

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

IL-21抗體

IL-21 ANTIBODIES

本發明係關於對人類IL-21具有高結合親和力且中和人類IL-21之經工程改造的人類化抗體；使用該等抗體治療病狀(諸如自體免疫性病狀)、保證IL-21之影響得到拮抗或中和的方法；以重組方式產生該等抗體之組合物及方法；以及包含該等抗體之醫藥組合物。

WO2010/055366揭示來源於轉殖基因小鼠之人類抗體，據稱該等抗體結合及中和人類IL-21。特定抗體為來源於純系362.78之抗體。

Maurer, M.等人(Generation and characterization of human anti-human IL-21 neutralizing monoclonal antibodies, 4 MAbs 69 (2012))描述來源於人類IgG轉殖基因小鼠之一組人類抗人類IL-21單株抗體(包括來源於純系362.78之抗體)之產生及初始表徵。在患有全身性紅斑性狼瘡症(SLE)及克隆氏症(Crohn's Disease)之患者中，對WO2010/055366、US 20130323259A1及Maurer等人所述之抗IL-21抗體(亦即「mAb 362.78」，亦稱為NN8828及NNC114-0006或NNC-0000-0006)進行臨床研究。

WO2012/098113陳述已形成人類IL-21與單株抗體362.78之Fab片段之複合物的晶體結構(NNC 0114-0005)(該抗體先前已在WO2010/055366中提及)且已使用X射線方法加以分析。

文本揭示之本發明力圖提供上述抗IL-21抗體之替代方案。該等抗體潛在地高度適於治療自體免疫性病狀或疾病，諸如原發性休格連

氏症候群(primary Sjögren's Syndrome, pSS)、休格連氏症候群(SS)及全身性紅斑性狼瘡症(SLE)、格雷夫氏病(Graves disease)、1型糖尿病及其他疾病，對於此等疾病而言，可利用的療法寥寥無幾且在世界範圍內仍有醫療需求。相較於現有患者照護標準，非常需要具有更佳安全概況之更有效療法。

特定言之，本發明提供的抗體係以本文中稱為Ab327之抗體之經工程改造的人類化重鏈可變域及輕鏈可變域作為重鏈及輕鏈可變域。

本發明提供具有以下特性中一或多者之抗體：1)以高親和力與人類IL-21及食蟹獼猴IL-21結合(K_D 分別等於 $0.8 \pm 0.5 \times 10^{-12}$ M及 $0.3 \pm 0.1 \times 10^{-12}$ M，37°C，依據KinExA溶液平衡結合)；2)以中度親和力與小鼠及大鼠IL-21結合(K_D 分別等於 $2.4 \pm 1.3 \times 10^{-7}$ 及 $2.3 \pm 0.2 \times 10^{-7}$ M，37°C，依據KinExA溶液平衡結合)；3)實質上不結合任何其他人類 γ 共同鏈家族成員(IL-2、IL-4、IL-7、IL-9及IL-15)；4)在特定泛STAT-IM9-螢光素酶報導子分析中，以陽性對照物(hIL-21R-Fc構築體)之約1/6之IC50中和人類及食蟹獼猴IL-21活性(分別為約46.7 pM與-41 pM相較於約271 pM)；5)以約1.15 nM之IC50活體外中和人類IL-21誘導初級人類B細胞增殖；6)活體外中和人類IL-21誘導初級人類B細胞之漿細胞分化；7)有效阻斷注射有人類IL-21之小鼠脾中若干細胞類型(包括B及T細胞亞群)之迅速及短暫擴增；及/或8)在醫藥製造、儲存及治療性使用中足夠穩定。

根據本發明之第一態樣，提供與人類IL-21結合之抗體，其包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)，其中LCVR包含CDRL1之SEQ ID NO: 7、CDRL2之SEQ ID NO: 8及CDRL3之SEQ ID NO: 9，且其中HCVR包含CDRH1之SEQ ID NO: 10、CDRH2之SEQ ID NO: 11及CDRH3之SEQ ID NO: 12。

本發明之抗體較佳包含抗體重鏈及抗體輕鏈，其中重鏈包含具

有SEQ.ID.NO: 1之HCVR且其中輕鏈包含具有SEQ.ID.NO: 2之LCVR。

本發明進一步提供與人類IL-21結合之抗體，其包含兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈，其中各重鏈包含重鏈可變域，其胺基酸序列為SEQ ID NO: 1序列，且其中各輕鏈包含輕鏈可變域，其胺基酸序列為SEQ ID NO: 2序列。

較佳地，本發明之抗體提供由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之抗體，其中各重鏈包含重鏈可變域，其胺基酸序列為SEQ ID NO: 1序列，且其中各輕鏈包含輕鏈可變域，其胺基酸序列為SEQ ID NO: 2序列。

特定實施例為抗體Ab327，其為針對人類IL-21之經工程改造的人類化抗體，其各重鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 3序列且其各輕鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。

本發明亦提供包含本發明之抗體及醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

本發明亦包括編碼本發明抗體之重鏈及輕鏈之DNA分子，以表現本發明抗體。特定言之，根據本發明之另一態樣，提供包含編碼抗體重鏈之聚核苷酸之DNA分子，該抗體重鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 3序列。本發明亦提供包含序列為SEQ ID NO: 5序列之聚核苷酸之DNA分子。此聚核苷酸序列對應於抗體重鏈。

根據本發明之另一態樣，提供包含編碼抗體輕鏈之聚核苷酸之DNA分子，該抗體輕鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。本發明進一步提供包含序列為SEQ ID NO: 6序列之聚核苷酸之DNA分子。此聚核苷酸序列對應於抗體輕鏈。

根據本發明之另一態樣，提供包含編碼抗體重鏈之聚核苷酸且包含編碼抗體輕鏈之聚核苷酸的DNA分子，該抗體重鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 3序列且該抗體輕鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序

列。本發明進一步提供包含序列為SEQ ID NO: 5序列之聚核苷酸且包含序列為SEQ ID NO: 6序列之聚核苷酸的DNA分子。

本發明包括藉由重組方式表現本發明抗體之哺乳動物細胞。特定言之，本發明提供用上述本發明之DNA分子轉型之哺乳動物細胞。

本發明之另一態樣包括產生抗體之方法，該抗體包含兩個抗體重鏈及兩個免疫球蛋白輕鏈，其中兩個重鏈中每一者之胺基序列為SEQ ID NO: 3序列且兩個輕鏈中每一者之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列，且該方法包含：a)如上所述，在表現抗體之條件下培養本發明之哺乳動物細胞，及b)回收表現之抗體。本發明包括可藉由如上文剛剛描述之本發明方法獲得之抗體。

本發明包括使用抗體之方法，尤其用於治療自體免疫性(AI)病狀，尤其原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)、全身性紅斑性狼瘡症、格雷夫氏病或1型糖尿病的方法；製備抗體的方法；編碼抗體之聚核苷酸；包含供轉型宿主細胞且表現抗體用之核苷酸之載體；表現抗體之宿主細胞；藉由哺乳動物宿主系統中之重組表現方法所製備之抗體；及包含抗體及醫藥學上可接受之賦形劑的抗體醫藥組合物。

抗體之預想特定用途為治療AI病狀，特定言之，諸如原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)、全身性紅斑性狼瘡症、格雷夫氏病或1型糖尿病之AI病狀。本發明包括用於治療之抗體，其用於治療自體免疫性病狀，用於治療原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)、全身性紅斑性狼瘡症、格雷夫氏病或1型糖尿病，且尤其用於治療原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)或全身性紅斑性狼瘡症。本發明包括本發明抗體用於製造藥物的用途，該藥物用於治療自體免疫性病狀；用於治療原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)、全身性紅斑性狼瘡症、格雷夫氏病

或1型糖尿病；用於治療原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)；或用於治療全身性紅斑性狼瘡症。特定言之，本發明包括本發明抗體用於製造藥物的用途，該藥物用於治療自體免疫性病狀；原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)、全身性紅斑性狼瘡症、格雷夫氏病或1型糖尿病；原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)；或全身性紅斑性狼瘡症。

【圖式簡單說明】

圖1. 展示Ab327與人類IL-21之結合及其他配位體與人類共同 γ 鏈受體之結合(依據ELISA)。

圖2. 展示Ab327活體外中和人類IL-21誘導之初級人類B細胞增殖。

圖3. 用IL-21抗體或同型對照抗體治療42天的移植有人類周邊血液單核細胞(PBMC)之嚴重免疫低下NSG小鼠(NOD-scid，無IL-2R γ)相對於基線之平均體重變化百分比。治療在箭頭指示之點發生。符號：-■- Ab327 (10 mg/kg)；--▼-- Ab327 (1 mg/kg)；--□--；同型對照(10 mg/kg)；-●-未移植。

圖4. 用IL-21抗體或同型對照抗體治療的移植有人類周邊血液單核細胞(PBMC)之嚴重免疫低下NSG小鼠(NOD-scid，無IL-2R γ)相對於基線之平均體重變化百分比。治療在箭頭指示之點發生。符號：-■- Ab327 (10 mg/kg)；--□--；同型對照(10 mg/kg)；-●-未移植。

圖5及圖6. 展示用抗小鼠IL-21抗體治療可緩解NOD小鼠唾液腺中之淋巴細胞性浸潤。勾勒出淋巴細胞。

圖7A及圖7B. 展示替代抗體728預防NOD小鼠體內之自體免疫性糖尿病發展。在7週齡(A)開始預防治療或在13週齡(B)在前糖尿病階段開始治療。每組之糖尿病發病率計算為超過250 mg/dl之兩個連續讀數且顯示為每組糖尿病小鼠之百分比(A：mIgG1 n=12；Ab728

n=12及B：IgG1 n=8；Ab728 n=11)。糖尿病發病率作為生存曲線資料評分且藉由對數秩檢驗而不同(A：p=0.0007及B：p=0.002)。

本發明抗體之用途

介白素(IL)-21藉由多種T細胞亞群產生且結合至由稱為IL-21受體(IL-21R)之特定受體及共同 γ 鏈次單元組成之複合受體。人類IL-21由162個胺基酸前驅分子在活體內產生。成熟人類IL-21由前驅蛋白質之殘基32-162 (131個胺基酸)組成。典型的I類細胞激素IL-21具有依上-上-下-下拓撲排列之四螺旋束結構。藉由使用162個胺基酸前驅蛋白質之編號，認為螺旋由以下殘基組成：A螺旋：41-56，B螺旋：69-84，C螺旋：92-105，及D螺旋：135-148。此結構與其他I類細胞激素家族成員(最顯著者為IL-2、IL-4及IL-15)之結構密切相關。

IL-21結合至受體複合物及隨後受體活化之後，經由Jak-STAT信號傳導路徑發生信號傳導。IL-21R鏈以高親和力結合IL-21且提供大部分結合能量。然而，信號傳導需要與共同 γ 鏈之相互作用。IL-21與IL-21R之間的相互作用係藉由A與C螺旋中存在之殘基且藉由緊隨IL-21 C螺旋之後的小部分CD環介導(O. Hamming等人, Crystal Structure of Interleukin-21 Receptor (IL-21R) Bound to IL-21 Reveals That Sugar Chain Interacting with WSXWS Motif Is Integral Part of IL-21R, 287 J. Biol. Chem. 9454-9460 (2012))。

IL-21為對先天性及適應性免疫反應具有多效性作用之I類細胞激素，諸如刺激淋巴細胞增殖、促進CD8⁺ T細胞及NK細胞之細胞毒性及使B細胞分化成漿細胞。IL-21由活化之CD4⁺ T細胞(特定言之Th17及T濾泡輔助細胞)以及自然殺手細胞分泌。其在藉由前饋機制促進Th17及T濾泡輔助細胞發展中起重要作用。另外，IL-21與其他細胞激素協作以在抗原存在下增強CD8⁺ T細胞之細胞毒性且促進CD8⁺細胞增殖。IL-21亦影響B細胞產生抗體。IL-21具有多種作用，包括促進T

細胞增殖，驅動B細胞分化成記憶細胞及末端分化漿細胞，及增強自然殺手細胞之活性。在某些人類病狀及疾病中，可能需要阻斷IL-21之活性。特定言之，在治療此類病狀及疾病時需要阻斷IL-21與其受體結合之抗體。

鑒於其特性，本發明之抗體潛在地高度適於治療其中T細胞-B細胞相互作用、Th17細胞、T濾泡輔助細胞、漿細胞及活化之CD8及NK細胞起主要致病作用之自體免疫性病狀或疾病。容易歸為此類別之疾病為原發性休格連氏症候群(pSS)、休格連氏症候群(SS)及全身性紅斑性狼瘡症(SLE)，對於此等疾病而言，可利用的療法寥寥無幾且在世界範圍內仍有較大醫療需求。其他潛在病症包括格雷夫氏病及1型糖尿病。

休格連氏症候群為緩慢進行之全身性自體免疫疾病，見於0.5-1.0%人群中，其顯著影響中年女性，但其可發生在任何年齡及男性與女性中。原發性休格連氏症候群(pSS)及休格連氏症候群(SS)之特徵為外分泌腺(特定言之，唾液及淚液腺)之慢性炎症。pSS之主要特徵為口及眼乾燥(「乾燥症候群」)且組織學標誌為外分泌腺之局灶性淋巴細胞性浸潤，其可藉由唇小唾液腺活檢確定。乾燥特徵影響生活品質且造成所涉及黏膜之局部併發症。嚴重口乾為不適且失能之病狀。然而，腺外表現發生於許多患者中且可涉及幾乎任何器官。獲准治療pSS及SS之疾病改善劑目前不存在。藥物治療針對症狀且提供支持性治療。患有pSS及SS之患者需要具有較佳安全概況的較有效療法。用本發明之抗體進行藥理學干預可影響與pSS及SS致病機制呈現因果關係之失調免疫系統之若干方面且因此可為患者提供顯著臨床益處。此療法亦可降低對慢性(非特異性)免疫抑制劑之需要，為pSS及SS患者提供生活品質之改善。

治療及投藥

術語「治療(treatment/treating/to treat)」及其類似者包括限制、減緩、停止或逆轉患者之現有症狀、病狀、疾病或病症之進展或嚴重性。術語「患者」係指人類。術語「有效量」係指本發明抗體之量或劑量，其以單或多劑量投與患者之後在患者體內提供所要作用。有效量可由主治診斷醫師或健康照護專業人員(如熟習此項技術者)藉由使用已知技術及藉由觀測結果容易地確定。在為患者確定有效量時，可考慮多種因素，包括患者體型、年齡及一般健康狀況；涉及之特定疾病或病症；疾病、病狀或病症之嚴重性；個別患者之反應；投藥模式；所投與製劑之生物可用性特徵；所選擇之給藥方案；附隨藥物治療之用途；及其他相關因素。

本發明之抗體意欲非經腸投與人類以治療自體免疫性病狀。皮下及靜脈內途徑較佳。該等抗體可在投與之前調配成水基醫藥溶液。可由健康專業人員投與靜脈內負載劑量。一般而言，投藥預期藉由皮下注射進行，由患者自投藥或由其他人(諸如健康照護專業人員)投藥。對於皮下注射，可使用自動注射器或預填注射器。劑量可固定(用於每一位患者之活性抗體質量相同)或可基於體重(質量)。以體重(質量)計，劑量較佳在每公斤患者體重(質量) 0.01 mg至30 mg抗體範圍內。更佳地，劑量在每公斤患者體重(質量) 0.1 mg至20 mg抗體範圍內。給藥頻率預期為每週一次或更低頻率，其視人體內之實際藥物代謝動力學及藥物效應動力學而定。治療持續時間視許多因素而變化且其由患者之診斷醫師或治療健康照護提供者基於此項技術中之經驗及技能來確定。治療之頻率及持續時間可視適應症而變化。

本發明抗體之結構

本發明之抗體具有全長人類IgG抗體之典型三元及四元結構。本發明之抗體當於適合之哺乳動物宿主細胞中生物合成時，將以由兩個重鏈及兩個輕鏈組成之分子形式分泌，其鏈以常見方式藉由鏈內及鏈

間二硫鍵共價結合在一起，其中重鏈彼此結合且一個輕鏈與重鏈中之每一者結合。鏈內且鏈間二硫鍵之位置為熟知的。

各重鏈含有四個域：自N端至C端為重鏈可變域、IgG CH1域、IgG CH2域及IgG CH3域。CH1與CH2之間的鉸鏈區含有連接兩個重鏈之鏈間雙硫鍵。各輕鏈含有兩個域：自N端至C端為輕鏈可變域及輕鏈恆定域(CL)之域。重鏈恆定域較佳為人類IgG4或其變異體。輕鏈恆定域較佳為人類 κ 。可變區共同產生與人類IL-21結合及中和人類IL-21活性之功能特性。本發明抗體可變區之胺基酸序列提供於SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2。一種本發明抗體(Ab327)之恆定域在SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4內給出。可使SEQ ID NO: 3之Asn294之N鍵聯糖基化位點糖基化。

抗體重鏈(HC)之胺基酸序列由本發明之重鏈可變域SEQ ID NO: 1組成，該重鏈可變域在其C端融合至適合之人類重鏈恆定域(CH1、CH2及CH3)或可具有提高穩定性或減小效應功能之熟知突變的人類重鏈恆定域之結構類似變異體。具有與穩定性及/或減小之效應功能相關之突變的人類IgG4恆定域變異體較佳。SEQ ID NO: 3提供Ab327重鏈之胺基酸序列。

輕鏈(LC)之胺基酸序列由本發明之輕鏈可變域SEQ ID NO: 2組成，該輕鏈可變域在其C端融合至適合之人類輕鏈恆定域(CL)或其結構類似變異體。人類 κ 輕鏈恆定域較佳。SEQ ID NO: 4提供Ab327輕鏈之胺基酸序列。為表現Ab327，SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6給出之DNA序列可分別用於HC及LC。

本發明抗體之產生

本發明之抗體可藉由熟知方法進行生物合成、純化及調配用於投藥。適合宿主細胞(諸如HEK 293或CHO)經使用預定HC:LC載體比率(若使用兩個載體)之表現系統或編碼重鏈與輕鏈之單一載體系統短

暫或穩定轉染用於分泌抗體。適於此等常用宿主細胞表現及分泌抗體之載體為熟知的。

表現及分泌抗體之後，澄清培養基以移除細胞且使用許多常用技術中之任一者純化澄清之培養基。舉例而言，可將培養基塗覆於已用緩衝液(諸如磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4))平衡之蛋白A管柱。洗滌管柱以移除非特異性結合組分。溶離細胞所結合抗體，例如藉由pH梯度(諸如0.1 M磷酸鈉緩衝液(pH 6.8)至0.1 M檸檬酸鈉緩衝液(pH 2.5))溶離細胞所結合抗體。偵測抗體溶離份，諸如藉由SDS-PAGE偵測，接著彙集。視預期用途而定，視情況進一步純化。抗體可使用常見技術濃縮及/或無菌過濾。可藉由常見技術(包括尺寸排阻、疏水相互作用、陽離子交換、陰離子交換、親和力或羧基磷灰石層析)有效減少或移除除抗體以外之其他材料(諸如宿主細胞及生長培養基組分)及抗體之可溶聚集體與多聚體。此等層析步驟之後的抗體純度通常大於95%。產物可存儲於4°C下、冷凍於-70°C下或可凍乾。

本文所述研究中所用的Ab327在經分別併有SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之DNA序列的各別重鏈及輕鏈表現DNA載體共轉染之後的HEK293細胞中短暫表現，或在經併有SEQ ID NO: 5與SEQ ID NO: 6之DNA序列(其分別編碼重鏈及輕鏈)的單一DNA載體轉染之後的CHO細胞中穩定表現。使自5天HEK293培養物或14天CHO大量培養物收集之培養基澄清且所得粗上清液藉由蛋白質A層析純化。Ab327與蛋白質A樹脂結合且使用低pH緩衝液溶離。進一步純化所溶離之抗體，對於短暫轉染HEK293所產生之物質使用製備型尺寸排阻層析(size-exclusion chromatography, SEC)，或對於穩定轉染CHO所產生之物質使用多模式陰離子交換層析(Capto adhere® GE Healthcare Life Sciences)作為精製步驟。藉由SDS-PAGE、分析型SEC-HPLC及LC/MS分析評估Ab327之最終純度。使用Endosafe-PTS分析顯示內毒素含量

為 < 1 EU/mg。純化之Ab327儲存在 4°C 於PBS（磷酸鹽緩衝鹽水）pH 7.2中。

本發明抗體之醫藥組合物

純化之抗體可根據熟知之蛋白質及抗體調配方法調配成醫藥組合物用於非經腸投與，尤其皮下或靜脈內投與。抗體可與適合醫藥學上可接受之賦形劑一起凍乾，接著日後在使用之前用基於水之稀釋劑復原。或者，抗體可在水溶液中調配且在使用之前儲存達1至3年。在任一情況下，抗體之醫藥組合物之儲存形式及注射形式可能含有醫藥學上可接受之賦形劑，其為抗體以外之成分。一種成分是否在醫藥學上可接受視其對醫藥組合物之安全性及有效性或者安全性、純度及效能之影響而定。若一種成分判定為對安全性或有效性(或對安全性、純度或效能)具有充分不利影響而保證其不用於投與人類之組合物，則其對用於抗體之醫藥組合物為醫藥學上不可接受的。

抗體之溶液組合物通常應為水基的且除水以外，其亦可含有賦形劑，諸如緩衝系統、防腐劑(若預期用於多種用途)、螯合劑、將組合物張力調節至接近於人類組織張力之張力劑及/或溶解劑或穩定劑(諸如清潔劑、界面活性劑或其類似物)。達成適當穩定之調配物以長期儲存在溶液中可非常具有挑戰性。可藉由改變例如pH、多種賦形劑之包括(或不包括)及賦形劑之類型與濃度、使用實驗設計程序來改善溶解度及化學與物理穩定性。關於調配藥物之一般資訊之來源為Remington: The Science and Practice of Pharmacy。W. Wang等人, Antibody Structure, Instability, and Formulation, 96 J. Pharm. Sci. 1-26 (2007)在調配抗體上為有用之一般來源。

現將參考附圖、僅以非限制性實例及分析之方式描述本發明之多種較佳特徵及實施例。

實例1

抗體之產生、工程改造及人類化以獲得Ab327

在小鼠爪墊免疫接種且選殖抗IL-21可變區之後分離小鼠抗人類IL-21抗體15H12。使用標準免疫接種程序與市售獲得之人類IL-21使Balb/c小鼠免疫。在最後非佐劑加打後三至五天，收集淋巴結及/或脾，且產生單細胞懸浮液。抗原特異性細胞藉由標準分類方法使用生物素標記或螢光團標記之IL-21富集且在選殖小鼠可變域之前與飼養細胞共培養兩週。抗體使用抗IL-21捕獲ELISA加以鑑別且展示在活體外分析中阻斷且中和IL-21，對人類及食蟹獼猴之IL-21具有約5 pM之KD。用山羊抗人類 κ 抗體捕獲Fab抗體片段，接著針對結合生物素標記之IL-21（其又藉由鹼性磷酸酶標記之中性鏈親和素偵測）之能力進行篩選。

進一步最佳化與小鼠及人類IL-21均結合的抗體，得到小鼠抗體15M2。為此，使所分離之鼠類15H12之VH及VL之CDR發生隨機突變誘發且使用ELISA篩選與人類及小鼠IL-21結合的所得抗體。隨後將增強親和力之突變組合，得到15M2，隨後使用構架庫方法進行人類化。對於構架庫而言，合成含有15M2之CDR的十二個人類VH構架生殖系基因(1-24、1-46、1-69、2-5、3-15、3-23、3-53、3-72、4-04、4-39、5-51及6-01)及八個人類VL構架基因(A-19、A-26、A-27、B-2、B-3、L-2、L-12及O-2)且選殖於重鏈及輕鏈人類IgG4表現載體中。所有96個重鏈及輕鏈組合短暫轉染293 HEK之後，用抗人類 κ 抗體自上清液捕獲人類IgG之後，藉由ELISA分析上清液中與直接塗佈至盤上之人類IL-21及溶液中經生物素標記之IL-21結合的情況。考慮可發展性及ELISA活性，利用1-46重鏈人類構架及O2人類輕鏈構架，選擇CDR來源於抗體15M2之人類化抗體用於進一步最佳化。其對人類IL-21之KD為約0.5 pM。

人類化抗體之分析鑑別出輕鏈CDR脫醯胺位點(Asn92)及重鏈

CDR異構化位點(Asp55)。為移除此等化學降解熱點，產生含有重鏈 Asp55Glu及輕鏈 Asn92His突變之經工程改造抗體。此等突變對人類及食蟹獼猴IL-21引起一些親和力損失(降至約2 pM KD)。確定親和力損失係歸因於Asp55Glu突變。因此，在重鏈中維持Asp55殘基以及在輕鏈中發生Asn92His突變。合理的工程改造原理係藉由工程改造重鏈中之近鄰Ser56殘基而引導進一步之親和力最佳化。據此，選擇含有Ser56Val突變、同時減少Asp55異構化且改善親和力的經工程改造抗體。最終抗體對人類及食蟹獼猴之IL-21均具有約0.5 pM之親和力。選擇人類IgG4之恆定區，其具有阻止半抗體形成(S225P)且降低效應功能(F231A/L232A)的點突變。電子雜交Epivax分析顯示免疫原性熱點無法辨別。最終經工程改造之人類化抗體(「Ab327」)之序列資訊展示於下表1中。

表1

SEQ ID NO:	身分	長度	胺基酸序列
1	重鏈可變域	117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIDTSDVYTIY NQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARYGPLAMDYWGQGTLLVTVSS
2	輕鏈可變域	106	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ FHTLRTFGGGTKVEIK
3	重鏈	443	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIDTSDVYTIY NQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARYGPLAMDYWGQGTLLVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
4	輕鏈	213	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIS

SEQ ID NO:	身分	長度	胺基酸序列
			NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ FHTLRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

Ab327之溶解度及穩定性特徵

評估Ab327在10 mM檸檬酸鹽pH 6 (C6)及10 mM檸檬酸鹽pH 6 + 150 mM NaCl (C6N)調配物中之與溶解度及穩定性相關之物理化學特性。C6調配物中之溶解度≥ 122.9 mg/mL且C6N調配物中之溶解度≥ 130.9 mg/mL。100 mg/mL Ab327於10 mM檸檬酸鹽、150 mM NaCl、0.02% Tween80之pH 6調配物(C6NT)中之黏度經測定為5.8 cP。

在25℃下在10 mM檸檬酸鹽之pH 6緩衝液中4週之後，Ab327化學及物理異質性之改變較小，藉由分析型陽離子交換層析(CEX)觀測到主峰面積之變化小於5%。在相同狀況下，藉由分析型尺寸排阻層析(SEC)觀測到< 0.5%之高分子量(HMW)聚集體生長。檸檬酸鹽pH 6穩定性樣品在40℃下4週之後在基於細胞之分析中顯示無生物活性損失。

在4℃、25℃及40℃下於C6中4週之後，藉由用於表徵CDR化學降解熱點之肽圖譜LC-MS來分析抗體。LC-MS分析顯示，相對於4℃之對照樣品，40℃下之重鏈CDR殘基Asp55無顯著異構化。相對於4℃之對照樣品，鑑別出在25℃下4週之後其他常見CDR降解生長超過0.5%且總體而言在全部6個CDR中總計小於5%。

用1 mg/mL快速凍融研究及50 mg/mL緩慢凍融研究評估Ab327在C6中之物理穩定性。在這兩個研究期間，Tween80之存在減少10微米大小粒子之形成。在高濃度研究中，150 mM NaCl鹽之存在減少HMW聚集體之形成。在低濃度研究中，在鹽及Tween80存在下HMW

聚集體為0.7%。總之，Ab327在此等測試中似乎具有良好溶液特性(包括黏度、溶解度及穩定性)，以繼續進行至人類研究中。

Ab327之功能特性

Ab327與人類IL-21及其他人類共同 γ 鏈受體家族成員之結合(使用ELISA)

此研究之目的為確定Ab327與人類IL-21之結合特異性(相較於共同 γ (γ c)鏈受體細胞激素之其他成員)。細胞激素受體 γ c鏈家族由六個成員組成：IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15及IL-21。此家族之全部成員經由含有 γ c次單元之受體複合物傳導信號。使用ELISA測定Ab327與其他人類 γ c鏈細胞激素家族成員結合之特異性。簡言之，在塗有山羊抗人類 κ IgG之ELISA盤上捕獲Ab327。隨後在37°C下將用自100 nM-780 pM滴定之生物素標記之細胞激素添加至盤中持續1小時且使用經鹼性磷酸酶標記之中性鏈親和素偵測任何結合之細胞激素。隨驢抗山羊IgG一起捕獲之針對IL-2之市售小鼠單株抗體及針對IL-4、IL-7、IL-9及IL-15之山羊多株抗體在結合經生物素標記之細胞激素且用中性鏈親和素偵測之後得到陽性信號。然而，除結合人類IL-21者之外，未觀測到Ab327之可偵測信號(參見下表2，其展示Ab327及結合人類共同 γ 鏈受體之其他配位體之結合(使用ELISA)，如560 nm下之光學密度(OD)量測所示。亦參見圖1)。此等結果表示，Ab327對IL-21具有特異性且不結合其他人類 γ c鏈受體家族細胞激素。

表2

蛋白質	蛋白質濃度 (nM)	100	33.33	11.11	3.7	1.23	0.41	0.14	0.05
IL-2	陽性對照	1.2486	0.5925	0.2387	0.1334	0.1014	0.0843	0.0915	0.0949
	Ab327	0.0723	0.074	0.0731	0.0789	0.0766	0.081	0.0891	0.0876
IL-4	陽性對照	1.7798	1.7463	1.6317	1.4439	1.1759	0.9233	0.5363	0.2707
	Ab327	0.0752	0.0726	0.0735	0.0698	0.0722	0.0688	0.0736	0.0742
IL-7	陽性對照	2.8796	2.8491	2.7336	1.9599	0.9213	0.3748	0.177	0.117
	Ab327	0.0707	0.0721	0.0713	0.0744	0.0755	0.0749	0.0761	0.0773
IL-9	陽性對照	1.6997	1.2082	0.6841	0.3396	0.1809	0.1163	0.0994	0.091

	Ab327	0.0739	0.0705	0.0714	0.1116	0.0717	0.0701	0.0729	0.0749
IL-15	陽性對照	1.7007	1.4887	1.2129	0.8659	0.4361	0.2077	0.136	0.0915
	Ab327	0.0739	0.0685	0.0688	0.0682	0.0694	0.1073	0.075	0.0733
IL-21	hIgG4	0.0618	0.0597	0.058	0.063	0.059	0.0582	0.062	0.0604
	Ab327	0.8124	0.8056	0.7637	0.7613	0.7054	0.5237	0.3414	0.1951

Ab327對人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠及家兔IL-21之結合親和力

Ab327為結合且中和人類IL-21之經工程改造的人類化單株IgG4抗體。此研究之目的為測定Ab327對人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠及家兔IL-21 (序列在下文給出)之結合親和力。在37℃下使用KinExA 3000儀器測定Ab327與此等多種IL-21物質之表觀結合親和力(KD)。使用IL-21之固定抗體濃度方案及2倍連續稀釋液進行KinExA溶液平衡結合實驗。在分析之前，樣品於37℃下平衡6-36小時。使用結合Dylight 649之抗人類IgG Fc多株抗體偵測平衡樣品中之游離抗體。使用KinExA Pro軟體使所得游離抗體相較於抗原濃度之百分比資料擬合「親和力，標準」結合模型且確定最佳擬合結合親和力值(KD)。

來自三個獨立實驗(人類、食蟹獼猴、小鼠及大鼠)或來自單個測定(家兔IL-21)之平均KD以及標準差概括於下表3中(Ab327之表觀溶液平衡結合親和力(KD))。

表3

IL-21物質	獨立測定之次數	37℃下Ab327之表觀溶液平衡結合親和力 KD (M)
人類	3	$0.8 \pm 0.5 \times 10^{-12}$
食蟹獼猴	3	$0.3 \pm 0.1 \times 10^{-12}$
小鼠	3	$2.4 \pm 1.3 \times 10^{-7}$
大鼠	3	$2.3 \pm 0.2 \times 10^{-7}$
家兔	1	$> 2 \times 10^{-7}$

Ab327在37℃下分別以 $0.8 \pm 0.5 \times 10^{-12}$ M及 $0.3 \pm 0.1 \times 10^{-12}$ M之平均(n=3)親和力與人類及食蟹獼猴IL-21結合。Ab327分別以 $2.4 \pm 1.3 \times 10^{-7}$ M、 $2.3 \pm 0.2 \times 10^{-7}$ M及 $> 2 \times 10^{-7}$ M之親和力與小鼠、大鼠及家兔IL-21結合。與家兔IL-21之結合係基於結合信號小於小鼠及大鼠IL-21之等效樣品所觀測者之結合信號來估計。基於此等結果，Ab327對人類及

5

食蟹獼猴IL-21具有約皮莫耳濃度等級之親和力，而對於小鼠、大鼠及家兔IL-21具有相對弱之親和力。

Ab327在活體外IM9泛STAT-螢光素酶報導子分析中抑制人類及食蟹獼猴之IL-21。

IL-21活化JAK家族蛋白質酪胺酸激酶，其調節信號轉導子及轉錄活化因子(Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT)之IL-21依賴性活化。使用IM9細胞評估IL-21活化STAT路徑之能力。IM9細胞為來源於患有多發性骨髓瘤之患者血液之經EBV轉型之B類淋巴母細胞細胞株且自然地表現IL-21受體(IL-21R)及其共受體(c)，IM9細胞經泛STAT-螢光素酶報導子構築體穩定轉染。使用IM9-泛STAT-螢光素酶報導子分析，此實驗之目標為確定Ab327是否可抑制STAT之IL-21依賴性活化。

在燒瓶中於培養基(RPMI1640，10% FBS，1X 青黴素/鏈黴素，100 $\mu\text{g/mL}$ 勻黴素(Zeocin)用於選擇泛STAT-螢光素酶報導子)中常規地培養IM9-泛STAT-螢光素酶細胞(具有泛STAT螢光素酶報導子之IM9細胞次純系1B10/3G2)。在分析中，使細胞以50,000個細胞/50微升/孔接種於經TC處理之盤中且在37°C下培育隔夜。隨後，在來自不同物種之重組IL-21蛋白質存在下用Ab327處理細胞。評估0 pM至6670 pM劑量範圍之Ab327 (最終濃度係以Ab327之MW = 150 kDa計)。向各孔中添加來自不同物種之重組IL-21至66.67 pM之最終濃度(以MW = 15 kDa計)。人類IL-21R:Fc嵌合體(R&D Systems，目錄號991-R2)用作陽性對照且人類IgG4用作陰性對照。評估0 pM至47520 pM劑量範圍之陽性及陰性對照。一式三份地進行測試。將96孔盤置放於組織培養恆溫箱(37°C，95%相對濕度，5% CO₂)中4小時。添加100微升/孔One-Glo螢光素酶溶液以停止分析。使用光度計(Perkin Elmer Victor3)讀盤。

結果係以IC50 (半最大抑制濃度)表示且使用 4參數S形資料擬合 (Sigma plot)來計算。來自三個獨立實驗之平均IC50及標準偏差報導於下表4中。

表4

IC50 (pM)	人類IL-21	食蟹獼猴 IL-21	小鼠IL-21	大鼠IL-21	家兔IL-21
Ab327	46.7±2.4	48.3±5.9	N.N.D.	N.N.D.	N.N.D.
hIL21R-Fc	271±15.6	3922±525	3533±543	N.N.D.	321±76.2

在測試範圍內，Ab327以劑量依賴性方式完全抑制人類及食蟹獼猴 IL-21 誘導之 STAT 活性。Ab327之抑制大於使用陽性對照(hIL-21R:Fc)所觀測之抑制，相較於陽性對照之271±15.6，Ab327之IC50為46.7±2.4。同型對照抗體(hIgG4)未抑制泛STAT活性(資料未顯示)。總之，在此等狀況下(N.N.D. = 未偵測之中和)，Ab327活體外有效中和人類及食蟹獼猴IL-21之活性，但其不中和小鼠、大鼠或家兔IL-21(以上給出之序列)。

Ab327活體外中和人類IL-21誘導之初級人類B細胞增殖。

B細胞之主要功能為產生中和及清除病原體之抗體。產生抗體之B細胞係由初始B細胞在生發中心(germinal center, GC)反應期間產生。GC係在B細胞與特異性抗原相遇時確立且接收來自T濾泡輔助細胞之指示信號用於生長、生存、選擇及分化。在彼等信號中，B細胞由CD40及大量細胞激素刺激，其中IL-21為促進增殖、同型轉換、漿細胞分化及分泌抗體之關鍵因子。目標為確定Ab327是否能夠抑制IL-21誘導之初級人類B細胞增殖。

自Indiana血液中心獲得來自五個健康供者之膚色血球層(buffy coats)。藉由菲科爾-帕克(Ficoll-Paque)梯度分離自膚色血球層分離PBMC且用抗CD19磁性珠粒(Miltenyi Biotec)陽性選擇CD19+ B細胞。回收群之純度通常為> 90%。為評估所培養細胞之增殖性反應，在37

℃及5% CO₂下，在96孔平底培養盤中，以50萬個細胞/毫升(10萬個細胞/孔)用適合之刺激劑(含有1 mM丙酮酸鈉、非必需之胺基酸、10 mM HEPES pH 7.0、100 U/mL青黴素及100 µg/mL鏈黴素之RPMI-1640/10% FBS)培養純化之CD19+細胞5天。用3.33 nM (以MW = 15k Da計)人類IL-21及2 µg/mL抗人類CD40 (BD Pharmingen)之組合培育分離之B細胞。評估Ab327 (0.1 nM至26.7 nM)、人類IL-21R:Fc嵌合體(0.1 nM至213.3 nM，R&D Systems)或人類IgG4 (0.1 nM至26.7 nM)之劑量範圍。在培養起始時添加所有刺激物及處理。培養5天之後，使用液體閃爍計數器量測[甲基-3H]胸苷吸收量。

結果係以最大增殖百分比表示，而無抗體之情況下IL-21介導之刺激為100%。使用4參數S形資料擬合計算其中Ab327抑制50% IL-21誘導性反應之濃度(IC₅₀)。Ab327以劑量依賴性方式抑制IL-21誘導之初級人類B細胞增殖。此抑制遠大於使用陽性對照(人類IL-21R-Fc構築體)所觀測之抑制，該陽性對照在所用最高濃度(26.7 nM)下不能夠完全抑制IL-21誘導之增殖(參見圖2)。Ab327之IC₅₀計算值為1.15±0.25 nM (5個獨立實驗之平均值± SD)。陰性對照抗體(同型對照hIgG4)不抑制IL-21誘導之初級B細胞增殖。表5展示Ab327能夠活體外中和人類IL-21誘導之初級人類B細胞增殖。數值展示人類B細胞增殖之百分比± SDEV。總之，Ab327活體外抑制IL-21誘導之初級人類B細胞增殖。

表5

	hIgG4同型 之數值	SDEV	huIL-21R:Fc 之數值	SDEV	Ab327之數值	SDEV
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
0.1	96.48	5.34	83.37	15.82	83.12	10.39
0.21	115.36	10.33	98.71	10.84	95.59	6.77
0.42	107.20	17.11	87.38	6.43	81.91	7.21
0.83	114.18	15.30	109.17	6.33	79.24	16.18
1.67	107.91	4.78	89.85	12.62	24.57	3.68
3.33	118.55	18.68	102.87	13.68	13.35	2.38

6.67	102.74	17.85	-	-	6.89	1.59
13.3	-	-	77.10	13.75	-	-
13.33	100.99	6.21	-	-	5.51	1.47
26.7	96.34	11.22	-	-	4.01	1.34
53.3	-	-	82.57	6.17	-	-

Ab327活體外中和人類IL-21誘導之初級人類B細胞之漿細胞分化。

藉由整合由抗原及T細胞(CD40-CD40L相互作用及細胞激素之產生)提供之信號而調節B細胞分化成漿母細胞。對於人類B細胞分化具有重要作用之細胞激素之一為IL-21，其誘發漿細胞產生及活化之初始及記憶B細胞分泌抗體。已展示IL-21誘導活化B細胞上之CD25 (IL-2R)表現，使彼等細胞對IL-2之分化促進作用敏感，從而實現IL-2與IL-21之間的協同性相互作用以促進漿母細胞產生及抗體分泌。目標為確定Ab327是否能夠活體外抑制IL-21誘導初級人類B細胞分化成漿細胞。

如上所述獲得膚色血球層。在37℃及5% CO₂下，在96孔平底培養盤中，以75萬個細胞/毫升(15萬個細胞/孔)用適合之刺激劑(含有1 mM丙酮酸鈉、非必需之胺基酸、10 mM HEPES pH 7.0、100 U/mL青黴素及100 µg/mL鏈黴素之RPMI-1640/10% FBS)培養純化之B細胞6天。用3.33 nM人類IL-21、1 µg/mL抗人類CD40 (BD Pharmingen)、100 U/mL 人類 IL-2 (普留淨 (Proleukin)，Hanna's Pharmaceutical Supply Co.)及/或26.7 nM Ab327或26.7 nM人類IgG4抗體(陰性對照)之組合培育分離之B細胞。培養六天之後，細胞用染色緩衝液(2% FBS/PBS)洗滌且在4℃下與對人類CD38、IgD、CD19、CD27具有特異性之抗體(全部得自BD Biosciences)一起培育40分鐘。使用FC-500流式細胞儀(Beckman Coulter)進行五色流動式細胞量測術分析。漿細胞鑑別為表現高含量CD38及低含量IgD之細胞(參見下表6)。

由於供者中存在高可變性，因此以下展示之結果表現為藉由添加IL-21所誘導之漿細胞(CD38高 + IgD低之細胞)相對數量之倍數增



強，其中在培養基 + 抗CD40 + IL-2中來源於各供者之漿細胞值設定為等於一(1)。資料顯示為對來自五個健康供者之初級人類B細胞之作用的「倍數增強」。

表6

培養基+抗CD40 + IL-2	培養基+抗CD40 + IL-2 + IL-21	培養基+抗CD40 + IL-2 + IL-21 + IgG4同型	培養基+抗CD40 + IL-2 + IL-21 + Ab327
1.00	176.34	174.11	11.65
1.00	114.13	108.48	3.38
1.00	46.41	47.18	7.81
1.00	67.67	66.02	6.87
1.00	21.89	22.89	3.64

用抗CD40與IL-2之組合培養之新製B細胞含有極少CD38高/IgD低之漿細胞。相反，在IL-21存在下用抗CD40及IL-2共同刺激純化之B細胞導致實質性分化成漿細胞。陰性對照抗體(同型hIgG4)未能夠抑制IL-21之活性。Ab327抑制IL-21誘導之初級人類B細胞之漿細胞分化(n = 5個供者，p = 0.008，不成對t檢驗，Ab327相對於IgG4同型抗體)。總之，Ab327活體外抑制人類IL-21誘導之漿細胞分化。

Ab327中和小鼠中之人類IL-21活性。

將IL-21注射於小鼠中引起脾中若干細胞類型(包括B及T細胞亞群)之迅速及短暫擴增，如使用特異性標記物明顯鑑別。此實驗之目標為研究Ab327是否能夠抑制小鼠中人類IL-21之生物活性。

第1天對八至十週齡雌性C57Bl6小鼠(每組n = 5)腹膜內(i.p.)注射Ab327 (1毫克/小鼠)或同型(hIgG4，1毫克/小鼠)對照抗體。第2及第3天，小鼠接受50微克重組人類IL-21/小鼠/天或PBS之腹膜內注射。第4天，製備脾細胞之細胞懸浮液且裂解紅血球之後測定細胞總數。使用細胞表面標記物Gr-1及Sca-1、藉由流動式細胞量測術測定IL-21反應細胞之相對百分比。藉由用脾中細胞總數乘以IL-21反應細胞之百分比(Gr-1低Sca-1+細胞)計算每個脾之IL-21反應細胞總數。

下表7中之結果顯示為五隻小鼠中每一者脾中之IL-21反應細胞($\times 10^6$)之總數。

表7

hIL-21反應性脾細胞之數量($\times 10^6$)		
PBS + IgG4 同型	hIL-21 + IgG4 同型	hIL-21 + Ab327
1.72	9.12	2.26
1.73	9.19	2.32
2.59	9.23	3.49
2.64	11.78	2.34
2.36	12.27	5.25

注射人類IL-21造成IL-21反應性細胞增加。相對於接受陰性對照抗體之動物，Ab327之存在減少彼等細胞之數量($p < 0.0001$ ，不成對t檢驗，Ab327 + IL-21相對於IgG4 + IL-21以及IgG4 + PBS相對於IgG4 + IL-21)。藉由定量ELISA確定各組內對於Ab327及陰性對照抗體之暴露。據推斷，Ab327在活體內有效中和人類IL-21之生物活性。

Ab327展示在人類T細胞活化之NSG小鼠活體內模型中之功效。

先前已展示，中和人類IL-21阻止人類T細胞活化模型之疾病進展，在該模型中人類周邊血液單核細胞(PBMC)移植於嚴重免疫低下之NSG小鼠中(NOD-scid，無IL-2R γ ；Hippen KL等人. Blocking IL-21 signaling ameliorates xenogeneic GVHD induced by human lymphocytes. Blood 2012; 119: 619)。NSG小鼠缺乏T、B及NK細胞，且巨噬細胞及樹突狀細胞之功能亦已降低。移植人類PBMC導致明顯之人類T細胞活化及其於小鼠皮膚、肝、腸、肺及腎臟中之浸潤。此伴隨最終導致死亡之消耗症候群(Hippen, 2012)。此模型之優點為疾病由人類免疫細胞及人類細胞激素驅動，從而允許對其他物種無交叉反應性之抗體之活體內詢問。此研究之目的為展現以預防模式(在移植時開始投與)或治療模式(在移植後第21天開始投與)投與時，Ab327在人類T細胞活化模型中之活體內功效及疾病調節活性。

02

在移植之前，基於體重基線測量，將雌性NSG小鼠分組($n = 10$ /組)。第0天，將自San Diego血庫獲得之膚色血球層分離之 10^7 個人類PBMC靜脈內注射至小鼠中。對於預防模式(圖3)，將1 mg/kg或10 mg/kg Ab327或10 mg/kg hIgG4同型對照抗體在移植時及其後每週一次皮下給與小鼠。每週2-3次測量體重且監測總體外觀及健康。第19天，藉由剪尾獲得血液且藉由流動式細胞測量術分析人類CD45+細胞之移植。對於治療模式(圖4)，基於流動式細胞測量術資料及體重，將未接受任何治療之動物再分成匹配之群組。移植後第21天，將10 mg/kg Ab327或10 mg/kg hIgG4同型對照抗體皮下給與小鼠，接著其後每週一次給藥。包括四隻未移植小鼠作為「未治療對照或未移植」小鼠。體重變化係以基線體重百分比(第(x)天體重/第0天體重*100)計算。結果係以體重隨時間變化相對於基線之百分比顯示。

對於預防模式，用人類同型對照抗體(參見圖3，白色方形)治療之小鼠早在細胞轉移之後第20天出現消耗表現型。在轉移後第45天，同型對照組中平均重量相對於基線之損失大於10%且大部分小鼠落難，且因此研究終止。在移植日起始(預防模式)以10毫克/公斤/週Ab327 (圖3，黑色方形)治療完全消除消耗表現型。小鼠體重持續增加，與未移植小鼠相當。其體重在統計學上明顯不同於同型對照組($p = 0.000846$ 及 $p < 0.001$ ，分別為Ab327相較於同型及未移植小鼠相較於同型，雙因子變異數分析(2-way ANOVA)，重複測量)。1毫克/公斤/週劑量之Ab327 (圖3，黑色三角形)具有部分作用，因為其顯示減緩體重損失之進行。然而，此組中小鼠體重未在統計學上不同於同型對照。表8顯示用IL-21抗體或同型對照抗體治療42天的移植人類周邊血液單核細胞之嚴重免疫低下NSG小鼠(NOD-scid，無IL-2R γ)相對於基線之體重變化百分比平均值 $\pm$ SDEV。在移植PBMC之同時開始治療。Ab327 10 mg/kg組與同型對照組之間有顯著差異。

表8

	數值-未移植	SDEV	數值-同型 10 mg/kg	SDEV	數值- Ab 327 10 mg/kg	SDEV	數值 - Ab 327 1 mg/kg	SDEV
0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
7	100.9	3.0	102.7	2.9	103.1	3.1	102.5	2.7
14	103.8	2.8	105.8	5.0	107.4	4.6	106.2	3.4
17	104.4	1.9	108.0	4.8	109.5	2.6	107.5	4.0
21	106.5	2.7	104.8	5.8	107.4	3.9	108.2	5.1
24	110.8	6.1	103.1	8.8	107.4	3.9	109.5	6.6
26	110.1	4.1	100.8	10.4	108.5	3.6	109.6	7.3
28	110.4	2.8	99.6	13.5	111.7	3.9	109.2	9.8
31	110.2	3.7	98.2	14.2	111.3	4.1	107.7	10.4
33	111.2	3.2	95.4	12.5	113.4	3.6	105.5	11.9
35	109.9	2.5	93.6	11.5	113.9	4.3	102.2	13.4
38	109.5	4.3	91.9	11.3	114.2	5.5	99.5	15.0
40	110.3	2.9	90.9	11.1	113.2	4.4	98.8	17.2
42	111.4	4.0	89.9	11.1	115.1	5.4	97.5	18.1
45	114.0	3.3	89.6	10.9	116.1	4.5	97.3	18.1

如上所指出，人類PBMC投與導致在移植約20天之後開始之消耗病。為研究阻斷人類IL-21是否能夠中斷進行中之惡化疾病(治療模式)，在移植第21天之後開始用10毫克/公斤/週Ab327或hIgG4同型對照物治療小鼠。如圖4中所示，給與人類IgG4同型對照抗體之小鼠(白色方形)體重持續降低。另一方面，疾病發病(移植後第21天，圖4，黑色方形)之後起始之Ab327治療有效緩解消耗表現型。此組之平均體重在統計學上明顯不同於同型對照組($p = 0.042$ ，雙因子變異數分析，重複量測)。體重損失及疾病嚴重性之差異不歸因於將人類細胞移植於小鼠中之差異。與經同型對照治療之動物相比，研究結束時經Ab327治療之小鼠中之周邊人類CD45+細胞數量以及脾中之人類細胞略高。概言之，Ab327在活體內T細胞活化異種模型中展示功效及疾病調節活性。表9展示用IL-21抗體或同型對照抗體治療的移植有人類周邊血液單核細胞之嚴重免疫低下NSG小鼠(NOD-scid，無IL-2R γ)自第21天之體重變化百分比平均值 $\pm$ SDEV。治療始於第21天。Ab327 10 mg/kg組與同型對照組之間存在顯著差異。

20

表9

	數值-未移植	SDEV	數值-同型10 mg/kg	SDEV	數值- Ab327 10 mg/kg	SDEV
21	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
24	104.0	4.7	98.2	4.1	100.8	3.5
26	103.4	1.8	96.0	6.5	102.1	4.1
28	103.7	3.0	94.8	9.7	103.7	5.3
31	103.5	2.9	93.5	10.8	101.9	4.8
33	104.3	1.3	90.8	8.9	101.9	5.8
35	103.2	1.2	89.1	8.0	98.9	7.1
38	102.8	3.8	87.6	8.0	99.0	6.7
40	103.5	2.0	86.6	8.0	97.8	6.8
42	104.6	1.8	85.7	8.1	96.5	7.4
45	107.0	1.7	85.3	8.0	96.2	8.0

Ab327之藥物代謝動力學

在雄性食蟹獼猴體內單次靜脈內或皮下 3 mg/kg 給藥之後表徵 Ab327 之藥物代謝動力學。給藥 1008 個小時 (6 週) 後收集血清樣品。使用兩種 ELISA 方法 (總人類 IgG 或抗原捕獲) 量化抗體之後產生濃度-時間概況。總人類 IgG 方法利用 ELISA 形式量測抗 IL-21 抗體之濃度。標準、對照及測試樣品與已固定於微量滴定盤上之親和純化 F(ab')₂ 片段山羊抗人類 IgG (塗佈 Ab) 一起培育。培育之後，將小鼠抗人類 IgG4-HRP (辣根過氧化酶) 添加至孔中。洗滌掉非結合酶後，將 SureBlue® TMB (四甲基聯苯胺) 受質溶液添加至孔中。藉由添加酸性溶液停止顯色且在 450 nm 下量測光學密度，其中波長校正設定為 650 nm。

抗原捕獲方法利用 ELISA 形式量測抗 IL-21 抗體之濃度。標準、對照及測試樣品與已固定於經抗生蛋白鏈菌素塗佈之微量滴定盤上之人類 IL-21-生物素一起培育。培育之後，將小鼠抗人類 IgG4-HRP (辣根過氧化酶) 添加至孔中。洗滌掉非結合酶後，將 SureBlue® TMB (四甲基聯苯胺) 受質溶液添加至孔中。藉由添加酸性溶液停止顯色且在 450 nm 下量測光學密度，其中波長校正設定為 650 nm。分析範圍為 5-500 ng/mL。

藥物代謝動力學結果 (平均值) 提供於下表 10 及表 11 中。各組中之

動物數量為2。

表10

靜脈內投藥值

分析	$t_{1/2}^*$	AUC _{0-t}	AUC _{0-INF}	外推AUC%	CLss	Vss
	(h)	(h* μ g/mL)	(h* μ g/mL)	(%)	(mL/h/kg)	(mL/kg)
捕獲	249	6200	6750	7.36	0.430	47.2
總	105	6170	6220	0.823	0.484	52.0

縮寫= $t_{1/2}$ -半衰期，AUC_{0-t} - 0至末次可量測濃度之曲線下面積，AUC_{0-inf} - 0至無限之曲線下面積，外推AUC% -歸因於自末次可量測濃度外推至無限之AUC_{0-inf}百分比，CLss -總身體清除率之估算，Vss -穩態下分佈體積之估算。*終末半衰期經計算在72小時與168小時之間。

表11

皮下投藥值

分析	$t_{1/2}^*$	Tmax	Cmax	AUC _{0-t}	AUC _{0-INF}	外推AUC%	CLss/F	F%
	(h)			(h* μ g/mL)	(h* μ g/mL)	(%)	(mL/h/kg)	(mL/kg)
捕獲	51.8	60	21.6	4410	4540	2.45	0.683	72
總	53.6	84	24.0	4620	4620	0.0276	0.675	74

縮寫= $t_{1/2}$ -半衰期，Tmax-最大濃度之時間，Cmax-最大濃度，AUC_{0-t} - 0至可量測濃度之曲線下面積，AUC_{0-inf} - 0至無限之曲線下面積，外推AUC% -歸因於自末次可量測濃度外推至無限之AUC_{0-INF}百分比，CLss/F -清除率/生物可用性，F% -使用平均3 mg/kg靜脈內劑量之生物可用性作為參考= (AUC_{0-inf}皮下/AUC_{0-inf}靜脈內)/(靜脈內劑量/皮下劑量)*100。*終末半衰期經計算在96小時與336小時之間。

向雄性食蟹獼猴單次靜脈內或皮下投與Ab327之後，濃度-時間概況表明抗藥物抗體(ADA)形成且ADA在4/4猴中確認。平均終末半衰期為105-249小時且依據72小時至168小時的斜率計算以避免顯著ADA影響。平均清除率為0.43-0.48 ml/h/kg，其恰好在0.2-0.4 ml/h/kg之典型單株抗體清除率範圍之外。

皮下投與之後，生物可用性為72-74%，其屬於用於單株抗體之

典型範圍(50-100%)。儘管ADA形成，但猴中Ab327之藥物代謝動力學相對類似於針對單株抗體結合可溶性配位體所預期之藥物代謝動力學，其中Ab327之清除率略高於普通。

基於此等研究，推斷出Ab327在人類中之藥物代謝動力學將在人類化IgG4抗體之預期範圍內。基於猴清除率之類比法(allometric scaling)，所推估之人類清除率為0.3 mL/hr/kg (70 kg人類中0.02 L/h)且人類之生物可用性推估為50-75%。

用抗小鼠IL-21抗體治療緩解NOD小鼠唾液腺中之淋巴球浸潤。

因為Ab327不中和嚙齒動物之IL-21，所以研發替代分子用於臨床前疾病模型。抗體Ab728為特異性結合至小鼠IL-21之鼠類IgG1單株抗體。鼠類IL-21與Ab728之結合親和力為1 pM。Ab728在活體內及活體外分析中能夠完全中和鼠類IL-21。

非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠廣泛用作休格連氏症候群模型，因為其自發產生唾液腺中之淋巴球浸潤。先前研究顯示局部抑制帶有IL-21 shRNA慢病毒之NOD小鼠頷下腺之IL-21含量可扼止休格連氏症候群類症狀之發展(Liu H等人. Local suppression of IL-21 in submandibular glands retards the development of Sjögren's syndrome in non-obese diabetic mice. J Oral Pathol Med 2012; 41:728). 此實驗之目標為研究Ab728 (Ab327之替代物)之全身性投與是否能夠預防或緩解NOD小鼠之休格連氏症候群發展。

在7週齡開始用Ab728或同型對照mIgG1 (20毫克/公斤/週)治療雌性NOD小鼠。在18週齡處死小鼠且收集唾液腺。唾液腺片在4℃下用1.6% PFA 20%蔗糖固定隔夜，嵌入OCT中且儲存於-80℃下直至藉由免疫螢光法分析。另一片冷凍於液氮中用於mRNA研究。

在NOD小鼠中，頷下唾液腺及淚液腺中自約8週齡後出現局灶性炎症。病灶在結構及細胞組成方面與一些人類唾液腺中所發現之浸潤

物類似，其中存在T及B細胞。為研究抗IL-21治療是否緩解NOD唾液腺中之淋巴球浸潤，進行免疫螢光染色。簡言之，用PBS洗滌唾液腺之8 μ m冷凍切片，接著在室溫下與純化之初級抗體一起培育1小時，隨後與適合之經標記之二級抗體一起培育30分鐘。初級抗體為得自BD Biosciences之抗CD3 (T細胞)及抗B220 (B細胞)。二級抗體為得自Jackson ImmunoResearch Laboratories之Alexa Fluor 488山羊抗大鼠IgG及DyLight 594山羊抗亞美尼亞倉鼠(anti-Armenian hamster)。使用DAPI鑑別細胞之細胞核。

用mIgG1對照抗體治療之NOD小鼠顯示存在T及B淋巴細胞以管周聚集體形式排列之典型淋巴單核細胞浸潤物(圖5，概述於頂圖上)，其高度組織化，類似於休格連氏症候群患者中所發現之淋巴球形病灶。Ab728治療不僅有效降低所觀測病灶之數量，且亦有效減小其大小。

認為休格連氏症候群中淋巴聚集體之發展係由淋巴趨化激素CXCL13及其同源受體CXCR5之異位產生調節，其調節B細胞及CD4⁺T濾泡輔助(TFH)細胞於生發中心結構中之再循環及定位。已顯示IL-21參與TFH及生發中心結構之維持。IL-21亦控制CD8⁺T淋巴細胞之活化，認為其經由穿孔素及顆粒酶摧毀靶細胞。為研究抗IL-21治療是否將減少彼等標記物之表現，使用Trizol、隨後使用RNeasy小型套組(Qiagen, Inc.)、藉由均質化作用自冷凍之唾液腺分離總RNA。在260 nm下利用分光光度吸收來測定RNA濃度。使用高容量cDNA逆轉錄套組(PE Applied Biosystems)將RNA逆轉錄成cDNA。全部反應一式三份地進行以測定所分析之mRNAs之相對豐度。自PE Applied Biosystems 獲得用於IL-21 (Mm00517640_m1)、CXCR5 (Mm00432086_m1)、CXCL13 (Mm04214185_s1)、CCR9 (Mm02620030_s1)、顆粒酶B (Mm00442834_m1)及CD8 (Mm01182107_g1)之引子探針組。

GusB (Mm00446956_m1)係作為內源性對照物加以量測以校正基因表現量中之可變性。使用Delta Ct方法分析表現資料。個別Ct數值係以一式三份量測之平均值計算。

與經mIgG1對照抗體治療之小鼠(圖5)相比，CXCL13、CXCR5、IL-21、CD8及顆粒酶B mRNA轉錄物在經Ab728治療之小鼠中在統計學上明顯下調。概言之，投與抗小鼠IL-21抗體(Ab728)減少淋巴球浸潤唾液腺且延緩NOD小鼠SS類症狀之發展。

抗mIL-21 (Ab728)療法預防NOD小鼠之糖尿病。

Ab728為特異性結合至小鼠IL-21之鼠類IgG1單株抗體。鼠類IL-21與替代物Ab728之結合親和力為1 pM。Ab728在活體內及活體外分析中能夠完全中和鼠類IL-21。

人類I型糖尿病為由胰腺郎氏(Langerhans)胰島中之胰島素產生 β 細胞自體反應性毀壞所致之自體免疫疾病，其導致後續胰島素產生之損失。非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠品系發展出類似疾病且亦充當模型系統用於研究涉及自體免疫性反應起始及傳播之機制。組織學研究已顯示，胰島中發現的免疫細胞浸潤物很少直至約3至4週齡，此時雄性與雌性小鼠均開始展現包圍胰島之單核浸潤物(周圍胰島炎)。此等浸潤物發展且侵入胰島(胰島炎)，隨後於約12週齡開始出現高血糖症及完全糖尿病。

先前研究顯示，NOD小鼠中IL-21信號傳導之缺失使得疾病發展幾乎完全廢除(Spolski R等人. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:14028, 2008)。實驗目標為研究Ab728之全身性投與是否能夠預防或緩解NOD小鼠之糖尿病發展。

在疾病病程之不同時段用Ab728或同型對照mIgG1 (20毫克/公斤/週)治療雌性NOD小鼠。一組小鼠在7週齡開始治療(預防研究，圖7A)

且另一組動物在13週齡開始治療(臨床前後期，圖7B)。在這兩個情形中，追蹤小鼠之糖尿病發展直至小鼠為37週齡。為追蹤糖尿病發展，每週監測血糖含量且若連續兩次量測中之血糖高於250 mg/dl，則視動物患有糖尿病。藉由定量ELISA確認對Ab728之暴露。

用mIgG1對照抗體治療之NOD小鼠在其為13-15週齡之間時開始出現糖尿病且75%小鼠在37週齡進展至明顯糖尿病(12隻小鼠中之9隻用於預防研究且8隻小鼠中之6隻用於臨床前後期研究-參見圖7A及圖7B)。相反，抗IL-21治療明顯延緩糖尿病進展。在7週齡開始治療時，12隻小鼠中僅一隻(8%，圖7A， $p = 0.0007$)出現糖尿病，且在臨床前後期期間開始治療時，十一隻小鼠中僅一隻(9%，圖7B， $p = 0.002$)進展至明顯糖尿病。

概言之，投與抗小鼠IL-21抗體(Ab728)有效預防NOD小鼠之糖尿病發展。

序列

實例及分析中使用以下序列：

人類IL-21 - UniprotKB/Swiss-Prot資料庫條目#Q9HBE4

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKL
KRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTHGSEDS
(SEQ ID NO:13)

食蟹獼猴IL-21 - 序列係內部選殖；在公共資料庫中不可獲得

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLDPEFLPAPEDVETNCEWSAISCFQKAQLKSANTGNNERIINLSIIKKL
KRKSPSTGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTHGSEDS
(SEQ ID NO:14)

小鼠IL-21 - UniprotKB/Swiss-Prot資料庫條目#Q9ES17

HKSSPQGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLDPELLSAPQDVKGHCEHAACFQKAKLKPSNPGNNKTFI
IDLVAQLRRRLPARRGGKKQKHIACPCSCDSYEKRTPKFELERLKWLLQKMIHQHLS (SEQ ID NO:15)

大鼠IL-21 - UniprotKB/Swiss-Prot資料庫條目#A3QPB9

HKSSPQRPDHLIRLRHLMIDIVEQLKIYENDLDPELLTAPQDVKGQCEHAACFQKAKLKPSNTGNNTTFI
NDLLAQLRRRLPAKRTGNKQRHMAKPCSDLYEKKTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS (SEQ ID NO:16)

家兔IL-21 - (市售試劑- R&D Systems，目錄號7274-RB/CF)

HKSSSXGQDRYMIRMHQLLDIVDQLQSDVNDLDPDFLPAPQDVQKGCEQSAFSCFQKAQLKPANAGDNCKRI
SSLIKQLKRKL PSTKSKKTQKHRPTCPSCSYEKKNLKEFLERLKS LIQKMIHQHLLHLR
(SEQ ID NO:17)

序列

Ab327之胺基酸序列

SEQ ID NO:	身分	長度	序列
1	重鏈可變域	117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQAP GQGLEWMGLIDTSDVYTIYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARYGPLAMDYWGQGT LVTVSS
2	輕鏈可變域	106	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPED FATYYCQQFHTLRTFGG GTKVEIK
3	重鏈	443	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQAP GQGLEWMGLIDTSDVYTIYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARYGPLAMDYWGQGT LVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHK PSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA TK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
4	輕鏈	213	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPED FATYYCQQFHTLRTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQ LKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

Ab327之CDR序列

SEQ ID NO:	身分	長度	序列
7	LC-CDR1	11	RASQDISNYLN
8	LC-CDR2	8	YYTSRLHS
9	LC-CDR3	8	QQFHTLRT
10	HC-CDR1	13	KASGYTFTDYWMH
11	HC-CDR2	17	LIDTSDVYTIYNQKFKG
12	HC-CDR3	10	ARYGPLAMDY

供表現Ab327用之DNA

SEQ ID NO:	身分	長度	序列
5	重鏈		caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcc tggggcctcagtgagggtttcctgcaaggcatctggctaca cattcactgactactggatgcactgggtgagacaggccct ggacaagggttgagtggatgggactgattgatacttctga tgtttatactatctacaatcaaaagttcaagggcagagtca ccatgaccaggacacgtccacgagcacagtcacatggag ctgagcagcctgagatctgaggacacggcgtgtattactg tgcaagatatggggccctggctatggactactggggccagg gcacctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccca tcggtcttcccgtagcgcctgctccaggagcacctccga gagcacagccgcctgggctgcctgggtcaaggactacttcc ccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgacc agcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagg actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagca gcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaa cccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagtccaaata tggtcccccatgcccacctgcccagcacctgaggccgccc ggggaccatcagtccttctgttcccccaaaacccaaggac actctcatgatctcccggacctctgaggtcacgtgcgtggt ggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaact ggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaagacaa ccgccccgaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcag cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaagg agtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctcc atcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgaga gccacaggtgtacacctgcccccatcccaggaggagatga ccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttc taccacagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggact ccgacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggac aagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgt gatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcc tctcctgtctctgggt
6	輕鏈		Gacatccagatgaccagtcctccatcctccctgtctgcac tgtaggagacagagtcaccatcacttgaggggcaagtcagg acattagcaattatttaaactgggtatcagcagaaaccagg aaagcccctaagctcctgatctattacacatcaagattaca ctcaggggtcccatcaagggttcagtggcagtggtctggga cagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacctgaagat tttgcaacttactactgtcaacagtttcacacgcttcggac gttcggcgaggaggaccaaggtggagatcaaaagaactgtgg cggcgccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcag ttgaaatccggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataa cttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggata acgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagag caggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacct gacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacg cctgcgaagtcaaccatcagggcctgagctcgcccgtcaca aagagcttcaacaggggagagtg

【符號說明】

無



【序列表】

<110> 美國禮來大藥廠

<120> IL-21抗體

<130> X20141

<150> 61/968550

<151> 2014-03-21

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asp Thr Ser Asp Val Tyr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe His Thr Leu Arg Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20										25					30															
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met															
		35					40					45																		
Gly	Leu	Ile	Asp	Thr	Ser	Asp	Val	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe															
	50					55					60																			
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr															
65					70					75					80															
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys															
				85					90					95																
Ala	Arg	Tyr	Gly	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu															
			100					105					110																	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu															
		115					120					125																		
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys															
	130					135					140																			
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser															
145					150					155					160															
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser															
				165					170					175																
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser															
			180					185					190																	
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn															
		195					200					205																		
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro															
	210					215					220																			
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe															
225					230					235				240																

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 4
<211> 213
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe His Thr Leu Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 5
<211> 1329
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggcta cacattcact gactactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggactg attgatactt ctgatgttta tactatctac 180
aatcaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgigt attactgtgc aagatatggg 300
cccctggcta tggactactg gggccagggc accctggtea cegtctctc agcctccacc 360
aagggcccat cggctcttccc gctagcgccc tgcctcagga gcacctccga gagcacagcc 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 600
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 660
cccccatgcc caccctgccc agcacctgag gccgccgggg gaccatcagt cttcctgttc 720
cccccaaac ccaaggacac tctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtgggtg 780
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 900
agcgtctca cegtcttgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggaaagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200
ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1260
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1320
tctctgggt 1329

<210> 6
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6
gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattac acatcaagat tacactcagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactcttca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag ttacacagc ttccggacgtt cggcggaggg 300
accaaggtgg agatcaaaag aactgtggcg gcgccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
gatgagcagt tgaaatccgg aactgcctct gtgtgtgtcc tgctgaataa cttctatccc 420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtaggac aacgcccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
agctcgccccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgc 639

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 8

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 9

Gln Gln Phe His Thr Leu Arg Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 10

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Met His
 1 5 10

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 11

Leu Ile Asp Thr Ser Asp Val Tyr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12

Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此蛋白質以重組方式產生且與智人序列一致。

<400> 13

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp
1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala
20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile
50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn
65 70 75 80

Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu

100

105

110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser
115 120 125

Glu Asp Ser
130

<210> 14
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此蛋白質以重組方式產生且與食蟹獼猴序列一致。

<400> 14

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp
1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala
20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Ile Ser Cys Phe
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile
50 55 60

Ile Asn Leu Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Thr Gly
65 70 75 80

Ala Glu Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu
100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser
115 120 125

Glu Asp Ser

130

<210> 15
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此蛋白質以重組方式產生且與小家鼠序列一致。

<400> 15

His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg
 1 5 10 15

His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu
 20 25 30

Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu
 35 40 45

His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn
 50 55 60

Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala
 85 90 95

Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe
 100 105 110

Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu
 115 120 125

Ser

<210> 16
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 此蛋白質以重組方式產生且與褐家鼠序列一致。

<400> 16

His Lys Ser Ser Pro Gln Arg Pro Asp His Leu Leu Ile Arg Leu Arg
1 5 10 15

His Leu Met Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu
20 25 30

Asp Pro Glu Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly Gln Cys Glu
35 40 45

His Glu Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn
50 55 60

Thr Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Asn Asp Leu Leu Ala Gln Leu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Leu Pro Ala Lys Arg Thr Gly Asn Lys Gln Arg His Met Ala
85 90 95

Lys Cys Pro Ser Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Lys Thr Pro Lys Glu Phe
100 105 110

Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu
115 120 125

Ser

<210> 17

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此蛋白質以重組方式產生且與穴兔序列一致。

<400> 17

His Lys Ser Ser Ser Lys Gly Gln Asp Arg Tyr Met Ile Arg Met His
1 5 10 15

Gln Leu Leu Asp Ile Val Asp Gln Leu Gln Ser Asp Val Asn Asp Leu
 20 25 30

Asp Pro Asp Phe Leu Pro Ala Pro Gln Asp Val Gln Lys Gly Cys Glu
 35 40 45

Gln Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Pro Ala Asn
 50 55 60

Ala Gly Asp Asn Gly Lys Arg Ile Ser Ser Leu Ile Lys Gln Leu Lys
 65 70 75 80

Arg Lys Leu Pro Ser Thr Lys Ser Lys Lys Thr Gln Lys His Arg Pro
 85 90 95

Thr Cys Pro Ser Cys Tyr Ser Tyr Glu Lys Lys Asn Leu Lys Glu Phe
 100 105 110

Leu Glu Arg Leu Lys Ser Leu Ile Gln Lys Met Ile His Gln His Leu
 115 120 125

Leu Glu His Leu Arg
 130

I646105

發明摘要

※ 申請案號：104107331

※ 申請日：104/03/06

※IPC 分類：
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

【發明名稱】

IL-21抗體

IL-21 ANTIBODIES

【中文】

本發明係關於對人類IL-21具有高結合親和力且中和人類IL-21之經工程改造的人類化抗體；使用該等抗體治療病狀(諸如自體免疫病狀)之方法，其中保證拮抗或中和IL-21之作用；以重組產生該等抗體之組合物及方法；以及包含該等抗體之醫藥組合物。

【英文】

The invention relates to engineered, humanized antibodies that have high binding affinity for and neutralize human IL-21, methods of using the antibodies to treat conditions in which antagonism or neutralization of the effects of IL-21 is warranted, such as autoimmune conditions, compositions and methods for recombinantly producing the antibodies, and pharmaceutical compositions comprising the antibodies.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（2）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

圖式

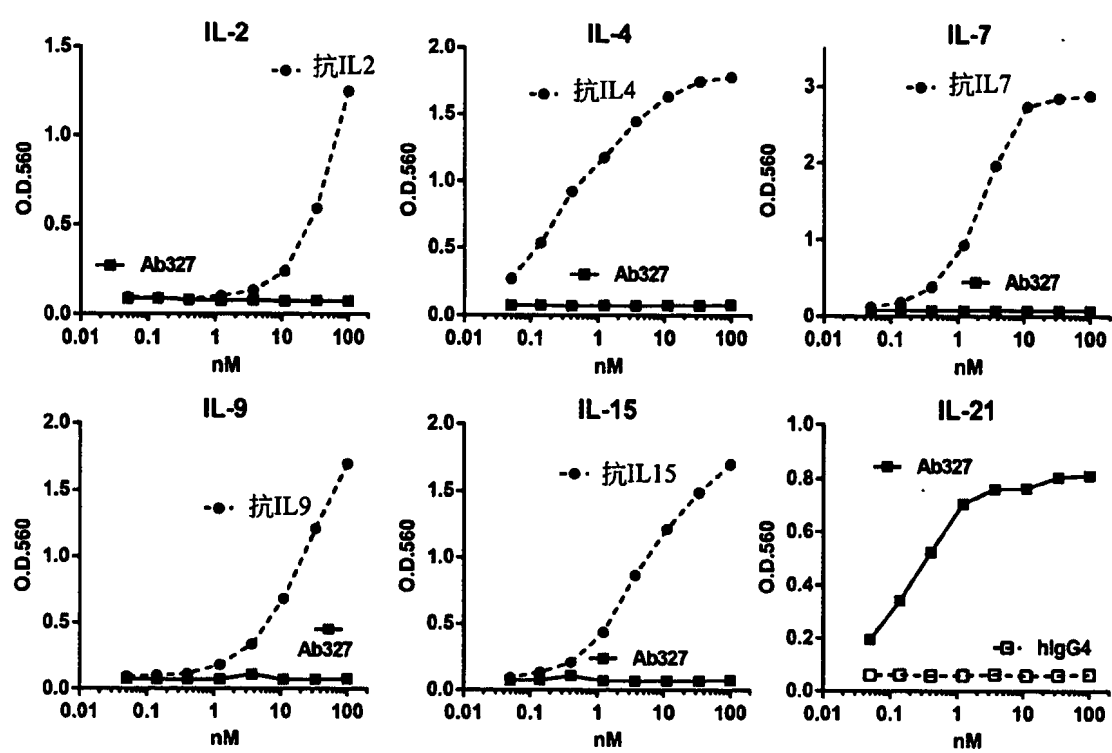


圖 1

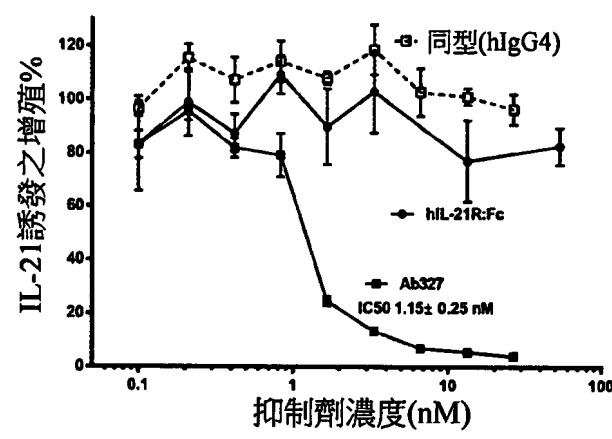


圖2

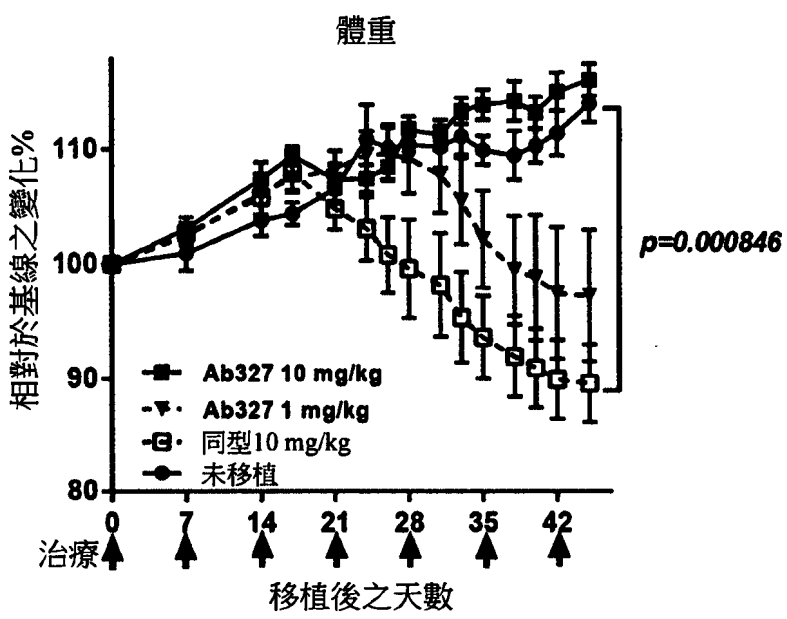


圖3

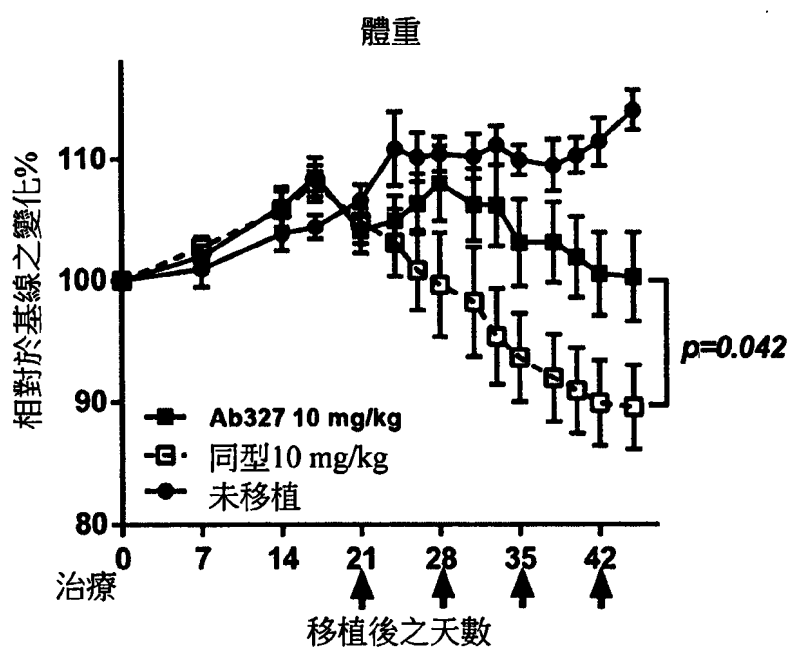


圖4

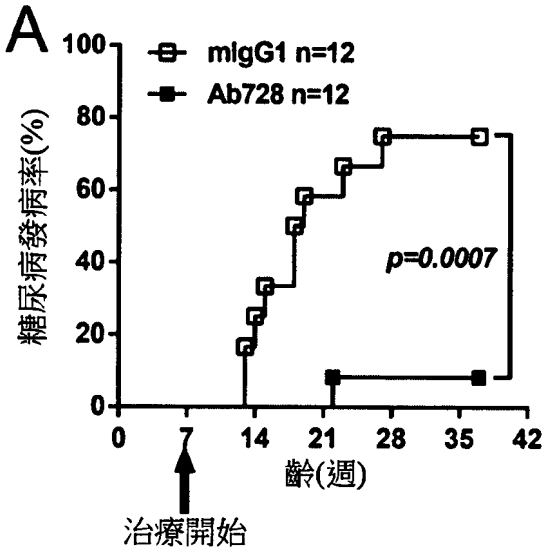


圖7A

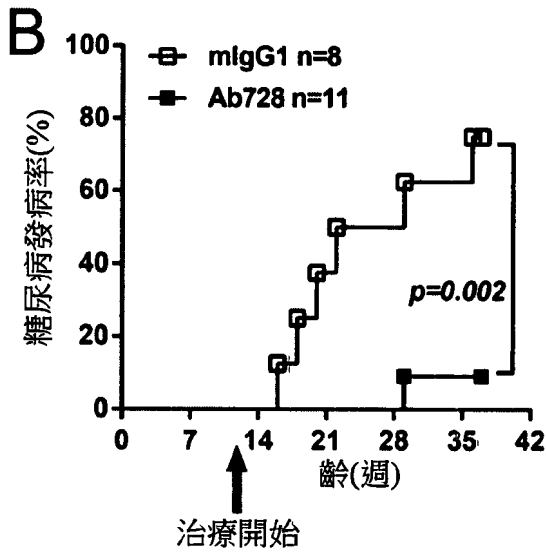


圖7B

申請專利範圍

1. 一種結合至人類IL-21之抗體，其包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)，其中該LCVR包含CDRL1之SEQ.ID.NO: 7、CDRL2之SEQ.ID.NO: 8及CDRL3之SEQ.ID.NO: 9，且其中該HCVR包含CDRH1之SEQ.ID.NO: 10、CDRH2之SEQ.ID.NO: 11及CDRH3之SEQ.ID.NO: 12。
2. 如請求項1之抗體，其包含抗體重鏈及抗體輕鏈，其中該重鏈包含具有SEQ.ID.NO: 1之HCVR，且其中該輕鏈包含具有SEQ.ID.NO: 2之LCVR。
3. 如請求項1或2之抗體，其係由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，其中各重鏈包含重鏈可變域，其胺基酸序列為SEQ ID NO: 1序列，且其中各輕鏈包含輕鏈可變域，其胺基酸序列為SEQ ID NO: 2序列。
4. 如請求項1或2之抗體，其中各重鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 3序列且各輕鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。
5. 一種DNA分子，其包含編碼抗體重鏈之聚核苷酸，該抗體重鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 3序列。
6. 如請求項5之DNA分子，其中編碼該抗體重鏈之聚核苷酸之序列為SEQ ID NO: 5序列。
7. 一種DNA分子，其包含編碼該抗體輕鏈之聚核苷酸，該抗體輕鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。
8. 如請求項7之DNA分子，其中編碼該抗體輕鏈之聚核苷酸之序列為SEQ ID NO: 6序列。
9. 一種DNA分子，其包含編碼該抗體重鏈之聚核苷酸，該抗體重鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 3序列，且其包含編碼該抗體輕鏈

之聚核苷酸，該抗體輕鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。

10. 如請求項9之DNA分子，其中編碼該抗體重鏈之聚核苷酸之序列為SEQ ID NO: 5序列，且其中編碼該抗體輕鏈之聚核苷酸之序列為SEQ ID NO: 6序列。
11. 一種用如請求項5或6之DNA分子及如請求項7或8之DNA分子轉型之哺乳動物細胞，該經轉型之哺乳動物細胞能夠表現包含兩個抗體重鏈及兩個免疫球蛋白輕鏈之抗體，其中該兩個重鏈之各胺基序列為SEQ ID NO: 3序列且該兩個輕鏈之各胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。
12. 一種用如請求項9或10之DNA分子轉型之哺乳動物細胞，該經轉型之哺乳動物細胞能夠表現包含兩個抗體重鏈及兩個免疫球蛋白輕鏈之抗體，其中該兩個重鏈之各胺基序列為SEQ ID NO: 3序列且該兩個輕鏈之各胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列。
13. 一種用於產生抗體之方法，該抗體包含兩個抗體重鏈及兩個免疫球蛋白輕鏈，其中該兩個重鏈之各胺基序列為SEQ ID NO: 3序列且該兩個輕鏈之各胺基酸序列為SEQ ID NO: 4序列，且該方法包含：
 - a. 將如請求項11或12之哺乳動物細胞在表現該抗體之條件下培養，及
 - b. 回收該表現之抗體。
14. 一種如請求項1至4中任一項之抗體之用途，其係用於製造供治療自體免疫病狀之藥物。
15. 如請求項14之用途，其中該自體免疫病狀為原發性休格連氏症候群(primary Sjögren's Syndrome)、休格連氏症候群、全身性紅斑性狼瘡症、格雷夫氏病(Grave's disease)或1型糖尿病。
16. 如請求項15之用途，其中該自體免疫病狀為原發性休格連氏症

候群或休格連氏症候群。

17. 如請求項15之用途，其中該自體免疫病狀為全身性紅斑性狼瘡症。
18. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項之抗體及醫藥學上可接受之賦形劑。