

(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2011-523849

(P2011-523849A)

(43) 公表日 平成23年8月25日(2011.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-510744 (P2011-510744)  
 (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21日 (2011.1.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/045182  
 (87) 国際公開番号 W02009/143523  
 (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 61/055,500  
 (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)

(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  
 7940. マジソン, ファイブ ジラルダ  
 ファームズ  
 (71) 出願人 505148324  
 メッドイミュン・リミテッド  
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ  
 ケンブリッジ, グランタ パーク, ザ  
 ミルスタイン ビルディング  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰

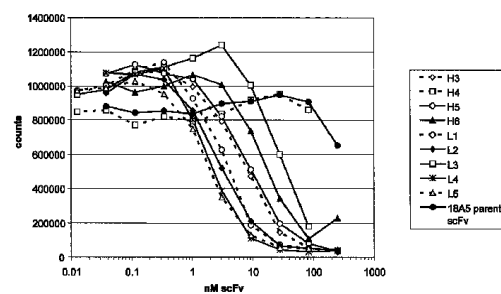
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-21受容体結合性タンパク質

(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結合性タンパク質およびその抗原結合性断片を提供する。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、例えば炎症性弛緩、自己免疫疾患、アレルギー、移植片拒絶、癌、およびその他の免疫系疾患、の診断ならびに/または治療に用いてもよい。

Figure 1a



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

I L - 2 1 R に結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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 1 4、1 6、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、9 4、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 8、1 1 0、1 1 2、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4、1 2 6、1 2 8、1 3 0、1 3 2、1 3 4、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、1 4 4、1 4 6、1 4 8、1 5 0、1 5 2、1 5 4、1 5 6、1 5 8、1 6 0、1 6 2、1 6 5 ~ 1 6 8、1 7 1 ~ 1 9 3、2 1 3 ~ 2 2 9、2 4 0、2 4 2、2 4 4、2 4 6 および 2 4 8、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 9 5 % 同一である少なくとも 1 のアミノ酸配列を含む、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

10

## 【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 に記載の単離された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、s c F v である、請求項 1 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

20

## 【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<sub>H</sub> である、請求項 1 に記載の単離された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<sub>L</sub> である、請求項 1 に記載の単離された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、C D R である、請求項 1 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 7】

I L - 2 1 R に結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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 1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、8 9、9 1、9 3、9 5、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 7、1 0 9、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 5 9、1 6 1、2 3 9、2 4 1、2 4 3、2 4 5 および 2 4 7、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 9 5 % 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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

30

40

## 【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、抗体である、請求項 7 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 9】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、s c F v である、請求項 7 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 10】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、V<sub>H</sub> である、請求項 7 に記載の単離さ

50

れた結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 1】

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 7 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 2】

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 7 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 3】

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、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。

10

【請求項 1 4】

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 3 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

20

【請求項 1 5】

結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、 $s c F v$  である、請求項 1 3 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 6】

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 3 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 7】

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 3 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

30

【請求項 1 8】

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 3 に記載の単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 9】

$IL-21R$  に結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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 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

40

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、

50

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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項20】

IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項21】

請求項19に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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、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

10

20

30

40

50

、 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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

10

【請求項22】

IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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軽鎖および重鎖を含み、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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

【請求項23】

IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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軽鎖および重鎖を含み、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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

20

【請求項24】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がV<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインを含み、そしてここでV<sub>H</sub>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22に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片。

30

【請求項25】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がV<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインを含み、そしてここでV<sub>L</sub>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23に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片。

【請求項26】

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22または23に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片。

40

【請求項27】

単離された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によって認識されるIL-21Rエピトープに結合し、ここで、当該結合性タンパク質または抗原結合断片は、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、前記結合性タンパク質または抗原結合性断片。

50

## 【請求項 28】

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<sub>v</sub> 断片を含む、請求項 27 に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片。

10

## 【請求項 29】

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<sub>v</sub> 断片を含む、請求項 27 に記載の結合性タンパク質またはその抗原結合性断片。

20

## 【請求項 30】

結合性タンパク質または抗原結合性断片のヒト IL-21R に対する結合定数が、少なくとも約  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である、請求項 1、2、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

## 【請求項 31】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が、IL-21 により媒介される B a F 3 細胞の増殖を、約  $1.75 \text{ nM}$  またはそれ未満の IC<sub>50</sub> で阻害する、そしてここで当該 B a F 細胞はヒト IL-21R を含む、請求項 1、2、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

30

## 【請求項 32】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が、IL-21 により媒介される TF 1 細胞の増殖を、約  $14.0 \text{ nM}$  またはそれ未満の IC<sub>50</sub> で阻害する、そしてここで当該 TF 1 細胞はヒト IL-21R を含む、請求項 1、2、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

## 【請求項 33】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が、IL-21 により媒介される初代ヒト B 細胞の増殖を、約  $1.9 \text{ nM}$  またはそれ未満の IC<sub>50</sub> 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、2、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

40

## 【請求項 34】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が、IL-21 により媒介される初代ヒト CD4<sup>+</sup> 細胞の増殖を、約  $1.5 \text{ nM}$  またはそれ未満の IC<sub>50</sub> で阻害する、そしてここで当該 CD4<sup>+</sup> 細胞はヒト IL-21R を含む、請求項 1、2、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

## 【請求項 35】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が、配列番号 2 中の少なくとも 100 の連続したアミノ酸であるいずれかの配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列に特異的に結合する、請求項 1、2、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の結合性タンパク質また

50

は抗原結合性タンパク質。

【請求項 36】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が、IL-21RへのIL-21の結合を阻害する、請求項1、2、19または20のいずれか1項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

【請求項 37】

結合性タンパク質または抗原結合断片がIgG1である、請求項1、2、19または20のいずれか1項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

【請求項 38】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がヒトのものである、請求項1、2、19または20のいずれか1項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性タンパク質。

10

【請求項 39】

請求項1、2、19または20のいずれか1項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片を含む、医薬組成物。

【請求項 40】

請求項1、2、19または20のいずれか1項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片をコードする単離された核酸。

【請求項 41】

請求項40に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 42】

請求項41に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

20

【請求項 43】

宿主細胞が細菌、哺乳動物細胞、酵母細胞、植物細胞、または昆虫細胞である請求項42に記載の宿主細胞。

【請求項 44】

請求項1、2、19または20のいずれか1項に記載の結合性タンパク質または抗原結合性断片を含む診断用キット。

【請求項 45】

結合性タンパク質または抗原結合性断片が抗体である、請求項19～38のいずれか1項に記載の単離された結合性タンパク質または抗原結合性断片。

30

【請求項 46】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がscFvである、請求項19～38のいずれか1項に記載の単離された結合性タンパク質または抗原結合性断片。

【請求項 47】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がV<sub>H</sub>である、請求項19～38のいずれか1項に記載の単離された結合性タンパク質または抗原結合性断片。

【請求項 48】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がV<sub>L</sub>である、請求項19～38のいずれか1項に記載の単離された結合性タンパク質または抗原結合性断片。

【請求項 49】

結合性タンパク質または抗原結合性断片がCDRである、請求項19～38のいずれか1項に記載の単離された結合性タンパク質または抗原結合性断片。

40

【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61/055,500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

50

[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、例えば、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の治療および/または診断に有用である。

【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。

10

【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)。

20

【0005】

[0005]ヒトIL - 21RはクラスI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受容体鎖およびIL - 4受容体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( $\gamma$ )と会合し、この $\gamma$ 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)。

30

【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<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> 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; Kasaiian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. 241:6

40

50

6 - 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<sup>+</sup>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。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【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】

【0009】

【非特許文献1】Parrish - Novakら (2000) Nature 408: 57 - 63

20

【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】Kasaiyan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

30

【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】

【0010】

40

[0008]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に対してはるかに高い度合いのアフィニティを有する。

【0011】

[0009]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

50

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、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、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。

10

## 【0012】

[0010]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 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の結合定数でヒトIL-21Rに結合する；（8）少なくとも約 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の結合定数でネズミIL-21Rに結合する；（9）約 $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ またはそれ未満の解離定数でヒトIL-21Rに結合する；（10）約 $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 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1.75 nMまたはそれ未満の $\text{IC}_{50}$ 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0.5 nMまたはそれ未満の $\text{IC}_{50}$ 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14.0 nMまたはそれ未満の $\text{IC}_{50}$ 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1.9 nMまたはそれ未満の $\text{IC}_{50}$ 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1.5 nMまたはそれ未満の $\text{IC}_{50}$ で、IL-21により媒介されるヒト初代CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を阻害する；および（16）約5.0 nMまたはそれ未満の $\text{IC}_{50}$ で、IL-21により媒介されるネズミ初代CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を阻害する。

20

30

## 【0013】

[0011]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61/055,500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な態様、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。

## 【0014】

[0012]本発明の1つの態様は、IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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

40

50

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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、例えば、抗体、s c F v、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、またはCDRであってもよい。

【0015】

[0013]本発明の別の態様は、IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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（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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。

10

【0016】

[0014]本発明のさらなる態様は、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、単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。

20

【0017】

[0015]本発明のさらに別の態様は、IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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、

30

40

50

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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。

【0018】

[0016]本発明のさらに別の態様は、IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。

10

20

30

【0019】

[0017]さらに、本発明のさらなる態様は、単離された結合性タンパク質または抗原結合性断片であって、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

40

50

、 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、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。

#### 【0020】

[0018]本発明の別の態様は、IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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、または実質的にそれと同一である配列（例えば、実質的にそれと同一である配列には、少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより同一である配列が含まれる）、または実質的にそれと相同である配列（例えば、実質的にそれと相同である配列には、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより同一である配列が含まれる）を含む、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。さらなる態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片はV<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインを含み、そして当該V<sub>H</sub>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、あるいはそれと実質的に同一または相同である配列を含む。本発明の別の態様は、IL-21Rに結合する単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、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、あるいはそれと実質的に同一または相同である配列を含む、前記結合性タンパク質またはその抗原結合性断片である。さらなる態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片はV<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインを含み、そして当該V<sub>L</sub>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、あるいはそれと実質的に同一または相同である配列を含む。さらに別の態様において、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、あるいはそれと実質的に同一または相同である配列を含む。

#### 【0021】

[0019]本発明の結合性タンパク質、例えば抗体は、生殖系列化されていてもまたはされていなくてもよい。これらは、AbA～AbZ、H3～H6、L1～L6、L8～L21、またはL23～L25が結合するのと同じIL-21Rエピトープまたは類似のエピトープ（例えば重複するエピトープ）に特異的に結合してもよい。他の態様において、当該結合性タンパク質は、IL-21Rの断片、例えば、配列番号2または4に示すアミノ酸配列、あるいは当該配列に少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより同一である配列に連続した、少なくとも10、20、50、75、100、150、または200アミノ酸の断片に特異的に結合する。

#### 【0022】

[0020]本発明の別の態様は、AbA～AbZ、H3～H6、L1～L6、L8～L21

、および L 2 3 ~ L 2 5 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 I L - 2 1 R エピトープに結合する、単離された結合性タンパク質またはその抗原結合性断片であって、A b A ~ A b Z、H 3 ~ H 6、L 1 ~ L 6、L 8 ~ L 2 1、および L 2 3 ~ L 2 5 からなる群より選択される結合性タンパク質のヒト I L - 2 1 R 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その抗原結合性断片である。別の態様において、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 1 4、1 6、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、9 4、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 8、1 1 0、1 1 2、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4、1 2 6、1 2 8、1 3 0、1 3 2、1 3 4、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、1 4 4、1 4 6、1 4 8、1 5 0、1 5 2、1 5 4、1 5 6、1 5 8、1 6 0、1 6 2、1 6 5 ~ 1 6 8、1 7 1 ~ 1 9 3、2 1 3 ~ 2 2 9、2 4 0、2 4 2、2 4 4、2 4 6、および 2 4 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列、あるいは当該配列に実質的に同一または相同である配列を含む、重鎖、軽鎖、または F<sub>v</sub> 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抗原結合性断片は、配列番号 1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、8 9、9 1、9 3、9 5、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 7、1 0 9、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 5 9、1 6 1、2 3 9、2 4 1、2 4 3、2 4 5、および 2 4 7 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、あるいは当該配列に実質的に同一または相同である配列を含む重鎖、軽鎖または F<sub>v</sub> 断片を含む。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 2 3 】

[0021] さらに他の態様において、当該結合性タンパク質は、これらの V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインの少なくとも 1 つの相補性決定領域 ( C D R ) ( 例えば、1 またはそれより多い、2 またはそれより多い、3 またはそれより多い、4 またはそれより多い、あるいは 5 またはそれより多い連続した C D R ( 例えばフレームワーク領域 ( F R ) またはリンカーによって分離された 2 またはそれより多い C D R ) または連続しない C D R ( 例えば少なくとも 1 つの他の C D R および例えば F R ( 単数または複数 ) によって分離された 2 またはそれより多い C D R ) ) を含む。例えば、結合性タンパク質には、V<sub>H</sub> ドメインおよび / または V<sub>L</sub> ドメインの 1 つ、2 つ、3 つまたはそれより多い C D R が含まれてもよい。

#### 【 0 0 2 4 】

[0022] 本開示は、A b A ~ A b Z、H 3 ~ H 6、L 1 ~ L 6、L 8 ~ L 2 1、および L 2 3 ~ L 2 5 の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメイン由来の核酸配列を提供する。やはり意図されるのは、A b A ~ A b Z、H 3 ~ H 6、L 1 ~ L 6、L 8 ~ L 2 1、および L 2 3 ~ L 2 5 由来の少なくとも 1 つの C D R を含む核酸配列である。本開示はまた、こうした核酸を含むベクターおよび宿主細胞も提供する。

#### 【 0 0 2 5 】

[0023] 本発明の結合性タンパク質は、全長であってもよい ( 例えば少なくとも 1 つの完全重鎖および少なくとも 1 つの完全軽鎖を含む ) し、または抗原結合性断片 ( 例えば、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、一本鎖 F v 断片、F d 断片、d A b 断片、C D R、または抗原に特異的に結合する能力を保持する全長結合性タンパク質の他の断片 ) のみを含んでもよい。当該結合性タンパク質には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子のいずれかから選択される定常領域、またはその一部が含まれてもよい。例えば、多様なアイソタイプの重鎖定常領域を用いてもよく、これには : I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、および I g E が含まれる。軽鎖定常領域はカッパまたはラムダから選択可能で

ある。当該結合性タンパク質は I g G であってもよく、あるいはまた、I g G 1 または I g G 1 であってもよい。

【0026】

[0024]本明細書記載の抗 I L - 2 1 R 結合性タンパク質を誘導体化するか、または別の機能分子（例えば別のペプチドまたはタンパク質、例えば F a b 断片）に連結してもよい。例えば、本発明の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、機能的に連結してもよい（例えば化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合または他の方式によって）。

【0027】

[0025]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のヒト I L - 2 1 R に対する結合定数は、少なくとも約  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である。別の態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、I L - 2 1 により媒介される B a F 3 細胞の増殖を、約  $1.75 \text{ nM}$  またはそれ未満の  $\text{IC}_{50}$  で阻害し、そして当該 B a F 3 細胞はヒト I L - 2 1 R を含む。別の態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、I L - 2 1 により媒介される T F 1 細胞の増殖を、約  $14.0 \text{ nM}$  またはそれ未満の  $\text{IC}_{50}$  で阻害し、そして当該 T F 1 細胞はヒト I L - 2 1 R を含む。別の態様において、当該結合性タンパク質または抗原結合性断片は、I L - 2 1 により媒介される初代ヒト B 細胞の増殖を、約  $1.9 \text{ nM}$  またはそれ未満の  $\text{IC}_{50}$  で阻害し、そして当該 B 細胞はヒト I L - 2 1 R 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抗原結合性断片は、I L - 2 1 により媒介される初代ヒト C D 4 + 細胞の増殖を、約  $1.5 \text{ nM}$  またはそれ未満の  $\text{IC}_{50}$  で阻害し、そして当該 C D 4 + 細胞はヒト I L - 2 1 R を含む。

【0028】

[0026]1つの態様において、本発明は、配列番号2の少なくとも100の連続したアミノ酸であるいずれかの配列と少なくとも約95%同一であるアミノ酸配列に特異的に結合する結合性タンパク質または抗原結合性断片を提供する。別の態様は、I L - 2 1 R への I L - 2 1 の結合を阻害する、結合性タンパク質または抗原結合性断片を提供する。少なくとも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断片は I g G 1 である。少なくとも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ヒトのものである。

【0029】

[0027]別の側面において、本発明は、少なくとも1つの抗 I L - 2 1 R 結合性タンパク質および医薬的に許容されうるキャリアーを含む、医薬組成物を特徴とする。医薬組成物は、さらに、少なくとも1つの抗 I L - 2 1 R 結合性タンパク質および少なくとも1つの他の療法剤（例えば、本明細書により詳細に記載するような、サイトカインおよび増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞傷害剤、細胞分裂阻害剤、またはその組み合わせ）を含んでもよい。抗 I L - 2 1 R 結合性タンパク質および療法剤（単数または複数）の組み合わせもまた、本発明の範囲内である。本発明の組成物および組み合わせを用いて、例えば I L - 2 1 R シグナル伝達を調節することによって、I L - 2 1 R が関連する免疫障害を制御してもよい。

【0030】

[0028]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、i n v i t r o 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（i n t a c t）抗体から形成される二重特異性抗体）である。

【0031】

[0029]本発明の他の態様には、抗 I L - 2 1 R 結合性タンパク質をコードする単離核酸、当該核酸を含む発現ベクター、および当該ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれ

10

20

30

40

50

る。宿主細胞は、細菌、哺乳動物細胞、酵母細胞、植物細胞、または昆虫細胞であってもよい。

【0032】

[0030]結合性タンパク質は、結合したまたは結合していない結合性タンパク質の検出を促進するため、検出可能物質で直接または間接的に標識されていてもよい。適切な検出可能物質には、限定されるわけではないが、多様な酵素、補欠分子族 (prosthetic group)、蛍光物質、発光物質、および放射性物質が含まれる。

【0033】

[0031]別の側面において、本発明は、剤、例えば療法剤または細胞傷害剤を、IL-21R発現性細胞に *in vivo* で送達するかまたはターゲティングするための方法を提供する。当該方法には、IL-21Rへの結合性タンパク質の結合を可能にする条件下で、被験体に抗IL-21R結合性タンパク質を投与する工程が含まれる。当該結合性タンパク質を、第二の療法部分、例えば毒素にカップリングしてもよい。

10

【0034】

[0032]別の態様において、本発明は、本発明の結合性タンパク質または抗原結合性断片を含む、診断キットを提供する。

[0033]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。

20

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1a】[0034]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。

30

【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】[0035]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。

40

【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】[0036]図3(a-c)は、scFvによるマウスIL-21R-BaF3細胞

50

増殖の中和を示している。細胞を示された s c F v と混合し、次に 4 0 0 p g / m l のマウス I L - 2 1 とインキュベートした。4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) により測定した。

【図 3 b】図 3 ( a - c ) は、s c F v によるマウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞増殖の中和を示している。細胞を示された s c F v と混合し、次に 4 0 0 p g / m l のマウス I L - 2 1 とインキュベートした。4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) により測定した。

【図 3 c】図 3 ( a - c ) は、s c F v によるマウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞増殖の中和を示している。細胞を示された s c F v と混合し、次に 4 0 0 p g / m l のマウス I L - 2 1 とインキュベートした。4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) により測定した。

10

【図 4 a】[0037] 図 4 ( a - c ) は、マウス I L - 2 1 R への結合についての、親抗体 1 8 A 5 I g G と s c F v の競合を示している。s c F v をビオチン化マウス I L - 2 1 R - H / F と混合し、混合物を、E L I S A プレート上に固定化した抗体 1 8 A 5 に加えた。m I L - 2 1 R の捕捉は、H R P - ストレプトアビジンで検出し、m I L - 2 1 R への結合についての競合は A 4 5 0 シグナルの減少により示されている。

【図 4 b】図 4 ( a - c ) は、マウス I L - 2 1 R への結合についての、親抗体 1 8 A 5 I g G と s c F v の競合を示している。s c F v をビオチン化マウス I L - 2 1 R - H / F と混合し、混合物を、E L I S A プレート上に固定化した抗体 1 8 A 5 に加えた。m I L - 2 1 R の捕捉は、H R P - ストレプトアビジンで検出し、m I L - 2 1 R への結合についての競合は A 4 5 0 シグナルの減少により示されている。

20

【図 4 c】図 4 ( a - c ) は、マウス I L - 2 1 R への結合についての、親抗体 1 8 A 5 I g G と s c F v の競合を示している。s c F v をビオチン化マウス I L - 2 1 R - H / F と混合し、混合物を、E L I S A プレート上に固定化した抗体 1 8 A 5 に加えた。m I L - 2 1 R の捕捉は、H R P - ストレプトアビジンで検出し、m I L - 2 1 R への結合についての競合は A 4 5 0 シグナルの減少により示されている。

【図 5 a】[0038] 図 5 は、2 1 の重鎖 / 軽鎖対による I L - 2 1 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。I L - 2 1 を続けて加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞 (図 5 a - c) に対して実施した。

30

【図 5 b】図 5 は、2 1 の重鎖 / 軽鎖対による I L - 2 1 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。I L - 2 1 を続けて加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞 (図 5 a - c) に対して実施した。

【図 5 c】図 5 は、2 1 の重鎖 / 軽鎖対による I L - 2 1 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。I L - 2 1 を続けて加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞 (図 5 a - c) に対して実施した。

【図 5 d】図 5 は、2 1 の重鎖 / 軽鎖対による I L - 2 1 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。I L - 2 1 を続けて加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞 (図 5 d - f) に対して実施した。

40

【図 5 e】図 5 は、2 1 の重鎖 / 軽鎖対による I L - 2 1 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。I L - 2 1 を続けて加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞 (図 5 d - f) に対して実施した。

【図 5 f】図 5 は、2 1 の重鎖 / 軽鎖対による I L - 2 1 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。I L - 2 1 を続けて加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO (登録商標) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞 (図 5 d - f) に対して実施した。

50

【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。

10

【図6a】[0039]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-21RIgG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-21RIgG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。

20

【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-21RIgG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-21RIgG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-21RIgG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。

30

【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-21RIgG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-21RIgG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。

40

【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-21RIgG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-21RIgG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-l)を一過性に発現しているCHO細胞に対する21の抗IL-21RIgGの結合を示している。CHO細胞をIL-21R

50

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E L I S Aにおいて、HRPコンジュゲート抗ヒトI g G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 I g G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E L I S Aにおいて、HRPコンジュゲート抗ヒトI g G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 I g G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E L I S Aにおいて、HRPコンジュゲート抗ヒトI g Gで結合を検出した。

【図7a】[0040]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I g G上に捕捉され、マウスIL-21R-H/F、ヒトIL-13-H/F、ヒトIL-2R、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-2R及びヒト可溶性IL-4Rが、それぞれ特異的抗IL-2R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I g G上に捕捉され、マウスIL-21R-H/F、ヒトIL-13-H/F、ヒトIL-2R、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-2R及びヒト可溶性IL-4Rが、それぞれ特異的抗IL-2R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I g G上に捕捉され、マウスIL-21R-H/F、ヒトIL-13-H/F、ヒトIL-2R、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-2R及びヒト可溶性IL-4Rが、それぞれ特異的抗IL-2R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I g G上に捕捉され、マウスIL-21R-H/F、ヒトIL-13-H/F、ヒトIL-2R、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-2R及びヒト可溶性IL-4Rが、それぞれ特異的抗IL-2R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】[0041]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I g G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I g G上に捕捉された。ヒトIL-21R-His/FLAG(図8a

10

20

30

40

50

～ b) 及びマウス I L - 2 1 R - H i s / F L A G ( 図 8 c - 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 8 c】図 8 ( a - d ) は、ヒト及びマウス I L - 2 1 R に対する抗 I L - 2 1 R 抗体の結合を示している。示されたヒト抗 I L - 2 1 R 抗体は、BIACORE ( 商標 ) チップに固定化された抗ヒト I g G 上に捕捉された。ヒト I L - 2 1 R - H i s / F L A G ( 図 8 a ~ b ) 及びマウス I L - 2 1 R - H i s / F L A G ( 図 8 c - 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 8 d】図 8 ( a - d ) は、ヒト及びマウス I L - 2 1 R に対する抗 I L - 2 1 R 抗体の結合を示している。示されたヒト抗 I L - 2 1 R 抗体は、BIACORE ( 商標 ) チップに固定化された抗ヒト I g G 上に捕捉された。ヒト I L - 2 1 R - H i s / F L A G ( 図 8 a ~ b ) 及びマウス I L - 2 1 R - H i s / F L A G ( 図 8 c - 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 9 a】[0042] 図 9 は、ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R に対する抗 I L - 2 1 R 抗体の結合を示している。ヒト抗 I L - 2 1 R 抗体 A b S 及び A b T は、BIACORE ( 商標 ) チップに固定化された抗ヒト I g G 上に捕捉された。ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R - H i s / F L A G 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 9 a は、A b S へのカニクイザル I L - 2 1 R - H i s / F L A G 結合を示している。

【図 9 b】図 9 は、ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R に対する抗 I L - 2 1 R 抗体の結合を示している。ヒト抗 I L - 2 1 R 抗体 A b S 及び A b T は、BIACORE ( 商標 ) チップに固定化された抗ヒト I g G 上に捕捉された。ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R - H i s / F L A G 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 9 b は、A b S へのヒト I L - 2 1 R - H i s / F L A G 結合を示している。

【図 9 c】図 9 は、ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R に対する抗 I L - 2 1 R 抗体の結合を示している。ヒト抗 I L - 2 1 R 抗体 A b S 及び A b T は、BIACORE ( 商標 ) チップに固定化された抗ヒト I g G 上に捕捉された。ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R - H i s / F L A G 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 9 c は、A b T へのカニクイザル I L - 2 1 R - H i s / F L A G 結合を示している。

【図 9 d】図 9 は、ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R に対する抗 I L - 2 1 R 抗体の結合を示している。ヒト抗 I L - 2 1 R 抗体 A b S 及び A b T は、BIACORE ( 商標 ) チップに固定化された抗ヒト I g G 上に捕捉された。ヒト及びカニクイザル I L - 2 1 R - H i s / F L A G 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 9 d は、A b T へのヒト I L - 2 1 R - H i s / F L A G 結合を示している。

【図 1 0 a】[0043] 図 1 0 は、I L - 2 1 R 抗体のエピトープ評価を示している。図 1 0 a ( 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 I L - 2 1 R - H / F ( H i s - F l a g 融合タンパク質 ) は BIACORE ( 商標 ) チップ上に固定化された抗 I L - 2 1 R 抗体 A b S により捕捉された。追加の抗 I L - 2 1 R 抗体 ( A b S 、 A b T 、 D 5 ( D 5 - 2 0 、中和抗マウス I L - 2 1 R 抗体 ) 及び 7 C 2 ( 非中和抗マウス I L - 2 1 R 対照抗体 ) ) をチップ上に流し、捕捉された I L - 2 1 R - H / F へのそれらの結合をモニターした。

【図 1 0 b】[0043] 図 1 0 は、I L - 2 1 R 抗体のエピトープ評価を示している。図 1 0 b に示した実験において、ヒト I L - 2 1 R - H / F は BIACORE ( 商標 ) チップ上に固定化された抗 I L - 2 1 R 抗体により捕捉された。追加の抗 I L - 2 1 R 抗体 ( A b S 、 A b T 、及び 9 D 2 ( 非中和抗ヒト I L - 2 1 R 対照抗体 ) ) をチップ上に流し、捕捉された I L - 2 1 R - H / F へのそれらの結合をモニターした。

【図 1 1 a】[0044] 図 1 1 は、示された抗体による、ヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞及びマウス I L - 2 1 R - B a F 3 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 I L - 2 1 を加え、4 8 時間後、増殖を CELLTITER-GLO ( 登録商標 ) で測定した。アッセイは、1 0 0 p g / m l のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細

10

20

30

40

50

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】[0044]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】[0045]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。<sup>3</sup>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。<sup>3</sup>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】[0046]図13は、ヒト初代CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞へ加え、<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを3日後に測定した。

【図14】[0047]図14は、マウス初代CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞に加え、<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを3日後に測定した。

【図15】[0048]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PBMCI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】[0049]図16は、抗IL-21R抗体による相補的C1q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、C1q結合をニワトリ抗ヒトC1q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】[0050]図17(a-c)は、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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】[0051]図18(a-c)は、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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】[0052]図19(a-c)は、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン、CDR(H1、H2、H3、

10

20

30

40

50

L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b W のアミノ酸配列を示している。

【図 19 c】図 19 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b W のアミノ酸配列を示している。

【図 20 a】[0053] 図 20 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b S のアミノ酸配列を示している。

【図 20 b】図 20 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b S のアミノ酸配列を示している。

【図 20 c】図 20 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b S のアミノ酸配列を示している。

【図 21 a】[0054] 図 21 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b T のアミノ酸配列を示している。

10

【図 21 b】図 21 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b T のアミノ酸配列を示している。

【図 21 c】図 21 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b T のアミノ酸配列を示している。

【図 22 a】[0055] 図 22 ( a - c ) は V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b O のアミノ酸配列を示している。

【図 22 b】図 22 ( a - c ) は V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b O のアミノ酸配列を示している。

【図 22 c】図 22 ( a - c ) は V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b O のアミノ酸配列を示している。

20

【図 23 a】[0056] 図 23 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b P のアミノ酸配列を示している。

【図 23 b】図 23 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b P のアミノ酸配列を示している。

【図 23 c】図 23 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b P のアミノ酸配列を示している。

【図 24 a】[0057] 図 24 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b U のアミノ酸配列を示している。

【図 24 b】図 24 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b U のアミノ酸配列を示している。

30

【図 24 c】図 24 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b U のアミノ酸配列を示している。

【図 25 a】[0058] 図 25 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b V のアミノ酸配列を示している。

【図 25 b】図 25 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b V のアミノ酸配列を示している。

【図 25 c】図 25 ( a - c ) は、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン、CDR ( H 1、H 2、H 3、L 1、L 2 及び L 3 ) 及び定常領域を含む A b V のアミノ酸配列を示している。

【図 26 a】[0059] 図 26 ( a - g ) は、図 5、1 1、1 2、1 3 及び 1 4 ( 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。

40

【図 26 b】図 26 ( a - g ) は、図 5、1 1、1 2、1 3 及び 1 4 ( 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 26 c】図 26 ( a - g ) は、図 5、1 1、1 2、1 3 及び 1 4 ( 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 26 d】図 26 ( a - g ) は、図 5、1 1、1 2、1 3 及び 1 4 ( 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

50

。

【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】[0060]図27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28】

【発明を実施するための形態】

【0036】

[0061]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、先に記載される剤と比較した際、より高い効率で翻訳されうる。さらに、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>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変更されてきており、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。

【0037】

定義

[0062]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。

【0038】

[0063]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)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inker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')<sub>2</sub>、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。

10

20

30

40

50

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。

【0039】

[0064] 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、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。

10

20

【0040】

[0065] 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（ $\kappa$ ）またはラムダ（ $\lambda$ ）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、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。

30

40

【0041】

[0066] 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

50

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Streletssov (2005) Protein Sci. 14 (11) : 2901 - 09に記載される。

10

#### 【0042】

[0067]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)。

20

#### 【0043】

[0068]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目指す。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 (VL) および重鎖可変領域 (VH) 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VH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) VL、VH、CLおよびCH1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')<sub>2</sub>断片；(3) 2つのVHおよび1つのCH1ドメインを有するFd断片；(4) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインを有するFv断片；(5) VH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、VLおよびVHは、別個の遺伝子にコードされているが、組換え法を用い、VLおよびVH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

30

40

50

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。

【0044】

[0069]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。

【0045】

[0070]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。

10

【0046】

[0071]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、Kabata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。

20

【0047】

[0072]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。

30

【0048】

[0073]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；Ozakira（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-4に共有される鎖に相同である（Ozakira（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（c）と相互作用し、そしてSTAT1およびSTAT3（Asaoら（2001）上記）またはSTAT5（Ozakira（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

40

50

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。

10

20

30

40

50

#### 【0049】

[0074]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<sup>+</sup>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；Kasaiian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。

#### 【0050】

[0075]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(c)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；ならびに(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が含まれる。

【0051】

[0076]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。

10

【0052】

[0077]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。

20

【0053】

[0078]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、Altschul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。

30

【0054】

[0079]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。

40

【0055】

[0080]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

50

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  $K_a$  が約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  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。

#### 【0056】

[0081]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。

10

20

#### 【0057】

[0082]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る条件が含まれる。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 °C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 °C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 °C、60 °C、または65 °C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 °Cでのハイブリダイゼーション、その後、0.2xSSC/1%SDS、65 °C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。

30

40

#### 【0058】

表1：ハイブリダイゼーション条件

#### 【0059】

【表 1 - 1】

条件	ハイブリッド	ハイブリッド長 (bp) <sup>1</sup>	ハイブリダイゼーション温度 および緩衝剤 <sup>2</sup>	洗浄温度 および緩衝剤 <sup>2</sup>
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 <sub>B</sub> *; 1X SSC	T <sub>B</sub> *; 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 <sub>D</sub> *; 1X SSC	T <sub>D</sub> *; 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 <sub>F</sub> *; 1X SSC	T <sub>F</sub> *; 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 <sub>H</sub> *; 4X SSC	T <sub>H</sub> *; 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 <sub>J</sub> *; 4X SSC	T <sub>J</sub> *; 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 <sub>L</sub> *; 2X SSC	T <sub>L</sub> *; 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 <sub>N</sub> *; 6X SSC	T <sub>N</sub> *; 6X SSC

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

【表 1 - 2】

条件	ハイブリッド	ハイブリッド長 (bp) <sup>1</sup>	ハイブリダイゼーション温度 および緩衝剤 <sup>2</sup>	洗浄温度 および緩衝剤 <sup>2</sup>
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 <sub>F</sub> *; 6X SSC	T <sub>F</sub> *; 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 <sub>R</sub> *; 4X SSC	T <sub>R</sub> *; 4X SSC

10

## 【0061】

<sup>1</sup> 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。

20

## 【0062】

<sup>2</sup> ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液において、SSC（1x SSCは、0.15 M NaClおよび15 mMクエン酸ナトリウムである）の代わりに、SSPE（1x SSPEは、0.15 M NaCl、10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、および1.25 mM EDTA、pH 7.4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。

30

## 【0063】

T<sub>B</sub>\* ~ T<sub>R</sub>\* : 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<sub>m</sub>）より5~10 低くなくてはならず、ここでT<sub>m</sub>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<sub>m</sub>（ ） = 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<sub>m</sub>（ ） = 81.5 + 16.6（log<sub>10</sub> Na<sup>+</sup>） + 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<sup>+</sup>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（1x SSCに関して、Na<sup>+</sup> = 0.165 M）。

40

## 【0064】

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、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（1989）、およびAusubelら監修、Current Protocols in Molecular Biology, セクション2.10および6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc.（1995）に提供される。

## 【0065】

[0083]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

50

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。

【0066】

[0084]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。

【0067】

[0085]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。

【0068】

[0086]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。

【0069】

[0087]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。

## 【0070】

## 抗IL-21R結合性タンパク質

[0088]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<sup>TM</sup>)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。

10

## 【0071】

[0089]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。

20

## 【0072】

[0090]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、例えばシモノキー(*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システム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<sup>TM</sup>(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)。

30

## 【0073】

[0091]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、Morrisson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

40

50

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。

【0074】

[0092]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、Morrisson (1985) Science 229:1202-07; Oira (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。

10

【0075】

[0093]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、Tengra (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7308-73; Kozborra (1983) Immunol. Today 4:7279; Olserson (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)。

20

【0076】

[0094]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<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>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。排他的にはではないが、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<sub>H</sub> 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

30

40

50

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。

【0077】

[0095]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、FcRI、FcRII、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; Capelra(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。

10

20

【0078】

[0096]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( $\lambda$ )およびカッパ( $\kappa$ )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 $C_H1$ 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参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、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3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、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3とも呼ばれる)と呼ばれる。

30

40

【0079】

[0097]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。CDRH3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

50

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<sub>H</sub>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、Kabata CDR (Kabata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、Kabata CDRに関して記載される態様を実行してもよい。

#### 【0080】

[0098] 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<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1およびV<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>ドメインからなる。F<sub>v</sub>断片はより小さく、そして非共有的に連結されたV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>のC末端をV<sub>L</sub>のN末端に、あるいは(2) V<sub>L</sub>のC末端をV<sub>H</sub>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<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>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。

#### 【0081】

[0099]アセンブリ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<sup>10</sup>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)。

#### 【0082】

[0100]本発明の特定の態様において、結合性タンパク質は、単ドメイン結合性タンパク質である。単ドメイン結合性タンパク質には、CDRが単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ドメインタンパク質足場が含まれる。単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ドメイン結合性タンパク質が含まれる。

#### 【0083】

[0101]単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Streletssov (2005) Protein Sci. 14:2901-09に記載される。単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<sub>H</sub>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）。

10

#### 【0084】

[0102] 「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。ハイブリッドマの融合または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。

20

#### 【0085】

[0103] 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。

30

40

#### 【0086】

[0104] 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

50

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。

【0087】

[0105]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。

【0088】

[0106]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。

【0089】

[0107]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、Kabataら（（1991）上記）に記載されるように決定可能である。

【0090】

[0108]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~AbZ、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 s c F v 断片、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメイン、および C D R、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 2 A および 2 B に示す。

【 0 0 9 1 】

表 2 A : 現在の抗体コードおよび以前の名称の相関

【 0 0 9 2 】

【 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

10

20

30

40

【 0 0 9 3 】

表 2 B : 本発明の例示的な結合性タンパク質の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメイン、s c F v、ならびに C D R のアミノ酸およびヌクレオチド配列

【 0 0 9 4 】

【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 <sub>H</sub>	AA	14	16	18	20	6
V <sub>L</sub>	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 <sub>H</sub>	DNA	13	15	17	19	5
V <sub>L</sub>	DNA	9	9	9	9	21
scFv	DNA	109	111	113	115	117

10

20

表 2 B (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 <sub>H</sub>	AA	6	6	6	6	6
V <sub>L</sub>	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 <sub>H</sub>	DNA	5	5	5	5	5
V <sub>L</sub>	DNA	23	25	27	29	31
scFv	DNA	119	121	123	125	127

30

40

【 0 0 9 5 】

【表 2 - 3】

表 2 B (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 <sub>H</sub>	AA	6	6	6	6	6
V <sub>L</sub>	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 <sub>H</sub>	DNA	5	5	5	5	5
V <sub>L</sub>	DNA	33	35	37	39	41
scFv	DNA	129	131	133	135	137

10

20

表 2 B (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 <sub>H</sub>	AA	6	6	6	6	6
V <sub>L</sub>	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 <sub>H</sub>	DNA	5	5	5	5	5
V <sub>L</sub>	DNA	43	45	47	49	51
scFv	DNA	139	141	143	145	147

30

40

【 0 0 9 6 】

【表 2 - 4】

表 2 B (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 <sub>H</sub>	AA	6	6	6	6	6
V <sub>L</sub>	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 <sub>H</sub>	DNA	5	5	5	5	5
V <sub>L</sub>	DNA	53	55	57	59	61
scFv	DNA	149	151	153	155	157

10

20

表 2 B (続き)

領域	タイプ	L24 配列番号	L25 配列番号
V <sub>H</sub>	AA	6	6
V <sub>L</sub>	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 <sub>H</sub>	DNA	5	5
V <sub>L</sub>	DNA	63	65
scFv	DNA	159	161

30

40

【 0 0 9 7 】

[0109]本発明の抗 I L - 2 1 R 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<sub>L</sub>ドメインが、そのC末端で、C またはC 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<sub>H</sub>ドメインまたはその一部が、I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g M、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、K a b a t 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せられた、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン、またはその一部が含まれる。

50

## 【0098】

[0110]特定の態様は、A b A ~ A b Z、H 3 ~ H 6、L 1 ~ L 6、L 8 ~ L 2 1、および/またはL 2 3 ~ L 2 5由来のF v断片のV<sub>H</sub>ドメイン、V<sub>L</sub>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<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>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。

## 【0099】

[0111]特定の態様において、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>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。

10

## 【0100】

[0112]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、またはエラープロンプ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<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインの生殖系列配列は、V B A S Eデータベース(M R C Center for Protein Engineering、英国)に対してアミノ酸および核酸配列整理を行うことによって、同定可能である。V B A S Eは、G E N B A N K(登録商標)およびE M B L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、s c F vのFRは、V B A S E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。

20

## 【0101】

[0113]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A b A ~ A b Z、H 3 ~ H 6、L 1 ~ L 6、L 8 ~ L 2 1、またはL 2 3 ~ L 2 5の結合を競合的に阻害するように、A b A ~ A b Z、H 3 ~ H 6、L 1 ~ L 6、L 8 ~ L 2 1、またはL 2 3 ~ L 2 5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<sub>A</sub>)は、少なくとも10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>である。当該技術分野に知られる技術、例えばE L I S A、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。

30

## 【0102】

[0114]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。

[0115]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。

40

## 【0103】

[0116]配列相同性分析に加えて、エピトープマッピング(例えば、E p i t o p e M a p p i n g P r o t o c o l s (1996) M o r r i s 監修, H u m a n a P r e s s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

50

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(Engstrom(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(Fletcher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。

#### 【0104】

[0117]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<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>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)。

10

20

#### 【0105】

[0118]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、わずか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、こうしたわずかな相違(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と比較した際、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。

30

#### 【0106】

[0119]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。

#### 【0107】

[0120]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)。

40

#### 【0108】

[0121]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。

#### 【0109】

50

表 3 . 例示的なアミノ酸置換

【 0 1 1 0 】

【 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

10

20

30

【 0 1 1 1 】

[0122] 特定の態様において、保存的な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。

【 0 1 1 2 】

[0123] 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。

40

【 0 1 1 3 】

[0124] 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。

50

## 【 0 1 1 4 】

[0125]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。

10

## 【 0 1 1 5 】

[0126]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Applin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プロセッシングに関与する。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ッシングは、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ッシングに関与し、これには、ゴルジマンノシダーゼIA、IBおよびIC、GlcNA

20

30

40

50

c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。

【0116】

[0127]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。

10

【0117】

[0128]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)。

【0118】

[0129]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、C1q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)。

20

30

【0119】

[0130]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<sub>3</sub>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。

40

【0120】

[0131]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

50

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。

【0121】

[0132]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<sup>131</sup>Iおよび<sup>99</sup>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。

【0122】

[0133]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 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の結合定数でヒトIL-21Rに結合する；（8）少なくとも約 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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1.75 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>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0.5 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>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14.0 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>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1.9 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>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1.5 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>で、IL-21により媒介されるヒト初代CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を阻害する；および（16）約5.0 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>で、IL-21により媒介されるネズミ初代CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を阻害する。

【0123】

[0134]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

[0135]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。

【0124】

[0136]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<sub>H</sub>ドメイン、V<sub>L</sub>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。

【0125】

[0137]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。

## 【0126】

[0138]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、カップ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・カップ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、I g G (例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4)、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、およびI g E 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、I g G (例えばI g G 1) アイソタイプであってもよい。

## 【0127】

[0139]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)。

## 【0128】

[0140]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。

## 【0129】

[0141]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。

[0142]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。

## 【0130】

[0143]やはり提供するのには、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<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>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。

## 【0131】

[0144]抗原結合性断片、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>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。

## 【0132】

[0145]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

10

20

30

40

50

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。

10

#### 【0133】

[0146]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。

20

#### 【0134】

[0147]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。

30

#### 【0135】

##### 抗IL-21R結合性タンパク質の使用

[0148]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、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、および強直性脊椎炎を含む）、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、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。

40

#### 【0136】

##### 併用療法

50

[0149] 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。

【0137】

[0150] 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、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。

10

【0138】

[0151] 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のように配合された少なくとも1つの療法剤を含む。

20

【0139】

診断使用

[0152] 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、医学的状态と相関させることによって、当業者は、関連する医学的状态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态には、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。

30

【0140】

[0153] 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、イムノプロット、ウェスタンプロット、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。

40

【0141】

[0154] 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。

【0142】

[0155] 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

50

、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。

#### 【0143】

##### 医薬組成物および投与法

[0156]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、  
10  
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。

#### 【0144】

[0157]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、  
20  
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。

#### 【0145】

[0158]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。  
30

#### 【0146】

[0159]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。  
40

#### 【0147】

[0160]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  
50

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。

【0148】

[0161]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。

10

【0149】

[0162]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)。

20

【0150】

[0163]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、および医学的状态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ポ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。

【0151】

[0164]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。

30

【0152】

[0165]被験体に投与可能な投薬量範囲の例は：1 $\mu$ g/kg~20mg/kg、1 $\mu$ g/kg~10mg/kg、1 $\mu$ g/kg~1mg/kg、10 $\mu$ g/kg~1mg/kg、10 $\mu$ g/kg~100 $\mu$ g/kg、100 $\mu$ g/kg~1mg/kg、250 $\mu$ g/kg~2mg/kg、250 $\mu$ g/kg~1mg/kg、500 $\mu$ g/kg~2mg/kg、500 $\mu$ g/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、投与方法、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。

40

【0153】

[0166]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、

50

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。

【0154】

[0167]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<sub>50</sub>（集団の50%に対して致死である用量）およびED<sub>50</sub>（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<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>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。

【0155】

[0168]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<sub>50</sub>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<sub>50</sub>（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。

10

20

【0156】

[0169]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】

【0157】

[0170]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

[0171]米国特許第7、495、085号（本明細書において参考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ピオチン化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。

30

実施例2：ライブラリー構築

[0172]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pCANTAB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。

【0158】

[0173]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<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>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<sub>H</sub> CDR3 [配列番号199及び200]；H3B1（ライブラリーサイズ1.40×10<sup>9</sup>）[配列番号201及び202]；H3B2（ライブラリーサイズ1.00×10<sup>9</sup>）[配列番号203及び204]；IL-21R：18A5 V<sub>L</sub> CDR3 [配列番号205及び206]；L3B1（ライブラリーサイズ9.00×10<sup>9</sup>）[配列番号207及び208]；L3B2（ライブラリーサイズ6.40×10<sup>9</sup>）[配列番号209及び210]。

40

実施例3：ファージ選択

[0174]18A5の全ての誘導体は、溶液相でピオチン化ヒトIL-21R細胞外ドメイ

50

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

[0175] 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。

10

#### 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

[0176] 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/100 µg/mlアンピシリンを含む990 µl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 (999 rpm)で約4時間増殖させた。培養物を、0.02 mMの最終濃度のIPTGで誘導し、30 (999 rpm)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150 µlのTESペリプラスム緩衝液(50 mMトリス/HCl (pH 8.0)/1 mM EDTA (pH 8.0)/20%スクロース)に再懸濁し、続いて150 µl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。

20

#### 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

[0177] 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體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/0.4 M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10 µlを黒色384-浅底ウェルプレート(Nunc, Rochester, NY)に移した。次に5 µl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4.8 nMビオチン-hIL-21R-H/Fあるいは40 nMビオチン-mIL-21R-H/Fの混合物5 µl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(340 nm励起、615 nm及び665 nm発光)。18A5抗体との競合は、665 nmでの発光及び615 nm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。

30

40

#### 【0159】

[0178] 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

[0179] 親18A5 scFv分子よりも改良されたIL-21R結合を有する287の18A5 scFv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

50

。V<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>L</sub> 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<sub>L</sub> 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<sub>L</sub> CDR3のN末端での）の変化に由来していた。

【0160】

[0180] s c F v の P C R 増幅は、製造元の使用説明書に従い、H N 緩衝液（Epicentre Biotechnologies, Madison, WI）中、VENT（登録商標）D N A ポリメラーゼ（New England Biolabs, Ipswich, 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5 μ l を、20 μ l 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。P C R 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、Exo I / S A P（エビアルカリホスファターゼ）で精製した。

10

【0161】

[0181] 27 s c F v の C D R 3 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 s c F v 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。

20

【0162】

## 【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

10

20

30

## 【 0 1 6 3 】

## 実施例 6：ライブラリー由来 s c F v の特徴付け

## 実施例 6.1：定量分析のための精製 s c F v の調製

[0182] 個々の s c F v 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、50 ml 円錐チューブ中、0.1% グルコース / 100  $\mu$ g / ml アンピシリンを含む 20 ml の 2 x TY 培地において、250 rpm で振盪しながら 37 °C にて中期対数増殖期まで増殖させた。s c F v の発現は 0.02 mM の最終濃度の IPTG で誘導し、培養物を 30 °C で一晩増殖させた。細胞を遠心分離により回収し、1 ml の TES ペリプラスム緩衝液に再懸濁し、続いて 1 ml 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 3200 rpm で 10 分、4 °C にて遠心分離し、上清を 2 mM MgCl<sub>2</sub> とした。s c F v は、Perkin Elmer (Waltham, MA) MINITRAK (商標) IX 液体処理口ポ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、200 mM イミダゾール、50 mM トリス、300 mM NaCl (pH 8.0) 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。

40

50

### 実施例 6 . 2 : ヒト又はマウス I L - 2 1 R を過剰発現している細胞の I L - 2 1 依存性増殖についてのアッセイ

[0183] 1 8 A 5 由来結合タンパク質 ( s c F v 及び I g G ) で阻害アッセイを実施し、ヒト又はマウス I L - 2 1 R でトランスフェクトされた細胞株の I L - 2 1 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 B a F 3 細胞、及びヒト赤血球細胞株である T F 1 細胞に、 I L - 2 1 R 及び緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) をレトロウイルスにより形質導入した。細胞を、 1 0 % F B S 、 2 m M L - グルタミン、 1 0 0 U / m l ペニシリン、 1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン及び 0 . 0 0 0 3 6 % -メルカプトエタノールを含有する R P M I 1 6 4 0 中でルーチ的に増殖させた。ヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞培養液には、 5 0 n g / m l のヒト I L - 2 1 を補給し；マウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞培養液には、 1 0 U / m l の I L - 3 を補給し； T F 1 細胞培養液には、 5 0 n g / m l の G M - C S F 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、 3 7 / 5 % C O <sub>2</sub> 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、 5 0 0 0 細胞を 9 6 ウェル平底白色組織培養プレート ( Thermo Scientific, Waltham, MA ) の中央の 6 0 ウェルに、 5 5 μ l / ウェルの容量で加えた。試験 s c F v 又は I g G 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。 2 5 μ l の結合タンパク質試料を細胞に加え、 3 7 / 5 % C O <sub>2</sub> で 3 0 分インキュベートした。 1 0 0 - 4 0 0 p g / m l のヒト又はマウス I L - 2 1 を含有する 2 0 μ l のアッセイ培地を各ウェルに加え、細胞をさらに 4 8 時間インキュベートした。プレートを室温とし、 1 5 μ l / ウェルの CELLTITER-GLO ( 登録商標 ) を添加し、室温で 1 0 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、 1 0 8 の s c F v を、三つすべての細胞株の I L - 2 1 依存性増殖の中和について試験した。すべて、親 1 8 A 5 s c F v の I C <sub>50</sub> より低い又は同等の値でヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞の中和を示した。一部は、マウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞増殖及びヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞の強い中和を示した。 2 7 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。

#### 【 0 1 6 4 】

[0184] 図 1 - 3 は、ヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞 ( 図 1 a - c ) ; ヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞 ( 図 2 a - c ) 及びマウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞 ( 図 3 a - c ) の s c F v による増殖の中和を示している。細胞を示された s c F v と混合し、 1 0 0 p g / m l ( 図 1 - 2 ) 又は 4 0 0 p g / m l ( 図 3 ) のヒト I L - 2 1 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

[0185] 精製した s c F v は、酵素連結免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) においてマウス I L - 2 1 R への結合について、親 1 8 A 5 抗体と競合するそれらの能力を定量的に分析した。 9 6 ウェル Nunc MAXISORP ( 登録商標 ) プレートを、 P B S 中 0 . 7 5 μ g / m l の濃度の親 1 8 A 5 抗体を用いて、 4 で一晩コートした。プレートは P B S を使用して 3 回洗浄し、次に、 P B S / 1 % B S A / 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 中、室温で 3 時間ブロックした。 s c F v を、 3 6 n M ビオチン化 m I L - 2 1 R - H / F と混合し、室温で 1 0 分インキュベートした。ブロックしたプレートは P B S で 3 回洗浄し、 5 0 μ l / ウェルの s c F v / I L - 2 1 R 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 P B S 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 : 6 0 0 0 希釈液を添加し、結合されたビオチン化 m I L - 2 1 R - 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、 P B S で 7 回洗浄した。 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B ) を使用してシグナルを発生させ、 H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> で反応を停止し、 ENVISION ( 商標 ) プレートリーダー ( Perkin Elmer ) を用いて 4 5 0 n m で吸光度を読み取った。PhyNexus IMACチップにより精製された 1 0 8 の s c F v をこのアッセイで試験し、ほとんどが、親 1 8 A 5 s c F v の I C <sub>50</sub> より低い値で、ビオチン化マウス I

L - 2 1 R - H / F への結合について親 1 8 A 5 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 2 7 のクローンについてのエピトープ競合データが図 4 a - c に示されており、表 5 に要約されている。

【 0 1 6 5 】

【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 <sub>50</sub> (nM)	ヒト IL-21R-TF1 中和アッセイに おける IC <sub>50</sub> (nM)	マウス IL-21R-BaF3 中和アッセイに おける IC <sub>50</sub> (nM)	マウス IL-21R エピ トープ競合 ELISA に おける IC <sub>50</sub> (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	20
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	30
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	

【 0 1 6 6 】

実施例 7：親 1 8 A 5 I g G の生殖細胞系列 (germline) 配列への変換

[0186] 修飾された V<sub>L</sub> 領域を有する以下の 1 5 の s c F v を、生殖細胞系列化親 1 8 A 5 V<sub>L</sub> とともに (以下を参照されたい)、完全長ヒト I g G ラムダ：L 2、L 3、L 6、L 9、L 1 1、L 1 3、L 1 4、L 1 6、L 1 7、L 1 8、L 1 9、L 2 0、L 2 3、L 2 4 及び L 2 5 への変換に選択した。修飾された V<sub>H</sub> 領域を有する 4 つの s c F v、H 3、H 4、H 5 及び H 6 を、生殖細胞系列化親 1 8 A 5 V<sub>H</sub> とともに (以下を参照されたい)、完全長ヒト I g G 1 への変換に選択した。

[0187] 親 1 8 A 5 抗体の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> アミノ配列は、C D R 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<sub>H</sub> の場合、D P 6 7 / V H 4 B + (V B A S E \_\_ A A : W A P 0 0 C E A Z \_\_ 1) 及び J H 1 / J H 4 / J H 5、そして V<sub>L</sub> の場合、D P L 1 6 / V L 3 . 1 (V B A S E \_\_ A A : W A P 0 0 C E M I \_\_ 1)。修飾は、GENEART(Regensburg, Germany)での遺伝子合成及び P C R 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 GENE

ART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

【0167】

【化1】

親18A5 V<sub>H</sub>

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGACTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCT  
GTCTCTGGTTACTCCATCAGCAGTGGTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGTTG  
GAGTGGATTGGGAGTATCTCTCATACTGGGAACACCTACTACAACCCGCCCTCAAGAGTCGCGTCACC  
ATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCC  
GTGTATTACTGTGCGCGAGGTGGGGGAATTAGCAGGCCGGAGTACTGGGGCAAAGGCACCCTGGTCACC  
GTCTCGAGT (配列番号5)

10

【0168】

【化2】

生殖細胞系列化18A5 V<sub>H</sub>

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCC  
GTGTCCGGCTACTCCATCTCCTCCGGCTACTACTGGGGCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAGGGCCTG  
GAGTGGATCGGCTCCATCTCTCACACCGGCAACACCTACTACAACCCCTCTGAAGTCCAGAGTGACC  
ATCTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCTGTGACCGCTGCCGATACCGCC  
GTGTACTACTGTGCCAGAGGCGGCGGAATCTCCAGACCTGAGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACC  
GTGTCTCT (配列番号7)

20

【0169】





## 【化7】

親(配列番号6) QVQLQESGPGLVKTSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWRQPPGKG  
 生殖細胞系列化(配列番号8) QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGYYWGWRQPPGKG

親 LEWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGGISRP  
 生殖細胞系列化 LEWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGGISRP

親 EYWGKGLTVTVSS  
 生殖細胞系列化 EYWGQGTLTVTVSS

10

## 【0176】

生殖細胞系列修正 V<sub>L</sub> 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)

## 【0177】

## 【化8】

親(配列番号10) SSELTDPPVSVVALGQTVTLTCQGDLSLRTYYASWYQQKSGQAPIL  
 生殖細胞系列化(配列番号12) SSELTDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPQAPVL

20

親 LLYGKHKRPSGIPDRFSGSTSGDTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPHVLFGGGTQ  
 生殖細胞系列化 VIYGKHKRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPHVLFGGGTQ

親 LTVL  
 生殖細胞系列化 LTVL

30

## 【0178】

## 実施例8：ライブラリー由来 s c F v の I g G への変換

[0188]改良された 18A5 s c F v 誘導体の V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> 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<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 遺伝子の 5' 部分を包含する PCR 断片は、プライマー B s s H I I \_ \_ I I \_ \_ V \_ \_ H \_ \_ F (5' - G C T T G G C G C G C A C T C T C A G G T G C A G C T G C A G G A G - 3') [配列番号230] 及び G V \_ \_ R \_ \_ f o r \_ \_ B s s H I I (5' - T C A G G G A G A A C T G G T T C T T G G - 3') [配列番号231] でのプラスミド p S M E D 2 \_ \_ O P 1 8 A 5 G \_ \_ h u I g G 1 の増幅により発生させた。改良された s c F v クローン V<sub>H</sub> 3 から V<sub>H</sub> 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 \_ \_ f o r \_ \_ S a l I (5' - T C C A A G A A C C A G T T C T C C C T G - 3') [配列番号232] 及び s c F v \_ \_ S a l I \_ \_ V \_ \_ H \_ \_ R (5' - G C G A C G T C G A C A G G A C T C A C C A C T C G A G A C G G T G A C C A G G G T G C C - 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 B s s H I I \_ \_ G \_ \_ V \_ \_ H \_ \_ F 及び S a l I \_ \_ V \_ \_ H \_ \_ R で増幅して完全 V<sub>H</sub> 遺伝子断片を発生させた。これを B s s H I I 及び S a l I で消化し、三重変異体ヒンジ領域を有するヒト I g G 1 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<sub>H</sub> J セグメントのコード配列を変化させるため、B s s H I I \_ \_ I I \_ \_ V \_ \_ H \_ \_ F 及び新規プライマー (S a l I \_ \_ V \_ \_ H \_ \_ R \_ \_ R J (5' - G C G A C G T C G A C A G G A C T C A C C A C T C G A G A C G G - 3')) [配列番号234] で再増幅し、J H 1 生殖細胞系列配列を一致さ

40

50

せ、そしてヒト I g G 1 - 三重変異体定常領域ベクター内にライゲートした。

【0179】

[0189]改良された s c F v からの V<sub>L</sub> 遺伝子は、同様の方法によりサブクローン化した。18A5 V<sub>L</sub> 遺伝子の 5' 部分を包含する PCR 断片は、プライマー B s s H I I \_\_ I I \_\_ V<sub>L</sub> \_\_ F (5' - G C T T G G C G C G C A C T C T T C C T C T G A G C T G A C C C A G - 3') [配列番号235] 及び s c F v \_\_ V<sub>L</sub> \_\_ R \_\_ f o r \_\_ B s s H I I (5' - G C C T G A G C C C C A G T G A T G G T C A - 3') [配列番号236] でのプラスミド p S M E N 2 \_\_ O P 1 8 A 5 G \_\_ h u ラムダの増幅により発生させた。改良された s c F v クローンからの V<sub>L</sub> 遺伝子の 3' 部分を包含する PCR 断片は、プライマー G V<sub>L</sub> \_\_ F \_\_ f o r \_\_ X b a I (5' - A C C G C C T C C C T G A C C A T C A C - 3') [配列番号237] 及び s c F v \_\_ X b a I \_\_ V<sub>L</sub> \_\_ R (5' - G C G C C G T C T A G A G T T A T T C T A C T C A C C T A A A C G G T G A G C T G G G T C C C T C - 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 B s s H I I \_\_ I I \_\_ V<sub>L</sub> \_\_ F 及び s c F v \_\_ X b a I \_\_ V<sub>L</sub> \_\_ R で増幅して、完全 V<sub>L</sub> 遺伝子断片を発生させた。これらを B s s H I I 及び X b a I 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 I g G 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

[0190]クローンは、c o s - 7 細胞での一過性発現後、完全 I g G 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<sub>L</sub> 及び L 2、L 3、L 6、L 9、L 11、L 13、L 14、L 16、L 17、L 18、L 19、L 20、L 23、L 24 及び L 25)の組における各軽鎖を5つの試験配列(H 3、H 4、H 5 及び H 6、ならびに V<sub>H</sub> \_\_ P、生殖細胞系列化親 18A5 V<sub>H</sub> 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(1.4 μg)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 c o s - 7 細胞の単層に加えた。24時間後、培養液を無血清培地(R1CD1)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 I g G E L I S A により定量した。

実施例 9 . 2 : 細胞増殖の中和における抗 I L - 2 1 R I g G の活性

[0191]血清を含まない条件培地中の 80 の一過性に発現された I g G は、上記の3つの細胞株での I L - 2 1 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 I L - 2 1 R - B a F 3 細胞、(2)マウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞、及び(3)ヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞。80 対すべてがヒト I L - 2 1 R 発現 B a F 3 細胞の増殖の中和を示し、V H 4 を含んでいるものを除いたすべての対がヒト I L - 2 1 R 発現 T F 1 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 I L - 2 1 R 発現 B a F 3 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 V H 4 重鎖と関係していた(データは示さない)。最も強力な 2 1 の I g G 組み合わせ(A b A - A b U)は図 5 に示されており、I C<sub>50</sub> データは、表 6 に要約されている。

【0180】

[0192]アッセイは、100 pg / ml のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - B a F 3 細胞(図 5 a - c)、100 pg / ml のヒト I L - 2 1 を加えたヒト I L - 2 1 R - T F 1 細胞(図 5 d - f)、又は、400 pg / ml のマウス I L - 2 1 を加えたマウス I L - 2 1 R - B a F 3 細胞(図 5 g - i)に対して実施した。I L - 2 1 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 2 6 a - 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 I L - 2 1 R への抗 I L - 2

1 R I g G 結合

[0193]結合タンパク質のサブセットを、CHO - PA - Duk x 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 - 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、0.9 mM  $CaCl_2$  及び0.45 mM  $MgCl_2$  含有PBS (PBS / Ca Mg) で穏やかに5回洗浄し、PBS / Ca Mg / 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 I g G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 / Ca Mg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I g Gと、室温で1時間インキュベートした。次に細胞をPBS / Ca Mg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100  $\mu$ l TMBとインキュベートし、100  $\mu$ lの0.18 M  $H_2SO_4$  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。

10

## 【0181】

[0194]21のI g G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細胞上一過性に発現された対照タンパク質(ヒトガンマ( )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、I g Gのサブセット(A b D、A b E、A b F、A b H、A b L、及びA b M)は、バックグラウンドを超え13 nM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。

20

## 【0182】

【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 <sub>50</sub> (nM)	ヒト IL-21R-TF1 増殖 IC <sub>50</sub> (nM)	マウス IL-21R-BaF3 増殖 IC <sub>50</sub> (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	10
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	20
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	

## 【 0 1 8 3 】

実施例 9 . 4 : ヒト I L - 2 1 R への抗 I L - 2 1 R I g G 結合の選択性の BIACORE ( 商標 ) 分析

[0195]一過性に発現された抗 I L - 2 1 R 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 ) 2 0 0 0 表面プラズモン共鳴装置で試験した。抗ヒト I g G、抗マウス免疫グロブリン抗体及びマウス I L - 2 1 R - 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 ( C M 5 ) 上に固定化した。センサーチップ表面を、2 0 μ l / 分の流量で 7 分、E D C / N H S 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 F c 抗体 ( I n v i t r o g e n C o r p o r a t i o n , C a r l s b a d , C A ) の 7 , 1 5 0 レゾナンスユニット ( R U ) 及びフローセル 3 の抗マウス F c 抗体の 7 , 5 0 0 R U ) は、酢酸ナトリウム緩衝液 ( p H 5 . 0 ) で 1 0 μ g / m l まで希釈し、活性化表面に注入した。残存活性化基は、1 . 0 M エタノールアミン ( p H 8 . 0 ) でブロックした。抗ヒト I g G 及び抗マウス I g G の分子量は、両方とも 1 5 0 k D であり、I L - 2 1 R モノマーの分子量は、2 7 k D であった。

## 【 0 1 8 4 】

[0196]抗 I L - 2 1 R 抗体及び抗体対照 ( マウス抗ヒト I L - 2 R 及びマウス抗ヒト I L - 4 R ( R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N ) ; ヒト抗ヒト I L - 1 3 ( W y e t h , C a m b r i d g e , M A ) ) を含有する条件培地は、0 . 2 % ウシ血清を補給した H B S / E P 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秒の洗浄時間につき、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-2R及びヒトsIL-4R(R&D Systems))の50 nM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(pH 1.5)5 µl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。

#### 【0185】

[0197]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-2R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-2R及びヒト可溶性IL-4Rが特異的抗IL-2R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

[0198]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25 µg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、0.22 µm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、20 mMクエン酸/150 mM塩化ナトリウム(pH 2.5)で溶出し、トリス(pH 8.5)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

[0199]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、20 µl/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、20 µg/mlに10 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)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、1.0 Mエタノールアミン-HCl(pH 8.5)でブロックした。

#### 【0186】

[0200]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0.1-0.2 µg/mlに希釈し、BIAcore(商標)チップにロードした。短い洗浄時間につき、0-100 nMヒトIL-21R-H/F又は10-500 nMマウスIL-21R-H/Fの溶液を50 µl/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、そしてヒトIL-21Rについては15分及びマウスIL-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(pH 1.5)10 µlの2回注入及び30 µl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で行った。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 7 B に示されている。

【 0 1 8 7 】

[0201] 加えて、上記プロトコルにより、カニクイザル IL - 2 1 R - H i s / F L A G への結合動力学について A b S 及び A b T を試験した。ヒト及びカニクイザル IL - 2 1 R - H / F の結合プロファイルは A b S 及び A b T 両方について同様であった ( 図 9 )。図 9 は、A b S ( 9 a ) 及び A b T ( 9 c ) に対するカニクイザル IL - 2 1 R - H i s / F L A G の結合 ; 及び A b S ( 9 b ) 及び A b T ( 9 d ) に対するヒト IL - 2 1 R - H i s / F L A G の結合を示している。

【 0 1 8 8 】

【表 7 A】

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

抗体	ヒト IL-21R			マウス IL-21R		
	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

【 0 1 8 9 】

【表 7 B】

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

抗体	ヒト IL-21R		
	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

【 0 1 9 0 】

#### 実施例 9 . 7 : BIACORE エピトープ競合アッセイ

[0202] 抗体 A b S 及び A b T 及び親抗体 1 8 A 5 を直接 C M 5 BIACORE ( 商標 ) チップ上に固定化した。マウス IL - 2 1 R - H / F ( 1 0 0 n M ) を 3 0 0 秒間チップ上に流し、続いて洗浄し ( 1 0 0 秒 )、そして次に A b S、A b T、D 5 あるいは非中和抗 m I L - 2 1 R 抗体 ( 7 C 2 ) の 5  $\mu$  g / m l 溶液を表面に流した。A b S、A b T 及び D 5 では追加の結合は観察されず、m I L - 2 1 R - H / F 上のそれらの結合部位が A b S、A b T 又は 1 8 A 5 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 1 0 a )。対照的に、非中和対照抗 I L - 2 1 R 抗体 7 C 2 は、A b S、A b T 又は 1 8 A 5 抗体上に捕捉された m I L - 2 1 R - 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。

【0191】

[0203]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

[0204]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。

【0192】

【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 <sub>50</sub> (nM)	マウス IL-21R-BaF3 中和 IC <sub>50</sub> (nM)	ヒト IL-21R-TF1 中和 IC <sub>50</sub> (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)

【0193】

実施例9.9:初代ヒトB細胞増殖アッセイ

[0205]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パフィーコート(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<sup>+</sup>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、1×10<sup>5</sup>/ウェルで培養した。B細胞は、5%CO<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sup>3</sup>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。

<sup>3</sup>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 12 a - b、表 9；図 26 e も参照されたい）。

【 0 1 9 4 】

【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 <sub>50</sub> (nM)
AbQ	0.16
AbR	0.22
AbS	0.44
AbT	0.14
AbU	0.13
18A5 抗体	1.86

10

【 0 1 9 5 】

実施例 9 . 1 0：初代ヒト T 細胞増殖アッセイ

[0206] 抗 IL - 21 R 抗体を、初代ヒト CD 4<sup>+</sup> 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パフィーコート細胞は Massachusetts General Hospital から得た。CD 4<sup>+</sup> T 細胞は、製造元の使用説明書に従って RO SETTESEP (商標) CD 4<sup>+</sup> 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% CD 4<sup>+</sup> / CD 3<sup>+</sup> T 細胞であった。濃縮したヒト CD 4<sup>+</sup> T 細胞は、5% CO<sub>2</sub> に調整した 37 インキュベーターにおいて、10% FBS、100 U / ml ペニシリン、100 μg / ml ストレプトマイシン、2 mM L - グルタミン及び HEPES を含有する RPMI 中、抗 CD 3 / 抗 CD 28 でコートしたマイクロスフェアで 3 日間活性化した。活性化後、マイクロスフェアを除去し、細胞を洗浄し、培地中、およそ 1 x 10<sup>6</sup> 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 (20 ng / ml 最終濃度) 及び活性化及び静止 CD 4<sup>+</sup> T 細胞 (10<sup>5</sup> 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、1 μCi / ウェルの <sup>3</sup>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、<sup>3</sup>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 10 A；図 26 f も参照されたい）。

20

30

【 0 1 9 6 】

## 【表 10 A】

表 10 A : ヒト初代 T 細胞増殖の中和

抗体	T細胞増殖の中和 IC <sub>50</sub> (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

10

## 【 0 1 9 7 】

## 実施例 9 . 1 1 : 初代マウス T 細胞増殖アッセイ

[0207] 抗 IL - 2 1 R 抗体を、初代マウス CD 8 <sup>+</sup> T 細胞の IL - 2 1 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 B A L B / 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 . 1 6 M NH<sub>4</sub>Cl を含有する 0 . 0 1 7 M トリス ( pH 7 . 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 CD 8 サブセットカラムキット ( R & D Systems ) を使用して CD 8 <sup>+</sup> 細胞を濃縮した。マウス CD 8 <sup>+</sup> 細胞 ( 3 × 1 0 <sup>4</sup> ; 1 0 % ウシ胎仔血清を含有し、そして 0 . 0 5 m M β -メルカプトエタノール、2 m M L - グルタミン、0 . 1 m M 非必須アミノ酸、1 m M ビルビン酸ナトリウム、1 0 0 U / m l ペニシリン、1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン及び 5 0 μ g / m l ゲンタマイシンを補給した D M E M に懸濁) を 9 6 ウェル、抗 m C D 3 活性化プレート ( BD Biosciences ) に蒔き ; m I L - 2 1 ( 5 0 n g / m l ) を、すべてのウェルに加えた。試験抗体は 2 0 μ g / m l から始めて、三重に力価を測定した。細胞は、3 7 % / 1 0 % C O<sub>2</sub> 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 . 5 μ C i のメチル - <sup>3</sup> 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。Ab P は別として、改良された抗体のすべてが、親 1 8 A 5 抗体より強い効力で IL - 2 1 依存性増殖を中和した ( 図 1 4、表 1 0 B ; 図 2 6 g も参照されたい ) 。

20

30

## 【 0 1 9 8 】

## 【表 10 B】

表 10 B : マウス初代 T 細胞増殖の中和

抗体	T 細胞増殖の中和 IC <sub>50</sub> (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

10

## 【 0 1 9 9 】

## 実施例 9 . 1 2 : A D C C アッセイ

[0208] 抗 I L - 2 1 R 抗体は、標的細胞に結合した場合に抗体依存性細胞毒性 ( A D C C ) を誘発するそれらの能力について試験した。実験の前日、パフィーコートで P B S 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 P B M C を単離した。FICOLL (登録商標) 層の上層から P B M C を除き、10ng/ml I L - 2 及び 10ng/ml I L - 1 2 (R&D Systems) で一晩刺激した。実験当日、遠心分離により P B M C を回収し、 $1 \times 10^8$  細胞/ml で培地に再懸濁した。B J A B 細胞は、 $0.5 \mu M$  C F S E (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 P B S で 2 回洗浄した。細胞は次に、100  $\mu l$  の培地中、 $2 \times 10^5$  細胞/ウェルで 96 ウェル平底プレートに蒔いた。50  $\mu l$  の 4 x 抗体、続いて 50  $\mu l$  の  $5 \times 10^6$  P B M C を B J A B 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 (P I) 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 (C F S E<sup>+</sup>) は、FACSCALIBUR (商標) フローサイトメーター (BD Biosciences) において P I 染色を測定することにより評価した。野生型ヒト I g G 1 定常領域を有するただ一つの抗 I L - 2 1 R 抗体、A b Z のみが、標的細胞結合しない対照抗 I L - 1 3 抗体により示されたバックグラウンドレベルより上の A D C C を示した。ヒト I g G 4 (A b Y) を有する形態及びヒト I g G 1 の二重変異体 (A b X) 及び三重変異体 (A b T) を有する形態を含み、A b Z と同一の変域ドメインを有するすべての抗体が、A D C C 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 I L - 2 1 R 抗体のすべてがヒト I g G 1 の三重変異体形を含んでおり、バックグラウンド A D C C 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 A D C C を誘発した。

20

30

40

## 【 0 2 0 0 】

## 実施例 9 . 1 3 : C l q E L I S A

[0209] 抗 I L - 2 1 R 抗体による細胞表面結合が補体依存性細胞傷害 (C D C) を導き易いかどうかを決定するため、E L I S A において、相補的成分 C l q へ結合するそれらの能力について抗体を試験した。I L - 2 1 R 抗体及びリツキシマブ (RITUXAN (登録商標)) を P B S で 5  $\mu g/ml$  に希釈した。希釈した抗体 (100  $\mu l$ ) で COSTAR (登録商標) 高結合 E L I S A プレート (Corning Life Sciences, Lowell, MA) を 4 で一晩コートした。プレートを P B S / ツイーン 20 で 3 回洗浄し、室温にて 1 時間、200  $\mu l$  のブロッキング緩衝液 (0.1 M N a P O<sub>4</sub>、0.1 M N a C l、0.1% ゼラチン、0.01% ツイーン) でブロックした。C l q を含むと前もって決定されたヒト血清

50

(Quidel, San Diego, CA) を P B S で 1 : 5 0 に希釈した。1 時間のブロッキング後、プレートを洗浄し、1 0 0  $\mu$  l 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、1 0 0  $\mu$  l の 0 . 1  $\mu$  g / m l ニワトリポリクローナル抗ヒト C l q 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 : 4 0 0 0 に希釈したニワトリ I g - Y - H R P (AbCam) に対する 1 0 0  $\mu$  l 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、T M B で 5 分発色させ、続いて 5 0  $\mu$  l の 1 M  $H_2SO_4$  で反応を停止させ、4 5 0 n m で読み取った。野生型ヒト I g G 1 定常領域を有するただ一つの抗 I L - 2 1 R 抗体、A b Z のみが、C l q 結合を欠くことが以前に示されている三重変異体ヒト I g G 1 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 C l q 結合を示した。ヒト I g G 4 ( A b Y ) を有する形態及びヒト I g G 1 の二重変異体 ( A b X ) 及び三重変異体 ( A b T ) を有する形態を含む、A b Z と同一の変域ドメインを有するすべての抗体が、C l q 結合のバックグラウンドレベルが示さなかった ( 図 1 6 ) 。試験された他の抗 I L - 2 1 R 抗体のすべてがヒト I g G 1 の三重変異体形を含んでおり、バックグラウンド C l q 結合を示した。

10

【 0 2 0 1 】

実施例 9 . 1 4 : サイトカイン競合アッセイ

[0210] 抗体 A b T がマウス I L - 2 1 R に I L - 2 1 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。1  $\mu$  g / m l の抗体 A b T で E L I S A プレートをコートし、次に 1 % B S A の P B S / . 0 5 % 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 I L - 2 1 の存在下で、ウェルにビオチン化マウス I L - 2 1 R - H i s / F L A G ( 1 . 5 n g / m l ) を加え、固定化された抗体へのレセプターの結合を、H R P - コンジュゲートストレプトアビジンそしてその後の T M B 検出試薬とのインキュベーションで検出した。マウス I L - 2 1 は 4 n g / m l より上でほとんど完全に A b T への m I L - 2 1 R 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 I L - 2 1 R への結合について競合することを示している ( 図 2 7 ) 。

20

【 0 2 0 2 】

均等物

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。

30

【 図 1 a 】

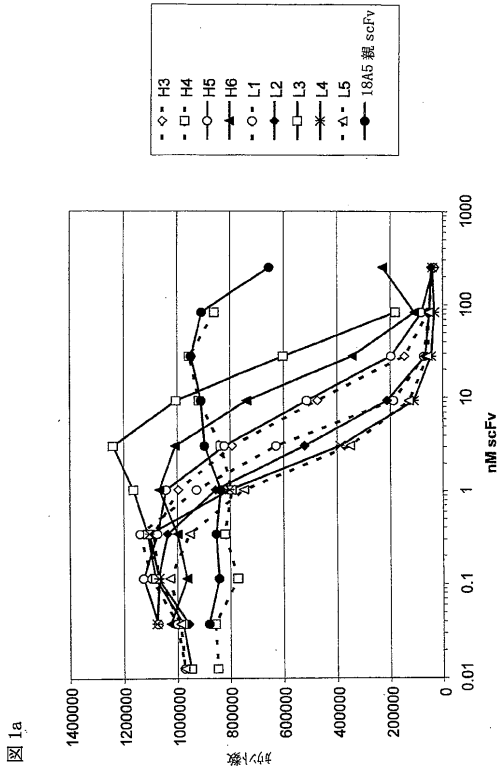


図 1a

【 図 1 b 】

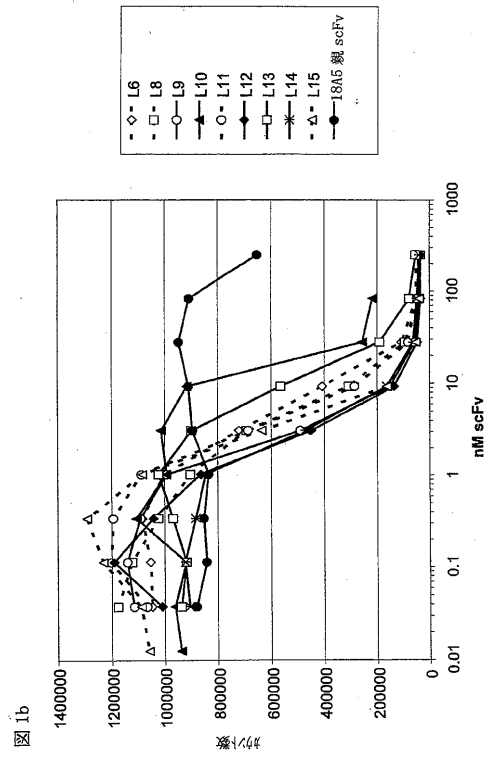


図 1b

【 図 1 c 】

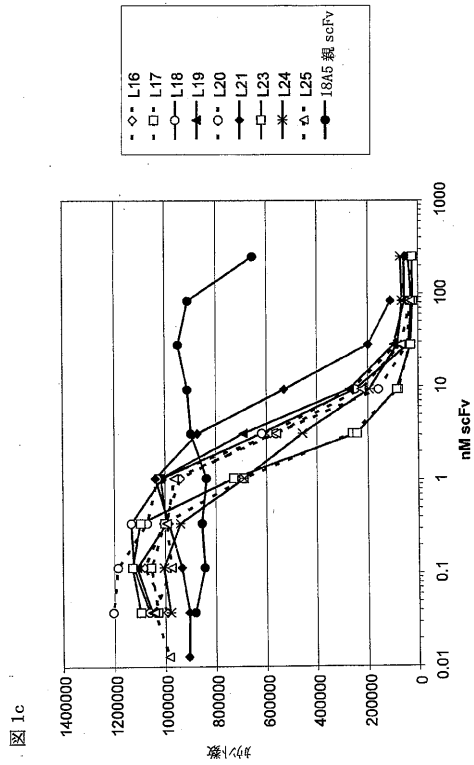


図 1c

【 図 2 a 】

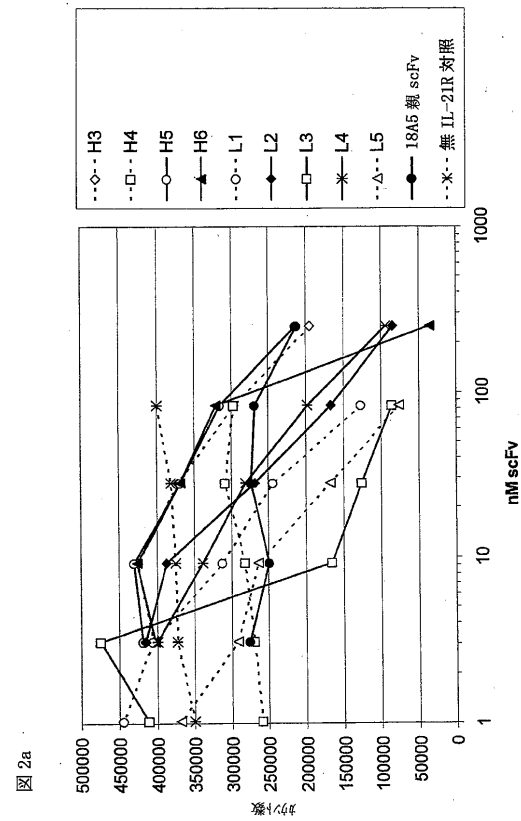


図 2a

【 図 2 b 】

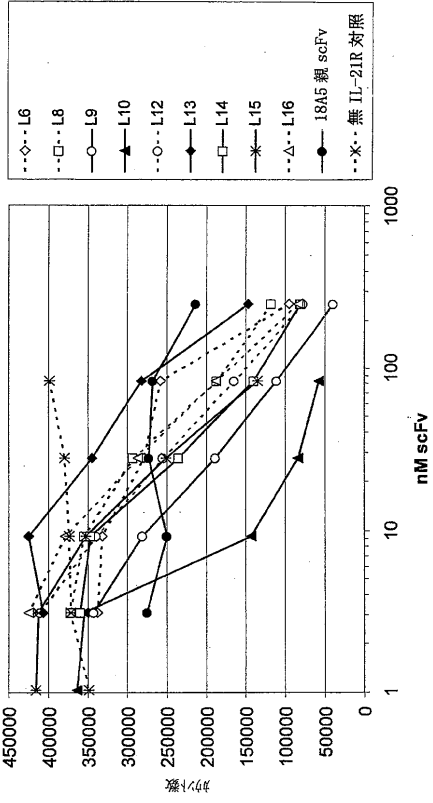


図 2b

【 図 2 c 】

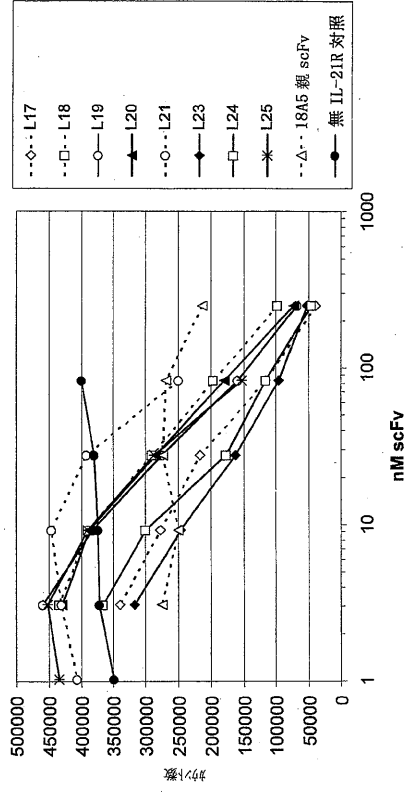


図 2c

【 図 3 a 】

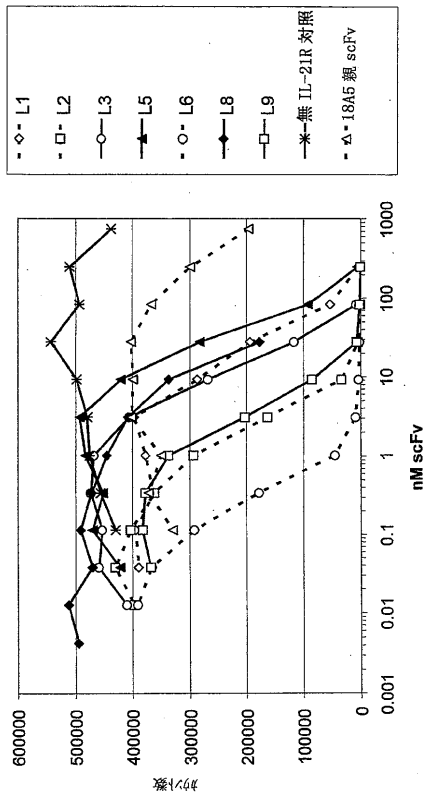


図 3a

【 図 3 b 】

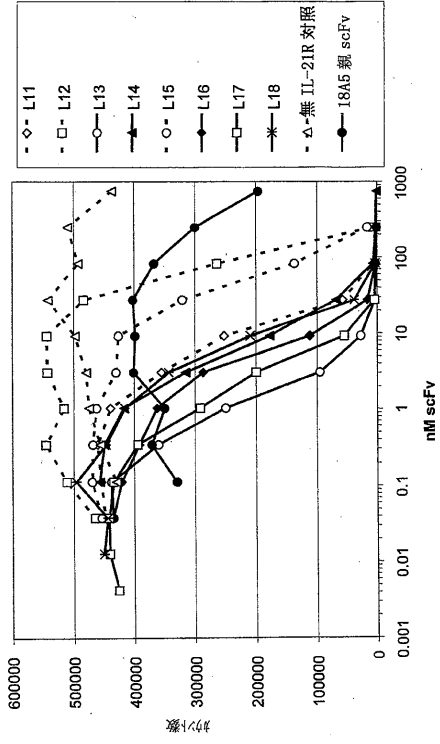


図 3b

【 図 3 c 】

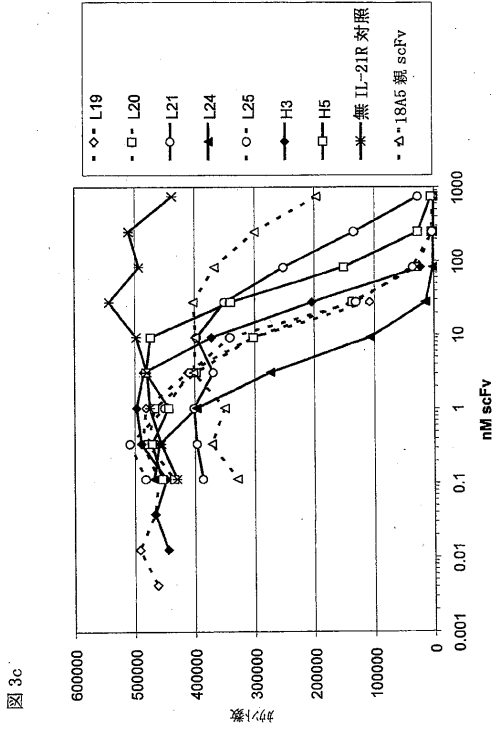


図 3c

【 図 4 a 】

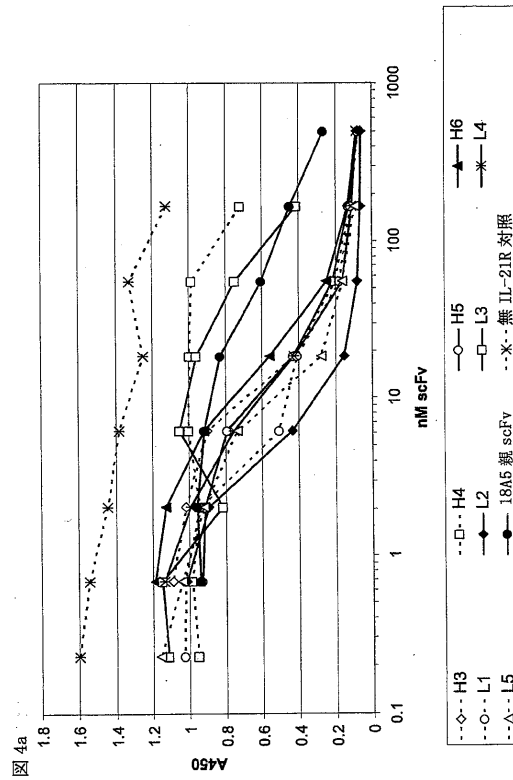


図 4a

【 図 4 b 】

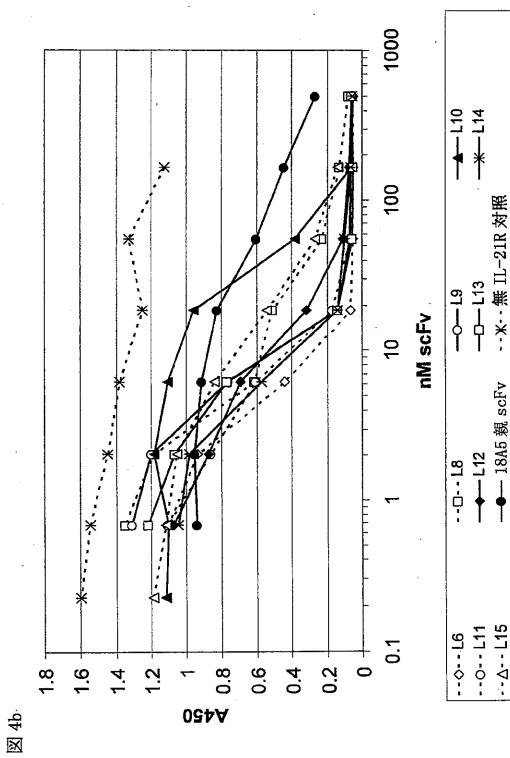


図 4b

【 図 4 c 】

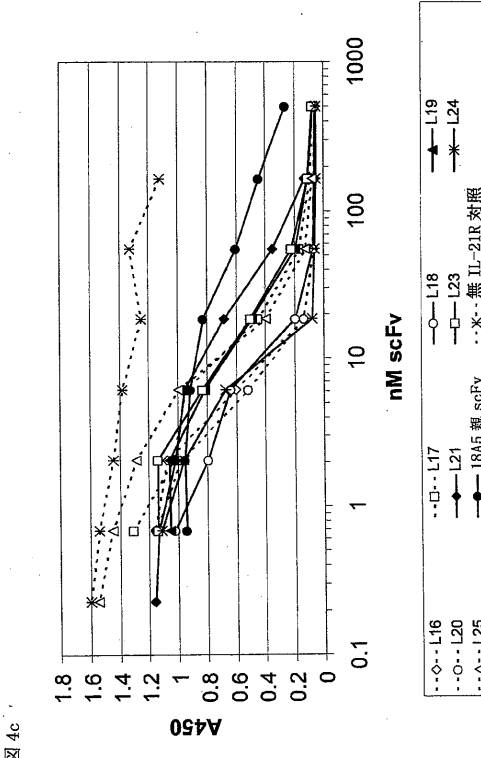
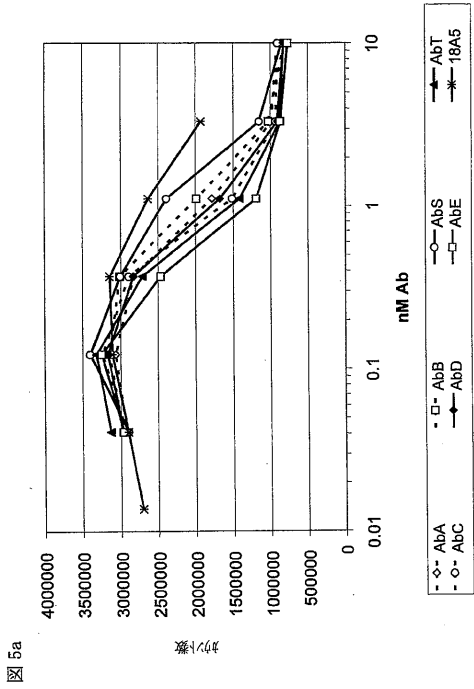
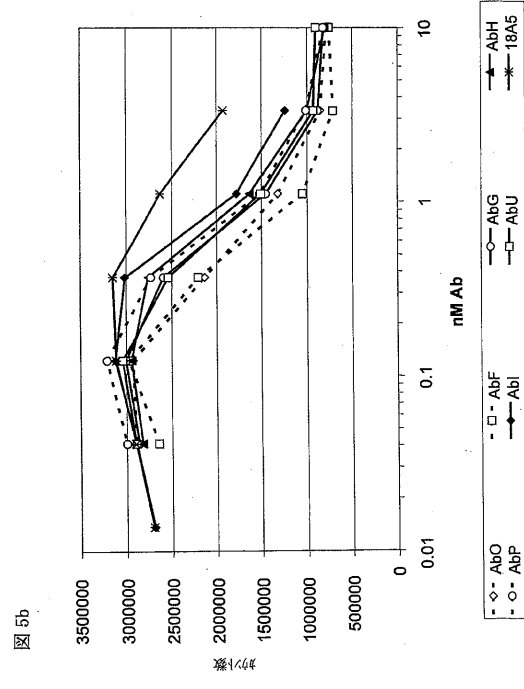


図 4c

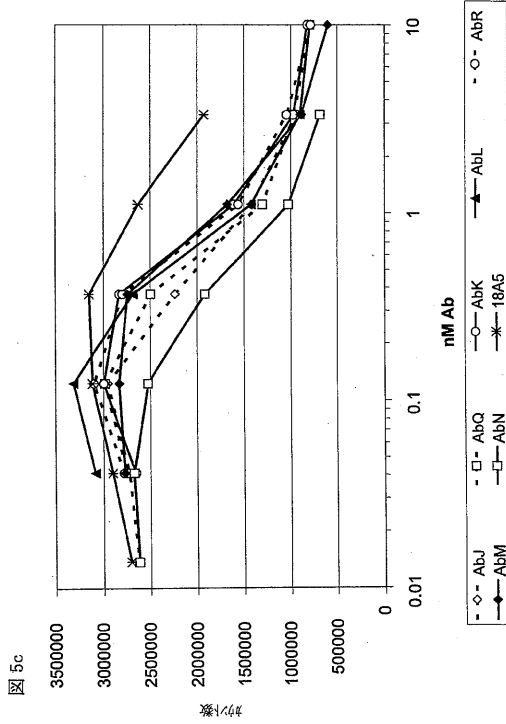
【 図 5 a 】



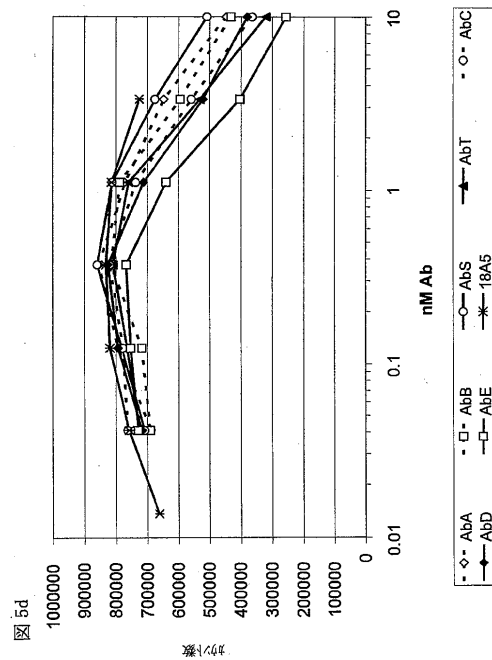
【 図 5 b 】



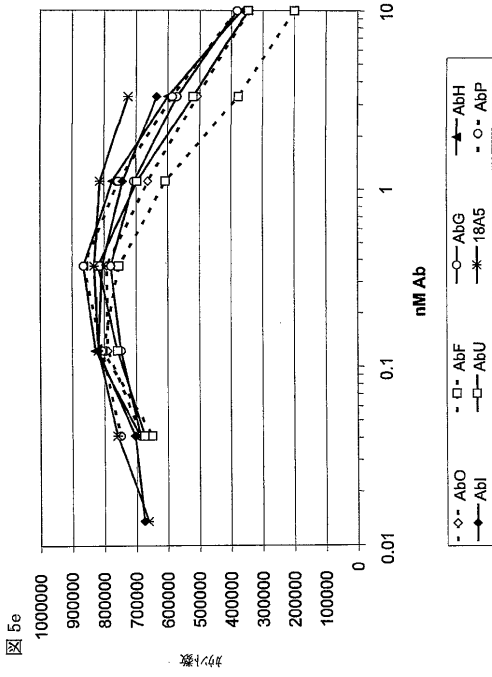
【 図 5 c 】



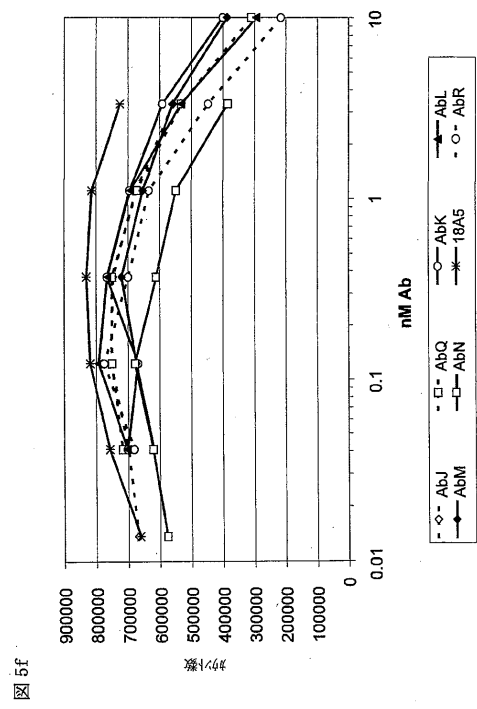
【 図 5 d 】



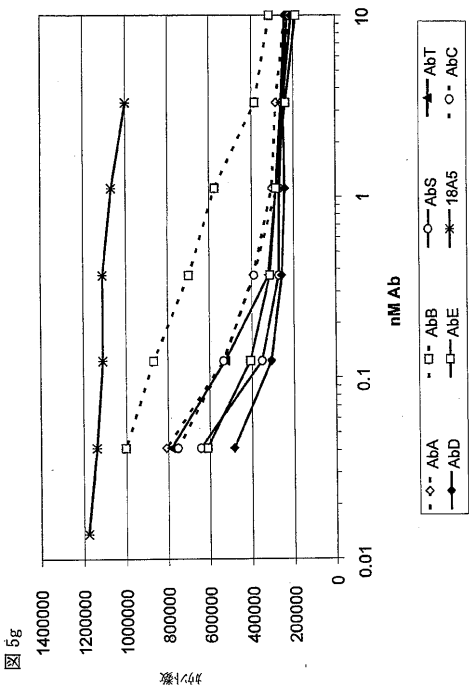
【 図 5 e 】



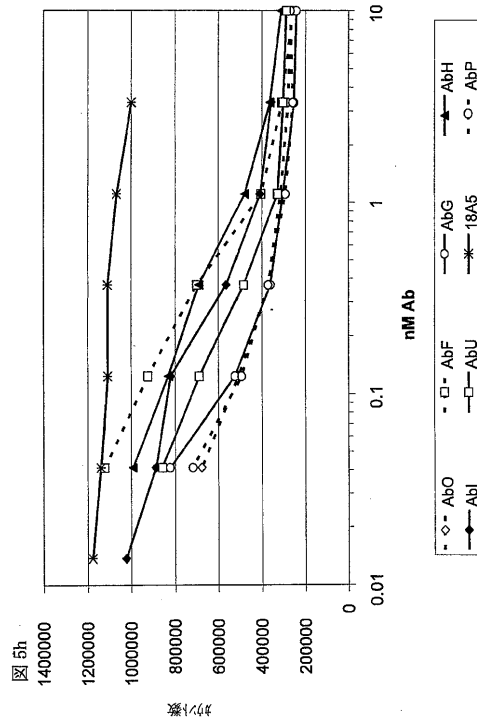
【 図 5 f 】



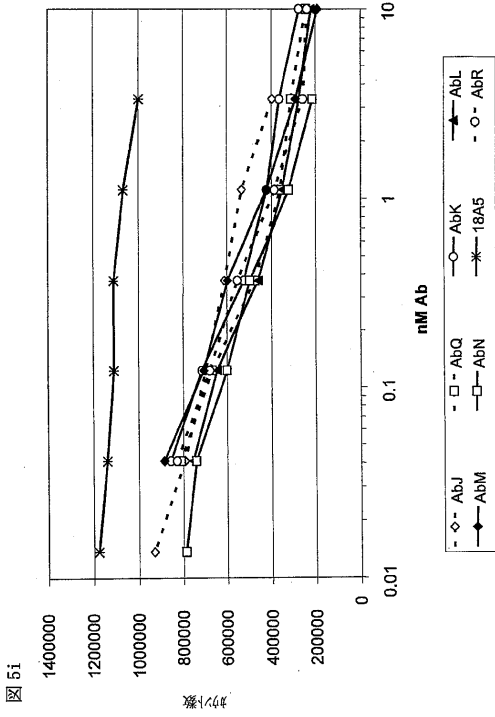
【 図 5 g 】



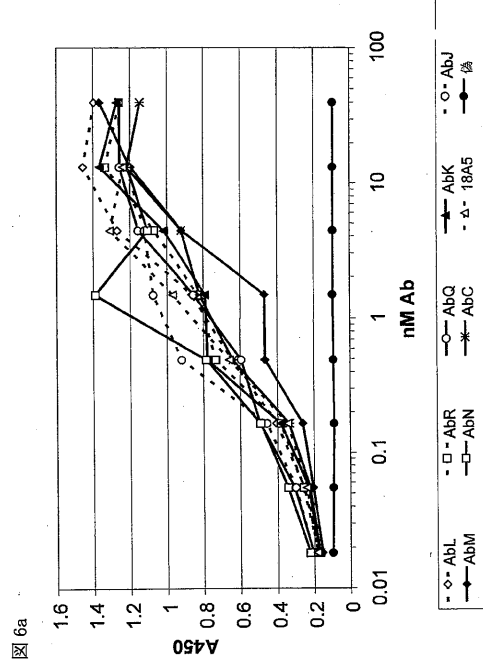
【 図 5 h 】



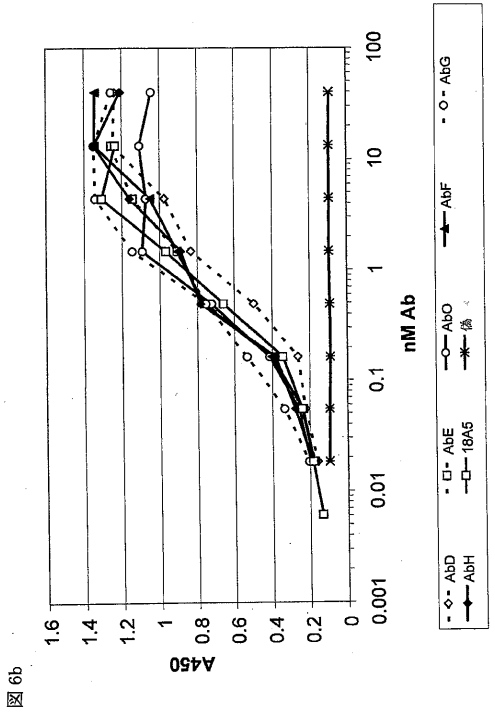
【 図 5 i 】



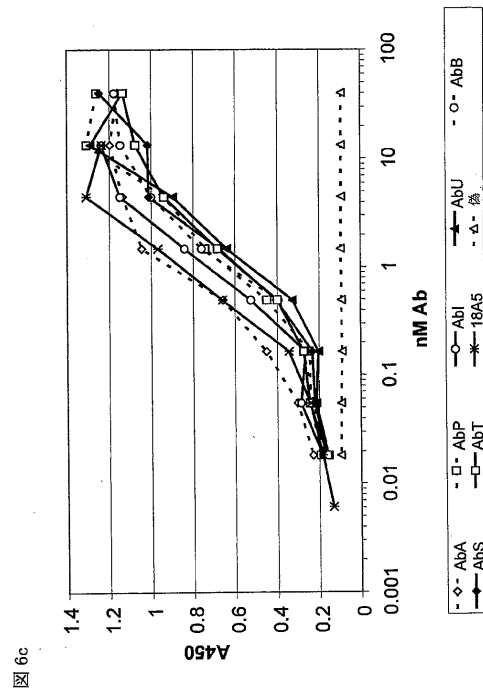
【 図 6 a 】



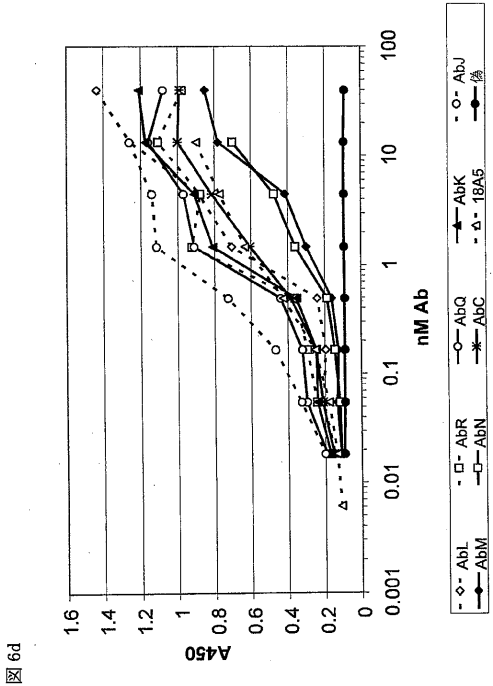
【 図 6 b 】



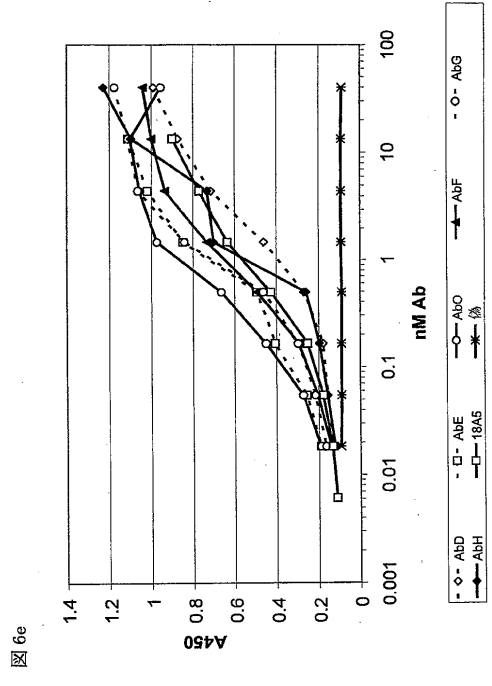
【 図 6 c 】



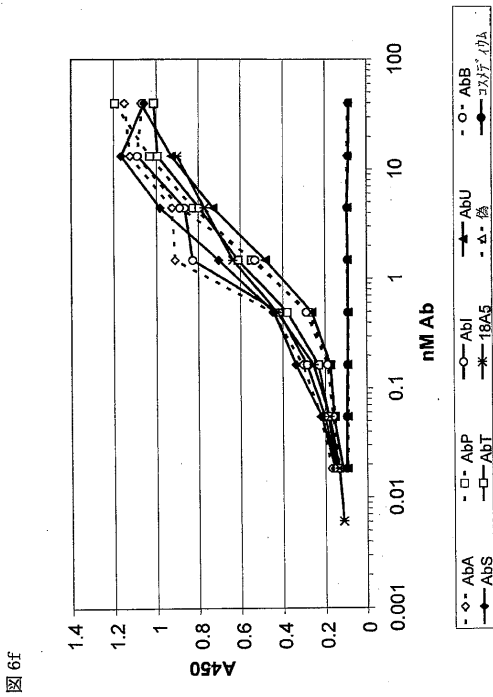
【 図 6 d 】



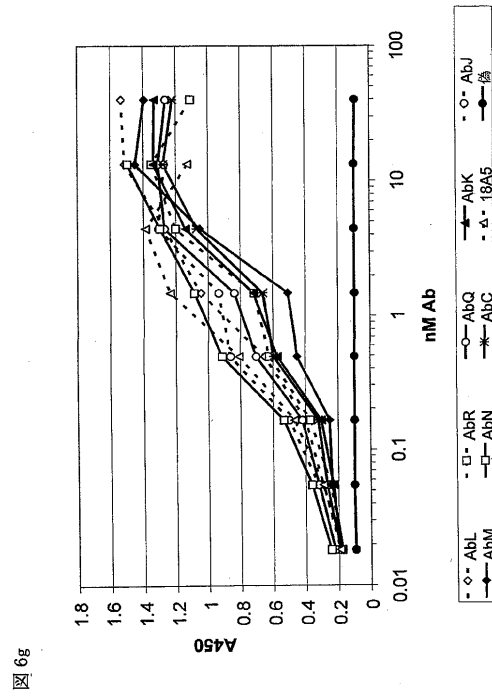
【 図 6 e 】



【 図 6 f 】



【 図 6 g 】



【 図 6 h 】

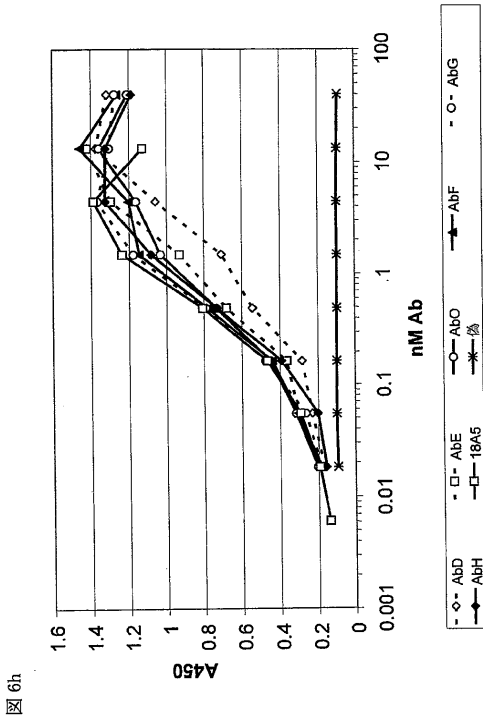


図 6h

【 図 6 i 】

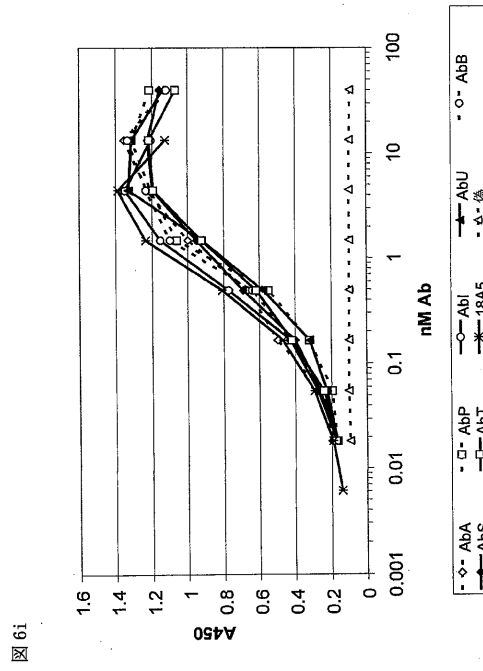


図 6i

【 図 6 j 】

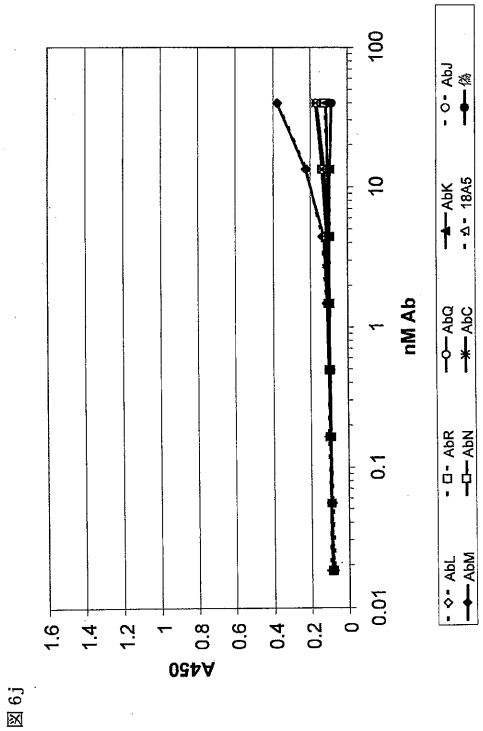


図 6j

【 図 6 k 】

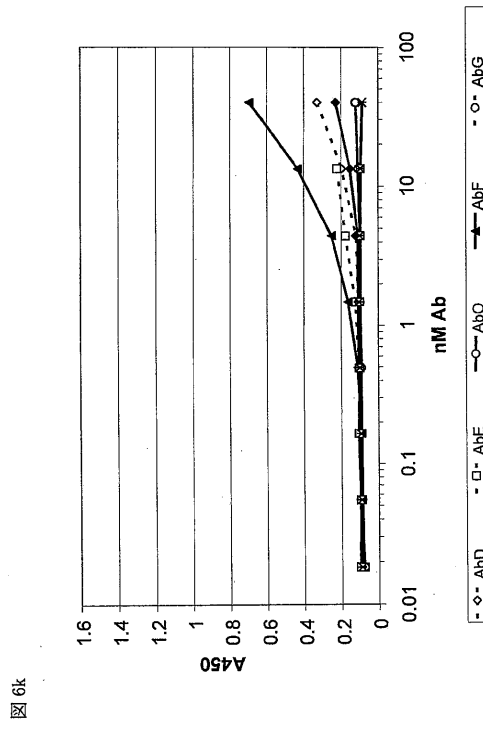


図 6k

【 図 6 1 】

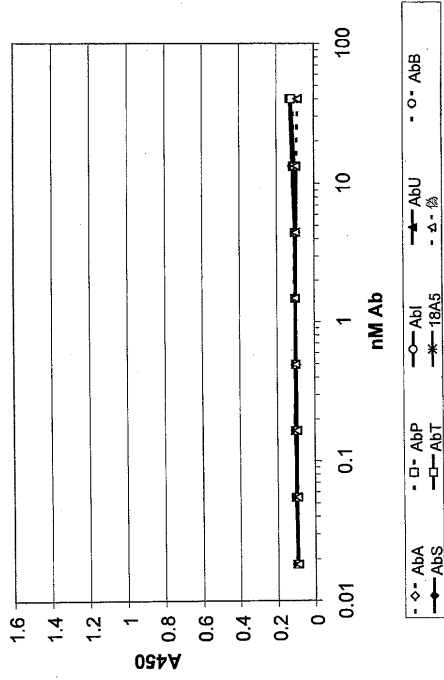
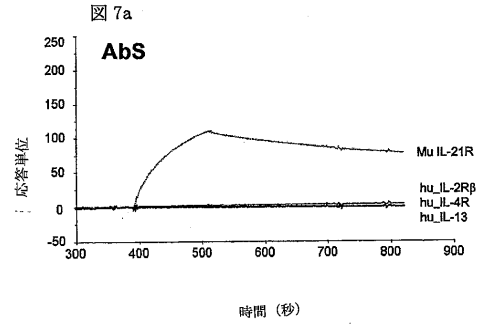


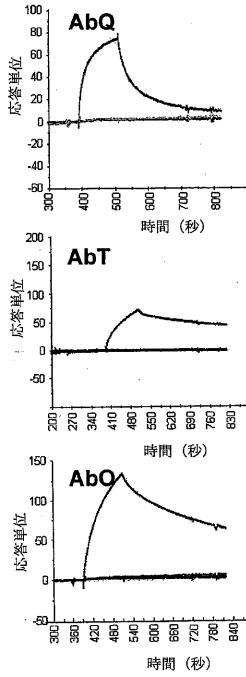
図 61

【 図 7 a 】



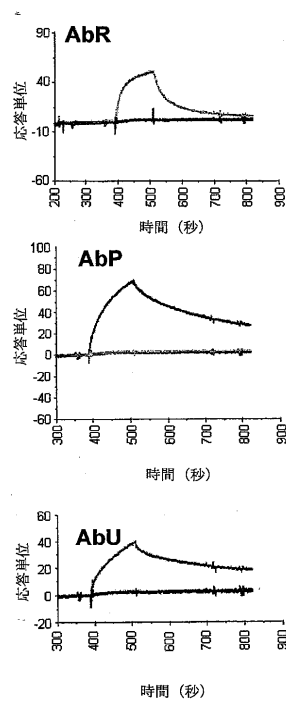
【 図 7 b 】

図 7b

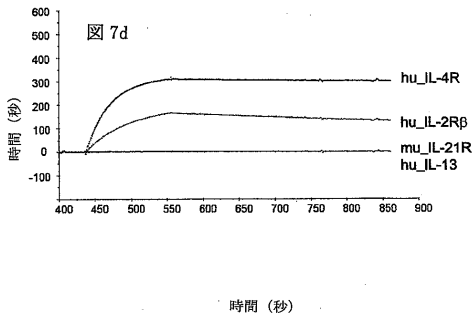


【 図 7 c 】

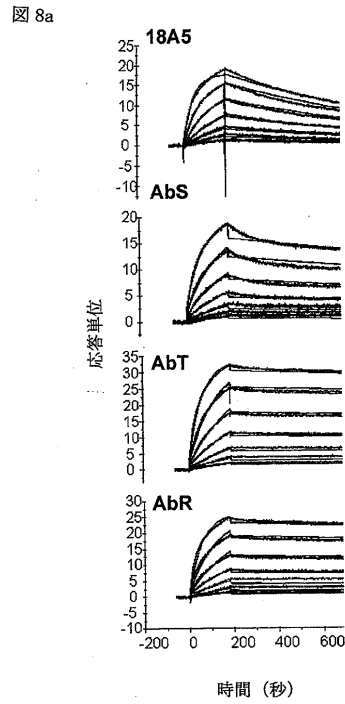
図 7c



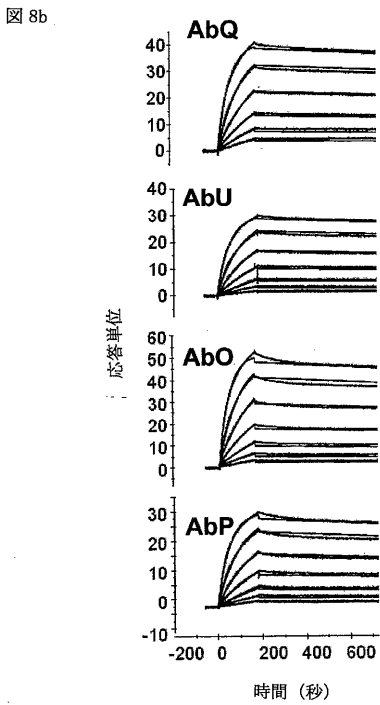
【 図 7 d 】



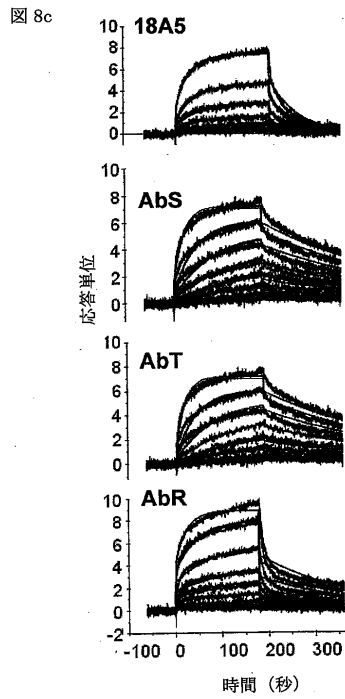
【 図 8 a 】



【 図 8 b 】

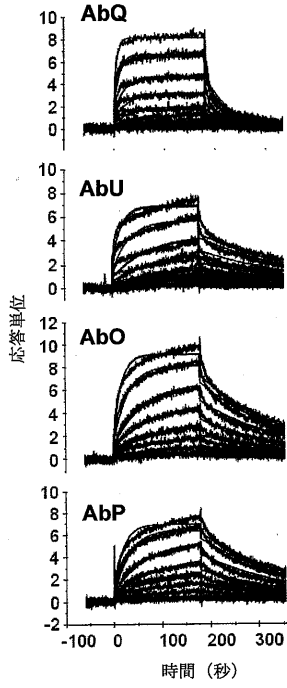


【 図 8 c 】



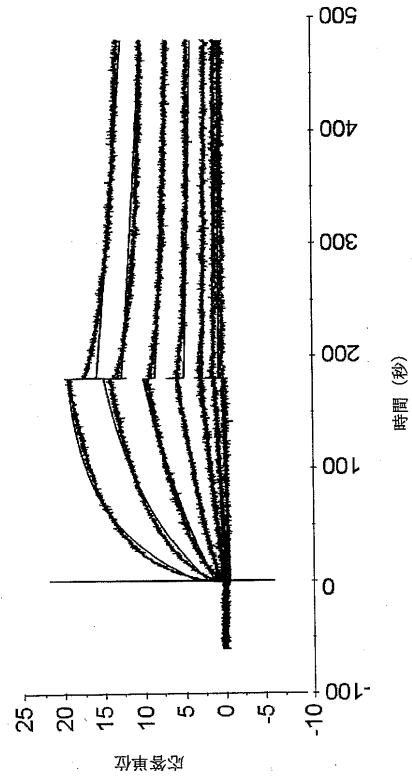
【 図 8 d 】

図 8d



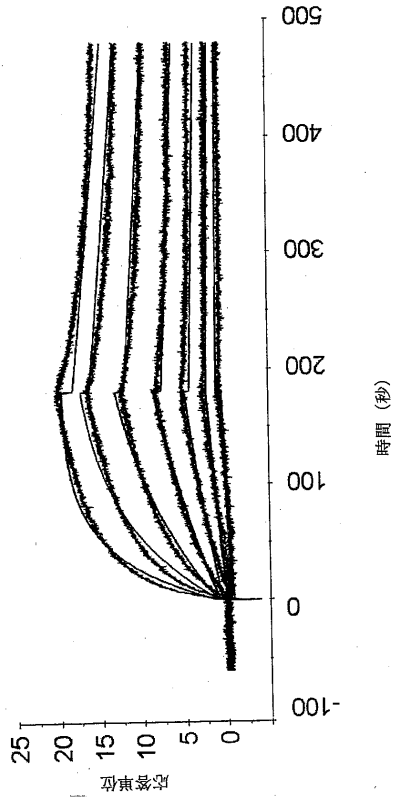
【 図 9 a 】

図 9a



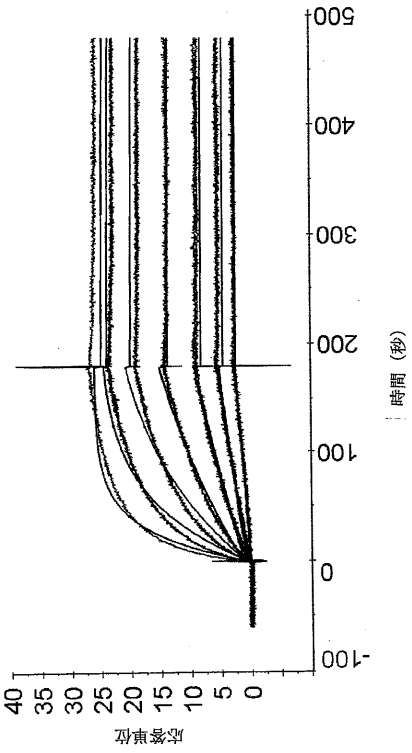
【 図 9 b 】

図 9b



【 図 9 c 】

図 9c



【 図 9 d 】

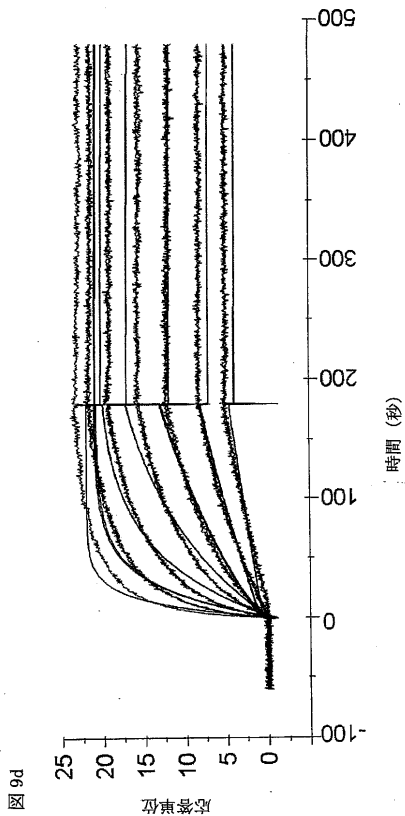


図 9d

【 図 1 0 a 】

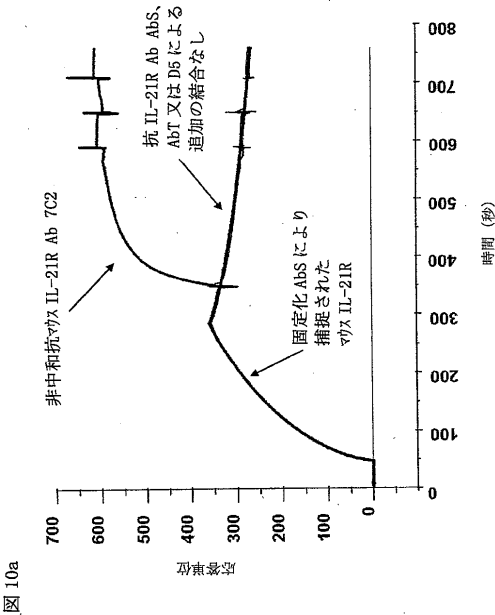


図 10a

【 図 1 0 b 】

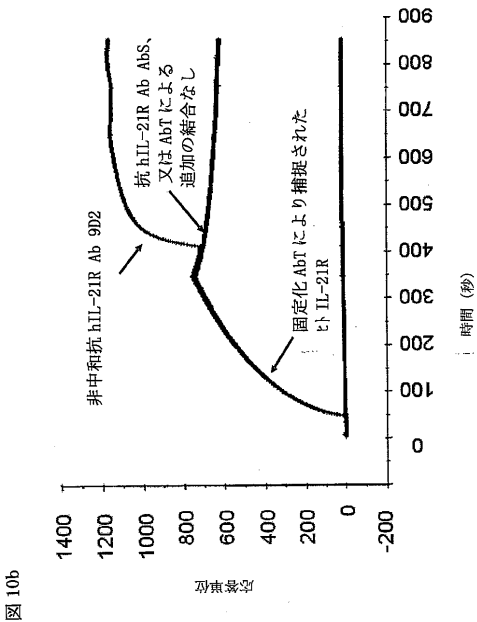


図 10b

【 図 1 1 a 】

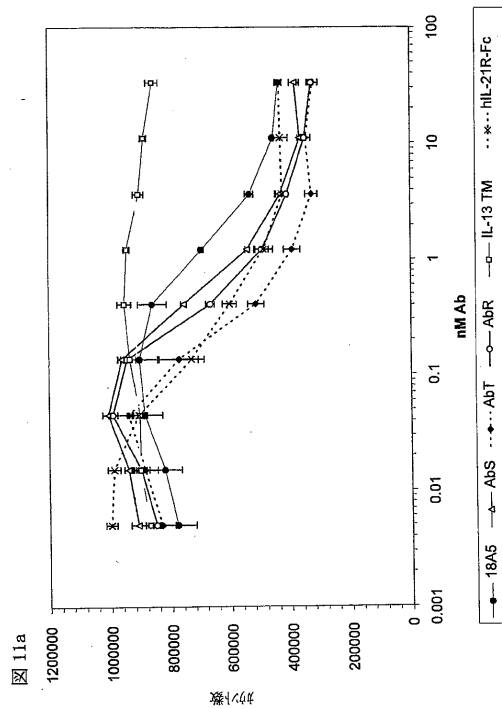


図 11a

【 図 1 1 b 】

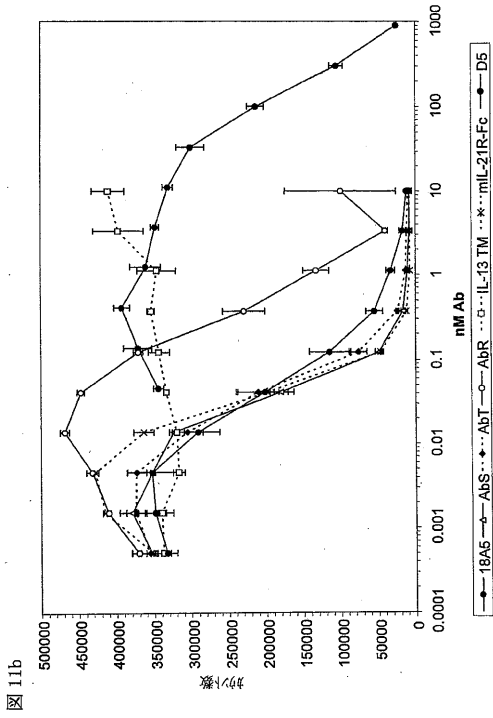


図 11b

【 図 1 1 c 】

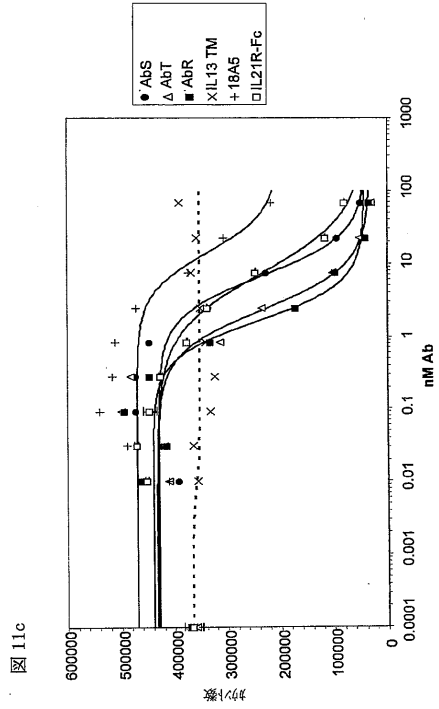


図 11c

【 図 1 2 a 】

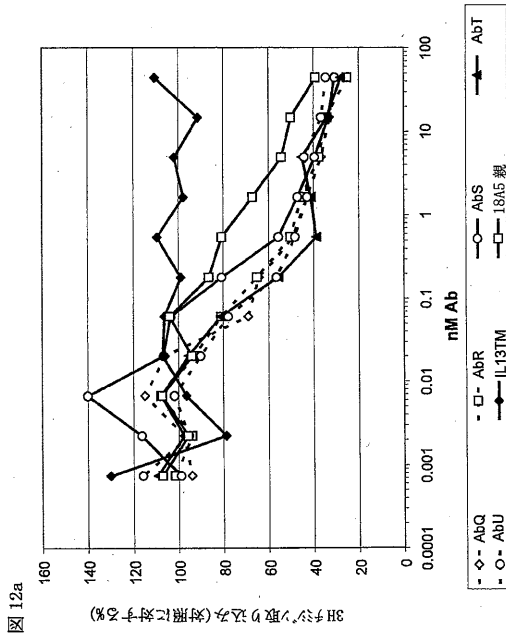


図 12a

【 図 1 2 b 】

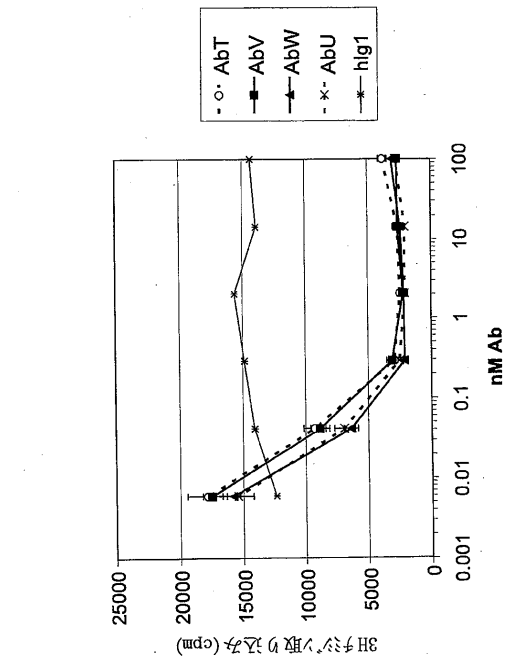


図 12b

【 図 1 3 】

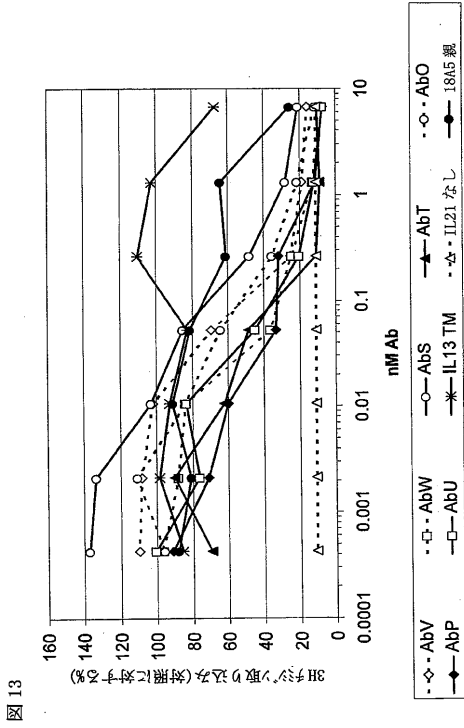


図 13

【 図 1 4 】

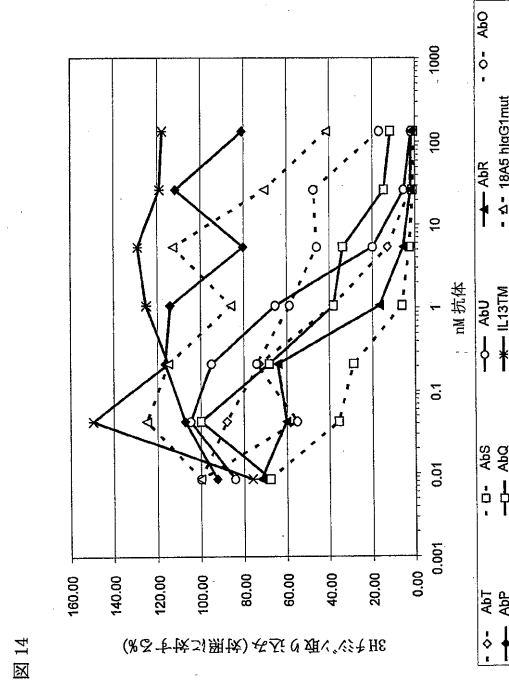


図 14

【 図 1 5 】

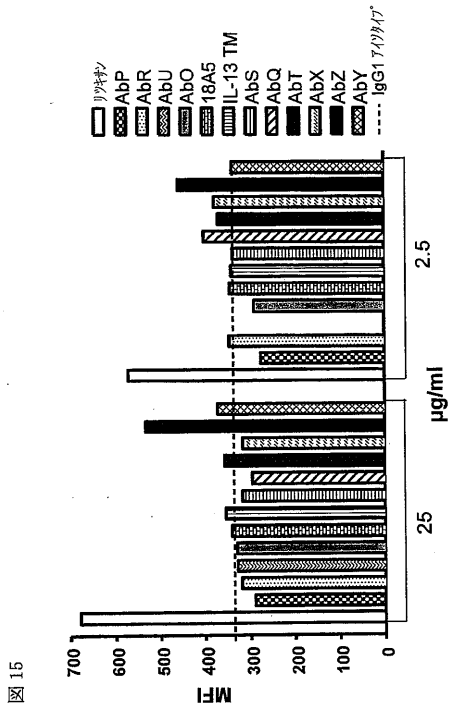


図 15

【 図 1 6 】

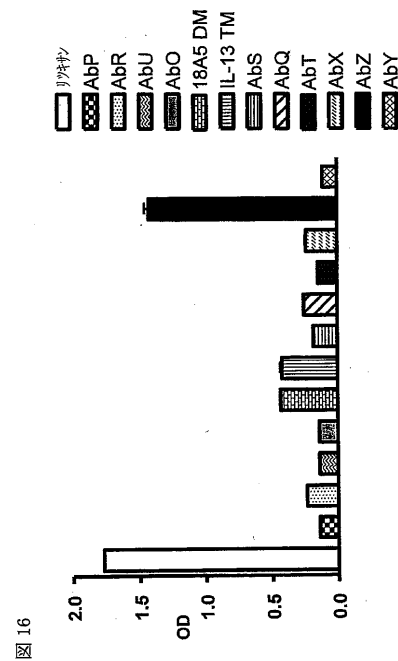


図 16

【 図 17 a 】

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)。重鎖定常領域はイッパ体の小文字で示されており、二重突然変異 (L234A G237A) は「-」付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)。

QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPFGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTQVTVSSastkqpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfepvtvswngalstgvtfpavlgssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrreemtknqvsitc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
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7ドメイン軽鎖配列はイッパ体の小文字で示されている (配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPV
LYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCVARS
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapsvtlfpssseelqankatlvc
lisdffypgavtvawkadsppkagvetttpskqsnnykaassyls
lteqwkshrsyscqvthegstvektvaptcecs

配列番号 213 は AbQ の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPFGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTQVTVSSastkqpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfepvtvswngalstgvtfpavlgssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrreemtknqvsitc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【 図 17 c 】

図 17c

配列番号 215 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPV
LYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCVARS
VGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 172 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VARSVGNPHVL

配列番号 198 は7ドメイン軽鎖定常領域である:

gqpkapsvtlfpssseelqankatlvc
lisdffypgavtvawkads
spkagvetttpskqsnnykaassyls
lteqwkshrsyscqvthegstvektvaptcecs

【 図 17 b 】

図 17b

配列番号 14 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPFGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTQVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPLKLS

配列番号 165 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H3 部分である:

FMGFRPEY

配列番号 197 は重鎖定常領域であり、二重突然変異 (L234A G237A) は「-」付小文字で下線が引かれた文字列で示されている:

astkqpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfepvtvswngal
stgvtfpavlgssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkvepkscdktht
cpcpapealgapsvflfppkpkdtlmisr
tpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
vsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepq
vylppsrreemtknqvsitc
lvkgfypsdiavewesngqpennykt
ppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

配列番号 214 は AbQ の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPV
LYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCVARS
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapsvtlfpssseelqankatlvc
lisdffypgavtvawkadsppkagvetttpskqsnnykaassyls
lteqwkshrsyscqvthegstvektvaptcecs

【 図 18 a 】

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)。重鎖定常領域はイッパ体の小文字で示されており、二重突然変異 (L234A G237A) は「-」付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)。

QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPFGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTQVTVSSastkqpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfepvtvswngalstgvtfpavlgssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrreemtknqvsitc
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7ドメイン軽鎖配列はイッパ体の小文字で示されている (配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPV
LYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCVARS
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapsvtlfpssseelqankatlvc
lisdffypgavtvawkadsppkagvetttpskqsnnykaassyls
lteqwkshrsyscqvthegstvektvaptcecs

配列番号 213 は AbR の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPFGKGL
EWIGSISHTGNTYYNPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTQVTVSSastkqpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfepvtvswngalstgvtfpavlgssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppc
papealgapsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrreemtknqvsitc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

【 図 1 8 b 】

図 18b

配列番号 14 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H3 部分である:

FMGFRPEY

配列番号 197 は重鎖定常領域であり、二重突然変異 (L234A G237A) は\*'-ト' 体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkqpsvflpapsksts~~g~~gtaalgclvkdyfpepvtvswngal  
ts~~g~~vhtfpavlgssgylslsvvtvpsslg~~t~~gtq~~t~~ycnvnkpsnt  
kv~~d~~kkvepksc~~d~~kt~~t~~ht~~c~~ppc~~p~~ape~~a~~ag~~a~~psvflfppk~~p~~kd~~t~~lmisr  
tpevtc~~v~~vdvsh~~e~~dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr  
vsvl~~t~~vlh~~q~~dwl~~n~~gkeyk~~v~~snkalpapiektiskakgqprepg  
vytlppsreemtknqvs~~t~~clvkgfy~~p~~sdia~~a~~ve~~w~~esngqpennykt  
tppv~~l~~ds~~d~~gs~~f~~flyskitvdk~~s~~rwq~~g~~gnvfscsv~~m~~heal~~h~~nhytqk  
slslspgk

配列番号 216 は AbR の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCYVTRSV  
KGNPHVLFGGGTQLTVLgppkaapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisd~~f~~ypgavtvawkads~~s~~pvkagvet~~t~~tpskqsn~~n~~ky~~a~~assyls  
ltp~~e~~qwksh~~r~~syscqv~~t~~he~~g~~st~~v~~ekt~~v~~apt~~e~~cs

【 図 1 9 a 】

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)、重鎖定常領域は例々の小文字で示されており、三重突然変異 (L234A L235A G237A) は\*'-ト' 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)。

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTVTVSSastkqpsvflpapsksts~~g~~  
g~~t~~aalgclvkdyfpepvtvswngal~~t~~sgvhtfpavlgssgylsls  
svvtvpsslg~~t~~gtq~~t~~ycnvnkpsntkv~~d~~kkvepksc~~d~~kt~~t~~ht~~c~~ppc  
pape~~a~~ag~~a~~psvflfppk~~p~~kd~~t~~lmisrtpevtc~~v~~vdvsh~~e~~dpevkf  
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvl~~t~~vlh~~q~~dwl~~n~~gkeyk  
kvsnkalpapiektiskakgqprepgvytlppsreemtknqvs~~t~~cl  
vkgfy~~p~~sdia~~a~~ve~~w~~esngqpennyktppv~~l~~ds~~d~~gs~~f~~flyskitv  
dks~~r~~wq~~g~~gnvfscsv~~m~~heal~~h~~nhytqk~~s~~lslspgk

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)、定常領域は例々の小文字で示されている (配列番号 196)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCYVTRSV  
KGNPHVLFGGGTQLTVLgppkaapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisd~~f~~ypgavtvawkads~~s~~pvkagvet~~t~~tpskqsn~~n~~ky~~a~~assyls  
ltp~~e~~qwksh~~r~~syscqv~~t~~he~~g~~st~~v~~ekt~~v~~apt~~e~~cs

配列番号 218 は AbW の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTVTVSSastkqpsvflpapsksts~~g~~  
g~~t~~aalgclvkdyfpepvtvswngal~~t~~sgvhtfpavlgssgylsls  
svvtvpsslg~~t~~gtq~~t~~ycnvnkpsntkv~~d~~kkvepksc~~d~~kt~~t~~ht~~c~~ppc  
pape~~a~~ag~~a~~psvflfppk~~p~~kd~~t~~lmisrtpevtc~~v~~vdvsh~~e~~dpevkf  
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvl~~t~~vlh~~q~~dwl~~n~~gkeyk  
kvsnkalpapiektiskakgqprepgvytlppsreemtknqvs~~t~~cl  
vkgfy~~p~~sdia~~a~~ve~~w~~esngqpennyktppv~~l~~ds~~d~~gs~~f~~flyskitv  
dks~~r~~wq~~g~~gnvfscsv~~m~~heal~~h~~nhytqk~~s~~lslspgk

【 図 1 8 c 】

図 18c

配列番号 217 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCYVTRSV  
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGD~~S~~LR~~T~~YYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 187 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VTRSVKGNPHVL

配列番号 198 は例々の軽鎖定常領域である:

gppkaapsvtlfpssseelqankatlvc~~l~~isd~~f~~ypgavtvawkads  
spvka~~g~~vet~~t~~tpskqsn~~n~~ky~~a~~assyls~~l~~tpe~~q~~wksh~~r~~syscqv~~t~~he  
gst~~v~~ekt~~v~~apt~~e~~cs

【 図 1 9 b 】

図 19b

配列番号 14 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARFMGFRPEYWGQGLTVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H3 部分である:

FMGFRPEY

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\*'-ト' 体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkqpsvflpapsksts~~g~~gtaalgclvkdyfpepvtvswngal  
ts~~g~~vhtfpavlgssgylslsvvtvpsslg~~t~~gtq~~t~~ycnvnkpsnt  
kv~~d~~kkvepksc~~d~~kt~~t~~ht~~c~~ppc~~p~~ape~~a~~ag~~a~~psvflfppk~~p~~kd~~t~~lmisr  
tpevtc~~v~~vdvsh~~e~~dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr  
vsvl~~t~~vlh~~q~~dwl~~n~~gkeyk~~v~~snkalpapiektiskakgqprepg  
vytlppsreemtknqvs~~t~~clvkgfy~~p~~sdia~~a~~ve~~w~~esngqpennykt  
tppv~~l~~ds~~d~~gs~~f~~flyskitvdk~~s~~rwq~~g~~gnvfscsv~~m~~heal~~h~~nhytqk  
slslspgk

配列番号 216 は AbW の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYCYVTRSV  
KGNPHVLFGGGTQLTVLgppkaapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisd~~f~~ypgavtvawkads~~s~~pvkagvet~~t~~tpskqsn~~n~~ky~~a~~assyls  
ltp~~e~~qwksh~~r~~syscqv~~t~~he~~g~~st~~v~~ekt~~v~~apt~~e~~cs

【 図 19 c 】

図 19c

配列番号 217 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPFAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLYGKHKRPSGIPDRFSGSSSNTASLTTGAQAEDADYYCVTRSVKGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 187 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VTRSVKGNPHVL

配列番号 198 は H<sub>3</sub> 軽鎖定常領域である:

gqpk aapsv t l fppssee lqankatlvclisdfypgavtvawkads spvkagvett tpskqsnkyaassy sl tpeqwkshrsyscqvt hegstvektvapt ecs

【 図 20 a 】

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 別々の 小文字で示されており、三重突然変異 (L234A L235A G237A) は ホ-ホ 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)。

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGYYWGWRPQPKGGL EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastk g p s v f p l a p s s k s t s g g t a a l g c l v k d y f p e p v t v s w n s g a l t s g v h t f p a v l q s s g l y s i s s v t v p s s l g t q t y i c n v n h k p s n t k v d k k v e p k s c d k t h t c p p c p a p e a a g a p s v f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l p a p i e k t i s k a g g p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

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)。定常領域 軽鎖 配列は 別々の 小文字で示されている (配列番号 198)。

SSELTQDPFAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLYGKHKRPSGIPDRFSGSSSNTASLTTGAQAEDADYYCMRSI WGNPHVLFGGGTQLTVLgqpk aapsv t l fppssee lqankatlvcl isdfypgavtvawkads spvkagvett tpskqsnkyaassy sl tpeqwkshrsyscqvt hegstvektvapt ecs

配列番号 219 は AbS の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGYYWGWRPQPKGGL EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastk g p s v f p l a p s s k s t s g g t a a l g c l v k d y f p e p v t v s w n s g a l t s g v h t f p a v l q s s g l y s i s s v t v p s s l g t q t y i c n v n h k p s n t k v d k k v e p k s c d k t h t c p p c p a p e a a g a p s v f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l p a p i e k t i s k a g g p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

【 図 20 b 】

図 20b

配列番号 6 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGYYWGWRPQPKGGL EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 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-ホ 小文字で下線が引かれた文字列で示されている:

astk g p s v f p l a p s s k s t s g g t a a l g c l v k d y f p e p v t v s w n s g a l t s g v h t f p a v l q s s g l y s i s s v t v p s s i g t q t y i c n v n h k p s n t k v d k k v e p k s c d k t h t c p p c p a p e a a g a p s v f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l p a p i e k t i s k a g g p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

配列番号 220 は AbS の完全長軽鎖である:

SSELTQDPFAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLYGKHKRPSGIPDRFSGSSSNTASLTTGAQAEDADYYCMRSI WGNPHVLFGGGTQLTVLgqpk aapsv t l fppssee lqankatlvcl isdfypgavtvawkads spvkagvett tpskqsnkyaassy sl tpeqwkshrsyscqvt hegstvektvapt ecs

【 図 20 c 】

図 20c

配列番号 221 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPFAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPVLYGKHKRPSGIPDRFSGSSSNTASLTTGAQAEDADYYCMRSI WGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 176 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

MRSI WGNPHVL

配列番号 198 は H<sub>3</sub> 軽鎖定常領域である:

gqpk aapsv t l fppssee lqankatlvclisdfypgavtvawkads spvkagvett tpskqsnkyaassy sl tpeqwkshrsyscqvt hegstvektvapt ecs

【 図 2 1 a 】

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\* -付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)。

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastkgpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfpvvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpc
papeaagapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgprepqvvtlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiawesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnytkqslslspgk

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)。定常領域の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)。

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQKPGQAPVIV
IYQKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTTITGAQAEDEADYYCVARSN
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapavtlfppsseelqankatlvc
isdfypgavtvawkadspvkagvetttpskqsnnykaassylsl
peqwkshrsyscqvtthegstvektvaptects

配列番号 219 は AbT の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastkgpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfpvvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpc
papeaagapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgprepqvvtlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiawesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnytkqslslspgk

【 図 2 1 c 】

図 21c

配列番号 223 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQKPGQAPVIV
IYQKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTTITGAQAEDEADYYCVARSN
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 178 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VARSNKGNPHVL

配列番号 198 は軽鎖定常領域である:

gqpkapavtlfppsseelqankatlvcisdfypgavtvawkadspvkagvetttpskqsnnykaassylsltpewkshrsyscqvtthegstvektvaptects

【 図 2 1 b 】

図 21b

配列番号 6 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGIYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPPKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 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\* -付小文字で下線が引かれた文字列で示されている:

astkgpsvflapsskstsaggtaalgclvkdypfpvvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpcpapeaagapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgprepqvvtlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiawesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdkswqqgnvfscsvmhealhnytkqslslspgk

配列番号 222 は AbT の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQKPGQAPVIV
IYQKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTTITGAQAEDEADYYCVARSN
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapavtlfppsseelqankatlvc
isdfypgavtvawkadspvkagvetttpskqsnnykaassylsl
peqwkshrsyscqvtthegstvektvaptects

【 図 2 2 a 】

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\* -付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)。

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastkgpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfpvvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpc
papeaagapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgprepqvvtlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiawesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnytkqslslspgk

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)。定常領域の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)。

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQKPGQAPVIV
IYQKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTTITGAQAEDEADYYCVTRSA
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapavtlfppsseelqankatlvc
isdfypgavtvawkadspvkagvetttpskqsnnykaassylsl
peqwkshrsyscqvtthegstvektvaptects

配列番号 219 は AbO の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastkgpsvflapssksts
gtaalgclvkdypfpvvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpc
papeaagapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgprepqvvtlppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiawesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhnytkqslslspgk

【 図 2 2 b 】

図 22b

配列番号 6 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPPKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 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\*  
-#\* 体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkgpsvflpapskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngal  
tsgvhtfpavlgssgylslsvvtvpssslgtqtyicvnhkpsnt  
kvdkkvepkscdkthtccppcpeaaagapsvflfppkpkdtlmisr  
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr  
vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq  
vytlppsreemtknqvsitclvkgyfypsdiavewesngqpennykt  
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhealhnyhtqk  
slslspgk

配列番号 224 は AbO の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDDEADYYCVTRSA  
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisdlypgavtvawkadsppvkagvetttpskqsnkyaassyisl  
tpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptces

【 図 2 3 a 】

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#\*#\*体の小文字で示されてお  
り、三重突然変異 (L234A L235A G237A) は\*  
-#\* 体小文字に下線が引かれた文  
字列で示されている (配列番号 196)。

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastkgpsvflpapskstsg  
gtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssgylsls  
svvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpp  
cpeaaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf  
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyk  
kvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsitc  
lvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd  
ksrwqgnvfscsvmhealhnyhtqkslslspgk

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#\*#\*軽鎖配列は#\*#\*体の小文字で示さ  
れている (配列番号 198)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDDEADYYCVTRSA  
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisdlypgavtvawkadsppvkagvetttpskqsnkyaassyisl  
tpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptces

配列番号 219 は AbP の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSSastkgpsvflpapskstsg  
gtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssgylsls  
svvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpp  
cpeaaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf  
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyk  
kvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsitc  
lvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd  
ksrwqgnvfscsvmhealhnyhtqkslslspgk

【 図 2 2 c 】

図 22c

配列番号 225 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDDEADYYCVTRSA  
KGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 185 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VTRSAKGNPHVL

配列番号 198 は#\*#\*軽鎖定常領域である:

gqpkapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisdlypgavtvawkadsppvkagvetttpskqsnkyaassyisl  
tpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptces

【 図 2 3 b 】

図 23b

配列番号 6 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPPKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGLTVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPPKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 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\*  
-#\* 体小文字に下線が引かれた文字列で示されている:

astkgpsvflpapskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngal  
tsgvhtfpavlgssgylslsvvtvpssslgtqtyicvnhkpsnt  
kvdkkvepkscdkthtccppcpeaaagapsvflfppkpkdtlmisr  
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr  
vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq  
vytlppsreemtknqvsitclvkgyfypsdiavewesngqpennykt  
tppvldsdgsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhealhnyhtqk  
slslspgk

配列番号 226 は AbP の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDDEADYYCVTRSA  
KGNPHVLFGGGTQLTVLgqpkapsvtlfpssseelqankatlvc  
lisdlypgavtvawkadsppvkagvetttpskqsnkyaassyisl  
tpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptces

【 図 2 3 c 】

図 23c

配列番号 227 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCVSRSA  
KGNPHVLFGGGTQLTLVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 189 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VSRSAKGNPHVL

配列番号 198 は H<sub>3</sub> 軽鎖定常領域である:

gqpkapsvtlfpssseelqankatlvlclisdfyppgavtvawkads  
spvkagvetttpskqsnnyaassylsltpqwkshrsyscqvthe  
gstvektvaptecs

【 図 2 4 a 】

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) はボールド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)。

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWRIRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGTTLVTVSSastkqpsvflapsskstsg  
gtaalgclvkdylfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls  
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpc  
papeaaqapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf  
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc  
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc  
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd  
ksrwqqgnvfscsvmhela hnhytqkslslspgk

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 H<sub>3</sub> 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)。

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCTTRSN  
KGNPHVLFGGGTQLTLVlgqpkapsvtlfpssseelqankatlvlcl  
isdfyppgavtvawkadspvkagvetttpskqsnnyaassylsltp  
eqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

配列番号 219 は AbU の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWRIRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGTTLVTVSSastkqpsvflapsskstsg  
gtaalgclvkdylfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgyls  
svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccpc  
papeaaqapsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkf  
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc  
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltc  
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvd  
ksrwqqgnvfscsvmhela hnhytqkslslspgk

【 図 2 4 b 】

図 24b

配列番号 6 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCVAVSGYSISSGGYWGWRIRQPPGKGL  
EWIGSISHTGNTYYNPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA  
VYYCARGGGISRPEYWGQGTTLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYNPPLKS

配列番号 169 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 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) はボールド体小文字で下線が引かれた文字列で示されている:

astkqpsvflapsskstsggtaalgclvkdylfpepvtvswngalt  
sgvhtfpavlqssgylsissvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt  
kvdkkvepkscdkthtccpcpapeaaqapsvflfppkpkdtlmsir  
tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynsty  
rvsvltvlhqdwlngkeykcvsnkalpapiektiskakgqprepq  
vytlppsreemtknqvsltc lvkgfypsdiavewesngqpennykt  
ppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhela hnhytqk  
slslspgk

配列番号 228 は AbU の完全長軽鎖である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCTTRSN  
KGNPHVLFGGGTQLTLVlgqpkapsvtlfpssseelqankatlvlcl  
isdfyppgavtvawkadspvkagvetttpskqsnnyaassylsltp  
eqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs

【 図 2 4 c 】

図 24c

配列番号 229 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVLV  
IYGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCTTRSN  
KGNPHVLFGGGTQLTLVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 193 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

TTRSNKGNPHVL

配列番号 198 は H<sub>3</sub> 軽鎖定常領域である:

gqpkapsvtlfpssseelqankatlvlclisdfyppgavtvawkads  
spvkagvetttpskqsnnyaassylsltpqwkshrsyscqvthe  
gstvektvaptecs

【 図 2 5 a 】

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 \* 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)。

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYICARFMGFRPBYWGQGLVTVSSastkqpsvflapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsqaltsgvhtfpavlgssgyls
svtvpssslgtgtiyicnvnkpsntkvdkkvepkscdkthtppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvyltppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhhnytqkslsispgk

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)。定常領域の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)。

SSELTQDPAVSVLGGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVIV
YGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYICVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqkaapsvflfppsseelqankatlvc
isdlypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassylst
peqwkhrrsycqvthegstvektvaptecs

配列番号 218 は AbV の完全長重鎖である:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYICARFMGFRPBYWGQGLVTVSSastkqpsvflapsskstsg
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsqaltsgvhtfpavlgssgyls
svtvpssslgtgtiyicnvnkpsntkvdkkvepkscdkthtppc
papeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkf
nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc
kvsnkalpapiektiskakgqprepqvyltppsreemtknqvsltc
lvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgfflyskltvd
ksrwqqgnvfscsvmhealhhnytqkslsispgk

【 図 2 5 c 】

図 25c

配列番号 215 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分である:

SSELTQDPAVSVLGGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVIV
YGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYICVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVL

配列番号 194 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L1 部分である:

QGDLSLRTYYAS

配列番号 195 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L2 部分である:

GKHKRPS

配列番号 172 は完全長軽鎖の V<sub>L</sub> 部分の CDR L3 部分である:

VARSVVGNPHVL

配列番号 198 は軽鎖定常領域である:

gqkaapsvflfppsseelqankatlvcisdlypgavtvawkad
spvkagvettpskqsnkyaassylstpeqwkhrrsycqvtheg
stvektvaptecs

【 図 2 5 b 】

図 25b

配列番号 14 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分である:

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSISSGGYWGWIROPKGL
EWIGSISHTGNTYYPPLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
VYICARFMGFRPBYWGQGLVTVSS

配列番号 163 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H1 部分である:

SGYYWG

配列番号 164 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H2 部分である:

SISHTGNTYYPPLKS

配列番号 165 は完全長重鎖の V<sub>H</sub> 部分の CDR H3 部分である:

FMGFRPEY

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 \* 体小文字で下線が引かれた文字列で示されている:

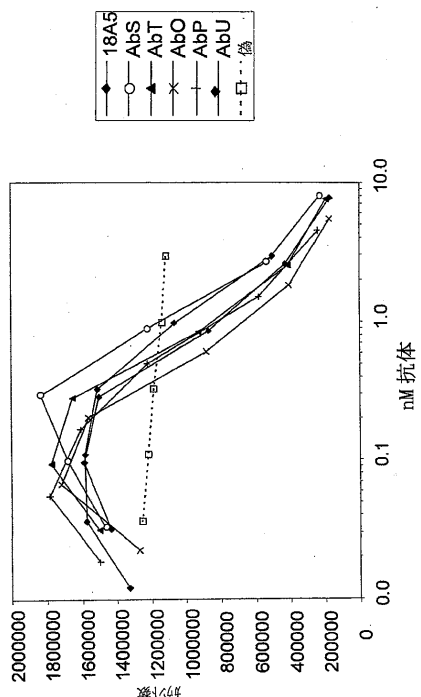
astkqpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsqal
tsqvhtfpavlgssgylsissvtpssslgtgtiyicnvnkpsnt
kvdkkvepkscdkthtppcpapeaagapsvflfppkpkdtlmisr
tpvctvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv
svltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepqv
yltppsreemtknqvsltc lvkgfypsdiavewesngqpennykt
ppvldsdgfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhhnytqk
s l s l s p g k .

配列番号 214 は AbV の完全長軽鎖である:

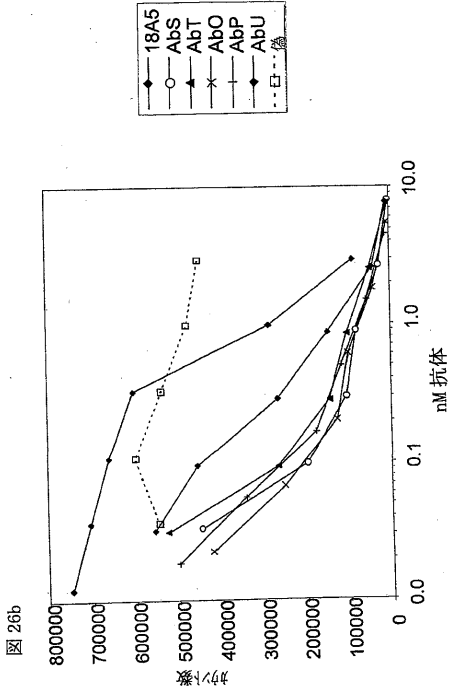
SSELTQDPAVSVLGGQTVRITCQGDLSLRTYYASWYQQKPGQAPVIV
YGKHKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYICVARSV
VGNPHVLFGGGTQLTVLgqkaapsvflfppsseelqankatlvc
isdlypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnkyaassylst
peqwkhrrsycqvthegstvektvaptecs

【 図 2 6 a 】

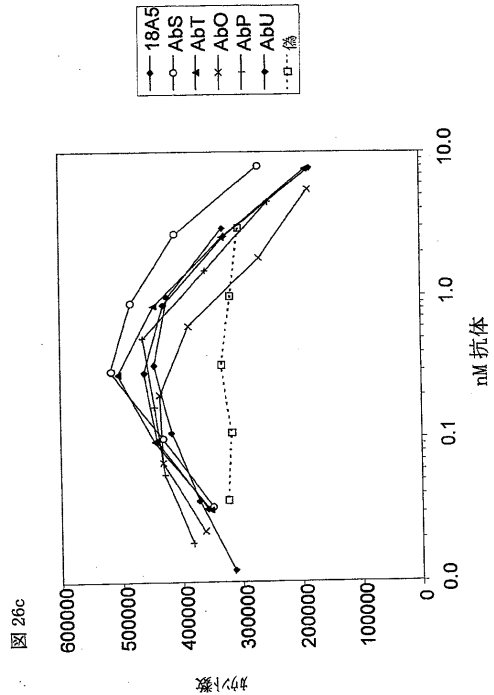
図 26a



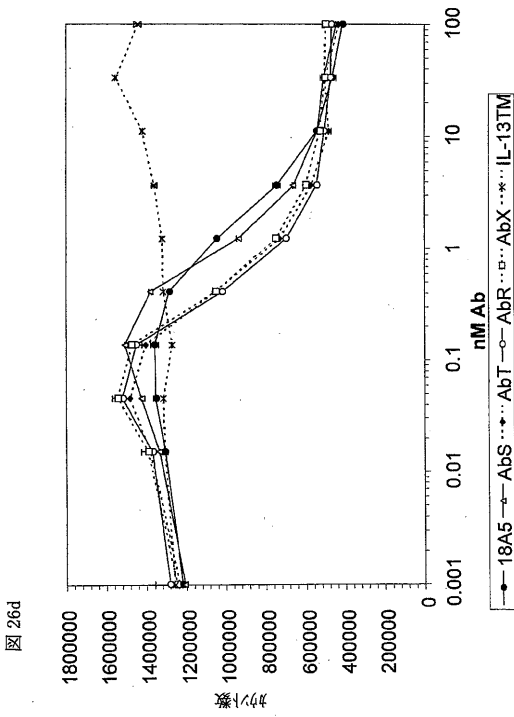
【 図 2 6 b 】



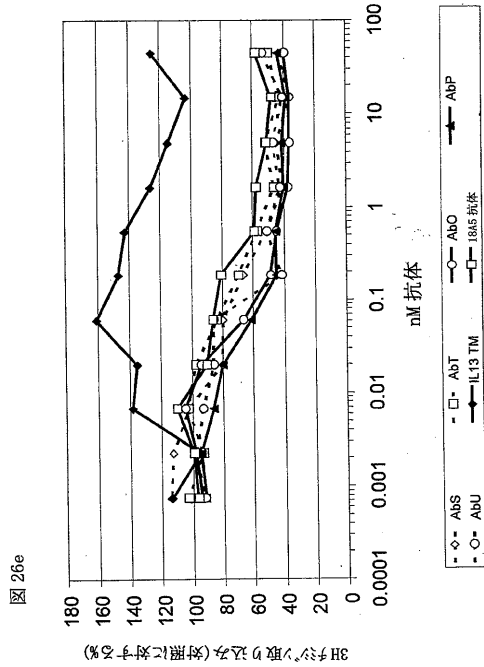
【 図 2 6 c 】



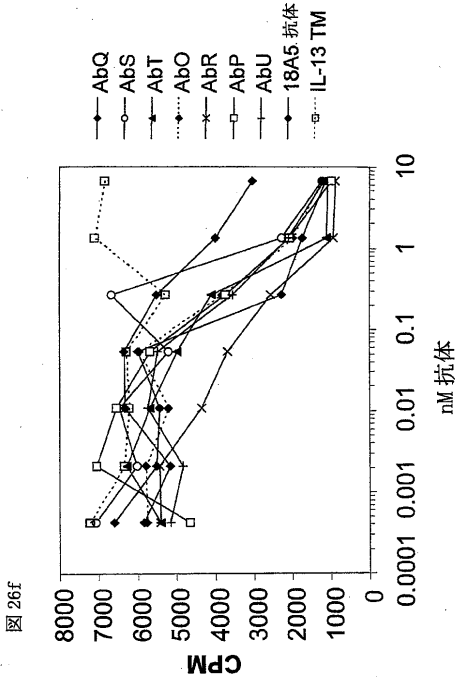
【 図 2 6 d 】



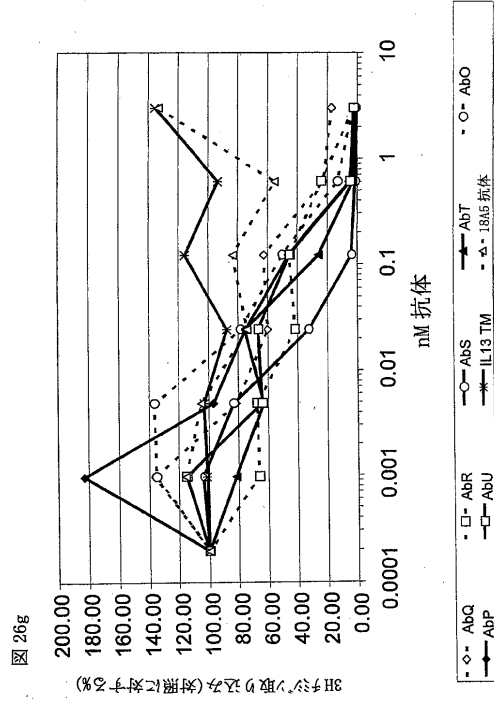
【 図 2 6 e 】



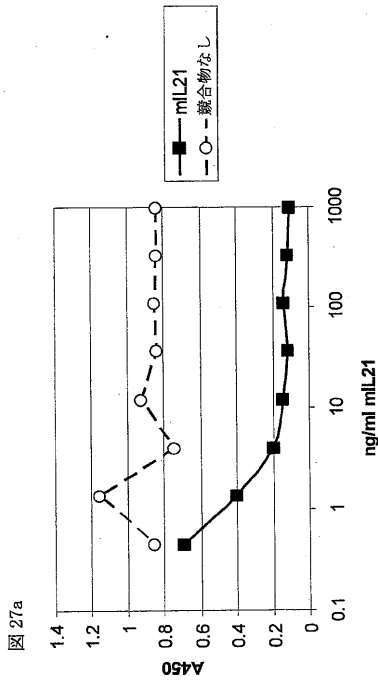
【 図 26 f 】



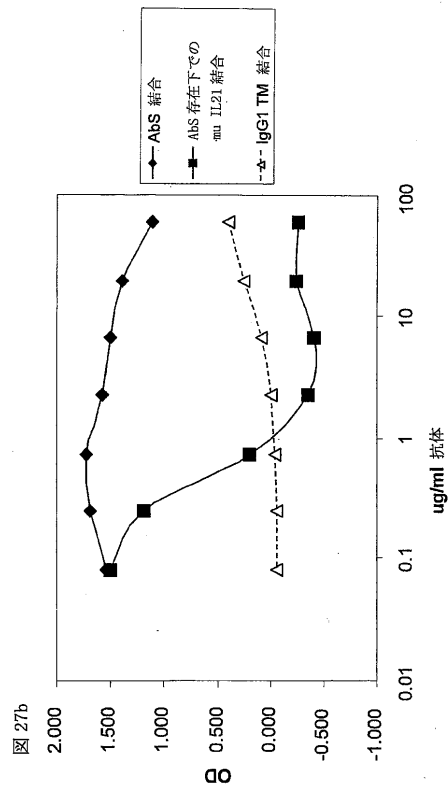
【 図 26 g 】



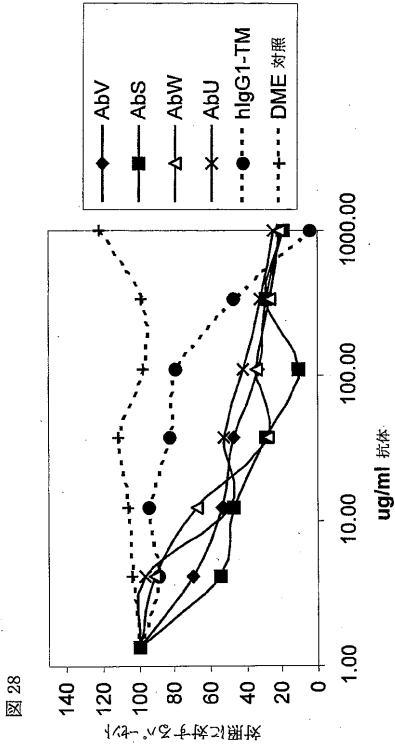
【 図 27 a 】



【 図 27 b 】



【 图 2 8 】



【 配列表 】

2011523849000001.app

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/045182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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) 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, EMBASE; MEDLINE, 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	1-49
X	US 2004/265960 A1 (VALGE-ARCHER VIIA [GB] ET AL) 30 December 2004 (2004-12-30) the whole document	1-49
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search  2 October 2009		Date of mailing of the international search report  13/10/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Sommerfeld, Teresa

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/045182

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
US 2004265960 A1	30-12-2004	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	1 0 1
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 P 37/08	

(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

(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

(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 0 2 4 9 2, ニーダム, ファルコン・ストリート 8 2

(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 0 1 8 1 0, アンダーヴァー, シャーロット・ドライブ 2 0

(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 0 1 8 6 4, ノース・レディング, リバーサイド・ドライブ 3 7

(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 0 2 1 7 6, メルローズ, ネルソン・ロード 3 9

(72) 発明者 ロウ, デーヴィッド

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスタインビルディング

(72) 発明者 ヴァルジェ - アーチャー, ヴィーア

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスタインビルディング

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA01 DA02 DA05 DA12 EA03 EA04

FA02 GA11 HA03

4B065 AA01X AA57X AA89X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 BB11 CC01 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	白细胞介素-21受体结合蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011523849A</a>	公开(公告)日	2011-08-25
申请号	JP2011510744	申请日	2009-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司 医学李μ有限公司排放		
申请(专利权)人(译)	魏斯, LLC Meddoimyun有限公司		
[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 ロウデーヴィッド ヴァルジェアーチャーヴィーア		
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 ロウ,デーヴィッド ヴァルジェ-アーチャー,ヴィーア		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P37/08		
CPC分类号	A61P29/00 C07K14/54 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/52 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/53.D A61K39 /395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P29/00 A61P37/06 A61P37/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024 /DA12 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA89X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC01 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	61/055500 2008-05-23 US		
其他公开文献	JP2011523849A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供特异性结合人白细胞介素-21受体 ( IL-21R ) 的结合蛋白及其抗原结合片段。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可用于诊断和/或治疗与IL-21R相关的疾病，例如炎症性肠病，自身免疫疾病，过敏，移植排斥，癌症和其他免疫系统疾病。可以用。

