処理は、１０又は４０μｇマウスＩＬ－２１のいずれかに応答したラット空気嚢内への細胞浸潤に影響せず、増加したラット空気嚢内への細胞浸潤は、このモデルにおいては、１ｍｇ／ｋｇのＡｂｓ及び２０μｇのマウスＩＬ－２１用量に非常に特異的であることを示している（図３９ｊ）。これらのデータは、ＡｂＳが、マウスＩＬ－２１に応答したラット空気嚢内への細胞浸潤に影響することができ、この応答の阻害はｌ０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳの投与で達成されることを示している。

実施例１０．４：ＡｂＳの静脈内又は皮下投与後のＣＤ－１マウスにおける薬物動態

[0296]ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の血清濃度は、表１３に記載されているように、適格なＥＬＩＳＡにより決定した。抗ＩＬ－２１Ｒ　ＥＬＩＳＡは、捕捉試薬として単量体Ｈｉｓタグ付ＩＬ－２１Ｒ及び検出試薬として抗ヒトＦｃ（西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）とコンジュゲートされた）を使用した。酵素基質、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を使用して有色最終生成物を産生し、結合された被験物質を可視化した。光学濃度（ＯＤ）は、比色分析により４０５又は４５０ｎｍの波長で測定した。試料濃度は、４－パラメータ式を使用して適合させた検量線からの内挿により決定した。

【０２４１】

[0297]薬物動態パラメータは、平均濃度に基づいて計算した。ＬＯＱより低い個々の濃度値は、平均及びＳＤの計算にはゼロとして処理した。ＰＫパラメータは、ＰＫソフトウェアパッケージWinNonlin（バージョン 4.1; Pharsight, Mountain View, CA）の非コンパートメント解析モジュール（腹腔内及び皮下投与にはモデル２００及び静脈内投与にはモジュール２０１）を使用して決定した。本プログラムはモデル独立アプローチ及びGibaldi 及びPerrierにより記述されている標準法（Pharmacokinetics（2nd ed. 1982）Marcel-Dekker, Inc., New York）を適用する。血清濃度対時間曲線下の面積（ＡＵＣ）を、線形台形法を使用して計算した。みかけの終末期の勾配は、少なくとも３つのデータポイントを使用する対数線形回帰により見積り、終末速度定数（λ）は勾配から誘導した。ＡＵ

$C_{0-\infty}$は、AUC_{0-t}（式中、ｔは最終測定可能濃度の時間である）及びC_t/λの合計として見積った。みかけの排出半減期（$t_{1/2}$）は、０．６９３／λとして計算した。複数回投与計画後の濃度の予測は、WinNonlinソフトウェア使用するノンパラメトリック重層法により行った。

【０２４２】

[0298]オスＣＤ－１マウスに１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳの静脈内投与後、ＡｂＳの曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、７２７２μｇ＊時間／ｍｌであった。静脈内投与後、最初のサンプリング時点での平均濃度（C_{5min}）は１１３μｇ／ｍｌであった。ＣＤ－１マウスにおけるＡｂＳの排出は～１．４ｍｌ／時間／ｋｇの低い全身クリアランス（ＣＬ）及び１６２時間（～６．８日間）の長い排出半減期（$t_{1/2}$）からも明らかなように比較的遅かった。定常状態分布容積（Ｖｄｓｓ）は３０６ｍｌ／ｋｇであり、ＡｂＳは、血管系に主に限定されていた（図４０；表１４）。

【０２４３】

[0299]ＣＤ－１マウスにおけるＡｂＳの薬物動態は、１０～１００ｍｇ／ｋｇ用量範囲において直線的であるようである。オスＣＤ－１マウスへの１００ｍｇ／ｋｇのＡｂＳ静脈内投与後、$AUC_{0-\infty}$は、７５７９２μｇ＊ｈｒ／ｍｌであり、C_{5min}は、１１６０μｇ／ｍｌであり、ＣＬは、～１．３ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、Ｖｄｓｓは、４７３ｍｌ／ｋｇであり、排出半減期は、～３９１時間（～１６．２日）であった（図４０；表１４）。

【０２４４】

[0300]ＣＤ－１マウスへの１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳの皮下投与後、ＡｂＳの吸収は遅く（４８時間のT_{max}）、そして皮下生物学的利用率は、８１％であった。皮下投与後の平均$t_{1/2}$値は～１９５時間（～８．１日）であり、１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後に観察された値と同様であった。

【０２４５】

[0301]抗ＡｂＳ抗体の存在は、ＣＤ－１マウスへＡｂＳの１０ｍｇ／ｋｇ静脈内又は皮下投与後５７６時間（２４日）及び　６７２時間（２８日）に適格なイムノアッセイを使用して評価した（ｎ＝８／時点／群）。電気化学発光、常磁性ビーズアッセイを使用して抗ＡｂＳ抗体を検出した。このアッセイにおいては、試料をビオチン化ＡｂＳと一晩、共インキュベートした。ストレプトアビジンコート常磁性ビーズを混合物とインキュベートした。ビーズとのインキュベーション後、プレートをBioVeris M-Series 384 Analyzerに置いた。磁力をかけて常磁性ビーズを表面電極上に捕捉し、非結合反応体を洗い流した。ビーズ上に捕捉されたルテニル化ＡｂＳは、電圧をかけることにより電気的に励起し、光の生成を生じさせた。光は応答単位（ＲＵ）で読み出す光検出器によって測定した。

【０２４６】

[0302]陽性及び陰性対照も、陰性対照の平均ＲＵの２倍として定義されるカットポイントＲＵを決定するために使用した。試料は、１：２５及び１：７５の希釈でのスクリーニングフォーマットで最初に試験した。カットポイントＲＵより大きい又は等しいＲＵを発生している試料を陽性と考え、全希釈系列で再分析して陽性結果を確認し、そして力価を決定した（カットポイントＲＵに等しいＲＵを発生するであろう相互希釈）。陽性試料については、力価の対数が報告されている。最小限必要とされる希釈は１：２５であり、検出限界は、１．４０（２５の対数）であった。それ故陰性試料は＜１．４０と表されている。

【０２４７】

[0303]静脈内及び皮下処理群の両方において、時点当たり、群当たり（８の内）５又は６匹のマウスが抗ＡｂＳ抗体について陽性と試験された（表１５）。検出可能な抗ＡｂＳ抗体を有するマウスの大多数は、抗ＡｂＳ抗体を有していない動物で観察されるＡｂＳ濃度より低いＡｂＳ濃度を有していた；大事なことは、いくつかの試料における高いレベルが、抗ＡｂＳ抗体の検出を妨害しているようである。多様な時点にわたる、及び動物種及び系統／モデルにわたる抗ＡｂＳ抗体応答の発現の要約が表２３に示されている。

【０２４８】

[0304]抗ＡｂＳ抗体の存在も、ＣＤ－１マウスへのＡｂＳの１００ｍｇ／ｋｇ、静脈内投与後、６４８時間（２７日）、９８４時間（４１日）及び１３２０時間（５５日）で試験した（ｎ＝３、時点当たり）。試験された動物のいずれも、これらの時点では抗ＡｂＳ抗体について陽性ではなかった。

実施例１０．５：ＡｂＳの腹腔内投与後のＤＢＡ及びＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける薬物動態

[0305]ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の血清濃度は、表１３に記載されているように、適格なＥＬＩＳＡにより決定した。抗ＩＬ－２１Ｒ　ＥＬＩＳＡは、捕捉試薬として抗ヒトＦｃ及び検出試薬としてビオチン化抗ヒトＦｃを使用したアビジン－ＨＲＰ及び酵素基質ＴＭＢ又は２，２’－アジノ－ジ（３－エチル－ベンズチアゾリン－６－スルホナート）（ＡＢＴＳ）を使用して、有色最終生成物を産生した。ＯＤは４０５又は４５０ｎｍの波長での比色分析により測定した。試料濃度は、４－パラメータ式を使用して適合させた検量線からの内挿により決定した。ＰＫパラメータは実施例１０．４で述べたように計算した。複数回投与計画後の濃度予測は、WinNonlinソフトウェア使用してノンパラメトリック重層法により行い、２．５－１０ｍｇ／ｋｇ用量範囲（単回投与）におけるＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}及びＤＢＡマウスでの線形動力学を仮定した。

【０２４９】

[0306]オスＤＢＡマウスに、８ｍｇ／ｋｇのＡｂＳを単回腹腔内投与後、ＡｂＳの最大血清濃度（C_{max}）及び曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、それぞれ６２μｇ／ｍｌ及び７２２９μｇ＊ｈｒ／ｍｌであった。ＡｂＳのT_{max}及び排出半減期（$t_{1/2}$）は、それぞれ６時間及び１４０時間（～５．８日）であった（図４１）。試験された８匹の動物の内、３匹が６７２時間で抗ＡｂＳ抗体応答を発生させ、実施例１０．４に記載されている常磁性ビーズアッセイを使用して決定した（表１２）。多様な時点にわたる、及び種／系統にわたる抗ＡｂＳ抗体の発現の要約が表２３に示されている。

【０２５０】

【表１２】

表１２：DBAマウスへ単回8 mg/kg i.p.投与後の抗AbS 抗体の形成

発生 (hr)	408 hr	504 hr	576 hr	672 hr
陽性	８の内０	８の内０	８の内０	８の内３

【０２５１】

[0307]メス１２週齢ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスに、１０ｍｇ／ｋｇの単回腹腔内投与後、ＡｂＳの最大血清濃度（C_{max}）及び曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、それぞれ５１μｇ／ｍｌ及び２７９８μｇ＊ｈｒ／ｍｌであった。T_{max}及びＡｂＳの排出半減期（$t_{1/2}$）は、それぞれ３時間及び４６時間（～１．９日）であった（図４１）。

【０２５２】

[0308]ＤＢＡ及びＣＤ－１マウスと比較して、ＡｂＳの用量規格化曝露はＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおけるよりも低いようである（表１４）。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウス（特に疾患症状を有する）及びＳＬＥ患者における正常ＩｇＧの迅速な排出が報告されているので（Zhou et al. (2005) Lupus 4(6):458-66; Newkirk et al. (1996) Clin. Exp. Immunol. 106(2) ／259-64; Wochner (1970) /. Clin. Invest. 49(3):454-64を参照されたい）、このことは全く予期されていなかった。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおけるマウスＩｇＧの異化亢進は、ＩｇＧの恒常性を調節するレセプターＦｃＲｎの疾患誘発損傷によると提案されている(Zhou et al. (2005) 上記文献）。ＡｂＳはヒトＩｇＧであるので、マウスの異なる系統間の終末過程でのＡｂＳの排出の差異は、少なくとも一部は異なったＭＡＨＡ応答により説明することができる。

【０２５３】

[0309]ＡｂＳを、２．５、５又は１０ｍｇ／ｋｇ用量で３Ｘ／週、１０週間、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウス腹腔内に投与した場合（実施例１０．２）、すべての用量群がアイソタイプ対照（抗ヒトＩＬ－１３ヒトＩｇＧｌ三重変異体）と比較して抗ｄｓＤＮＡ抗体の力価の有意な減少を有した。２．５及び１０ｍｇ／ｋｇ用量群について、ＡｂＳの定常状態トラフ値をＥＬＩＳＡによりアッセイした。２及び４週時点で、２．５ｍｇ／ｋｇ群から試験されたほとんどすべての試料が、血清中のＡｂＳは検出不能なレベル（＜３４ｎｇ／ｍｌ）であり；一つの試料は、非常に低いレベルを有していた（５７ｎｇ／ｍｌ）。１０ｍｇ／ｋｇ群については、ＡｂＳ血清濃度の高い動物間差異があった；しかしながら、中央値定常状態トラフ値は、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける単回投与研究からのＰＫデータを使用するシミュレーションにより予測される値と比較して～３－１０倍高かった（図４２）。ＤＢＡマウス系統で得られた単回腹腔内投与データを予測に使用した場合、１０ｍｇ／ｋｇ／用量群における観察された及び予測されたＡｂＳ濃度間の相関が改善されたようである（図４２）。理論に束縛されるものではないが、低用量群におけるＡｂＳの検出不能なレベルについての可能な説明は、比較的低用量でのＡｂＳの複数回投与により引き金が引かれた著しいＭＡＨＡ産生である、なぜなら、２．５ｍｇ／ｋｇ／用量群からの２週目の血清試料を抗ＡｂＳ抗体についてアッセイすると、すべての試料が４．７４対数力価単位の定量上限以上の非常に高い力価を有していたからである。しかしながら、ＩｇＧ応答を遅延させる及び／又は減少させるための予期されるＡｂＳの薬理作用の代わりに、複数回投与計画でのＡｂＳのより高い用量は、それ自身に対するＭＡＨＡ応答を減少させるであろうことが可能であり、単回投与ＰＫデータのみに基づいて予測された濃度と比較してより高い実測血清ＡｂＳ濃度を生じる。実際、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおいて、ＡｂＳに対するＭＡＨＡ応答は、１０ｍｇ／ｋｇ　３Ｘ／週、で１０週間の同一の複数回投与計画により投与されたアイソタイプ対照ヒトＩｇＧと比較しておよそ１０分の１であった。

実施例１０．６：メスカニクイザルにおけるＡｂＳのＰＫ

[0310]メスザルにおけるＡｂＳのＰＫは、単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内又は皮下投与後に決定した。この研究からの個々の動物及び平均濃度時間プロファイルは、それぞれ図４３ａ及び４３ｂに示されており、平均ＰＫパラメータは、表１４に要約されている。

【０２５４】

[0311]ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の血清濃度は、表１２に記載されているように、適格なＥＬＩＳＡにより決定した。抗ＩＬ－２１Ｒ　ＥＬＩＳＡは、実施例１０．４でＣＤ－１マウスについて記載したように、捕捉試薬として単量体Ｈｉｓタグ付ＩＬ－２１Ｒ及び検出試薬としてＨＲＰにコンジュゲートされた抗ヒトＦｃを使用した。サルにおけるアイソタイプ対照抗体（抗ＩＬ－１３抗体）の血清濃度もＥＬＩＳＡにより測定した。このアッセイにおいて、ＦＬＡＧオクタペプチド融合タグを含む組み換えヒトＩＬ－１３リガンドは、抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体により捕捉した。抗ＩＬ－１３抗体含有血清試料は、抗ヒトＦｃ－ＨＲＰで検出した。酵素基質ＡＢＴＳを使用して有色最終生成物を生成させ、結合された被験物質を可視化した。ＰＫパラメータは、ノンコンパートメント法を使用し、各個の動物について計算した。

【０２５５】

[0312]１０ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝３、静脈内及び皮下両方の投与経路について）でＡｂＳを投与された６匹すべてのメスザルは終末期（投与後～４０８時間）にＡｂＳレベルの急激な低下を有しており、抗生成物抗体の潜在的形成を示している。１０ｍｇ／ｋｇ群の排出半減期値は、急激な濃度低下が観察された時点を含めてあるいは含めないで計算した。

【０２５６】

[0313]メスカニクイザルにＡｂＳの単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、平均血清クリアランス（ＣＬ）は、１．０３ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、平均排出半減期（$t_{1/2}$）は、７４時間（～３日）であった。急激な濃度低下が観察された時点が計算から除外された場合、推定平均$t_{1/2}$は、～７．９日であった。平均定常状態分布容積（Ｖｄｓｓ）は低く（～１２５ｍｌ／ｋｇ）、ＡｂＳは主として血管系に限定されていることを示している

。ＡｂＳの平均曝露（ＡＵＣ$_{0-\infty}$）は、９７２８μｇ＊ｈｒ／ｍｌであった。

【０２５７】

[0314]カニクイザルにＡｂＳの単回１００ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＣＬは～１．０８ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、$t_{1/2}$は２７９時間（～１１．６日）であり、ＡＵＣ$_{0-\infty}$は９２８６７μｇ＊ｈｒ／ｍｌであり、そしてＶｄｓｓは～２１１ｍｌ／ｋｇであった。従って、一般に、ＡｂＳのＰＫは１０－１００ｍｇ／ｋｇの用量範囲でほとんど直線的であった。

【０２５８】

[0315]メスザルにＡｂＳの１０ｍｇ／ｋｇ皮下投与後、ＡｂＳの吸収は遅く（～３４時間の平均T_{max}）、平均皮下生物学的利用率は～４３％であった。サルに１０ｍｇ／ｋｇ皮下投与後の平均$t_{1/2}$値は５２時間（～２．２日）であり、１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後に観察された値に類似していた。急激な濃度低下が観察された時点が計算から除外された場合、平均$t_{1/2}$は、２５８時間（～１０．８日）であった。

【０２５９】

[0316]１０ｍｇ／ｋｇでＡｂＳが投与された６匹すべてのメスザルは、投与後５０４時間（３週）から検出可能な抗ＡｂＳ抗体を有しており（表１６）、実施例１０．４に記載されている常磁性ビーズアッセイを使用して決定した。これらのデータは、観察されたＡｂＳ血清レベルの急激な低下と一致している。抗ＡｂＳ応答は、すべての引き続いての時点で持続されていた（２７週まで）。従って、抗ＡｂＳ抗体応答は、単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内又は皮下投与後、サルにおけるＡｂＳのＰＫに影響しているようである。１００ｍｇ／ｋｇ静脈内投与群については、３匹のサルの内１匹が６週目及び８週目に抗ＡｂＳ抗体陽性であり、それぞれ１．８及び４．６の対数力価を有していた。

【０２６０】

【表１３】

【表１３】

表１３：マウス及びメスザル血清におけるＡｂＳについてのＥＬＩＳＡ概要

種 系統	アッセイ 捕捉	アッセイ 検出	定量の範囲 (100% 血清中 ng/mL)	培地 必要とされた希釈	検量線 (5% 血清中 ng/ml)	アッセイ希釈剤に使用した血清
マウス DBA	抗ヒト IgG	抗ヒト IgG-ビオチン	32-500	20	0.78-100	Sprague-Dawley ラット
マウス MRL^{lpr}	抗ヒト IgG	抗ヒト IgG-ビオチン	33.4-630	20	0.514-102	C57BL/6 マウス
マウス CD-1	単量体 His-タグ付 Il-21R	抗ヒト IgG-HRP	45-768	20	1-38.4	CD-1 マウス
サル (cyno)	単量体 His-タグ付 Il-21R	抗ヒト IgG-HRP	30-512	20	0.44-38.4	プールしたサル

【０２６１】

【表１４】

【表１４】

表１４：マウス及びメスザルにおけるAbSの平均PKパラメータ

種 系統	用量 (mg/kg)， 経路、 ﾌﾟﾛﾄｺﾙ	C_{5min} 又は C_{max}[a] (μg/ml)	T_{max} (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (μg*hr/ml)	CL (ml/hr/kg)	Vd_{ss} (ml/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	F (%)
マウス DBA	8, ip	62	6	7229	NA	NA	140	ND
マウス MRL/lpr	10, ip	51	3	2798	NA	NA	46	ND
	2.5, ip	12	3	823	NA	NA	12 (54)[b]	ND
マウス CD-1	10, iv	113	NA	7272	1.38	306	162	NA
	10, sc	17	48	5913	NA	NA	195	81
	100, iv	1160	NA	75792	1.32	473	391	NA
マウス C57BL/6	2.5, iv	29	NA	1927	1.30	208	120	NA
マウス IL-21R ﾉｯｸｱｳﾄ	2.5, iv	32	NA	3415	0.73	273	256	NA
サル (cyno)	10, iv	177±10	NA	9728±621	1.03±0.07	125±16	74±46 (190±38)[b]	NA
	10, sc	15±3	34±34	4188±542	NA	NA	52±20 (258±35)[b]	43±6
	100, iv	2030±95	NA	92867±9768	1.08±0.11	211±11	279±28	NA

[a]C_{5min} はi.v.経路について決定され、又は C_{max} はi.p.及びs.c経路について決定された。
[b]半減期は、急な濃度低下のデータポイントを除外して計算した。
NA = 該当なし
ND = 検出せず

【０２６２】

【表１５】

表１５：10 mg/kg の単回 IV 又は SC 投与後の、オス CD-1 マウスにおける抗 AbS 抗体の形成(Log 力価)

静脈内群

	時間 (hr)	
SAN	576	672
26	2.65	
27	2.54	
28	<1.40[a]	
29	2.16	
30	<1.40 [a]	
40	2.81	
41	2.34	
42	2.32	
43		2.79
44		<1.40 [a]
45		3.25
46		1.79
47		3.28
48		<1.40 [a]
49		3.21
50		3.18

皮下群

	時間 (hr)	
SAN	576	672
76	2.30	
77	2.55	
78	<1.40[a]	
79	2.71	
80	1.87	
90	<1.40 [a]	
91	3.75	
92	2.35	
93		<1.40 [a]
94		2.75
95		<1.40 [a]
96		3.27
97		3.53
98		3.73
99		<1.40 [a]
100		3.65

[a] <1.40 陰性結果を示す。

SAN = 研究動物番号

【０２６３】

【表１６】

表１６：10 mg/kgの単回IV又はSC投与後の、メスカニクイザルにおける抗AbS 抗体の形成(Log力価)

静脈内群

時間 (hr)	SAN 1	SAN 2	SAN 3
336	<1.40[a]	<1.40	<1.40
504	2.35	2.33	2.26
672	3.61	3.22	2.47
804	3.78	3.61	3.31
1008	3.80	3.72	4.18
1176	3.72	3.76	4.09
2016	3.70	4.44	4.14
2856	3.60	4.67	4.44
3696	3.60	4.71	4.24
4536	3.53	4.64	4.31

皮下群

時間 (hr)	SAN 4	SAN 5	SAN 6
336	<1.40[a]	<1.40	<1.40
504	3.00	2.68	2.39
672	3.52	3.64	2.59
804	4.10	3.71	2.47
1008	3.91	3.73	2.89
1176	4.11	3.59	3.27
2016	4.29	3.77	3.65
2856	4.25	3.61	3.50
3696	4.26	3.49	3.45
4536	4.39	3.56	3.58

[a] <1.40 陰性結果を示す。
SAN = 研究動物番号

【０２６４】

実施例１０．７：マウスにおけるＡｂＴのＰＫ

[0317]ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の血清濃度は、表１７に記載されているように、適格なＥＬＩＳＡにより決定した。抗ＩＬ－２１Ｒ ＥＬＩＳＡは、ＣＤ－１マウスのためには捕捉試薬として単量体Ｈｉｓタグ付ＩＬ－２１Ｒ及び検出試薬として抗ヒトＦｃ（西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）とコンジュゲートされた）を、そしてＤＢＡ及びＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスのためには捕捉試薬として抗ヒトＦｃ及び検出試薬としてビオチン化抗ヒトＦｃを使用した。ＰＫパラメータは実施例１０．４で述べたように計算した。複数回投与計画後の濃度予測は、WinNonlinソフトウェア使用してノンパラメトリック重層法により行い、ＡｂＳについては２．５－１０ｍｇ／ｋｇ用量範囲（単回投与）において、そしてＡｂＴについては８－２０ｍｇ／ｋｇ用量範囲（単回投与）においてＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}及びＤＢＡマウスでの線形動力学を仮定した。

【０２６５】
[0318]オスＣＤ－１マウスに１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＴの静脈内投与後、ＡｂＴの曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、４５５１μｇ＊ｈｒ／ｍｌであった（図４４ａ；表１８）。静脈内投与後、最初のサンプリング時点（C_{5min}）での平均濃度は、～７０μｇ／ｍｌであった。ＣＤ－１マウスにおけるＡｂＴの排出は、～２．２ｍｌ／ｈｒ／ｋｇの低い全身クリアランス（ＣＬ）及び２１０時間（～８．８日）の長い排出半減期（$t_{1/2}$）から明らかなように比較的遅かった。定常状態分布容積（Ｖｄｓｓ）は５７２ｍｌ／ｋｇであった。マウスに１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＡｂＴは、ＡｂＳの対応する値と比較して、より高いＣＬ（～６０％増加）、より低い$AUC_{0-\infty}$（～３７％減少）及びより大きいＶｄｓｓ（～８７％増加）を有しているようである。

【０２６６】
[0319]オスＤＢＡマウスに８ｍｇ／ｋｇの単回腹腔内投与後、ＡｂＴの最大血清濃度（C_{max}）及び曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、それぞれ２１μｇ／ｍｌ及び３３２０μｇ＊ｈｒ／ｍｌであった（図４４ｃ；表１８）。ＡｂＴのT_{max}及び排出半減期（$t_{1/2}$）は、それぞれ１時間及び８０時間（～３．３日）であった。ＤＢＡマウスに腹腔内投与後、ＡｂＴ曝露及び半減期は、ＡｂＳの対応するＰＫパラメータと比較してそれぞれ～５４％及び～４３％減少した。
[0320]メス１２週齢ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスに、１０ｍｇ／ｋｇ腹腔内単回投与後のＡｂＴの最大血清濃度（C_{max}）及び曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、それぞれ２３μｇ／ｍｌ及び９５７μｇ＊時間／ｍｌである（図４４ｂ；表１８）。ＡｂＴのT_{max}及び排出半減期（$t_{1/2}$）は、それぞれ６時間及び２１時間である。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスに腹腔内投与後の、ＡｂＴ曝露及び半減期は、ＡｂＳの対応するＰＫパラメータと比較して、それぞれ～６６％及び～５４％減少した。抗ｄｓＤＮＡ力価の減少が観察された唯一の時点である２週目、中央値ＡｂＴレベルは、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける単回投与研究からのＰＫデータを使用するシミュレーションにより予測される値と比較すると４－５倍高く、ＤＢＡマウスから得られた単回投与データでのシミュレーションにより予測される値とは同等であった（図４５）。この観察はＡｂＳ１０ｍｇ／ｋｇ群についてのものと一致している。理論に束縛されるものではないが、２週時点での相対的により低いＡｂＴのレベル（ＡｂＳのレベルと比較して）及び遅い時点でのＡｂＴの検出不能レベルについての可能な説明は、ＡｂＳの複数回投与により引き金が引かれた著しいＭＡＨＡ産生、及びそれ自身に対するＭＡＨＡ応答をＡｂＴが抑制できないことである。

【０２６７】
[0321]ＡｂＴについて記載した結果と一致して、ＡｂＴの用量規格化曝露はＤＢＡ及びＣＤ－１マウスにおけるものと比較して、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおいてより低いようである（表１８）。

【０２６８】
[0322]ＡｂＳと異なり、ＡｂＴを、投与当たり１０ｍｇ／ｋｇ又は２０ｍｇ／ｋｇ、３Ｘ／週で１０週間、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウス腹腔内に投与した場合、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける疾患の発生に対しては限られた影響しか観察されなかった（実施例１０．２）。ＡｂＴ（１０ｍｇ／ｋｇ）の投与は、評価されたすべての時点で抗ｄｓＤＮＡの力価は有意な減少を生じなかった。ＡｂＴの２０ｍｇ／ｋｇ投与は、２週目に抗ｄｓＤＮＡの力価に一時的な減少が生じた；しかしながら、より遅い時点では（４、６、８、及び１０週間）、抗ｄｓＤＮＡ力価は対照と相違しなかった（表１９）。２０ｍｇ／ｋｇＡｂＴ群については、ＡｂＴの定常状態トラフレベルをＥＬＩＳＡによりアッセイした。ＡｂＴ血清濃度には高い動物間差異があった；しかしながら、一般に、ＡｂＴの中央値定常状態トラフレベルは、中央値抗ｄｓＤＮＡ力価に対する効果と逆相関しているようである（表１９）。２週目、中央値ＡｂＴレベルは４週目のレベルより～８倍高かった（しかし、１０ｍｇ／ｋｇ群の２週目の中央値ＡｂＳレベルよりは未だに低い）。より遅い時点では（４、６、８及び１０週目）、中央値ＡｂＴトラフレベルは検出限界（～６６ｎｇ／ｍｌ）未満であった。抗ｄｓＤＮＡ力価の減少が観察された唯一の時点である２週目、

中央値ＡｂＴレベルは、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける単回投与研究からのＰＫデータを使用するシミュレーションにより予測される値と比較すると４－５倍高く、ＤＢＡマウスから得られた単回投与データでのシミュレーションにより予測される値とは同等であった（図４５）。この観察はＡｂＳ１０ｍｇ／ｋｇ群についてのものと一致している。理論に束縛されるものではないが、２週時点での相対的により低いＡｂＴのレベル（ＡｂＳのレベルと比較して）及び遅い時点でのＡｂＴの検出不能レベルについての可能な説明は、ＡｂＳの複数回投与により引き金が引かれた著しいＭＡＨＡ産生、及びそれ自身に対するＭＡＨＡ応答をＡｂＴが抑制できないことである。

実施例１０．８：カニクイザルにおけるＡｂＴのＰＫ

[0323]単回静脈内（１０ｍｇ／ｋｇ又は１００ｍｇ／ｋｇ）又は皮下（１０ｍｇ／ｋｇ）投与後のメスザルにおけるＡｂＴのＰＫを決定した。この研究からの平均濃度－時間プロファイルをＡｂＳのものと比較し（図４６ａ－ｂ）、平均ＰＫパラメータは、表１８に要約されている。

【０２６９】

[0324]ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の血清濃度は、表１７に記載したように、適格なＥＬＩＳＡにより決定した。抗ＩＬ－２１Ｒ　ＥＬＩＳＡは、実施例１０．６に記載したように、捕捉試薬として単量体Ｈｉｓタグ付ＩＬ－２１Ｒ及び検出試薬としてＨＲＰにコンジュゲートされた抗ヒトＦｃを使用した。ＴＭＢを使用して有色最終生成物を産生し、結合された被験物質を可視化した。サルにおけるアイソタイプ対照抗体（抗ＩＬ－１３抗体）の血清濃度も、実施例１０．６に記載したように、ＥＬＩＳＡにより測定した。ＰＫパラメータは、実施例１０．６に示したように計算した。

【０２７０】

[0325]メスカニクイザルに、ＡｂＴの単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、平均血清クリアランス（ＣＬ）は７．０１ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、平均排出半減期（$t_{1/2}$）は～２．６日であった。平均定常状態分布容積（Ｖｄｓｓ）は～２０２ｍｌ／ｋｇであり、ＡｂＴの平均曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、１４７６μｇ＊ｈｒ／ｍｌ（表１８）であった。

【０２７１】

[0326]カニクイザルにＡｂＴの単回１００ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＣＬは～４．８７ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、$t_{1/2}$は、～３．７日であり、$AUC_{0-\infty}$は、～２０９５５μｇ＊ｈｒ／ｍｌであり、Ｖｄｓｓは、～１４６ｍｌ／ｋｇであった（表１８）。１０ｖｓ．１００ｍｇ／ｋｇ静脈内単回投与、サルのＡｂＴの平均ＰＫパラメータ間には有意差はなかった；従って、ＡｂＴのＰＫは、１０－１００ｍｇ／ｋｇの用量範囲でほとんど直線的であった。

【０２７２】

[0327]サルにＡｂＴの１０ｍｇ／ｋｇ皮下投与後、平均T_{max}は、～６時間であり、平均皮下生物学的利用率は～４３％であった。サルに、１０ｍｇ／ｋｇ皮下投与後の平均$t_{1/2}$値は、６３時間（～２．６日）であり、１０又は１００ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後に観察された値と同様であった（表１８）。

【０２７３】

【表１７】

表17: マウス及びメスザル血清におけるＡｂＴについてのＥＬＩＳＡ概要

種 系統	アッセイ 捕捉	アッセイ 検出	定量の範囲 (100% 血清中 ng/mL)	培地 必要とされた希釈	検量線 (ng/ml)	アッセイ 希釈剤に使用した血清
マウス DBA	抗ヒト IgG	抗ヒト IgG-ビオチン	32-500	20	0.78-100 (5%血清中)	S-Dラット
マウス MRL^{lpr}	抗ヒト IgG	抗ヒト IgG-ビオチン	66.8-1260	40	0.514-102 (2.5% 血清中)	C57BL/6 マウス
マウス CD-1	単量体 His-タグ付 Il-21R	抗ヒト IgG-HRP	45-768	20	1-38.4 (5%血清中)	CD-1 マウス
サル (cyno)	単量体 His-タグ付 Il-21R	抗ヒト IgG-HRP	30-512	20	0.44-38.4 (5%血清中)	ﾌﾟｰﾙしたcyno

【０２７４】

【表１８】

表１８：マウス及びメスザルにおけるAbTの平均PKパラメータ

種 系統	用量 (mg/kg), 経路	C_{5min} 又は C_{max}[a] (μg/ml)	T_{max} (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (μg*hr/ml)	CL (ml/hr/kg)	Vd_{ss} (ml/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	F (%)
マウス DBA	8, i.p.	21	1	3320	NA	NA	80	ND
マウス MRL^{lpr}	10, i.p.	23	6	957	NA	NA	21	ND
マウス CD-1	10, i.v.	70	NA	4551	2.194	572	210	NA
サル cyno	10, i.v.	113±14	NA	1476± 312	7.01 ± 1.68	202 ± 44	63 ± 24	NA
	10, s.c.	11±3	6±0	638 ± 56	NA	NA	63 ± 10	43 ± 4
	100, i.v.	1850±415	NA	20955 ± 3702	4.87± 0.79	146 ± 24	88 ± 34	NA

【０２７５】

【表１９】

表１９：MRL^{lpr}マウスに多数回投与後の中央値AbS及びAbT濃度

抗体　(用量)	2 wk	4 wk	6 wk	8 wk	10 wk
AbS (2.5 mg/kg)	0*	0*	ND*	ND	ND
AbS (10 mg/kg)	137940*	196887*	198707*	68363	49563
AbT (20 mg/kg)	94456*	12765	0	0	0

【０２７６】

実施例１０．９：ＤＢＡマウスにおける^{125}Ｉ－Ｄ５の薬物動態

[0328]^{125}Ｉ－抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体Ｄ５－２０（“Ｄ５”）を、単回８ｍｇ／ｋｇ投与で、非絶食オスＤＢＡマウスの腹腔内に注入した。１－５７６時間の時点で血清試料を採取し、Ｄ５レベルは、トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）沈殿性放射活性を測定することにより定量した。ＤＢＡマウスに腹腔内投与後、Ｄ５抗体のＰＫプロファイルは、一般に、ヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のものと類似していた（表２０、図４７；表１４及び１８も参照されたい）。

【０２７７】

【表２０】

表２０：オスDBAマウスにおける^{125}I-D5の薬物動態パラメータ

	$t_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (μg*hr/ml)
^{125}I-D5	143.9	6	36	5422

【０２７８】

実施例１０．１０：抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の静脈内、皮下又は腹腔内投与後のスプラーグドーリーラットにおける薬物動態

[0329]ＡｂＳ、ＡｂＴ、ＡｂＶ、ＡｂＵ及びＡｂＷ、ならびにアイソタイプ対照抗体のＰＫは、Ｓ－Ｄラットに単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後に試験した。被験物質血清濃度の定量のための生化学分析的アッセイ、ラット血清中の抗ＡｂＳ抗体の検出のためのアッセイ、及び薬物動態計算は、サルについてＡｂＳ及びＡｂＴで記載したように（実施例１０．６及び１０．８）実施し、以下の修正を加えた：Ｓ－Ｄ血清はアッセイ希釈液として使用し、被験物質血清濃度アッセイのＬＯＱは４５ｎｇ／ｍＬであった。アイソタイプ対照のために用いたＥＬＩＳＡについては、抗ヒトＦｃ抗体を捕捉剤及び検出剤の両方として使用した。

【０２７９】

[0330]Ｓ－Ｄラットに単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、抗体ＡｂＳは徐々に排出された（ＣＬ～１．６ｍｌ／ｈｒ／ｋｇ）；アイソタイプ対照ＩｇＧ（～０．４ｍｌ／ｈｒ／ｋｇ）より有意に速かったが（ｐ＜０．０５）（表２１及び図４８ａ）。すべてのラット（ｎ＝６）がＡｂＳ血清濃度の急激な減少を示したので、投与後１５日目以降、ＡｂＳは検出不能であった。ＡｂＳ血清濃度のこの減少は、６匹すべての動物において、１５日目及びすべての引き続いた時点で検出された抗ＡｂＳ抗体の存在に関係しているようである。平均血清濃度は早ければ投与後２４時間で分かれ始め、１週時点では～４倍以上異なっているので、ＡｂＳ及び対照ＩｇＧ間のラットでの濃度－時間プロファイルの差異は、抗生成物応答により完全には説明できないようであることに注目すべきである。ＡｂＶの濃度－時間プロファイル及びＰＫパラメータは、ラットにおけるＡｂＳのそれと酷似していた。

【０２８０】

[0331]ラットに単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＡｂＳと比較して、ＡｂＴ排出はより速く（ＣＬ～２．１ｍｌ／ｈｒ／ｋｇ）、得られた$AUC_{0-\infty}$は～２分の１であった。ＡｂＴ投与ラットの６匹すべても、終末期に血清濃度の急激な減少を有していた。ラットにおける、ＡｂＵ及びＡｂＷ及びＰＫパラメータ（$AUC_{0-\infty}$、$AUC_{0-240hr}$及びＣＬのような）の濃度－時間プロファイルは、ＡｂＳ及びＡｂＴの中間であった（図４８ｂ）。

【０２８１】

【表２１】

表２１：10 mg/kg i.v.投与後のS-Dラットにおける抗IL-21R抗体の薬物動態特性

化合物 (n)	C_{5min}[a] (μg/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (μg*hr/ml)	AUC_{0-240h}[b] (μg*hr/ml)	CL (ml/hr/kg)	Vd_{ss} (ml/kg)
AbS (n=6)	191±38.5	6361±184	5266 ± 625	1.60 ± 0.210	191 ± 33.0
AbT (n=5)	149±51.1	3233 ± 356	3036 ±167	3.12 ± 0.312	182 ± 46.0
AbU (n=7)	161±15.0	4371±552	4116 ± 392	2.32 ± 0.328	160 ± 24.2
AbV (n=7)	153±14.4	5541±691	4907 ± 374	1.83 ± 0.211	161 ± 20.3
AbW (n=5)	144±7.78	4002 ± 737	3613 ± 591	2.58 ± 0.522	200 ± 36.7

CL=血清クリアランス。 Vd_{ss}=定常状態での分布の量。 AUC=濃度曲線下面積.
a. 5分での濃度、IV 投与後最初のサンプリング時点。
b. 全てのラットにおいて 240 hr 時点後の AbS レベルはくLOQ であった。
c. 全ての投与群の全ての動物は、168-504 hr 期間に試験項目の急な低下を有していた。従って、終末期は明確に定義できず、得られた見かけの $t_{1/2}$ 値はこの濃度低下発生の相違から誘導された。それ故、$t_{1/2}$ 値は構築物にまたがった PK の比較には使用されず、示されていない。

【０２８２】

[0332]ＡｂＳについては、ラットにおけるＰＫが１０ｍｇ／ｋｇ皮下及び腹腔内投与後、ならびに静脈内投与後の二つの用量レベル（１及び１０ｍｇ／ｍｇ）でも試験した。

[0333]ラットへ単回静脈内、皮下、又は腹腔内投与１６８－５０４時間後に、すべての動物においてＡｂＳレベルの急激な減少があった（図４９）。静脈内及び皮下群において、ＡｂＳレベルは、３６０時間から研究の終了（８４０時間）まで、アッセイのＬＯＱ（４５．０ｎｇ／ｍＬ）以下であった。腹腔内群においては、５７６時間から始まり研究の終了まで、ＡｂＳは検出不能であった。実施例１０．４及び１１に記載されている常磁性ビーズアッセイを使用し、抗ＡｂＳ抗体はすべての用量群についてすべての動物で早ければ投与後３６０時間（抗ＡｂＳ抗体評価のため採取した最初のサンプリング時点）で検出され、研究の終了（８４０時間）まで持続した。抗ＡｂＳ応答の対数力価は、試験されたすべての試料についての研究の終了までに４．０１から＞４．７４単位に達した。従って、ＡｂＳの急激な減少は抗ＡｂＳ抗体の形成に関係しているようである。

【０２８３】

[0334]ラットにＡｂＳの単回、１又は１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、平均曝露（$ＡＵＣ_{０－∞}$）は、それぞれ４７０±４５又は６３６１±８４５μｇ・ｈｒ／ｍＬであった（表２２）。ＡｂＳの単回、１又は１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後の平均定常状態分布容積（Ｖｄｓｓ）は低く（それぞれ１０１±２４又は１９１±３３ｍＬ／ｋｇ）、静脈内投与後、ＡｂＳは主として脈管性間隙にわたって、及び限定された細胞外液内に分布していたことを示している。ＡｂＳの平均 クリアランス（ＣＬ）は、１ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与について、それぞれ２．１４±０．２１及び１．６０±０．２１ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであった。平均排出半減期（$ｔ_{１／２}$）は、１ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与について、それぞれ４０±１０及び１１３±２４時間であった。ＡｂＳ ＰＫパラメータは、ラットへの静脈内投与後、１及び１０ｍｇ／ｋｇ用量群間では平均用量規格化曝露（$ＡＵＣ_{０－∞}$／用量）、ＣＬ、及び$ｔ_{１／２}$が有意に異なっていたので（ｐ＜０．０１、対応のないｔ検定）、１－１０ｍｇ／ｋｇの用量範囲において用量に比例していなかった。

【０２８４】

[0335]ラットにＡｂＳの単回１０ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後、平均血清$ＡＵＣ_{０－∞}$は、３９２９±９７９μｇ・ｈｒ／ｍＬであり、平均推定生物学的利用率（ＢＡ）は、６２±１５％であった（１０ｍｇ／ｋｇ静脈内群からの$ＡＵＣ_{０－∞}$データをＢＡ計算に使用した）（表２２）。平均血清$Ｃ_{ｍａｘ}$は、３１±１４μｇ／ｍＬであり、２０±９時間で$Ｔ_{ｍａｘ}$に達した。ラットに１０ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後、みかけの終期$ｔ_{１／２}$に有意な動物間差異があり、平均値は７８±７０時間であった。

【０２８５】

[0336]ラットにＡｂＳの単回１０ｍｇ／ｋｇ皮下投与後、平均血清$ＡＵＣ_{０－∞}$は１５９５±４５６μｇ・ｈｒ／ｍＬであり、平均推定ＢＡは比較的低かった、２５±７％（１

０ｍｇ／ｋｇ静脈内群からのＡＵＣ$_{0-\infty}$データをＢＡ計算に使用した）（表２２）。平均　血清Ｃ$_{max}$は、８±１μｇ／ｍＬであり、７７±２６時間でＴ$_{max}$に達した。ラットに１０ｍｇ／ｋｇ皮下投与後、同様にみかけの終期ｔ$_{1/2}$に有意な動物間差異があり、平均値は８８±７８時間であった。

【０２８６】

【表２２】

表２２：単回i.v.、i.p.、又はs.c.投与後の、S-DラットにおけるAbSの平均(±SD)薬物動態パラメータ

群	N	投与経路 (mg/kg)	$C_{5\,min}$ 又は C_{max} (μg/mL)	T_{max} (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (μg·hr/mL)	$AUC_{0-\infty}$/用量 (μg·hr/mL) / (mg/kg)	CL (mL/hr/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	Vd_{ss} (mL/kg)	BA[b] (%)
1	6	IV, 10	191±38	NA	6361±845	636±85	1.60±0.21	113±24	191±33	NA
2	6[c]	IV, 1	19±3	NA	470±45	470±45[c]	2.14±0.2[c]	40±10[c]	101±24	NA
3	4	IP, 10	31±14	20±9	3929±979	393±98	NA	78±70	NA	62±15
4	4[c]	SC, 10	8±1	77±26	1595±456	160±46	NA	88±78	NA	25±7

NA=該当なし

注:PKパラメータは個々の動物について計算した。

a. C_{5min}、i.v.投与後最初のｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点での濃度、は群１及び２について示されている。
C_{max}は群３及び４について示されている。

b. BA、i.p.又はs.c.投与後の生物学的利用能、は群１(10 mg/kg, IV)についてのAUCデータを使用して計算した。

c. 群１と統計的に有意な相違($p<0.01$)。

【０２８７】

[0337]Ｓ－Ｄラットを含む全ての動物における抗ＡｂＳ抗体応答の発生の概要が表２３に要約されている。

【０２８８】

【表２３】

表２３：マウス、ラット及びサルへAbS単回投与後の抗AbS抗体応答の発生

種、系統	用量(mg/kg) 経路	発生 (hr)[a]	発生時点での%陽性
マウス、DBA	8, ip	672	37%
マウス、MRL-fas^{lpr}	10, ip	336	100%
	2.5 ip	312	100%
マウス、CD-1	10, iv	576	75%
ﾗｯﾄ、Sprague-Dawley	10, iv	360	100%
サル、カニクイザル	10, iv	504	100%
	10, sc	504	100%

【０２８９】

実施例１１：野生型対照（Ｃ５７ＢＬ／６）、ＩＬ－２ＩＲノックアウト及びＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの薬物動態及び体内分布

実施例１１．１：^{125}Ｉ標識

[0338]ヨウ素化は製造元の使用説明書に従い、IODO-BEADS法（Pierce,Rockford, IL）を使用して実施し、濾過により精製した。簡単には、被験物質の～１００－２００μｇを、１－２ｍＣｉの^{125}Ｉ（PerkinElmer）、３つのIODO-BEADS及び～１００－２００μｌのＰＢＳと２５分インキュベートした。反応混合物をIODO-BEADSから分離し、Centriconろ過デバイス（１０ｋＤカットオフ、Millipore）に移した。精製は、～５－１０ｍｌ（１－２ｍＬの分割量で）のＰＢＳを加え、そして、ろ過デバイス中の上部チャンバーの容量が～２００－５００μｌに減少するまで２、０００Ｘ　ｇで遠心することにより実施した。

【０２９０】

[0339]投与溶液は、非標識被験物質の保存溶液、製剤緩衝液及び^{125}Ｉトレーサーを混合することにより調製した。投与溶液の純度は、還元性及び非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して分析した。投与溶液は、動物の第一のコホートを投与する１日前に調製した。

実施例１１．２：血清中の放射能当量濃度の決定

[0340]５０－１００μｌの血清試料（二重に）における全放射能（１分当たりのカウント数（ｃｐｍ））は、ガンマカウンティングによって決定した（1480 WIZARD, Wallac Inc.,Gaithersburg,MD）。等容量の２０％ＴＣＡ（トリクロロ酢酸）を、各分割量に加え、試料を～１２、０００ｒｐｍで１０分遠心した。上清中のＴＣＡ可溶性放射能（総放射活性計数に使用した試料容量に等しい容量で）は、ガンマカウンティングにより決定した。所与の試料のＴＣＡ沈殿性放射能［全ｃｐｍ－２ｘＴＣＡ－可溶性ｃｐｍ］、投与溶液の比放射能（ｃｐｍ／ｎｇ）、ならびに試料（t_S（日））及び投与溶液（t_D（日））測定の日付を、式：［平均ＴＣＡ沈殿ｃｐｍ／ＥＸＰ（－０．６９３／６０．２ｘ（（t_S－t_D））］／［比放射能ｘ試料容量］を用いる、所与の試料中の放射能当量濃度（ｎｇ　ｅｑ／ｍｌ）を計算するために使用した。

実施例１１．３：尿中の累積全カウント数（投与量カウントのパーセンテージとして）及び遊離^{125}ヨード分画の決定

[0341]式：［１００％ｘ尿ｃｐｍ／ＥＸＰ（－０．６９３／６０．２ｘ（t_S－t_D））］／［比放射能ｘ用量］使用し、全カウント数を各収集期間についての尿中排泄を計算するために使用した（排泄ｃｐｍ、％投与量として）。尿中の累積放射能（累積排泄ｃｐｍ、％投与量として）は０時点から示された時点までの尿排泄（ｃｐｍ、％投与量として）の総計として定義される。

【０２９１】

[0342]ＴＣＡ可溶性放射能の分画を決定するため、５０μｌの尿分割量を、５０μｌの正常マウス血清と混合し（１００μｌの試料が得られる）、ガンマカウンティングにより分析した。２０％ＴＣＡの１００μｌ分割量を、各１００μｌ試料に加え、２００μｌの試料を～１２、０００ｒｐｍで１０分遠心した。１００μｌの上清中のＴＣＡ可溶性放射能をガンマカウンティングにより決定した。遊離ヨードの分画は、式：［２ｘ１００％ｘ上清１００μｌ中のＴＣＡ可溶性ｃｐｍ／尿５０μｌ中の全ｃｐｍ］を使用して得られた。

実施例１１．４：体内分布分析

[0343]組織試料を、予め坪量したチューブ内に置き、秤量して組織の重量をグラムで決定し、全放射能をカウントした（ｃｐｍ）。放射能当量組織濃度（ｎｇ　ｅｑ／ｇ）の定量は、組織中の全放射能、及び式：［試料ｃｐｍ／ＥＸＰ（－０．６９３／６０．２ｘ（t_S－t_D）］／［比放射能ｘ試料重量］を使用した^{125}Ｉの半減期について補正後の投与溶液の比放射能（ｃｐｍ／ｎｇ）に基づいていた。

【０２９２】

[0344]所与の時点での所与の組織についての組織対血清濃度比（Ｔ／Ｓ）は、組織の放射能当量濃度（μｇ　ｅｑ／ｇ）と血清中の放射能当量濃度（μｇ　ｅｑ／ｍｌ）の比を使用して計算した。％投与量としての総組織カウント数は、式：［１００％ｘ試料ｃｐｍ／ＥＸＰ（－０．６９３／６０．２ｘ（t_S－t_D）］／［比放射能ｘ投与量］を使用して計算した。

実施例１１．５：２．５ｍｇ／ｋｇ静注投与後の対照及びＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスにおける薬物動態及び体内分布

[0345]野生型Ｃ５７ＢＬ／６（対照）マウスにおいては、平均ＡｂＳ血清レベルがＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスと比較して減少しており、^{125}Ｉ－ＡｂＳの単回２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与１０～１４日後に始まっている（図５０ｃ）。１４日目（３３６時間）、対照（ｎ＝１０）の６０％及びＩＬ－２１Ｒノックアウトマウス（ｎ＝１０）の０％が、検出不能又は非常に低いレベルのＡｂＳしかなかった。２０日目（４８０時間）以後、すべての対照マウスの血清でＡｂＳレベルは検出不能であった。ＩＬ－２１Ｒノックア

ウトマウスにおいては、最終サンプリング時点の投与後３６日目（８６４時間）の遅くまでＡｂＳが血清中に検出された。対照ｖｓ．ＩＬ－２１Ｒノックアウトにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの濃度－時間プロファイルの差異は、これら２つのマウス系統における抗ＡｂＳ応答の潜在的差異によるようである。５週時点で、約５５％（９の内の５）の野生型血清試料が抗ＡｂＳ抗体アッセイにおいて陽性であったが、試験されたＩＬ－２１Ｒノックアウト血清試料のどれも陽性ではなかった。

【０２９３】

[0346]対照マウスにおいて、全身クリアランス（ＣＬ）は～１．３ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、排出半減期（$t_{1/2}$）は１２０時間（～５．０日）であった。ＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスにおける ＣＬは～０．７ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、$t_{1/2}$は２５６時間（１０．７日）であった（表１４）。従って、２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスは、対照と比較してより高い血清曝露（$AUC_{0-\infty}$）を有していた（表１４）。

【０２９４】

[0347]一般に、対照及びＩＬ－２１Ｒノックアウトマウス両方で、最も高い^{125}Ｉ－ＡｂＳ濃度は、検査した他の組織と比較して血清中に観察された（図５０ａ及び５０ｂ；表２４及び２５）。しかしながら、最後の組織サンプリング時点（８６４時間）では、検出可能な^{125}Ｉ－ＡｂＳレベルは、対照マウスの血清中ではなく組織中に観察された。

【０２９５】

[0348]対照及びＩＬ－２１Ｒノックアウトマウス間のＡｂＳの血清レベルにおける差異に従うと、組織中のＡｂＳの放射能当量濃度は、ＩＬ－２１Ｒノックアウトと比較して対照においてより低く、投与後～２週間から始まっている（図５０）。同様に、組織　排出半減期（$t_{1/2}$）は、ＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスの組織（～２３０－２７０時間）と比較して、対照マウス（～９０－１６５時間）ではより短かった。従って、組織暴露（$AUC_{0-\infty}$）は、ＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスと比較して対照マウス中でより低かった（表２６）。従って、ＩＬ－２１Ｒノックアウトマウスに、^{125}Ｉの２．５ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、血清及び組織の両方における曝露は、対照と比較してより高かった。

【０２９６】

【表２４】

表２４：C57BL/6 マウスへ 2.5 mg/kg の ^{125}I-AbS 単回静注投与後の平均(±SD)組織対血清(T/S)放射活性当量濃度比

	1 hr	48 hr	168 hr	336 hr
脂肪	0.0099±0.0062	0.0849±0.0289	0.0619±0.0144	0.2316±0.2619
大腿	0.0360±0.0126	0.1203±0.0124	0.1108±0.0140	0.6979±1.0550
心臓	0.0776±0.0109	0.1588±0.0143	0.1122±0.0123	0.3837±0.4993
腎臓	0.1293±0.0311	0.2497±0.2105	0.0957±0.0215	0.6350±0.8669
大腸	0.0122±0.0056	0.0760±0.0127	0.0466±0.0078	0.2102±0.2544
肝臓	0.1600±0.0770	0.1342±0.0679	0.1206±0.0717	1.1834±1.4455
肺	0.1968±0.0863	0.2522±0.0714	0.1462±0.0776	1.3408±2.4852
ﾘﾝﾊﾟ節	0.0314±0.0163	0.1554±0.0333	0.1504±0.0542	3.7491±5.7164
骨格筋	0.0099±0.0048	0.0789±0.0108	0.0724±0.0064	0.2461±0.3171
皮膚	0.0243±0.0195	0.3125±0.0327	0.3145±0.1155	1.4147±1.6123
脾臓	0.2450±0.0289	0.2043±0.0403	0.1470±0.0232	2.2414±3.4892
胃	0.0471±0.0530	0.0791±0.0249	0.0674±0.014	0.4292±0.5801
胸腺	0.0215±0.0117	0.0842±0.0174	0.0590±0.0125	0.2794±0.3901

定量限界以下(LOQ、3X ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ cpm として定義される)の個々の値は、平均及び標準偏差 (SD)の計算では“ 0”として処理した。
血清中濃度が検出限界以下であったので、336 時間以後(480 及び 864 時間)の時点については T/S を計算しなかった。

【０２９７】

【表２５】

表２５：IL-21R ﾉｯｸｱｳﾄﾏｳｽへ 2.5 mg/kg の ^{125}I-AbS 単回静注投与後の平均(±SD)組織対血清(T/S)放射活性当量濃度比

	1 hr	48 hr	168 hr	336 hr
脂肪	0.0063±0.0022	0.0718±0.0353	0.0856±0.0475	0.0885±0.0381
大腿	0.0327±0.0069	0.1283±0.0555	0.1169±0.0104	0.1238±0.0217
心臓	0.0733±0.0152	0.1569±0.0172	0.1526±0.0213	0.1681±0.0315
腎臓	0.1491±0.0417	0.1570±0.0218	0.1588±0.0347	0.1687±0.0417
大腸	0.0112±0.0034	0.0666±0.0133	0.0612±0.0111	0.0568±0.0122
肝臓	0.1550±0.0466	0.1434±0.0706	0.1190±0.0549	0.0784±0.0282
肺	0.3495±0.1671	0.2722±0.0529	0.1178±0.0707	0.2510±0.1016
ﾘﾝﾊﾟ節	0.0224±0.0096	0.1337±0.0369	0.1215±0.0345	0.1118±0.0384
骨格筋	0.0068±0.0016	0.0663±0.0077	0.0761±0.0115	0.1227±0.1479
皮膚	0.0185±0.0029	0.2716±0.0315	0.3244±0.0607	0.3593±0.1247
脾臓	0.2682±0.0425	0.1943±0.0304	0.1809±0.0322	0.1846±0.0483
胃	0.0318±0.0151	0.0617±0.0165	0.0689±0.0237	0.0724±0.0174
胸腺	0.0206±0.0099	0.0929±0.0178	0.0979±0.0127	0.1049±0.0233

定量限界以下(LOQ、3X ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ cpm として定義される)の個々の値は、平均及び標準偏差 (SD)の計算では“ 0”として処理した。
血清中濃度が検出限界以下であったので、336 時間以後(480 及び 864 時間)の時点については T/S を計算しなかった。

【０２９８】

【表２６】

表２６：単回2.5 mg/kg 静注投与後の、C57BL/6及びIL-21R ノックアウトマウスの組織における^{125}I-AbSの暴露

	C57BL/6			IL-21R KO		
	Cmax[a]	Tmax	$AUC_{0-\infty}$	Cmax[a]	Tmax	$AUC_{0-\infty}$
	μg eq/ml	hr	hr* μg eq/ml	μg eq/ml	hr	hr* μg eq/ml
脂肪	0.66	48	120	0.64	48	236
大腿	0.93	48	213	1.17	48	370
心臓	1.79	1	258	1.97	1	501
腎臓	3.06	1	352	4.07	1	573
大腸	0.59	48	105	0.61	48	181
肝臓	3.77	1	317	4.24	1	419
リンパ節	1.21	48	303	9.88	1	882
肺	4.84	1	447	1.21	48	357
骨格筋	0.61	48	128	0.60	48	238
皮膚	2.44	48	567	2.48	48	939
脾臓	5.77	1	454	7.20	1	706
胃	0.78	1	163	0.81	1	222
胸腺	0.65	48	141	0.85	48	320
血清	29	NA	1927	32	NA	3415

[a] C_{max} 最初のｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点での濃度が血清について示されている。組織ｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点は:
1、48、168、336、480及び864hrであった。

【０２９９】

実施例１１．６：２．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後のMRL-Fas^{lpr}マウスにおける薬物動態及び体内分布

[0349]メスＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウス（～１０－１２週齢）に^{125}Ｉの２．５ｍｇ／ｋｇを単回腹腔内投与後、血清濃度－時間プロフィールは二相性であり、投与後最初の１週間の間はＡｂＳレベルの比較的ゆっくりとした減少（$t_{1/2}$～５４時間）及び投与５日以後はより速い減少（$t_{1/2}$～１２時間）を示しており、抗ＡｂＳ抗体の形成を示している（図５１ａ及び５２）。実際、３１２時間時点での４匹のマウス中の４匹、及び４０８時間時点での４匹のマウス中の４匹が抗生成物抗体について陽性と試験された（それぞれ～４．０１及び～４．４３の対数力価単位の相対的培地力価で）。^{125}Ｉの２．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後、ＡｂＳの最大血清濃度（C_{max}）及び曝露（$AUC_{0-\infty}$）は、それぞれ１２μｇ　ｅｑ／ｍｌ及び８２３μｇ　ｅｑ・ｈｒ／ｍｌであった。従って、ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスに単回腹腔内投与後のＰＫは、２．５－１０ｍｇ／ｋｇ用量範囲でほとんど直線状であった（図５２；表１４）（実施例１０．４も参照されたい）。ＭＲＬ－Ｆａｓ^{lpr}マウスにおける^{125}Ｉ－ＡｂＳの尿カウント数は、１０日目時点現在で上昇していた（図５１ｂ）。

【０３００】

[0350]単回２．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与後の最初の１週の間（抗生成物抗体の形成前と思われる）、ＡｂＳの最高濃度は、試験されたすべての組織の血清中で観察された。最初の１週間後、血清濃度は、組織中のＡｂＳの減少と比較してより迅速に減少し、そのため、Ｔ／Ｓ濃度比は有意に１より高く（表２７）、そして組織中の$AUC_{0-\infty}$は～９０－３００μｇ　ｅｑ・ｈｒ／ｍｌであった（表２８）。組織において、みかけの排出半減期（２４－３１２時間データセットに基づいて計算した）は～４０－５５時間であった。比較的低い（しかしまだ検出可能）放射能のレベルが、研究終了（投与後７週間）まで組織中に持続した（図５１ａ）。

【０３０１】

【表２７】

表２７：MRL-Fas^{lpr}マウスへ 2.5 mg/kg の ^{125}I-AbS 単回 IP 投与後の平均(±SD)組織対血清(T/S) 放射活性当量濃度比

	24 hr	72 hr	168 hr	240 hr
脂肪	0.321±0.073	0.233±0.070	41.125±69.735	71.500±131.496
腎臓	0.195±0.026	0.202±0.036	9.831±6.787	56.205±25.079
肝臓	0.104±0.028	0.091±0.032	8.067±5.587	16.820±6.892
肺	0.177±0.074	0.159±0.070	7.621±6.512	20.127±12.783
リンパ節	0.197±0.055	0.141±0.020	5.490±3.707	22.497±16.812
皮膚	0.318±0.023	0.305±0.056	12.237±8.734	50.869±59.413
脾臓	0.166±0.022	0.105±0.020	9.648±6.834	50.418±33.424

定量限界以下(LOQ、3X ﾊﾞｯｸｸﾞﾗｳﾝﾄﾞ cpm として定義される)の個々の値は、平均及び標準偏差 (SD)の計算では " 0" として処理した。
血清中濃度が検出限界以下であったので、240 時間以後の時点については T/S を計算しなかった。

【０３０２】

【表２８】

表２８：単回 2.5 mg/kg IP 投与に続いての、MRL-Fas^{lpr} マウスの組織における ^{125}I-AbS の暴露

	Cmax μg eq/ml	Tmax hr	$AUC_{0-\infty}$ hr* μg eq/ml
脂肪	2.9	24	255
腎臓	1.8	24	197
肝臓	1.0	24	95
リンパ節	1.8	24	133
肺	1.6	24	150
皮膚	2.9	24	285
脾臓	1.5	24	161
血清	12	3	823

組織ｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点は：24、72、168、240、312、528、864 及び 1176 hr であった。

【０３０３】

実施例１２：ヒト血液における抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の阻害特性

実施例１２．１：ＩＬ－２１に対するヒト全血のアゴニスト性応答は抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のエキソビボ処理により中和される

[0351] ヒト全血は、Cambridge,MAでのHuman Blood Donor Programによるものである。すべてのヒト血液試料は、BD Vacutainer ((商標)CPT（商標）細胞調製チューブで採取した。採血チューブはヘパリンナトリウムを含有していた。試料は、周囲温度に維持し、直ちに処理した。血液は、クリオバイアルに１－２ｍＬ分割量に分割し、ＩＬ－２１、ＡｂＳ又は対照タンパク質で処理した。次に試料が抗体及びＩＬ－２１の両方で処理する場合、抗体をＩＬ－２１の直前に加えた。試料は次に、Forma Scientific Reach-In incubator Model # 3956中、４時間３７℃でインキュベートし、インキュベーションの間Appropriate Technical Resources Inc (ATR) Rotamix（カタログ番号RKVS）回転混合機（シリアル番号995-52及び#0695-36）を使用して、又はLabquake（登録商標）チューブ振盪機／回転機（カタログ番号400110）を使用し、１５ＲＰＭで連続的に混合した。一部（０．５ｍＬ）を、ART1000Eチップ（カタログ番号72830-042）を付けたGilson P1000ピペットを使用して除き、Human RiboPure(商標)血液キット（Ambion, Austin, TX; カタログ番号AM 1928）で供給される１．３ｍＬのRNAlater（登録商標）を含有する２．０ｍＬマイクロ

チューブ（Axygen Scientific，カタログ番号10011-744）に加え、５回の完全反転により十分に混合した。試料は周囲温度で一晩保存し、その後－８０℃で冷凍してＲＮＡ精製を保留した。

【０３０４】

[0352]ＲＮＡは、Human RiboPure（商標）血液プロトコル（Ambion、カタログ番号AM 1928）を使用して単離した。Human RiboPure（商標）ＲＮＡ単離法は、グアニジウム基剤溶液での細胞溶解、及びフェノール／クロロホルム抽出によるＲＮＡの初期精製及びガラス繊維フィルター上への固相抽出による最終ＲＮＡ精製から成っている。残留ゲノムＤＮＡは、該キットで提供されるDNA-free（商標）試薬を使用するＤＮＡｓｅ処理のための製造元の使用説明書に従って除去した。すべての試料について、NanoDrop 1000 (NanoDrop、 Wilmington、 DE)を使用し、２６０ｎｍでの吸光度によりＲＮＡ量を決定した。ＲＮＡ品質は、2100 Bioanalyzer（Agilent，Palo Alto，CA）を使用し、抜き取り検査（spot-checked）した。試料はｃＤＮＡ合成を実施するまで－８０℃で保存した。

【０３０５】

[0353]製造元の使用説明書に従い、５０Ｕ／試料の追加のＲＮａｓｅ阻害剤（ABI，カタログ番号N808-0119）により、大容量ｃＤＮＡ逆転写キット（ABI，カタログ番号4368814）を使用して、全ＲＮＡからｃＤＮＡを逆転写した。ｃＤＮＡ試料は、ＲＴ－ＰＣＲ（リアルタイムＰＣＲ）を実施するまで－２０℃で保存した。TaqMan（登録商標） 低密度アレイカードにロードするｃＤＮＡの量は、実験内で得られた最も低いＲＮＡ収率を使用して決定した。ｃＤＮＡ試料は、５０℃で２分、９５℃で１０分、次に９５℃で１５秒及び６０℃で１分を４０サイクルの一般的熱サイクル条件を使用し、ABI PRISM 7900 配列検出器（Sequence Detector Software v2.2.2，Applied Biosystems）でアッセイした。

【０３０６】

[0354]ＩＬ－２１エキソビボ効果についてチェックするため、ヒト全血が遺伝子発現レベルでの検出可能な変化でＩＬ－２１に応答するかどうかを試験する実験を行った。ヒトドナーからの全血を、ＩＬ－２１の存在及び不存在下でインキュベートし、ＴＬＤＡカードを使用してＲＮＡレベルを決定した。二つの異なったＴＬＤＡを、ＲＮＡ発現レベルを測定するため使用した。第一のヒト免疫ＴＬＤＡ（ABI，カタログ番号4370573）で９６遺伝子を試験し、その内の９１が刺激されたヒト血液で検出可能であった。ヒトドナー全血からのＬＰＳ又はＰＨＡで刺激されたＰＢＭＣを陽性対照として使用した。ＩＬ－２１に応答したＩＬ－２１Ｒの上方調節を試験するため、ＩＬ－２１Ｒ遺伝子を含有する特別注文設計のＴＬＤＡを使用して結果を得た。

【０３０７】

[0355]選択されたアッセイ条件下で試験された４人のヒトの全血試料で観察された７つの最も一致したＩＬ－２１依存性遺伝子発現変化についてのデータは表２９に示されている。ＩＬ－２１への有意な応答が、ＩＬ６、ＩＦＮγ、ＣＤ１９、ＰＲＦ１、ＩＬ１０、ＩＬ２Ｒα及びＧＮＬＹについて観察された。興味深いことに、３０ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍｌ及び５００ｎｇ／ｍＬの濃度でのＩＬ－２１処理が、同様の結果を生じた（表２９）。

【０３０８】

【表２９】
表２９：ヒト全血試料におけるIL-21-依存性遺伝子発現変化

遺伝子	IL-21 (30ng/mL) 平均倍数変化 (2ヒト)	IL-21 (100ng/mL) 平均倍数変化 (4ヒト)	IL-21 (500ng/mL) 平均倍数変化 (2ヒト)	混合平均倍数変化	混合標準偏差	対応のあるt-検定 (P値)
IL6	20.17	13.24	32.14	19.70	22.51	1.35E-01
IFNG	7.65	6.51	7.23	6.97	2.34	5.86E-02
CD19	2.72	2.78	2.78	2.76	0.94	6.09E-02
PRF1	2.43	2.87	2.72	2.72	1.08	5.21E-02
IL10	3.17	2.49	2.66	2.70	1.26	3.78E-02
IL2RA	2.82	2.07	2.15	2.28	0.86	5.35E-02
GNLY	2.12	2.07	2.66	2.23	0.38	1.76E-03

倍数変化は処理群のRQを対照群のRQで割ることにより計算した。対応のあるT-検定値は、各ヒトドナーからのRQ値及び対となる対照及び処理値を使用して計算した。

【０３０９】
[0356]ＡｂＳが、ヒト細胞のＩＬ－２１／ＩＬ－２１Ｒ依存性活性化の所望のブロッキング作用を有しているかどうかを決定するため、全血においてＩＬ－２１依存性活性化をブロックするこの抗体の能力を、ヒトドナーの一人において試験した。図５３ａ－ｂは、該抗体によるＩＬ－２１応答性遺伝子のＩＬ－２１依存性活性化の有効な阻害（Ｈｕ　ＩｇＧ１対照と比較して）を示している。

【０３１０】
[0357]これらの結果は、ヒト全血試料におけるＩＬ－２１への応答を測定するための方法を明確にしている；従って、このアッセイは、実験あるいは臨床状況において、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体によるＩＬ－２１依存性活性化の阻害を検出するために使用することができ、なぜなら、該アッセイはルーチン的に収集できる量より多くの血液は必要とせず、そして最少のエキソビボ操作しか含んでいないからである。

実施例１２．２：ヒト全血においてＡｂＳのＰＤ活性を測定するアッセイ

[0358]総計で５人の健康ヒトドナーをこれらの研究に使用した。すべてのヒト全血試料は、ヘパリンナトリウムを含有するBD Vacutainer(商標) CPT（商標）細胞調製チューブ（カタログ番号362753）に採取した。ヒト全血は、ヒトBlood Donor Program in Cambridge, MAによるものである。試料は周囲温度に維持し、特に記述しない限り、採取１時間以内処理した。試料を免疫グロブリン試薬及びＩＬ－２１で処理する場合、免疫グロブリン試薬をＩＬ－２１の添加に先立って加えた。試料は、Forma Scientific Reach- In incubator Model #3956中、示された持続時間、３７℃でインキュベートし、インキュベーションの間、Appropriate Technical Resources Inc (ATR) Rotamix（カタログ番号RKVS）回転混合機（シリアル番号0995-52及び0695-36）を使用して、又はLabquake（登録商標）チューブ振盪機／回転機（カタログ番号400110）を使用して約７ＲＰＭで連続的に混合した。その後、各試料の０．５ｍＬを取り出して、Human RiboPure(商標)血液キット (Ambion, カタログ番号AM1928）で提供される１．３ｍｌのRNAlater（登録商標）を含有する２．０ｍＬマイクロチューブ（Axygen Scientific, カタログ番号10011-744,）に加え、５回の完全反転により十分に混合した。実施例１２．１に記載されている手順に従って試料を処理して単離し、ＲＮＡ収率を定量し、ｃＤＮＡを合成し；そして２００ｎｇのｃＤＮＡを、図５４に示されている２４の遺伝子（ＲＮＡ発現レベルが、ＩＬ－２１での刺激によりヒト全血において変化することが観察されている１９の試験遺伝子、及び５つの内因性対照遺伝子）を含む特別注文ＴＬＤＡプレートに加えた。

【０３１１】
[0359]ＲＮＡ発現レベルの定量のため、いくつかの内在性対照（図５４のＧＡＰＤＨ、ＧＵＳＢ、ＺＮＦ５９２及びＰＧＫ１）からの平均リアルタイムＰＣＲ閾値サイクル（Ｃｔ）値を「ノーマライザー」として使用したが、これら遺伝子の発現は処理により変化しせず、そしてこれらの遺伝子はすべての試料にわたって最も一致したＣｔ値を与えるから

である。実験対照（ＡｂＳなし及びＩＬ－２１添加なし）の平均Ｃｔ値を「検量用試料」として使用した。所与の試料における遺伝子発現は、遺伝子のＣｔ－その試料の内在性対照の平均のＣｔ、として計算した（試料のΔＣｔ）。遺伝子発現値（ΔΔＣｔ）は、試料のΔＣｔ－「検量用試料」のΔＣｔ、として計算した。相対的定量化（ＲＱ）又は変化倍数は、$2^{-\Delta\Delta Ct}$として算出した。

【０３１２】

[0360]最大シグナル発生のためのＩＬ－２１処理の最適な時間及び用量を決定するため、５人の健常ドナーからの全血試料を、３．３、１０又は３０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１の存在下で２、４、６又は２４時間インキュベートした。ＲＮＡを単離し、遺伝子発現レベルを測定した。有意な及び強いＩＬ－２１依存性シグナルが６つの遺伝子について得られた：ＩＬ６、ＩＦＮγ、ＩＬ２Ｒα、ＧＺＭＢ、ＰＲＦ１、ＣＤ１９。ＣＤ１９を除いたすべてについて、最適シグナルが２時間で得られた（図５５）。３．３、１０又は３０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－２１で得られた応答にはほとんど差はなかった。エキソビボＩＬ－２１処理に対する応答は、５人すべてのドナー間で一致していた（データは示さない）。これら５人のドナーから得られた結果に基づくと、ＩＬ－２１へのエキソビボ応答に対するＡｂＳの阻害効果を力価測定するために選択されたアッセイ条件は：１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１での２時間刺激であった。最も信頼できるＩＬ－２１応答性遺伝子は、ＧＺＭＢ、ＩＦＮγ、ＩＬ－２１ＲＡ、ＩＬ－６及びＰＲＦｌであった。

【０３１３】

[0361]ＩＬ－２１の効果をブロックするのに最適なＡｂＳの投与量決定するため、４人の個々のドナーからの試料は、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１の添加前に、示された濃度のＡｂＳの及びＩｇＧ１ＴＭ（両方ともＰＢＳに希釈して）で２時間、前もってインキュベートした。ＩＬ－２１の添加後、試料をさらに２時間インキュベートした。

【０３１４】

[0362]０．１μｇ／ｍＬ　ＡｂＳの添加は完全阻害を生じ、そのため、その後の実験については０．００３μｇ／ｍＬのＡｂＳを使用した。ＡｂＳは、図５６ａ－ｃに示されているように、４人すべてのドナーにおいて、試験された６つすべての遺伝子の応答を阻害したが、ＩｇＧ１ＴＭは阻害しなかった。６つすべての遺伝子についてのIC_{50}が表３０に示されている。

【０３１５】

【表３０】

表３０：全血における IL-21 応答シグナルに対する AbS の阻害活性

	CD19	GZMB	IFNG	IL2Rα	IL6	PRF1
IC_{50}(μg/mL)	0.007	<0.003	0.015	0.002	0.005	0.007

【０３１６】

[0363]図５６に示されているように、０．０３μｇ／ｍＬ（２００ｐＭ又は$6x10^4$分子／細胞）ほど低い濃度のＡｂＳでも、遺伝子発現に対する１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１の効果を成功裏にブロックした。この阻害は、ＡｂＳの濃度を≦０．００３μｇ／ｍＬ（２０ｐＭ）まで低下させたときに減少した。ＧＺＭＢ、ＩＦＮγ、ＩＬ－２Ｒα、ＩＬ－６及びＰＲＦｌは、２時間でのＩＬ－２１Ｒ／ＩＬ－２１及び抗体活性の信頼できる血液バイオマーカーであった；しかしながら、６つすべての遺伝子（ＧＺＭＢ、ＩＦＮγ、ＩＬ－２Ｒα、ＩＬ－６、ＰＲＦｌ及びＣＤ１９）が、ＩＬ－２１Ｒ／ＩＬ－２１活性の有用なヒト血液バイオマーカーとして同定された。さらに、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１は、同一アッセイにおいてＴＢＸ２１遺伝子の遺伝子発現を減少させることが示されており、この減少は、０．０３μｇ／ｍＬのＡｂＳにより完全に回復された（データは示さない）。

実施例１３：メスカニクイザルにおけるＡｂＳ及びＡｂＴのＰＫ及びＰＤ

実施例１３．１：ＡｂＳ及びＡｂＴ研究のための動物選択

[0364]本研究において使用された動物は、タンパク質未変性（native）であり、投与に先だった全血エキソビボアッセイにおける組み換えヒトＩＬ－２１刺激で得られた結果に基づいて包含させること（inclusion）で選択した。

【０３１７】

[0365]具体的には、オスザルについては全血試料（０．５－１．５ｍＬ）を、滅菌され、ヌクレアーゼを含まない２ｍＬの微小遠心チューブ（Axygen, cat.#1011-744）に入れ、ビヒクル（１０ｍＭ　Ｌ－ヒスチジン、５％スクロース）、５０ｎｇ／ｍＬ組み換えヒトＩＬ－２１（ｒｈｕＩＬ－２１）、３０ｎＭ　ＩｇＧ対照抗体を伴った５０ｎｇ／ｍＬ　ｒｈｕＩＬ－２１、又は３０ｎＭ抗ＩＬ－２１Ｒ抗体を伴った５０ｎｇ／ｍＬ　ｒｈｕＩＬ－２１で、プラットフォーム振盪機上、３７℃で４時間処理した。メスザルについては、全血試料（０．５ｍＬ）を、ビヒクルあるいは２０ｎｇ／ｍＬ　ｒｈｕＩＬ－２１で処理した。血液試料中の末梢血単核球を、製造元の使用説明書に従ってフィコール法（GE Healthcare, Ficoll-Paque（商標）plus）により単離し、ＰＢＳ中で１回洗浄した。

【０３１８】

[0366]ＲＮＡ単離は、製造元の使用説明書に従い、RiboPure（商標）血液キット（Ambion,カタログ番号AM1928；オス）又はRNeasyキット（Qiagen、メス）を使用して実施した。ＲＮＡ収率は、NanoDrop 1000A分光光度計（NanoDrop,Wilmington,DE）を使用して決定し、ＲＮＡの品質は、2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA)を使用して評価した。ＲＮＡ濃度は、２８ｎｇ／ｍＬ（オス）又は２０ｎｇ／μＬ（メス）に調整した。

【０３１９】

[0367]オスザルについては、ｃＤＮＡの合成を、製造元の使用説明書に従って、大容量ｃＤＮＡ逆転写キット（Applied Biosystems, Foster City, CA, カタログ番号4368814）を使用して、７００ｎｇのＲＮＡで実施し、遺伝子発現解析はカニクイザル遺伝子の検出のために設計されたWyeth特別注文ＴＬＤＡカード（Applied Biosystems, 部品番号4342249）を使用して実施した。各ｃＤＮＡ合成反応物をTaqMan（登録商標）／2xPCR Master Mix （Applied Biosystems, カタログ番号4304437）と混合し、１００μｌをＴＬＤＡカード上に加えた。ＴＬＤＡカードは製造元の使用説明書に従って処理し、増幅はABI Prism（登録商標）7900HT配列決定システムを使用して実施した。各々の実行のために使用したサイクリングパラメータは、以下の通りである：５０℃で２分、９５℃で１０分、そして９５℃で１５秒続いて６０℃で１分を４０サイクル。サイクル閾値（ＣＴ）は、Sequence Detectionソフトウェア（バージョン 2.3,Applied Biosystems）を使用して計算した。

【０３２０】

[0368]メスザルについては、ＩＬ－２Ｒαのみ、前もって認定されたＩＬ－２Ｒαについてのプライマー及びプローブ（Applied Biosystems；オスザルのための特別注文ＴＬＤＡで使用されたものと同一のＩＬ－２Ｒαプライマー及びプローブ）を使用してTaqMan定量的ＲＴ－ＰＣＲを実施した。

【０３２１】

[0369]オス及びメス両方に対して、遺伝子発現の相対的数量化（ＲＱ）を、デルタデルタＣｔ（ΔΔＣｔ）法を使用して計算した、ここでＲＱ＝$2^{-\Delta\Delta Ct}$。亜鉛フィンガータンパク質５９２（ＺＮＦ５９２、オス ）又はタンパク質キナーゼＧ－１（ＰＫＧ１、メス）を、内在性対照として使用し、ビヒクル対照試料を、ＲＱ計算のための検量用試料として使用した。１．５より大きな又は等しいＲＱ値の試料が、対応するビヒクル対照試料よりも高い遺伝子発現を有すると考えられた。

【０３２２】

[0370]その血液が、ビヒクルと比較してＩＬ－２１でエキソビボ刺激された場合に、いくつかの免疫機能関連遺伝子のより高い発現を示した（ＲＱ＞１．５）オスザルを、この研究に包含させるために選択した。以下に記載するさらなる研究ために選択された９匹のサル（動物番号（動物＃）により示されている）の５つの遺伝子（ＩＬ－２Ｒα、ＩＬ－２１Ｒ、ＰＲＦｌ、ＧＺＭＢ及びＩＬ－６）のＲＱ値は表３１に示されている。群番号（

Ａ－Ｃ）は、選択された動物がその後の実験でＡｂＳ（Ａ群）、ＡｂＴ（群Ｂ）又はＩｇＧ対照（Ｃ群）で処理されたかどうかを示している。動物１０－１３は、さらなる研究に選択されなかった。

【０３２３】

【表３１】

表３１：オスカニクイザルから得られた全血へのIL-21のエクスビボ添加により誘発された遺伝子発現の相対定量法（RQ）

群; 動物#	IL-2Rα	IL-21R	PRF1	GZMB	IL-6
A; 1	2.8	2.5	2.8	2.0	4.2
A; 2	3.4	2.3	1.2	1.1	1.7
A; 3	5.5	2.9	2.5	1.4	3.6
B; 4	4.1	2.1	2.5	1.1	4.9
B; 5	5.3	3.2	2.1	2.1	4.1
B; 6	2.8	1.8	1.8	2.0	0.5
C; 7	6.3	1.9	2.4	1.9	2.6
C; 8	2.2	1.8	1.6	1.6	6.7
C; 9	3.8	2.0	1.9	2.2	1.2
10	2.9	1.8	0.7	1.0	0.9
11	7.7	3.4	2.6	2.2	2.8
12	4.5	3.6	1.4	1.5	1.1
13	2.1	1.5	1.1	1.2	1.4

【０３２４】

[0371]ＩＬ－２Ｒαは、評価されたＩＬ－２１誘発遺伝子発現において最も大きな程度で（最も高いＲＱ）及び最も一致した変化（ＲＱ＞１．５を有する動物のパーセンテージが最も高い）を有していると決定され、従って、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の薬力学的（ＰＤ）活性を評価するための最良の単一遺伝であった。インビボ研究に含まれているすべてのサルからの全血試料が、ＩＬ－２１によるエキソビボ刺激後、１．５より大きなＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値を有していた。しかしながら、ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値における有意な動物間差異が観察され、２．８－６．３の範囲の値を有していた。

【０３２５】

[0372]エキソビボアッセイにおいて、ｒｈｕＩＬ－２１に対するＩＬ－２Ｒα応答の分布の特徴付けのための多数の試料を得るため、２４匹の追加のメスカニクイザルから血液試料を得、ｒｈｕＩＬ－２１でエキソビボ刺激し、定量的ＲＴ－ＰＣＲ法を使用することによりＩＬ－２Ｒα遺伝子発現の分析をした（ＩＬ－２１Ｒ、ＰＲＦｌ、ＧＺＭＢ及びＩＬ－６発現は、これらのサルでは分析していない）。オス及びメスザル間にはＩＬ－２Ｒα　ＲＱ分布の注目すべき相違はなく（それぞれ３．８±１．７及び３．０±１．９の中央値±ＳＤ　ＲＱ値）、ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ分布の引き続いての分析を、ｎ＝３７の合併データセットを使用して実施した。試験されたすべてのカニクイザルは、ｒｈｕＩＬ－２１でエキソビボ刺激後、１．５より大きな又は等しいＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値を有していた。中央値ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値（ｎ＝３７）は３．２であり、範囲は１．５－８．１であった。

【０３２６】

[0373]３７匹のサルからのベースラインで得られたＩＬ－２Ｒα発現についてのＲＱ値を対数変換し、ＲＱの分布及びｌｏｇ｛ＲＱ｝値を、Shapiro-Wilk及びD’Agostino & Pearson正規性検定（GraphPad Prizm 5, GraphPad Software, Inc）で試験した。正規性仮定は、ＲＱ分布（ｐ＜０．０５）については拒否されたが、ｌｏｇ｛ＲＱ｝分布についてはされなかった（Shapiro-Wilk検定ではＰ＝０．１６；及びD’Agostino & Pearson検定ではＰ＝０．４８）。対数変換ＲＱ値は、GraphPad Prizm 5ソフトウェアを使用して正規分布に適合させた（R^2＝０．６９）。全３７匹（ｎ＝１３オス；ｎ＝２４メス）すべてのサルのエキソビボアッセイで得られたＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値及びＲＱ値の対数変換（ｌ

ｏｇ２）の分布は、それぞれ図５７ａ及び５７ｂに示されている。ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値の分布はおおよそ対数正規で出現し、正規性検定をパスした。カニクイザルにおける抗ＩＬ－２１Ｒ抗体での将来の薬力学的（ＰＤ）研究の包含基準は、式：ｌｏｇ｛ＲＱ$_{カットポイント}$｝＝対数変換されたされたＲＱ値の平均－対数変換されたＲＱ値の標準偏差、に基づいて、２．３と定義された。従って、２．３より大きなＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値の分布を有する動物は、ＩＬ－２１刺激への良好なレスポンダーであると考えられた。２．３より大きなＲＱ値を有する動物（～８１％；３７の内の３０）は、良好なレスポンダーとして定義され、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のＰＤ研究についての包含基準を満たすと考えられた。

【０３２７】

[0374]ＩＬ－２１誘発遺伝子発現がカニクイザルＩＬ－２１Ｒの関与に依存していることを確認するため、ＲＮＡ単離及び遺伝子発現解析に先だって、サル全血試料をＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（ＡｂＴ；３０ｎＭ）と同時にインキュベートした。予期されるように、ＩＬ－２１と同時のＡｂＴのエキソビボ添加は、全血アッセイにおけるＩＬ－２１誘発遺伝子発現変化を強く阻害した（即ち、ＲＱ値＜１．５；図５７ｃ）。

実施例１３．２：インビボ実験のための研究設計

[0375]エキソビボ薬力学的（ＰＤ）全血アッセイ（実施例１２．１に記載されている）においてＩＬ－２１刺激へのレスポンダーとして同定された９匹のオスタンパク質未変性カニクイザルに、群当たり３匹の動物で、１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳの（群Ａ）、ＡｂＴ（群Ｂ）又はＩｇＧ対照抗体（群Ｃ）を投与した。用量は、２．５ｍＬ／ｋｇの投与量で、伏在静脈内に静脈内投与（～４ｍＬ／分の注入速度）した。

【０３２８】

[0376]ＰＤ活性の決定のため、血液試料（～７．０ｍＬ）（３群すべて）を抗凝血剤としてクエン酸ナトリウムを含有するチューブ内に採取した。血清ＡｂＳ又はＡｂＴ濃度の決定のための、及び抗生成物抗体の評価のための血液試料（～３．０ｍＬ）を抗凝血剤なしのチューブ内に採取し、室温でおよそ１５分凝固させ、遠心分離により血清採取の処理をした。試料採集予定は、表３２に示されている。５０日目以後、ＰＤ活性の可逆性を示すため、追加のサンプリング時点をＡｂＳ群（Ａ群）の動物１及び３に加えた。「用量投与」とも称される１日目は抗体がサルに投与される日である。「投与前」とは、投与前の時点に試料採集することを指し、「投与後」とは、投与後の時点に試料採集することを指す。

【０３２９】

【表３２】

表３２：オスカニクイザルにおけるインビボ研究設計及び試料収集

群（投与） 動物 #	時間 （日）	試料採集[a]
A; AbS (10 mg/kg, IV) 動物 1-3	-13, 1(投与前[b]及び5分後), 2, 8, 15, 22, 36, 50	動物 1-3
	71, 92[c]	動物 3
	92, 106, 113, 134, 148[c]	動物 1
B; AbT (10 mg/kg, IV) 動物 4-6	-13, 1(投与前及び5分後), 2, 8, 15, 22, 36	動物 4-6
C; IgG 対照 (10 mg/kg, IV) 動物 7-9	-13, 1(投与前及び5分後), 2, 8, 15, 22, 36	動物 7-9

a.群A及びBについて、血清は試験項目濃度及び抗生成物抗体をアッセイするために集め、そして全血はエクスビボPDアッセイのために集めた。群Cについては、全血試料のみを集めた。
b.動物1については、投与1日前の試料は集めなかった。
c.50日目のPD分析に続き、PD活性の可逆性を示すための追加のｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点が含まれている。

【０３３０】

実施例１３．３：ＡｂＳ及びＡｂＴ血清濃度

[0377]ＡｂＳ及びＡｂＴ血清濃度を決定するため、実施例１０に記載したＥＬＩＳＡを

使用した。実施例１０に記載されているカニクイザルにおけるＰＫ研究は、単回静脈内投与後、ＡｂＴと比較して、ＡｂＳが著しく速く除去されることを示している。この研究においては、ＰＤアッセイには比較的に大量の試料容量が必要とされ、そして各個のカニクイザルから採取することができる血液量に制限があるため、ＰＫパラメータの完全セットを決定するために必要とされる広範な血清サンプリングは実施されなかった。抗ＩＬ－２１Ｒ血清濃度を決定するための試料は、各個の動物についての血清濃度及びＰＤ活性間の相関を可能にするためにＰＤ活性が評価される時点でのみ採取された。それ故、排出半減期（$t_{1/2}$）のみが、血清濃度－時間プロファイルの終末期に基づいて見積もられた。みかけの$t_{1/2}$は、実施例１０に記載されている通りに決定した。

【０３３１】

[0378]単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＡｂＳは～１０．６±３．９２日の平均みかけの終末期半減期（$t_{1/2}$）で、オスカニクイザルから徐々に排出された（表３３）。２２日目まで、ＡｂＳ血清濃度は3匹すべてのＡｂＳ投与動物間で非常に類似していた（図５８）。しかしながら、３６日目及びそれ以降の時点で、動物２のＡｂＳ血清濃度（～０．６μｇ／ｍＬへ）が動物１及び３（～２μｇ／ｍＬへ）と比較して急速に下落した。５０日目、動物２は血清中のＡｂＳが検出不能であり（３０ｎｇ／ｍＬのＬＯＱ未満）、一方、動物１及び３は、～０．９－１μｇ／ｍＬのＡｂＳ血清濃度を有していた。従って、ＡｂＳの推定$t_{1/2}$は、動物１及び３（それぞれ～１２及び１４日）と比較して、動物２（～６．２日）についてはより短かった。

【０３３２】

[0379]最初のＰＫ研究に基づいて予測されるように、単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＡｂＴの血清濃度は、ＡｂＳのそれと比較して著しく速く下落する（図５８）。3匹すべてのＡｂＳ投与サルは、類似の濃度時間－プロファイル及びみかけの$t_{1/2}$値を有しており（表３３）、血清濃度は１５日目に比較的低いレベルに下落し（＜０．４μｇ／ｍＬ）、２２日目ではＬＯＱ未満であった。ＡｂＴの推定平均$t_{1/2}$は２．３±０．１６日であった。ＡｂＳ及びＡｂＴ濃度は早ければ投与後２４時間で分かれ始め、１週目時点では１０倍以上異なっていた。これらのデータは、ＡｂＴがＡｂＳと比較して～５－７倍速い全身クリアランス（ＣＬ）を有していた初期のＰＫ研究の観察を確かにしている（例えば、実施例１０を参照されたい）。

【０３３３】

【表３３】

表３３：オスカニクイザルへAbS及びAbTの10mg/kg IV投与後のピーク及び最終検出可能濃度及び排出半減期

群	動物	C_{peak}	$t_{½}$	C_{last}	T_{last}
		(μg/mL)	(日)	(μg/mL)	(日)
A (AbS)	1	200	12	0.91	50
	2	139	6.2	0.56	36
	3	153	14	0.37	71
	平均	164	11	0.61	52
	SD	32	3.9	0.27	18
B (AbT)	4	145	2.5	0.36	15
	5	155	2.3	0.26	15
	6	201	2.1	0.25	15
	平均	167	2.3	0.29	15
	SD	30	0.16	0.06	0

C_{peak} ５分での濃度(C_{5min}とも呼ばれる)、i.v. 投与後の最初のｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点
$t_{1/2}$ 排出半減期
T_{last} 試験項目濃度が定量の最低限界(LOQ=30.0 ng/mL)より上である最終時点
C_{last} T_{last}での濃度

【０３３４】

実施例１３．４メスカニクイザルにおけるＡｂＳ及びＡｂＴ　ＰＤ応答

[0380]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体によるＩＬ－２１誘発発現の阻害を検出するためのエキソビボ全血アッセイは、実施例１２．１に記載されている。この研究に登録されている９匹すべてのサルについて、投与前及び投与後全血試料を、４つの１．５ｍＬ分割量に分けた。第一及び第二の分割量は組み換えヒトＩＬ－２１あるいはビヒクル（ＲＱ計算のための検量用試料）で処理し、循環している被験物質がエキソビボＩＬ－２１誘発ＩＬ－２Ｒα遺伝子発現に影響するか（即ち、ＰＤ活性）を評価するために使用した。第三の分割量は、ＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１Ｒ抗体（３０ｎＭ）で処理し、第四の分割量は、ＩＬ－２１及びＩｇＧ対照抗体（抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の陰性対照）で処理した。第三及び第四の分割量は、所与の投与後試料中の循環している被験物質によるＩＬ－２１誘発ＩＬ－２Ｒα遺伝子発現の阻害が完全であったかどうか（ＰＤ活性が認められた時点について）、ＩＬ－２１誘発遺伝子発現の回復がＩＬ－２１Ｒを介して仲介されたかどうか（ＰＤ活性が後で失われる時点について）を評価するため、及び中和抗生成物抗体の存在をモニターするため使用された。

【０３３５】

[0381]ＡｂＳについては、ＩＬ－２１誘発ＩＬ－２Ｒα遺伝子発現の完全阻害（ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ＜１．５）が用量投与の直後に観察され、動物２については少なくとも２２日目まで、動物１及び３については少なくとも５０日目まで持続し、その時点で、血清ＡｂＳ濃度は３匹すべてのサルについて６ｎＭ以上（０．９μｇ／ｍＬ）であった（図５９ａ－ｃ及び表３３）。エキソビボＩＬ－２１誘発ＩＬ－２Ｒα発現は、動物１及び３については９２日目に投与前値に回復し（即ち、ＰＤ活性は失われた）、血清濃度が＜ＬＯＱであった時点と一致していた（図５９ａ及びｃ）。動物２については、３６日目にＰＤ活性が失われ、その時点で、血清ＡｂＳ濃度は～４ｎＭ（０．６μｇ／ｍＬ）の比較的低いレベルに下落した。この研究において試験されたすべての時点について、ＡｂＳのＰＤ活性はすべてか無であるようであり、典型的にはＩＬ－２１誘発ＩＬ－２Ｒα遺伝子発現の完全な阻害（ＲＱ　＜１．５）あるいは又は阻害の欠如（対応する投与前試料と同様のＲ

Ｑ）である。部分的ＰＤ応答は、ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値に観察された動物内可変性のため、区別するのが困難である。ＡｂＳに対する部分的ＰＤ応答のデータポイントは、もし追加のサンプリング時点を終末期で集めたならば観察されたであろう。ＡｂＳの最少ＰＤ活性（C_{min}）を維持するために必要とされる最少濃度を正確には推定できなかったが、おそらく～４－６ｎＭであろう。

【０３３６】

[0382]ＡｂＴについては、ＰＤ活性が用量投与の直後にも認められ、少なくとも８日まで持続し（ＲＱ＜１．５）、その時点で血清ＡｂＴ濃度は１．３μｇ／ｍＬ又はそれ以上であった（図６０ａ－ｃ及び表３３）。ＰＤ活性は、３匹すべてのサルについて１５日目には失われた（ＲＱ＞１．５）。動物５及び６から１５日目に得られた血液試料において、ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値は、対応する投与前値と同様のようであり（即ち、ＰＤ活性の完全な喪失）、そして血清ＡｂＴ濃度は１．８ｎＭ未満であった。動物４から１５日目に得られた血液試料に部分的ＰＤ応答があり、観察されたＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値２．７は、投与前（ＲＱ＝４．８）及びその後の２２日時点（ＲＱ＝５．３；図６０ａ）での値未満であった。動物４は、動物５及び６と比較して、わずかにより長い推定$t_{1/2}$、及び１５日目には幾分より高いＡｂＴ血清濃度（～２．５ｎＭ）も有しており（図６０ａ－ｃ）、これらのデータは、ＰＤ活性を維持するために必要なＡｂＴのC_{min}はおよそ２．５ｎＭであることを示唆している。

【０３３７】

[0383]アイソタイプ対照群については、エキソビボ添加組み換えヒトＩＬ－２１は、すべての時点で、３匹すべてのサルからの全血試料においてＩＬ－２Ｒα遺伝子発現を誘発し、ＩＬ－２Ｒα　ＲＱ値において顕著な動物内可変性があった（データは示さない）。

【０３３８】

[0384]初期のＰＫ研究（実施例１０を参照されたい）と一致して、ＡｂＴは、ＡｂＳと比較すると、サルにおいてより速く排出され、平均みかけの$t_{1/2}$は、ＡｂＳ及びＡｂＴについてそれぞれ１０．６及び２．３日であった。１５日目時点でＰＤ活性は、３匹すべてのＡｂＴ投与サルにおいて完全に又は部分的に失われていたが、一方、ＡｂＳ投与群の３匹すべてのサルは相対的に高い血清ＡｂＳ濃度（～６．０－７．４μｇ／ｍＬ）及び完全ＰＤ活性を有していた。従って、ＡｂＳは、カニクイザルにおいてＰＤ活性のより長い持続及びより長い$t_{1/2}$を有していた。

実施例１３．５：抗生成物抗体応答

[0385]ＰＤ活性の喪失が観察された第一の時点で、ｒｈｕＩＬ－２１と同時の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のエキソビボ添加は、すべてのＡｂＳ及びＡｂＴ投与サルにおいて、ＩＬ－２Ｒα遺伝子発現の誘導を阻害し（ＲＱ＜１．５）、ｒｈｕＩＬ－２１誘発遺伝子発現の回復はＩＬ－２１Ｒを介して仲介されること、及び中和抗ＩＬ－２１Ｒ抗体は存在していないことを示している（図５９及び６０）。ＡｂＳのエキソビボ添加は、動物１及び３から収集したその後の時点で阻害活性を示し続けた。しかしながら、ＡｂＳは、動物２からの５０日目の時点では、エキソビボ阻害活性を有していなかった（図５９）。同様に、ＡｂＴは、ＡｂＴ投与群のすべての動物から収集した２２日目及び／又は３６日目ではエキソビボ阻害活性を有していなかった（図６０）。これらのデータは、ＡｂＳ群における動物２、及びＡｂＴ群における３匹すべての動物（４－６）が発生した中和抗生成物抗体を有していたことを示唆した。

【０３３９】

[0386]ＡｂＴ投与動物における中和抗ＡｂＴ抗体の存在は、直交化されたフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）に基づいたアッセイを使用して確認した。ＴＦ－１及びＴＦ－１／ｒｈｕＩＬ－２１Ｒ（ｒｈｕＩＬ－２１ＲでトランスフェクトされたＴＦ－１細胞）を、２５ｎｇ／ｍｌのｈｕＧＭＣＳＦ（R&D Systems）を含有するＲＰＭＩ培地で増殖させた。コンフルエント細胞培養物を３００ｇで１０分遠心分離し、10^6細胞／ｍｌでOptiMEM無血清培地（Invitrogen Corporation）に再懸濁し、３７℃で２時間インキュベートした。細胞を、次に冷ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで洗浄し、氷冷ＰＢＳ緩衝液に再懸濁し、染

色まで氷上に維持した。ＴＦ－１／ｒｈｕＩＬ－２１Ｒ細胞へのＡｂＳビオチン及びＡｂＴビオチン結合についてのＥＣ$_{50}$を決定するため、親ＴＦ－１及びＴＦ－１／ｒｈｕＩＬ－２１Ｒ細胞の両方を（試験当たり１０^{5}細胞）、連続３倍希釈（範囲＝１６－０．０００２μｇ／ｍＬ）を使用してＡｂＴ－ビオチンあるいはＩｇＧ－ビオチン対照と氷上で３０分インキュベートし、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで洗浄し、次にストレプトアビジン－アロフィコシアニン（ＡＰＣ；Invitrogen Corporation）とインキュベートした。ＡＰＣチャネルピークの幾何平均蛍光強度（「ＧＭＦＩ」）をLSRII フローサイトメーター（BD Biosciences）で集め、Flowjo8.3.3ソフトウェア（Treestar）を使用し分析した。プロットの線形回帰分析は、Prism 4 for Macintosh v4.0b（GraphPad Software, Inc.）を使用して実施した。

【０３４０】

[0387]このアッセイにおいて、血清試料を試験するための最少要求希釈（ＭＲＤ）は、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡ中、１：６であると決定された。ＴＦ－１／ｒｈｕＩＬ－２１Ｒ細胞に対するＡｂＴ－ビオチンの阻害（即ち、中和活性の存在）を試験するため、ＴＦ－１／ｒｈｕＩＬ－２１Ｒ細胞を、抗ＩＬ－２１Ｒ投与サルからの血清でプレインキュベートし（ＭＲＤから始まる３倍希釈系列を使用して）、抗ＩＬ－２１Ｒ－ビオチンで染色し（推定ＥＣ$_{50}$濃度で）、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで洗浄し、ストレプトアビジン－ＡＰＣで染色し、前述のようにＧＭＦＩを分析した。各血清試料は、二つの個別実験において二重に実行し、四つの反復の平均ＧＭＦＩ値は、各希釈ポイントについて得た。各希釈ポイントでの各血清試料についての相対的ＧＭＦＩ値は、式［１００％＊平均ＧＭＦＩ／投与前平均ＧＭＦＩ］を使用して計算した。試料は、もし相対的ＧＭＦＩ値が、ＭＲＤにおいて８０％未満あるいは等しければ陽性と考えられた。陽性試料については、対数力価は、ｌｏｇ［相対的ＧＭＦＩ＞８０％を発生するであろう相互希釈］として計算した。ＭＲＤに基づいて、陰性試料の対数力価は＜０．７８（ｌｏｇ６）と報告された。

【０３４１】

[0388]３匹のＡｂＴ投与動物すべてが、２２日目及び３６日目でのＦＡＣＳに基づいた中和抗体アッセイにおいて陽性と試験され、２．２－４．１の範囲の対数力価を有していた（表３４）。

【０３４２】

【表３４】

表３４：オスカニクイザルへAbTの10 mg/kg i.v. 投与後の、中和抗AbT抗体の形成(log力価)

時間（日）	動物 4	動物 5	動物 6
投与前	陰性	陰性	陰性
15	陰性	陰性	陰性
22	4.12	2.7	2.2
36	2.2	2.7	2.7

【０３４３】

[0389]ＡｂＳ投与動物の一匹のみが、エキソビボＩＬ－２Ｒα遺伝子発現アッセイにおいて中和抗ＡｂＳ抗体の証拠を示し、ＡｂＳ投与サルからの血清試料を、中和及び非中和抗ＡｂＳ抗体両方を検出する、実施例１１．５に記載した電気化学発光常磁性ビーズに基づいたアッセイで試験した。このアッセイにおいては、ビオチン化ＡｂＳ及びルテニル化ＡｂＳと同時にインキュベートし、ストレプトアビジンコートした常磁性ビーズを混合物に加え、発光される光はBioVerisテクノロジーを使用して検出した。このアッセイにおい

て、ＡｂＳ投与サル３匹すべてが抗ＡｂＳ抗体陽性であり、１．８６－３．４３の範囲の対数力価を有していた（表３５）。抗ＡｂＳ発生のみかけ上の開始において有意な動物間差異があった。BioVerisに基づいたアッセイにおいて抗ＡｂＳ抗体陽性であった第一の血清試料が、動物１、２及び３に関して、それぞれ１３４日目、３６日目及び９２日目に得られた。従って、３匹のＡｂＳ投与動物の中で、動物２は最も短い$t_{1/2}$及び最も速い開始及び抗ＡｂＳ抗体応答の最も高い力価を有していた。動物２は、ＡｂＳ投与サル３匹すべてと同様に、エキソビボＩＬ－２Ｒα遺伝子発現アッセイにおいて、中和抗ＡｂＳ抗体応答の証拠を示した唯一のＡｂＳ投与サルでもあった。

【０３４４】

【表３５】

表３５：オスカニクイザルへAbSの10 mg/kg i.v. 投与後の、中和抗AbS抗体の形成(log力価)

時間(日)	動物 1	動物 2	動物 3
投与前	陰性	陰性	陰性
15	陰性	陰性	陰性
22	陰性	陰性	陰性
36	陰性	2.13	陰性
50	陰性	3.43	陰性
71	ND	ND	陰性
92	陰性	ND	2.27
106	ND	ND	2.79
113	陰性	ND	ND
134	1.86	ND	ND
148	2.4	ND	ND

“ND” = 検出せず

【０３４５】

実施例１４：カニクイザルにおける追加の抗ＩＬ－２１Ｒ抗体のＰＫ及びＰＤ

[0390]ＡｂＶ、ＡｂＵ及びＡｂＷの薬物動態を、タンパク質未変性カニクイザルに静脈内単回投与（それぞれ１０、１０及び１ｍｇ／ｋｇ）後に検査し、ＰＫパラメータを、ＡｂＳ及びＡｂＴで得られた初期ＰＫデータと比較した（表３６及び図６１）。生化学的分析アッセイ及びＰＫ計算は、実施例１３においてＡｂＳ及びＡｂＴについて記載されているように実施した。

【０３４６】

[0391]すべての化合物について、終末期に有意な動物間差異があり、抗生成物抗体の形成の異なった発生に関連しているようであった。サルに単回１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、ＡｂＶ及びＡｂＳは類似の平均血清濃度及びＰＫパラメータを有していたようであった。サルに単回静脈内投与後、ＡｂＶ及びＡｂＳは試験されたすべてのヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の中で、最も遅い平均ＣＬ、最も長い平均$t_{1/2}$、及び最も高い（用量規格）平均血清濃度を有しているようであった。ＡｂＴは、試験されたすべてのヒト抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の中で、最も速い平均ＣＬ、最も短い平均$t_{1/2}$及び最も低い（用量規格化）平均血清濃度を有していた。カニクイザルに単回静脈内投与後の平均濃度分布及びＰＫパラメータの比較は、ＰＫプロファイルに基づいたヒト抗ＩＬ－２１Ｒ　Ａｂ抗体のランク付けが、Ｓ－Ｄラット及びカニクイザル間で類似していた（実施例１０．１０も参照されたい）ことを示唆した。

【０３４７】

【表３６】

表３６：カニクイザルヘヒト抗 IL-21R 抗体の単回 i.v.投与後の PK パラメータ

化合物	性	用量 (mg/kg)	C_{5min}[a] (μg*hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (μg*hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$/用量 (μg*hr/ml)/(mg/kg)	CL (ml/hr/kg)	Vd_{ss} (ml/kg)	$t_{1/2}$ (hr)
AbS	F 平均	2	33.3	1575	788	1.28	122	78.5
	SD		3.84	184	91.9	0.150	25.0	16.4
	F 平均	10	177	9728	973	1.03	125	74
	SD		10	621	62.1	0.07	16	46
	M 平均	10[b]	164	ND	ND	ND	ND	255
	SD		32	ND	ND	ND	ND	94
	M 平均	100	2030	92867	929	1.08	211	279
	SD		95	9768	97.7	0.108	8.00	27.6
AbT	F 平均	10	113	1476	148	7.01	244	63
	SD		14	312	31.2	1.68	02	24
	M 平均	10[b]	167	ND	ND	ND	55	
	SD		30	ND	ND	ND	4	
	M 平均	100	1850	20955	210	4.87	146	87.8
	SD		415	3702	37.0	0.790	24.4	34.0
AbW	F 平均	1	10.0	430	430	2.33	165	73.2
	SD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AbV	F 平均	10	152	9895	989	1.00	228	201
	SD		46.0	3181	318	0.367	70.4	113
AbU	F 平均	10	197	6807	1947	1.55	140	89.6
	SD		35.5	681	195	0.447	25.6	35.2

特に示さない限り、総ての研究はﾌﾟﾛﾃｲﾝﾅｲｰﾌﾞ(protein-naive)サルで行った、用量群当たり n=3。
a. C_{5min} = 5 分での濃度、IV 投与後の最初の時点
b. 別の PK-PD 研究からの PK データ
NA=該当なし (n=2)
ND= 検出せず;不十分なｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ時点

【０３４８】

[0392]同一の研究において、サルにおけるＡｂＵ－ＡｂＷ（ＡｂＵ、ＡｂＶ及びＡｂＷ）のＰＤ活性は、エキソビボｒｈｕＩＬ－２１誘発遺伝子発現アッセイを使用して試験した（実施例１３に記載されている）。

【０３４９】

[0393]最初のサンプリング時点である５分では、ＡｂＵ－ＡｂＷはすべてのサルにおいてＰＤ活性を有しており、即ち、エキソビボ全血アッセイにおいてｒｈｕＩＬ－２１誘発遺伝子発現の完全な阻害を示し、ＡｂＳ及びＡｂＴについて得られたデータと同様であった。ＰＤ活性は、血清からＡｂＵ－ＡｂＷの洗い流しで失われた。

実施例１５：破傷風トキソイド曝露オス及びメスカニクイザルへのＡｂＳ静脈内投与後の薬物動態

[0394]ＡｂＳのＰＫは、破傷風トキソイド曝露カニクイザルに、ＡｂＳの１回の週３回２又は１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与後、試験した。ＡｂＳ血清濃度及び抗ＡｂＳ抗体は、特異的ＥＬＩＳＡによりモニターし、ＰＫパラメータを、例えば、実施例１３に記載したように、非コンパートメント解析により計算した。

【０３５０】

[0395]週３回、２又は１０ｍｇ／ｋｇをサルに静脈内投与後、ＡｂＳ濃度－時間プロファイル及びＰＫパラメータは、同一用量群（ｎ＝３／性／群）においては、オス及びメスザル間で一般的に類似していた。１回目投与（C_{5min}）及び３回目投与（$C_{14日目}$

$_{,5min}$）５分後での平均濃度、ならびに、３回目投与（$AUC_{14日目-21日目}$）後の平均暴露は、用量レベルとともに増加した。２ｍｇ／ｋｇ群において、平均C_{5min}は２８．４±２．５０μｇ／ｍＬであり、平均$C_{14日目,5min}$は３５．７±１１．０μｇ／ｍｌであり及び平均$AUC_{14日-21日}$は１２７９±５９２μｇ・ｈｒ／ｍＬであった。１０ｍｇ／ｋｇ群においては、平均C_{5min}は１２０±５９．９であり、平均$C_{14日目,5min}$は１５２±２１．９μｇ／ｍｌであり、平均$AUC_{14日目-21日目}$は７７００±７８２μｇ・ｈｒ／ｍＬであった。３回目ＡｂＳの静脈内投与後の排出半減期（$t_{1/2}$）は、２及び１０ｍｇ／ｋｇ群においてそれぞれ、２５．６±２２．７及び１６８±５６．５時間であった（Ｐ＝０．０００２）（図６２）。

【０３５１】

[0396]２ｍｇ／ｋｇ群において、ＡｂＳ濃度は3回目の静脈内投与後、急速に下落し、６匹のサルすべてが、相対的に短い$t_{1/2}$と一致して、２８日目（３回目投与後２週間）から研究の終わりまで、抗ＡｂＳ抗体が陽性と試験された（図６２ａ）。１０ｍｇ／ｋｇ群において、６匹のサルの２匹（ＳＡＮ７及びＳＡＮ８）が抗ＡｂＳ抗体陽性（４２日又は４９日で）と試験され、これらのサルは該投与群において最も短い$t_{1/2}$値を有しており、抗ＡｂＳ抗体の形成がＡｂＳの$t_{1/2}$と相関することを示唆している（図６２ｂ）。

実施例１６：単回投与後、ヒトにおけるＡｂＳ及びＡｂＴの薬物動態予測

[0397]ヒトにおけるＡｂＳ及びＡｂＴのＰＫを予測するため、二つのアプローチを使用した。第一のアプローチについては、ヒトにおける抗ＩＬ－２１Ｒ　ＡｂのＰＫパラメータ（ＣＬ及び分布容積のような）はカニクイザルにおけるものと類似しているであろうことが仮定された。第二のアプローチについては、抗ＩＬ－２１Ｒ抗体の単回静脈内投与後に、マウス 、ラット、及びカニクイザルから得られた動物データに基づいてヒトＰＫパラメータを見積もるためにアロメトリックスケーリング（allometric scaling）を使用した。ＣＬのアロメトリックスケーリングは、以前にMahmood (1996) Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 21:275-78; Mahmood and Balian (1996) Xenobiotica 26:887-95; Sacher, “Relation of lifespan to brain weight and body weight in mammals” in CIBA Foundation Symposium - The Lifespan of Animals (Colloquia on Aging), 115-33 (Wolstenholme GEW, O’Connor M, eds, 1959); 及び Hahn ME, Haber SB. (1978) Behav Genet., 8:251-260、に記載されている方法に従って、ＡｂＳについては潜在的最長寿命（ＭＬＰ）についての調整、そしてＡｂＴについては脳重量調整を使用して実施した。ＡｂＳ及びＡｂＴについてのアロメトリックスケーリングデータは、それぞれ図６３ａ－ｂ及び６４ａ－ｂに示されている。

【０３５２】

[0398]まとめると、これら二つのアプローチは、ヒトにおけるＡｂＳの低いクリアランス（ＣＬ）及び小さな定常状態分布容積（Ｖｄｓｓ）を示唆した。推定されたＡｂＳのＣＬは～０．７２－１．３ｍｌ／ｈｒ／ｋｇであり、そして推定Ｖｄｓｓは～９２．４－１２５ｍＬ／ｋｇであろう。６０ｋｇヒト対象に１ｍｇ／ｋｇのＡｂＳの静脈内投与後、アロメトリックスケーリング法により得られたＣＬ値に基づくと、曝露（$AUC_{0-\infty}$）の推定値は１３９３μｇ・ｈｒ／ｍＬである。ＡｂＴについては、これら二つのアプローチは、～５－８．５ｍｌ／ｈｒ／ｋｇのより高いＣＬ、及び～１１５－２０２ｍｌ／ｈｒ／ｋｇのVd_{ss}を示唆した。

実施例１７：ＡｂＳによる処置はＮＺＢＷＦｌ／Ｊマウスループス腎炎モデルにおける疾患に影響を与えない

[0399]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳは、ＮＺＢＷＦ／１／Ｊマウスを使用するループスのマウスモデルにおける疾患を軽減させるその能力について試験した。メスＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスは、ヒトループス腎炎で観察される症状に似ている症状を自然発症的に発生し、高力価の循環ＩｇＧ抗核及び抗二本鎖ＤＮＡ自己抗体、糸球体におけるＩｇＧ沈着、及びタンパク尿が含まれる。尿中タンパク質の存在により測定される腎疾患の開始は、メスＮＺＢＷＦｌ／Ｊマウスにおいて、およそ２６週齢で起こる。ＡｂＳによるＩＬ－２１Ｒ遮

断の効果を試験するため、２６週齢メスＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスに、１０週にわたる４００μｇ／マウス　３Ｘ／週、腹腔内注入により、生理食塩水（ビヒクル対照）、ＣＴＬＡ－４Ｉｇ（マウスＩｇＧ２ａ、陽性対照）、抗アイメリアテネラ抗体（マウスＩｇＧ２ａアイソタイプ対照）、ＡｂＳ又はヒト抗体アイソタイプ対照（三重変異を有するヒトＩｇＧ１抗体）を投与した。血清サンプルを２週間ごとに採取し、ＥＬＩＳＡによりＩｇＧ抗ｄｓＤＮＡ抗体の測定を行った。尿を採取し、Albustix（Bayer HealthCare, Tarrytown, NY）を使用してタンパク質レベルを２週間ごとに検査した。すべての動物群は、研究の開始時には同様のレベルのタンパク尿を有し、研究の間にタンパク尿の程度は、生理食塩水、抗Ｅ．テネラ（E.tenella）及びｈＩｇＧ１ＴＭ対照において増加した（図６５ａ）。このモデルにおいて疾患を寛解させることが以前に示されているＣＴＬＡ－４Ｉｇタンパク質による処理は、これらのマウスにおける増加したタンパク尿の発生を防止した。対照的に、ＡｂＳによる処理は、対照マウスと比較した場合、ＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスにおけるタンパク尿の発生に影響しなかった（図６５ａ）。同様に、ＣＴＬＡ－４Ｉｇによる処理は、ＮＺＢＷＦ１／Ｊマウスにおいて抗ｄｓＤＮＡ　ＩｇＧ血清抗体価を有意に減少させたが、ＡｂＳによる処理は、これらのマウスにおける抗ｄｓＤＮＡ抗体の発生に影響しなかった（図６５ｂ）。

実施例１８：半治療的コラーゲン誘発関節炎（ＣＩＡ）マウスモデルにおける抗ＩＬ－２１Ｒ抗体での治療の効果

[0400]抗体ＡｂＳ及びＡｂＴは、関節リウマチのマウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて、疾患を軽減するそれらの能力について試験した。メスＤＢＡ／１マウスは、完全フロインドアジュバントに乳化した１００ｍｇのウシＩＩ型コラーゲンで尻尾の皮内で免疫化し、２１日後、フロインド不完全アジュバントに乳化した１００ｍｇのウシＩＩ型コラーゲンを用いて同一部位でブーストした。ウシＩＩ型コラーゲンでの二次免疫化後、膨潤について足を検査し、０－１６のスケールで重症度をスコア化した（０は膨潤がないことを示し、１６は重症疾患を示している）。この研究の動物の１０％が疾患の兆候を示したら、動物は処理しないで放置するあるいは３Ｘ／週、３０日にわたって８ｍｇ／ｋｇのマウスＩｇＧ２ａアイソタイプ対照抗体、抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体Ｄ５（マウスＩｇＧ２ａ抗体）、ｍＴＮＦＲＩＩ－Ｆｃ（陽性対照、マウスＩｇＧ２ａアイソタイプ）、抗ＩＬ－１３ＴＭ抗体（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体）、ＡｂＴ又はＡｂＳを投与した。この研究において、全体の疾患重症度は、このモデルにおいて通常観察されるように、重度であるとは観察されない。本研究の最終日、未処理及びアイソタイプ処理対照マウスにおける平均疾患重症度は、０－１６のスケールで４未満であった（図６６ｃ）。加えて、ｍＴＮＦＲＩＩ－Ｆｃ陽性対照による処理は、この研究において疾患を軽減したにもかかわらず、疾患重症度における統計的有意差は、投与２２日目で、この処理群とアイソタイプ処理対照群疾患の間でのみ観察された。抗マウスＩＬ－２１Ｒ抗体（Ｄ５）又は抗ヒトＩＬ－２１Ｒ抗体（ＡｂＳ及びＡｂＴ）による処理は、この研究において疾患重症度にも影響しなかった（図６６ａ－ｂ）。

実施例１９：カニクイザルでの破傷風免疫へのアムネスティック（amnestic）抗体応答の形成に対する抗体効果の試験

[0401]抗ＩＬ－２１Ｒ抗体ＡｂＳは、カニクイザルにおける破傷風免疫化に対するアムネスティック抗体応答の発生に対するその影響について試験した。９匹のメス及び９匹のオスカニクイザルは、破傷風未変性動物の同定のため、破傷風トキソイド血清抗体価試験を行った。これらの動物は、次に二等分されている（０．２５ｍｌ）破傷風トキソイドの０．５ｍｌを筋肉内投与し、血液を７日ごと３５日間にわたって採取し、ＥＬＩＳＡにより、抗破傷風ＩｇＭ及びＩｇＧ血清抗体を試験した。一次免疫４３日後、３匹のオス及び３匹のメスカニクイザルの群をランダムに指定し、生理食塩水（ビヒクル）、２ｍｇ／ｋｇのＡｂＳ又は１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳを、３週の間１Ｘ／週で、１ｍｌ／ｋｇの投与容量で（２ｍｌビヒクルで流した）、上腕／頭部又は伏在静脈内にゆっくりとボーラス投与した。ＡｂＳの又はビヒクルの初回用量の投与２４時間後、０．５ｍｌの破傷風トキソイドを二等分して（０．２５ｍｌ）筋肉内投与し、サルに二回目の免疫化を行い、血液をル

ーチン的に採取し、ＥＬＩＳＡにより抗破傷風ＩｇＭ及びＩｇＧ抗体力価について試験した。ＩｇＭ及びＩｇＧ破傷風血清抗体は、破傷風トキソイドでの第一の免疫化１４日後以内に、オス及びメスカニクイザル両方において検出可能であった（図６７ａ）。破傷風特異的血清ＩｇＭ力価は、破傷風トキソイドで二次免疫後、いずれの処理群においても変化しなかった。破傷風特異的ＩｇＧ血清力価は、およそ１０～２０倍高く、二次免疫後、生理食塩水処理動物においてより急速に発生し、アムネスティック抗体応答の動力学と一致している（図６７ｂ）。２ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／ｋｇのＡｂＳによる処理は、二次免疫後のカニクイザルにおいて、破傷風特異的ＩｇＧ血清抗体応答の発生には影響せず、ＡｂＳによる処理が、この処理プロトコルを使用する、破傷風トキソイドに対するアムネスティック抗体応答には影響しなかった（図６７ｂ）。

均等物

[0402]当業者は、ルーチン実験程度を使用して本明細書に記載した発明の具体的態様の多くの均等物を認識する、あるいは確認することができるであろう。こうした均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【図１ａ】

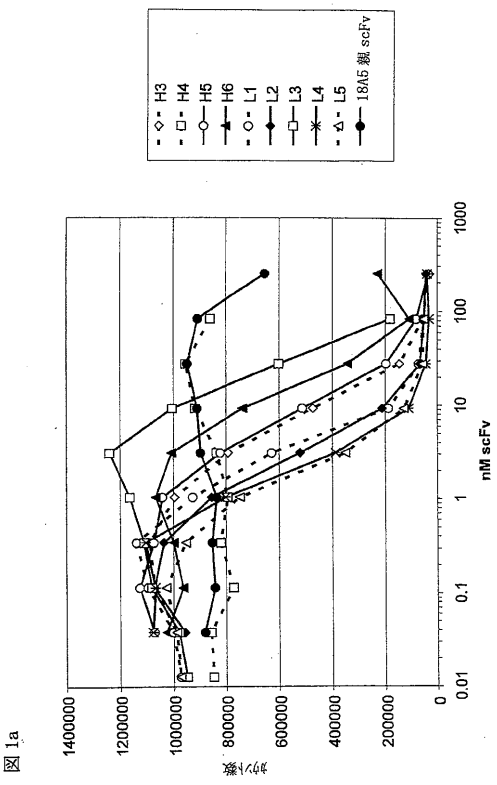


図 1a

【図１ｂ】

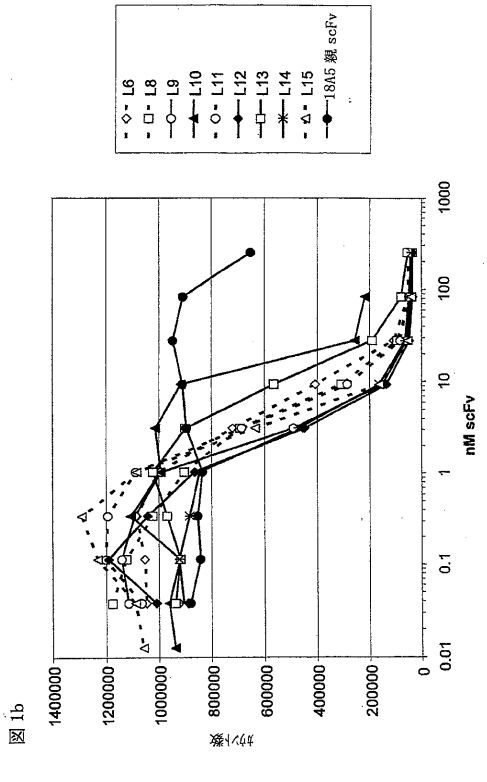


図 1b

【図１ｃ】

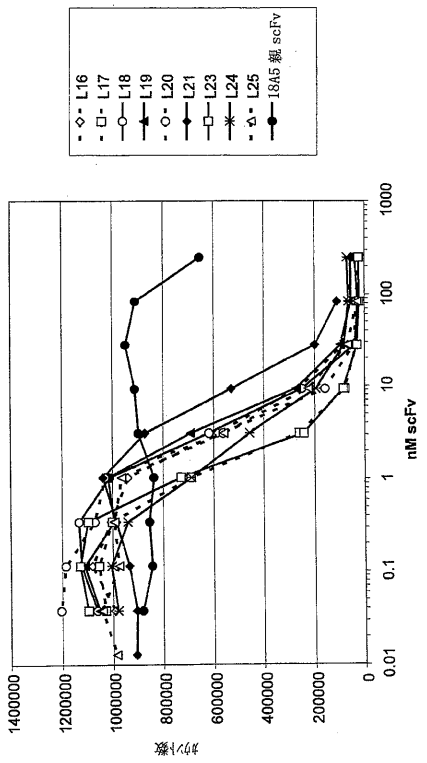


図 1c

【図２ａ】

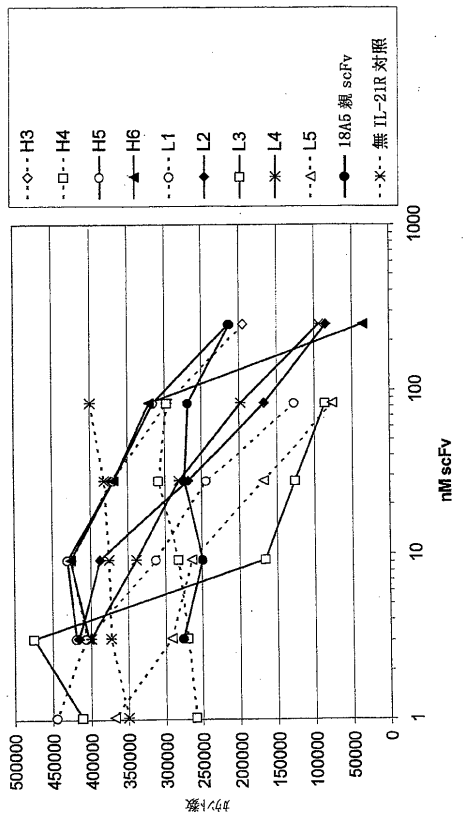


図 2a

【図２ｂ】

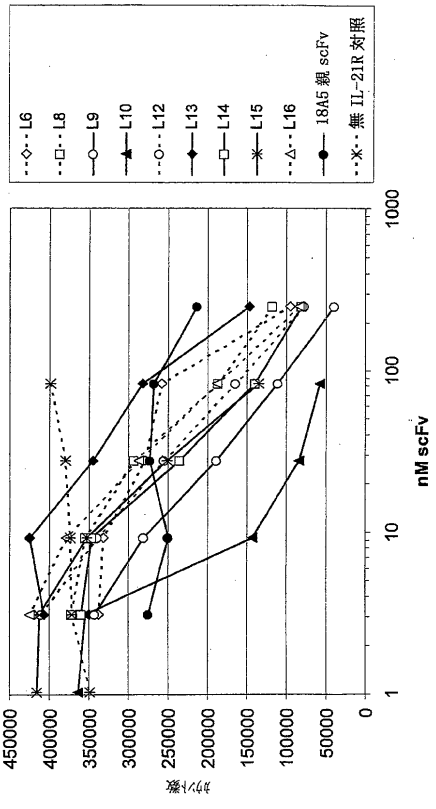


図 2b

【図２ｃ】

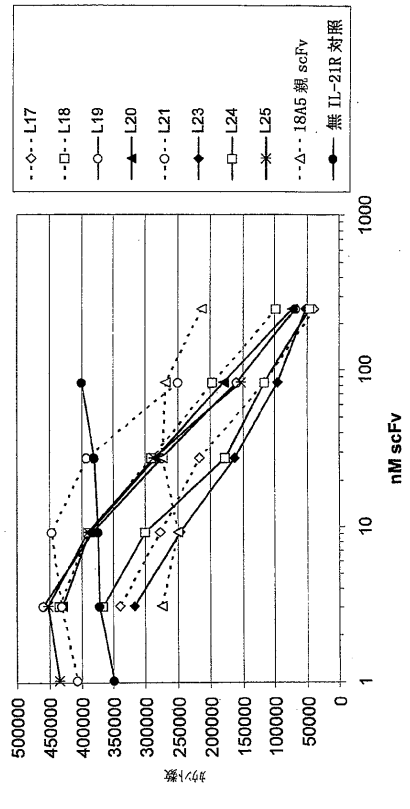


図 2c

【図３ａ】

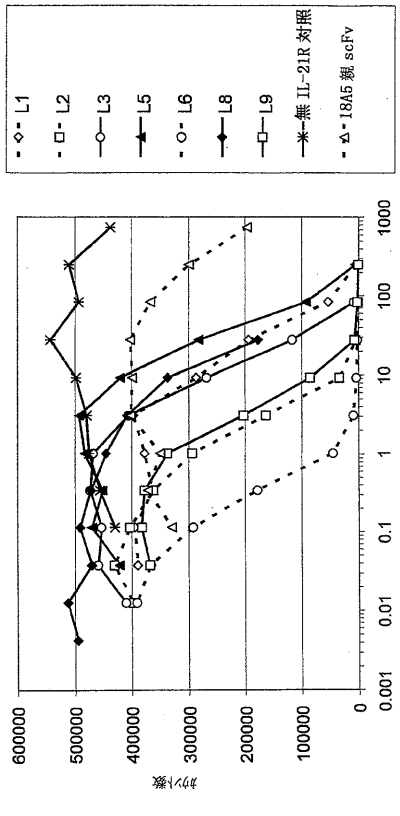


図 3a

【図３ｂ】

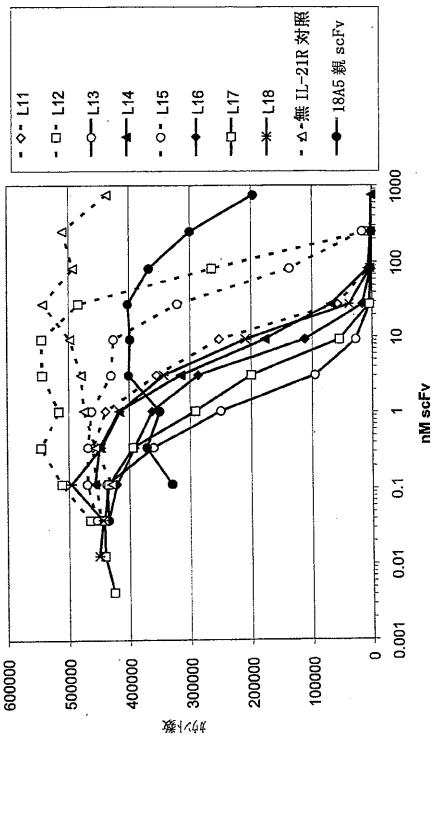


図 3b

【図３ｃ】

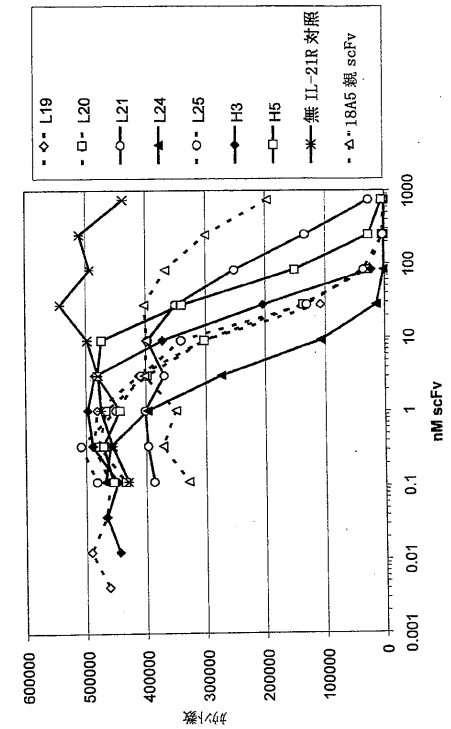


図 3c

【図４ａ】

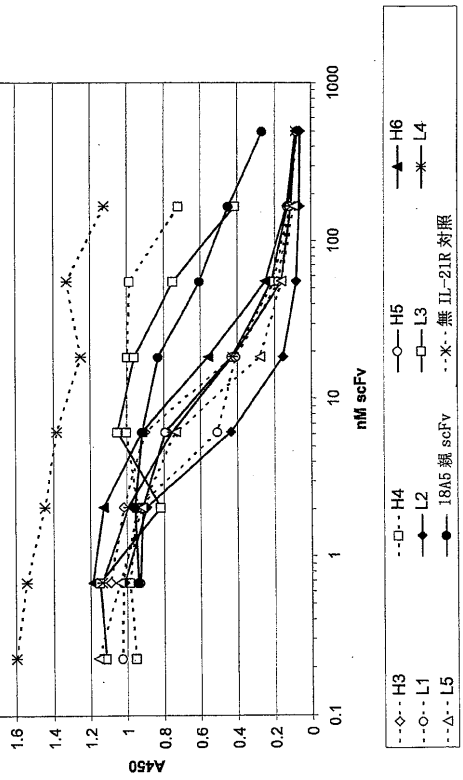


図 4a

【図４ｂ】

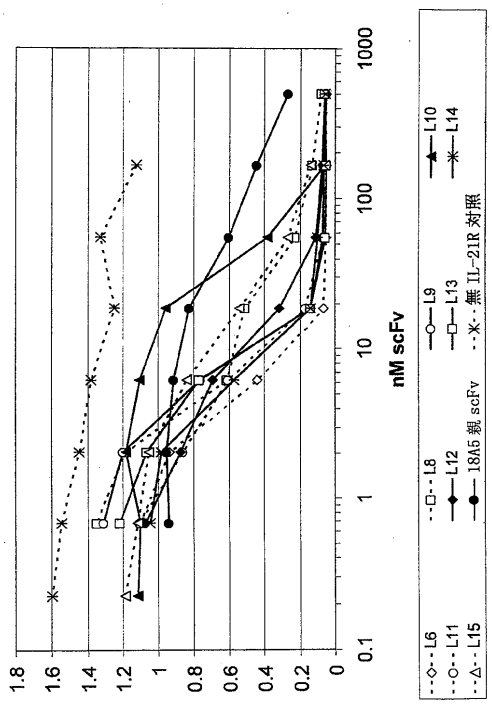


図 4b

【図４ｃ】

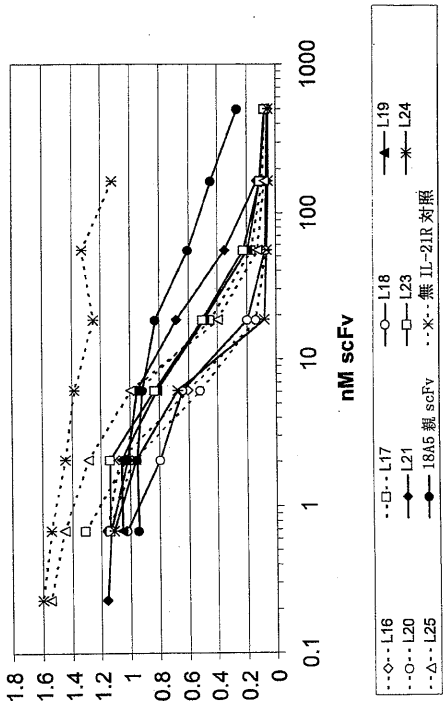


図 4c

【図５ａ】

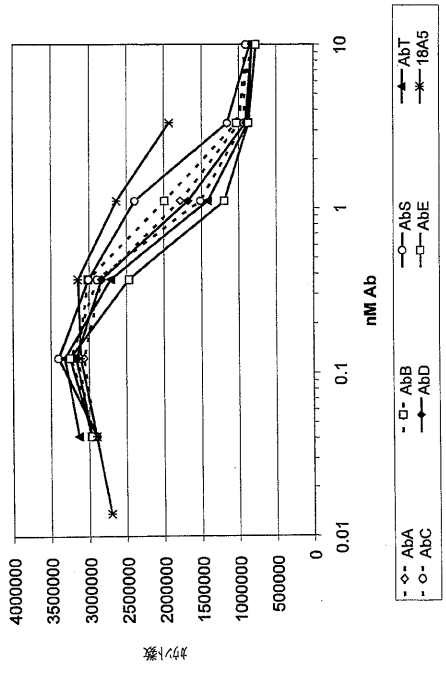


図 5a

【図５ｂ】

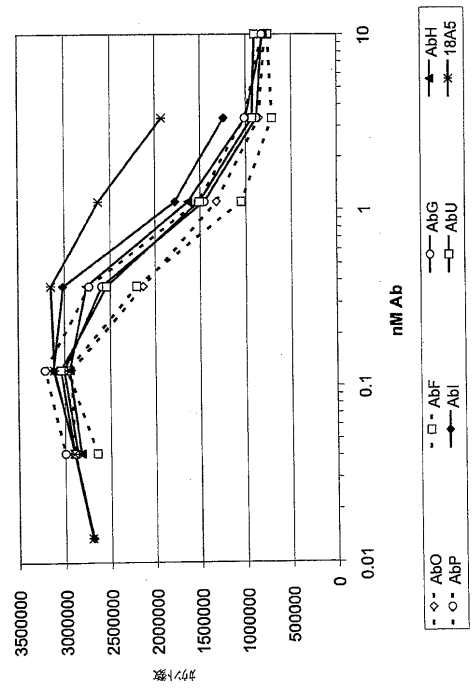


図 5b

【図５ｃ】

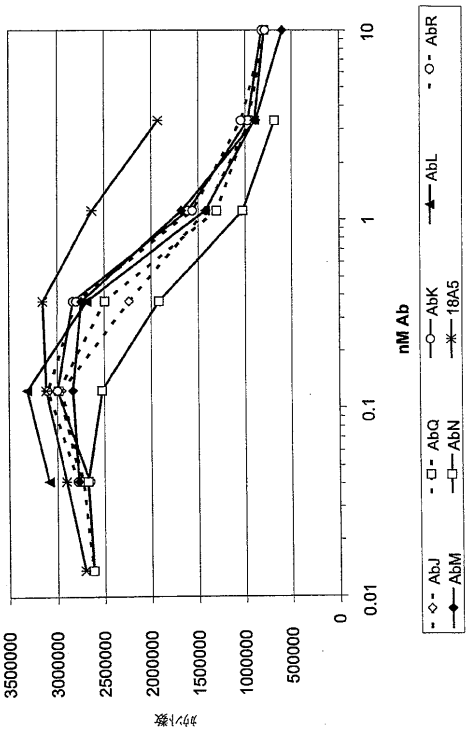


図5c

【図５ｄ】

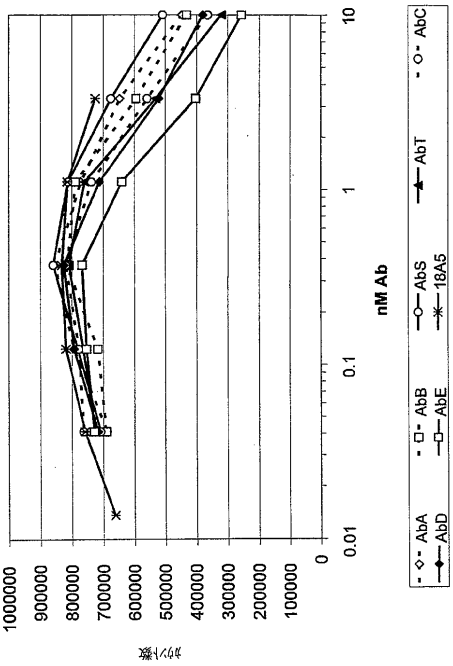


図5d

【図５ｅ】

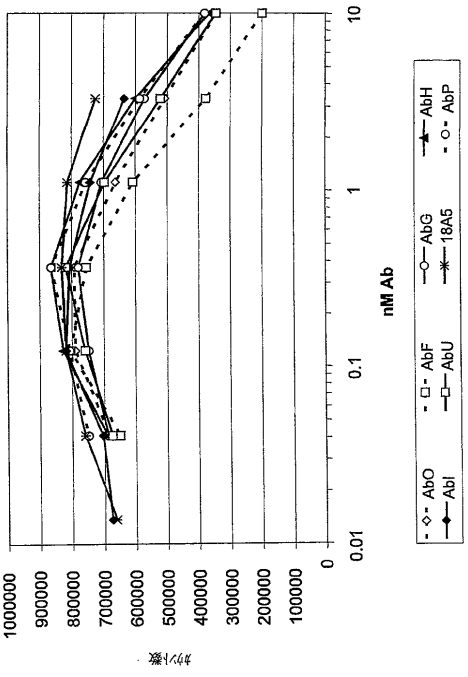


図5e

【図５ｆ】

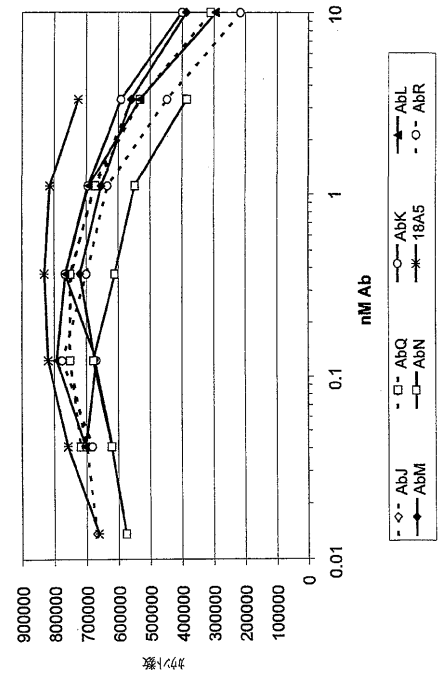
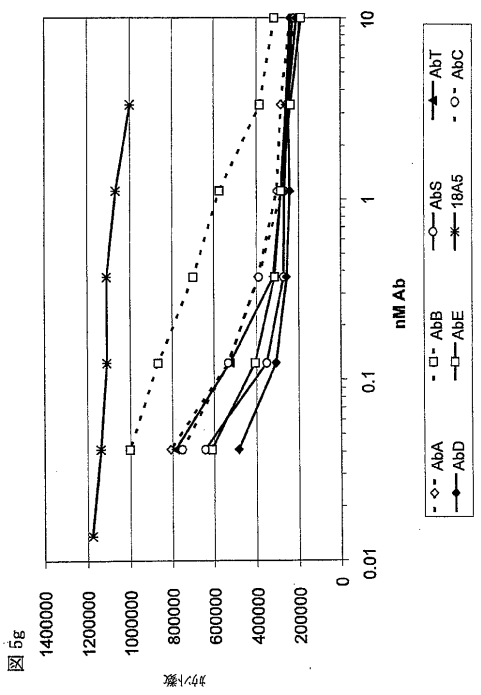
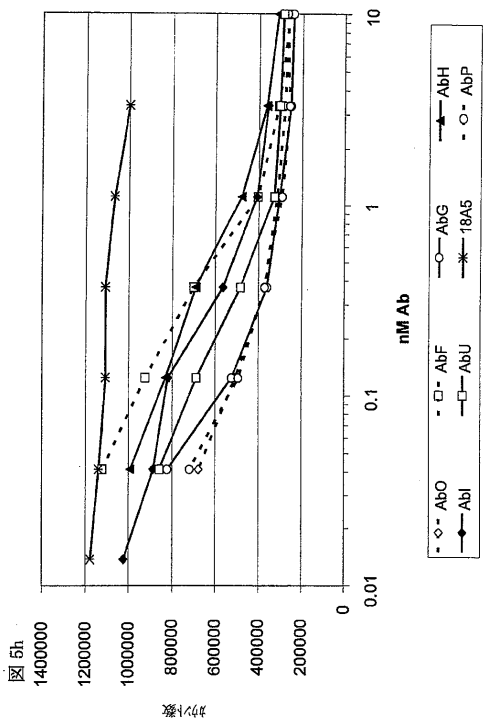


図5f

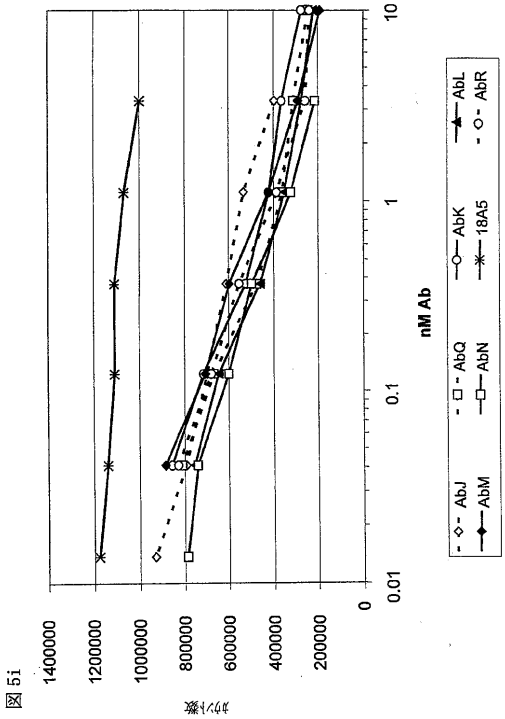
【図５ｇ】



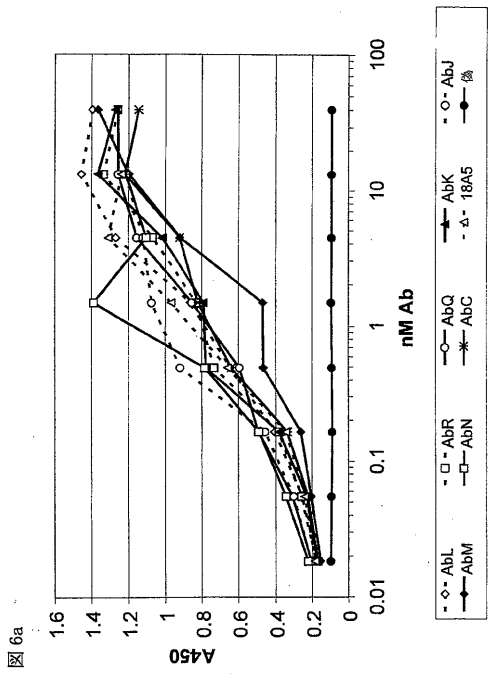
【図５ｈ】



【図５ｉ】



【図６ａ】



【図６ｂ】

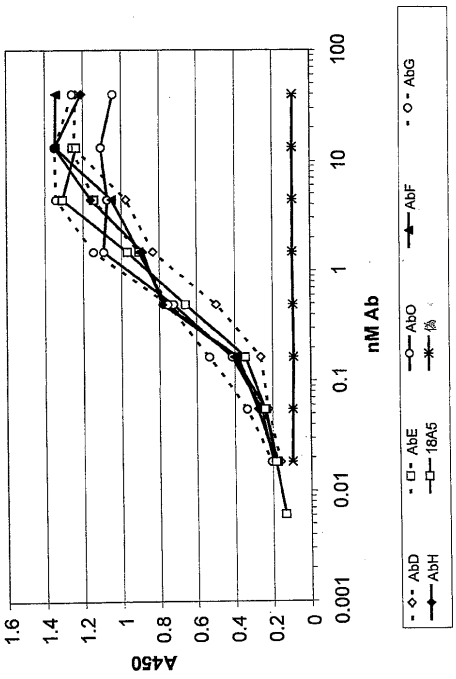


図6b

【図６ｃ】

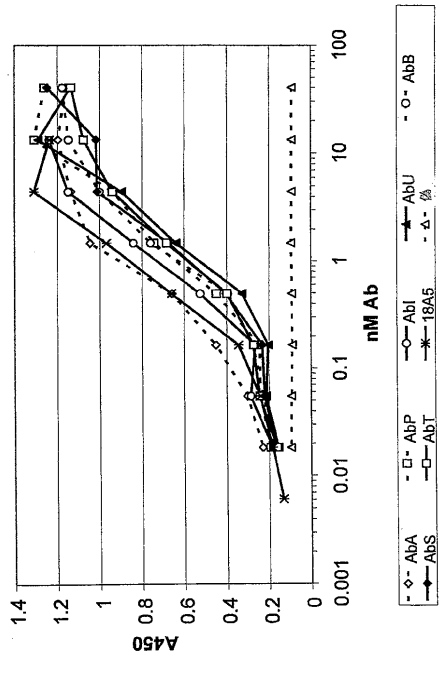


図6c

【図６ｄ】

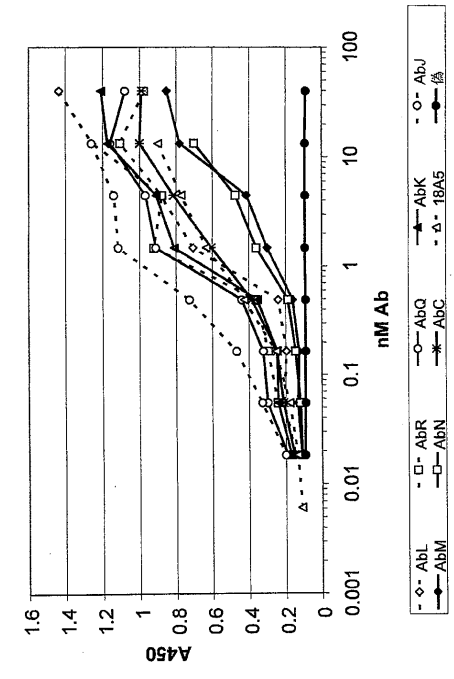


図6d

【図６ｅ】

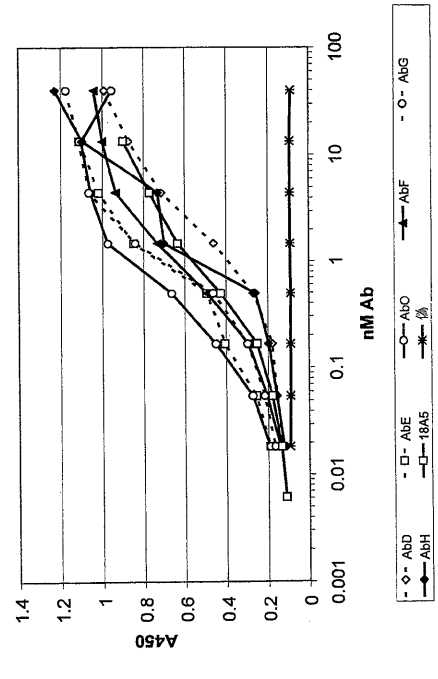


図6e

【図６ｆ】

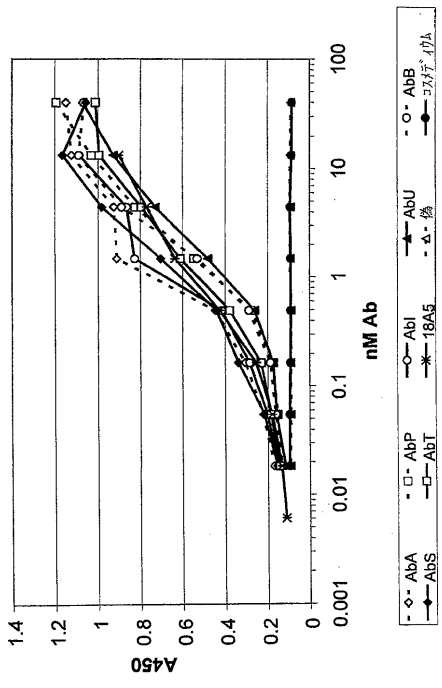


図6f

【図６ｇ】

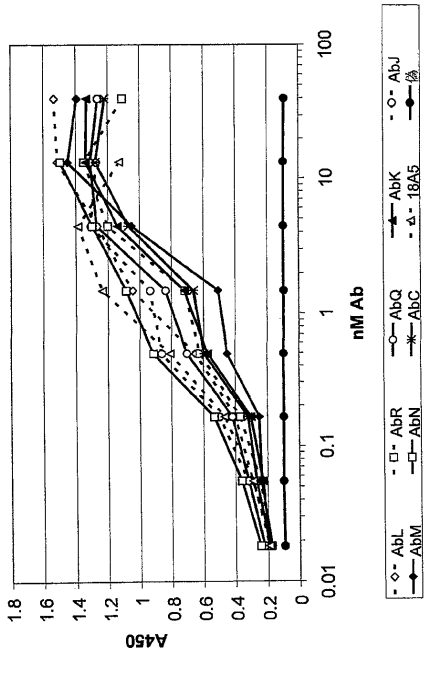


図6g

【図６ｈ】

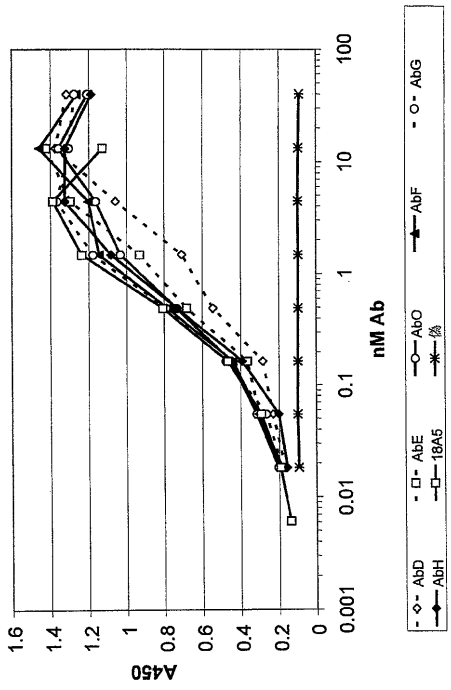


図6h

【図６ｉ】

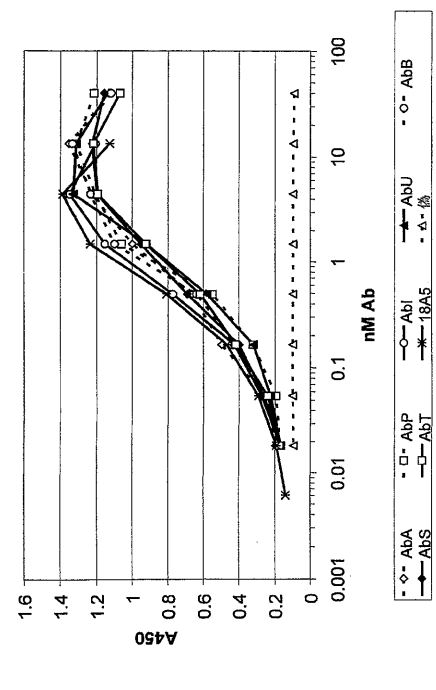


図6i

【図６ｊ】

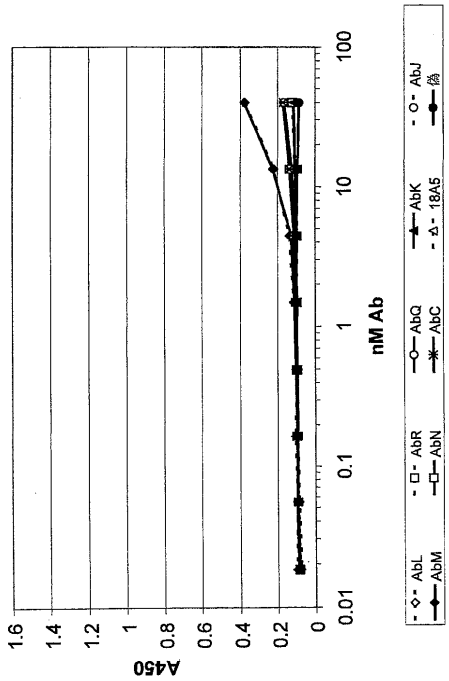


図 6j

【図６ｋ】

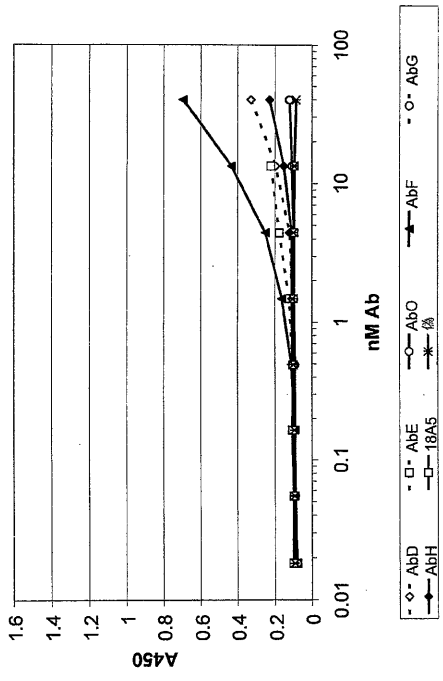


図 6k

【図６ｌ】

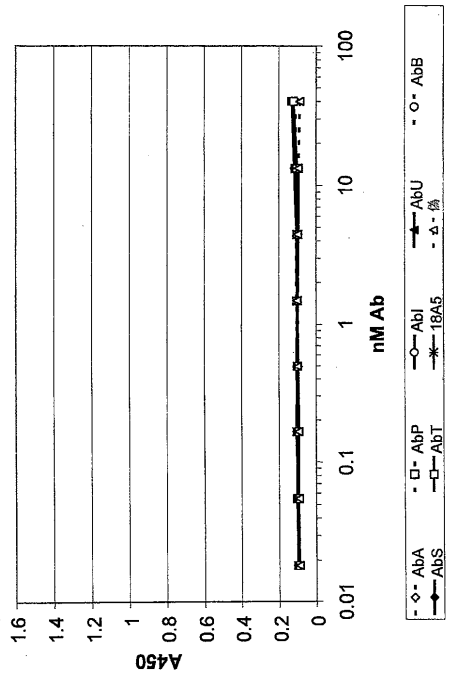
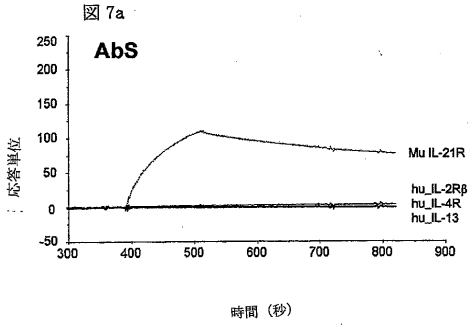


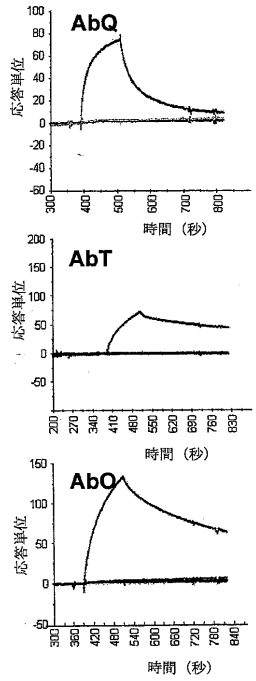
図 6l

【図７ａ】



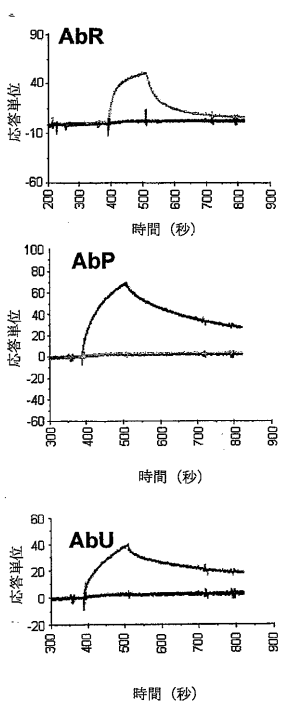
【図７ｂ】

図 7b



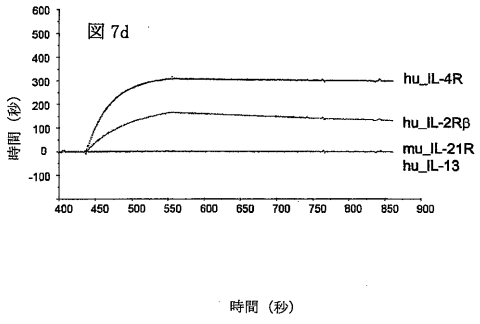
【図７ｃ】

図 7c



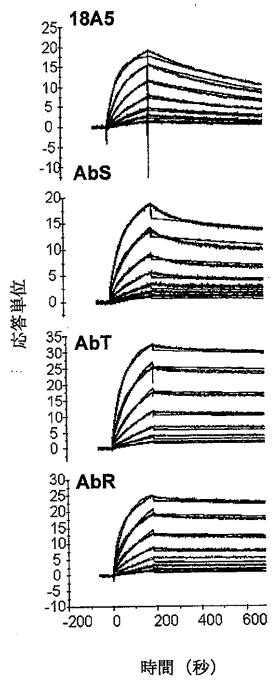
【図７ｄ】

図 7d



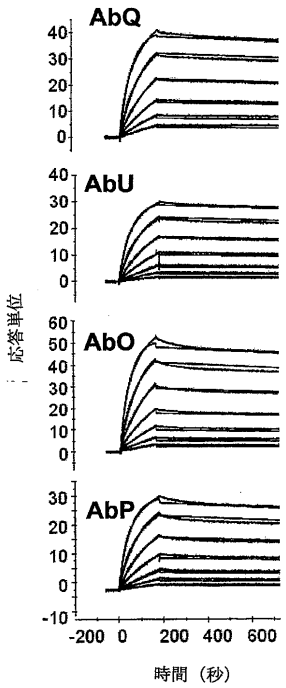
【図８ａ】

図 8a



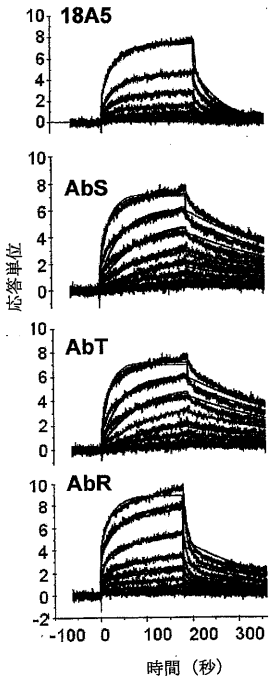
【図８ｂ】

図 8b



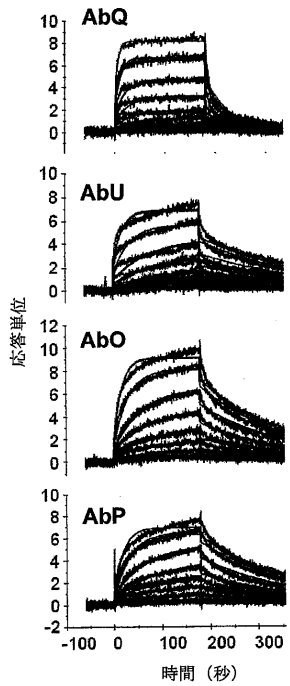
【図８ｃ】

図 8c



【図８ｄ】

図 8d



【図９ａ】

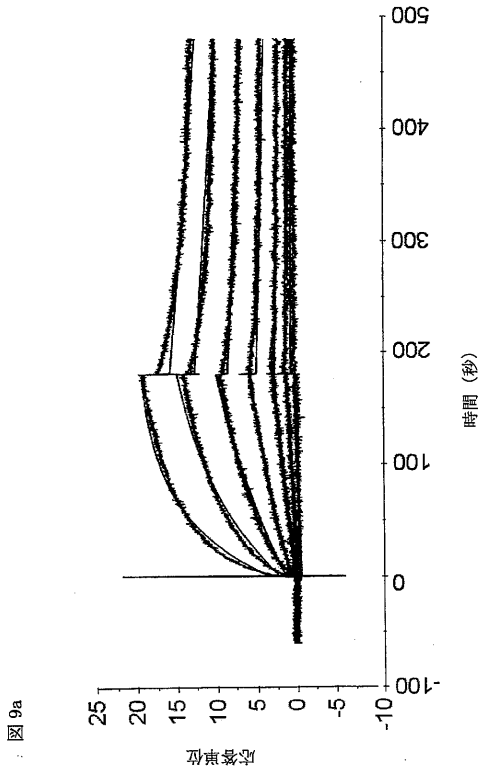


図 9a

【図９ｂ】

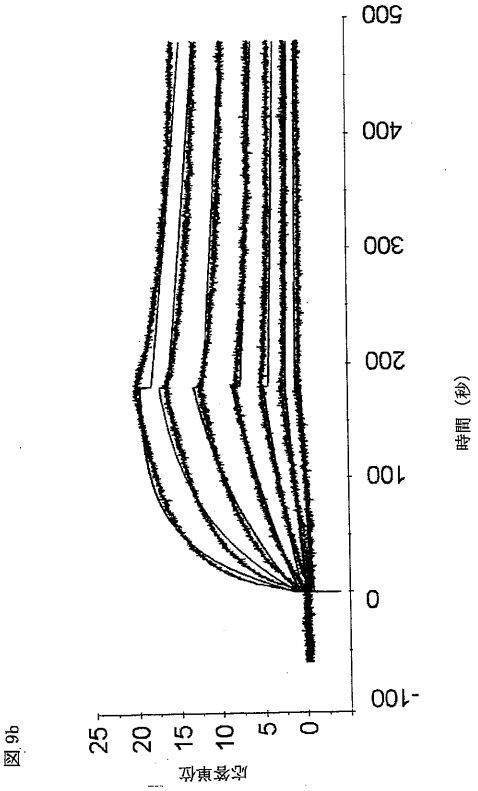


図 9b

【図９ｃ】

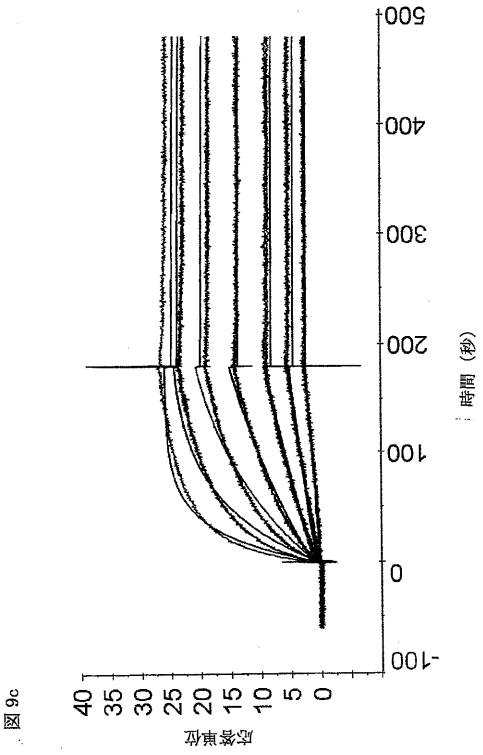


図 9c

【図９ｄ】

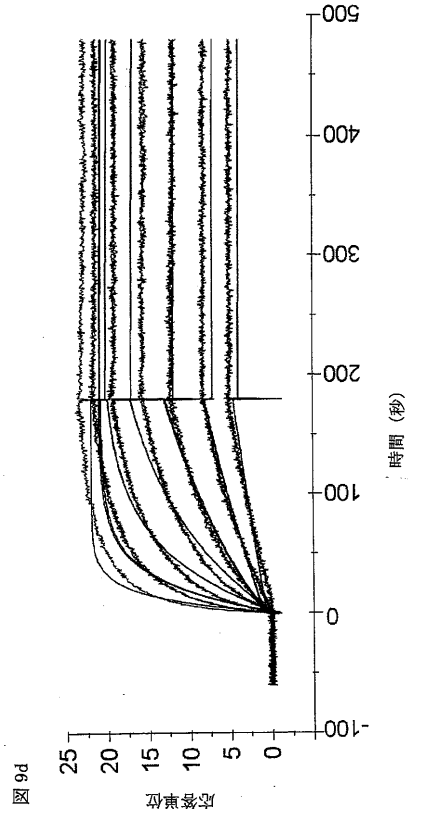


図 9d

【図１０ａ】

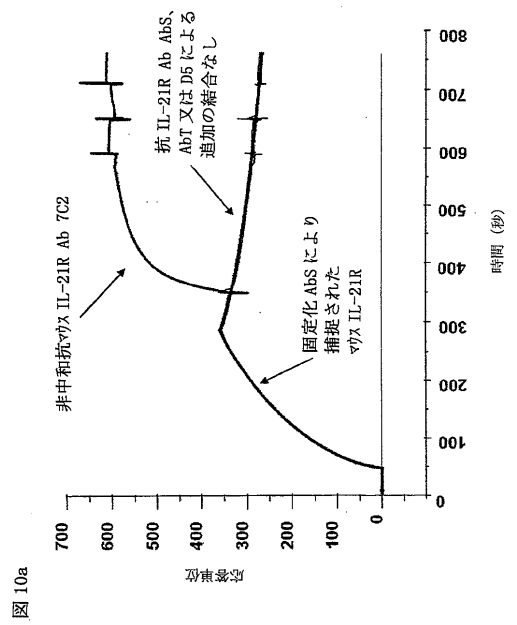


図 10a

【図１０ｂ】

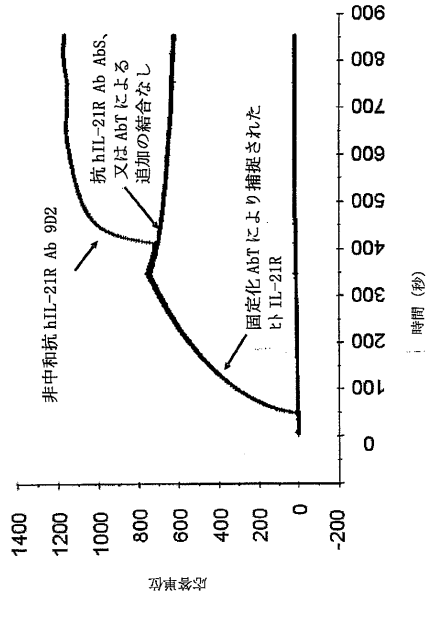


図 10b

【図１１ａ】

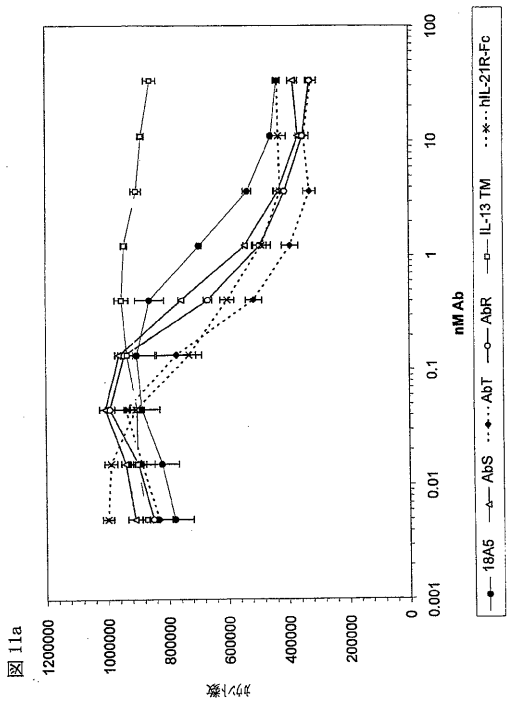


図 11a

【図１１ｂ】

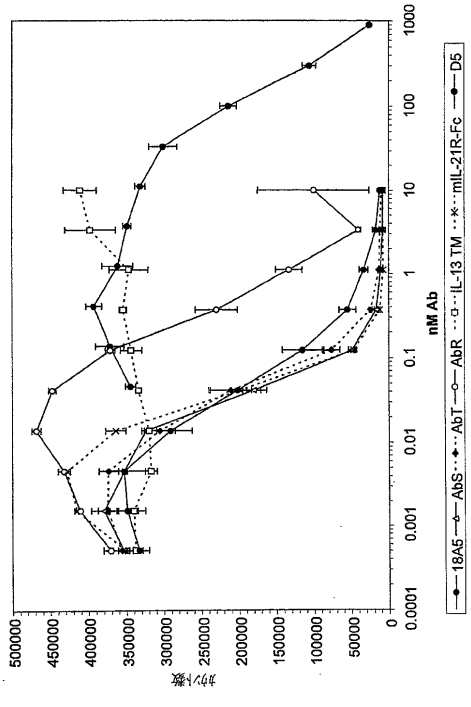


図 11b

【図１１ｃ】

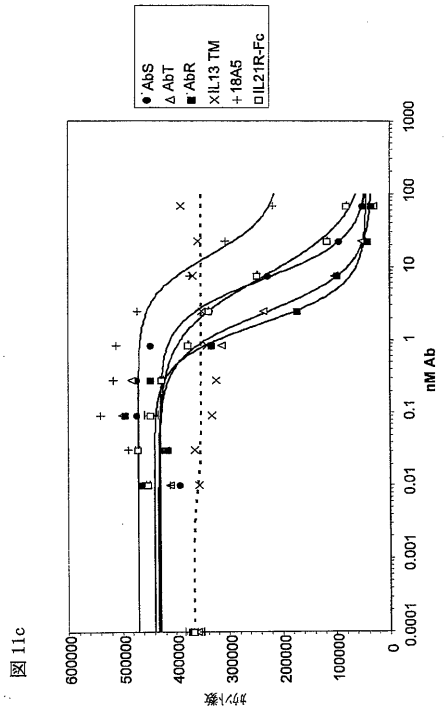


図 11c

【図１２ａ】

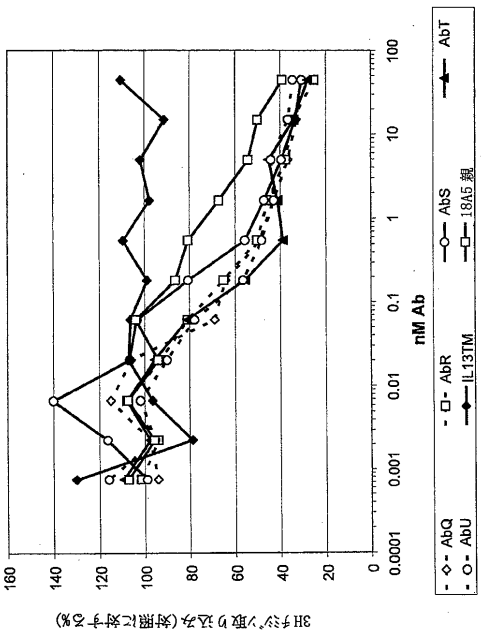


図 12a

【図１２ｂ】

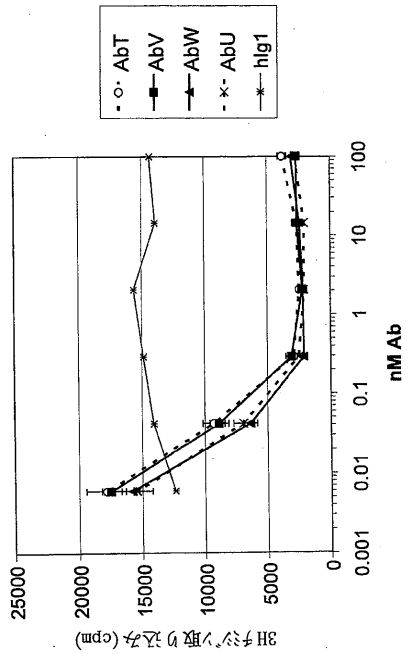


図 12b

【図１３】

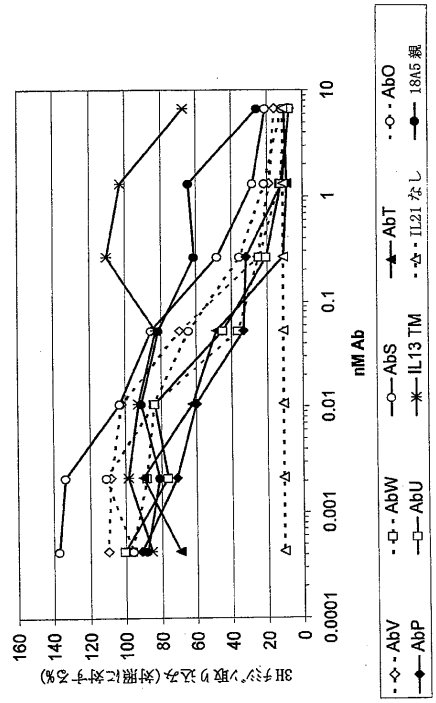


図 13

【図１４】

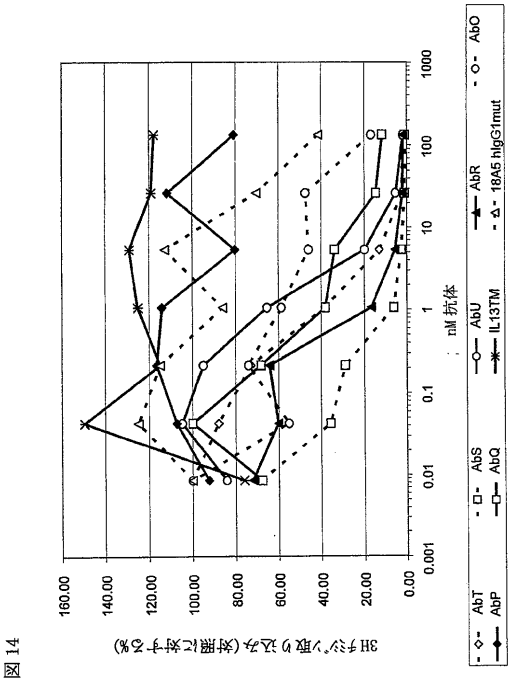


図 14

【図１５】

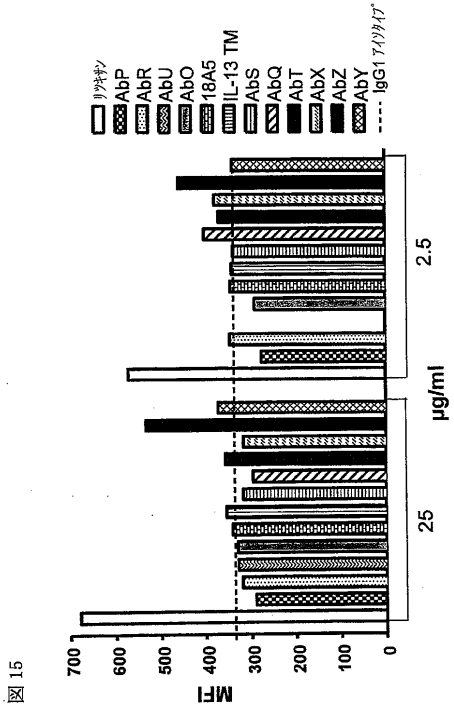


図 15

【図１６】

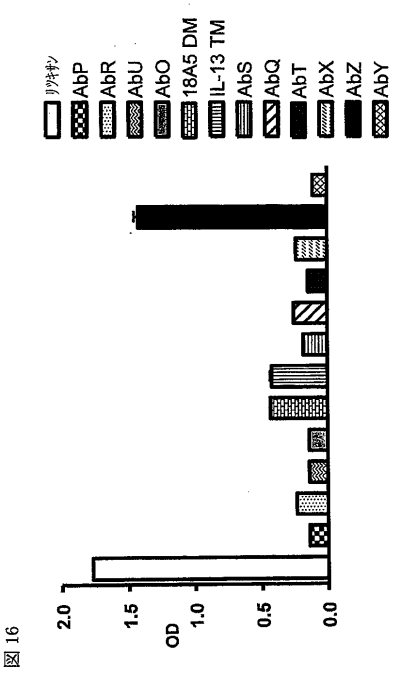


図 16

【図１７ａ】

図 17a

AbQ:

AbQ の重鎖(配列番号 213)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 165)。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、二重突然変異(L234A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 197)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbQ の軽鎖(配列番号 214)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 172)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 213 は AbQ の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図１７ｂ】

図 17b

配列番号 14 は完全長重鎖の V_H 部分である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である:

FMGFGRPEY

配列番号 197 は重鎖定常領域であり、二重突然変異(L234A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglysls svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpapealgapsvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 214 は AbQ の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図１７ｃ】

図 17c

配列番号 215 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

配列番号 172 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

VARSVVGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図１８ａ】

図 18a

AbR:

AbR の重鎖(配列番号 213)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 165)。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、二重突然変異(L234A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 197)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapsskstsg*
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbR の軽鎖(配列番号 216)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 187)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSV
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 213 は AbR の完全長重鎖である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapsskstsg*
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図１８ｂ】

図 18b

配列番号 14 は完全長重鎖の V_H 部分である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である：

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である：

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である：

FMGFGRPEY

配列番号 197 は重鎖定常領域であり、二重突然変異(L234A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている：

astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpapealgapsvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 216 は AbR の完全長軽鎖である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSV
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図１８ｃ】

図 18c

配列番号 217 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSV
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

配列番号 187 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

VTRSVKGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図１９ａ】

図 19a

AbW:

AbW の重鎖(配列番号 218)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 165)。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 196)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbW の軽鎖(配列番号 216)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 187)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSV
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 218 は AbW の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図１９ｂ】

図 19b

配列番号 14 は完全長重鎖の V_H 部分である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である:

FMGFGRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpapeaagapsvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflysktvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 216 は AbW の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSV
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図１９ｃ】

図 19c

配列番号 217 は完全長軽鎖の V_L 部分である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSV
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である:

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 187 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である:

VTRSVKGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である:

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図２０ａ】

図 20a

AbS:

AbS の重鎖(配列番号 219)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 169)。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 196)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbS の軽鎖(配列番号 220)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 176)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCMSRSI
WGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 219 は AbS の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図２０ｂ】

図 20b

配列番号 6 は完全長重鎖の V_H 部分である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である：

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である：

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である：

GGGISRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾟｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている：

*astkgpsvfplapssksts*ggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpape**aa**g**a**psvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 220 は AbS の完全長軽鎖である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCMSRSI
WGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図２０ｃ】

図 20c

配列番号 221 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCMSRSI
WGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

配列番号 176 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

MSRSIWGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図２１ａ】

図 21a

AbT:

AbT の重鎖(配列番号 219)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 169)。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾟｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 196)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIS**SGYYWG**WIRQPPGKGL
EWIG**SISHTGNTYYNPPLKS**RVTISVDTS**KNQFSLKLSSVTAADTA**
VYYCAR**GGGISRPEYWGQGTLVTVSS***astkgpsvfplapssksts*g
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslss
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbT の軽鎖(配列番号 222)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 178)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRTYYAS**WYQQKPGQAPVLV
IY**GKHKRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**VARSN**
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 219 は AbT の完全長重鎖である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapssksts*g
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslss
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreegynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図２１ｂ】

図 21b

配列番号 6 は完全長重鎖の V_H 部分である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である：

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である：

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である：

GGGISRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾟｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている：

*astkgpsvfplapssksts*ggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpape**aa**g**a**psvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 222 は AbT の完全長軽鎖である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSN
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図２１ｃ】

図 21c

配列番号 223 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSN
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

配列番号 178 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

VARSNKGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図２２ａ】

図 22a

AbO:

AbO の重鎖（配列番号 219）、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている（それぞれ、配列番号 163、164 及び 169）。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異（L234A L235A G237A）はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている（配列番号 196）。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapssksts*g
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbO の軽鎖（配列番号 224）、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている（それぞれ、配列番号 194、195 及び 185）。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている（配列番号 198）。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 219 は AbO の完全長重鎖である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapssksts*g
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図２２ｂ】

図 22b

配列番号 6 は完全長重鎖の V_H 部分である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である：

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である：

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である：

GGGISRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異（L234A L235A G237A）はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている：

*astkgpsvfplapssksts*g*gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal*
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
*kvdkkvepkscdkthtcppcpape**aa**g**a**psvflfppkpkdtlmisr*
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 224 は AbO の完全長軽鎖である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図２２ｃ】

図 22c

配列番号 225 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVTRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

配列番号 185 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

VTRSAKGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図２３ａ】

図 23a

AbP:

AbP の重鎖(配列番号 219)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 169)。重鎖定常領域はｲｸﾞﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 196)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbP の軽鎖(配列番号 226)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 189)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲｸﾞﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVSRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 219 は AbP の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図２３ｂ】

図 23b

配列番号 6 は完全長重鎖の V_H 部分である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である:

GGGISRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpapeaagapsvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 226 は AbP の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVSRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図２３ｃ】

図 23c

配列番号 227 は完全長軽鎖の V_L 部分である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVSRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である:

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 189 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である:

VSRSAKGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である:

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

【図２４ａ】

図 24a

AbU:

AbU の重鎖(配列番号 219)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 169)。重鎖定常領域はｲｸﾞﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 196)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

AbU の軽鎖(配列番号 228)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 193)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲｸﾞﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCTTRSN
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 219 は AbU の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図２４ｂ】

図 24b

配列番号 6 は完全長重鎖の V_H 部分である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である：

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である：

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である：

GGGISRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている：

*astkgpsvfplapssksts*ggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpape**aa**g**a**psvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 228 は AbU の完全長軽鎖である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCTTRSN
KGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs*

【図２４ｃ】

図 24c

配列番号 229 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCTTRSN
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

配列番号 193 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

TTRSNKGNPHVL

配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs*

【図２５ａ】

図 25a

AbV:

AbV の重鎖(配列番号 218)、CDR H1、H2 及び H3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 163、164 及び 165)。重鎖定常領域はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されており、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字で下線が引かれた文字列で示されている(配列番号 196)。

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapssksts*g
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
ssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreegynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkk

AbV の軽鎖(配列番号 214)、CDR L1、L2 及び L3 には下線が引かれている(それぞれ、配列番号 194、195 及び 172)。定常ﾗﾑﾀﾞ軽鎖配列はｲﾀﾘｯｸ体の小文字で示されている(配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 218 は AbV の完全長重鎖である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS*astkgpsvfplapssksts*g
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
ssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreegynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【図２５ｂ】

図 25b

配列番号 14 は完全長重鎖の V_H 部分である：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWIRQPPGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCARFMGFGRPEYWGQGTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H1 部分である：

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H2 部分である：

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V_H 部分の CDR H3 部分である：

FMGFGRPEY

配列番号 196 は重鎖定常領域であり、三重突然変異(L234A L235A G237A)はﾎﾞｰﾙﾄﾞ体小文字に下線が引かれた文字列で示されている：

*astkgpsvfplapssksts*ggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgal
tsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdkthtcppcpape**aa**g**a**psvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykt
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk

配列番号 214 は AbV の完全長軽鎖である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVL*gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvcl*
isdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylslt
peqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【図２５ｃ】

図 25c

配列番号 215 は完全長軽鎖の V_L 部分である：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L1 部分である：

QGDSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L2 部分である：

GKHKRPS

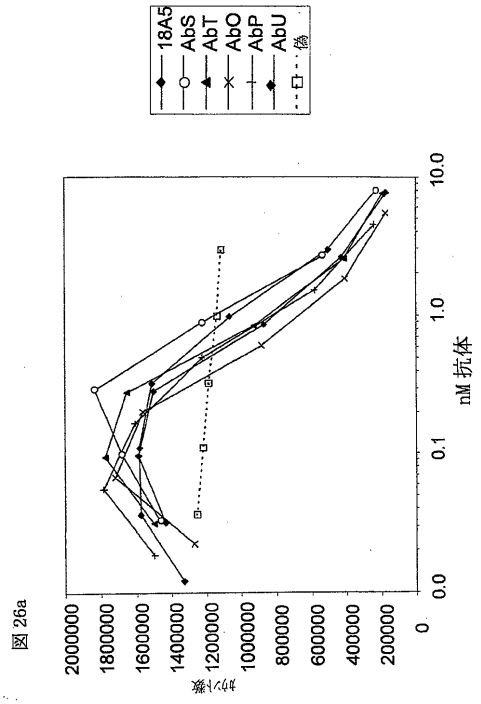
配列番号 172 は完全長軽鎖の V_L 部分の CDR L3 部分である：

VARSVVGNPHVL

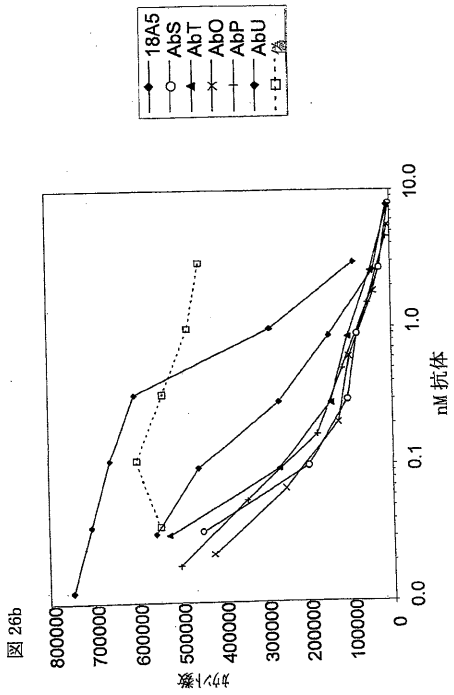
配列番号 198 はﾗﾑﾀﾞ軽鎖定常領域である：

gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkads
spvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqvthe
gstvektvaptecs

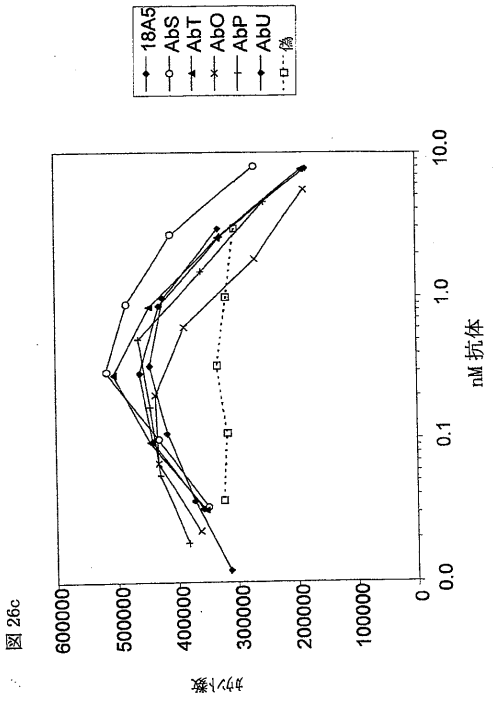
【図２６ａ】



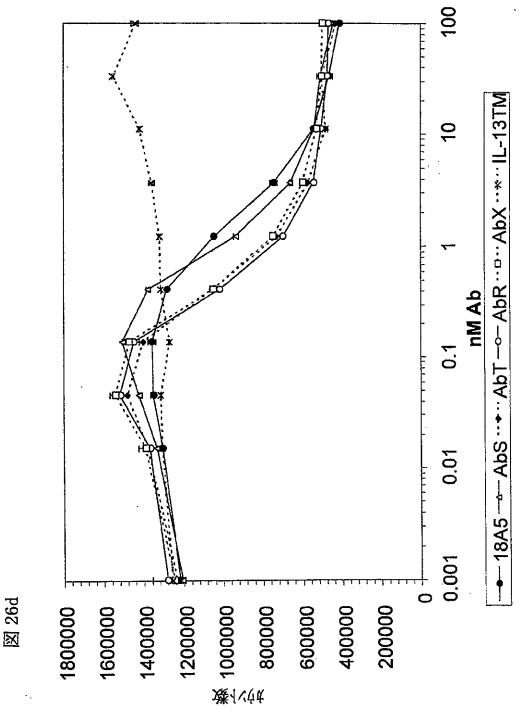
【図２６ｂ】



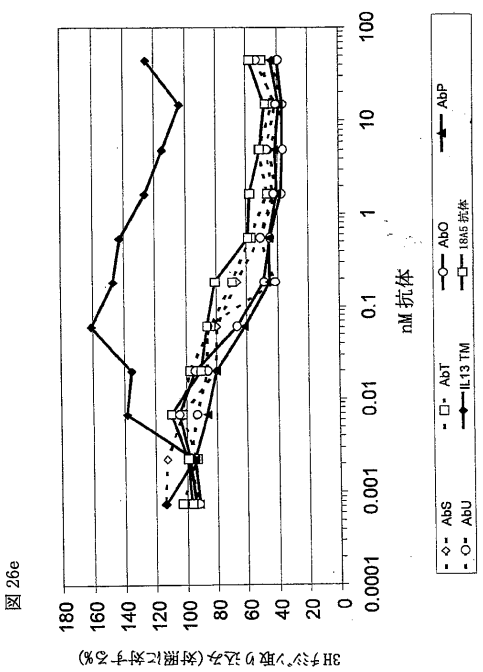
【図２６ｃ】



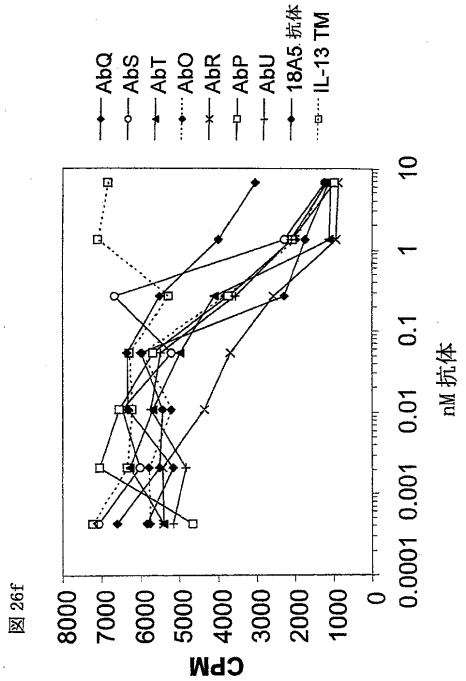
【図２６ｄ】



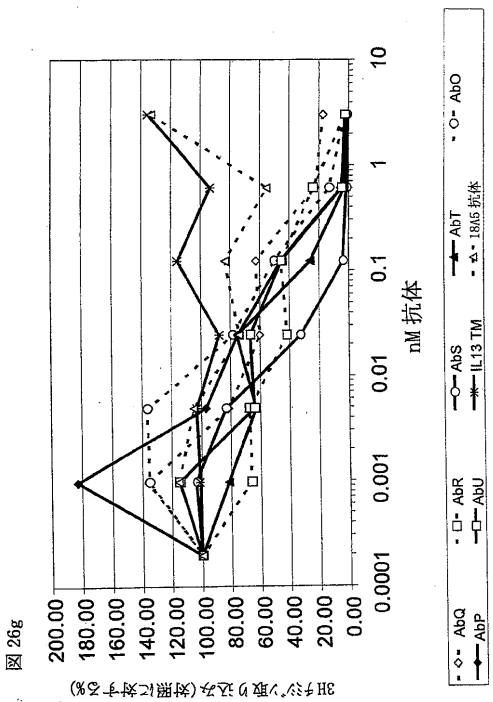
【図２６ｅ】



【図２６ｆ】



【図２６ｇ】



【図２７ａ】

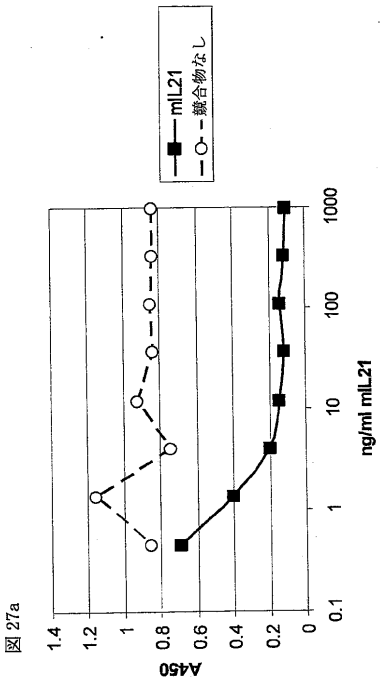


図 27a

【図２７ｂ】

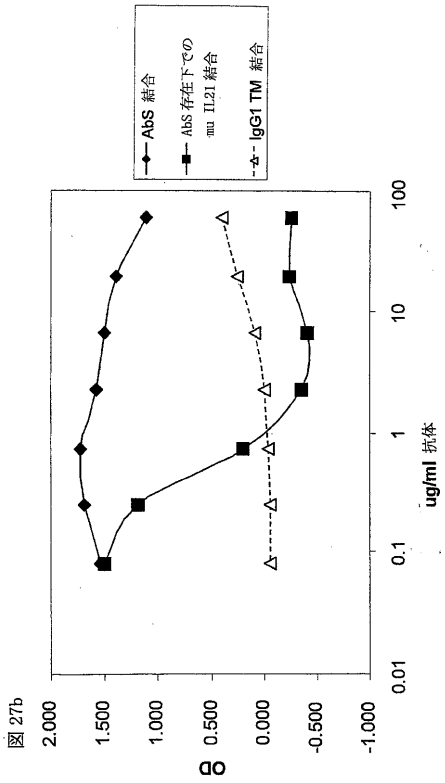


図 27b

【図２８】

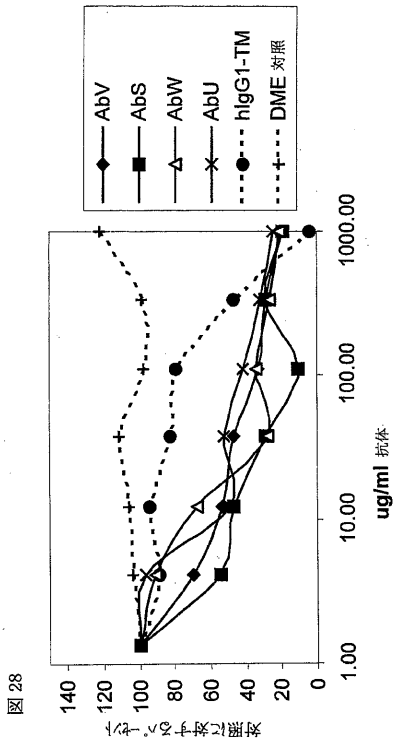


図 28

【図２９ａ】

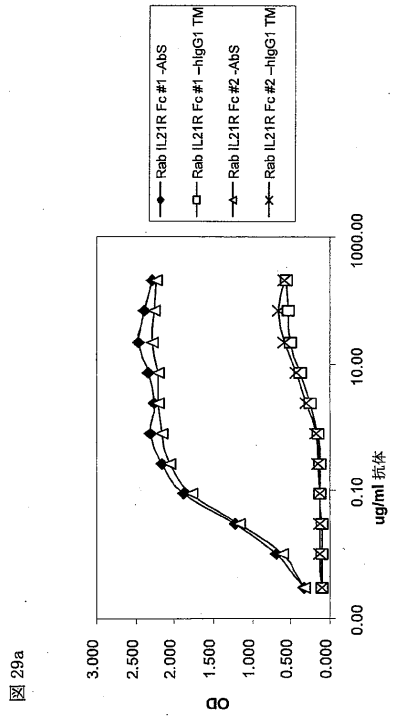
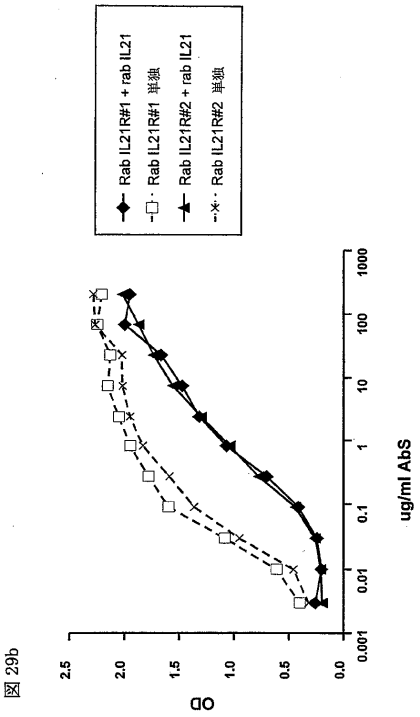
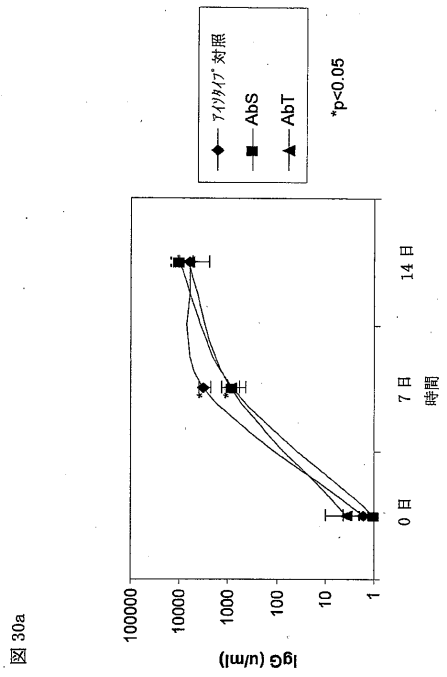


図 29a

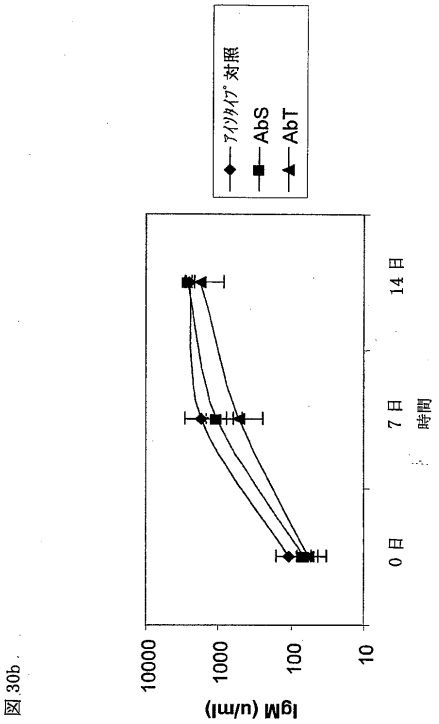
【図２９ｂ】



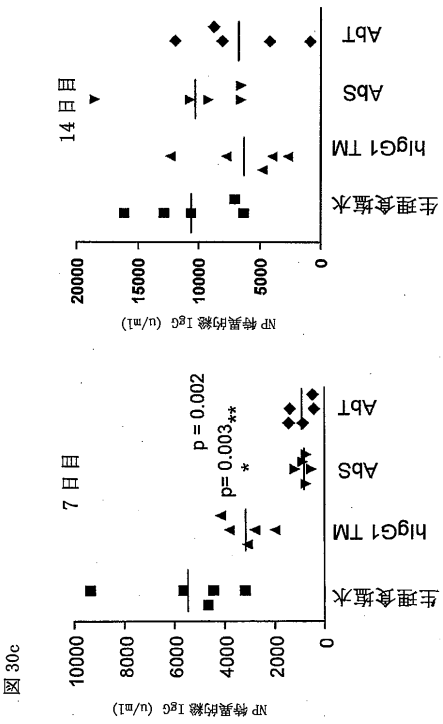
【図３０ａ】



【図３０ｂ】



【図３０ｃ】



【図３０ｄ】

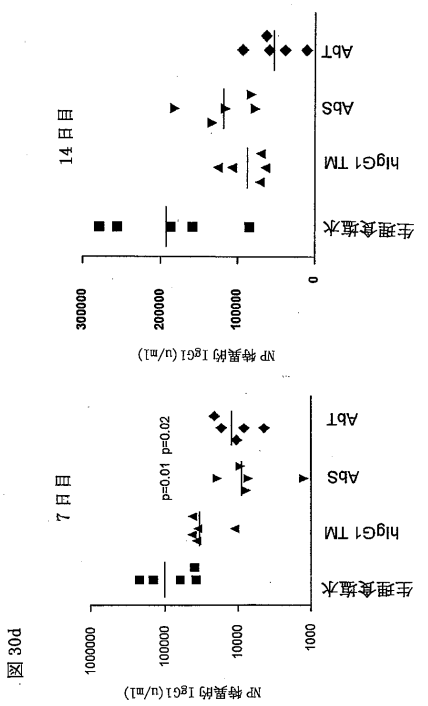


図30d

【図３０ｅ】

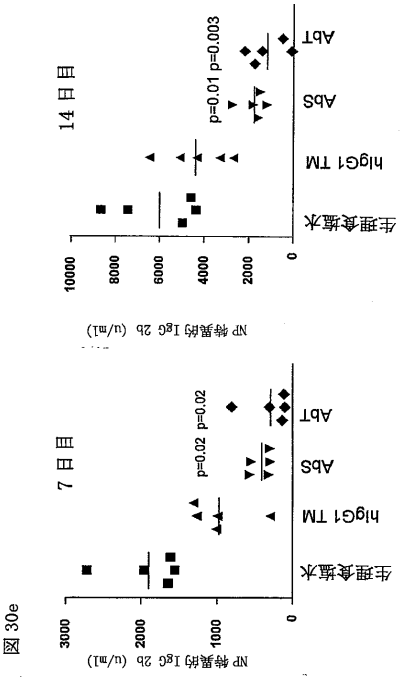


図30e

【図３０ｆ】

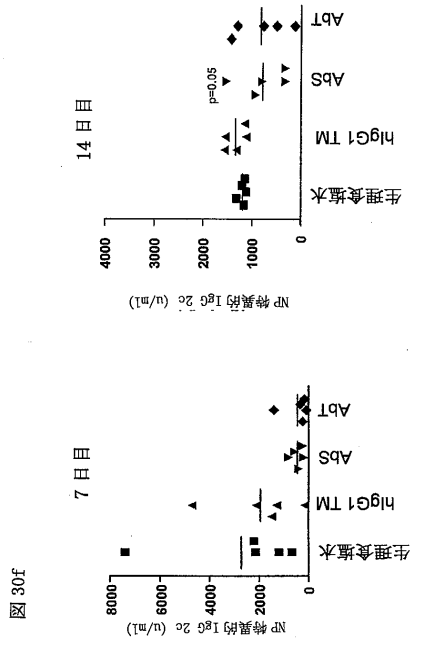


図30f

【図３０ｇ】

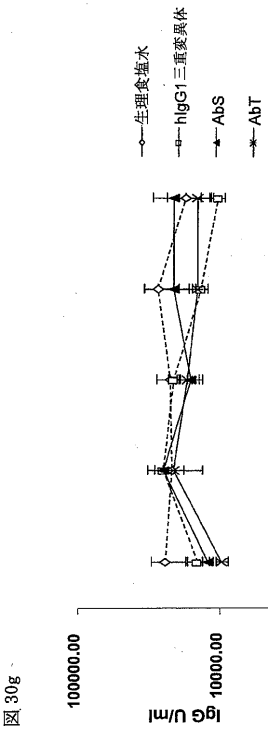


図30g

【図３０ｈ】

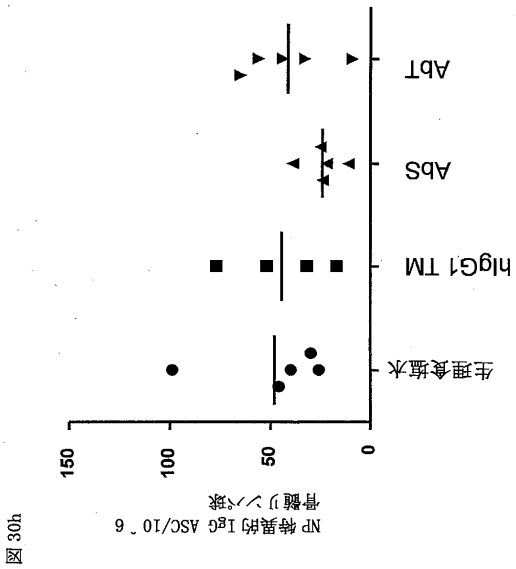


図 30h

【図３１ａ】

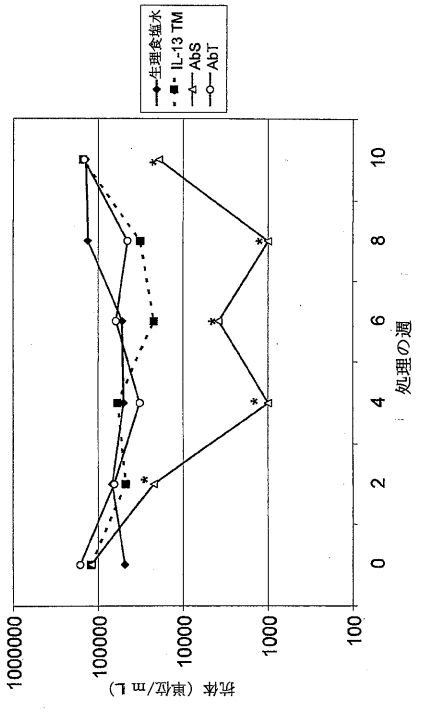


図 31a

【図３１ｂ】

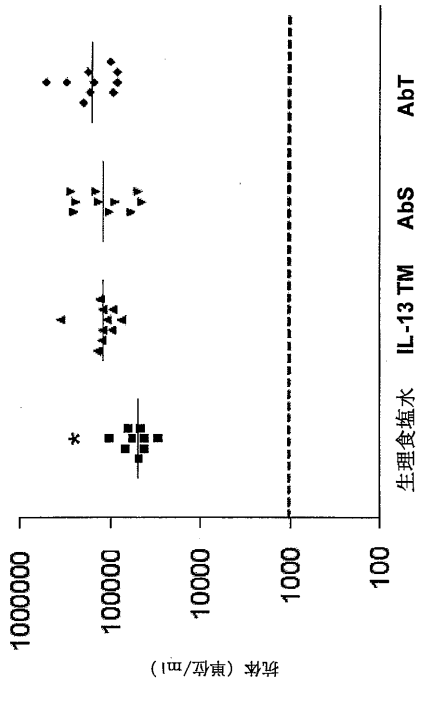
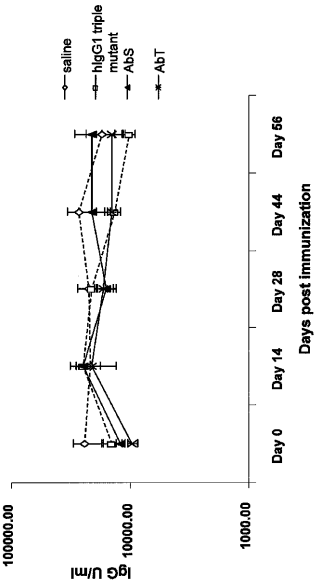


図 31b

Figure 30g



【図３１ｃ】

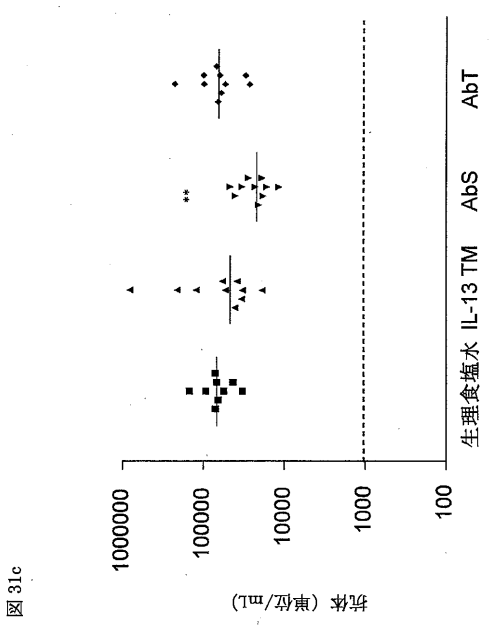


図 31c

【図３１ｄ】

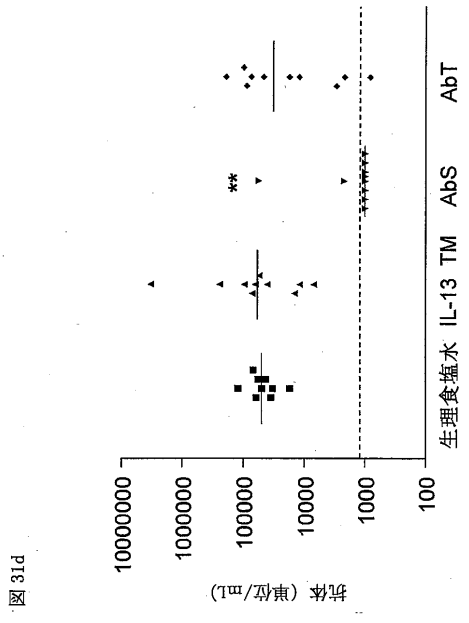


図 31d

【図３１ｅ】

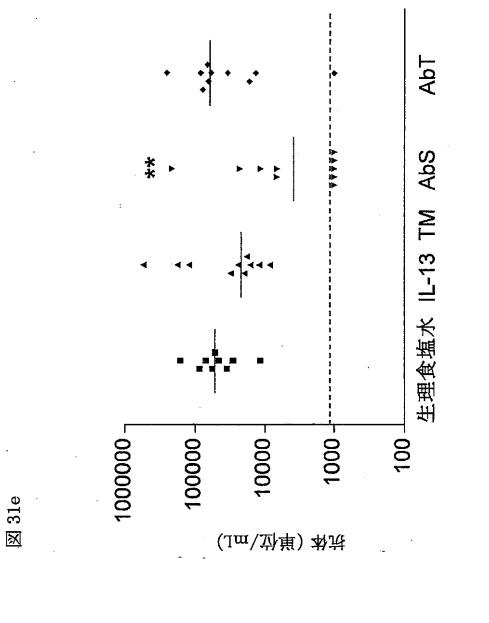


図 31e

【図３１ｆ】

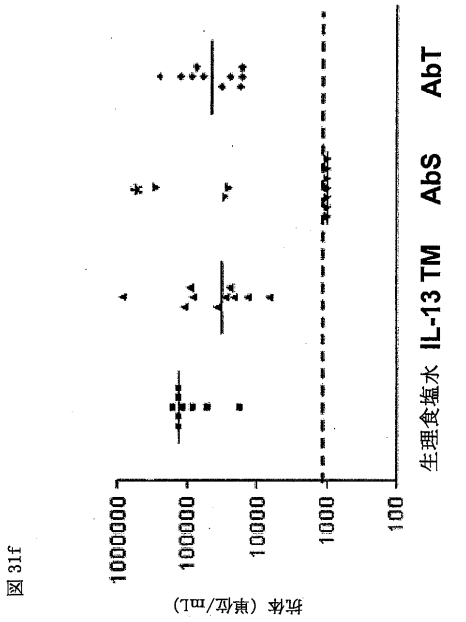
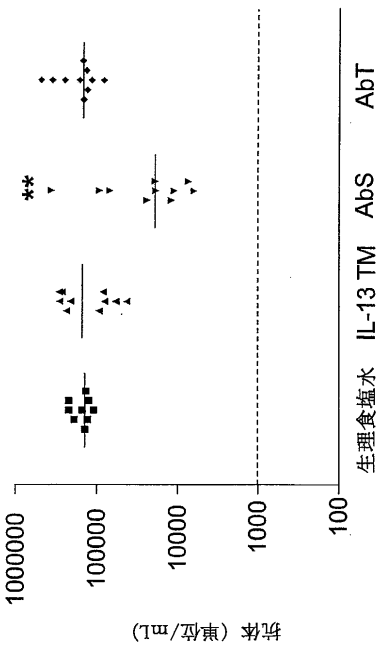
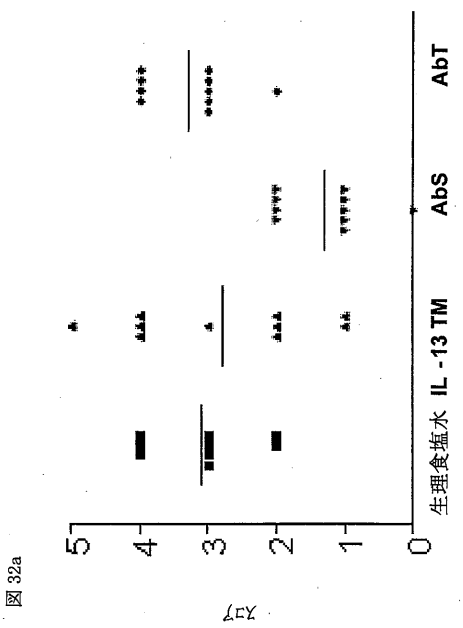


図 31f

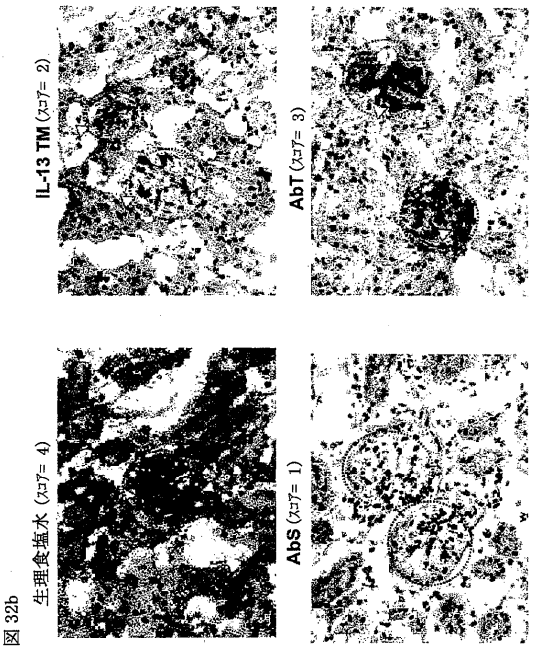
【図３１ｇ】



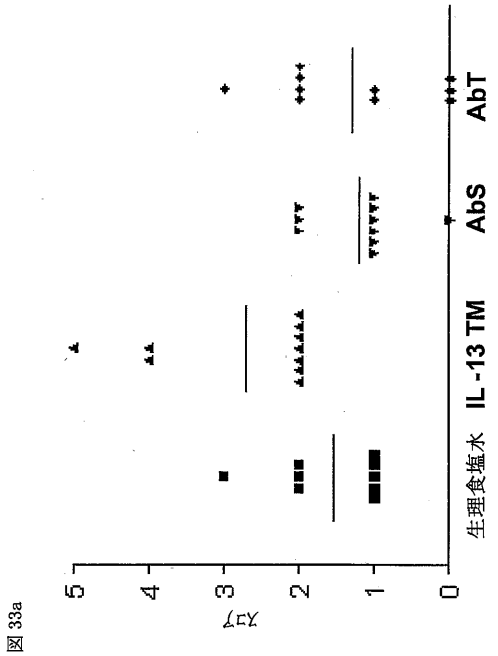
【図３２ａ】



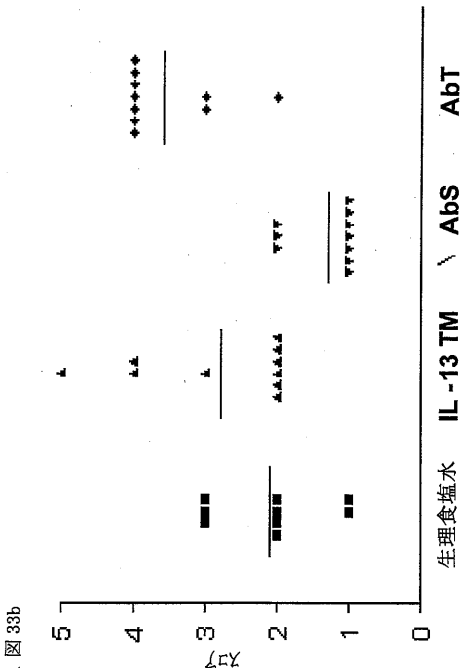
【図３２ｂ】



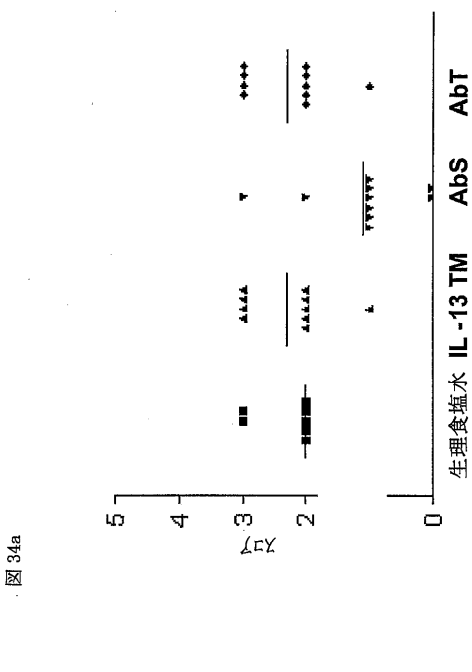
【図３３ａ】



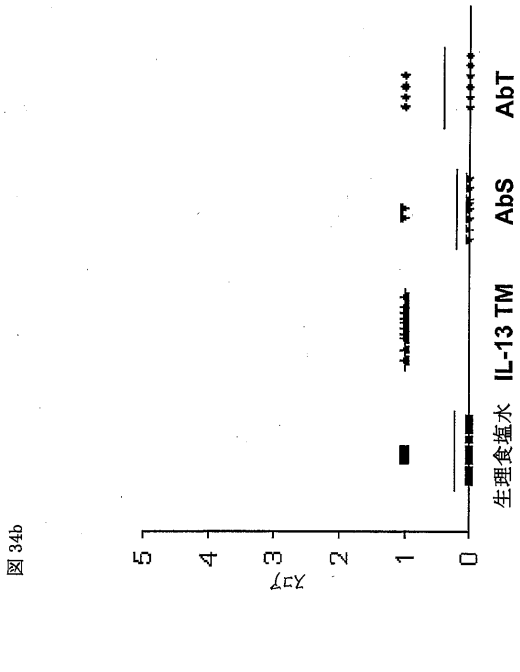
【図３３ｂ】



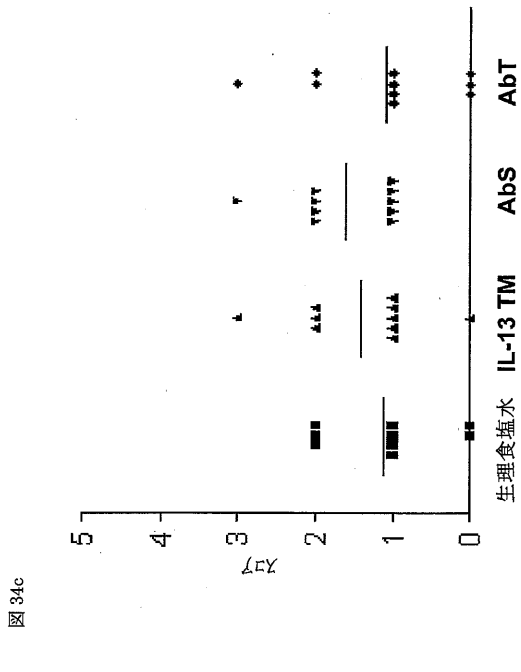
【図３４ａ】



【図３４ｂ】



【図３４ｃ】



【図３５ａ】

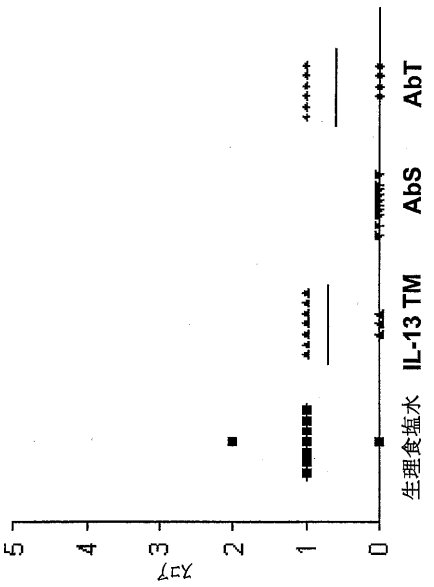


図35a

【図３５ｂ】

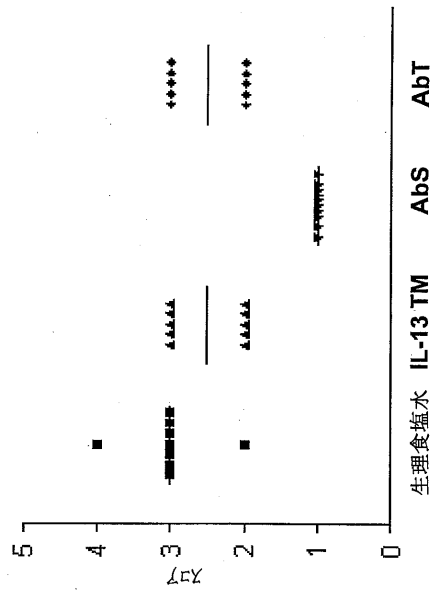


図35b

【図３５ｃ】

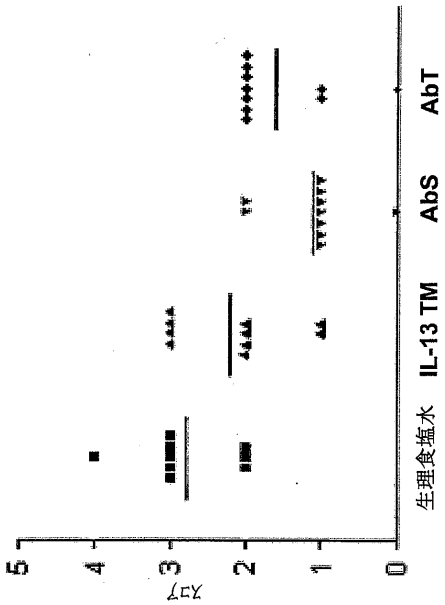


図35c

【図３６】

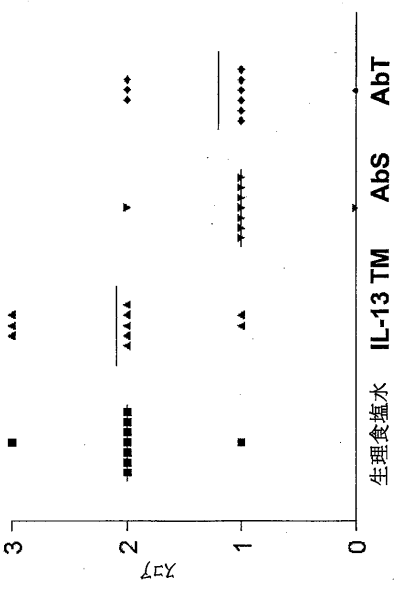


図36

【図３７ａ】

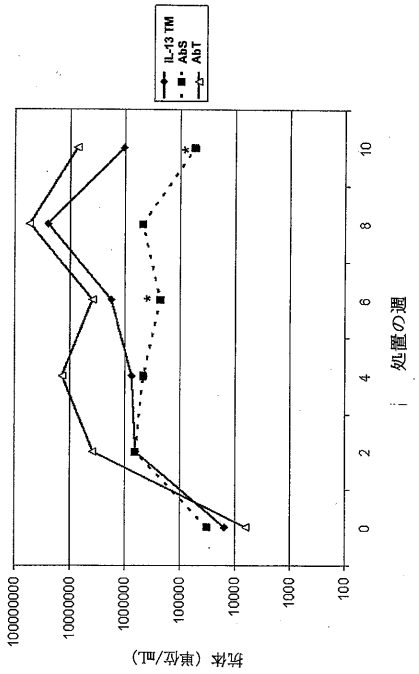


図 37a

【図３７ｂ】

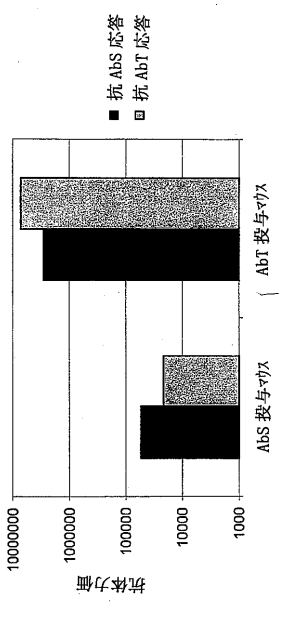


図 37b

【図３８ａ】

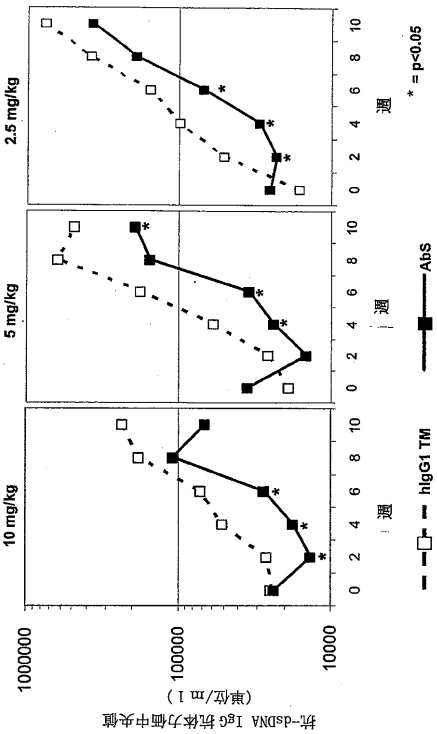


図 38a

【図３８ｂ】

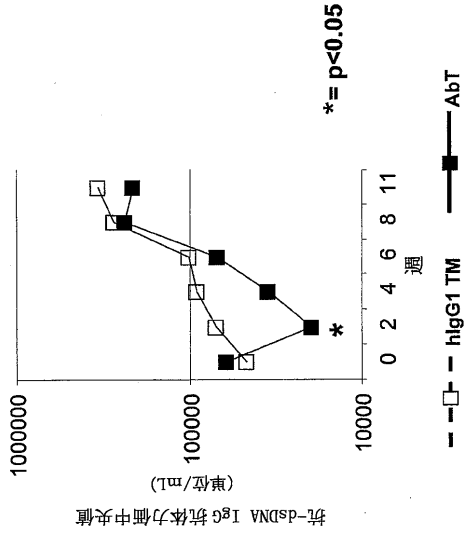


図 38b

【図３８ｃ】

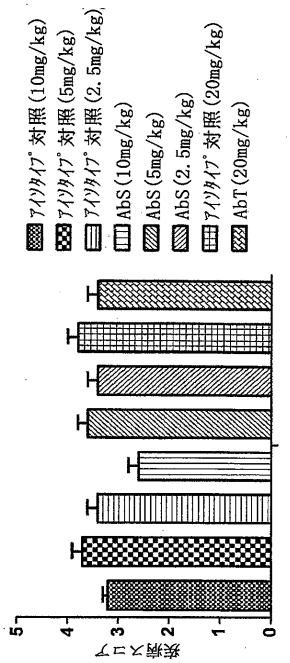


図 38c

【図３８ｄ】

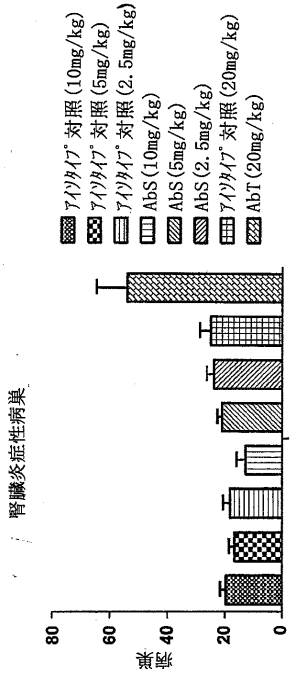


図 38d

【図３９ａ】

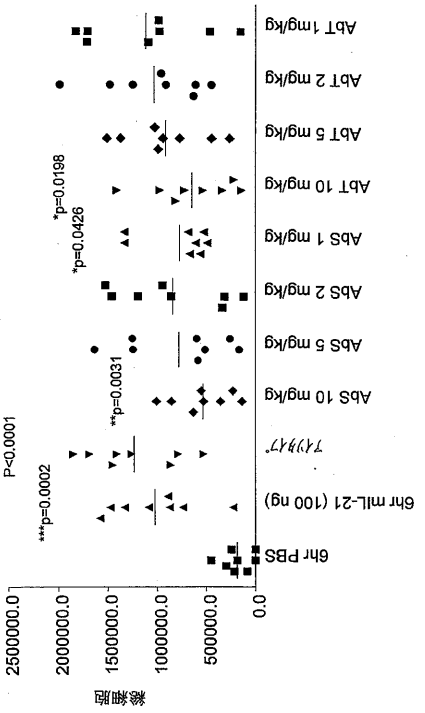


図 39a

【図３９ｂ】

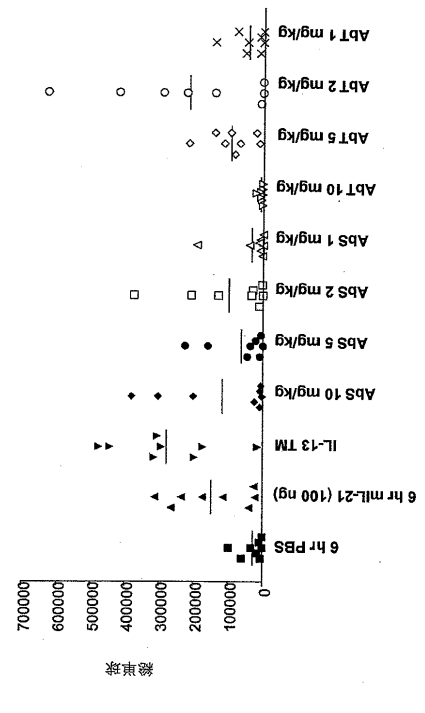


図 39b

【図３９ｃ】

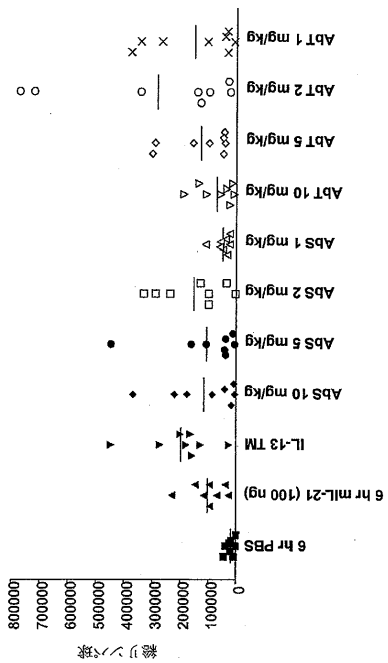


図 39c

【図３９ｄ】

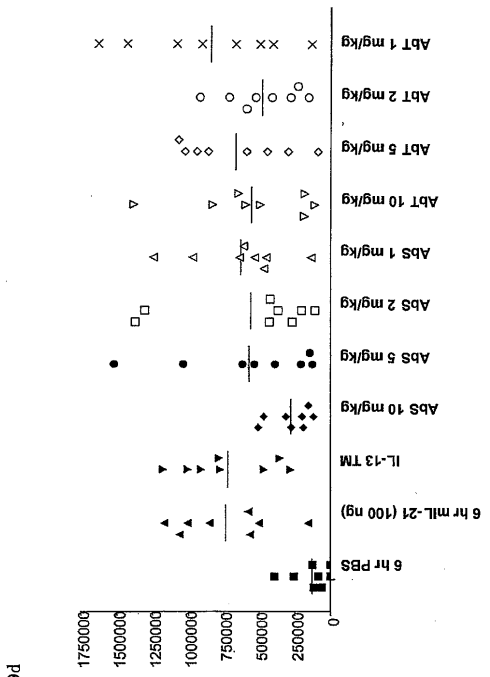


図 39d

【図３９ｅ】

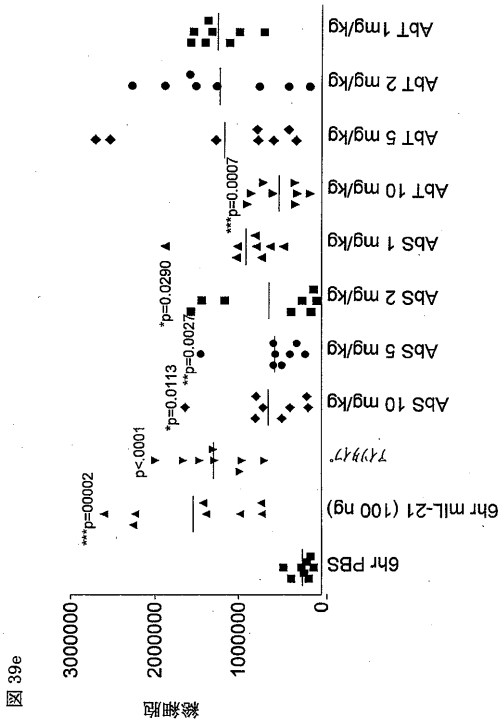


図 39e

【図３９ｆ】

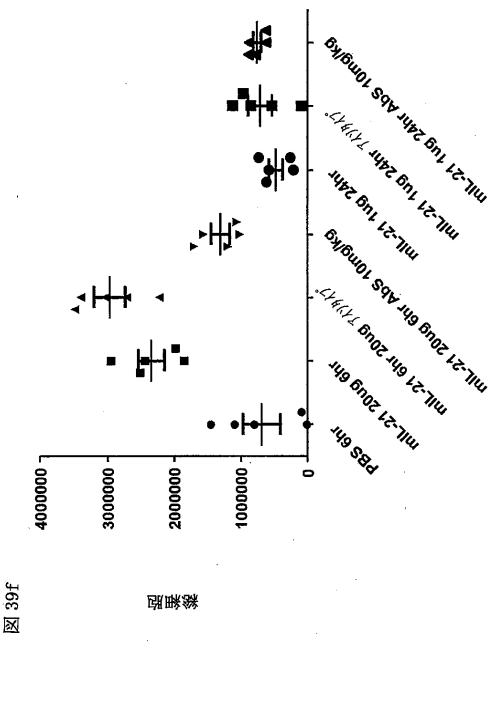


図 39f

【図３９ｇ】

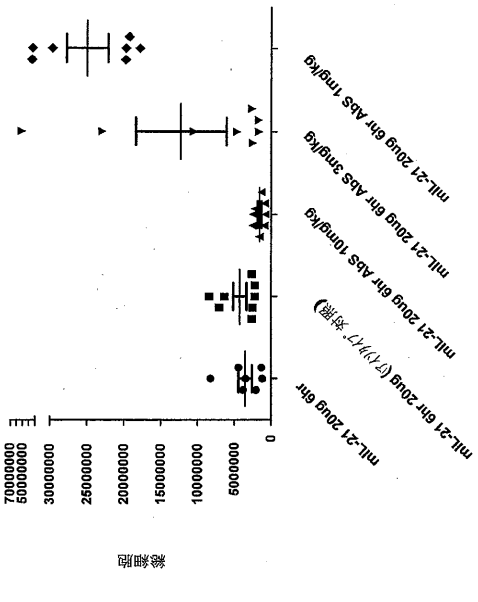


図 39g

【図３９ｈ】

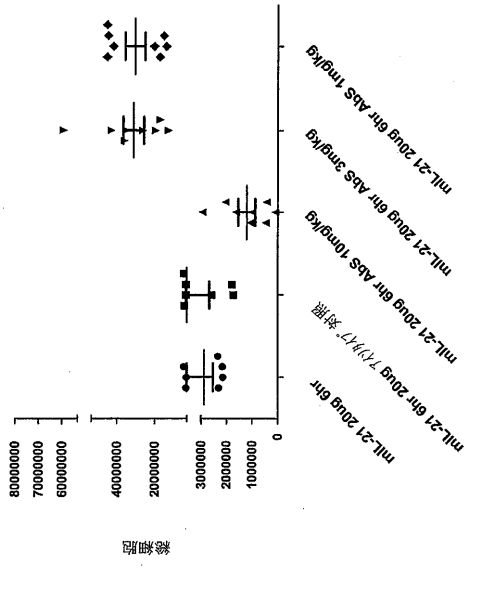


図 39h

【図３９ｉ】

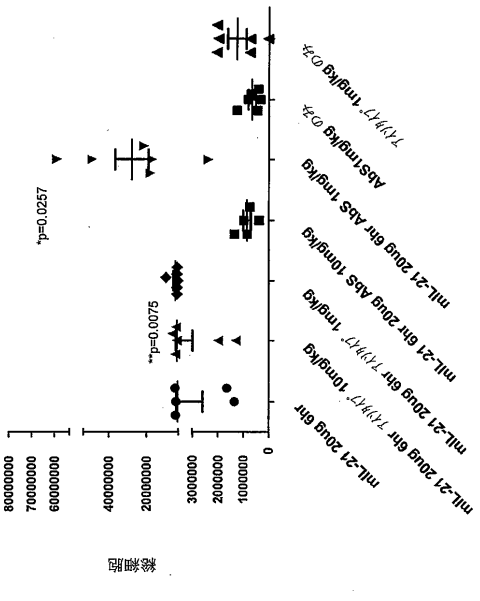


図 39i

【図３９ｊ】

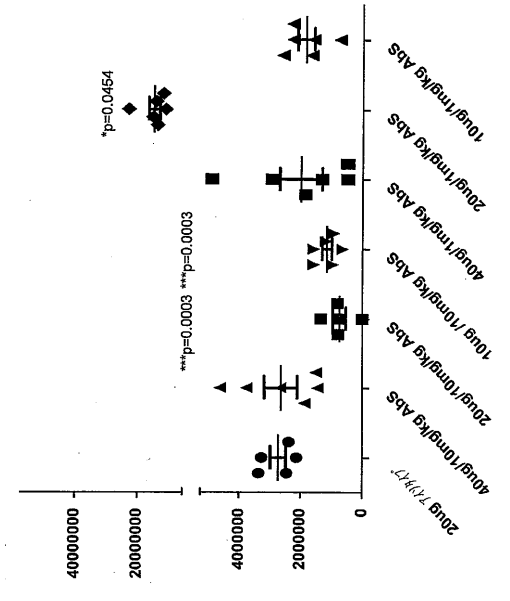


図 39j

【図４０】

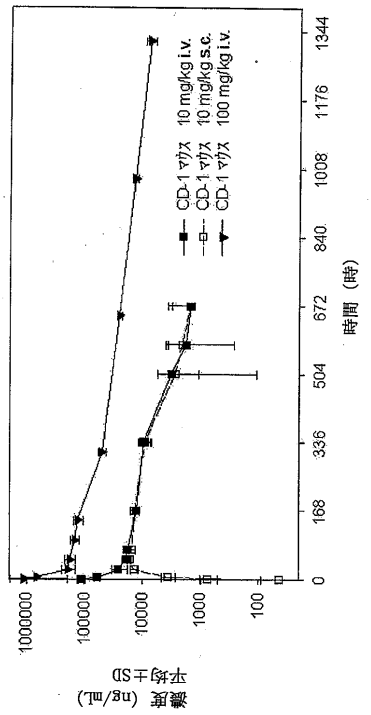


図 40

【図４１】

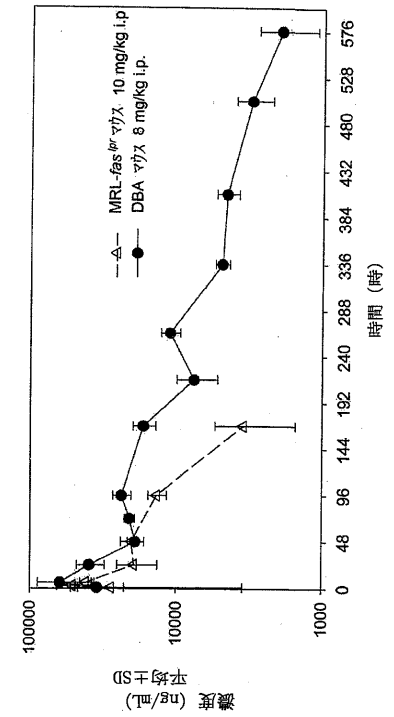


図 41

【図４２ａ】

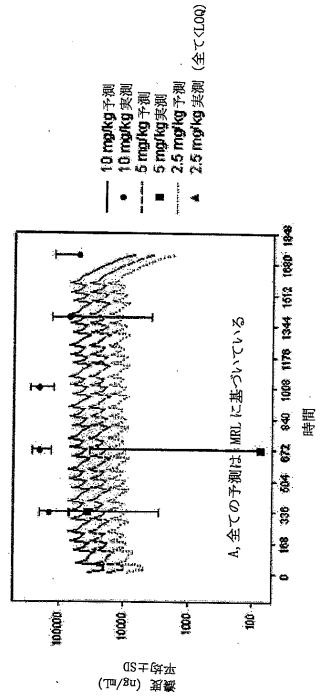


図 42a

【図４２ｂ】

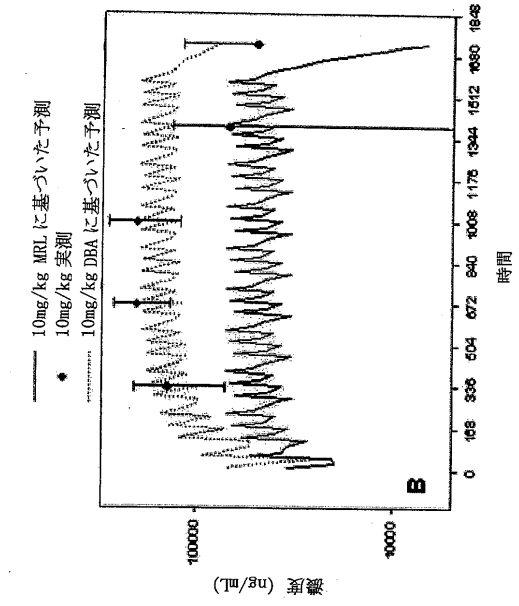


図 42b

【図４３ａ】

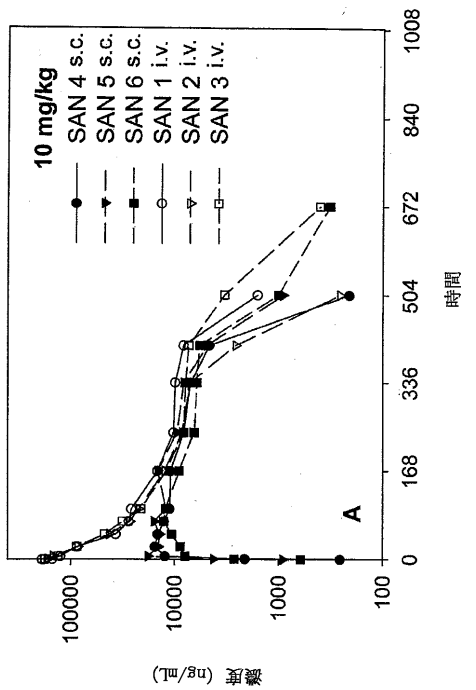


図 43a

【図４３ｂ】

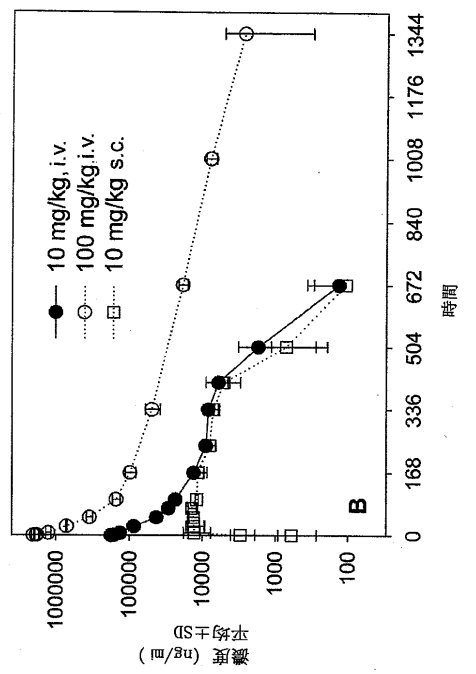


図 43b

【図４４ａ】

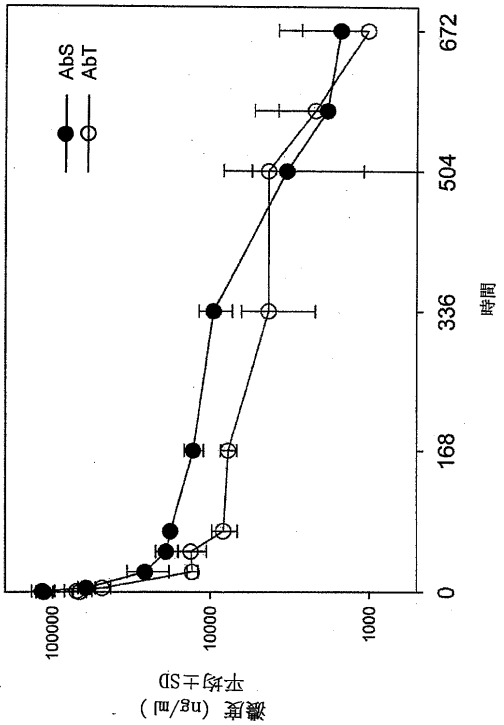


図 44a

【図４４ｂ】

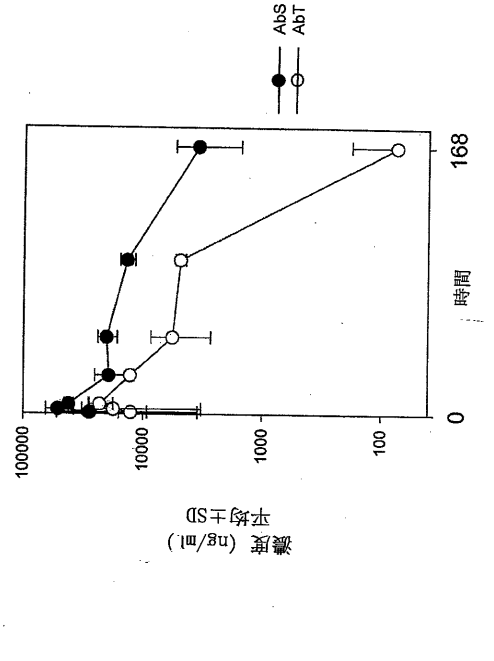


図 44b

【図４４ｃ】

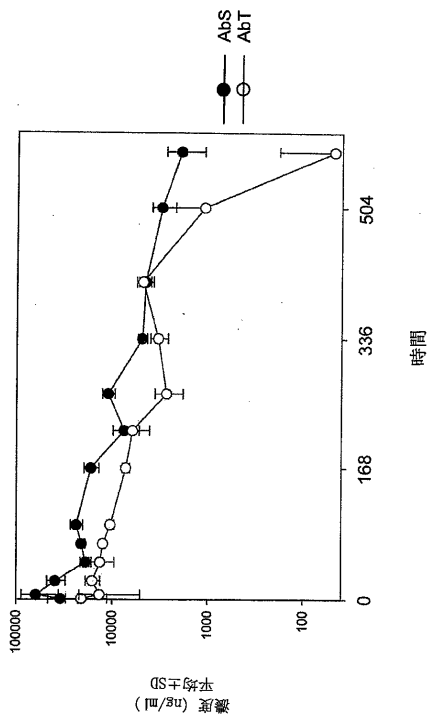


図 44c

【図４５】

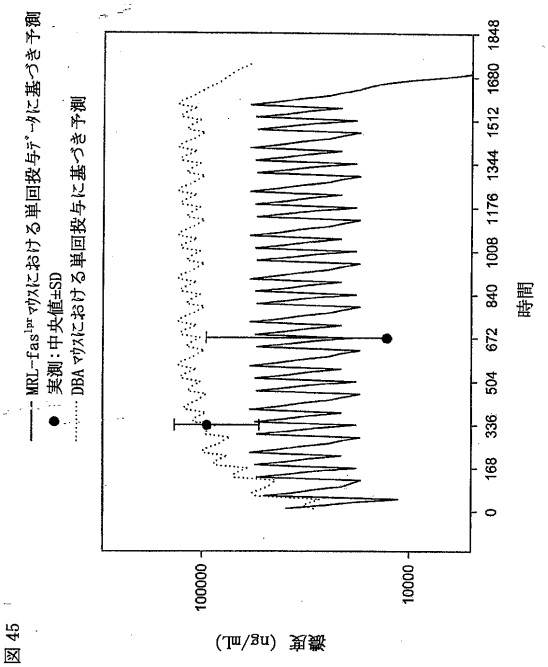


図 45

【図４６ａ】

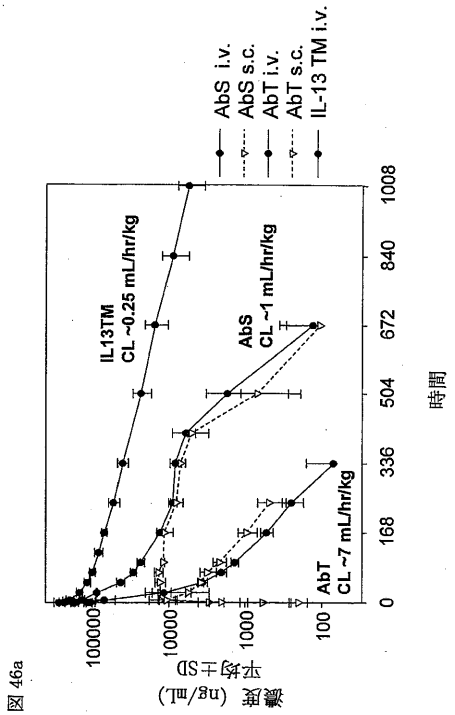


図 46a

【図４６ｂ】

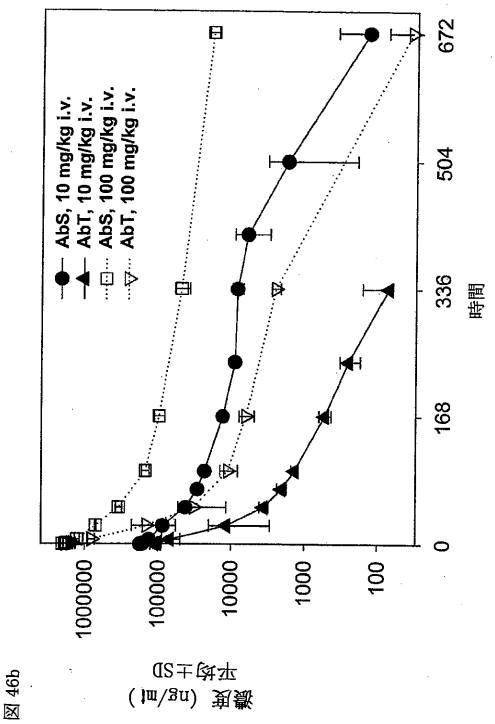


図 46b

【図４７】

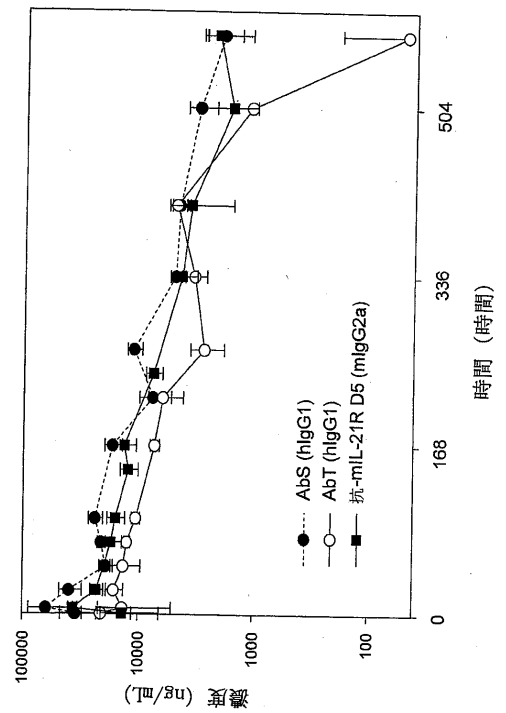


図 47

【図４８ａ】

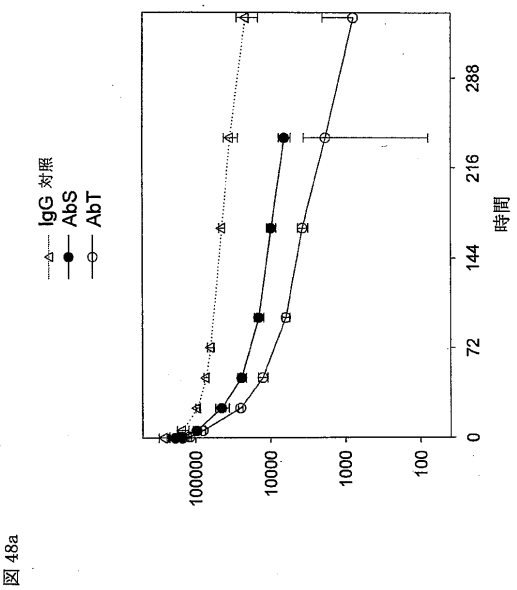


図 48a

【図４８ｂ】

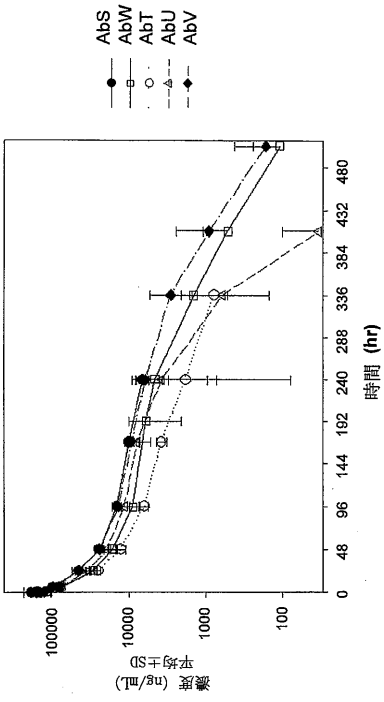


図 48b

【図４９】

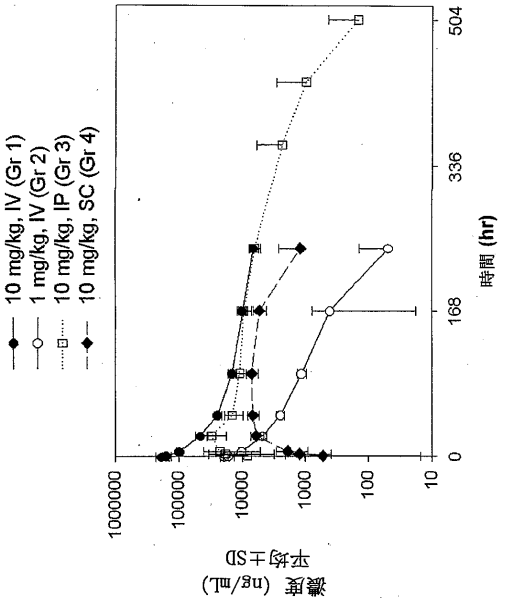


図 49

【図５０ａ】

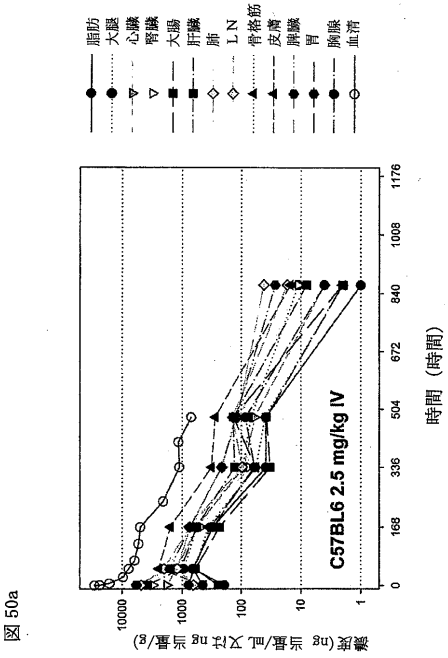


図 50a

【図５０ｂ】

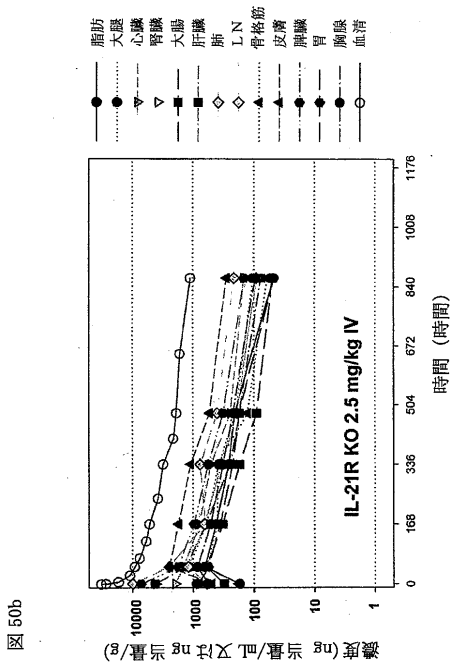


図 50b

【図５０ｃ】

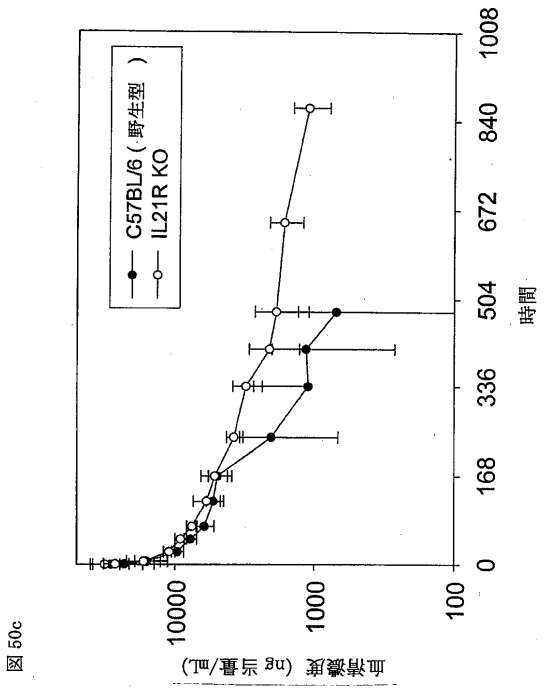


図 50c

【図５０ｄ】

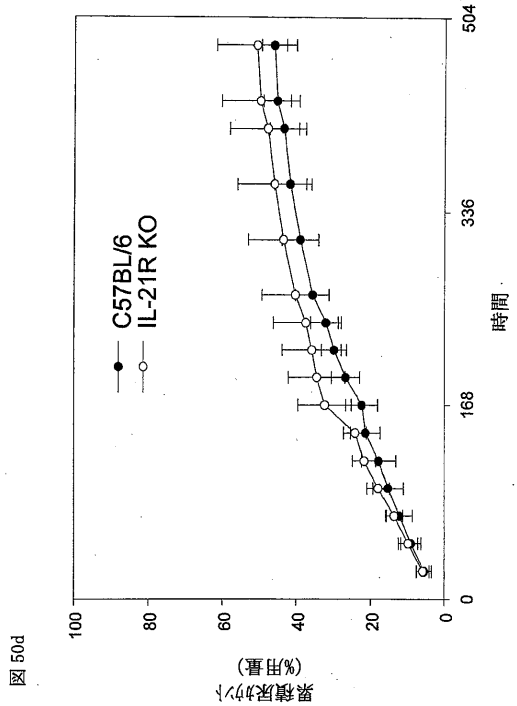


図 50d

【図５１ａ】

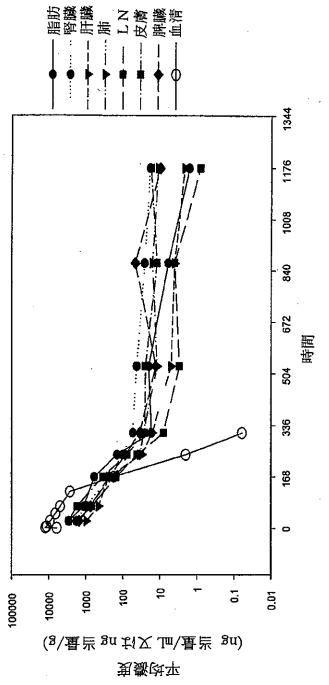


図 51a

【図５１ｂ】

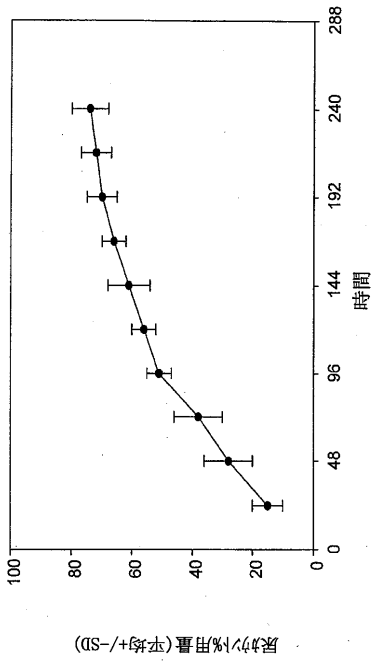


図 51b

【図５２】

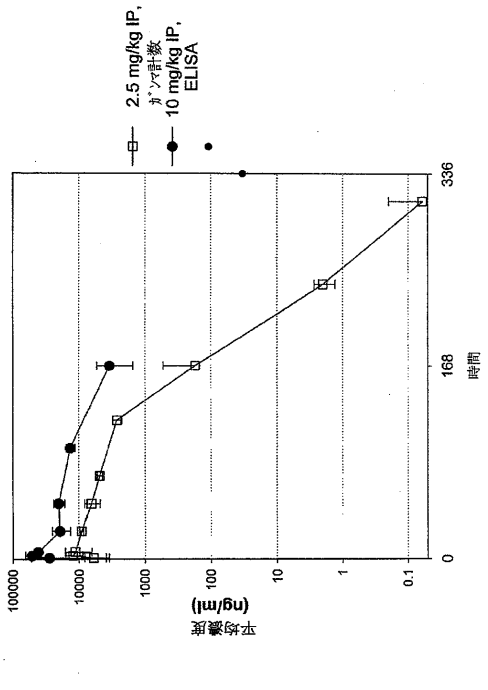


図 52

【図５３ａ】

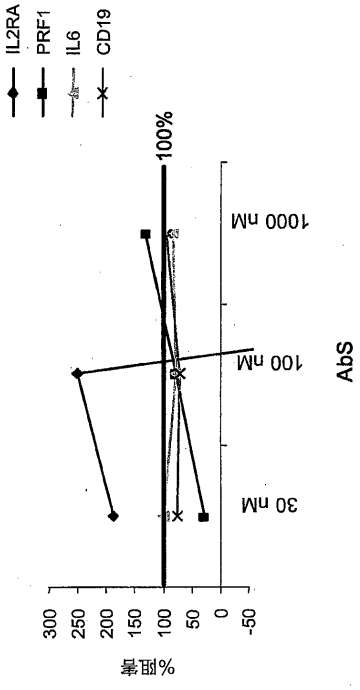


図 53a

【図５３ｂ】

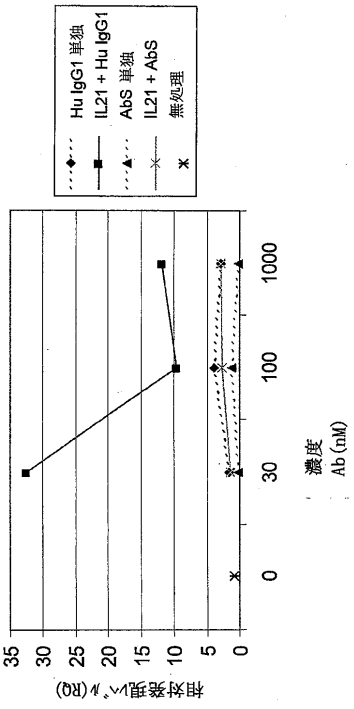


図 53b

【図５６ｂ】

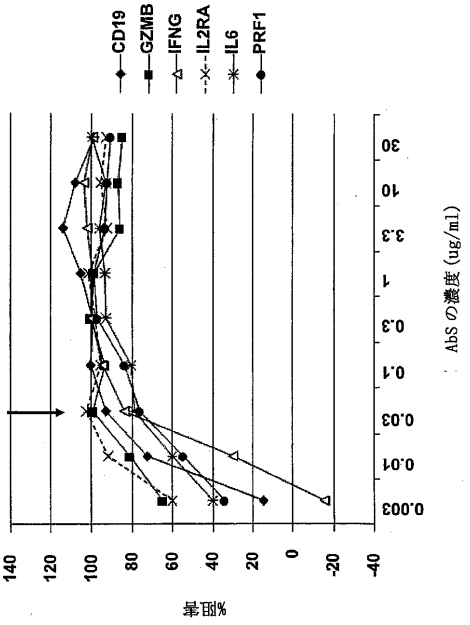


図 56b

【図５６ｃ】

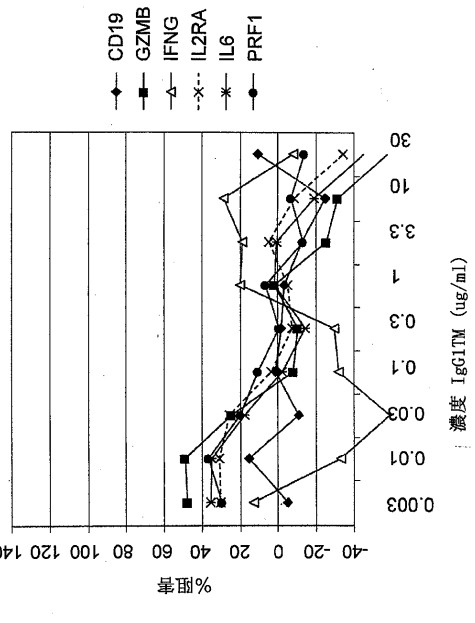


図 56c

【図５７ａ】

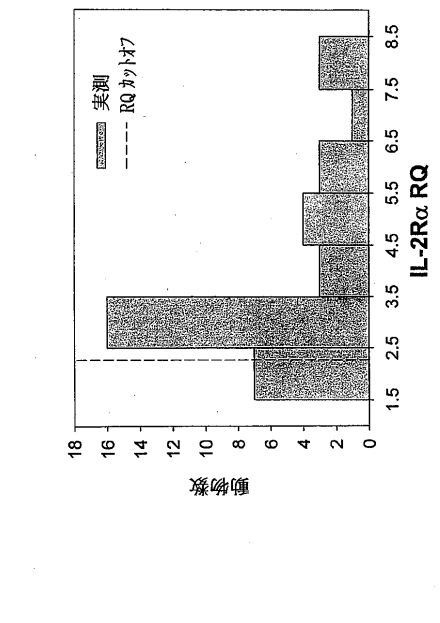


図 57a

【図５７ｂ】

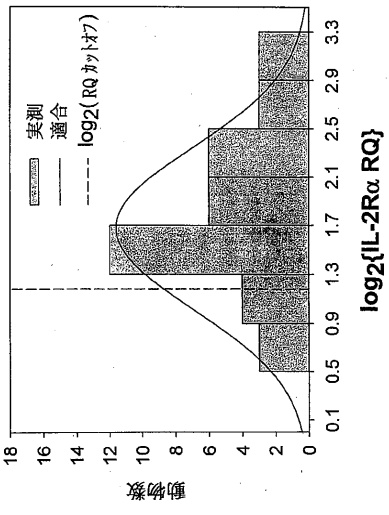


図 57b

【図５７ｃ】

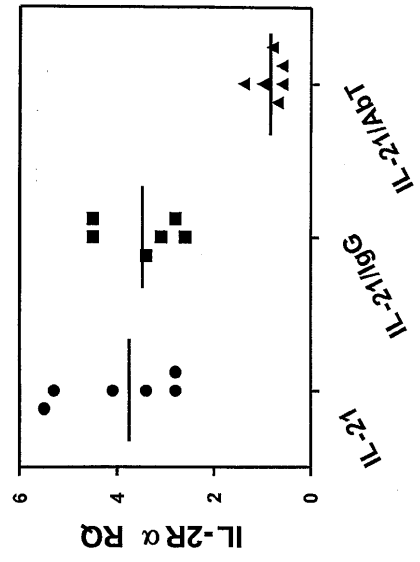


図 57c

【図５８】

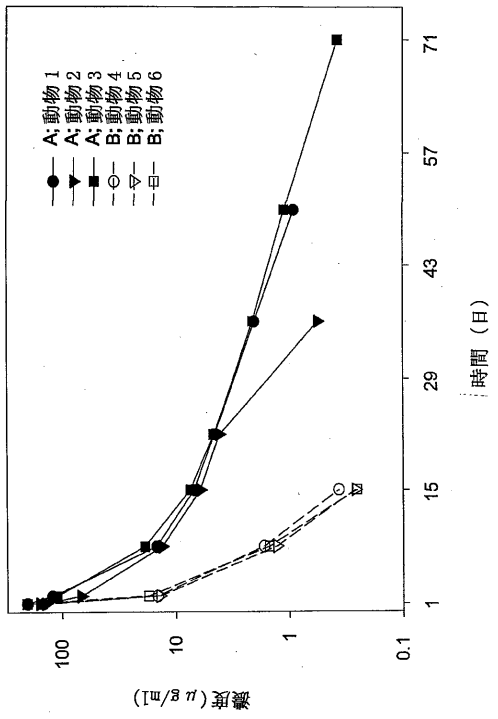


図 58

【図５９ａ】

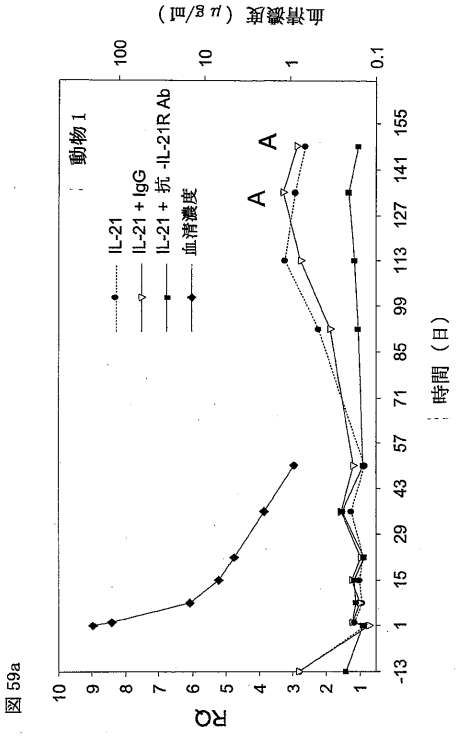


図 59a

【図５９ｂ】

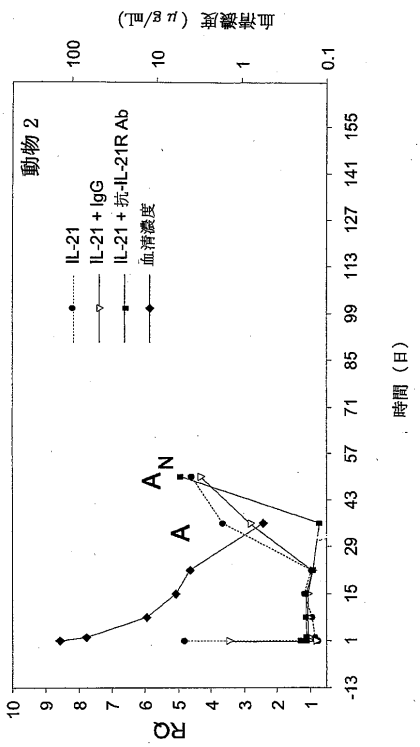


図 59b

【図５９ｃ】

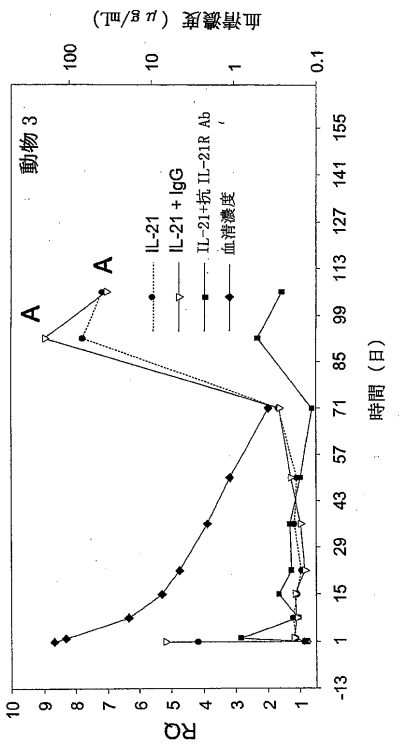


図 59c

【図６０ａ】

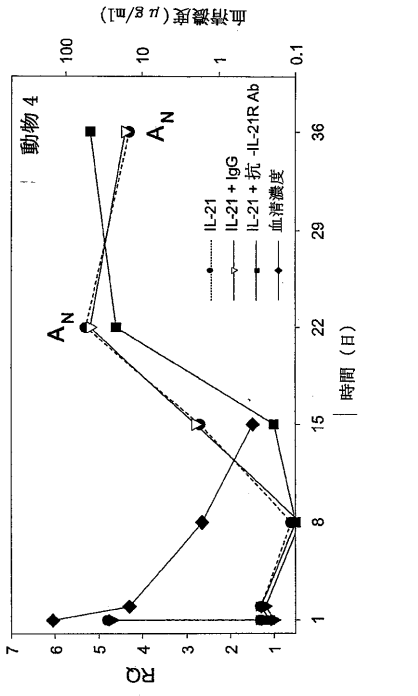


図 60a

【図６０ｂ】

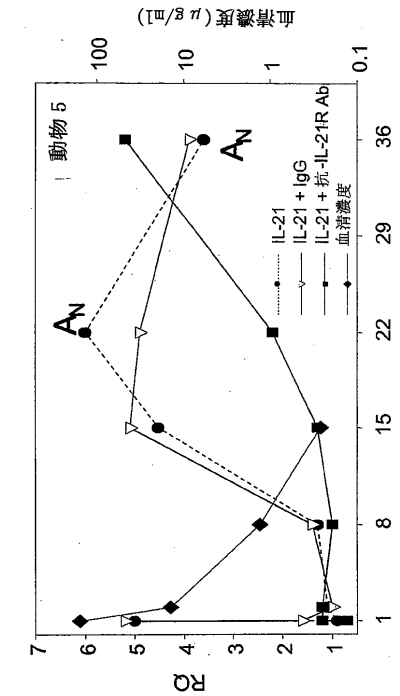


図 60b

【図６０ｃ】

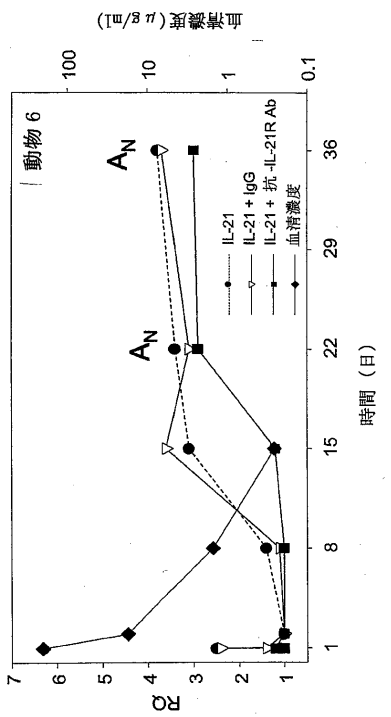


図 60c

【図６１】

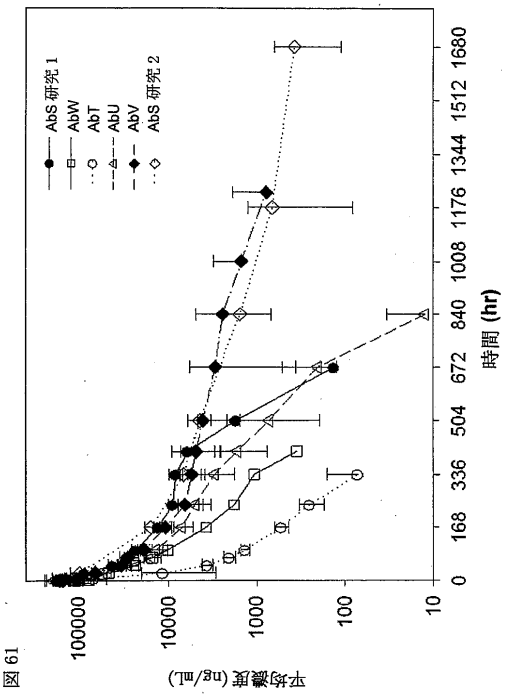


図 61

【図６２ａ】

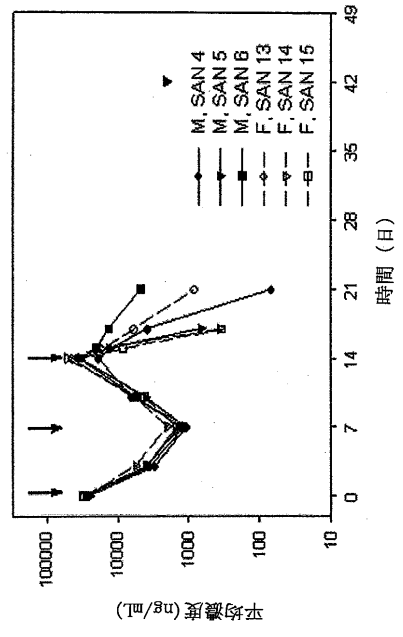


図 62a

【図６２ｂ】

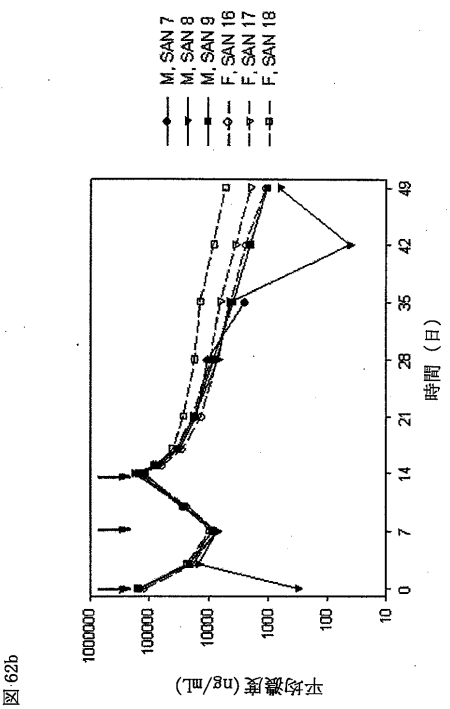


図 62b

【図６３ａ】

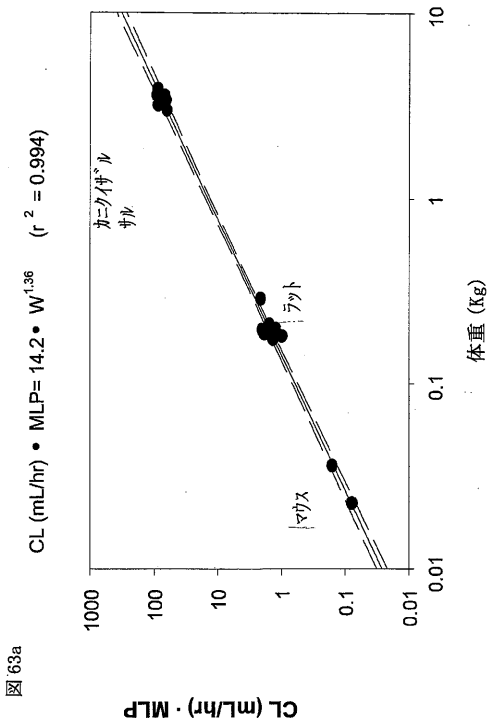


図63a

【図６３ｂ】

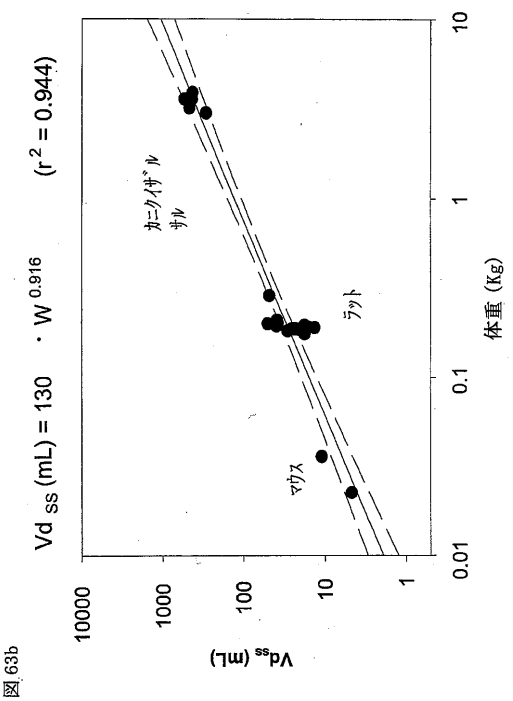


図63b

【図６４ａ】

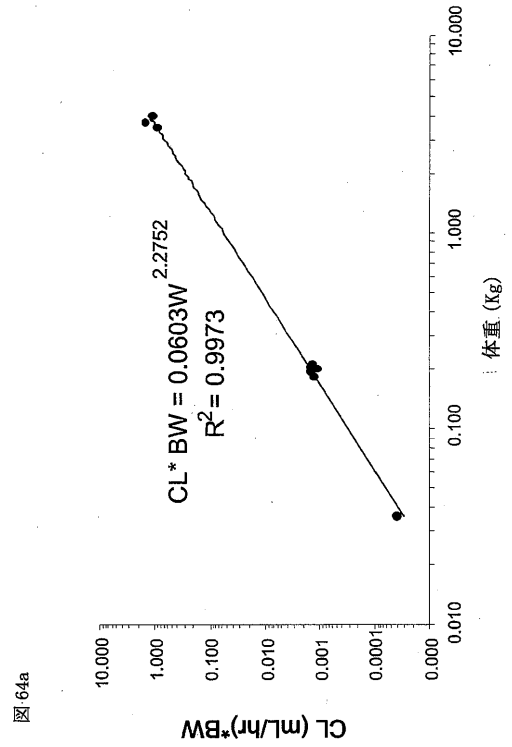


図64a

【図６４ｂ】

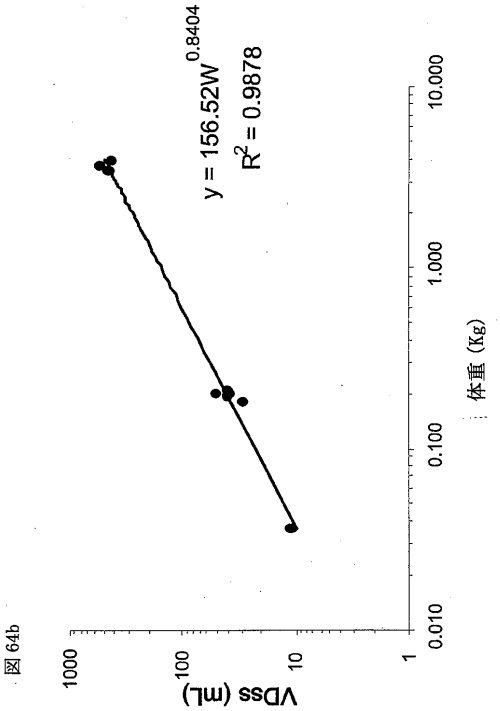


図64b

【図６５ａ】

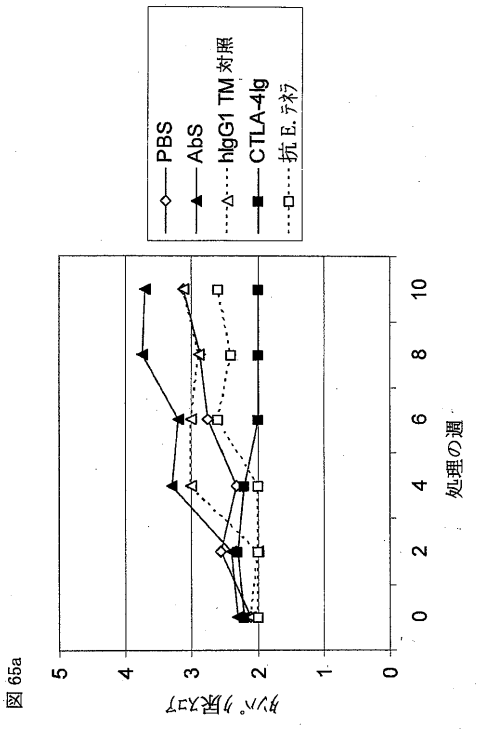


図 65a

【図６５ｂ】

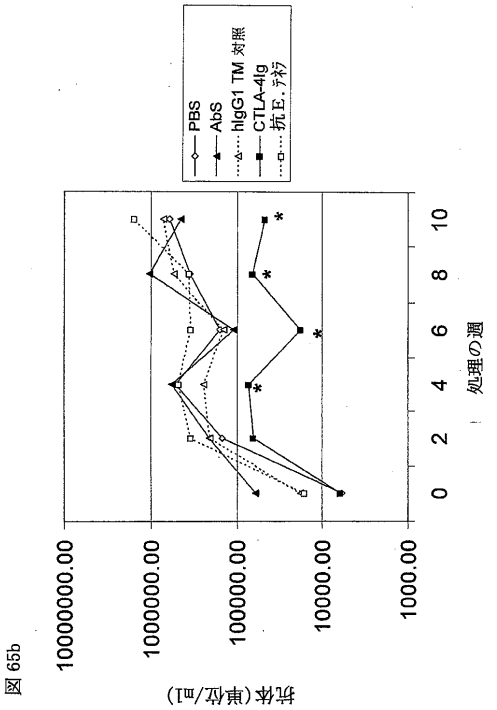


図 65b

【図６６ａ】

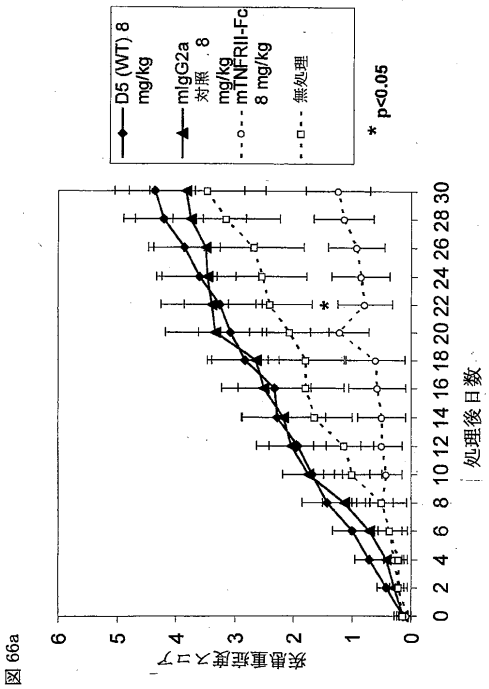


図 66a

【図６６ｂ】

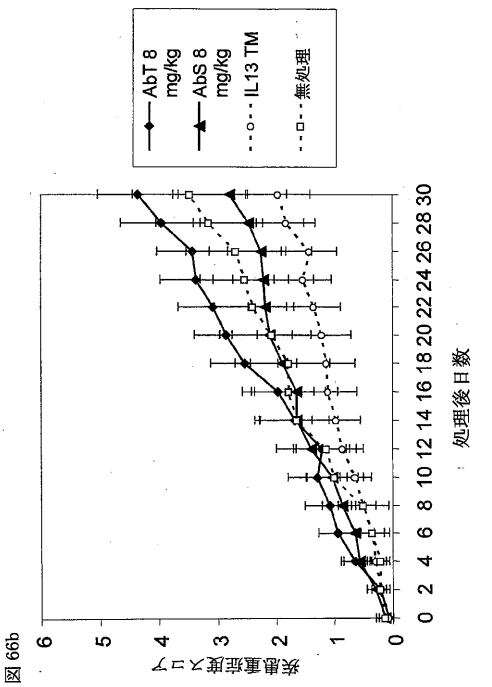


図 66b

【図６６ｃ】

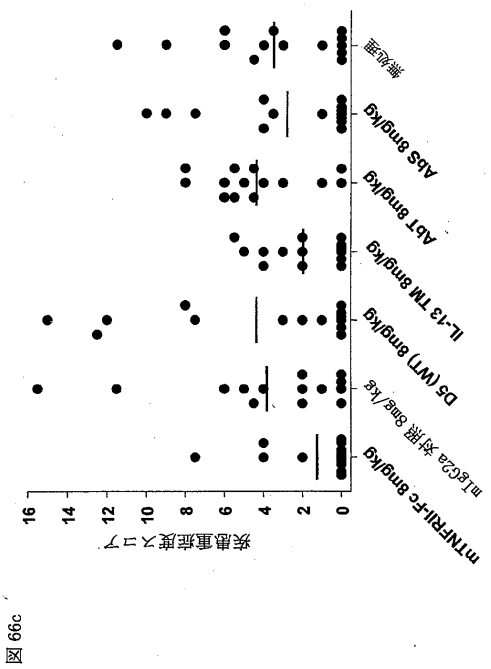


図 66c

【図６７ａ】

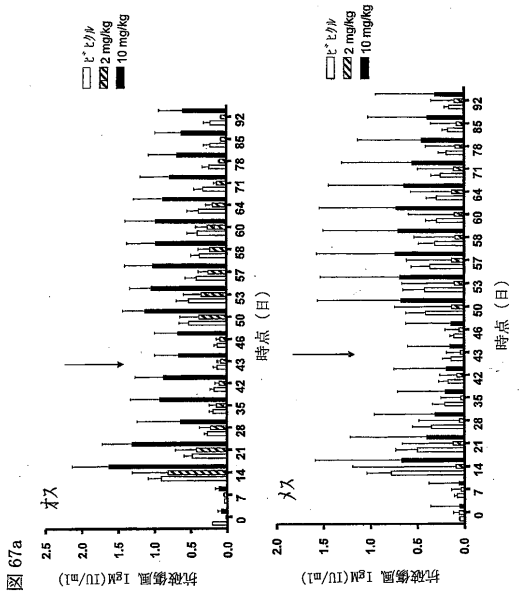


図 67a

【図６７ｂ】

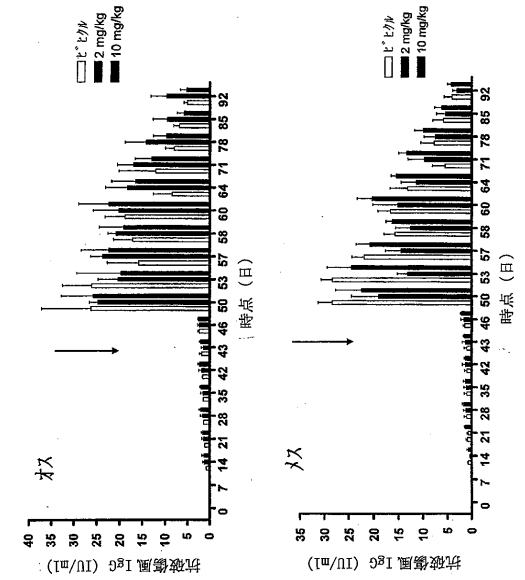


図 67b

【図５４】

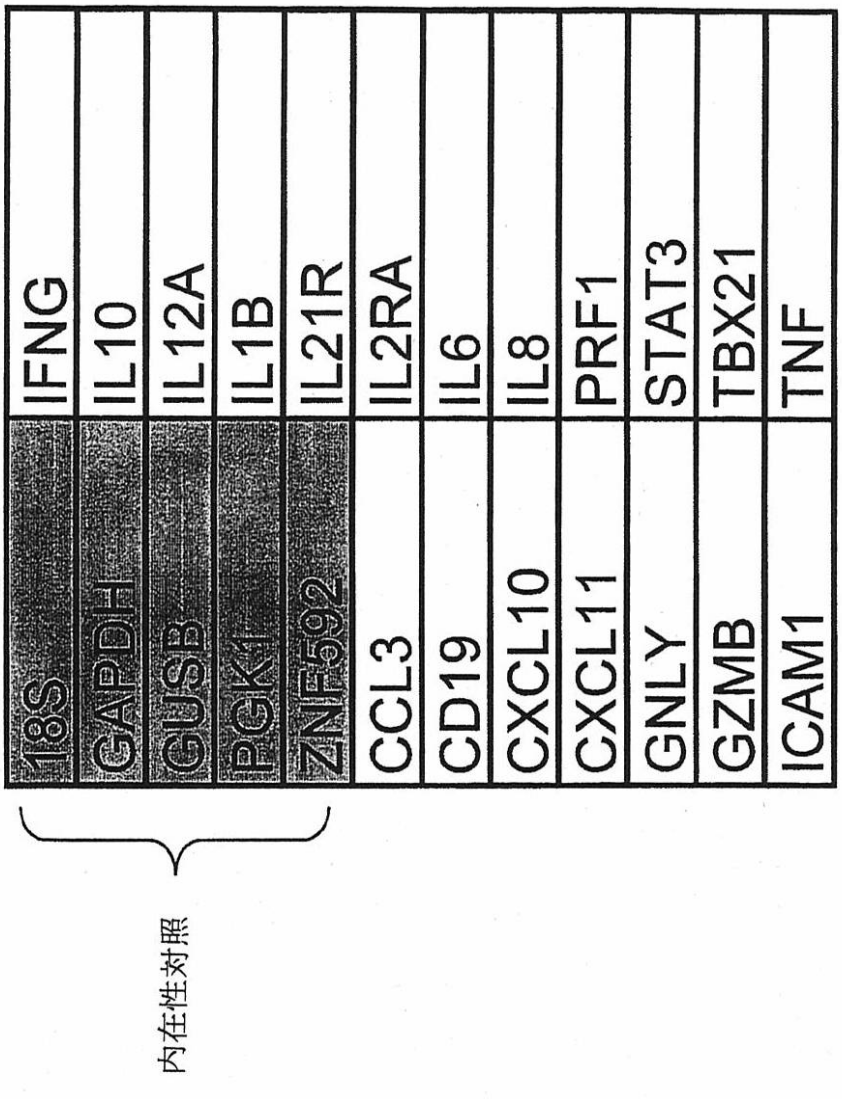

18S
GAPDH
GUSB
PGK1
ZNF592
内在性対照
IFNG
IL10
IL12A
IL1B
IL21R
IL2RA
IL6
IL8
PRF1
STAT3
TBX21
TNF
CCL3
CD19
CXCL10
CXCL11
GNLY
GZMB
ICAM1

図 54

【図５５】

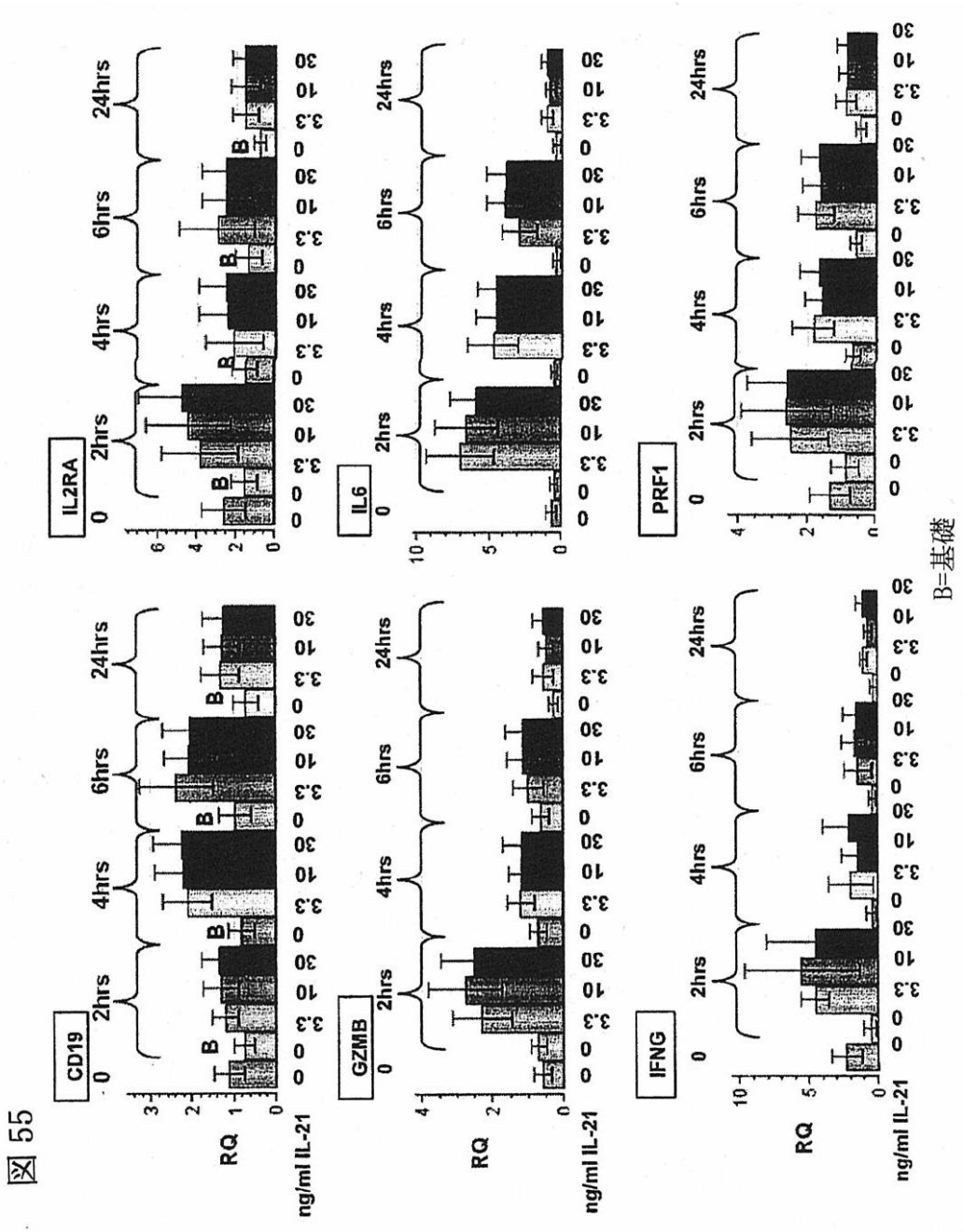


図 55
CD19
IL2RA
GZMB
IL6
IFNG
PRF1
0
2hrs
4hrs
6hrs
24hrs
RQ
ng/ml IL-21
B=基礎

【図５６ａ】

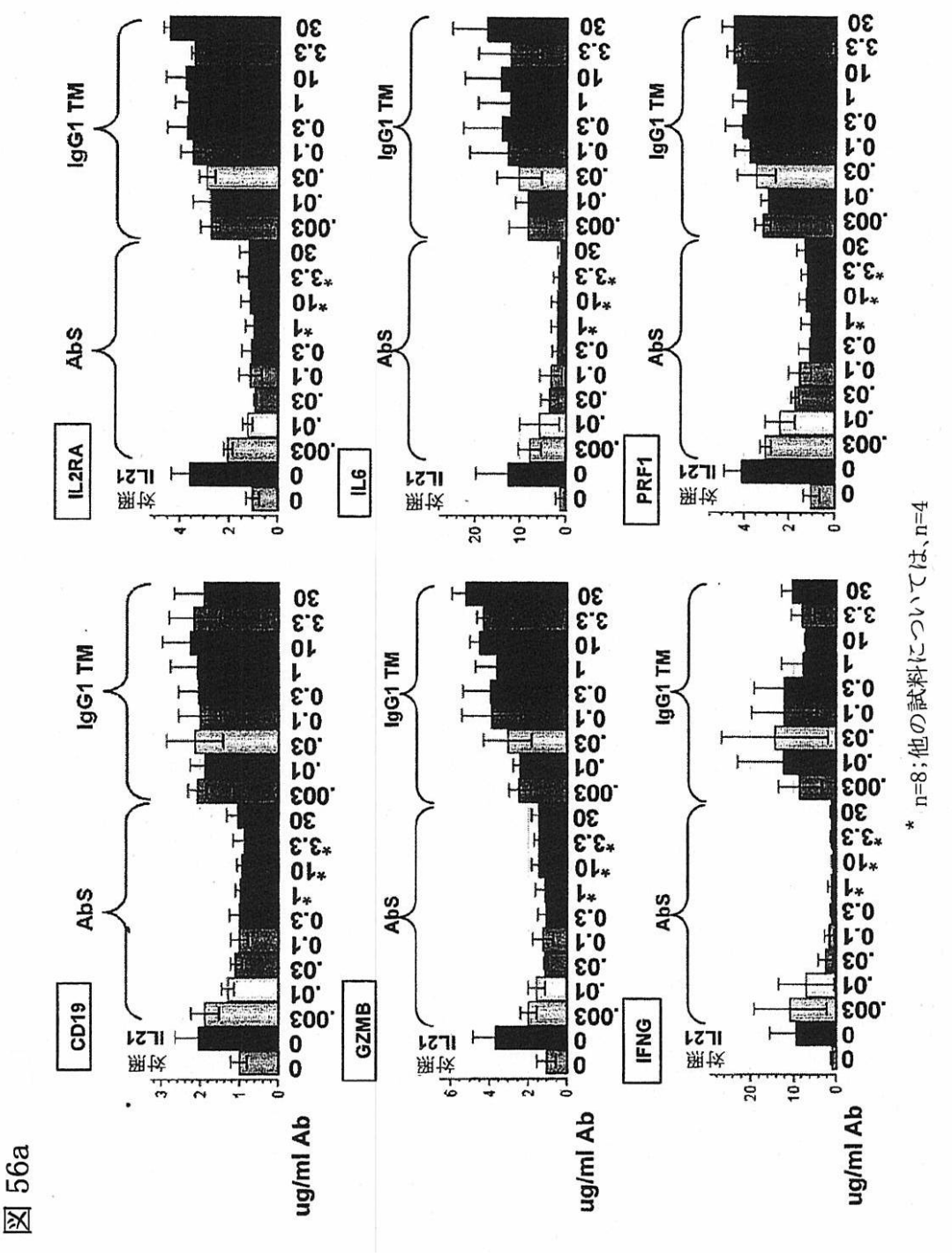


図 56a

【配列表】
2011520989000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/045188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/17 A61K38/20 C07K14/715 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBL, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/083249 A (WYETH CORP [US]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; YOUNG DEBORAH A [US]; W) 30 September 2004 (2004-09-30) the whole document	1-35
Y	WO 2006/135385 A (WYETH CORP [US]; YOUNG DEBORAH A [US]; COLLINS MARY [US]; DUNUSSI-JOAN) 21 December 2006 (2006-12-21) the whole document	1-35
Y	WO 2004/084835 A (WYETH CORP [US]; COLLINS MARY [US]; CHIN ELAINE Y [US]; SENICES MAYRA) 7 October 2004 (2004-10-07) the whole document	1-35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 October 2009	13/10/2009

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sommerfeld, Teresa

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/045188

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2004083249 A	30-09-2004	AU	2004221876 A1	30-09-2004
		BR	PI0408315 A	07-03-2006
		CA	2518371 A1	30-09-2004
		CL	5342004 A1	04-03-2005
		CN	1777621 A	24-05-2006
		EP	1603949 A2	14-12-2005
		JP	2007525159 T	06-09-2007
		KR	20050119120 A	20-12-2005
		MX	PA05009556 A	16-11-2005
		NZ	542306 A	30-04-2008
		ZA	200507067 A	27-12-2006
WO 2006135385 A	21-12-2006	AR	051071 A1	20-12-2006
		AU	2005332996 A1	21-12-2006
		BR	PI0514138 A	27-05-2008
		CA	2574848 A1	21-12-2006
		EC	SP077226 A	29-03-2007
		EP	1773394 A2	18-04-2007
		JP	2008508885 T	27-03-2008
		KR	20070057789 A	07-06-2007
WO 2004084835 A	07-10-2004	AU	2004224277 A1	07-10-2004
		BR	PI0408523 A	21-03-2006
		CA	2518854 A1	07-10-2004
		CN	1849131 A	18-10-2006
		EC	SP056027 A	18-09-2006
		EP	1608315 A2	28-12-2005
		JP	2006523682 T	19-10-2006
		KR	20060015482 A	17-02-2006
		MX	PA05010035 A	17-11-2005
		ZA	200507235 A	28-03-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 27/08		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ａ６１Ｐ 17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 29/00	１０１	
		Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	
		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｐ	
		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｎ	
		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブルーム，レアード
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４９２，ニーダム，ファルコン・ストリート ８２
(72)発明者 ジル，ダヴィンダー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８１０，アンドーヴァー，シャーロット・ドライブ ２０
(72)発明者 ヴグメイスター，ユリア
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８６４，ノース・レディング，リバーサイド・ドライブ ３７
(72)発明者 ヤング，デボラ・エイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１７６，メルローズ，ネルソン・ロード ３９
(72)発明者 オトゥール，マーゴット
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４６０，ニュートンヴィル，アルベマール・ロード ３５３
(72)発明者 グアイ，ヒース・エム
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５２，ウォルサム，ハンボルト・ストリート １７
(72)発明者 アドキンス，カリッサ・ケイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８３２，ヘーバリル，ターソロ・ロード ３１
(72)発明者 ウェイバー，エイミー・アーリーン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８６４，ノース・レディング，フォレスト・ストリート １
(72)発明者 ジャイン，サドハナ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３２，ウエスト・ロックスベリー，ファーブッシュ・ロード １８
(72)発明者 アライ，マヤ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４４６，ブルックライン，ビーコン・ストリート １０７０，アパートメント ３ビー

Ｆターム(参考) 4C085 AA13 AA14 DD23 DD62 DD63 DD88 DD90 EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2011520989A5	公开(公告)日	2012-07-12
申请号	JP2011510745	申请日	2009-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯，LLC		
[标]发明人	ブルームレアード ジルダヴィンダー ヴグメイスターユリア ヤングデボラエイ オトゥールマーゴット グアイヒースエム アドキンスカリッサケイ ウェイバーエイミーアーリーン ジャインサドハナ アライマヤ		
发明人	ブルーム,レアード ジル,ダヴィンダー ヴグメイスター,ユリア ヤング,デボラ·エイ オトゥール,マーゴット グアイ,ヒース·エム アドキンス,カリッサ·ケイ ウェイバー,エイミー·アーリーン ジャイン,サドハナ アライ,マヤ		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P37/02 A61P29/00 A61P27/08 A61P37/06 A61P25/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P43/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/08 A61P29/00 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/30 G01N33/6869 G01N2333/54		
FI分类号	C07K16/28.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/02 A61P29/00 A61P27/08 A61P37/06 A61P25/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P43/00.111 G01N33/53.M G01N33/53.P G01N33/53.N G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/DD90 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	61/055543 2008-05-23 US 61/099476 2008-09-23 US		
其他公开文献	JP2011520989A		

摘要(译)

本发明提供结合蛋白及其抗原结合片段，包括人抗体，其特异性结合人白细胞介素-21受体（IL-21R），及其使用方法。结合蛋白可以例如充当IL-21R活性的拮抗剂，从而调节一般免疫应答，特别是IL-21R介导的免疫应答。所公开的组合物和方法用于诊断，治

疗和/或预防与IL-21R相关的疾病，例如炎性疾病，自身免疫疾病，过敏，移植排斥和其他免疫系统疾病。可以用。