



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102027011 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 03

(21) 申请号 200880126330. 8

PTA-8434 2007. 05. 15

(22) 申请日 2008. 12. 08

(73) 专利权人 津莫吉尼蒂克斯公司

(30) 优先权数据

地址 美国华盛顿

61/012, 329 2007. 12. 07 US

(72) 发明人 S·R·雅斯帕斯 M·W·里克森

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

S·R·狄龙 F·J·拉姆斯德尔

2010. 08. 06

C·M·克赖萨 E·C·易

(86) PCT国际申请的申请数据

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

PCT/IB2008/005011 2008. 12. 08

公司 11285

(87) PCT国际申请的公布数据

代理人 张广育 刘文君

W02010/055366 EN 2010. 05. 20

(51) Int. Cl.

(83) 生物保藏信息

C07K 16/24 (2006. 01)

PTA-8790 2007. 11. 15

A61K 39/395 (2006. 01)

PTA-8786 2007. 11. 15

(56) 对比文件

PTA-8791 2007. 11. 15

W0 2006057027 A1, 2006. 06. 01,

PTA-8787 2007. 11. 15

W0 2006057027 A1, 2006. 06. 01,

PTA-8789 2007. 11. 15

US 2007122413 A1, 2007. 05. 31,

PTA-8788 2007. 11. 15

W0 2006105538 A2, 2006. 10. 05,

PTA-8317 2007. 04. 03

W0 2007111714 A2, 2007. 10. 04,

PTA-8314 2007. 04. 03

审查员 李煦颖

PTA-8313 2007. 04. 03

PTA-8315 2007. 04. 03

PTA-8316 2007. 04. 03

PTA-8430 2007. 05. 15

权利要求书2页 说明书62页

PTA-8431 2007. 05. 15

序列表35页 附图4页

PTA-8432 2007. 05. 15

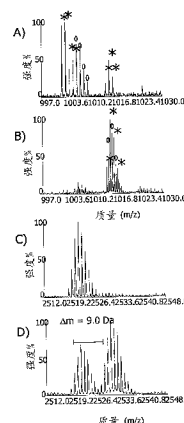
PTA-8433 2007. 05. 15

(54) 发明名称

抗人 IL-21 单克隆抗体

(57) 摘要

本发明提供了人抗人 IL-21 单克隆抗体以及产生它们的杂交瘤细胞。这些抗体中的一些具有结合天然人 IL-21、突变重组 IL-21 蛋白和 / 或人 IL-2 的肽区的能力。这些人抗 IL-21 抗体可用于治疗自身免疫和炎症性疾病, 尤其是由 T 滤泡辅助性细胞、B 细胞 T_H 细胞或 T_H17 细胞介导的疾病。



1. 一种抗人 IL-21 单克隆抗体, 包含:
 - (a) 重链区, 包含:
 - (i) 包含 SEQ ID NO:31 中所示的 CDR1 序列;
 - (ii) 包含 SEQ ID NO:33 中所示的 CDR2 序列; 和
 - (iii) 包含 SEQ ID NO:35 中所示的 CDR3 序列; 以及
 - (b) 轻链区, 包含:
 - (i) 包含 SEQ ID NO:39 中所示的 CDR1 序列;
 - (ii) 包含 SEQ ID NO:41 中所示的 CDR2 序列; 和
 - (iii) 包含 SEQ ID NO:43 中所示的 CDR3 序列。
2. 权利要求 1 的抗体, 其中所述重链包括 SEQ ID NO:29 的氨基酸残基 20-145; 并且其中所述轻链包括 SEQ ID NO:37 的氨基酸残基 21-126。
3. 一种由标识为 362.78.1.44 的杂交瘤细胞产生的抗体, 其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), ATCC 专利保藏号为 PTA-8790。
4. 权利要求 1-3 任一项的分离的抗体, 其中所述分离的抗体以 10^6M^{-1} 或更高的结合亲和力和 (K_A) 结合人 IL-21。
5. 权利要求 4 的分离的抗体, 其中所述分离的抗体以 10^7M^{-1} 或更高的结合亲和力 (K_A) 结合人 IL-21。
6. 权利要求 1-3 任一项的抗体, 其中所述 Fc 部分的效应器功能降低。
7. 权利要求 1-3 任一项的抗体, 其中所述抗体的 Fc 部分选自 IgG1、IgG2 和 IgG4。
8. 一种标识为 362.78.1.44 的杂交瘤细胞, 其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), ATCC 专利保藏号为 PTA-8790。
9. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗炎症性肠病 (IBD) 的药剂的用途, 其中所述炎症性肠病选自克罗恩病、溃疡性结肠炎和肠易激综合征。
10. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗类风湿型关节炎的药剂的用途。
11. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗多发性硬化症的药剂的用途。
12. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗 I 型糖尿病 (IDDM) 的药剂的用途。
13. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗斯耶格伦氏综合征的药剂的用途。
14. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗自身免疫疾病的药剂的用途, 其中所述自身免疫疾病选自胰腺炎、炎性肌病、显微镜下多血管炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肝炎、韦格纳氏综合征、肠憩室病、强直性脊柱炎、硬皮病、系统性硬化症、银屑病关节炎、骨关节炎、异位性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病 (GVHD)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、肾小球性肾炎、IgA 肾病、高敏移植患者、抗磷脂综合征、葡萄膜炎和哮喘。
15. 权利要求 14 的用途, 其中所述炎性肌病为多肌炎或皮肌炎。
16. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗系统性红斑狼疮 (SLE) 或银屑病的药剂的用途。
17. 权利要求 1-7 中任一项的抗体用于制备治疗 T 滤泡辅助细胞介导或 B 细胞介导的疾病的药剂的用途, 其中所述 T 滤泡辅助细胞介导和 B 细胞介导的疾病选自系统性红斑狼疮、自身免疫性听力丧失、格雷夫斯氏病、寻常型天疱疮、重症肌无力、视神经脊髓炎、古德

帕斯彻氏综合征、自身免疫性肾炎、冷球蛋白血症、格林－巴利综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病（CIDP）、自身免疫性溶血性贫血和特发性血小板减少性紫癜（ITP）。

抗人 IL-21 单克隆抗体

背景技术

[0001] 免疫系统是机体抵抗由病原体即细菌、病毒、真菌等引起的疾病,以及对由机体自身的细胞和组织的异常生长引起的疾病(即癌性肿瘤)的主要防御。在正常情况下,免疫系统能够区分机体正常细胞或“自体”细胞与异质病原体或异常细胞或“非自体”细胞。免疫系统避免与自体反应的过程被称为耐性。有时,免疫系统失去将“自体”识别为正常的能力并因此发生抵抗该组织或细胞的反应,从而导致自身免疫的一种状态——耐性丧失。由自身免疫引起的病理通常具有严重临床后果并且是世界上尤其是发达国家的主要健康问题之一。

[0002] IL-21 是一种强效免疫调制四- α -螺旋束 I 型细胞因子,其与由 IL-21R 和公共 γ 链构成的异二聚受体结合(见综述 Spolski and Leonard, *Annu Rev Immunol.* Nov8 ;2007)。IL-21 由 NK-T 和 CD4⁺T 细胞(包括对生发中心反应重要的促炎性 Th17 细胞和滤泡辅助性 T_{FH} 细胞)产生,并对先天和适应性免疫反应都具有多效性,包括 B 和 T 细胞增殖的增强、CD8⁺T 细胞和自然杀伤(NK)细胞细胞毒性的增加、B 细胞向分泌免疫球蛋白的浆细胞的分化,和 Th17 细胞谱系的调控(见下)。IL-21 还可抑制树突细胞的抗原递呈功能并可在某些条件下诱导 B 细胞和 NK 细胞的凋亡。IL-21 具有强效抗肿瘤活性,但也与多种自身免疫疾病(包括系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病(IBD)和银屑病)有关(见综述 Spolski and Leonard, *Annu Rev Immunol.* Nov. 8, 2007)。

[0003] IL-21 已被证明通过直接作用于 B 细胞而调制抗体反应(Mehta et al., *J. Immunol.*, 170 :4111-4118, 2003 ;Ozaki et al., *Science*, 298 :1630-1634, 2002 ;Suto et al., *Blood*, 100 :4565-4573, 2002)。IL-21 可诱导人的幼稚 B 细胞分化为分泌抗体的浆细胞(Ozaki et al., *J. Immunol.* 173 :5361, 2004 ;Ettinger et al., *J Immunol.* 175 :7867-79, 2005 ;Ettinger et al., *J Immunol.* 178 :2872-82, 2007 ;Kuchen et al., *J Immunol.* 179 :5886-96, 2007)并刺激人 B 细胞中 IgE 的产生(Kobayashi et al., *Human Immunol.* doi :10 :1016 / j.humimm. 2008. 10)。在 IL-21 或 IL-21R 缺陷的动物中,从生发中心反应生成的分泌抗体细胞减少并且亲和力成熟下降(Zotos et al., 已提交)。滤泡外抗体形成细胞——其参与自身免疫——需要分泌 IL-21 的部分特化 CD4⁺T 细胞的一个亚组辅助(Odegard, et al., *JEM*205(12) :2873-2886, 2008)。

[0004] 抗同种异体 MHC 的抗体的生成是移植排斥中的关键现象。形成抗 MHC 抗体的滴定度的移植受体(高度敏感的移植患者)有慢性排斥的危险,并且由于可能会出现抗体介导的对新移植体的排斥而不太适合接受新移植体(Smith et al., *AM J Transplantation*8 :1-11, 2008)。在急性肾同种异体移植排斥的大鼠模型中,IL-21 和 IL-21R 在肾同种异体移植体但不在同系移植体的血管内单核细胞中有着独特的增加(Hecker, et al., *Immunobiology* :doi :10. 1016 / j.imbio. 2008. 04. 004, (2008))。在人心脏移植体遇到的排斥中,IL-21 和 IL-21R 的表达水平与 ISHLT 排斥等级有关,最高表达水平存在于 1R 和 2R 级(Baan, et al., *Transplantation*83(11) :1485-1492, 2007)。

[0005] 在移植体抗宿主病(GVHD)中,抗同种异体反应由来自移植体的 T 淋巴细胞的不受

控活化介导,所述细胞引导抗宿主组织的炎性反应。调控性T细胞(Treg)可调制动物模型中的这一反应。IL-21已被证明反作用于Treg的调控功能(Clough et al., J Immunol180:5395-5401,2008)。在GVHD小鼠模型中,与WT T细胞相比,IL-21缺陷的T细胞的转移导致临床症状的显著减轻和组织学评分的显著降低以及存活率的显著增加。在结肠粘膜中观察了分泌IFN- γ 的T细胞的减少率和Treg的增加。使用抗mIL-21mAb阻断IL-21和WT T细胞转移产生了相似的结果(Bucher et al., Blood(ASH Annual Meeting Abstracts)2008112:Abstract#2342)。

[0006] 最近已经证明,IL-21由小鼠促炎性Th17细胞产生,并且为后者分化所必需(Korn et al. Nature. 448:484-487,2007;Nurieva et al. Nature448:480-483,2007;Zhou et al., Nat Immunol. 8:967-974,2007;Wei et al. J Biol Chem. 282:34605-34610,2007)。人Th17细胞也产生IL-21,正在进行研究以确定IL-21是否与其在小鼠Th17细胞中的作用一样,作为人Th17细胞的自分泌因子。Ozaki et al. (J. Immunol. 173:5361,2004)证明,在狼疮易感BXSB-Yaa小鼠(一种系统性红斑狼疮(SLE)的模型)的自身免疫过程早期特征开始变得明显的年龄时IL-21的表达增加。用可溶性小鼠IL-21受体(mIL-21R-Fc)处理这些BXSB-Yaa小鼠可部分抑制多种疾病,包括肾小球肾炎(Bubier et al., Ann N Y Acad Sci. 1110:590-601,2007)。用mIL-21R-Fc处理还被证明在另一种SLE临床前疾病模型——MRL / lpr小鼠(Herber et al. J. Immunol. 178:3822-3830,2007)中以及在类风湿型关节炎的胶原诱导关节炎(CIA)模型(Young et al., Arthr Rheum56:1152-1163,2007)中有效。人的初步数据也表明SLE中IL-21和IL-21R的调节异常(Mitoma et al. Int J Mol Med. 16:609-615,2005;Wang et al., Chinese J. Cell. Mol. Immunol. 23(11):1041-1042,2007;Sawalha et al. Ann Rheum Dis67:458-461,2008)。最近,Rus等人从24名SLE患者和15名健康对照身上获得了数据(Nguyen et al., ACR / ARHP Scientific Meeting,1760 / 482,2008Oct24-29San Francisco, CA)。Rus等人证明:1)与对照相比,IL-21mRNA的表达在狼疮患者的CD4+T细胞中显著增加;2)与缓解期SLE患者或对照相比,IL-21水平在活动期SLE患者的血清中显著升高;3)IL-21以剂量依赖的方式增强CD4+T细胞和CD19+B细胞在患者和对照中的增殖;4)IL-21增强抗-CD40诱导的浆细胞在正常对照和SLE患者中的分化;以及5)IL-21水平的升高可能有助于SLE中自体反应性CD4+T细胞的增殖和浆细胞分化。

[0007] Monteleone等人证明IL-21RNA和蛋白表达在克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎患者的炎性组织中增加,但在非炎性组织中增加,其中在溃疡性结肠炎患者中的增加较少;并且由CD患者的固有层单核细胞的CD3+细胞产生的IL-21也增加(Monteleone et al. Gastroenterology128:687-694,2005;Monteleone et al. Gut55:1774-1780,2006;Peluso et al., J Immunol178:732-739,2007)。这些作者提出IL-21通过调制调控性T细胞(Tregs)和Th17细胞之间的平衡而调控实验性结肠炎(Fantini et al. Eur. J. Immunol. 37:3155-3163,2007)。在小鼠或大鼠结肠炎模型中用可溶性IL-21受体对IL-21的体内抑制导致结肠炎临床症状的显著减轻(Young et al. US2006 / 0039902)。

[0008] 所述IL-21受体由NK细胞表达,NK细胞已被证明在体内和体外都响应于用IL-21进行的处理。在用重组人IL-21处理的肿瘤患者中,观察到了在包括NK细胞在内的部分淋巴细胞中再循环模式的改变,以及NK细胞活化标记表达和溶细胞效应器容量的增加

(Frederiksen, et al., Cancer Immunol Immunother 57(10):1439-1449, 2008)。在自身免疫疾病中, NK 细胞活性可起到促进炎症和相关组织破坏的作用。NK 细胞的组织归巢受到在炎症位点上释放的化学引诱物的引导 (Morris and Ley, Curr Mol Med. ;4(4):431-8, 2004)。与对照的 LPNK 细胞相比, 在用 IL-21 和 IgG 进行体外刺激时, 克罗恩病患者的固有层 NK 细胞释放出更大量的 IFN- γ 和 TNF- α (Liu and Jiu, Chronic Inflammation of Liver and Gut, Falk Symposium abstr. No.163, 2008 Mar 14-15)。NK 细胞还被报道通过杀死未成熟或激活的树突细胞 (DC) 以及通过释放影响 DC 的活化状态和抗原呈递功能的细胞因子, 从而通过与 DC 相互作用而调控自身免疫和移植排斥 (Vivier et al., Nat Immunol 9(5):503-510, 2008; Laffont et al., Blood 112:661-671, 2008)。耐性和非耐性肝脏同种异体移植受体的周围血单核细胞的对比显示了 NK 细胞转录程序中的变化 (Martinez-Llordella et al., J Clin Invest 118(8):2845-2857, 2008)。因此, IL-21 的阻断可调制 NK 细胞的活化状态, 降低其对自身免疫疾病中组织炎症的促进作用, 并改变移植排斥的临床过程。NK 细胞还被报道通过杀死未成熟或激活的树突细胞 (DC) 以及通过释放影响 DC 的活化状态和改变 DC 抗原呈递功能的细胞因子, 从而与 DC 相互作用而调控自身免疫和移植排斥。因此, IL-21 的阻断可调制 NK 细胞的活化状态, 降低其对自身免疫疾病中组织炎症的促进作用。

[0009] 本申请提供抗人 IL-21 单克隆抗体和使用那些抗体的方法, 所述抗体抑制表现为自身免疫和炎症疾病并且与 IL-21 / IL-21 受体相互作用有关的症状和生物学活性。

附图说明

[0010] 图 1 是对包含由克隆编号 62.78.1.44(78)、362.597.3(597)、362.75.1.1(75)、366.552.11(552)、366.328.10(328) 标识的抗体可变重链区的氨基酸残基的比对。

[0011] 图 2 是对包含上述抗体的可变轻链区的氨基酸残基的比对。

[0012] 图 3 示出了从单独的 IL-21 和从 IL-21 免疫复合物获得的 IL-21 肽序列区的 MALDI / TOF 质谱。游离状态 IL-21 的 IL-21 肽序列, EKKPPKEF (SEQ ID NO:2 的残基 129-136) (m / z, 1002.5619Da) 和 LERFKSLL (SEQ ID NO:2 的残基 137-144) (m / z, 1005.6091Da) (A)。在 IL-21mAb 的存在下因酰胺氟化的保留而发生的肽质量偏移 (B)。游离状态 IL-21 的另一 IL-21 肽序列, KSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2 的残基 141-162) (m / z, 2519.2451) (C)。在 IL-21mAb 的存在下因酰胺氟化的保留而发生的部分肽质量偏移 (D)。

[0013] 图 4 示出了乙酰化和非乙酰化的肽的选择离子色谱图。从单独的 IL-21 分离的乙酰化 TCPSCDSYEKKPPKEF (SEQ ID NO:2 的残基 119-136) (m / z, 1986Da) 的选择单离子色谱图 (A) 和 IL-21 免疫复合物 (B) 的相同色谱图曲线 (B)。所插入的质谱图是带三个电荷状态的肽质量 (m / z, 662.9)。第三条曲线示出了 m / z 为 1018Da 的肽离子的选择离子色谱图, 所述肽离子为从单独的 IL-21 分离的乙酰化 KSLLQKMI (SEQ ID NO:2 的残基 141-148) (C) 以及 IL-21 免疫复合物的相同色谱曲线 (D)。所插入的质谱图是该带两个电荷状态的肽质量 (m / z, 509.1)。

发明内容

[0014] 在一个方面,本发明提供与 SEQ ID NO:29 的氨基酸残基 20-145 具有至少 80% 同一性并与 SEQ ID NO:37 的氨基酸残基 21-126 具有至少 80% 同一性的抗人 IL-21 单克隆抗体。在某些实施方案中,所述抗体包含的具有至少 80% 同一性的变化在 SEQ ID NO:31 的重链可变区 CDR1 中。

[0015] 在另一方面,本发明提供一种抗人 IL-21 单克隆抗体,包含:(a) 重链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:31 的重链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:33 的重链可变区 CDR2;和(iii) 包含 SEQ ID NO:35 的重链可变区 CDR3;以及(b) 轻链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:39 的轻链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:41 的轻链可变区 CDR2;和(iii) 包含 SEQ ID NO:43 的轻链可变区 CDR3。在某些实施方案中,本发明提供包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸残基 20-145 和 SEQ ID NO:37 的氨基酸残基 21-126 的抗人 IL-21 单克隆抗体。在其他实施方案中,所述抗体还包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸残基 1-145 和 SEQ ID NO:37 的氨基酸残基 1-126。本发明的另一实施方案提供标识为 362.78.1.44 的杂交瘤细胞,其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),ATCC 专利保藏号为 PTA-8790,本发明包括由所述杂交瘤细胞产生的抗体。

[0016] 本发明的另一方面提供一种抗人 IL-21 单克隆抗体,包含:(a) 重链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:47 的重链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:49 的重链可变区 CDR2;和(iii) 包含 SEQ ID NO:51 的重链可变区 CDR3;以及(b) 轻链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:55 的轻链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:57 的轻链可变区 CDR2;和(iii) 包含 SEQ ID NO:59 的轻链可变区 CDR3。在某些实施方案中,本发明提供包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸残基 20-145 和 SEQ ID NO:53 的氨基酸残基 21-126 的抗人 IL-21 单克隆抗体。在其他实施方案中,本发明还包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸残基 1-145 和 SEQ ID NO:53 的氨基酸残基 21-126。本发明的另一实施方案提供标识为 362.597.3 的杂交瘤细胞,其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),ATCC 专利保藏号为 PTA-8786,本发明包括由所述杂交瘤细胞产生的抗体。

[0017] 在另一方面,本发明提供与 SEQ ID NO:13 的残基 20-141 具有至少 80% 同一性并与 SEQ ID NO:21 的残基 21-126 具有至少 80% 同一性的抗人 IL-21 单克隆抗体。在一个实施方案中,本发明包括任何氨基酸改变都是保守性氨基酸改变的单克隆抗体。

[0018] 在另一方面,本发明提供一种抗人 IL-21 单克隆抗体,包含:(a) 重链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:15 的重链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:17 的重链可变区 CDR2;和(iii) 包含 SEQ ID NO:19 的重链可变区 CDR3;以及(b) 轻链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:23 的轻链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:25 的轻链可变区 CDR2;和(iii) 包含 SEQ ID NO:27 的轻链可变区 CDR3。在某些实施方案中,本发明包括包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸残基 20-141 和 SEQ ID NO:21 的氨基酸残基 21-126 的抗人 IL-21 单克隆抗体。在另一实施方案中,本发明还包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸残基 1-141 和 SEQ ID NO:21 的氨基酸残基 1-126。本发明的另一实施方案提供标识为 362.75.1.1 的杂交瘤细胞,其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),ATCC 专利保藏号为 PTA-8791;以及由所述杂交瘤细胞产生的抗体。

[0019] 在另一方面,本发明提供一种抗人 IL-21 单克隆抗体,包含:(a) 重链区,包含:(i) 包含 SEQ ID NO:79 的重链可变区 CDR1;(ii) 包含 SEQ ID NO:81 的重链可变区 CDR2;和

(iii) 包含 SEQ ID NO:83 的重链可变区 CDR3; 以及 (b) 轻链区, 包含: (i) 包含 SEQ ID NO:87 的轻链可变区 CDR1; (ii) 包含 SEQ ID NO:89 的轻链可变区 CDR2; 和 (iii) 包含 SEQ ID NO:91 的轻链可变区 CDR3。在一个实施方案中, 本发明提供包含 SEQ ID NO:77 的氨基酸残基 20-136 和 SEQ ID NO:85 的氨基酸残基 23-129 的抗人 IL-21 单克隆抗体。在另一实施方案中, 本发明还包含 SEQ ID NO:77 的氨基酸残基 1-136 和 SEQ ID NO:85 的氨基酸残基 1-129。本发明的另一实施方案提供标识为 366.552.11 的杂交瘤细胞, 其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), ATCC 专利保藏号为 PTA-8787; 以及由所述杂交瘤细胞产生的抗体。

[0020] 在另一方面, 本发明提供一种抗人 IL-21 单克隆抗体, 包含: (a) 重链区, 包含: (i) 包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区 CDR1; (ii) 包含 SEQ ID NO:65 的重链可变区 CDR2; 和 (iii) 包含 SEQ ID NO:67 的重链可变区 CDR3; 以及 (b) 轻链区, 包含: (i) 包含 SEQ ID NO:71 的轻链可变区 CDR1; (ii) 包含 SEQ ID NO:73 的轻链可变区 CDR2; 和 (iii) 包含 SEQ ID NO:75 的轻链可变区 CDR3。在某些实施方案中, 本发明提供包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸残基 20-139 和 SEQ ID NO:69 的氨基酸残基 23-129 的抗人 IL-21 单克隆抗体。在其他实施方案中, 本发明还包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸残基 1-139 和 SEQ ID NO:69 的氨基酸残基 1-129。本发明的另一实施方案提供标识为 366.328.10 的杂交瘤细胞, 其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), ATCC 专利保藏号为 PTA-8789; 以及由所述杂交瘤细胞产生的抗体。

[0021] 在另一方面, 本发明提供标识为 366.345.6.11 的杂交瘤细胞, 其中所述杂交瘤细胞保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), ATCC 专利保藏号为 PTA-8788, 本发明包括由所述杂交瘤细胞产生的抗体。

[0022] 在本发明的另一方面, 本发明提供一种与不连续表位结合的分离单克隆抗体, 所述表位包含 IL-21 蛋白上的至少两个区, 其中第一区由 SEQ ID NO:2 的残基 Ile45 至残基 Leu56 的至少一个氨基酸构成, 第二区由 SEQ ID NO:2 的残基 Glu129 至残基 Leu144 的至少一个氨基酸构成。在一个实施方案中, 本发明提供: 第一区由 SEQ ID NO:2 的残基 Ile45 至残基 Leu56 中的 1 至 12 个氨基酸构成, 第二区由 SEQ ID NO:2 的残基 Glu129 至残基 Leu144 中的 1 至 16 个氨基酸构成。

[0023] 上述本发明的每个方面都包括其中所述单克隆抗体还包含 Fc 片段的实施方案, 和其中所述 Fc 片段选自 IgG1、IgG2 和 IgG4 的另一实施方案, 以及其中所述 Fc 片段的效应器作用降低的另一实施方案。

[0024] 在另一方面, 本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的 T 滤泡辅助细胞介导或 B 细胞介导的疾病的方法, 其中所述 T 滤泡辅助细胞介导或 B 细胞介导的疾病选自系统性红斑狼疮、自身免疫性听力丧失、格雷夫斯氏病 (Graves' disease)、寻常型天疱疮、重症肌无力、视神经脊髓炎、古德帕斯彻氏综合征 (Goodpasture's syndrome)、自身免疫性肾炎、冷球蛋白血症、格林-巴利综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、自身免疫性溶血性贫血和特发性血小板减少性紫癜 (ITP)。

[0025] 在另一方面, 本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的 TH1 细胞介导或 TH17 细胞介导的疾病的方法, 其中所述 TH1 细

胞介导或 TH17 细胞介导的疾病选自银屑病、脊柱关节病、反应性关节炎、肠病性关节炎、自身免疫性心肌炎、川崎病、腹腔疾病、葡萄膜炎、白塞氏病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD) 和肺间质病。

[0026] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的炎性肠病 (IBD) 的方法,其中所述炎性肠病选自克罗恩病、溃疡性结肠炎和肠易激综合征。

[0027] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的类风湿性关节炎的方法。

[0028] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的多发性硬化的方法。

[0029] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的 I 型糖尿病 (IDDM) 的方法。

[0030] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的斯耶格伦氏综合征 (sjogren' s syndrome) 的方法。

[0031] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗移植受试者的方法,其中抑制了移植排斥,形成了移植前治疗方案中的耐性或者降低了所述受试者中同种异体抗体的滴度。

[0032] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的自身免疫疾病的方法,其中所述自身免疫疾病选自胰腺炎、炎性肌病 (多肌炎、皮肌炎)、显微镜下多血管炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肝炎、韦格纳氏综合征 (Wegener' s syndrome)、憩室病、强直性脊柱炎、硬皮病、系统性硬化症、银屑病关节炎、骨关节炎、异位性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病 (GVHD)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、肾小球性肾炎、IgA 肾病、高敏移植患者、抗磷脂综合征和哮喘,以及其他自身免疫疾病,或者其他由 IL-21 和 IL-21 受体激动剂介导的疾病。

[0033] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的系统性红斑狼疮 (SLE) 的方法。

[0034] 在另一方面,本发明提供通过给予治疗量的要求保护的本文所述的抗人 IL-21 单克隆抗体来治疗受试者的银屑病的方法。

具体实施方式

[0035] 下面给出如下定义以帮助理解本文所述的发明。

[0036] 术语“氨基末端的”和“羧基末端的”在本文中用于表示多肽内的位置。当上下文允许时,这些术语在述及多肽的具体序列或部分时,用于表示邻近或相关位置。例如,位于多肽内的参照序列羧基末端的某一序列的位置邻近所述参照序列的羧基末端,但不一定位于所述完整多肽的羧基末端。

[0037] 术语“拮抗剂”是指降低另一分子的活性、活化或功能的任何化合物,包括蛋白、多肽、肽、抗体、抗体片段、大分子或小分子 (小于 10kD)。IL-21 拮抗剂导致下列情形的至少一种: NK 细胞、树突细胞、T 细胞亚组和 B 细胞亚组的免疫功能下降;与 IL-21 结合从而阻断、抑制、降低或中和 IL-21 蛋白与其受体的相互作用。

[0038] “抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。抗体具有与特定抗原的结合特异性,而免疫球蛋白包括抗体和其他无抗原特异性的抗体样分子。无抗原特异性的抗体样分子的多肽是例如由淋巴系统以低水平以及由骨髓瘤以高水平产生的。因此,本文所用的术语“抗体”或“抗体肽”是指完整抗体或者与完整抗体进行特异性结合竞争的完整抗体的结合片段,并包括嵌合抗体、人源化抗体、完全人源化抗体和双特异性抗体。在某些实施方案中,结合片段是用重组 DNA 技术制备的。在其他实施方案中,结合片段是通过完整抗体的酶法或化学切割制备的。结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 和单链抗体 ScFv。“天然抗体和免疫球蛋白”通常为约 150000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数量在不同免疫球蛋白同种型的重链之间有变动。每条重链和轻链还都具有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一个末端具有一个可变区(VH),随后具有多个恒定区。每条轻链在一个末端具有一个可变区(VL)并在其另一个末端具有一个恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区对齐,并且轻链的可变区与重链的可变区对齐。特定氨基酸残基被认为在轻链和重链可变区之间形成界面(Chothia et al., *J. Mol. Biol.* **186**: 651(1985); Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:4592(1985))。

[0039] 术语“嵌合抗体”或“嵌合抗体(复数)”是指其轻链和重链基因是从属于不同物种的免疫球蛋白的可变区和恒定区基因,通常通过遗传工程构建的抗体。例如,可将小鼠单克隆抗体基因的可变区段与人恒定区段例如 $\gamma 1$ 和 $\gamma 3$ 连接。因此,一种典型的治疗性嵌合抗体是由小鼠抗体的可变或抗原结合区和人抗体的恒定区构成的杂合蛋白,也可使用其他哺乳动物物种。具体地,嵌合抗体是用重组 DNA 技术制备的,其中免疫球蛋白轻链、重链或两者的全部或部分铰链以及恒定区被另一种动物的免疫球蛋白轻链或重链的对应区所替代。这样,亲代单克隆抗体的抗原结合部分被嫁接到另一物种的抗体的骨架上。

[0040] 术语“表位”是指能够与免疫球蛋白或 T 细胞受体特异性结合的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子例如氨基酸或糖侧链具有化学活性的表面基团构成,并通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。更具体地,本文所用的术语“IL-21 表位”是指在动物中(优选在哺乳动物中,最优选在小鼠或人中)具有抗原性或免疫原性活性的 IL-21 多肽的一部分。具有免疫原性活性的表位是在动物中引起抗体反应的 IL-21 多肽的一部分。具有抗原性活性的表位是 IL-21 多肽的这样一部分,即抗体免疫特异性地与所述部分结合,这可用本领域熟知的任何方法例如免疫测定而测定。抗原性表位没有必要一定是免疫原性的。“不连续表位”是由 IL-21 蛋白的一级序列中的至少两个独立区域构成的构象表位。构象表位在变性溶剂的存在下(如在蛋白杂交分析中)会丧失特异性结合的能力。

[0041] 本发明提供与 IL-21 蛋白和多肽特异性结合的单克隆抗体和抗体片段。Parrish-Novak et al., *Nature* **408**:57-63, 2003; 美国专利 No. 6,307,024 和 6,686,178; 以及 7,250,274 中公开了人和小鼠 IL-21 多肽、蛋白以及编码所述多肽的多核苷酸。本文描述了被治疗性单克隆抗体识别为靶标的人 IL-21 蛋白的结构和功能特征限定区域(表位)。给出了典型人抗人 IL-21 单克隆抗体。这些抗体中的某一些具有结合天然人 IL-21、重组野生型人 IL-21、重组突变型 IL-21 蛋白和/或人 IL-21 肽区的能力。

[0042] 本发明提供可用于治疗自身免疫和炎症疾病的抗 IL-21 抗体。例如,抗-IL-21 抗体可用于治疗银屑病、胰腺炎、I 型糖尿病(IDDM)、Graves 病、炎症肠病(IBD)、克罗恩病、

溃疡性结肠炎、肠易激综合征、多发性硬化、类风湿关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、脊柱关节病、自身免疫性心肌炎、川崎病、腹腔疾病、葡萄膜炎、白塞氏病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肺间质病、炎性肌病 (多肌炎、皮肌炎)、显微镜下多血管炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肝炎、韦格纳氏综合征、憩室病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、系统性硬化症、银屑病关节炎、骨关节炎、异位性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病 (GVHD)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、斯耶格伦氏综合征、肾小球性肾炎、IgA 肾病、自身免疫性肾炎、寻常型天疱疮、重症肌无力、自身免疫性听力丧失、视神经脊髓炎、古德帕斯彻氏综合征、冷球蛋白血症、格林 - 巴利综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 的、移植排斥、高敏移植患者、抗磷脂综合征、过敏症和哮喘,以及其他自身免疫疾病,或者其他由 IL-21 和 IL-21 受体激动剂介导的疾病。

[0043] 在高等脊椎动物中已识别出五类免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。IgG、IgD 和 IgE 蛋白的特征在于为二硫键连接的由两条相同的重链和两条相同的轻链构成的异四聚体。通常, IgM 作为四聚体的五聚体存在, 而 IgA 作为四聚体的二聚体存在。可在免疫球蛋白部分中引入修饰。

[0044] IgG 构成主要的一类免疫球蛋白, 因为其通常作为血浆中第二丰富的蛋白存在。在人中, IgG 由四个亚类组成, 分别称为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。每条免疫球蛋白重链都具有由对于给定亚类不变的恒定区蛋白结构域 (C_H1 、铰链、 C_H2 和 C_H3) 构成的恒定区。IgG 类的重链恒定区以希腊符号 γ 标识。例如, IgG1 亚类免疫球蛋白含有 $\gamma 1$ 重链恒定区。

[0045] Fc 片段或 Fc 区由二硫键连接的重链铰链区、 C_H2 和 C_H3 结构域构成。在免疫球蛋白的融合蛋白中, IgG1 亚类的 Fc 区经常用作免疫球蛋白部分, 因为 IgG1 在所有血清蛋白中具有最长的血清半衰期。长血清半衰期对于动物研究和潜在人治疗应用是一个理想的蛋白特性。此外, IgG1 亚类具有最强的实现抗体介导的效应器作用的能力。在免疫球蛋白的融合蛋白中最有用的主要效应器作用是 IgG1 抗体介导抗体依赖的细胞毒性的能力。另一方面, 这对于主要作为拮抗剂起作用的融合蛋白可能为一种不利的功能。已经识别出了对于 IgG1 亚类中抗体恒定区介导的活性是重要的数个特定氨基酸残基。因此包括或不包括这些特定氨基酸使得包括或不包括特定免疫球蛋白恒定区介导的活性 (见美国专利 5, 648, 260 ; 5, 624, 821)。

[0046] 已经生成修饰的人 IgG1Fc 以用于制备 Fc 融合蛋白。例如, 美国专利申请 2006-0034852 描述了通过降低 Fc γ RI 结合和补体 C1q 结合而降低由 Fc 介导的效应器作用的 Fc4、Fc5 和 Fc6 突变, 此文献以引用的方式全文纳入本文中。具体地, 引入了三种氨基酸置换以降低 Fc γ RI 结合。这些是在 EU 索引位置 234、235 和 237 上的置换。在这些位置上的置换已被证明可降低与 Fc γ RI 的结合 (Duncan et al., *Nature*332 :563(1988))。这些氨基酸置换还可降低 Fc γ RIIa 结合以及 Fc γ RIII 结合 (Sondermann et al., *Nature*406 :267(2000) ; Wines et al., *J. Immunol.* 164 :5313(2000))。这些突变不改变与 FcRn 的结合, 所述结合通过经胞吞收再循环途径回收 IgG 而有利于长血清半衰期。

[0047] 数个研究小组已描述了 EU 索引位置 330 和 331 在补体 C1q 结合和随后的补体结合中的相关性 (Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173 :1483(1991) ; Tao et al., *J. Exp. Med.* 178 :661(1993))。在 Fc4 中引入这些位置上的氨基酸置换以降低补体结合。Fc4 的 C_H3

结构域与在对应的野生型多肽中发现的相同,但终止密码子由 TGA 变为 TAA 以消除当所克隆 DNA 在大肠杆菌 (*E. coli*) 的 dam⁺ 菌株中生长时可能的 dam 甲基化位点。在 Fc5 中,EU 索引位置 218 上的精氨酸残基为赖氨酸,并且 Fc5 序列的其余部分符合上面对 Fc4 的描述。

[0048] 本发明还包括遗传上改变但在功能上与上述抗体相同的抗体。优选提供改进的稳定性和 / 或治疗有效性的修饰抗体。修饰抗体的实例包括具有氨基酸残基保守置换的修饰抗体,以及具有不明显不利地改变抗原结合效用的一个或多个氨基酸缺失或添加的修饰抗体。置换的范围可从改变或修饰一个或多个氨基酸残基到一个区的完全重新设计,只要治疗效用得以保持。本发明的抗体可被翻译后修饰 (例如乙酰化和磷酸化) 或可被合成修饰 (例如连接标记基团)。

[0049] 本发明的抗体可用它们识别或特异性结合的本发明 IL-21 多肽的表位或一部分来进行描述或限定。表位或多肽的一部分可如本文所描述的那样用例如 N- 末端和 C 末端的位置或用连续氨基酸的长度进行限定。本发明的抗体也可用它们的交叉反应性来进行描述或限定。包括不与本发明多肽的任何其他类似物、直系同源物或同源物结合的抗体。

[0050] 表位建仓 (epitope binning) 是指使用竞争性结合测定以识别能或不能同时结合 IL-21 蛋白的抗体对,从而识别与蛋白上相同或重叠表位结合的抗体。因此具有相同或重叠结合特异性的抗体家族 (或仓 (bin)) 可用于帮助确定 IL-21 上的特异性表位。表位建仓实验证明存在抗原性不同的表位。然而,通过这些实验自身并不能将表位与 IL-21 蛋白分子上的具体氨基酸序列或位置对应起来或者将前者“绘制”到后者。

[0051] 可对任何一对抗体或片段评估结合竞争。例如,使用合适的检测试剂,可将任何物种 / 来源的抗体或结合片段的结合特异性与本文所公开的单克隆抗体的结合特异性进行比较。表位建仓可用“分离抗体”或用细胞培养上清液进行。通常,用第一轮克隆的上清液进行建仓以指导对要进一步培养的克隆的选择。要比较的抗体应具有基本同质的抗原结合结构域。对于“双特异性”或“双功能”抗体,两个不同结合位点的结合特异性需要独立地进行评估或建仓。

[0052] 本发明着重描述配体特异性抗体。除了抗体的竞争性结合以外,表位建仓也可用于将抗体与受体或者配体对应起来,所述抗体竞争性干扰配体与其受体的结合或者配体介导的其受体的活化。通常,抗体家族 (或仓) 的有利性质可以将与通过表位仓确定的特异性表位的结合关联起来。

[0053] 竞争性结合实验不直接测量结合亲和力,然而要检测的抗体必须结合得足够强以用作竞争物。通常将实验条件设计为使结合亲和力差异的影响最小。

[0054] 抗 IL-21 抗体也可用于 IL-21 蛋白的诊断性测定,例如检测其在特定细胞、组织或血清中的表达。被分配到不同的仓并且能够与 IL-21 的不同免疫原性部分或表位结合的抗体可用作夹心检测的试剂。在夹心测定中,检测样品分析物被固定在固体支架上的第一抗体捕获,然后用也与该分析物结合的第二抗体检测,从而形成不可溶的三部分复合物。参见例如美国专利 No. 4, 376, 110。第二抗体本身可被可检测部分标记 (直接夹心检测),或可使用以可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体进行检测 (间接夹心检测)。例如,一种夹心检测为 ELISA 检测,其中所述可检测部分为一种酶。

[0055] 本发明的抗体可用任何本领域所知的方法测定特异性结合。许多不同的竞争性结合测定形式都可用于表位建仓。可使用的免疫测定包括但不限于:使用诸如蛋白质印

迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀反应测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集试验、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白 A 免疫测定等技术的竞争性和非竞争性测定系统。这些测定在本领域内是常规和广为人知的(参见例如 Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York)。下面简述示例性免疫测定(但并非出于限制的目的)。此外,还可进行在例如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)中描述的常规交叉阻断(cross-blocking)测定。

[0056] **BIACORE®** (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 是多种表面等离子体共振测定形式中唯一一种常规用于单克隆抗体的表位仓组的形式。许多参考文献(例如 *The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology*, Volume 66 Glenn E. Morris ed. Humana Press, 1996) 描述了可用于对抗体建仓并且被预期可提供关于抗体与 IL-21 蛋白之间结合特异性的可比较信息的其他方法。当使用 **BIACORE®** 系统时,表位建仓实验用可溶性天然或重组抗原进行。表位建仓研究可在 **BIACORE1000®** 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行。**BIAllogue®** 1.2 版软件可用于程序化运行方法。对于使用 **BIACORE®** 以对抗 IL-21 的小鼠单克隆抗体建仓的实例,可将多克隆山羊抗小鼠 IgG Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 共价固定在 **BIACORE®** CM5 传感芯片上并用其将检测系列的第一单克隆抗体结合(捕获)到所述芯片上。然后使用多克隆 IgG Fc 片段 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 阻断芯片上未被占据的 Fc 结合位点。随后,注入 IL-21 蛋白并使其与所捕获的第一单克隆抗体特异性结合。所述 **BIACORE®** 设备测量结合于所述传感芯片上的蛋白质量,并且第一抗体和 IL-21 抗原的结合在每轮中都可进行验证。在第一抗体和抗原结合到芯片后,注入可溶性第二抗体并使其与预先结合的抗原结合。如果第二单克隆抗体能够与第一单克隆抗体同时结合 IL-21 抗原,那么 **BIACORE®** 就检测到其结合。然而,如果第二单克隆抗体不能与第一单克隆抗体同时结合 IL-21 抗原,那么就检测不到额外的结合。每种单克隆抗体的检测都以其自身作为阴性对照来建立背景(无结合)信号水平。

[0057] 无标记的竞争性 ELISA 形式 (LFC-ELISA) 也可用于进行对抗体建仓。Nagata et al., *J. Immuno Methods* 292:141-155, 2004. 描述了此方法。这种表位建仓方法使用生物素化的 IL-21。对于对抗 IL-21 的小鼠单克隆抗体建仓的实例,用在 ELISA B (PBS, 0.1% Tween20, 1% BSA) 中稀释的 $1\mu\text{g} / \text{mL}$ 的山羊抗小鼠 IgG Fc- γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch) 以 $100\mu\text{L} / \text{孔}$ 包被微量滴定板。在这种包被抗体在室温下结合 3 小时后,将每种含 mAb 的条件培养基在 ELISA B 中稀释以使 mAb 浓度约为 $0.5\mu\text{g} / \text{mL}$ 并使其与山羊抗小鼠 IgG 包被的滴定板在 4°C 下结合过夜 (mAb#1)。平行地,将第二组条件培养基 (mAb#2) 在聚苯乙烯试管中用 ELISA B 稀释至 mAb 浓度为约 $0.5\mu\text{g} / \text{mL}$, 与 $50\text{ng} / \text{mL}$ 生物素化的 IL-21 抗原混合,在 4°C 下孵育过夜。在用包被抗体孵育 mAb#1 后,用无关抗体充满滴定板上未占据的结合位点以封闭滴定板。将 mAb#2-生物素-IL-21 混合物加入到该板中并使它们结合。作为所述测定中的(非竞争)对照,将 $50\text{ng} / \text{mL}$ 生物素化的 IL-21 直接(不用 mAb#2 预先孵育)加入含有固定的 mAb#1 的孔中。在用生物素化 IL-21-mAb#2 复合物孵育后,将链霉抗生物素蛋白-HRP 以 $0.5\mu\text{g} / \text{mL}$ 加入到所述滴定板中。用 TMB 底物

(BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 使所述滴定板显色,然后用读板器 (Molecular Devices **SPECTRAMAX®340**, Sunnyvale, CA) 测量每孔在 450nm 处的吸光度。如果 mAb#1 与 mAb#2 结合不同的表位,那么生物素-IL-21-mAb#2 复合物就会与所述滴定板结合,产生高吸光度读数。如果 mAb#1 与 mAb#2 结合相同的表位,那么生物素-IL-21-mAb#2 复合物就不会与所述滴定板结合,产生低吸光度读数。

[0058] 本发明的配体特异性抗体可以只是与 IL-21 拮抗剂结合或用作 IL-21 拮抗剂。例如,本发明包括不破坏 IL-21 的受体 / 配体相互作用或者部分或完全破坏 IL-21 的受体 / 配体相互作用的抗体。本发明着重描述阻止受体活化的配体特异性抗体。本发明包括结合配体并阻止所述配体与受体结合的中和抗体,以及这样的抗体,即所述抗体结合配体——从而阻止受体活化——但不阻止所述配体结合所述受体。受体活化(即信号转导)可用本文所述或本领域所知的技术测定。例如,受体活化可通过用免疫沉淀继之以蛋白质印迹或基于发光材料的分析(例如上述那些)检测受体或其底物的磷酸化(例如酪氨酸或丝氨酸 / 苏氨酸)而测定。在具体实施方案中,相对于不存在抗体时配体或受体的活性,提供的抗体可将配体或受体的活性抑制至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60% 或至少 50%。

[0059] 抗 IL-21 抗体的制备

[0060] IL-21 的抗体可例如使用 IL-21 表达载体产生的蛋白或分离自天然来源的 IL-21 作为抗原而制备。本发明的抗 IL-21 抗体与 IL-21“特异性结合”。如果抗体具有下面两个特性中的至少一个,那么抗体就被认为是特异性结合的:(1) 抗体与 IL-21 以阈水平的结合活性相结合,和(2) 抗体与 IL-21 相关的多肽不发生明显交叉反应。相关多肽可包括结合含有 γ 共用链(γ c)的受体的 1 型细胞因子的其他成员,例如 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15。

[0061] 就第一个特性而言,如果抗体与 IL-21 多肽、肽或表位的结合具有如测量的亲和常数所反映的结合亲和力,那么抗体就是特异性结合的。为测定亲和特性,通过表面等离子体共振评估了 IL-21 拮抗剂与 IL-21 抗原的相互作用的动力学速率常数、平衡结合常数和平衡离解常数的测量情况。结合速率常数(k_a ($M^{-1}s^{-1}$))是反映抗原-拮抗剂复合物形成速率的值。离解速率常数(k_d (s^{-1}))是反映此复合物稳定度的值。平衡结合亲和力通常表示为离解平衡常数(K_D (M))或结合平衡常数(K_A (M^{-1}))。 K_D 由离解速率常数除以结合速率常数而获得(k_d / k_a),而 K_A 由结合速率常数除以离解速率常数而获得(k_a/k_d)。具有相似 K_D (或相似 K_A)的拮抗剂可具有变动很大的结合和离解速率常数。因此,测量 k_a 和 k_d 以及 K_A 或 K_D 可帮助更独特地描述拮抗剂-抗原相互作用的亲和力。优选的抗体亲和力反映为 K_A (平衡结合常数)为 $10^6 M^{-1}$ 或更大,优选地为 $10^7 M^{-1}$ 或更大,更优选地为 $10^8 M^{-1}$ 或更大,最优选地为 $10^9 M^{-1}$ 或更大。抗体的结合亲和力可通过例如 Scatchard 分析(Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660, 1949)或使用市售的生物传感设备由本领域技术人员容易地测定。就第二个特性而言,例如,如果使用标准蛋白质印迹分析或捕获 ELISA,抗体可检测 IL-21 而非其他已知多肽,则它们与相关多肽分子不发生明显交叉反应。已知相关多肽的实例包括 IL-21 所属的 IL-2 家族的已知成员(例如 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15)。

[0062] 单克隆抗 IL-21 抗体可使用带有抗原性 IL-21 表位的肽和多肽来制备。本发明的抗体结合带有抗原性表位的肽和多肽,所述肽和多肽含有 SEQ ID NO:2 或其他本文所公开氨基酸序列中至少 9 个或 15 至约 30 个氨基酸的一段序列。然而,包含含有多肽的 30-50

个氨基酸或者长度最长至整个氨基酸序列的更大部分的氨基酸序列和包括多肽整个氨基酸序列的肽或多肽也可用于诱导与 IL-21 结合的抗体。理想的是选择带有表位的肽的氨基酸序列以提供在水性溶剂中的高溶解度（即序列包含高度亲水的残基，而通常避免疏水残基）。此外，含有脯氨酸残基的氨基酸序列对于大规模抗体生产也可能是理想的。

[0063] 单克隆抗 IL-21 抗体可用本领域技术人员已知的方法制备。例如，抗特定抗原的啮齿动物单克隆抗体可通过已知方法获得（参见，例如，Kohler et al., Nature256: 495(1975); Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, Vol.1, pages2.5.1-2.6.7(John Wiley&Sons1991) [“Coligan”]; Picksley et al., “Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E.coli,” in DNA Cloning2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), page93(Oxford University Press1995)）。

[0064] 本发明的抗体可用任何本领域所知的合成抗体的方法，尤其是通过化学合成或优选地通过重组表达技术而制备。本发明抗体，或其片段、衍生物或类似物，例如本发明抗体的重链或轻链的重组表达，需要构建含有编码该抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本发明抗体分子或抗体的重链或轻链或其一部分（优选地含有重链或轻链可变区）的多核苷酸，那么就可使用本领域熟知的技术通过重组 DNA 技术而制备用于产生该抗体分子的载体。因此，本文描述了通过表达含有抗体编码核苷酸序列的多核苷酸而制备蛋白的方法。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有抗体编码序列以及合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括，例如，体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。因此，本发明提供包含与启动子可操作地连接的编码本发明抗体分子、或其重链或轻链、或重链或轻链可变区的核苷酸序列的可复制载体。这些载体可包含编码抗体分子恒定区的核苷酸序列（参见例如 PCT 公布文本 W086 / 05807 ; PCT 公布文本 W089 / 01036 ; 和美国专利 No. 5, 122, 464），并且可将抗体的可变区克隆到这一载体中以表达完整的重链或轻链。

[0065] 用常规技术将所述表达载体转移到宿主细胞中，然后用常规技术培养转染细胞以产生本发明抗体。因此，本发明包括含有与异源启动子可操作地连接的编码本发明抗体或者其重链或轻链的多核苷酸的宿主细胞。在表达双链抗体的优选实施方案中，编码重链和轻链的载体可在宿主细胞中共表达以表达完整的免疫球蛋白分子，详述如下。

[0066] 多种宿主-表达载体系统可用于表达本发明的抗体分子。这些宿主表达系统不仅表示可用其产生继而纯化目的编码序列的载体，而且表示当被合适的核苷酸编码序列转化或转染时，可原位表达本发明的抗体分子的细胞。这些包括但不限于微生物例如被含有抗体编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌（例如大肠杆菌、枯草杆菌 (*B. subtilis*)）；被含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母（例如酵母属、毕赤酵母属）；被含有抗体编码序列的重组病毒表达载体（例如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；被含有抗体编码序列的重组病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒 CaMV；烟草花叶病毒 TMV）感染或被含有抗体编码序列的重组质粒表达载体（例如 Ti 质粒）转化的植物细胞系统；或者包含含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子（例如金属硫蛋白启动子）或源自哺乳动物病毒的启动子（例如 MPSV、CMV、腺病毒晚期启动子；牛痘病毒 7.5K 启动子）的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（例如 COS、CHO、BHK、293、3T3 细胞）。优选地，使用细菌细胞例如大肠杆菌，更优选地，使用真核细胞，尤其是使用表达完整重组抗体分子

的细胞进行重组抗体分子的表达。例如,哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),连同含有例如人类巨细胞病毒的主要立即早期基因启动子元件、CMV 增强子或 MPSV 启动子的载体是一种有效的抗体表达系统(Foecking et al.,1986,Gene45:101;Cockett et al.,1990,Bio / Technology8:2)。

[0067] 在细菌系统中,可根据待表达抗体分子的拟定用途有利地选择多种表达载体。例如,当要生产大量这种蛋白以制备抗体分子的药物组合物时,指导高水平表达易纯化的融合蛋白产物的载体是理想的。这些载体包括但不限于:大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruther et al.,1983,EMBO J.2:1791),其中抗体编码序列可单独地连接到载体中 lacZ 编码区的阅读框中从而产生融合蛋白;pIN 载体(Inouye&Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109,1985;Van Heeke&Schuster,J. Biol. Chem.24:5503-5509,1989);等等。pGEX 载体也可用于表达与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白形式的外来多肽。一般而言,这些融合蛋白是可溶的并可通过以下方法容易地从裂解细胞中纯化:吸附和结合于谷胱甘肽琼脂糖小球基质,继而在游离谷胱甘肽的存在下洗脱。pGEX 载体被设计为包括凝血酶或 Xa 因子蛋白酶酶切位点从而克隆的目的基因产物可被从 GST 部分释放。

[0068] 在昆虫系统中,使用草地贪夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)作为表达外来基因的载体。所述病毒在草地贪夜蛾细胞中生长。可将抗体编码序列单独地克隆到病毒的不重要区域(例如多角体蛋白基因)中并置于 AcNPV 启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制之下。

[0069] 在哺乳动物宿主细胞中,可利用多种基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可将目的抗体编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物例如晚期启动子和三联前导序列。然后可将此嵌合基因通过体外或体内重组插入到腺病毒基因组中。插入到病毒基因组的不重要区域(例如 E1 或 E3 区)会形成可存活并能够在感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如参见 Logan&Shenk,Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:355-359,1984)。插入的抗体编码序列的高效翻译可能还需要特定的起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和邻接序列。此外,所述起始密码子必须与所要编码序列的阅读框同相(in phase)以确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可来自天然和合成的多种来源。表达效率可通过包括合适的转录增强子元件、转录终止子等而得以增强(参见 Bittner et al.,Methods in Enzymol.153:51-544,1987)。

[0070] 此外,可选择调制插入序列的表达或者以特定形式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。这些蛋白产物的修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)对于所述蛋白的功能可能是非常重要的。不同的宿主细胞具有用于对于蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性和特定机制。可选择合适的细胞系或宿主系统以确保正确修饰和加工所表达的外来蛋白。为此,可使用具有正确加工初始转录物、糖基化和磷酸化基因产物的细胞机制的真核宿主细胞。这些哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERO、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、WI38,尤其是乳腺癌细胞系例如 BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D,以及正常哺乳动物腺细胞系例如 CRL7030 和 Hs578Bst。

[0071] 为长期、高产地产生产重组蛋白,优选稳定的表达。例如,可改造稳定表达抗体分子的细胞系。宿主细胞可被由合适的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的 DNA 以及可选择标记转化,而不使用含有病毒复制原点的表达

载体转化。引入外来 DNA 后,可使所改造细胞在增菌培养基 (enriched media) 中生长 1-2 天,然后转移至选择培养基。重组质粒中的可选择标记赋予选择抗性并使得细胞可将质粒稳定整合到其染色体中并生长形成细胞点,所述细胞点继而可被克隆并扩展成细胞系。此方法可有利地用于改造表达抗体分子的细胞系。这些经改造的细胞系可特别地用于对与抗体分子直接或间接相互作用的化合物的筛选和评估。

[0072] 可使用多种选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒的胸苷激酶 (Wigler et al., Cell111:223,1977)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Szybalska&Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA48:202,1992), 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (LowV et al., Cell22:817,1980), 这些酶基因可分别用于 tk 细胞、hgp^rt 细胞或 ap^rt 细胞。此外,抗代谢物抗性可用作下面基因的选择基础:Dhfr,其赋予甲氨蝶呤抗性 (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA77:357,1980;O' Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA78:1527,1981); gpt,其赋予霉酚酸抗性 (Mulligan&Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA78:2072,1981); neo,其赋予氨基糖苷 G-418 抗性 (Wu and Wu, Biotherapy3:87-95,1991;Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596,1993;Mulligan, Science260:926-932,1993; 和 Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217,1993;TIB TECH11(5):155-215); 以及 hyg^r,其赋予潮霉素抗性 (Santerre et al., Gene30:147,1984)。Ausubel et al. (eds.),1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY; Kriegler,1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; 和 Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds),1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1,1981 中描述了可用的重组 DNA 技术的本领域公知方法;这些文献以引用的方式全文纳入本文中。

[0073] 抗体分子的表达水平可通过载体扩增而升高(综述参见 Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987))。当表达抗体的载体系统中的标记可扩增时,存在于宿主细胞培养物中的抑制物水平的升高会增加标记基因的拷贝的数量。由于扩增区域与抗体基因连接,因此抗体的产量也会增加 (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257,1983)。

[0074] 可用两种本发明载体共转染宿主细胞,其中第一种载体编码重链衍生的多肽,第二种载体编码轻链衍生的多肽。所述两种载体可含有能够使重链和轻链多肽等量表达的相同可选择标记。或者,可使用编码重链和轻链多肽的单一载体。在这种情况下,轻链可置于重链之前以避免多余的有毒游离重链 (Proudfoot, Nature322:52,1986; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA77:2197,1980)。重链和轻链的编码序列可包括 cDNA 或基因组 DNA。

[0075] 一旦本发明的抗体分子被重组表达,那么其就可通过本领域所知的纯化免疫球蛋白分子的任何方法纯化,例如通过色谱法(例如离子交换色谱法、亲和色谱法,尤其是蛋白 A 后的特异性抗原的亲和色谱法以及分级柱色谱法)、离心、差别溶解法,或通过任何其他纯化蛋白的标准技术纯化。

[0076] 对于特别的应用,可能需要制备抗 IL-21 抗体的片段。这些抗体片段可例如通过抗体的蛋白水解而获得。抗体片段可通过用常规方法进行完整抗体的胃蛋白酶或木瓜

蛋白酶消化而获得。作为示例,抗体片段可通过用胃蛋白酶对抗体进行酶切以提供称为 F(ab')₂ 的 5S 片段来产生。此片段还可使用硫醇还原剂进一步切割以产生 3.5S Fab' 单价片段。任选地,可使用针对二硫键切割形成的巯基的封闭基团进行所述切割反应。或者,使用胃蛋白酶的酶切可直接产生两个单价 Fab 片段和一个 Fc 片段。例如,Goldenberg, U. S. patent No. 4,331,647, Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., in Methods in Enzymology Vol. 1, page 422 (Academic Press 1967) 和 Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10.-2.10.4 中描述了这些方法。

[0077] 也可使用切割抗体的其他方法,例如分离重链以形成单价轻-重链片段,进一步切割片段,或其他酶学技术、化学技术或遗传技术,只要所述片段与完整抗体所识别的抗原结合。

[0078] 例如, Fv 片段包括 VH 和 VL 链的结合。此结合可为非共价的,如 Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659, 1972 所述。或者,可变区链可通过分子间二硫键连接或通过化学物质例如戊二醛交联(参见例如 Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992)。

[0079] Fv 片段可包括通过肽接头连接的 VH 和 VL 链。这些单链抗原结合蛋白(scFv)是通过构建包含通过一段寡核苷酸相连的编码 VH 和 VL 结构域的 DNA 序列的结构基因而制备的。将所述结构基因插入到表达载体中,然后将所述表达载体引入到宿主细胞例如大肠杆菌中。所述重组宿主细胞合成一种以接头肽桥接所述两个 V 结构域的单条多肽链。生产 scFv 的方法的描述见例如 Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991) (也参见 Bird et al., Science 242:423, 1988, Ladner et al., U. S. Patent No. 4,946,778, Pack et al., Bio / Technology 11:1271, 1993, and Sandhu, 见上文)。

[0080] 也可通过使用单体蛋白的集合构建替代结构以形成单体结构域。这些单体结构域小到足以穿透组织。所述单体结构域可为天然或非天然变体或它们的组合。单体结构域可形成两个或多个结构域的多体。所述单体结构域结合靶分子上与本文所述的表位相似的位置。在某些情况下,所述多体可由多个单体结构域构成(参见例如美国专利申请 2004-0132028 和美国专利申请 2006-0177831。)

[0081] 本发明的抗体包括所修饰的衍生物,即被任何类型的分子与所述抗体的共价结合以使得所述共价结合不阻止所述抗体结合 IL-21 或阻断受体活化。例如,但并非限制,所述抗体衍生物包括通过例如糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、任何保护/封闭基团的衍生化、蛋白酶切、与细胞配体或其他蛋白的连接等而被修饰的抗体。可用已知技术进行多种化学修饰的任何一种,所述修饰包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,所述衍生物可含有一个或多个非标准氨基酸。

[0082] 抗 IL-21 抗体可与可检测标记缀合形成抗 IL-21 免疫缀合物。合适的可检测标记包括例如放射性同位素、荧光标记、化学发光标记、酶标记、生物发光标记或胶体金。制备和检测这种可检测标记的免疫缀合物的方法为本领域技术人员所熟知,并在下面进行详细描述。所述可检测标记可以为可通过放射自显影术检测的放射性同位素。特别可用于本发明目的的同位素为 ³H、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S 和 ¹⁴C。

[0083] 抗 IL-21 免疫缀合物也可由荧光化合物标记。荧光标记抗体的存在通过将所述免

免疫缀合物暴露在合适波长的光下并检测产生的荧光而测定。荧光标记化合物包括异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛、Alexa 染料、荧光纳米粒子（例如 Qdot）和荧光胺。

[0084] 也可通过偶联抗体成分与化学发光化合物而可检测地标记抗 IL-21 免疫缀合物。化学发光标记的免疫缀合物的存在是通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在而测定。化学发光标记化合物的实例包括鲁米诺、异鲁米诺 (isoluminol)、芳香吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[0085] 类似地，生物发光化合物可用于标记本发明的抗 IL-21 免疫缀合物。生物发光是一种在生物学系统中发现的化学发光，其中催化蛋白增加化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在通过检测发光的存在而检测。可用于标记的生物发光化合物包括荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

[0086] 或者，可通过连接抗 IL-21 抗体组分与酶而可检测地标记抗 IL-21 免疫缀合物。当在合适底物的存在下孵育所述抗 IL-21-酶缀合物时，其酶部分与所述底物反应而产生可通过例如分光光度计、荧光光度计或肉眼检测的化学部分。可用于可检测地标记多特异性免疫缀合物的酶的实例包括 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和碱性磷酸酶。

[0087] 本领域技术人员知晓本发明可用的其他的合适标记。标记部分与抗 IL-21 抗体的结合可使用本领域已知的标准技术而实现。以下文献描述了此方面的典型方法：Kennedy et al., Clin. Chim. Acta70:1, 1976; Schurs et al., Clin. Chim. Acta81:1, 1977; Shih et al., Int'l J. Cancer46:1101, 1990; Stein et al., Cancer Res. 50:1330, 1990; 以及 Coligan, supra.

[0088] 此外，免疫检测的便利和多样性可通过使用与抗生物素蛋白、链霉亲和素和生物素缀合的抗 IL-21 抗体而加强（参见例如 Wilchek et al. (eds.), “Avidin-Biotin Technology,” Methods In Enzymology, Vol. 184 (Academic Press 1990), 和 Bayer et al., “Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology,” in Methods In Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), pages 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992)）。

[0089] 进行免疫测定的方法被广为接受。参见例如 Cook and Self, “Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays,” in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), pages 180-208, (Cambridge University Press, 1995); Perry, “The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology,” in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch and Lennox (eds.), pages 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995); 以及 Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996)。

[0090] 体内半衰期延长的抗体或其片段可通过本领域技术人员已知的方法生成。例如，体内半衰期延长的抗体或其片段可通过修饰（如置换、缺失或者添加）被认为参与 Fc 结构域与 FcRn 受体之间的相互作用的氨基酸残基而生成（参见例如国际公布文本 No. W097 / 34631 和 W002 / 060919, 所述公布文本以引用的方式全文纳入本文中）。体内半衰期延长的抗体或其片段可通过在所述抗体或抗体片段上连接聚合物分子例如高分子量聚乙二醇 (PEG) 而生成。通过 PEG 与例如所述抗体或抗体片段的 N 或 C 末端的位点特异性缀合或经位于赖氨酸残基上的 ϵ 氨基，借助或不借助多官能接头，可以将 PEG 连接到所述抗体或抗

体片段。将使用使生物活性损失最小的直链或支链聚合物衍生化。缀合程度将用 SDS-PAGE 和质谱测定紧密检测以确保 PEG 分子与所述抗体的正确缀合。未反应的 PEG 可通过例如分子筛或离子交换色谱而与抗体-PEG 缀合物分离。

[0091] 药物组合物

[0092] 本发明还包括药物组合物,其包含药学可接受的载体以及本文所述的多肽或抗体。所述药物组合物可包括其他治疗剂,包括但不限于细胞毒性剂细胞毒素例如细胞生长抑制剂或杀细胞剂,治疗剂或放射性金属离子。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安和嘌呤以及它们的类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢药物(如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺)、烷基化剂(如氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、美法仑、卡氮芥(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺-二氯二氨络铂(II)(DDP,顺铂)、蒽环类抗生素(如柔红霉素(原道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(如更生霉素(原放线菌素)、博莱霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)。例如,所述药物组合物可包含具有所需生物活性的蛋白或多肽。这些蛋白可包括,例如,毒素例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白如肿瘤坏死因子、 α -IFN、 β -IFN、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织血纤维蛋白酶原激活蛋白、血栓形成剂或抗血管生成剂如血管生成抑素或内皮抑素;或生物反应调节剂如淋巴因子、白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、旨在拮抗生物反应调节剂的抗体、其他抗体、其他 Fc 融合蛋白或其他生长因子。

[0093] 出于治疗的目的,将抗 IL-21 抗体分子和药学可接受的载体以治疗有效量给予患者。如果给予本发明的治疗性分子和药学可接受的载体的结合物的量在生理学上有意义,那么就称以“治疗有效量”给药。如果一种试剂的存在造成接受患者的可检测的生理学变化,那么所述试剂就在生理学上有意义。例如,如果一种用于治疗炎症的试剂的存在减轻了炎性反应,那么其就在生理学上有意义。

[0094] 已设计了可降解聚合物微球体以保持治疗性蛋白的高系统水平。由可降解聚合物例如聚(丙交酯共聚乙交酯)(PLG)、聚酐、聚(原酸酯)、非可生物降解性醋酸乙基乙烯酯聚合物制备微球体,其中蛋白位于所述聚合物中(Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332,1995;Ranade,“Role of Polymers in Drug Delivery,”in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger(eds.), pages51-93(CRC Press1995);Roskos and Maskiewicz,“Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery,”in *Protein Delivery:Physical Systems*, Sanders and Hendren(eds.), pages45-92(Plenum Press1997);Bartus et al., *Science*281:1161,1998;Putney and Burke, *Nature Biotechnology*16:153,1998;Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548,1998)。聚乙二醇(PEG)涂覆的纳米球也可提供用于治疗性蛋白的静脉内给药的载体(参见例如 Gref et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:167,1997)。

[0095] 本领域技术人员也可设计其他剂型,如例如 Ansel and Popovich,

Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5th Edition (Lea & Febiger 1990); Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) 和 Ranade and Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996) 中所述。

[0096] 药物组合物可作为试剂盒提供, 所述试剂盒包含装有抗 IL-21 中和抗体的容器。治疗性多肽可以单剂或多剂可注射溶液的形式, 或作为在注射前复水的无菌粉末形式提供。或者, 这一试剂盒可包含用于治疗性多肽给药的干粉扩散器、液体气雾发生器或喷雾器。这一试剂盒还可包含关于所述药物组合物的适应症和用法的书面信息。

[0097] 包含抗 IL-21 抗体的药物组合物可以液体形式、气雾剂形式或固体形式提供。液体形式的实例包括可注射溶液、气雾剂、滴剂、局部用溶液和口服悬浮液。示例性固体形式包括胶囊、片剂和缓释形式。缓释形式的实例包括微型渗透泵和植入物 (Bremer et al., Pharm. Biotechnol. **10**:239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery," in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 93-117 (Plenum Press 1997))。其他固体形式包括霜剂、糊剂、其他局部使用形式等。

[0098] 抗 IL-21 抗体的治疗性应用

[0099] IL-21 是一种来源于 CD4⁺T 细胞的细胞因子, 其对 CD8⁺T 细胞介导的最佳免疫、NK 细胞活化和最佳体液应答例如抗体产生和 B 细胞成熟起重要作用。IL-21 已被证明诱导多种促炎性趋化因子和细胞因子、例如 IL-18、IL-15、IL-5、IL-6、IL-7A、IL-17F、TNFRII、sCD25 和 RANTES。当通过 IV 或 SC 注射给药时, IL-21 还在非人灵长类和人中诱导急性期反应 (Dodds et al., Cancer Immunol Immunother 2008 Oct 17 [electronic publication])。在体外, IL-21 刺激某些肿瘤免疫细胞群例如多种骨髓瘤细胞和急性 T 细胞白血病细胞的生长 (Brenne et al Blood 99(10):3756-62 (2002), diCarlo E, et al Cancer Immunol Immunother 56(9):1323-1324 (2007))。IL-21 也由霍奇金淋巴瘤中的霍奇金 Reed-Sternberg 细胞产生 (Lamprecht et al., Blood 112(8):3339-47, 2008)。已经发现 IL-21 受体在系统性硬化症患者的表皮 (Distler et al., Arthritis & Rheumatism 52:865-864, 2004) 和类风湿性关节炎患者的滑膜成纤维细胞 (Jungel et al., Arthritis & Rheumatism 50:1468-1476, 2004) 中的表达增加。此外, 自身免疫性糖尿病 NOD 小鼠的 IL-21 受体的表达增加 (King et al., Cell 1117:265-277, 2004.)。已经证明 IgG 和 IL-21 的表达在出现自身免疫性红斑狼疮类疾病的 BXSB-Yaa 小鼠模型中增加 (Ozaki et al., J. Immunol. **173**:5361-5371, 2004); IL-21 的表达在狼疮易感 sanroque 小鼠中较高 (Vinuesa et al. Nature 435:452, 2005); IL-21 的表达在克罗恩病患者发炎的肠组织中比在其不发炎的肠组织中高 (Monteleone, et al., Gastroenterology 128:687-694, 2005)。IL-21 还在腹腔疾病患者的粘膜中过表达 (Finn et al. Gut, PMID:17965065, 2007)。

[0100] 治疗有效量的抗 IL-21 抗体是指当给予受试者时, 可有效阻止、延缓、减轻或抑制与疾病或障碍有关的症状或生物学活性的抗体的量。给药可为单剂给药或多剂给药, 并可

与其他药物组合物组合给药。

[0101] 本发明提供在炎性和免疫疾病或病症中使用抗 IL-21 单克隆抗体的组合物和方法,所述炎性和免疫疾病或病症例如银屑病、胰腺炎、I 型糖尿病 (IDDM)、Graves' 病、炎性肠病 (IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、多发性硬化、类风湿关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、脊柱关节病、自身免疫性心肌炎、川崎病、腹腔疾病、葡萄膜炎、白塞氏病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肺间质病、炎性肌病 (多肌炎、皮肌炎)、显微镜下多血管炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肝炎、韦格纳氏综合征、憩室病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、系统性硬化症、银屑病关节炎、骨关节炎、异位性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病 (GVHD)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、斯耶格伦氏综合征、肾小球性肾炎、IgA 肾病、自身免疫性肾炎、寻常型天疱疮、重症肌无力、自身免疫性听力丧失、视神经脊髓炎、古德帕斯彻氏综合征、冷球蛋白血症、格林 - 巴利综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、移植排斥、高敏患者移植、抗磷脂综合征、变应反应和哮喘,以及其他自身免疫疾病。本发明提供在某些免疫细胞癌症例如多发性骨髓瘤、急性 T 细胞白血病或霍金奇淋巴瘤的治疗中使用抗 IL-21 单克隆抗体的组合物和方法。

[0102] 接触性皮炎

[0103] 变应性接触性皮炎被定义为 T 细胞介导的对与皮肤接触的抗原的免疫反应。CLA+T 细胞群被认为参与皮炎的发生,因为变应原依赖的 T 细胞应答主要限制于 CLA+ 细胞群 (参见 Santamaria-Babi, et al., J. Exp Med181:1935, (1995))。最近的数据发现,在对镍——一种常见的接触超敏变应原——的应答中,只有记忆 (CD45RO+)CD4+CLA+ 细胞而非 CD8+T 细胞增殖并产生 1 型 (IFN- γ) 和 2 型 (IL-5) 细胞因子。此外,表达 CLA 连同 CD4、CD45RO (记忆) 或 CD69 的细胞在镍特异性刺激后增加并表达趋化因子受体 CXCR3、CCR4、CCR10,但不表达 CCR6。参见 Moed et al., Br J Dermatol151:32, (2004)。

[0104] 在动物模型中,已经证明变应性接触性皮炎是 T 细胞依赖的,并且发现变应应答的 T 细胞迁移到变应原作用的位点。主要参见:Engeman, et al., J Immunol164:5207, (2000); Ferguson&Kupper, J Immunol150:1172, (1993); 和 Gorbachev&Fairchild, Crit Rev Immunol. 21:451 (2001)。

[0105] 对接触超敏小鼠模型给予抗 IL-21 抗体用于评估抗 IL-21 抗体对改善疾病症状和改变疾病进程的临床效用。

[0106] 异位性皮炎

[0107] 异位性皮炎 (AD) 是一种在过去十年间发病率急剧增加的慢性复发性炎性皮肤病。临床上 AD 的特征是极度瘙痒、表皮经常脱落、有斑块和丘疹,表现为慢性复发性过程。AD 的诊断主要基于主要和次要临床所见。参见 Hanifin J.M., Arch Dermatol135:1551 (1999)。组织病理学揭示了急性损伤中的海绵层水肿、过度角化不全、灶性角化不全,而伴随过度角化不全和角化不全的显著表皮过度增生、棘层肥厚 / 颗粒层增厚和淋巴细胞和过多的肥大细胞对真皮的血管周围浸润是慢性损伤的标志。

[0108] T 细胞在组织中的局部免疫反应的启动中起关键作用,有证据表明特别是皮肤浸润的 T 细胞可在皮肤失控免疫反应的启动和维持中起关键作用。皮肤炎性位点中约 90% 的浸润 T 细胞均表达皮肤淋巴细胞相关抗原,所述抗原结合内皮选择素 (E-selectin)——

一种内皮上诱导型粘附分子（综述见 Santamaria-Babi, et al., *Eur J Dermatol*14:13, (2004)）。已经有人报道 AD 患者中循环 CLA+T 细胞较对照个体的显著增加（参见 Teraki, et al., *Br J Dermatol*143:373(2000)），同时其他人已经证明 AD 患者的记忆 CLA+T 细胞较 CLA- 细胞群优先应答变应原提取物。在人中，皮肤异位性病变的发病机理与 CLA+T 细胞的增加有关，所述细胞表达水平增加的 Th-2 型细胞因子如 IL-5 和 IL-13。参见 Akdis et al., *Eur J Immunol*30:3533(2000) ;and Hamid et al., *J Allergy Clin Immunol*98:225(1996)。

[0109] 当将约 6-8 周龄的 NC / Nga 小鼠笼养在不含非特定病原体 (non-SPF) 条件下时，它们会自发地出现在许多方面与人的 AD 相似的 AD 样损伤。相反，饲养在 SPF 条件下的 NC / Nga 小鼠不发生皮肤损伤。然而，通过每周皮内注射粗尘螨抗原可使笼养在 SPF 鼠房中的 NC / Nga 小鼠同时出现自发性皮肤损伤和抓挠行为。参见 Matsuoka et al., *Allergy*58:139(2003)。因此，NC / Nga 中出现 AD 是一种评估治疗 AD 的新疗法的有用模型。

[0110] 除了自发性 AD 的 NC / Nga 模型以外，使用 OVA 对小鼠进行上皮敏化也可用作诱导抗原依赖的表皮和真皮增厚的模型，并且在敏化小鼠的皮肤中有单核细胞浸润物。这通常伴随总 IgE 和特定 IgE 的血清水平的升高，然而此模型中通常不出现皮肤屏障失调或瘙痒。参见 Spergel et al., *J Clin Invest*,101:1614, (1998)。可修改此方案以通过用 OVA 敏化 DO11.10OVA TCR 转基因小鼠而诱导皮肤屏障失调和瘙痒。能识别所述敏化抗原的抗原特异性 T 细胞数量的增加可增加皮肤的炎症水平，从而导致可见的抓挠行为和皮肤的苔藓样硬化 / 剥落。

[0111] 对异位性皮炎小鼠模型给予抗 IL-21 抗体以用于评估抗 IL-21 抗体对改善疾病症状和改变疾病进程的临床效用。

[0112] 关节炎

[0113] 关节炎，包括骨关节炎、类风湿性关节炎、关节损伤造成的关节炎等，是可受益于抗炎性抗体和结合多肽的治疗性应用的常见炎症病症。例如，类风湿性关节炎 (RA) 是影响全身的全身性疾病并且是最常见的关节炎形式之一。其特征是关节滑膜发炎，导致疼痛、僵硬、发热、发红和肿胀。炎症细胞释放可消化骨和软骨的酶。做为类风湿性关节炎的后果，发炎的关节膜滑膜可入侵并破坏骨和软骨，导致关节损害和剧烈疼痛以及其他生理影响。波及到的关节可丧失其形状和结构，导致疼痛和运动能力的丧失。

[0114] 类风湿性关节炎

[0115] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种免疫介导的疾病，具体特征是发炎和后续的组织损害，从而导致严重的残疾和死亡率的增加。在患类风湿性关节炎的关节中局部产生多种细胞因子。多项研究证明，两种原发性促炎细胞因子 IL-1 和 TNF- α 在滑膜发炎和进行性关节破坏涉及的机制中起重要作用。实际上，在 RA 患者中给予 TNF- α 和 IL-1 抑制剂已使炎症的临床和生物学体征得到巨大改善，并且使骨侵蚀和软骨破坏的放射性征兆减轻。然而，尽管有这些令人鼓舞的结果，但是很大百分比的患者对这些试剂无反应表明其他介导体也参与关节炎的发病机制 (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2):135-149, 2002)。

[0116] 有数种本领域已知的类风湿性关节炎的动物模型。例如，在胶原诱导的关节炎 (CIA) 模型中，小鼠发生与人类类风湿性关节炎非常相似的慢性炎性关节炎。由于 CIA 具有与 RA 相似的免疫和病理特征，这使得它成为用于筛选潜在的人用抗炎化合物的理想模型。CIA

模型是一种广为人知的依赖免疫反应和炎性反应而发生的小鼠模型。所述免疫反应包括对胶原应答的 B 细胞和 CD4+T 细胞的相互作用,所述胶原作为抗原被给予并导致抗胶原抗体的产生。炎性阶段是炎症介导体发生组织反应造成的,而所述炎症是这些抗体中的一些与小鼠天然胶原交叉反应并激活补体级联反应的后果。使用 CIA 模型的一个优点是其发病的基本机制是已知的。已经鉴定出了 II 型胶原上与 T 细胞和 B 细胞相关的表位,并且测定了与免疫介导的关节炎有关的多种免疫(例如延迟型超敏性和抗胶原抗体)和炎性(例如细胞因子、趋化因子和基质降解酶)参数,并因此可用于评价测试化合物在 CIA 模型中的效力(Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3 :407-20, 1999 ;Williams et al., Immunol. 89 :9784-788, 1992 ;Myers et al., Life Sci. 61 :1861-78, 1997 ;和 Wang et al., Immunol. 92 :8955-959, 1995)。

[0117] 对这些 CIA 模型小鼠给予抗 IL-21 抗体以用于评估抗 IL-21 抗体对改善疾病症状和改变疾病进程的应用。

[0118] 炎性肠病 (IBD)

[0119] 在美国约有 500000 患有炎性肠病 (IBD),其可影响结肠和直肠(溃疡性结肠炎)或同时影响小肠和大肠(克罗恩病)。这些疾病的发病机制尚不清楚,但它们涉及被影响组织的慢性炎症。溃疡性结肠炎 (UC) 是一种大肠——通常称为结肠——的炎性疾病,其特征为结肠粘膜或最内层肠壁的炎症和溃疡。这种炎症导致结肠频繁排空,从而造成腹泻。症状包括大便松散并伴随腹绞痛、发热和体重减轻。尽管 UC 的确切原因还未知,然而最近的研究表明其是身体自然防护系统对被免疫系统认为“非自身”的体内蛋白进行的反应(“自身免疫反应”)。也许由于这些蛋白与肠道中的细菌蛋白相似,因此它们可能会促使或刺激开始破坏所述结肠内壁的炎性过程。由于所述结肠内壁遭到破坏,因此形成释放出粘液、脓和血的溃疡。该病通常开始于直肠区并可最终蔓延到整个大肠。炎症的反复发作导致肠壁增厚并在直肠出现疤痕组织。对于严重疾病的情况,可发生结肠组织的坏死或脓毒症。溃疡性结肠炎的症状的严重程度不同,并且其发病可为渐进性或突发性的。许多因素包括呼吸道感染或应激都可引起发病。

[0120] 尽管目前尚无可治愈 UC 的疗法,但是治疗方法集中于抑制结肠内壁的异常炎性过程。可使用包括皮质甾类免疫抑制剂(例如咪唑硫嘌呤 (azathioprine)、巯基嘌呤 (mercaptopurine) 和氨甲蝶呤 (methotrexate)) 和氨基水杨酸盐的治疗方法以治疗该病。然而,长期使用免疫抑制剂(例如皮质甾类和咪唑硫嘌呤)会产生严重的副作用,包括骨质疏松、白内障、感染以及肝和骨髓影响。在目前疗法无效的患者中也可采用外科手术。然而,这种外科手术涉及整个结肠和直肠的切除。

[0121] 存在数种可部分模仿溃疡性结肠炎的动物模型。最广泛使用的模型是 2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇 (TNBS) 诱导的结肠炎模型,其引起结肠中的慢性炎症和溃疡。当通过直肠内灌注将 TNBS 引入易感染小鼠的结肠时, TNBS 会诱导结肠粘膜中 T 细胞介导的免疫反应,在这种情况下造成特征为 T 细胞和巨噬细胞在全部大肠壁上致密浸润的大面积粘膜炎症。此外,这种组织病理学状况伴随进行性体重减轻(消瘦)、出血性腹泻、直肠脱垂和大肠壁增厚的临床症状 (Neurath et al. *Intern. Rev. Immunol.* 19 :51-62, 2000)。将幼稚 T 细胞过继性转移到较低组织相容性不匹配或同系免疫缺陷的小鼠中会导致结肠炎 (Leach MW et al 1996, Powrie F et al, 1997) 以及类似银屑病的皮肤损伤 (Schon MP et al.,

Nat. Med. 2 :183-8,1997 ;Davenport CM et al. , Int. Immunopharmacol. 5 :653-72,2002) 的发生。将少至 0.2×10^6 BALB / C 或 B10. D2 小鼠的 CD4+CD25-T 细胞转移到免疫缺陷的 C. B-17SCID 小鼠中切割导致体重减轻,潜血检测阳性大便和皮肤损伤的发生。这些小鼠的症状在群与群之间不同。该结肠炎 / 银屑病模型与人类克罗恩病和银屑病有某些相似性,已被广泛用于检测对人类中这些疾病的治疗的效力。

[0122] 另一种结肠炎模型使用葡聚糖硫酸钠 (DSS),其诱导具有如下表现的急性结肠炎:出血性腹泻、体重减轻、结肠缩短和伴随中性白细胞浸润的粘膜溃疡。DSS 诱导的结肠炎的组织学特征为炎性细胞浸润到固有层,伴随淋巴样增生、灶性隐窝破坏和上皮溃疡。这些变化被认为是由于以下原因而发生:DSS 对于上皮细胞的毒性作用并通过固有层细胞的吞噬以及 TNF- α 和 IFN- γ 的产生。尽管被常规使用,然而 DSS 诱导的疾病在数个组织中的机制以及 DSS 与人类疾病的相关性仍未解决。DSS 被认为是一种不依赖 T 细胞的模型,因为其见于 T 细胞缺失的动物例如 SCID 小鼠中。

[0123] 对这些 TNBS、DSS 或 CD4+T 细胞转移模型给予抗 IL-21 抗体可用于评估 IL-21 拮抗剂改善胃肠疾病的症状和改变胃肠疾病进程的应用。IL-21 可在结肠炎的炎性反应中起重要作用,通过给予 IL-21 拮抗剂中和 IL-21 活性是一种潜在的治疗 IBD 的方法。

[0124] 银屑病

[0125] 银屑病是一种影响超过七百万美国人的慢性皮肤病。银屑病发生在新生皮肤细胞生长异常时,导致角质形成细胞的最终分化被改变的皮肤出现发炎、肿胀和鳞状的斑块。最常见的形式斑块状银屑病的特征为上覆银白鳞片的皮肤的发炎斑块(“损伤”)。银屑病可限于少数斑块或者波及中等至大片面积的皮肤,最常见于头皮、膝盖、肘和躯干上。尽管高度可见,然而银屑病并不是一种传染性疾病。该病的发病机理涉及 T 细胞活化,抗原呈递改变和炎性树突细胞的细胞因子的产生,以及受影响组织的慢性炎症。本发明的抗 IL-21 抗体可用作减轻银屑病、其他炎性皮肤病、皮肤和粘膜变应性以及相关疾病中的炎症和病理影响的有用治疗剂。

[0126] 银屑病是一种导致极大不适的 T 细胞介导的炎性皮肤病。其是一种无法治愈并影响所有年龄的人的疾病。银屑病影响欧洲和北美大约 2% 的人口。尽管患有轻微银屑病的人通常可用局部药剂控制他们的疾病,然而全世界超过一百万患者需要紫外线治疗或系统免疫抑制治疗。不幸的是,紫外辐射的不便和危险以及许多治疗剂的毒性限制了它们的长期使用。此外,患者经常在停止免疫抑制治疗不久后遭受银屑病的复发,并在某些情况下反弹。抗 IL-21 抗体可使用最近开发的基于 CD4+CD45RB 转移模型的银屑病模型进行测试(Davenport et al. , Internat. Immunopharmacol. , 2 :653-672,2002)。

[0127] 除了本文所述的其他疾病模型以外,抗 IL-21 抗体对由人银屑病损伤引起的炎性组织的活性还可使用基于严重联合免疫缺陷(SCID) 的小鼠模型在体内测量。已经开发了将人细胞或组织移植物植入免疫缺陷小鼠中的数种小鼠模型(总称为异种移植模型);参见例如 Cattani and Douglas, Leuk. Res. 18 :513-22,1994 和 Flavell, Hematological Oncology 14 :67-82,1996。作为银屑病体内异种移植模型,将人银屑病皮肤组织移植到 SCID 小鼠上,然后用合适的拮抗剂对小鼠进行攻击。此外,本领域其他银屑病动物模型也可用于评价 IL-21 拮抗剂,例如将人银屑病皮肤移植物移植到 AGR129 小鼠模型上并用合适的拮抗剂进行攻击(例如参见 Boyman et al. , J. Exp. Med. Online publication#20031482,

2004)。类似地,来自人结肠炎、IBD、关节炎或其他炎性损伤的组织或细胞可用于 SCID 模型中以评价本文所述的 IL-21 抗体的抗炎性能。

[0128] 使用本领域广为人知的方法测量治疗效果,并以一段时间里接受治疗的人群中抗炎作用的增加来从统计学上对其评价。一些示例性方法包括但不限于例如在银屑病模型中测量表皮厚度、上真皮中炎性细胞的数量和角化不全的程度。这些方法在本领域中已知并在本文中进行了描述。例如,参见 Zeigler et al., *Lab Invest* 81:1253, 2001; Zollner et al., *J. Clin. Invest.* 109:671, 2002; Yamanaka et al., *Microbiol. Immunol.* 45:507, 2001; Raychaudhuri et al., *Br. J. Dermatol.* 144:931, 2001; Boehncke et al., *Arch. Dermatol. Res.* 291:104, 1999; Boehncke et al., *J. Invest. Dermatol.* 116:596, 2001; Nickoloff et al., *Am. J. Pathol.* 146:580, 1995; Boehncke et al., *J. Cutan. Pathol.* 24:1, 1997; Sugai et al., *J. Dermatol. Sci.* 17:85, 1998; 和 Villadsen et al., *J. Clin. Invest.* 112:1571, 2003。也可使用广为人知的方法例如流式细胞术(或 PCR)来定量样品中的炎性或损伤细胞的数量、IBD 评分(体重减轻、腹泻、直肠出血、结肠长度)、CIA RA 模型的爪疾病评分和炎症评分从而在一段时间里监测炎症。

[0129] 对这些银屑病模型小鼠给予抗 IL-21 抗体以用于评估抗 IL-21 抗体对改善疾病症状和改变疾病进程的应用。

[0130] 系统性红斑狼疮

[0131] 系统性红斑狼疮(SLE)是一种与免疫复合物有关的疾病,其特征为针对普遍存在的自身抗原的 IgG 抗体(例如抗 dsDNA 抗体)的长期产生。SLE 的影响是全身性的,而不定位在于特定组织,尽管在一些情况下会引起肾小球性肾炎(即狼疮肾炎)。多个染色体位点与该疾病有关并可对该疾病的不同方面起促进作用,例如抗 dsDNA 抗体和肾小球性肾炎。已经发现 CD4⁺T 细胞在 SLE 小鼠模型中活跃(Horwitz, *Lupus* 10:319-320, 2001; Yellin and Thienel, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2:24-37, 2000)。CD8⁺T 细胞的作用尚未清楚地确定,但有证据表明“抑制剂”CD8⁺T 细胞的功能在狼疮患者中受到破坏(Filaci et al., *J. Immunol.*, 166:6452-6457, 2001; Sakane et al., *J. Immunol.*, 137:3809-3813, 1986)。

[0132] IL-21 已经被令人信服地证明诱导人幼稚 B 细胞分化为抗体分泌浆细胞(Ozaki et al., *J. Immunol.* 173:5361, 2004; Ettinger et al., *J. Immunol.* 175:7867-79, 2005; Ettinger et al., *J. Immunol.* 178:2872-82, 2007; Kuchen et al., *J. Immunol.* 179:5886-96, 2007)。Ozaki 等人(*J. Immunol.* 173:5361, 2004)也证明了,IL-21 的表达在年龄处于自身免疫过程的早期特征开始变得明显时的狼疮易感 BXSB-Yaa 小鼠(一种 SLE 模型)中增加。用小鼠 IL-21 拮抗剂治疗这些 BXSB-Yaa 小鼠部分抑制多种疾病症状,包括肾小球性肾炎(Bubier et al., *Ann N Y Acad Sci.* 1110:590-601, 2007)。相同的 IL-21 拮抗剂也被证明在另一种 SLE 临床前疾病模型——MRL / lpr 小鼠中有效(Herber et al., *J. Immunol.* 178:3822-3830, 2007)。此外,由于 IL-21 限制 Treg 细胞的发育,因此给予抗 IL-21 抗体可在 T 细胞抑制剂功能受到损害的狼疮患者中提供更强的 T 细胞抑制剂功能(Lamprecht et al., *Blood.* 112(8):3339-47, 2008)。

[0133] 从 24 名 SLE 患者和 15 名健康对照者中获得的数据显示:1) 与对照相比,IL-21mRNA 的表达在狼疮患者的 CD4⁺T 细胞中显著增加;2) 如使用商业 IL-21ELISA 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA)所测量的,与缓解期 SLE 患者或对照相比,IL-21 水平在活动

期 SLE 患者的血清中显著升高 ;3) IL-21 以剂量依赖的方式增强 CD4+T 细胞和 CD19+B 细胞在患者和对照中的增殖 ;4) IL-21 增强抗 -CD40 诱导的浆细胞在正常对照和 SLE 患者中的分化 ;以及 5) IL-21 水平的升高可能促进 SLE 中自体反应性 CD4+T 细胞的增殖和浆细胞分化 (Rus,V.,ACR Presentation#1760,2008American College of Rheumatology meeting, October24-29,2008)。

[0134] 抗 IL-21 抗体可结合其他已用于自身免疫的试剂包括免疫调节剂例如 IFN γ 、**NOVANTRONE®**、**ENBREL®**、**BETAFERON®**、**REMICADE®**、**LEUKINE®**和**PROLEUKIN®**而给药。抗 IL-21 抗体可结合其他已用于多发性骨髓瘤、霍金奇淋巴瘤或急性 T 细胞白血病的癌症治疗的试剂例如**THALOMID®**或结合以甾体例如地塞米松或强的松而给药。通过多种方法来确定最优化剂量水平并安排抗 IL-21 抗体,所述多种方法包括 :对抗 IL-21 抗体的药物代谢动力学和药效学研究 ;测定动物模型中的有效剂量并评估抗 IL-21 抗体的毒性。在灵长类和临床试验中完成的直接药物代谢动力学测量随后可用于预测患者中的理论剂量,使所述患者达到量和持续时间足以在患者中实现生物学反应的血浆抗 IL-21 抗体水平。

[0135] 移植排斥

[0136] 固体器官移植的受体可能因组织相容性不匹配而发生对同种异体移植物的急性或慢性排斥。抗 HLA 分子的抗体 (同种异体抗体) 在这些患者中的产生是由于外来抗原在 T 细胞上的呈递造成的。同种异体抗体可通过免疫复合物的形成、补体结合和抗体介导的针对所结合的同种异体抗体的细胞毒性而介导移植物中的组织损害。补体级联反应也释放激活内皮细胞并导致移植物中血管病变的局部因子。补体产物 C4d 是急性慢性移植排斥中都存在的一种早期标记,并可在出现明显病理变化前的亚临床情况下被检测 (Racusen and Haas,Clin J Am Soc Nephrol11:415-420,2006 ;Moll and Pascual,Am J Transplantation5:2611-2618,2005 ;Tinkam and Chandraker,Clin J Am Soc Nephrol11:404-414,2006)。在移植前对患者进行抗 HLA 同种异体抗体 (群体反应性抗体) 的筛选。患者可因前次同种异体移植失败、输血或多次怀孕而被高度敏化。高度敏化移植患者中同种异体抗体的存在使对他们的护理复杂化,因为可能需要更多的免疫抑制治疗并且发生急性排斥的机会很高 (Baid et al.,Curr Opin Immunol13:577-581,2001)。在某些情况下,使用针对 B 细胞的试剂 (霉酚酸或利妥昔单抗),尽管这种治疗方法不直接针对抗体分泌浆细胞。血浆除去法也用于减少循环免疫球蛋白。在所有情况下,都用针对 T 细胞的免疫抑制剂治疗移植受体以降低发生排斥的危险,并随着所述受体对移植物耐性的建立而慢慢“停止”这种治疗 (Seyfort-Margolis and Turka,J Clin Invest118(8):2684-2685,2008 ;Taylor et al.,Crit Rev Oncol Hematol56:23-46,2005 ;Amante and Ejercito,Transplant Proc40:2274-2280,2008)。

[0137] 除了支持浆细胞存活的特殊微环境之外,抗体分泌浆细胞的发育还需要 CD4T 细胞的同源辅助 (Tarlington et al.,Curr Opin Immunol20:162-169,2008)。激活的 T 细胞分泌细胞因子对于浆细胞的分化和存活是必需的,并已知影响抗体反应和 Ig 同种型的性质。在小鼠和非人灵长类中存在监测 T 细胞依赖的抗体反应的模型。这些方法为本领域技术人员所深刻理解。使用检测受治疗动物的血清中的总抗体或抗原特异性抗体包括 IgG 亚型、IgM、IgE 或 IgA 的测定来监测抗模型肽抗原例如卵白蛋白、破伤风类毒素、绵羊红细

胞或三硝基苯基修饰的钥孔戚血蓝蛋白的一抗或二抗反应的动力学和幅度。在某些模型中,还可监测抗体的亲和力成熟。这些模型可用于检测治疗药物的效果,所述治疗药物改变 T 细胞对 B 细胞的辅助并阻断被认为对浆细胞分化和存活重要的细胞因子。

[0138] 在许多动物种中进行了同种异体移植物排斥的研究。例如,食蟹猴 (cynomolgus monkey) 的肾移植模型可显示人中同种异体抗体介导的慢性肾同种异体移植排斥的影响。在某些病例中在移植前进行同种异体移植物耐受疗法。通过对外周血白细胞不匹配的受体血清的流式细胞术分析来监测供体特异的同种异体抗体的存在情况,并在肾同种异体移植物的活检组织中检测补体产物 C4d 的沉积情况 (Smith et al., Am J Transplant6: 1790-1798, 2006 ;Smith et al., Am J Transplant8:1-11, 2008)。本领域技术人员可在小鼠中进行急性和慢性移植模型。

[0139] 在 T 细胞依赖的抗体反应模型中或同种异体移植物排斥模型中给予抗 IL-21 抗体用于评价抗 IL-21 抗体对于减轻同种异体抗体反应、缓解同种异体移植物排斥症状的临床效用,或者用作移植受体 (包括高度敏化移植患者) 的移植前治疗或耐受疗法的一部分。

[0140] 本发明通过以下非限制性实施例进行进一步说明。

[0141] 实施例

[0142] 实施例 1. IL-21 蛋白和抗体的制备

[0143] A. 免疫接种和杂交瘤细胞

[0144] 如美国专利 7, 250, 274 中所述,制备 IL-21 蛋白,所述文献全文纳入本文中。如美国专利申请 2007-0122413 和美国专利 6, 777, 539 中所述,制备可溶性 IL-21 受体蛋白,所述两份文献全文纳入本文中。在产生小鼠抗体的野生型小鼠和产生完全人源性抗体的转基因小鼠 (Medarex, Princeton, NJ) 中制备抗 IL-21 单克隆抗体。用人 IL-21 蛋白免疫接种小鼠。简单地说,通过用 30 μ g 缀合有 BSA (Imject Pharmalink Immunogen Kit, Pierce) 的纯化重组 IL-21 (由 ZymoGenetics 在大肠杆菌中产生) 进行皮下注射来初次免疫接种小鼠,并按照厂商说明书联合给予 CpG 寡核苷酸 (小鼠 TLR9 配体) 和 GM-CSF (粒细胞巨噬细胞集落刺激因子, R&D, Minneapolis, MN) 和 **Emulsigen®**-P 佐剂 (MVP Laboratories, INC, Omaha, NE)。初次免疫接种后,每只小鼠以周为间隔经皮下途径再接受三次含 30 μ g IL-21 的 **Emulsigen®**-P 佐剂。第四次免疫接种后 7 天,经眼眶静脉丛对所述小鼠采血并从血中分离血清以分析其与 IL-21 结合的能力。

[0145] 从两只高效价 BALB / c 小鼠或转基因小鼠中采集并合并脾细胞,然后以单次融合方案使用 PEG1450 将其融合到 P3-X63-Ag8. 653 小鼠骨髓瘤细胞 (脾细胞与骨髓瘤细胞的融合比例为 2 :1, “Antibodies :A Laboratory Manual”, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press)。融合后生长 9 天后,用未标记的或人 IgG Fc 标记的重组 IL-21 蛋白作为特异性抗体标靶,通过直接和捕获 ELISA 识别产生特异性抗体的杂交瘤细胞池。进一步分析阳性杂交瘤细胞池阻断配体与受体结合的能力,所述能力以纯化重组 IL-21 蛋白在表达 IL-21 受体序列的 BaF3 细胞上的配体 - 受体相互作用 (“磷 -STAT3 中和测定”) 后 STAT3 磷酸化的水平作为量度。从组织培养基中纯化得到的单克隆抗体的特征在于其具有阻断纯化重组 IL-21 蛋白在表达 IL-21 受体序列的 BaF3 细胞上的配体 - 受体相互作用 (“磷 -STAT3 中和测定”) 的能力。以这种方式识别出“中和的”单克隆抗体。

[0146] 通过有限稀释将在“磷 -STAT3 中和测定”和 ELISA 方法中产生阳性结果的杂交瘤

细胞池克隆至少两次。在这些测定中,使用标准的低密度稀释物(每孔少于一个细胞)滴定样品以观察哪个克隆保持最高的 OD 值。利用中和和滴定测定的结果,从每个初始主孔中选择两个特异性克隆进行进一步分析。将这些克隆再进行一轮克隆以确保培养物均匀性,然后使用直接 ELISA 进行筛选。在再一次滴定测定后,选出两个最终的 IL-21 克隆。在生长培养基中培养杂交瘤细胞克隆,所述培养基含有 90% 的含有 2mM L-谷氨酰胺、100 μ g / mL 青霉素和 100 μ g / mL 硫酸链霉素的伊思考夫改良杜尔贝可培养基以及 10% 的 Fetal Clone I 血清 (Hyclone Laboratories)。通过以 2×10^5 细胞 / mL 接种培养物来繁殖所述克隆,并在 37°C 和 5-6% CO₂ 的条件下维持在 1×10^5 和 5×10^5 细胞 / mL 之间。在后续转移时使细胞适应不含血清的条件。将细胞冷冻在 90% 血清、10% DMSO 中并存放在液氮冷冻室的蒸汽相。

[0147] 由所述杂交瘤细胞克隆产生的纯化单克隆抗体以多种方法进行表征,所述方法包括建仓(即测定是否每种抗体均能抑制任何其他抗体的结合)、使用肽进行表位作图、相对亲和力以及中和。

[0148] 从转基因小鼠产生异源抗体的方法是已知的,参见例如 Lonberg, Nat. Biotech. 23(9):1117-25, 2005; Tomizuka et al. PNAS 97(2):722-727, 2000; 和美国专利 5,625,126。

[0149] 已在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, VA.) 保藏了以下产生小鼠抗人 IL-21 单克隆抗体的杂交瘤细胞:克隆 338.5.4ATCC No. (PTA-8317)、克隆 338.11.5ATCC No. (PTA-8314)、克隆 338.14.3ATCC No. (PTA-8313)、克隆 338.15.5ATCC No. (PTA-8315)、克隆 338.17.3ATCC No. (PTA-8316)、克隆 338.24.5ATCC No. (PTA-8430)、克隆 338.25.6ATCC No. (PTA-8431)、克隆 338.39.5ATCC No. (PTA-8432)、克隆 338.29.2ATCC No. (PTA-8433)、克隆 338.28.6ATCC No. (PTA-8434)。

[0150] 已在美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA.) 保藏下面的产生人抗人 IL-21 单克隆抗体的杂交瘤细胞。表 1 提供所述抗体的可变重链 (VH) 和可变轻链 (VL) 的完整氨基酸序列。该表还包括每种抗体的 VH 和 VL 区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。对应的核苷酸序列见序列表。标识为 366.345.6.11, ATCC No. PTA-8788 的杂交瘤细胞包括在保藏中但不在表 1 中。

[0151]

表1

克隆 编号	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	完整 序列
362.75.1. 1.7	PTA- 8791	SRTYR WG SEQ ID NO: 15	SIYYRG STFYNP SLKS SEQ ID NO: 17	QSGYS GYDWF DP SEQ ID NO: 19	RASQS VSSFLA SEQ ID NO: 23	DASNR AT SEQ ID NO: 25	QQRSN WIT SEQ ID NO: 27	VH MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQESGPGLVKPFSETLSL TCTVSGGSISRTYRWGWIRQPPGKELEWIGSIYVRGSTF YNPSLKSRVTVSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVVYCAR QSGYSGYDWFDPWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 13 VL MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIP ARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWITFGQ GTRLEIK SEQ ID NO: 21

[0152]

克隆 编号	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	完整 序列
362.78.1. 44	PTA- 8790	SYGMH SEQ ID NO: 31	FIWYD GSDKY YADSV KG SEQ ID NO: 33	DGDSS DWYGD YYFGM DV SEQ ID NO: 35	RASQS VSSSYL A SEQ ID NO: 39	GASSR AT SEQ ID NO: 41	QQYGS WT SEQ ID NO: 43	VH MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLR LSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWYDGS KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDGSDSDWYGDYYFGMDVWGQGTTVTVSS SEQ ID NO: 29
								VL METPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLISLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWTFGQ GTKVEIK SEQ ID NO: 37

[0153]

克隆 编号	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	完整 序列
362.597. 3.15	PTA- 8786	TYGMH SEQ ID NO: 47	FIWYD GSDKY YADSV KG SEQ ID NO: 49	DGDSS DWYGD YYFGM DV SEQ ID NO: 51	RASQS VSSSYL A SEQ ID NO: 55	GASSR AT SEQ ID NO: 57	QQYGS WT SEQ ID NO: 59	VH MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLR LSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWDGS DKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGSDSDWYGDYYFGMDVWGQGTTTIVSS SEQ ID NO: 45 VL METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSWTFGQ GTKVEIK SEQ ID NO: 53

[0154]

克隆 编号	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	完整 序列
366.328. 10.63	PTA- 8789	SYSMN SEQ ID NO: 63	SITSGS YYIHY ADSVK G SEQ ID NO: 65	ERGWG YYGMD V SEQ ID NO: 67	RASQDI DSALA SEQ ID NO: 71	DASSLE S SEQ ID NO: 73	QQFNS YPYT SEQ ID NO: 75	VH MELGLRWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFIFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSITSGSYIH YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RERGWGYGMDVWGQGTITVSS SEQ ID NO: 61 VL MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLASVGD RVTITCRASQDIDSALAWYQQKPGKAPKILIHDAASSLG VPSRFSGSGGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQFNSTPYTF GQGTKLEIK SEQ ID NO: 69

[0155]

克隆 编号	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	完整 序列
366.552. 11.31	PTA- 8787	SDFWG SEQ ID NO: 79	YISSRG STNYN- PSLKR SEQ ID NO: 81	SAGVT DFDF SEQ ID NO: 83	RASQGI SSWLA SEQ ID NO: 87	VASSLQ S SEQ ID NO: 89	QQANS FPLT SEQ ID NO: 91	[VH] MKHLWFFLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSISSDFWGWIRPPGKGLEWIGYISSRGSTNY NPSLKRRVTISVDTSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCARS AGVTDDFWGGQGLVTVSS SEQ ID NO: 77 [VL] MDMMVPAQLLGLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVG DRVTITCRASQGISSWLA WYQHKGKAPKLLIYVASSLQ SGVPSRFSGSGGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQANSFPL TFGGGTKVEIK SEQ ID NO: 85

[0156] 1B:克隆 362.78.1.44 免疫球蛋白重链和轻链基因在哺乳动物细胞系中表达以产生 362.78-CHO

[0157] 使用两种表达盒在 CHO 细胞中表达人抗人 IL-21 单克隆抗体（来自杂交瘤细胞克隆 362.78.1.44）。将 VH 链融合到修饰的人 IgG1 恒定区。修饰的 IgG1——IgG1.1, 含有 5 个氨基酸置换以降低效应物功能。将人抗人 IL-21 重链连接至带有内部核糖体进入位点 (IRES) 序列的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 选择性标记。人抗人 IL-21 重链和 DHFR 选择性标记的表达受组成型合成启动子的指导, 所述启动子由人巨细胞病毒 (CMV) 增强子和骨髓瘤病毒 (MPSV) 增强子 / 启动子的融合物构成。猴病毒 40 (SV40) 多腺苷酸化信号用于在 DHFR 选择性标记的末端终止转录。将 VL 链融合到人免疫球蛋白 κ 恒定区。将人抗人 IL-21 轻链连接到带有 IRES 序列的嘌呤霉素抗性 (puroR) 选择性标记。人抗人 IL-21 轻链和 puroR 选择性标记的表达受组成型合成启动子的指导, 所述启动子由人 CMV 增强子和 MPSV 增强子 / 启动子的融合物构成。SV40 多腺苷酸化信号用于在 puroR 选择性标记的末端终止转录。将人抗人 IL-21 重链和轻链表达盒共转染到 CHO DXB-11 宿主细胞中。嘌呤霉素选择后进行氨甲蝶呤选择以获得人抗人 IL-21 单克隆抗体的高表达、稳定表达。IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 的 CHO 表达形式在后面的实施例中称为“362.78-CHO”。

[0158] 实施例 2. 抗 IL-21 单克隆抗体结合人 IL-21 蛋白和肽

[0159] 2A. 对肽的结合与中和作用

[0160] 抗人 IL-21 结合及中和单克隆抗体与人 IL-21、突变人 IL-21 蛋白和人 IL-21 序列衍生的合成肽结合的能力通过直接 ELISA 测定形式得以证明。

[0161] 使用了以下肽：

[0162] 肽 #1 ((SEQ ID NO :3)pyroGlu GQDRHMIRMRLIDIVDQLKC；

[0163] 肽 #2 ((SEQ ID NO :4)NDLVPEFLPAPEDVETNC,

[0164] 肽 #3 ((SEQ ID NO :5)NVSIIKKLRKPPSTNAGRRQKHRLTC,

[0165] 肽 #4 ((SEQ ID NO :6)CDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS

[0166] 以及重组人 IL-21 (SEQ ID NO :2)、人 IL-21 序列衍生的合成序列和重组突变人 IL-21 (SEQ ID NO :7)；将在包被缓冲液 (0.1M Na_2CO_3 , pH9.6) 中浓度为 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的以上肽以 $100 \mu\text{L} / \text{孔}$ 的体积分别固定在 96 孔聚苯乙烯 ELISA 板的表面上。将板在 4°C 下孵育过夜, 然后吸出未结合的蛋白并用 $300 \mu\text{L} / \text{孔}$ 的洗涤缓冲液 (PBS-Tween, 定义为 0.137M NaCl, 0.0022M KCl, 0.0067M Na_2HPO_4 , 0.0020M KH_2PO_4 , 0.05% v / w 聚山梨醇酯 20, pH7.2) 将板洗涤两次。用 $200 \mu\text{L} / \text{孔}$ 的封闭缓冲液 (PBS-Tween 加 1% w / v 牛血清清蛋白 (BSA)) 将孔封闭 1 小时, 然后用洗涤缓冲液将板洗涤两次。用 5% 胎牛血清 (FBS) / 伊思考夫改良杜尔贝可培养基 (IMDM 培养基) 制备抗体稀释物并调整到 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 。然后将每种抗体稀释物以 $100 \mu\text{L} / \text{孔}$ 一式两份地转移到测定板中以结合抗人 IL-21 蛋白。在室温下孵育 1 小时后, 吸出孔中的液体并如上所述将板洗涤两次。然后将用 5% FBS / IMDM 培养基以 1 : 5000 稀释的 Fc 特异性辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG、Fc 特异性山羊抗兔 IgG, 或 Fc 特异性山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 以 $100 \mu\text{L} / \text{孔}$ 的体积加入到每孔中, 并将板在室温下孵育 1 小时。除去未结合的 HRP 缀合抗体后, 将板洗涤 5 次, 将四甲基联苯胺 (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 以 $100 \mu\text{L} / \text{孔}$ 的体积加入到每孔中, 并将板在室温下孵育 3 分钟。通过加入 $100 \mu\text{L} / \text{孔}$ 的 450nm TMB 终止试剂 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 停止显色, 并在 450nm 下在 Molecular Devices Spectra MAX340 设备上读出每孔的吸光度。

[0167] 表 2

[0168] 单克隆小鼠抗人 IL-21 抗体对人 IL-21 蛋白、突变人 IL-21 蛋白和人 IL-21 序列衍生的肽的反应性

[0169]

小鼠抗人 IL-21 Ab 克隆#	结合 (B) 中和 (N) 同种型	纯化的 Ab 批次号	IL-21	肽1	肽2	肽3	肽4	IL-21 突变体
338.5.4	B/N	E10274	+/-	0	0	0	0	+/-
	IgG1							
338.11.5	B	E10276	+++	0	+++	0	0	+++
	IgG1							
338.14.3	B	E10273	+/-	0	0	0	0	0
	IgG1							
338.15.5	B	E10275	+++	0	0	0	+++	0
	IgG1							
338.28.6	B	E10329	+++	0	0	0	0	+
	IgG1							
338.39.5	B	E10330	+++	0	0	+++	0	+++
	IgG1							
反应性:		无 (0)	弱 (+)	中等 (++)	强 (+++)			

[0170] 表 3

[0171] 单克隆人抗人 IL-21 抗体对人 IL-21 蛋白、突变人 IL-21 蛋白和人 IL-21 序列衍生的肽的反应性

[0172]

人抗人 IL-21 Ab 克隆#	结合 (B) 中和 (N) 同种型	纯化的 Ab 批次号	IL-21	肽1 N末端	肽2	肽3	肽4 C末端	IL-21 突变体
362.75.1.1	B/N	E10364	+++	0	0	0	+++	0
	IgG							
362.78.1.44	B/N	E10554	++	0	0	0	0	+
	IgG							
362.597.3	B/N	E10366	+++	0	0	0	0	++
	IgG							
366.328.10	B/N	E10416	+++	0	0	0	0	+++
	IgG							
366.345.6.11	B	E10476	+++	0	0	0	0	++
	IgG							
366.552.11	B/N	E10435	+++	0	0	0	++	0
	IgG							
反应性:		无 (0)	弱 (+)	中等 (++)		强 (+++)		

[0173] 2B. 用表面等离子体共振技术 (Biacore) 对抗人 IL-21 单克隆抗体 362.78-CHO 结合人 IL-21 和食蟹猴 IL-21 的亲合力测量

[0174] 使用表面等离子体共振技术评估抗 IL-21 单克隆抗体 362.78-CHO 结合人重组 IL-21 和食蟹猴重组 IL-21 的亲合力。

[0175] 亲合力测定: 通过表面等离子体共振技术测量了抗人 IL-21 单克隆抗体 362.78-CHO 与人 IL-21 和食蟹猴 IL-21 的相互作用的动力学速率常数和平衡离解常数。结合速率常数 (k_a ($M^{-1}s^{-1}$)) 是反映抗原抗体复合物形成速率的值。离解速率常数 (k_d (s^{-1})) 是反映此复合物稳定度的值。用离解速率常数除以结合速率常数 (k_d/k_a) 就得到平衡离解常数 (K_D (M))。此值描述相互作用的结合亲合力。具有相似 K_D 的抗体可具有变动很大的结合和离解常数。因此, 测量抗体的 k_a 和 k_d 可帮助更独特地描述抗体 - 抗原相互作用的亲合力。

[0176] 材料和方法: 结合动力学和亲合力研究在 Biacore T100™ 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行。使用 BIACORE T100™ 控制软件 1.1.1 版将 Biacore T100™ 的方法程序化。对于这些实验, 362.78-CHO 抗体或者经山羊抗人 IgG Fc- γ 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 被捕获在 CM4 传感器芯片上, 或者用在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中质量比为 1 : 100 的 Sulfo-NHS-LC-生物素 (Pierce, Rockford, IL) 以最低程度地生

物素化之后再被捕获在链霉亲和素 (SA) 芯片上。所有结合实验都在 25℃ 下在 10mM HEPES、300mM NaCl、5mM CaCl₂、0.05% 表面活性剂 P20 (Biacore)、1mg / mL 牛血清清蛋白, pH8.0 的缓冲液中进行。

[0177] 对于使用山羊抗人 IgG Fc- γ 抗体进行的实验, 用 pH5.0 的 10mM 乙酸钠将捕获抗体稀释到 50 μ g / mL 的浓度, 然后用偶联胺化合物 (EDC:NHS) 共价将其固定于 CM4 感受器芯片的全部 4 个流动池。固定抗体后, 用 1M 乙醇胺封闭所述流动池上的剩余活性位点。获得了约 3500RU 的捕获抗体密度。抗 IL-21 抗体 362.78-CHO 以三个不同的密度 (25-150RU) 被捕获到所述 CM4 芯片的流动池 2、3 和 4 上。以流速 10 μ L / min 来进行 362.78-CHO 抗体到所述固定表面上的捕获。所述 Biacore 设备测量结合于传感器芯片表面上的蛋白质量, 从而每一轮都确认测试抗体的捕获情况。制备 40nM-0.003nM (1 : 5 连续稀释) 的人重组 IL-21 或食蟹猴重组 IL-21 (ZymoGenetics) 的连续稀释液。将所述连续稀释液注射到所述表面上并使其与被捕获到所述传感芯片上的 362.78-CHO 抗体特异性结合。每一 IL-21 抗原浓度进行两次注射, 且结合时间为 6.5 或 7 分钟, 离解时间为 10、15 或 60 分钟。以 50 μ L / min 的流速进行动力学结合研究。在两轮之间, 用 20mM 盐酸洗涤所述流动池以再生所述表面。这一洗涤步骤从所固定的抗体表面上除去了所捕获的测试抗体和任何结合抗原。随后 362.78-CHO 抗体在下一轮中被再次捕获。

[0178] 对于用最低程度生物素化的 362.78-CHO 进行的实验, 该生物素化的抗体 362.78-CHO 以三个不同的密度 (150-1200RU) 被捕获到所述 SA 芯片的流动池 2、3 和 4 上。以流速 10 μ L / min 来进行生物素化 362.78-CHO 抗体到所述表面的捕获。制备 50nM-0.001nM (1 : 4 连续稀释) 或 40nM-0.003nM (1 : 5 连续稀释) 的人重组 IL-21 或食蟹猴重组 IL-21 (ZymoGenetics) 的连续稀释液。将这些连续稀释液注射到所述表面上并使其与被捕获到所述传感芯片上的 362.78-CHO 抗体特异性结合。每一 IL-21 抗原浓度进行两次注射, 且结合时间为 6.5 或 7 分钟, 离解时间为 10、15 或 60 分钟。以 50 μ L / min 的流速进行动力学结合研究。在两轮之间, 用 20mM 盐酸洗涤所述流动池以再生所述表面。此洗涤步骤从所固定的抗体表面上除去任何结合抗原。所述洗涤循环不从所述传感器表面上除去所述生物素化 362.78-CHO 抗体, 所述抗体随后可结合下一个抗体样品。

[0179] 使用 BIACORE T100™ 评估软件 (1.1.1 版) 收集数据。通过扣除流动池和空白注射参照值对数据进行处理。对基线稳定性进行评估以确保所述再生步骤在整组注射中都提供一致的结合表面。就再现性检查两次注射曲线。基于单价 IL-21 与二价抗体的结合, 1 : 1 结合相互作用模式被确定为是合适的。将三个流动池 (FC2-1、FC3-1、FC4-1) 扣除参照值的结合曲线整体上拟合于具有多个 Rmax 和将 RI 设定为 0 的 1 : 1 结合模型。数据很好地匹配 1 : 1 结合模型, 实验和理论结合曲线之间很一致。与所述匹配有关的 χ^2 和标准差很低。没有对残余物进行趋势分析。

[0180] 结果: 对于 362.78-CHO 与人 IL-21 的相互作用, 从四个独立实验收集数据。多次实验的 k_a 范围为 3E+07 到 5E+07 ($M^{-1}s^{-1}$), 而 k_d 范围为 3E-06 到 3E-05 (s^{-1})。计算出的 K_D 范围为 0.9E-13 到 8E-13 (M)。

[0181] 对于 362.78-CHO 与食蟹猴 IL-21 的相互作用, 从三个独立实验收集数据。每个实验的 k_a 为 3E+07 ($M^{-1}s^{-1}$), 而 k_d 的范围为 2E-04 到 5E-04 (s^{-1})。计算出的 K_D 范围为 0.9E-11 到 2E-11 (M)。

[0182] 实施例 3. 物种交叉反应性实验

[0183] 测定抗人 IL-21 抗体与小鼠或食蟹猴 IL-21 蛋白或人 IL-21 序列衍生的合成肽交叉反应和结合的能力。

[0184] 物种交叉反应性研究对于证明治疗性拮抗剂开发方法的特征是重要的。为测定本文所述的抗人 IL-21 结合与中和实体能否与小鼠或食蟹猴 IL-21 发生交叉反应和结合（并因此判断所述食蟹猴或小鼠可否作为可行的测试物种），必须证明所述抗体与重组人、小鼠和食蟹猴 IL-21 在多种测定形式中发生相似的结合。用于检测所述单克隆抗体的结合的方法之一是利用它们进行免疫印迹（蛋白质印迹）测定。使用 4-12% BisTris 聚丙烯酰胺凝胶（Invitrogen, Inc.）将重组人 IL-21 (SEQ ID NO:2)、重组鼠 IL-21 (SEQ ID NO:11)、重组食蟹猴 IL-21 (SEQ ID NO:9)、人 IL-21 序列衍生的合成肽：缀合有卵清蛋白或不相关对照细胞因子重组人 IFN- λ (ZymoGenetics) 的肽 #1pyr30-K50 (Seq ID NO:3)、肽 #2N54-C71 (Seq ID NO:4)、肽 #3N97-C122 (Seq ID NO:5)、肽 #4C125-S153 (Seq ID NO:6) 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，并使用标准方法和含有 25mM Tris、186mM 甘氨酸和 40% 甲醇的缓冲液转移到硝酸纤维素膜上。

[0185] 对于蛋白质印迹，用含有 20mM Tris (pH7.4)、5mM EDTA、0.5% IGEPAL CA-630、150mM NaCl、0.25% 明胶和 1% 酪蛋白水解物封闭溶液 (Western Blocking Reagent, Roche Diagnostics, Inc., Basel Switerzerland) 的缓冲液（封闭缓冲液）封闭膜上的非特异性位点。然后用封闭缓冲液中的纯化单克隆抗体 (10ng / ml 或 100ng / ml) 将膜在室温下孵育 2 小时，然后用过氧化物酶缀合的驴抗人 IgG (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 孵育 2 小时。用缺少酪蛋白水解物的 Tris / EDTA / IGEPAL / NaCl / 明胶封闭缓冲液将膜洗涤 5 次，然后用 SUPERSIGNAL™ DuraWest 鲁米诺 / 增强剂 / 过氧化物酶溶液 (Pierce, Rockford, IL) 显影以进行化学发光检测。使用基于 X 光胶片的标准方法使印迹物可见。

[0186] 表 4. 在蛋白质印迹分析中的单克隆人抗 IL-21 抗体的反应性

[0187]

克隆*	人 IL-21	食蟹猴 IL-21	小鼠 IL-21	+人 IL- 21 肽 A1744	+人 IL- 21 肽 A1750	+人 IL- 21 肽 A1751	+人 IL-21 肽 A1752
362.35.1.2	0	0	0	0	0	0	0
362.37.3	+++	+++	+++	0	0	0	0
362.75.1.1	+++	+++	+++	0	0	0	+++
362.78.1	++	++	0	0	0	0	0
362.108.1.2	0	0	0	0	0	0	0
362.172.2	+++	+++	+++	0	0	0	0
362.216.2	0	+/-	0	0	0	0	0
362.256.1	0	0	0	0	0	0	0
362.303.1.1	0	0	0	0	0	0	0
362.378.1	+++	+++	+++	0	0	0	+
362.468.3	+/-	+	0	0	0	0	0
362.564.1.4	++	++	0	0	0	0	0
362.597.3	++	++	+/-	0	0	0	0
362.632.2	+++	+++	+++	0	0	0	+++
366.328.10	+	+	0	0	0	0	0
366.342.8	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.345.6.11	0	0	0	0	0	0	0
366.353.11.12	+	++	0	0	0	0	0
366.398.36	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.453.30	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.462.24.10	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.479.13	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.552.11	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.565.7	0	0	0	0	0	0	0
366.617.7	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.618.20	++	++	+	0	0	0	0
367.752.5	+++	+++	+++	0	0	0	0
368.626.24	+++	+++	++	0	0	0	0
反应性:	无 (0)	弱 (+)	中等 (++)	强 (+++)	*用 IFN- γ 没有观察到信号 +肽与卵清蛋白缀合		

[0188] 实施例 4. 评估抗人 IL-21 抗体与人 γ c- 家族细胞因子 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 发生交叉反应和结合的能力

[0189] 特异性抗体的另一重要特征为所述抗体结合和拮抗靶蛋白但不显著结合相关蛋白（非靶标）的能力。以蛋白质印迹形式检测抗人 IL-21 抗体结合相关细胞因子的能力。获得 γ c- 细胞因子家族的所有成员的样品，进行 SDS-PAGE 并转移到硝酸纤维素膜上进行印迹。重组人 IL-2(202-IL / CF)、人 IL-4(204-IL / CF)、人 IL-7(207-IL / CF)、人 IL-9(209-IL / CF)、人 IL-15(247-IL / CF)（以上都来自 R&D Systems, Minneapolis MN）、人 IL-21(ZymoGenetics) 和人 IFN- λ （美国专利 6,927,040 ;7,252,969）用于评估所述抗体的特异性。全部测试抗体都未显示出与 γ c 家族细胞因子发生背景以上的可检测结合，

除了对于人 IL-21 观察到了明显结合,这与之前使用这些抗体进行的蛋白质印迹一致(见实施例 3)。

[0190] 表 5. 在蛋白质印迹分析中的单克隆抗人 IL-21 抗体与 γ c 细胞因子的反应性
[0191]

克隆	人 IL-2	人 IL-4	人 IL-7	人 IL-9	人 IL-15	人 IL-21	人 IFN λ 阴性 对照
362.597.3	0	0	0	0	0	++	0
362.75.1.1	0	0	0	0	0	+++	0
362.78.1	0	0	0	0	0	+	0
362.564.1.4	0	0	0	0	0	++	0
366.328.10.63	0	0	0	0	0	++	0
366.552.11.31	0	0	0	0	0	+++	0
366.617.7	0	0	0	0	0	+++	0
反应性:	无 (0)	弱 (+)	中等 (++)	强 (+++)			

[0192] 表 6:在蛋白质印迹分析中的单克隆小鼠和大鼠抗人 IL-21 抗体的反应性
[0193]

克隆*	IL-21	食蟹猴 IL-21	小鼠 IL-21	+人 IL-21 肽 A1744	+人 IL-21 肽 A1750	+人 IL-21 肽 A1751	+人 IL-21 肽 A1752
小鼠克隆							
338.5.4	0	0	0	0	0	0	0
338.11.5	+++	+++	+/-	0	+++	0	0
338.14.3	+	+	0	0	0	0	0
338.15.5	+++	+++	++	0	0	0	+++
338.17.3	+++	++	+	0	0	++	0
338.24.5	+++	+	0	0	0	++	0
338.25.6	+++	+++	+++	0	0	0	0
338.28.6	+/-	0	0	0	0	0	0
338.29.2	+++	+++	0	+++	0	0	0
338.39.5	+++	+++	0	0	0	0	0
大鼠克隆							
272.19.1.1.4.2	+++	+++	+++	++	0	0	0
272.21.1.3.4.2	+++	+++	+	0	0	0	0
反应性:	无 (0)	弱 (+)	中等 (++)	强 (+++)	*用 INF- γ 没有观察到信号		+肽与卵清蛋白结合

[0194] 实施例 5. 竞争性表位建库研究

[0195] 进行表位建库实验以确定哪些抗 IL-21 单克隆抗体能够同时结合人 IL-21。以人和小鼠抗体两者作为代表。竞争抗原上的相同或部分重叠结合位点(表位)的抗 IL-21 单

克隆抗体不能同时结合并在功能上归类为同一家族或“表位仓”。不竞争抗原上的相同结合位点的抗 IL-21 单克隆抗体能够同时结合并在功能上归类为不同家族或“表位仓”。实验使用 BIACORE T100™ 设备进行。表位建仓实验用可溶性人 IL-21 (ZymoGenetics) 作为抗原进行。

[0196] 表位建仓研究在 Biacore T100™ 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行。使用 BIACORE T100™ 控制软件 1.1.1 版将方法程序化。各个抗 IL-21 单克隆抗体共价固定于 BIACORE CM4 传感器芯片的不同流动池上。随后,注入所述 IL-21 抗原并使其与固定在所述传感芯片上的单克隆抗体特异性结合。所述 **Biacore®** 设备测量结合于所述传感芯片表面上的蛋白质量,并且因此,在每轮检测中都验证测试对的第一抗体的固定化以及 IL-21 抗原与所述第一抗体的特异性结合。在所述 IL-21 抗原结合后,注入第二抗 IL-21 单克隆抗体并使其结合。如果第二抗 IL-21 单克隆抗体能够与第一单克隆抗体同时结合所述抗原,那么就会检测到所述芯片表面上的质量增加或者结合。然而,如果第二抗 IL-21 单克隆抗体不能与第一单克隆抗体同时结合所述抗原,那么就检测不到增加的质量或结合。每种抗 IL-21 单克隆抗体的检测都以其自身作为阴性对照来建立背景(无结合)信号水平。

[0197] 完成一系列实验以检测来自用人 IL-21 免疫的小鼠脾脏杂交瘤融合物纯化得到的抗 IL-21 单克隆抗体的结合性能。使用 EDC:NHS 将测试对的第一抗 IL-21 单克隆抗体共价固定至约 1000RU 的密度。将 IL-21 抗原稀释至 100nM 并使其从所固定抗体的表面上流过。随后,将测试对的第二抗体稀释至 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (约 32.2nM) 并使其与所捕获的 IL-21 抗原结合。检测作为第一抗体的抗 IL-21 单克隆抗体的一个亚组连同第二抗 IL-21 单克隆抗体的全组。在 25°C 下以 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ 的流速进行结合实验。这些研究的缓冲液由 10mM HEPES、0.3M NaCl、0.05% 表面活性剂 P20、5mM CaCl_2 、1mg / mL 牛血清清蛋白构成, pH 为 8.0。在两轮之间,用 20mM 盐酸再生所述芯片上的抗体。使用 BIACORE T100™ 评估软件 (1.1.1 版) 收集数据,然后载入到 EXCEL™ 中进行进一步数据处理。

[0198] 对纯化的抗 IL-21 单克隆抗体进行表征并分配给表位仓。BIACORE 报告的信号 (RU, 反应单位) 与所述传感器表面上的质量正相关。一旦建立与阴性对照关联的背景信号 (RU) 的水平(相同的抗 IL-21 单克隆抗体用作第一和第二抗体),建仓结果就被报告为阳性或阴性结合。阳性结合表明两种不同的抗 IL-21 单克隆抗体能够同时结合所述抗原。阴性结合表明两种不同的抗 IL-21 单克隆抗体不能同时结合所述抗原。在此实验中,阳性和阴性反应值之间的区别显著,并使得可将所述抗 IL-21 单克隆抗体明确分为 6 个不同的家族或表位仓。第一表位仓以来自例如克隆 338.5.4;362.78.1 和 362.597.3 的抗 IL-21 单克隆抗体为代表。第二表位仓以来自例如克隆 338.14.3;362.75.1.1 和 366.328.10 的抗 IL-21 单克隆抗体为代表。第三表位仓被发现与仓 #1 和仓 #2 抗体的结合表位部分重叠。其以来自例如克隆 366.552.11 的抗 IL-21 单克隆抗体为代表。在这三个仓的每一个中都发现了中和 IL-21 的抗体。

[0199] 也识别了其他三个表位仓。这些仓分别以来自例如杂交瘤克隆 366.345.6.11 (仓 #4)、338.28.6 (仓 #5) 和 338.39.5 (仓 #6) 的单克隆抗体为代表。这三个仓中识别的抗体不中和人 IL-21 的生物活性。

[0200] 实施例 6. 可溶性受体竞争研究

[0201] 进行竞争实验以确定何种抗 IL-21 单克隆抗体能够与所述 IL-21 可溶性受体同时

结合 IL-21。与所述可溶性受体竞争所述抗原上相同或部分重叠的结合位点（表位）的抗人 IL-21 单克隆抗体不能同时结合。不与所述可溶性受体竞争所述抗原上相同结合位点的抗人 IL-21 单克隆抗体能够同时结合。竞争实验用可溶性重组人 IL-21 作为抗原进行。使所述 IL-21 抗原结合所述单克隆抗体，然后再用 IL-21 可溶性受体进行竞争。在这些实验中使用两种 IL-21 可溶性受体（都由 ZymoGenetics 生产）进行单克隆抗体分析：一种受体由同源二聚受体（IL-21R-Fc）组成，其由与衍生自人免疫球蛋白的 Fc 分子融合的 IL-21 受体胞外结构域构成。第二种可溶性受体形式为异源二聚受体（IL-21R / γ c-Fc），其由包含与衍生自人免疫球蛋白的 Fc 分子融合的 IL-21 受体胞外结构域的一个亚基和包含与衍生自人免疫球蛋白的 Fc 分子融合的公共 γ 公共链胞外结构域的另一个亚基构成，如共有的美国专利 6,777,539 所述，该文献以引用的方式全文纳入本文中。

[0202] 竞争研究在 Biacore T100™ 系统（GE Healthcare, Piscataway, NJ）上进行。使用 BIACORE T100™ 控制软件 v1.1.1 将方法程序化。各个抗 IL-21 单克隆抗体共价固定于 BIACORE CM4 传感器芯片的不同流动池。随后，注入所述 IL-21 抗原（SEQ ID NO:2）并使其与固定在所述传感芯片上的单克隆抗体特异性结合。所述 **Biacore®** 设备测量结合于所述传感芯片表面上的蛋白质量，并且因此，在每轮检测中都验证第一抗体的固定化以及 IL-21 抗原与所述第一抗体的特异性结合。在所述 IL-21 抗原结合后，注入所述可溶性受体并使其结合。如果所述可溶性受体能够与第一单克隆抗体同时结合所述抗原，那么就会检测到所述芯片表面上的质量增加或者结合。然而，如果所述可溶性受体与第一单克隆抗体不能同时结合所述抗原，那么就检测不到增加的质量或结合。每种抗 IL-21 单克隆抗体的检测都以其自身作为阴性对照来建立背景（无结合）信号水平。作为阳性对照，每种抗 IL-21 单克隆抗体都对不同表位仓的抗 IL-21 抗体进行检测以测定阳性（结合）信号水平。

[0203] 完成一系列实验以检测 5 种结合人 IL-21 的纯化抗 IL-21 单克隆抗体（来自杂交瘤细胞克隆 362.78.1、366.75.1.1、366.328.10、366.552.11.31 和 366.345.6.11）的结合性能。使用 0.4M EDC[N-乙基-N'-(3-二乙氨基丙基)碳二亚胺]和 0.1M NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的混合物将测试对的第一抗 IL-21 单克隆抗体共价固定至约 1000RU 的密度。固定抗体后，用 1M 乙醇胺封闭所述流动池上的活性位点。将所述 IL-21 抗原稀释至 100nM 并使其从所固定抗体的表面上流过。随后，将可溶性受体稀释至 10 μ g / mL 并使其与所捕获的 IL-21 抗原结合。在 25℃ 下以 30 μ L / min 的流速进行结合实验。这些研究的缓冲液由 10mM HEPES、0.3M NaCl、0.05% 表面活性剂 P20、5mM CaCl₂、1mg / mL 牛血清清蛋白构成，pH 为 8.0。在两轮之间，用 20mM 盐酸洗涤所述流动池以再生所述表面。此洗涤步骤从所固定的抗体表面除去所述 IL-21 抗原和任何结合的可溶性受体，并使其可随后结合下一个测试样品。使用 BIACORE T100™ 评估软件（1.1.1 版）收集数据。

[0204] 纯化的抗 IL-21 单克隆抗体的特征在于其与所述人 IL-21 可溶性受体竞争结合所述 IL-21 抗原的能力。BIACORE 报告的信号（RU，反应单位）与所述传感器表面上的质量正相关。一旦建立与阴性对照关联的背景信号（RU）的水平（相同的抗 IL-21 单克隆抗体用作第一和第二抗体），竞争结果就被报告为阳性或阴性结合。阳性结合表明所述抗 IL-21 单克隆抗体和 IL-21 可溶性受体能够同时结合所述抗原。阴性结合表明所述抗 IL-21 单克隆抗体和所述 IL-21 可溶性受体不能同时结合所述抗原。在此实验中，阳性和阴性反应值之间的区别显著，并使得可清楚地确定所述抗 IL-21 单克隆抗体与 IL-21 可溶性受体之间的

竞争。

[0205] 来自杂交瘤细胞克隆 362.78.1 和 366.552.11.31 的单克隆抗体与所述两种 IL-21 可溶性受体（同源二聚 IL-21R-Fc 和异源二聚 IL-21R / γ c-Fc）都竞争结合所述人 IL-21 抗原。来自杂交瘤细胞克隆 366.328.10 和 366.345.6.11 的单克隆抗体不与所述可溶性受体的任何一种竞争结合所述抗原。来自杂交瘤细胞克隆 362.75.1.1 的单克隆抗体显示出与两种形式可溶性受体的部分竞争结合。这些研究是用预先结合于所述单克隆抗体的 IL-21 抗原进行的。这些抗体中的三种（362.78.1、366.328.10、366.552.11.31）已被证明可中和人 IL-21，而来自杂交瘤细胞克隆 362.75.1.1 和 366.345.6.11 的单克隆抗体非常微弱地中和或者不中和人 IL-21 的生物活性，这取决于测定方法。

[0206] 实施例 7. IL-21Baf3 / huIL-21R STAT3 生物活性测定

[0207] 下面的磷酸化 -STAT3 生物测定用作初次筛选，以测量小鼠血清中的中和抗 IL-21 的滴度以及杂交瘤上清液和纯化抗 IL-21 抗体中和 IL-21 的相对水平。通过测量 Baf3 / KZ134 / huIL-21R 细胞中配体 - 受体相互作用后的 STAT3- 磷酸化水平而测定 IL-21 活性（参见 Spolski and Leonard, *Annu Rev Immunol.* Nov8 ;2007）。使用 IL-21 的 EC₅₀ 浓度和拮抗剂的滴定，基于磷酸化 -STAT3 水平的下降而测定相对中和活性。

[0208] 用测定培养基（含有 5% 胎牛血清、1x Glutamax、1% 丙酮酸钠和 2 μ M β - 巯基乙醇的 RPMI1640；都来自 Invitrogen, Carlsbad, CA）将 Baf3 / KZ134 / huIL-21R 细胞洗涤两次，然后以 40000 细胞 / 孔接种于 96 孔圆底组织培养板中（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）。将细胞置于 37°C 组织培养箱中，同时制备测试溶液。为在此测定中测定 EC₅₀ 和 EC₉₀ 浓度，在测定培养基中制备重组人 IL-21 的连续稀释液并接种于单独的 96 孔 U 底板中。或者，为检测对 IL-21 的中和作用，用由 IL-21 免疫接种的小鼠血清、用过的杂交瘤细胞培养基、纯化的可溶性人 IL-21R / γ c-Fc 或纯化的单克隆抗 IL-21 抗体的连续稀释液预孵育 EC₅₀ 浓度的 IL-21（经测定为 33pM）。然后将所述细胞板和所述溶液板都于湿润的组织培养室中孵育以在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下平衡 30 分钟。30 分钟后，将所述 IL-21 溶液转移到所述细胞板中并在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下孵育 10 分钟启动反应。

[0209] 孵育 10 分钟后，将所述板置于冰上并向每孔中加入 125 μ L 冰冷的细胞洗涤缓冲液（BIO-PLEX 细胞裂解试剂盒，BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA）以停止反应。然后将细胞在 4°C 下以 1500rpm 离心 5 分钟，然后吸出培养基。为裂解细胞，向每孔中加入 50 μ L / 孔的裂解缓冲液（根据 BIO-RAD Labs 的说明书制备）。然后在冰上将细胞裂解物用移液器吹吸 5 次，然后在 4°C 下在微孔板平台摇床上以 600rpm 摇动 20 分钟。然后将板在 4°C 下以 3000rpm 离心 20 分钟。收集上清液并转移到新的微量滴定板中，与测定缓冲液（BIO-RAD）以 1 : 1 混合并保存在 -20°C 下。

[0210] 根据产商说明书稀释捕获小球（BIO-PLEX Phospho-STAT3 Assay, BIO-RAD Laboratories）并置于 96 孔过滤板（Millipore Corporation, Ireland）中。用洗涤缓冲液（BIO-RAD）将板洗涤两次，然后向每孔中转移 50 μ L 细胞裂解混合物。然后用铝箔将每块板包裹起来并在室温下以 300rpm 摇动过夜。第二天，将所述板转移到微量滴定真空设备中并用洗涤缓冲液洗涤两次。以 25 μ L / 孔加入检测抗体（BIO-RAD）后，将所述铝箔包裹的板在室温下以 300rpm 摇动孵育 30 分钟。将所述板过滤并用洗涤缓冲液洗涤两次。加入链霉抗生物素蛋白 -PE（BIO-RAD, 50 μ L / 孔），然后将所述铝箔包裹的板在室温下以

300rpm 摇动孵育 15 分钟。将所述板过滤并洗涤两次,重悬浮在 125 μ L / 孔的小球重悬浮缓冲液 (BIO-RAD) 中。然后使用阵列读数器 (BIO-PLEX, BIO-RAD Laboratories) 根据厂商说明书评定磷酸化-STAT3 的水平。数据使用分析软件 (BIO-PLEX MANAGER3.0, BIO-RAD Laboratories) 进行分析。裂解物中的磷酸化 STAT3 转录因子水平的升高表明发生了 IL-21 受体-配体相互作用。对于中和测定,裂解物中的磷酸化 STAT3 转录因子水平的降低表明出现了对 IL-21 受体-配体相互作用的中和作用。在中和测定中,IC₅₀ (抑制 50% 配体活性的拮抗剂浓度) 值使用 **GraphPad Prism**[®] 4 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA) 进行计算,并表示为每种试剂的摩尔浓度。

[0211] 人 IL-21 以剂量依赖的方式诱导 STAT3 磷酸化,且测得 EC₅₀ 浓度为大约 33pM。表 7 汇总了阳性对照 (可溶性人 IL-21R / γ c-Fc 融合蛋白) 和本文所述 IL-21 中和实体的 IC₅₀ 值。这些数据表明,IL-21 中和抗体在降低 IL-21 诱导的 STAT3 磷酸化方面具有活性并且相当于或优于阳性对照。

[0212] 表 7:STAT3-磷酸化测定中的 IC₅₀ 值

[0213]

	IC ₅₀ (pM) 实验 #1	IC ₅₀ (pM) 实验 #2	IC ₅₀ (pM) 实验 #3*
可溶性 hIL-21R/ γ c-Fc	25	102	140.2
IL-21 mAb 克隆 #			
362.75.1	无中和		
362.78.1	14	60	
362.78.1.44		41	66.7
362.78-CHO (A2162F)			42.0
366.328.10.63	210		
366.552.11.31	59		
366.617.7	69		
366.345.6.11	弱		

[0214] * - 实验 3 使用 96pM IL-21 进行

[0215] 实施例 8. IL-21Baf3 / huIL-21R STAT- 荧光素酶生物活性测定

[0216] 此 24 小时测定测量 Baf3 / KZ134 / huIL-21R 转染细胞中 IL-21 诱导的 STAT- 荧光素酶活性。用测定培养基 (含有 5% 胎牛血清、1x Glutamax、1% 丙酮酸钠和 2 μ M β - 巯基乙醇的无酚红 RPMI1640; 都来自 Invitrogen, Carlsbad, CA) 将 Baf3 / KZ134 / huIL-21R 转染细胞洗涤两次,然后以 40000 细胞 / 孔接种于 96 孔平底不透明白色培养板中 (Corning / Costar, Lowell, MA)。然后将细胞置于组织培养箱中,同时制备测试溶液。在单独的板中,将人 IL-21 与培养基或一系列 IL-21 拮抗剂 (单克隆抗体或可溶性人 IL-21 受体 / γ c-Fc) 混合。一旦混合,也将此板转移到湿润的 37°C 组织培养箱中。30 分钟后,将所述测试溶液转移到所述细胞板中并混合。然后将此板放回培养箱中 24 小时。24 小时后,

从培养箱中取出所述细胞并使其冷却至室温。然后将每孔用 100 μ L 体积的 Steady-Glo 荧光素酶试剂 (Promega, Madison, WI) 以 1 : 1 稀释并充分混合。覆盖所述板, 在室温下摇动 10 分钟, 然后在光度计上测量相对荧光素酶单位 (RLU)。

[0217] 为在此测定中测定 IL-21 的 EC_{50} 和 EC_{90} 浓度, 对 0-100ng / mL 的重组 IL-21 的连续稀释液进行了检测。IL-21 的 EC_{90} 浓度——约 15ng / mL (961pM)——被用于后续中和实验中。在这些实验中, 克隆 362. 78. 1 (及其亚克隆 362. 78. 1. 44 和 CHO- 表达的对应物 362. 78-CHO; 见实施例 1) 和 362. 328. 10. 63 表明了最强的抗 IL-21 活性, 其中 IC_{50} 浓度为 300-850pM, 而所述可溶性人 IL-21 受体 / γ c-Fc 对照的 IC_{50} 值为 650-1830pM。本文所述的中和实体的相对活性汇总于表 8。

[0218] 表 8 : 24 小时 STAT- 荧光素酶测定中的 IC_{50} 值

[0219]

	IC_{50} (pM) 实验 #1	IC_{50} (pM) 实验 #2	IC_{50} (pM) 实验 #3
可溶性 hIL-21R/ γ c-Fc	650-850	1830	
IL-21 mAb 克隆#			
362.75.1	无中和		
362.78.1	400	775	760
362.78.1.44		850	
362.78CHO (A2162F)			533
366.328.10.63	300-500		
366.552.11	2400		
366.617.7	6360		
366.345.6.11	3184		

[0220] 实施例 9. 与食蟹猴、小鼠或大鼠 IL-21 活性的交叉反应

[0221] 当研发治疗性拮抗剂时, 在临床前药理学 / 毒理学研究之前完成物种交叉反应研究 (尤其对于非人灵长类交叉反应) 是很重要的。为测定本文所述的抗人 IL-21 中和实体能否与食蟹猴 IL-21、小鼠 IL-21 或大鼠 IL-21 发生交叉反应, 并中和由其引起的活性 (并因此判断食蟹猴、小鼠和 / 或大鼠可否作为可行的试验物种), 首先必须证明重组的食蟹猴、小鼠和大鼠 IL-21 的生物活性。使用实施例 8 中所述的 IL-21STAT- 荧光素酶活性测定方法来测定重组的人 IL-21、食蟹猴 IL-21、小鼠 IL-21 和大鼠 IL-21 (全部由 ZymoGenetics 生产) 的 EC_{50} 和 EC_{90} 值。结果表明, 在此测定中, 由人、食蟹猴和小鼠 IL-21 诱导的 STAT- 荧光素酶活性水平非常不同。用于后续实验的 EC_{90} 值测得如下: 人 IL-21, 961pM; 食蟹猴 IL-21, 102pM; 小鼠 IL-21, 6. 41nM; 大鼠 IL-21, 1. 08nM。IL-21 可溶性受体 (hIL-21R / γ c-Fc) 中和了食蟹猴、小鼠和大鼠 IL-21 的效果。

[0222] 加入表 9 中所示的纯化抗 IL-21 单克隆抗体可以不同的程度中和食蟹猴 IL-21, 但不能中和小鼠或大鼠 IL-21 (注意针对大鼠 IL-21 只检测了 362. 78-CHO 和 366. 552. 11)。

由本文所述中和实体中和食蟹猴 IL-21 的 IC_{50} 值为约 100-431pM, 如表 9 所汇总。应注意, 最好的人 IL-21 中和抗体全部能够有效地中和食蟹猴 IL-21, 但不能中和小鼠 IL-21 或大鼠 IL-21。此外, 使用浓度为 800pM 的食蟹猴 IL-21 在单独实验中检测了 CHO 细胞产生的 IL-21mAb (362.78-CHO)。

[0223] 表 9: 在 STAT- 荧光素酶测定中 hIL-21 拮抗剂与食蟹猴、小鼠和大鼠 IL-21 的交叉反应

[0224]

	食蟹猴 IL-21 IC_{50} ([cIL-21] = 100 pM)		小鼠 IL-21 IC_{50} ([mIL-21] = 6.41 nM)		大鼠 IL-21 IC_{50} ([rIL-21] = 1.08 nM)	
	ng/mL	摩尔浓度	ng/mL	摩尔浓度	ng/mL	摩尔浓度
可溶性 hIL-21R/yc-Fc	20	385 pM	425.8	8.06nM	707.5	13.4 nM
<i>IL-21 mAb 克隆:</i>						
362.75.1	弱	--	无	无	N/T	N/T
362.78.1	60	400 pM	无	无	N/T	N/T
362.78-CHO (A2162F)*	255	1.7 nM	无	无	无	无
366.328.10	15	100 pM	无	无	N/T	N/T
366.552.11	23	156 pM	无	无	无	无
366.617.7	65	431 pM	无	无	N/T	N/T

[0225] * - 注意: 使用 800pM 的 cIL-21 浓度而非在其他实验中所用 100pM 来检测克隆 362.78-CHO (实施例 1b)。N / T = 未检测。

[0226] 实施例 10. 在基于细胞的测定中对与 IL-4 的可能交叉反应的评估

[0227] 当开发治疗性细胞因子拮抗剂时, 知晓其是否会与结构上相关的细胞因子发生交叉反应以及是否会中和所述因子是很重要的。设计此原代 B 细胞增殖测定旨在检测本文所述的 IL-21 中和实体与人 IL-4 的交叉反应和中和作用。

[0228] 原代 B 细胞的分离: 为获得原代 B 细胞, 从健康的人类志愿者采集 200mL 外周血 (ZymoGenetics)。用室温 PBS 将血液稀释至 400ml 并在 50ml 的圆锥形试管中分成 35ml 的等分试样。将 14ml 室温 Ficoll / Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 置于下部并将所述试管以 2000rpm 离心 20 分钟。吸出 PBMC 界面层并用 MACS 缓冲液 (PBS, 20mM HEPES 和 1% BSA; Invitrogen, Carlsbad, CA) 洗涤两次。对细胞进行计数并使用 Miltenyi Biotec (Auburn, CA) 的 B 细胞分离试剂盒按照厂商概述的方案负向选择 B 细胞。通过 FACS 分析对所纯化 B 细胞的一个小样品进行纯度检测, 发现在全部实验中 $CD19^+B$ 细胞的纯度都 >97%。

[0229] 增殖测定: 响应于 IL-4 与固定化抗 IgM 的共培养的 B 细胞增殖。为测定抗 IL-21mAb 与 IL-4 的可能交叉反应和中和作用, 首先将之前分离的 B 细胞以 40000-50000 细胞 / 孔置于被 $1.0 \mu g / mL$ 的抗 IgM (Southern Biotech, Birmingham, AL) 预包被的 96 孔 U 底组织培养板 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中。然后用 $10ng / mL$ 重组人 IL-4 (R&D Systems; Minneapolis, MN) 和 IL-21 拮抗剂 (测试抗体或对照) 的系列滴定液处理所述细胞。然后在湿润的组织培养箱中将所述细胞在 $37^{\circ}C$ 和 5% CO_2 的条件下孵育 3 天。三天后, 用 $1 \mu Ci / 孔$ 的 $[^3H]$ - 胸腺嘧啶核苷 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 对所述细胞进行脉冲处理。16 小时后, 将所述细胞采收到玻璃纤维滤器中并使用 β 计数器 (Topcount NXT, Packard) 定量 $[^3H]$ - 掺入量。检测的三种抗 IL-21 单克隆抗体 (362.78.1、

366.328.10.6 和 366.552.11.31) 在摩尔过量最多至 250 倍的情况下均未显示出对 IL-4 诱导的增殖的任何中和作用。

[0230] 实施例 11

[0231] 11A. 在基于细胞的测定中对与 IL-2 和 IL-5 的可能交叉反应的评估

[0232] 当开发治疗性细胞因子拮抗剂时,测定其是否会与结构上相关的细胞因子发生交叉反应以及是否会中和所述因子是很重要的。小鼠 T 细胞系 CTLL-2 可应答人 IL-2 或 IL-15 而被诱导增殖。因此,选择此测定以检测本文所述的 IL-21 中和实体与人 IL-2 和 IL-15 的交叉反应和中和作用。

[0233] 在增殖生物测定培养基 (RPMI1640、2x Glutamax、10% FBS、2xNaPyr、1x β -巯基乙醇和 20mM Hepes;Invitrogen, Carlsbad, CA) 将 CTLL-2 细胞洗涤三次,然后以 50000 细胞/孔置于 96 孔圆底组织培养板中 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。向这些细胞中加入预定 EC_{90} 剂量的 IL-2 (3.0ng / mL) 或 IL-15 (0.5ng / mL) 连同 IL-21 中和实体的连续稀释液。细胞因子与抗体的比例的范围是从摩尔过量 250 倍到比例 1 : 1。抗 IL-2 或抗 IL-15 中和抗体 (都来自 R&D Systems, Minneapolis, MN) 用作阳性对照。然后在湿润的组织培养箱中将所述细胞在 37°C 和 5% CO_2 的条件下孵育 24 小时。24 小时后,用 1 μ Ci / 孔的 [3H]-胸腺嘧啶核苷 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 对所述细胞进行脉冲处理。16 小时后,将所述细胞采收到玻璃纤维滤器中并使用 β 计数器 (Topcount NXT, Packard) 定量 [^{3} H]-掺入量。

[0234] 结果:检测的三种抗 IL-21 单克隆抗体 (362.78.1、366.328.10.6 和 366.552.11.31) 都未显示出对 IL-2 或 IL-15 诱导的增殖的任何中和作用。

[0235] 11B. 使用表面等离子体共振 (Biacore) 确认 IL-21mAb362.78-CHO 不结合 IL-21 相关的人细胞因子 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 或 IL-15。

[0236] 通过表面等离子体共振评估抗 IL-21mAb362.78-CHO 与人 IL-2、人 IL-4、人 IL-7、人 IL-9 和人 IL-15 的可能的交叉反应性。

[0237] 材料和方法:完成实验以检测抗 IL-21 单克隆抗体 362.78-CHO 与人 IL-2、人 IL-4、人 IL-7、人 IL-9 和人 IL-15 的交叉反应性。结合研究在 Biacore T100™ 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行。使用 BIACORE T100™ 控制软件 2.0 版将方法程序化。山羊抗人 IgG Fc- γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 使用胺偶联化学试剂 (EDC:NHS) 共价固定于 CM4 传感器芯片的流动池 1 和 2。随后纯化的抗 IL-21 单克隆抗体 362.78-CHO 被捕获到所述传感器芯片的流动池 2 上,密度为约 240RU。流动池 1 用作参照表面。

[0238] 将 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 (全部购自 R&D Systems, Minneapolis, MN) 以 100、20 和 4nM 的浓度注入到所捕获的抗体表面 (流动池 2) 和所述参照流动池 (流动池 1) 上。作为此组实验的阳性对照,IL-21 (由 ZymoGenetics 生产) 也以同样的密度被注入。结合研究以 25 μ L / min 的流速进行,结合时间为 2 分钟,离解时间为 3 分钟。所有结合实验都在 25°C 下在 10mM HEPES、300mM NaCl、5mM $CaCl_2$ 、0.05% 表面活性剂 P20 (Biacore)、1mg / mL 牛血清清蛋白, pH8.0 的缓冲液中进行。在两轮之间,用 20mM 盐酸洗涤所述流动池以再生所述表面。这一洗涤步骤从所述芯片表面上除去了捕获的 362.78-CHO 抗体和任何结合抗原。使用 BIACORE T100™ 评估软件 (2.0 版) 收集数据。通过扣除流动池和空白

注射参照值对数据进行处理。对基线稳定性进行评估以确保所述再生步骤在整组注射中都提供一致的结合表面。

[0239] 结果:未观察到 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 或 IL-15 与 362.78-CHO 抗体的结合。相反,所述 IL-21 阳性对照表现出与之前的研究一致的剂量依赖性结合。

[0240] 交叉反应性的缺少随后通过对克隆 362.78 的表位作图研究(见实施例 17)解释。显示被克隆 362.78 结合的位于和接近 IL-21 的 D 螺旋的氨基酸(EKKPPKEFLERFKSLL;SEQ ID NO:2 的残基 129-144)在相关人 γ 链细胞因子中和小鼠 IL-21 中都不是非常保守的,如下表 10 所示。

[0241] 表 10

[0242]

```

IL21_人  -----TCPSCDSYEKK--PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSTHGSEDS
IL21_小鼠 -----KCPSCDSYEKR--TPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS
IL15_人  -----CKECEEELEEK--NIKEFLQSFVHVHIVQMFINITS
IL2_人   -----TTFMCEYADET-ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
IL4_人   ---GLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
IL7_人   ----SLEENKSLKEQKK-LNDLCFLKRLQLQEIKTWCWNKILMGTKHEH
IL9_人   -----CEQPCNQTTAG--NALTFLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI

```

[0243] IL-21_人如 SEQ ID NO:2 所示;IL-21 小鼠如 SEQ ID NO:11 所示;IL-15_人如 SEQ ID NO:92 所示;IL-2_人如 SEQ ID NO:93 所示;IL-4_人如 SEQ ID NO:94 所示;IL-7_人如 SEQ ID NO:95 所示;IL-9_人如 SEQ ID NO:96 所示。

[0244] 实施例 12. B 细胞增殖测定

[0245] 原代 B 细胞测定

[0246] 为进一步检测所述 IL-21 中和实体的活性,建立了两个原代 B 细胞测定。所述 B 细胞增殖测定用于证明 4 天期间对 IL-21 诱导的增殖的中和作用,B 细胞分化测定表明了 8 天期间对 IL-21 诱导的浆细胞分化的中和作用。这些实验表明了 IL-21 在长期的生物学相关测定中的中和作用。

[0247] 人原代 B 细胞的分离:为获得原代 B 细胞,从健康的人类志愿者采集 200mL 外周血(ZymoGenetics)。用 200ml 的室温 PBS 稀释血液并在 50ml 的圆锥形试管中分成 35ml 的等分试样。将 14ml 室温 Ficoll / Hypaque(Pharmacia,Uppsala,Sweden)置于下部并将所述试管以 2000rpm 离心 20 分钟。吸出 PBMC 界面层并用 MACS 缓冲液(PBS,20mM HEPES 和 1% BSA;Invitrogen,Carlsbad,CA)洗涤两次。对细胞进行计数并使用 Miltenyi Biotec(Auburn,CA)的 B 细胞分离试剂盒按照厂商概述的方案负向选择 B 细胞。通过 FACS 分析对所纯化 B 细胞的一个小样品进行纯度检测,发现在全部实验中纯度都 >97%。

[0248] 增殖测定:与抗 CD40 和 IL-21 的共培养引起 B 细胞增殖。为测定所述抗 IL-21mAb 的中和活性,将 B 细胞以 40000-50000 细胞 / 孔置于 96 孔 U 底组织培养处理板(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。然后用 0.1 μ g / mL 的抗 CD40(山羊抗人 CD40 多克隆;R&D Systems;Minneapolis, MN)、50ng / mL(3.21nM)的重组 IL-21(ZymoGenetics,

A1207F) 和 IL-21 拮抗剂 (测试 mAb 或对照) 的滴定液来处理所述细胞。然后在湿润的组织培养箱中将所述细胞板在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下孵育 3 天。三天后,用 1 μ Ci / 孔的 [3H]- 胸腺嘧啶核苷 (Amersham Biosciences,Piscataway,NJ) 对所述细胞进行脉冲处理。16 小时后,将所述细胞采收到玻璃纤维滤器中并使用 β 计数器 (Topcount NXT, Packard) 确定 [3H]- 掺入量。计算测量对 IL-21 诱导的增殖的有效中和的 IC₅₀ 曲线并将其表达为摩尔浓度。本文所述的最好的中和 mAb 的 IC₅₀ 值的范围为约 0.71nM-6.55nM,如表 11 所汇总。

[0249] 表 11 :B 细胞增殖测定中对 IL-21 的中和作用

[0250]

IL-21 拮抗剂	IC ₅₀ (nM)
可溶性 hIL-21R / γ c-Fc	3.5
362.75.1	无中和
362.78.1	1.17
366.328.10	0.71
366.552.11	4.75
366.617.7	6.55

[0251] B 细胞分化测定 :当 IL-21 与抗 CD40 和 IL-4 联合时,在体外非常有助于使幼稚 B 细胞分化为抗体生产浆细胞 (Ettinger et al., J Immunol. 175 :7867-79,2005 ; Ettinger et al, J Immunol. 178 :2872-82,2007 ;Kuchenet al. J Immunol. 179 :5886-96,2007)。为在比实施例 7 和 8 中所述的两个基于 Baf3 的筛选测定更长期的测定中证明活性,使用本文所述的中和实体来中和 IL-21 并抑制人浆细胞分化。为达成此目的,将原代 B 细胞以 150000 细胞 / 孔置于 96 孔平底组织培养处理板 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中。然后用 0.1 μ g / mL 的抗 CD40 (山羊抗人 CD40 多克隆 ;R&D Systems ; Minneapolis, MN)、10ng / mL 的重组人 IL-4 (R&D Systems) 和 25ng / mL (1.6nM) 的重组人 IL-21 (ZymoGenetics) 来处理所述细胞。然后加入 IL-21 拮抗剂 (测试 mAb 或对照) 并将所述细胞板在湿润的组织培养箱中在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下孵育 8 天。在 8 天结束时,收集条件培养基 (用于抗体滴度) 并使细胞沉淀以用于后续流式细胞术分析。

[0252] 使用流式细胞术进行的 B 细胞分析 :将细胞重悬浮于人 FACS 缓冲液 (HBSS、20mM HEPES、1% BSA (都来自 Invitrogen) 和 2% 人 Ab 血清 (Gemini Bio-Products, Woodland, CA)) 5 分钟以封闭 Fc 受体。然后将细胞离心 (1200rpm, 5 分钟) 并吸出上清液。通过用人 FACS 缓冲液以 1 : 100 稀释抗体并在每个样品中加入 100 μ L 制备染色物。使用下面的抗体制备单一染色物 (用于调整细胞仪补偿设置) 和多重染色物混合物 :抗 CD138-FITC、抗 IgD-PE、抗 CD38-PE-Cy5.5 和抗 CD19-APC。浆细胞被定义为大的 (通过前向光散射仪评定) CD19⁺、IgD^低、CD38⁺ 和 CD138⁺ 细胞。浆细胞相对总 B 细胞的百分比用于测定本文所述的中和实体的有效性。

[0253] 结果 :当 IL-21 与 IL-4 和抗 CD40 联合时,在第 8 天大约 50% 活的大 B 细胞为 IgD

低、CD138⁺浆细胞。若无 IL-21, 浆细胞的比例约为所述大 B 细胞的 8%。向含有 IL-21 的培养物中加入不同的 IL-21 拮抗剂以剂量依赖的方式降低了浆细胞的比例。克隆 362.78.1 是最有效的中和剂, 在 10 : 1 和 2.5 : 1 的拮抗剂 : 配体比例下几乎完全中和 IL-21 活性。其他测试抗体克隆 366.328.10.63 和 366.552.11.31 对中和 IL-21 驱动的分化的有效性类似。此数据汇总于表 12。

[0254] 表 12 : 通过中和抗 hIL-21mAb 对人浆细胞分化的抑制

	拮抗剂 : 配体比例			
	10:1	2.5:1	0.6:1	0.16:1
IL-21 拮抗剂	IgD-低、CD138 ⁺ 浆细胞%			
[0255] 362.78.1	13.7	15.5	34.1	42.8
366.328.10.63	15.4	20.2	41.4	52.1
366.552.11.31*	15.4	26.4	44.8	50.3
IL-21 受体	23.4	41.7	54.2	66.7

[0256] * 注意克隆 366.552.11.31 的实际拮抗剂 : 配体比例为 14.4、3.6、0.9 和 0.22 : 1

[0257] 实施例 13. DTH 小鼠模型

[0258] DTH 反应是由 CD4⁺T 细胞启动并由 T 细胞、中性白细胞和巨噬细胞介导的经典免疫反应。DTH 反应是 CD4⁺T 细胞介导的反應的良好指标。用在两种佐剂——完全弗氏佐剂 (CFA ;Sigma) 或 Ribi (Sigma ;aka MPL+TDM+CWS 佐剂)——的任何一种中的鸡卵清蛋白 (OVA) 经皮下免疫接种小鼠。此阶段称为敏化阶段 (第 0-6 天)。7 天后对耳进行测量。然后对小鼠的耳注射对照 PBS (左耳) 或 OVA (右耳)。此阶段称为攻击阶段 (第 7-8 天)。对 OVA 产生的免疫应答引发耳中的炎症, 造成 OVA 处理的耳在 24 小时内耳厚度增加, 但 PBS 处理的耳未增厚。这是使用卡尺测量的。

[0259] 用总体积为 200 μ l 的在 CFA 中乳化的 100 μ g 鸡卵清蛋白 (OVA) 在背部免疫接种 C57BL / 6 小鼠 (n=8 / 组)。如果用 Ribi 代替 CFA, 那么向一个 RIBI 小瓶中加入 0.5mg / ml 的鸡卵清蛋白, 然后剧烈震荡 2 分钟以形成用于注射小鼠的乳液。免疫接种 7 天后, 用 10 μ l PBS 注射小鼠的左耳 (对照) 并用体积为 10 μ l 的溶于 PBS 中的 10 μ g OVA 注射小鼠的右耳。在注射前测量了全部小鼠的耳厚度 (0 测量)。攻击 24 小时后再次测量耳厚度。计算 0 测量和 24 小时测量之间的耳厚度的差值, 此差值反映了耳中的炎症。在第 0-6 天 (敏化阶段) 或是在第 7-8 天 (攻击阶段) 对分组小鼠腹膜内注射 PBS 或不同浓度的抗 IL-21 抗体。在第 7 和第 8 天, 注射 2 小时后测量 0 和 24 小时时间点的耳厚度。在 24 小时结束时, 一旦测量了耳厚度, 就将该耳切下并置于福尔马林中用于组织学分析。

[0260] 实施例 14. 多发性硬化症的小鼠模型

[0261] 为检测抗 IL-21 是否对多发性硬化症具有作用, 检测了抗 IL-21 抗体抑制实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE-MS)——一种 MS 小鼠模型——的能力。使用了良好表征的 T 细胞依赖性髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 35-55 肽在 C57BL / 6 小鼠中的免疫接种模型。进

行所述试验以确定抗 IL-21 抗体可通过抑制 DC 介导的抗原呈递或通过增强 CD8T 细胞反应而延缓和 / 或抑制 EAE 中的疾病情况。在此模型中高效 CD8T 细胞反应的缺乏使 EAE 恶化 (Malipiero et.al., *Eur. J. Immunol.*, 27:3151-3160, 1997)。EAE 模型中以剂量依赖的方式延缓疾病发作表明使用抗 IL-21 抗体可能对 MS 有益。

[0262] EAE 是一种 MS 小鼠模型。在一个这样的模型中,用在 CFA 佐剂中乳化的 100 μ g MOG 肽 (MOG35-55) 或 100 μ g 重组 MOG 蛋白免疫接种 C57BL / 6 小鼠。将 2ml 的 MOG35-55 在 PBS 中的 0.5mg / ml 制剂加入到 CFA 小瓶中并剧烈震荡以将所述溶液乳化,或者制备重组 MOG 和 CFA 的比例为 1 : 1 的配制液。将小鼠的背部剃毛,然后在小鼠的背部皮下注射 100 μ g MOG / CFA。免疫前 2 天和免疫后每天对小鼠称重。然后在第 2 天对小鼠静脉内注射 200 μ l 百日咳毒素 (PT),终浓度为 200ng / 小鼠。每天监测小鼠以进行临床评分。在第 0-20 天对分组小鼠腹膜内注射 200 μ l PBS、体积为 200 μ l 的 100 μ g BSA 和体积为 200 μ l 的 10-200 μ g 抗 IL-21 抗体;或者一周注射 3 次,共注射 3 周。对小鼠的重量、临床评分和发病率进行评估并作图以进行分析。

[0263] 实施例 15:抗 mIL-21 抗体在 T 细胞过继转移结肠炎和银屑病小鼠模型中降低疾病发生率并延缓疾病发展

[0264] 将幼稚 T 细胞过继转移到较低组织相容性不匹配或同系免疫缺陷的小鼠中导致结肠炎 (Leach MW et al 1996, Powrie F et al, 1997) 以及类似银屑病的皮肤损伤 (Schon MP et al., *Nat Med.* 2:183-8, 1997; Davenport CM et al., *Int Immunopharmacol.* 5: 653-72, 2002) 的发生。将少至 0.2×10^6 BALB / C 或 B10.D2 小鼠的 CD4+CD25-T 细胞转移到免疫缺陷的 C.B-17SCID 小鼠中导致体重减轻、潜血检测阳性大便和皮肤损伤的发生。这些小鼠的症状在群与群之间不同。

[0265] 该结肠炎 / 银屑病模型与人类克罗恩病和银屑病有某些相似性,已被广泛用于检测疗法对人类中这些疾病的效力。对于此实验,小鼠 (8B10.D2 雌性小鼠供体; 50C.B-17SCID 雌性小鼠受体) 分别从 Jackson Laboratories 或 Charles River Laboratories 获得。从 8B10.D2 小鼠中收集脾脏。使用本领域已知的标准方法从合并的脾脏中分离 CD4+CD25-T- 细胞。用流式细胞术评估 T 细胞群的纯度。

[0266] 在第 0 天通过静脉内注射使首次用于实验的 C.B-17SCID 小鼠接受 5×10^5 CD4+CD25-T 细胞 (从 B10.D2 小鼠的脾脏分离)。全部小鼠每周称重至少 5 次并仔细观察重量减轻,这可能与结肠炎有关。此外,每周至少一天进行结肠炎临床评分 (粪便坚硬度 and 粪便中的血)。每周还仔细监测小鼠至少 5 天并且对银屑病的症状 (毛发脱落、抓挠、秃顶等) 打分。

[0267] 从第 0 天开始给予分组小鼠大鼠抗小鼠 IL-21 (mIL-21) 抗体——一种大鼠同种型对照抗体——或载体 (PBS)。所述处理通过腹膜内注射递送,每周两次,给予的抗体量为每只小鼠每剂 0.2-0.8mg。也可使用类似的给药方案或其他给药途径来递送。在抗 IL-21 抗体组中每组有 9-10 只小鼠,在同种型对照抗体组中每组有 6-7 只小鼠,在 PBS 组中每组有 10 只小鼠。此给药方案也称为“预防性给药”。

[0268] 在单独的实验中,与上述相同抗体和剂量给药的小鼠组 (每组 10 只小鼠) 在细胞转移后第 12 天开始处理,第 12 天大约是所述小鼠开始表现银屑病和 / 或结肠炎症状的时间。此给药方案称为“治疗性给药”。

[0269] 在此研究的最后（第 45 天），取出结肠组织作为结肠炎的组织学证据并采集血清用于细胞因子和趋化因子水平的分析。

[0270] 预防性给药的结果：接受 0.2 和 0.8mg 剂量的抗 mIL-21 抗体的小鼠的特征为：在整个实验期间，与接受 PBS 或 0.2mg 同种型对照单克隆抗体的小鼠相比，体重减轻的明显降低（至少 $p < 0.05$ 或更好）以及银屑病皮肤和结肠炎症状的明显减轻。在此研究的最后（第 45 天），用任一剂量的 mIL-21 处理的小鼠的体重都约为其开始体重的 100%，而 PBS 处理的小鼠平均减轻了其开始体重的 16%，用同种型对照抗体处理的小鼠减轻了其开始体重的 10-15%。在第 45 天，用任一剂量的 mIL-21 处理的小鼠的平均结肠炎临床评分约为 1 / 7 到 1 / 6.5，平均银屑病皮肤评分约为 1 / 7 到 1 / 5。用 0.2mg 抗 mIL-21 抗体处理的小鼠只有 20% 患银屑病，该病程度居中，而用 0.8mg 剂量处理的小鼠无一具有任何银屑病皮肤症状。另一方面，用 PBS 处理的小鼠 100% 患银屑病，并且这些小鼠中的约 50% 具有严重的症状。在此研究的最后，与用 PBS 和 0.2mg 同种型对照处理的小鼠相比，用抗 mIL-21 抗体处理的小鼠的结肠炎组织学指标（对肠炎、损伤和结构评分）也明显降低。

[0271] 与用 PBS 处理的小鼠相比，用抗 mIL-21 抗体处理的小鼠的血清 IL-6、RANTES、TNF- α 和 MIP-1 β 的水平明显较低，进一步支持了抗 mIL-21 抗体的抗炎作用。

[0272] 治疗性给药的结果：从 T 细胞转移后第 12 天开始接受 0.2 和 0.8mg 剂量的抗 mIL-21 抗体的小鼠的特征为：在整个实验期间，与接受同种型对照单克隆抗体的小鼠相比，体重减轻的降低以及结肠炎症状的明显减轻。在第 45 天，用任一剂量的 mIL-21 处理的小鼠的平均结肠炎临床评分约为用同种型对照抗体处理的小鼠的 1 / 4 到 1 / 3.5。用 0.8mg 剂量的抗 mIL-21 抗体处理的小鼠的银屑病评分低于用同种型对照抗体或 PBS 处理的小鼠。

[0273] 总结：综上，这些结果表明体内给予抗 mIL-21 抗体对于在 T 细胞转移模型中减少结肠炎和银屑病发作和降低严重程度有效，并且表明抗 mIL-21 抗体可能用于治疗炎症性肠病和 / 或银屑病有效。

[0274] 实施例 16. 接触超敏小鼠模型

[0275] 可使用多种接触变应原包括二硝基氟苯 (DNFB) 和噁唑酮在小鼠中诱导接触超敏。用以丙酮 + 橄榄油为载体的变应原局部敏化小鼠，然后用只在橄榄油中的变应原在耳中攻击。耳厚度的变化是对所述变应原的免疫反应的量度。抗 IL-21 抗体可在敏化阶段（第 0-5 天）或攻击阶段（第 5-6 天）给药。通过拮抗 IL-21 对耳厚度的抑制表明 IL-21 具有诱导接触超敏的作用。

[0276] 在第 0 天用含 0.5% DNFB 的丙酮：橄榄油（4：1）或只用丙酮：橄榄油涂抹在 C57Bl / 6 小鼠的背上。在第 5 天，使用卡尺测量小鼠的耳厚度并只用橄榄油（对照）或用含 0.25% DNFB 的橄榄油通过将 25 μ l 溶液滴在耳上而在耳中攻击小鼠。在第 6 天测量耳厚度的变化并将炎症计算为第 5 天和第 6 天之间耳厚度的差值。在第 0-5 天或第 5-6 天对分组小鼠腹膜内注射 PBS 或 10-100 μ g 抗 IL-21 抗体。

[0277] 抗 IL-21 对耳厚度的抑制证明抗 IL-21 抗体可用于抑制接触超敏。

[0278] 实施例 17. 表位作图

[0279] A. 氢 - 氘交换 (HDx) 实验

[0280] 在鉴定由中和抗 IL-21mAb362.78.1.44、362.597.3、366.328.10、366.552.11 和

可溶性 hIL-21R / γ c-Fc 识别的 IL-21 表位区的努力中,应用了基于免疫亲和的氢-氘交换 (HDx) 方法,然后进行质谱分析。具体地,将纯化的 mAb 固定在 CNBr 活化的琼脂糖小球上并置换为氘缓冲液。通过孵育使氘化的 IL-21 结合在所述免疫亲和小球上,然后用氘化缓冲液洗涤以除去未结合的蛋白。然后将所述抗原抗体复合物置于 PBS 溶液中以开始使 IL-21 未结合区置换回酰胺氢。然后终止氘氢交换并以低 pH 缓冲液洗脱 IL-21,然后用固定的胃蛋白酶将 IL-21 蛋白水解消化。然后用 MALDI-TOF 质谱生成肽质量图并与由游离状态的 IL-21 生成的对照样品的肽质量图进行比较,所述游离状态的 IL-21 通过用 PBS 溶液稀释而从氘化 IL-21 置换回酰胺氢。图 3 示出了游离状态的 IL-21 (图 3A 和 3C) 和与抗体结合的 IL-21 (图 3B 和 3D) 经胃蛋白酶消化的肽的扩展范围质谱。如图 3A 中所示,将重叠的肽同位素指定给游离状态的 IL-21 的肽 EKKPPKEF (SEQ ID NO:2 的残基 129-136) (m/z , 1002.5619Da) 和 LERFKSLL (SEQ ID NO:2 的残基 137-144) (m/z , 1005.6091Da), 其中理论肽质量的质量准确度在 10ppm 内。由于酰胺氢置换不完全,在 m/z 约为 1002.5619Da 处观察到少量残余的氘化肽。

[0281] 图 3B 是质量范围与图 3A 相同的质谱图,示出了在 1014.49 m/z 和 1015.00 m/z 处具有单同位素离子的两个重叠的肽同位素峰 (envelope)。由于两种肽离子簇拥在相同的质量范围周围,因此很难在这两种离子之间指定每种肽的身份。然而,图 3A 和 B 的肽离子的串联质谱数据表明它们具有相同的肽碎裂模式 (数据未示出)。尽管从获自所述抗原抗体复合物的样品中检测到存在很小百分比的非氘化肽,然而通过限制溶剂进入抗体/抗原结合区,大部分肽离子保持了氘化并偏移 to 更高质量区,表明该 mAb 结合位点可能含有 EKKPPKEFLERFKSLL 区 (SEQ ID NO:2 的残基 129-144)。

[0282] 游离状态的 IL-21 和所述抗原抗体复合物的另一种经胃蛋白酶消化的肽如图 3C 和 D 所示,基于 IL-21 经胃蛋白酶消化的片段的理论质量将其确定为 KSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2 的残基 141-162) (m/z , 2519.2451)。如图 3D 所示,将此 22 个氨基酸残基的肽的质量偏移 (Δ 质量 = 9.0Da) 与那两段上游残基 (图 2B, EKKPPKEF (SEQ ID NO:2 的残基 129-136 和 LERFKSLL (SEQ ID NO:2 的残基 137-144)) 的质量偏移相比,此区只有少部分因所述 mAb 的结合而受到保护,表明此肽只有一部分参与到与所述 mAb 的结合。事实上,此肽的序列是 C 末端的尾部,其含有四个与肽 LERFKSLL (SEQ ID NO:2 的残基 137-144) 重叠的氨基酸残基,肽 LERFKSLL 看起来受到所述 mAb 的明显保护。基于这些氘保留的质谱测量,发明人估计所述 IL-21 结合所述 mAb 的表位是 EKKPPKEFLERFKSLL (SEQ ID NO:2 的残基 129-144) 并且是 KSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2 的残基 141-162) 的上游序列。

[0283] B. 赖氨酸标记保护实验

[0284] 使用 HDx 测定,估计了 IL-21mAb 结合表位区,并观察到 (在 IL-21 中总共有 12 个赖氨酸残基) 有 5 个赖氨酸残基位于估计的结合表位区。由于赖氨酸残基因其带电特性而最可能存在于蛋白中溶剂可接触的区域,因此赖氨酸看起来是用于对抗原表位区的平行测定的选择性化学修饰的理想选择。化学修饰方案背后的原理是,在存在和不存在抗体的情况下,抗原中的赖氨酸修饰保护与其结合表位相关 (Scholten et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectr.* 17:983-994, 2006)。因此,为进一步表征表位区以及为确定参与 mAb 结合的那些赖氨酸残基,在亲和结合和游离状态的 IL-21 中都对赖氨酸残基进行了选择性乙酰化。使用

MALDI-TOF 和电喷雾离子化 (ESI) 质谱通过总质量和肽图谱分析而确定赖氨酸修饰 / 保护的位点。

[0285] Scholten 等人 (Scholten et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectr.* 17 :983-994, 2006) 研究了用于将溶剂可接触的赖氨酸残基完全乙酰化时乙酰化试剂 (醋酸 NHS) 和抗原之间的摩尔比例, 并发现在 3 分钟反应中所述标记在所述试剂摩尔过量 250 倍时有效。为测定结合表位, 对于游离状态的 IL-21、与数种中和 IL-21mAb 亲和结合的 IL-21, 以及 IL-21 异源受体蛋白 (IL-21R / γ c-Fc) 使用相同的标记反应条件。在给定的标记反应条件下, 单独的 IL-21 和亲和结合的 IL-21 的赖氨酸残基的不同溶剂可接触性造成所述 IL-21 分子上赖氨酸乙酰化 (乙酰基占据) 分布。用最强的离子对亲和结合的 IL-21 和所述单独的 IL-21 上受保护的赖氨酸残基的数量进行比较。基于最强离子的质谱比对清楚地显示, 从不同免疫复合物中分离的抗原上的赖氨酸乙酰化的数目是不同的。很明显, 所述赖氨酸标记试剂更不易进入亲和结合的 IL-21。因此, 抗原与抗体的结合减少了乙酰化。

[0286] 乙酰化保护的赖氨酸——其可参与所述 mAb 的结合——通过蛋白酶消化、然后使用液相色谱质谱进行肽质量图谱分析而被进一步检测。由于共价修饰的赖氨酸残基对胰蛋白酶消化具有抗性, 因此使用胃蛋白酶蛋白水解酶来产生更能够通过质谱检测的肽, 以在更多细节上研究所述赖氨酸修饰。使用一种肽离子色谱对不同肽的修饰进行了研究。如图 4 所示, 从对照 (单独的 IL-21) 和测试样品 (亲和结合的 IL-21 分子) 生成选择离子色谱以测定乙酰化和非乙酰化赖氨酸残基。图 4A 是在给定色谱条件下, 在 56.22min 洗脱的蛋白水解肽的选择离子色谱图, 该单同位素肽离子质量为 662.9Da, 其看起来处于三电荷状态 ($\Delta m = 0.3\text{Da}$), 如插入的质谱图所示。这一处于三电荷状态的肽被识别为经赖氨酸乙酰化的胃蛋白酶消化的肽片段 TCPSCDSYEKKPPKEF (SEQ ID NO:2 的残基 119-136) (m/z , 1986Da), 而非乙酰化肽质量为 1860Da (m/z)。 (乙酰化肽与非乙酰化肽的) 质量差为 126Da, 表明此肽中的全部三个赖氨酸残基都在游离状态的 IL-21 中被乙酰化。然而, 亲和结合的 IL-21 的选择离子色谱图未显示出肽的痕迹 (图 4B), 表明所述三个赖氨酸残基全部受到 IL-21 抗体结合的保护。

[0287] 还发现了另一个经胃蛋白酶消化产生的肽 (KSLQKMI, SEQ ID NO:2 的残基 141-148) 因 IL-21mAb 的结合而受到保护 (图 4C 和 4D)。其单同位素离子作为带两个电荷的离子而位于 509Da (m/z) ($\Delta m = 0.5\text{Da}$), 并且 (乙酰化肽与非乙酰化肽的) 质量差为 42Da, 表明在此肽的两个赖氨酸残基中只有一个受到保护。更早的 H/D 交换实验表明 C 末端尾部肽序列 KSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2 的残基 141-162) 上游的赖氨酸最可能受到抗体结合的保护。因此, 很可能是 K113 而不是 K119 参与了抗体结合。

[0288] 四个赖氨酸残基 (K102、K103、K106 和 K113) 受到克隆 362.78.1.44 和 362.597.3 的结合的保护而免于乙酰化, 并且它们位于根据 HDx 试验测定而估计的 IL-21mAb 结合表位区内。总之, 乙酰化保护试验提供了所述抗原抗体相互作用中具体赖氨酸残基的参与情况并且进一步确认了根据 HDx 试验估计的表位序列。

[0289] 17C. 多种物种的 IL-21 氨基酸序列的比较

[0290] 为更好地理解实施例 3 和 9 中的物种交叉反应结果, 根据所确定的 IL-21 上与 IL-21mAb 结合的表位 (实施例 17A 和 B), 获得并比较了多个物种的 IL-21 的氨基酸序列 (表 13)。全长人序列与食蟹猴和恒河猴序列的同一性超过 96%, 而与啮齿类的 IL-21 序列

的同一性只有 61-65%。明显地,如实施例 17 中所述的被克隆 362. 78. 1. 44 和 362. 597. 3 所结合的不连续表位(在表 13 中以下划线标出)在人、食蟹猴和恒河猴 IL-21 中相同,而大鼠 IL-21 序列在这些区域中有 6 个残基与人 IL-21 不同,小鼠 IL-21 序列有 7 个残基不同。

[0291] 表 13 :人、食蟹猴、恒河猴、大鼠和小鼠 IL-21 的氨基酸序列比对。

[0292]

人 IL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSS	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLV
食蟹猴 IL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSS	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLD
恒河猴 IL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSS	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLD
大鼠 IL-21	MERTLVCLILIFLGTVAHKSSP	QRPDHLIRLRHLM DIVEQLKIYENDLD
小鼠 IL-21	MERTLVCLLVIFLGTVAHKSSP	QGPDRLLIRLRHLDIVEQLKIYENDLD
人	PEFLPAPEDVETNCEWSAIFCFQKAQLKSANTGNNERIINLSIKKLKRKPP	
食蟹猴	PEFLPAPEDVETNCEWSAIFCFQKAQLKSANTGNNERIINLSIKKLKRKSP	
恒河猴	PEFLPAPEDVETNCEWSAIFCFQKAQLKSANTGNNERIINLSIKKLKRKSP	
大鼠	PELLTAPQDVKGQCEHEAFACFQAKLKPSNTGNNKTFINDLLAQLRRRLP	
小鼠	PELLSAPQDVKGHCHEAFAFQAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLP	
人	STNAGRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS SRTHGSEDS	
食蟹猴	STGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS SRTHGSEDS	
恒河猴	STGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS SRTHGSEDS	
大鼠	AKRTGNKQRHMAKCPSCDLYEKKTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS	
小鼠	ARRGGKKQKHIACPCSDSYEKRTPEFLERLKWLLQKMIHQHLS	

[0293] IL-21_人如 SEQ ID NO :2 所示;IL-21_小鼠如 SEQ ID NO :11 所示;IL-21_食蟹猴如 SEQ ID NO :9 所示;IL-21_恒河猴如 SEQ ID NO :9 所示;IL-21_大鼠如 SEQ ID NO :97 所示。

[0294] 对两个高度相关的抗 hIL-21mAb362. 78. 1 和 362. 597. 3 确定的不连续表位在上面以下划线标出。

[0295] 实施例 18. 用于临床前和临床免疫测定的 362. 78-CHO 的抗独特型单克隆抗体。

[0296] 生成对 362. 78-CHO 特异的抗独特型 mAb 以用于临床前和临床免疫测定,从而可特异性地测量用此治疗性抗 IL-21mAb 处理的个体中可能的抗 362. 78-CHO 抗体反应。

[0297] 为区分免疫原(362. 78-CHO)——其本身是抗体——和此实施例中的抗独特型抗体,将所述免疫原命名为 Ab1,将抗独特型抗体命名为 Ab2。抗独特型抗体应该会抑制(中和)Ab1 与其抗原(IL-21)的结合。然而,应注意,在此过程中,会产生不是抗独特型抗体的抗 Ab1 抗体。根据定义,这些是抗 362. 78-CHO 结合的非中和抗体并且也可用于临床前和临床免疫测定。

[0298] 方法:为用 362. 78-CHO 免疫接种小鼠,用 362. 78-CHO 免疫接种 5 只 6-8 周大的 BALB / c 小鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)。通过按照厂商说明书皮下注射约 50 μ g 纯化 362. 78-CHO(Lot#A2125F)连同 **Emulsigen[®]**-P 佐剂(MVP Laboratories INC, Omaha, NE)对小鼠进行初次免疫接种。初次免疫接种后,每只小鼠在 6 周的时间内每两周经皮下途径再接受一次在 **Emulsigen[®]**-P 佐剂中的 50 μ g362. 78-CHO。第三次和第四次免疫接种 7 天后,经眼眶静脉丛对所述小鼠采血并从血中分离血清以分析与 362. 78-CHO 结合的能力。

[0299] 使用捕获测定和中和测定选择融合动物:

[0300] 捕获测定：使用捕获型 ELISA 测定评估抗血清中小鼠抗 362.78-CHO (Ab2, 抗独特型) 抗体与 362.78-CHO (Ab1, 在 CHO 细胞中产生, lot#E10569) 结合的能力。在此测定中, 首先用 100 μ L / 孔的在包被缓冲液 (0.1M Na_2CO_3 , pH9.6) 中浓度为 1 μ g / mL Fc 特异性山羊抗人 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 包被 96 孔聚苯乙烯 ELISA 板的孔。将板在 4°C 下孵育过夜, 然后吸出未结合的抗体并用 300 μ L / 孔的洗涤缓冲液 (PBS-Tween, 定义为 0.137M NaCl, 0.0022M KCl, 0.0067M Na_2HPO_4 , 0.0020M KH_2PO_4 , 0.05% v / w 聚山梨醇酯 20, pH7.2) 将板洗涤两次。在室温 (RT) 下用 200 μ L / 孔的封闭缓冲液 (PBS-Tween 加 1% w / v 牛血清清蛋白 (BSA)) 将孔封闭 60 分钟, 吸出液体并用 300 μ L / 孔的 PBS-Tween 将板洗涤两次。然后用 (在含 1% BSA 的 PBS-Tween 中) 浓度为 1 μ g / mL 的 362.78-CHO (Ab1, 在 CHO 细胞中产生的 ZGI, lot#E10569) 孵育孔。在室温下孵育 1 小时后, 吸出孔中的液体并如上所述将板洗涤两次。制备抗血清 (Ab2) 的连续 10 倍稀释液 (在含 1% BSA 的 PBS-Tween 中), 稀释度起始于 1 : 1000, 直至 1 : 1000000。然后将每个稀释度的样品一式两份地转移到所述测定板中, 100 μ L / 孔。正常小鼠血清用作阴性对照。在室温下孵育 1 小时后, 吸出孔中的液体并如上所述将板洗涤两次。然后将 Fc 特异性缀合有 HRP 的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 以 1 : 5000 的稀释度加入到孔中, 100 μ L / 孔。在室温下孵育 1 小时后, 从孔中吸出未结合的检测抗体并将板洗涤两次。吸出后, 将四甲基联苯胺 (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 按照 100 μ L / 孔加入到每孔中, 并将板在室温下孵育 1 分钟。通过加入 100 μ L / 孔的终止试剂 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 停止显色, 并在 450nm 下在 Molecular Devices Spectra MAX340 设备上读出每孔的吸光度值。

[0301] 中和测定：使用基于滴定板的中和测定评定抗血清中小鼠抗 362.78-CHO 抗独特型抗体 (Ab2) 抑制 (中和) 362.78-CHO (Ab1) 的结合活性的能力。在此测定中, 首先用 100 μ L / 孔的在包被缓冲液 (0.1M Na_2CO_3 , pH9.6) 中浓度为 1 μ g / mL 的人 IL-21 配体 (lot#A1207F) 包被 96 孔聚苯乙烯 ELISA 板的孔。将板在 4°C 下孵育过夜, 然后吸出未结合的配体并用 300 μ L / 孔的洗涤缓冲液 (PBS-Tween, 定义为 0.137M NaCl, 0.0022M KCl, 0.0067M Na_2HPO_4 , 0.0020M KH_2PO_4 , 0.05% v / w 聚山梨醇酯 20, pH7.2) 将板洗涤两次。用 200 μ L / 孔的封闭缓冲液 (PBS-Tween 加 1% w / v 牛血清清蛋白 (BSA)) 将孔封闭 1 小时, 然后用洗涤缓冲液将板洗涤两次。制备抗血清 (Ab2) 的连续 10 倍稀释液 (在含 1% BSA 的 PBS-Tween 中), 稀释度起始于 1 : 100, 直至 1 : 100000。正常小鼠血清用作阴性对照。然后将每个稀释度的样品一式两份地转移到 96 孔稀释板中, 100 μ L / 孔。Ab1 作为 2x 溶液加入, 100 μ L / 孔。在室温下孵育 45 分钟后, 在吸出封闭缓冲液之后按照 100 μ L / 孔转移到测定板中。在室温下孵育 1 小时后, 吸出孔中的液体并如上所述将板洗涤两次。然后将辣根过氧化物酶标记的 Fc 特异性缀合有 HRP 的山羊抗人 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 以 1 : 5000 的稀释度加入每孔中, 100 μ L / 孔; 将板在室温下孵育 1 小时。除去未结合的检测抗体后, 将板洗涤 2 次, 将四甲基联苯胺 (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 按照 100 μ L / 孔加入到每孔中, 然后将板在室温下孵育 2 分钟。通过加入 100 μ L / 孔的终止试剂 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) 停止显色, 并在 450nm 下在 Molecular Devices Spectra MAX340 设备上读出每孔的吸光度值。

[0302] 融合：用在不含佐剂的 PBS 中的约 50 μ g 362.78-CHO (Ab1) 最后一次免疫接种具有

最高的抗 362.78-CHO 中和滴度的两只小鼠。四天后,采集这些小鼠的脾脏和淋巴结。使用 Cyto-pulse CEEF-50 设备 (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD),使用本领域已知的标准方法进行电融合以将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤 P3-X63-Ag8.653 细胞 (美国典型培养物保藏中心, CRL1580) 以 1 : 1 的淋巴细胞 - 骨髓瘤比例融合。将融合混合物分到 96 孔平底板中。将杂交瘤生长培养基 (IMDM, 添加有 1x L- 谷氨酰胺 (100x)、1x 青霉素 - 链霉素 (100x)、以上来自 Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA ;10% 非热灭活的 Fetalclone1 血清 (HyClone, Logan, UT)、10% 杂交瘤克隆因子 (BM Condimed H1Roche Diagnostic, Indianapolis, IN)、1x HAT 添加剂 (50x, Gibco Invitrogen)) 加入融合板的孔中进行 70% 体积的置换,共加入三次。将融合物置于板中 10 天后对孔进行测定。

[0303] 主孔的选择:如上所述使用捕获型 ELISA 筛选 96 孔融合板中小鼠抗 362.78-CHO 独特型抗体的存在,除了来自培养板的杂交瘤上清液不经稀释即进行检测。阳性孔中的杂交瘤细胞被成功地扩大培养成为 24 孔板中的培养物。当所述 24 孔板培养物的密度约为 $4-6 \times 10^5$ 细胞 / mL 时,单独收集并保存每孔的上清液 (约 1.5mL) 并将每孔的细胞冷藏起来。冷藏培养基由 90% Fetalclone1 血清和 10% DMSO 构成。用上述捕获型 ELISA 和基于板的中和型 ELISA 测定重新分析所述 24 孔板的每孔中的上清液。结果表明扩大培养后,全部主孔上清液都保留了它们识别溶液中的 362.78-CHO 抗体 (Ab1) 的能力。7 个主孔上清液保留了它们中和 Ab1 与人 IL-21 配体结合的能力。

[0304] 克隆:根据中和和活性选择了 5 个主孔中的细胞并在添加有 1x HT (100x, Gibco Invitrogen) 的杂交瘤生长培养基中进行克隆以分离产生目的中和 mAb 的克隆杂交瘤。使用标准低密度稀释 (少于 1 个细胞 / 孔) 方法在 96 孔微量滴定细胞培养板中克隆细胞,并在测定前通过显微镜检查孔的单位点生长来评定单克隆性。置于板中后 6 天,用中和 ELISA 在所有板中筛选抗 362.78-CHO 抗独特型抑制抗体。来自阳性孔的杂交瘤细胞被成功地扩大培养到 24 孔板中。

[0305] 第一轮克隆的选择:从每个克隆组中收集每个克隆杂交瘤细胞系的约 6 孔的上清液——其对特异性 mAb 呈阳性并来自只有一个杂交瘤细胞生长群的孔——并用中和型 ELISA 在多个稀释度下重新筛选以识别产生中和 mAb 的最佳克隆。当所述 24 孔的最佳克隆的密度约为 $4-6 \times 10^5$ 细胞 / mL 时,单独收集并保存每孔的上清液并将每孔的细胞冷藏起来。

[0306] 总结:生成了对重组表达的 362.78-CHO 抗体 (Ab1) 有活性的小鼠单克隆抗体 (Ab2),并且其表现出能够阻断 362.78-CHO 抗体与人 IL-21 结合的中和活性。这些抗体可用作临床前和临床免疫测定的试剂。

[0307] 实施例 19. IL-21mAb362.78.1.44 与天然胞内人和食蟹猴 IL-21 (但不包括小鼠或大鼠 IL-21) 的结合。

[0308] 本文所述的中和抗 IL-21 单克隆抗体是由表达人免疫球蛋白基因并被重组人 IL-21 免疫接种的转基因小鼠中生成的 (见实施例 1)。重要的是要确认,除了重组形式的 IL-21 之外,IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 还可结合和中和天然的人 IL-21。此外,为支持临床前毒理学研究,理解 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 与多个物种中的天然 IL-21 的结合能力是有帮助的。为检测这一点,一种方法是用荧光染料标记 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 并通过流式细胞术用其检测活化 T 细胞胞内的 IL-21。在此研究中,用 PMA 和离子霉素在体

外激活新鲜分离的人和食蟹猴外周血白细胞以及大鼠和小鼠脾细胞 24 小时以诱导 IL-21 产生。采收、固定、透化细胞并使用为 ALEXA FLUOR-647 (AF-647) 所标记的 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 就 CD3 或 CD4 (界定辅助 T 细胞群) 以及 IL-21 的表达对该细胞进行染色, 并与由同种型匹配的对照抗体诱导的染色强度进行比较。此测定中的阳性信号高于对同种型对照 mAb 中观察到的信号, 表明特异性 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 与测试物种中的内源性 IL-21 结合, 尽管其并非 IL-21 中和活性的指标。需要进行进一步研究以证明在 IL-21 与抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 的结合检测为阳性的物种中的 IL-21 中和。

[0309] 人 PBMC 的分离: 从健康人类志愿者中采集 100mL 外周血 (ZymoGenetics), 置于绿顶肝素真空管 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 中。用 100ml 的室温 PBS 稀释血液并在 50ml 的圆锥形试管中分成 35ml 的等分试样。将 14ml 室温 Ficoll / 1Paque PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 置于下部并将所述试管以 2000rpm 离心 20 分钟。取出 PBMC 界面层并用测定培养基 (添加有青霉素 / 链霉素、10% 胎牛血清、丙酮酸钠、 $2\mu\text{M}\beta$ -巯基乙醇的 RPMI1640, 全部来自 Invitrogen, Carlsbad, CA) 洗涤两次。使用标准方法在锥虫蓝中对存活细胞进行计数。

[0310] 食蟹猴 PBMC 的分离: 从圈养在西雅图的华盛顿大学的食蟹猴中采集 40mL 外周血, 置于绿顶肝素真空采血管 (BD Biosciences) 中。用 40ml 的室温 PBS 稀释血液并在 50ml 的圆锥形试管中分成 35ml 的等分试样。将 14ml 室温 Ficoll / 1Paque PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 置于下部并将所述试管以 2000rpm 离心 25 分钟。取出 PBMC 界面层并用测定培养基 (添加有青霉素 / 链霉素、10% 胎牛血清、丙酮酸钠、 $2\mu\text{M}\beta$ -巯基乙醇的 RPMI1640) 洗涤两次。使用标准方法在锥虫蓝中对存活细胞进行计数。

[0311] 小鼠和大鼠脾细胞的采集: 按照下面的方案制备大鼠和小鼠脾细胞。使用两片冰冻载玻片的末端将新鲜采集的脾脏轻轻地切碎成单细胞悬浮液。然后使细胞通过 $70\mu\text{M}$ 尼龙网过滤器以除去组织块。通过在室温下将细胞沉淀重悬浮于 2mL ACK 裂解缓冲液中 10 分钟来裂解红细胞。通过加入测定培养基终止此反应, 然后将细胞离心 (1200RPM, 5 分钟)、重悬浮并通过另一尼龙网过滤器以除去碎片。使用标准方法在锥虫蓝中对存活细胞进行计数。

[0312] 用 PMA 和离子霉素过夜活化细胞。将所有物种的细胞以 2.0×10^6 细胞 / mL 重悬浮。然后将 1mL 细胞在添加或不添加 20ng / mL PMA 和 200ng / mL 离子霉素的情况下置于 24 孔板中并在湿润的 5% CO_2 组织培养箱中在 37°C 下孵育 20 小时。20 小时后, 向每孔中加入 $1.0\mu\text{L}$ GolgiPlug (BD Pharmingen) 并将细胞再孵育 4 小时。

[0313] 细胞采收和表面染色: 上述孵育 24 小时后, 采收细胞、用冷 FACS 缓冲液洗涤并以 2.0×10^5 – 5.0×10^5 细胞 / 孔置于 96 孔组织培养板中 (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ)。然后视情况用 $1\mu\text{g} / \text{mL}$ 的一种或多种以下抗体在冰上将细胞染色 20 分钟: 抗小鼠 CD4-PE、抗大鼠 CD3-PE、抗大鼠 B220-PE 或抗猴 CD4-PE 或抗人 CD4-PE。然后将细胞在 PBS 中洗涤两次, 准备进行固定。

[0314] 细胞固定和透化: 为固定细胞, 将每孔细胞沉淀重悬浮于 $200\mu\text{L}$ 2% 多聚甲醛中并在室温下孵育 5 分钟。然后将细胞离心 (1200rpm, 5 分钟) 并吸出上清液, 在室温下将细胞在透化缓冲液 (添加有 0.1% 皂苷 (Calbiochem) 和 0.5% BSA (Sigma) 的 PBS) 中重悬浮 10 分钟。

[0315] 胞内染色：固定和透化后，用 $1\ \mu\text{g} / \text{mL}$ 的以下标记抗体的一种对细胞进行染色：抗小鼠 IL-21-AF647、抗人 IL-21 克隆 362.78.1.44-AF647（两者都由 ZymoGenetics 生产）或来自 BD Pharmingen 的比较抗体——抗人 IL-21-AF647 抗体。然后在黑暗中的室温下将细胞孵育 40 分钟。40 分钟后，用 FACS 缓冲液（添加有 1% BSA、2% 人 AB 血清和 0.05% HEPES 的 HBSS）将细胞洗涤两次。

[0316] 数据获取和分析：染色和洗涤完成后，将细胞重悬浮于 $400\ \mu\text{L}$ FACS 缓冲液中并使用 FACS Calibur (BD Pharmingen) 运行 CellQuest 软件来采集数据。数据使用 FC S Express 分析软件 (De Novo Software, Los Angeles, CA) 进行分析。

[0317] 结果：在 PMA+ 离子霉素刺激的人 T 细胞中检测人 IL-21：尽管使用同种型对照只将 0.015% 的 CD3+T 细胞染色为阳性，然而使用 AF-647 标记的 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 可将约 9% 的 CD4+T 染为 IL-21 阳性。使用来自 eBiosciences 的市售 IL-21mAb 检测到相同比例的 IL-21+ 细胞。这表明 IL-21mAb 可结合人 CD4+T 细胞中内生的 IL-21。

[0318] 在 PMA+ 离子霉素刺激的外周血单核细胞中检测食蟹猴 IL-21：使用 AF-647 标记的 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 可将约 3.6% 的食蟹猴 CD3+T 细胞染为 IL-21 阳性，而使用同种型对照只将 0.1% 染为阳性。此数量高于使用 eBiosciences 的市售抗人 IL-21 检测到的数量。此差异可能是由于 eBiosciences 抗体对食蟹猴 IL-21 的结合亲和力较弱。这些结果表明抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 可结合食蟹猴 CD3+T 细胞中内生的 IL-21。

[0319] 在 PMA+ 离子霉素刺激的脾细胞中检测小鼠 IL-21：使用 ZymoGenetics 生产的大鼠抗小鼠 IL-21 单克隆抗体作为阳性对照，约 13.5% 的活化小鼠 CD4+T 细胞为 IL-21 阳性。然而，如证明抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 不结合或中和小鼠 IL-21 的蛋白质印迹和中和生物活性测定（见实施例 3 和 9）所预测的那样，AF647 标记的抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 未检测到任何 IL-21 阳性细胞。这进一步证明抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 不与小鼠 IL-21 结合。

[0320] 在 PMA+ 离子霉素刺激的脾细胞中检测大鼠 IL-21：在 PMA 和离子霉素的存在下过夜刺激大鼠脾细胞。这些刺激条件足以在人、食蟹猴和小鼠 T 细胞中产生 IL-21 阳性 T 细胞。在此实验中，不管是抗小鼠 IL-21mAb 还是抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 都未检测到 IL-21 阳性的任何细胞。然而，由于在此实验中无阳性对照，因此这一阴性结果并不确定地排除抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 可与大鼠 IL-21 结合的可能性。然而，这些数据——与在其他测定（见实施例 9）中抗人 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 不能中和大鼠 IL-21 生物活性的结果一起考虑——强烈地暗示此 mAb 很可能不结合大鼠 IL-21。

[0321] 结论：本文所述的 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 很显然与人和食蟹猴天然形式的 IL-21 蛋白结合，但不与小鼠或大鼠 IL-21 结合。

[0322] 表 14

[0323]

物种	同种型对照	抗人 IL-21 mAb(克隆 78)	抗 IL-21 阳性对照
人	用 hIgG4-AF647 对照将 0.015% 的 CD3+T 细胞染为阳性	9% 的 CD3+ T 细胞为 IL-21+	10% 的 CD3+ T 细胞为 IL-21+(eBiosciences α IL-21 mAb*)
食蟹猴	用 hIgG4-AF647 对照将 0.1% 的 CD3+ T 细胞染为阳性	3.6% 的 CD3+T 细胞为 IL-21+	0.2% 的 CD3+ T 细胞为 IL-21+*
小鼠	未使用同种型对照	未检出	13.5% 的 CD4+ T 细胞为 IL-21+
大鼠	未使用同种型对照	未检出	无法获得

[0324] * (此 mAb 可能不与食蟹猴 IL-21 强烈结合)

[0325] 实施例 20- 克隆 362. 78. 1. 44 对天然 IL-21 生物活性的结合和中和

[0326] 本文所述的中和抗 IL-21 单克隆抗体 (IL-21mAb) 是由表达人免疫球蛋白基因并被重组人 IL-21 免疫接种的转基因小鼠中生成的 (见实施例 1)。重要的是要确认,除了重组形式的 IL-21 之外, IL-21mAb 克隆 362. 78. 1. 44 还可结合和中和天然的人 IL-21。为证明对天然 IL-21 的中和,使用了前述基于 Baf3 / IL-21R pSTAT 细胞的测定 (见实施例 7),并将活化 CD4+T 细胞条件培养基样品用作天然 IL-21 的来源。在此实验中,用不同量的 IL-21mAb 克隆 362. 78. 1. 44 预孵育 T 细胞条件培养基样品,然后测量 Baf3 / hIL-21R 转染子中 IL-21 诱导的 STAT3 磷酸化 (pSTAT3) 的水平。使用来自 4 名独立健康人类捐赠者的活化 T 细胞条件培养基样品,证明了对天然 IL-21 的中和。

[0327] 人 PBMC 的分离和 T 细胞条件培养基样品的生成:从 4 名健康人类志愿者中采集 100mL 外周血 (ZymoGenetics),置于绿顶肝素真空管 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 中。然后用 100ml 的室温 PBS 稀释血液并在 50ml 的圆锥形试管中分成 35ml 的等分试样。将 14ml 室温 Ficol / lPaque PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 置于下部并将所述试管以 2000rpm 离心 20 分钟。取出 PBMC 界面层并用测定培养基 (添加有青霉素 / 链霉素、10% 胎牛血清、丙酮酸钠、 $2 \mu\text{M}$ β - 巯基乙醇的 RPMI1640,全部来自 Invitrogen, Carlsbad, CA) 洗涤两次。使用标准方法在锥虫蓝中对存活细胞进行计数。使用 Miltenyi Biotec (Auburn, CA) 的人 CD4+T 细胞选择试剂盒按照厂商概述的方案负向选择 T 细胞。随后使用标准免疫表型分型技术,通过流式细胞术测得 CD4+T 的纯度 >95%。然后将 T 细胞在 24 孔板中以 5×10^5 细胞 / 孔孵育 3 天,所述 24 孔板用在 Th1 偏移培养基——其含有 $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 抗 IFN γ 、 $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 抗 CD28 (以上来自 Becton Dickinson) 和 $10\text{ng} / \text{mL}$ 重组 IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN)——中的 $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 抗 CD3 抗体预包被。三天后,洗涤细胞,在含有 $25\text{ng} / \text{mL}$ PMA 和 $500\text{ng} / \text{mL}$ 离子霉素的培养基中重新接种并在 37°C 下孵育 5 小时。5 小时后,采收条件培养基样品并冷藏在 -80°C 下至实验当天。

[0328] 为估计 T 细胞条件培养基样品中 IL-21 的大约浓度,制备 1 : 4 连续稀释液并检测

Baf3 / hIL-21R 转染子中 STAT3 磷酸化的诱导情况。在实施例 7 中概述的 10 分钟 pSTAT3 生物测定方案后,通过比较 pSTAT3 的水平与使用重组 IL-21 的滴定液生成的 pSTAT3 水平而估计每个条件培养基样品中 IL-21 的相对浓度。使用这些数据,4 个条件培养基样品的每一个样品中的 IL-21 的浓度被测得都在 5.0 和 10.0 ng / mL 之间。

[0329] 为证明对天然 IL-21 诱导的 STAT3 磷酸化的中和作用,用 IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 的 1 : 4 连续稀释液将 4 个 T 细胞条件培养基样品的 1 : 10 稀释液 (IL-21 终浓度为 0.5-1.0 ng / mL) 在 37 °C 下预孵育 30 分钟。克隆 362.78.1.44 的浓度为 0.4-400 ng / mL。30 分钟后,将条件培养基 +IL-21mAb 样本转移到 Baf3 / hIL-21R 细胞板中并在 37 °C 下再孵育 10 分钟。10 分钟后,用冷洗涤缓冲液终止反应,使用实施例 7 中所述的方法裂解细胞并测量 pSTAT3 的量。

[0330] 在所有四个条件培养基样品中,克隆 362.78.1.44 IL-21mAb 有效地中和了 IL-21 的活性 (数据汇总于表 15 中)。这些数据清楚地证明了克隆 362.78.1.44 对天然人 IL-21 的有效结合和中和。

[0331] 表 15 :IL-21mAb 克隆 362.78.1.44 对天然 IL-21 的中和

[0332]

IL-21 mAb 浓度 (ng/mL)	对 pSTAT3 的诱导 (相对于背景的倍数)			
	捐赠者 1	捐赠者 2	捐赠者 3	捐赠者 4
0.4	69.49	56.32	61.11	62.73
1.6	70.84	61.73	68.24	65.41
6.25	70.76	10.46	7.51	60.65
25	2.16	1.62	1.70	2.49
100	1.68	1.43	1.51	1.49
400	1.59	1.30	1.14	1.51

[0333] 实施例 21

[0334] 21A. 在食蟹猴中用 IL-21mAb362.78-CHO 进行的试验性毒性研究

[0335] 人、恒河猴和食蟹猴具有共同的 IL-21mAb362.78-CHO 的表位特异性 (见实施例 17 和 17b),因此在一种对安全评估有价值的物种——食蟹猴中测试对 IL-21mAb 的耐受性及其毒性。

[0336] 用 IL-21mAb362.78-CHO 的单次注射处理食蟹猴并在处理后 4-8 周内监测临床症状。通过以 5 或 100 mg / kg 的剂量进行皮下或静脉内注射来给予 IL-21mAb。未观察到临床症状。未观察到有意义的体重变化或凝聚。未观察到可归因于药物毒性的血清化学或血液学的变化。全部动物都对用 5 或 100 mg / kg 的 IL-21mAb362.78-CHO 进行的单次处理具有良好的耐受性。

[0337] 对高剂量 (100 mg / kg) 动物进行尸体解剖。未观察到明显的解剖学变化。对高剂量动物的组织病理学分析显示,在淋巴组织中有少量淋巴增生。淋巴组织的免疫组织化学分析显示,滤泡大小和滤泡相关细胞类型的中度增加。这些变化可能涉及 IL-21mAb362.78-CHO 的药理学活性,因为已知 IL-21 直接影响淋巴滤泡的 B 细胞的发育和排出,还已知 IL-21 支持类别转换、亲和力成熟和浆细胞发育。

[0338] 在用食蟹猴进行的单剂量研究中监测了 IL-21mAb362.78-CHO 的药物动力学表现和生物利用度。用 IL-21mAb362.78-CHO 对 8 只雄性食蟹猴进行了处理。3 只通过皮下注射

5mg / kg 进行处理,3 只通过静脉内注射 5mg / kg 进行处理。2 只通过静脉内注射 100mg / kg 进行处理。100mg / kg 组在处理 4 周内,两个 5mg / kg 组在处理 8 周内采集血清样品以分析 IL-21mAb362.78-CHO 水平。药代动力学谱的无房室模型分析 (noncompartmental analysis) 显示,对于 5 或 100mg / kg IL-21mAb 的静脉内给药,药物暴露与剂量成比例的方式增加。皮下给药后,IL-21mAb362.78-CHO 的生物利用度约为 50%。估计的 IL-21mAb 的终末半衰期为 10-14 天。IL-21mAb * 插入物 :362.78-CHO 在食蟹猴中的估计终末半衰期为 10-14 天。

[0339] 21B. 在食蟹猴中对 362.78-CHO 的试验性药理学研究

[0340] 人、恒河猴和食蟹猴具有共同的 IL-21mAb362.78-CHO 的表位特异性 (见实施例 17 和 17b),因此在一种对药效评估有价值的物种——食蟹猴中测试 IL-21mAb 的体内药理学。

[0341] 用 IL-21mAb362.78-CHO 的单次注射处理食蟹猴并在处理后 4-8 周内监测临床症状。通过以 5-100mg / kg 的剂量进行皮下或静脉内注射来给予 IL-21mAb362.78-CHO。用流式细胞术监测全部动物的外周血白细胞组成的变化。未观察到单核细胞或 B 细胞的浓度发生与处理有关的变化,未观察到 T 细胞 CD4 和 CD8 亚组发生变化,也未观察到 CD4 与 CD8 细胞的比例发生变化。在 IL-21mAb362.78-CHO 给药后观察到 NK 细胞浓度的降低。在全部处理组中,外周血 NK 细胞在处理 24 小时相对基线值减少。在所述 8 只动物的 5 只中,NK 水平保持低于基线值 60%至少 2 周。需要具有用于处理引起外周血中 NK 细胞的浓度发生变化的应激和其他原因的足够对照的证实性研究以证实此观察结果。

[0342] 实施例 22. 抗 mIL-21 抗体在小鼠胶原诱导的关节炎 (CIA) 模型中降低疾病发生率和延缓疾病进展

[0343] 小鼠胶原诱导的关节炎 (CIA) 模型:

[0344] 本领域已知数种类风湿性关节炎动物模型。例如,在胶原诱导的关节炎 (CIA) 模型中,小鼠发生与人类风湿性关节炎非常相似的慢性炎性关节炎。由于 CIA 具有与 RA 相似的免疫和病理特征,这使得它成为用于筛选潜在的人用抗炎化合物的理想模型。CIA 模型是一种广为人知的依赖免疫反应和炎性反应而发生的小鼠模型。所述免疫反应包括对胶原应答的 B 细胞和 CD4+T 细胞的相互作用,所述胶原作为抗原被给予并导致抗胶原抗体的产生。炎性阶段是炎症介导物发生组织反应造成的,而所述炎症是这些抗体中的一些与小鼠天然胶原交叉反应并激活补体级联反应的后果。使用 CIA 模型的一个优点是其发病的基本机制是已知的。已经鉴定出了 II 型胶原上与 T 细胞和 B 细胞相关的表位,并且测定了与免疫介导的关节炎有关的多种免疫 (例如延迟型超敏性和抗胶原抗体) 和炎性 (例如细胞因子、趋化因子和基质降解酶) 参数,并因此可用于评价测试化合物在 CIA 模型中的效力 (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3 :407-20,1999 ;Williams et al., Immunol. 89 :9784-788, 1992 ;Myers et al., Life Sci. 61 :1861-78,1997 ;和 Wang et al., Immunol. 92 :8955-959, 1995)。在 CIA 模型中检测了 ZymoGenetics 生产的大鼠抗小鼠 IL-21mAb 的可能效力,如下所述。

[0345] 10 周大的雄性 DBA / 1J 小鼠 (Jackson Labs) 用于治疗性给药 (即当小鼠患既定疾病时)。在第 -21 天,对全部动物尾部皮内注射 100 μ L 在完全弗氏佐剂 (由 Chondrex, Redmond, WA 制备) 中配制的 1mg / mL 的鸡 II 型胶原,三周后在第 0 天对动物进行相同的注射除了在不完全弗氏佐剂中配制以外。一旦小鼠患既定疾病,立即每隔一天通过腹膜内

注射给予抗 IL-21 抗体或载体 (PBS), 共给予 6 个剂量。小鼠 (每个处理 n=7) 接受 0.15mg 的抗 IL-21 抗体 / 只 / 剂量、或载体对照 PBS (Life Technologies, Rockville, MD)。在第二次胶原注射后, 动物开始显示关节炎症状, 并且大多数动物在 1-2 周内出现炎症。通过使用卡尺测量爪厚度以及通过对每只爪进行临床评分 (0-3) 而评估每只爪中疾病程度 (参见下文)。

[0346] 监测疾病:

[0347] 动物可在第二次胶原注射后不久开始出现爪发炎的症状, 一些动物甚至在第二次胶原注射之前就开始具有趾炎症的症状。大多数动物在加强注射后的 1-2 周内出现关节炎, 但一些动物可能需要更长的时间。在此模型中疾病的发生率通常为 90-100%, 在使用 60 只动物的研究中通常观察到 0-5 只不发生反应的动物 (观察 6 周后确定)。由于此研究只包括患有既定疾病的小鼠, 因此不使用未出现关节炎的小鼠。注意当炎症开始时, 通常可短暂出现不同低程度的爪或趾炎症。为此, 直到出现显著、持续的爪肿胀时才认为动物患有既定疾病。

[0348] 每日观察动物以评定其爪的疾病的状态, 这可通过对每只爪给予定性临床评分来完成。每天, 根据每只动物的临床疾病的状态为其四只爪进行评分。为确定临床评分, 可认为爪具有 3 个区域: 趾、爪本身 (前掌或后掌) 以及腕或踝关节。与这些区域有关的炎症的程度和严重度被认为包括: 每趾肿胀情况; 趾甲脱落或趾发红; 任一爪出现任何浮肿或发红的症状; 腱或骨的任何细微解剖学分界消失的症状; 评估腕或踝的任何水肿或发红; 以及炎症上延到最接近的腿的症状。爪评分 1、2 或 3 首先基于严重度的总体印象, 其次基于涉及几个区域。用于临床评分的等级如下。

[0349] 临床评分:

[0350] 0= 正常

[0351] 0.5= 涉及一或多个趾, 但只有这些趾发炎

[0352] 1= 涉及爪 (1 个区域) 的轻微炎症, 并可包括一个或者多个趾

[0353] 2= 爪的中度炎症并可包括某些趾和 / 或腕 / 踝 (2 个区域)

[0354] 3= 爪、腕 / 踝以及某些或全部趾 (3 个区域) 的严重炎症

[0355] 既定疾病被定义为爪炎症的定性评分为 1 或更高, 并持续连续 2 天。一旦出现既定疾病, 记录日期并标识为该动物患“既定疾病”的第一天。

[0356] 接受抗 mIL-21 抗体的小鼠的特征为爪肿胀在实验过程中减轻并且平均关节炎评分较接受 PBS 的小鼠低约 25%。这些结果表明, 抗 mIL-21 抗体减轻与此关节炎模型相关的爪肿胀并延缓疾病发展, 表明抗 IL-21 抗体可在人关节炎的治疗中有效。

[0357] 实施例 23. IL-21R 在人银屑病皮肤样品中的表达

[0358] IL-21R 的表达通常限于造血细胞。然而, 在炎性疾病的背景下, IL-21R 在非造血细胞中的表达可对介导感染组织中功能性变化的细胞类型提供直接刺激。在银屑病中, 角化细胞生长失调, 伴随银屑样表皮增生、异常终末分化和角质层不完全发育。由银屑病皮肤中的浸润性 Th1 和 Th17 细胞产生的 IL-21 可促进角化细胞的功能性变化, 包括细胞增殖、趋化因子产生和分化改变。因此研究了 IL-21R 在银屑病皮肤损伤中的角化细胞上的存在情况。

[0359] 方法: 使用 ZymoGenetics 生产的抗人 IL-21R 的小鼠 IgG1 抗体对来自 4 名正常人

类捐赠者和 9 名银屑病患者 的 18 份皮肤活组织样品进行免疫组织化学分析。对于银屑病患者,一个小组 (5 名患者) 提供来自损伤和非损伤皮肤的样品。在来自所有捐赠者的损伤皮肤的组织病理学检查中都观察到高度的表皮增生。基于阳性细胞的出现率和染色密度对特定细胞类型上的 IL-21R 的免疫反应性 (染色) 进行评分。

[0360] **结果:**在银屑病患者 的正常皮肤和非损伤皮肤中,对 IL-21R 的染色在个别表皮内单核细胞 (MNC)、散在巨噬细胞和成纤维细胞样细胞为阳性。在银屑病患者 的所有损伤样品中,在大量 MNC 上存在对 IL-21R 的阳性染色。用小鼠同种型对照抗体染色的样品为阴性。对 IL-21R 的染色在来自正常皮肤的表皮角化细胞上存在极少或不存在。在来自银屑病患者 的非损伤皮肤活组织中,在 4 个样品的表皮角化细胞中观察到轻微染色并在第 5 个样品的棘层中观察到中度染色。在来自 9 名银屑病患者 中的 8 名的损伤样品中的角化细胞的中心区存在轻微到强烈染色。

[0361] **结论:**在银屑病皮肤损伤中, IL-21R 的表达不仅限于浸润性白细胞,而是也在表皮角化细胞中被上调。在银屑病患者 的非损伤皮肤中的表皮角化细胞上对 IL-21R 的染色与正常对照相比增加,表明甚至在未涉及的皮肤中,角化细胞也可对 IL-21 的刺激产生异常反应。在存在炎症的情况下,在浸润性 MNC 上和增生的表皮层中观察到 IL-21R 增加。因此用 IL-21 阻断抗体治疗银屑病可通过阻断到炎性细胞和表皮角化细胞的 IL-21 信号而抑制炎症。

[0362] 表 16. 在正常、非损伤和损伤银屑病患者皮肤中的 IL-21R 免疫反应

[0363] 性¹

[0364]	皮肤类型(N)	表皮 ²	MNC ²
	正常(4)	0	1
	银屑病非损伤(5)	1	1
	银屑病损伤 ³ (9)	2	3

[0365] ¹IL-21R 表达的等级 :0= 无、1= 轻微、2= 中等、3= 强烈

[0366] ² 所有测试样品的中位数评分

[0367] ³ 该样品组中的 5 个具有捐赠者匹配的非损伤皮肤活组织样品

[0001]

序列表

<110> 津莫吉尼蒂克斯公司

<120> 抗人IL-21单克隆抗体

<130> 07-16PC

<140> PCT/IB2008/005011

<141> 2008-12-08

<150> 61/012,329

<151> 2007-12-07

<160> 97

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 642

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtc 60
tggaacatg gagaggattg tcatcgtct gatggtcac ttcttgggga cactgggtcca 120
caaatcaagc tccaagggtc aagatgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat 180
tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga ctgtgtccct gaatttctgc cagctccaga 240
agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc tttttcctgt tttcagaagg cccaactaaa 300
gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag 360
gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcacg 420
tgattcttat gagaaaaaac caccacaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca 480
aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc 540
taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg 600
tattccaagt ggaggagccc tattaaatta tataaagaaa ta 642

```

<210> 2

<211> 162

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

```

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
1      5      10      15
Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
20      25      30
Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
35      40      45
Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
50      55      60
Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
65      70      75      80
Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile

```

[0002]

				85					90					95			
Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Ala		
			100					105					110				
Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr		
		115					120					125					
Glu	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Leu		
	130					135					140						
Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	His	Gly	Ser	Glu		
145					150					155					160		
Asp	Ser																

<210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IL-21合成肽#1

<400> 3																	
Glu	Gln	Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Val		
1				5				10					15				
Asp	Gln	Leu	Lys	Cys													
			20														

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IL-21合成肽#2

<400> 4																	
Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Asp	Val	Glu	Asn		
1				5				10					15				
Thr	Asn	Cys															

<210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IL-21合成肽#3

<400> 5																	
Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Ala		
1				5				10					15				
Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys								
			20					25									

[0003]

<210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IL-21合成肽#4

<400> 6
 Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe
 1 5 10 15
 Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser
 20 25

<210> 7
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变重组IL-21 aa

<400> 7
 Met Asp Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1 5 10 15
 Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
 20 25 30
 Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
 35 40 45
 Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
 50 55 60
 Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
 65 70 75 80
 Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
 85 90 95
 Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
 100 105 110
 Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
 115 120 125
 Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
 130 135 140
 Asp Lys Met Asp His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Asp Ser

<210> 8
 <211> 545
 <212> DNA
 <213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)

<400> 8
 cgagaccaag gtctagctct actgttggtta cttatgagat ccagtcctgg caacatggag 60
 aggatagtca tctgtctgat ggtcatcttc ttggggacac tggtcacaaa atcaagctcc 120

[0004]

```

caaggtcaag atcgccacat gattagaatg cgtcaactta tagatattgt tgatcagctg 180
aaaaattatg tgaatgactt ggaccctgaa ttcttgccag ctccagaaga tgtagagaca 240
aactgtgagt ggtcagctat ttctgtttt cagaaggecc aactaaagtc agcaaatata 300
ggaacaatg aaaggataat caatttatca attaaaaagc tgaagaggaa atcaccttcc 360
acaggtgcag agagaagaca gaaacacaga ctaacatgcc ctctcatgta ttcttattgag 420
aaaaaaccac ccaaagaatt cctagaaaga ttcaaatcac ttctccaaaa gatgattcat 480
cagcatctgt cctctagaac acatggaagt gaagattcct gaggatctaa cttgcagttg 540
gacac 545

```

<210> 9

<211> 162

<212> PRT

<213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

<400> 9

```

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
1      5      10      15
Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
20     25     30
Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
35     40     45
Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
50     55     60
Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Ile Ser Cys Phe Gln
65     70     75     80
Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
85     90     95
Asn Leu Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Thr Gly Ala
100    105    110
Glu Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
115    120    125
Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
130    135    140
Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
145    150    155    160
Asp Ser

```

<210> 10

<211> 3072

<212> DNA

<213> 小鼠 (*Mus Musculus*)

<400> 10

```

gagaaccaga ccaaggccct gtcattcagct cctggagact cagttcttgt ggcatggaga 60
ggacccttgt ctgtctggta gtcattcttct tggggacagt ggcccataaa tcaagccccc 120
aagggccaga tcgctcctg attagacttc gtcaccttat tgacattgtt gaacagctga 180
aaatctatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat gtaaaggggc 240
actgtgagca tgcagctttt gcctgttttc agaaggccaa actcaagcca tcaaaccctg 300
gaaacaataa gacattcatc attgacctcg tggcccagct caggaggagg ctgcccgcca 360
ggaggggagg aaagaaacag aagcacatag ctlaaatgcc ttctgtgat tegtatgaga 420
aaaggacacc caaagaattc ctagaagac taaaatggct ccttcaaaag atgattcatc 480
agcatctctc ctagaacaca taggaccgga agattcctga ggatccgaga agattcccga 540
ggactgagga gacgccggac actatagacg ctacggaatg caggagtaca tcttgccctc 600
tgggattgca agtggagaag tacgatacgt tatgataaga acaactcaga aaagctatag 660
gttaagatcc tttegcccat taactaagca gacattgttg ttccctgcac agactccatg 720

```

[0005]

```

ctgtcaacat ggaaaatctc aactcaacaa gagcccagct tcccgtgtca gggattttctg 780
glgcllclca agctgtggct tcatcttatt gcccaactgt gacattcttt gattggaagg 840
ggaaaactaa agcttttagc aaaaatacag ctagggaatt tgcgatctg cgagagtaag 900
acctcttatg atcctaacgg aatgatgtaa gctggaaata ataagcataa gatgaaattg 960
aaaattgaag tctttattct ttaagaaaaa ctttgtactt gaaagcatgt ctgaagagtt 1020
tactcattac cacaaacatc tagcatattg ataactaaca tctttatact ctacaagaga 1080
ggctttccag ataggtacag tttttcttct ctattaggtc tatcaaaatt taacctatta 1140
tgagggtcac ccctggcttt cactgttttt ctaaagagge aagggtgtag taagaagcag 1200
gcttaagttg ccttctctcc aatgtcaagt tcctttataa gctaatagtt taatcttgtg 1260
aagatggcaa tgaaagcctg tggaagtgc aacctacta tcttctggag ccaagtagaa 1320
tttcaagtt tgtagctctc acctcaagtg gttatgggtg tcctgtgatg aatctgctag 1380
ctccagcctc agtctcctct cccacatcct ttcctttctt tcctctttga aacttctaag 1440
aaaaagcaat ccaaaacaagt tcagcactta agacacattg catgcacact tttgataagt 1500
taaatccaac catctattta aaatcaaaat caggagatga gccaaagagac cagaggttct 1560
gttccagttt taaacagact tttactgaac atcccaatct tttaccaca gaggctaaat 1620
tgagcaaata gttttgccat ttgatataat ttccaacagt atgtttcaat gtcaagttaa 1680
aaagtctaca aagctatttt ccctggagtg gtatcatcgc tttgagaatt tcttatggtt 1740
aaaatggatc tgagatccaa gcatggcctg ggggatgggt ttgatctaag gaaaaaggtg 1800
tctgtacctc acagtgcctt taaaacaagc agagatcccg tgtaccgcc taagatagca 1860
cagactagtg ttaactgatt cccagaaaag tgcacaatc agaaccaacg cattctctta 1920
aactttaaaa atatgtattg caaagaactt gtgtaactgt aaatgtgtga ctgttgatga 1980
cattatacac acatagccca cgtaagtgtc caatgggtgt agcattgggt gctgagtttg 2040
ctgctcgaaa gctgaagcag agatgcagtc cllcacaaag caatgatgga cagagagggg 2100
agtctccatg ttttattctt ttgttggttc tggctgtgta actgttgact tcttgacatt 2160
gtgatttttta tatttaagac aatgtattta ttttggtgtg tttattgttc tagcctttta 2220
aatcactgac aatttctaata caagaagtac aaataattca atgcagcaca ggctaagagc 2280
ttgtatcggt tggaaaagcc agtgaaggct tctccactag ccatgggaaa gclacgctt 2340
agagtaaact agacaaaatt gcacagcagt cttgaacctc tctgtgtca agactcagcc 2400
agtcccttga cattattgtt cactgtgggt gggaacacat tggacctgac aactgttgt 2460
gtgtccatga aggttgccac tgggtgaagc tttttttggt tttcattctc ttatctgtag 2520
aacaagaatg tggggcttct ctaagtctat tctgtatttt attctgaact tcgtatglcl 2580
gagttttaat gttttgagta ctcttacagg aacacctgac cacacttttg agttaaat 2640
tatcccaagt gtgatattta gttgttcaaa aagggaaggg atatacatat atacatacat 2700
acatacatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat gtatatatat 2760
atatatatag agagagagag agagagagag agagaaagag agagaggttg ttgtaggtca 2820
taggagttca gaggaatca gttatggccg ttaatactgt agctgaaagt gttttcttg 2880
tgaataaatt catagcatta ttgatctatg ttattgctct gttttattta cagtcacacc 2940
tgagaattta gttttaatat gaatgatgta ctttataact taatgattat ttattatgta 3000
tttggttttg aatgtttgtg ttcattggctt cttatttaag acctgatcat attaaatgct 3060
accagtcgc ga 3072

```

<210> 11

<211> 146

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 11

```

Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val
1          5          10          15
Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu
20          25          30
Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp
35          40          45
Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys
50          55          60
Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser
65          70          75          80

```

[0006]

Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu
 85 90 95
 Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile
 100 105 110
 Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu
 115 120 125
 Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His
 130 135 140
 Leu Ser
 145

<210> 12

<211> 423

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens).

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (423)

<400> 12

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtc ctg tcc cag cta caa ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
agc agt agg act tac cgc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag	192
Ser Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
50 55 60	
gaa ctg gag tgg att ggg agt atc tat tat aga ggg agt acc ttc tac	240
Glu Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr	
65 70 75 80	
aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc gta tcc gta gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aac cag ttc tcc ctg aaa ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct	336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
gtg tat tac tgt gcg aga cag agt gga tat agt ggc tac gac tgg ttc	384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe	
115 120 125	
gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca	423
Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

[0007]

<210> 13
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 13
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 Glu Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe
 115 120 125
 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (21)

<400> 14
 agt agg act tac cgc tgg ggc
 Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly
 1 5

21

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 15
 Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly
 1 5

<210> 16
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

[0008]

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (48)

<400> 16

agt atc tat tat aga ggg agt acc ttc tac aac ccg tcc ctc aag agt	48
Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser	
1 5 10 15	

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 17

Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser	
1 5 10 15	

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (36)

<400> 18

cag agt gga tat agt ggc tac gac tgg ttc gac ccc	36
Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe Asp Pro	
1 5 10	

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 19

Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe Asp Pro	
1 5 10	

<210> 20

<211> 378

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (378)

<400> 20

[0009]

atg gaa gcc cca gct cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca	48
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	
1 5 10 15	
gat acc acc gga gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct	96
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	
20 25 30	
ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt	144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
gtt agc agc ttc tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc	192
Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
50 55 60	
agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc	240
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala	
65 70 75 80	
agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
85 90 95	
agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc	336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser	
100 105 110	
aac tgg atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa	378
Asn Trp Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
115 120 125	

<210> 21

<211> 126

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 21

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	
1 5 10 15	
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	
20 25 30	
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
50 55 60	
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala	
65 70 75 80	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
85 90 95	
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser	
100 105 110	
Asn Trp Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
115 120 125	

[0010]

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> 人 (Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1)... (33)

<400> 22
agg gcc agt cag agt gtt agc agc ttc tta gcc
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

33

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 23
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人 (Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1)... (21)

<400> 24
gat gca tcc aac agg gcc act
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

21

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 25
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

[0011]

<221> CDS

<222> (1)... (24)

<400> 26

cag cag cgt agc aac tgg atc acc

24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr

1

5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 27

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr

1

5

<210> 28

<211> 435

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (435)

<400> 28

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1

5

10

15

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20

25

30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

gag tgg gtg gcg ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca 240

Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala

65

70

75

80

gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85

90

95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

[0012]

tca	435
Ser	
145	

<400>	29
Met	Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly 1 5 10 15
Val	Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln 20 25 30
Pro	Gly Arg Scr Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 35 40 45
Ser	Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60
Glu	Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala 65 70 75 80
Asp	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 85 90 95
Thr	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110
Tyr	Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr 115 120 125
Tyr	Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser 130 135 140
Ser	
145	

$$\begin{aligned} &\langle 220 \rangle \\ &\langle 221 \rangle \text{ CDS} \\ &\langle 222 \rangle (1) \dots (16) \end{aligned}$$

<400> 30
agc tat ggc atg cac t
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 31

77

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 31
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 32
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (51)

<400> 32
 ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca gac tct gtg aag 48
 Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 ggc 51
 Gly

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 33
 Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 34
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (51)

<400> 34
 gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac tac ttc ggt atg gac 48
 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15
 gtc 51
 Val

[0014]

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 35
 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

<210> 36
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (378)

<400> 36
 atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 ggt agc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 378
 Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

[0015]

<210> 37
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 37
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 38
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (36)

<400> 38
 agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

36

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 39
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS

[0016]

<222> (1)... (21)

<400> 40

ggt gca tcc agc agg gcc act
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

21

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 41

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (21)

<400> 42

cag cag tat ggt agc tgg acg
Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
1 5

21

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 43

Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
1 5

<210> 44

<211> 435

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (435)

<400> 44

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15 48

[0017]

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga ggc gtg gtc cag Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln 20 25 30	96
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 35 40 45	144
agt acc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg Ser Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60	192
gag tgg gtg gcc ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala 65 70 75 80	240
gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 85 90 95	288
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tat tac tgt gcg aga gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr 115 120 125	384
tac ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser 130 135 140	432
tca Ser 145	435

<210> 45

<211> 145

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 45

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly 1 5 10 15	
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln 20 25 30	
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 35 40 45	
Ser Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60	
Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala 65 70 75 80	
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 85 90 95	
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	

[0018]

83

<400> 49

Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 50

<211> 51

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (51)

<400> 50

gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac tac ttc ggt atg gac 48

Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1

5

10

15

gtc

51

Val

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 51

Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 52

<211> 378

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (378)

<400> 52

atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1

5

10

15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser

20

25

30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144

[0020]

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct	192
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	
50 55 60	
ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca	240
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro	
65 70 75 80	
gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc	288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
85 90 95	
agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat	336
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr	
100 105 110	
ggt agc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	378
Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
115 120 125	

<210> 53

<211> 126

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 53

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	
1 5 10 15	
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser	
20 25 30	
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	
50 55 60	
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro	
65 70 75 80	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
85 90 95	
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr	
100 105 110	
Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
115 120 125	

<210> 54

<211> 36

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (36)

[0021]

<400> 54

agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

36

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (21)

<400> 56

ggt gca tcc agc agg gcc act
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

21

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 57

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (21)

<400> 58

cag cag tat ggt agc tgg acg
Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
1 5

21

[0022]

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 59
 Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1 5

<210> 60
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (417)

<400> 60
 atg gaa ctg ggg ctc cgc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta gaa ggt 48
 Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc atc ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45
 agt agc tat agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192
 Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg gtc tca tcc att act agt ggt agt tat tac ata cac tac gca 240
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala
 65 70 75 80
 gac tca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 tat tac tgt gtg aga gag aga gga tgg ggc tac tac ggt atg gac gtc 384
 Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 115 120 125
 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 417
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

[0023]

<210> 61
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 61
 Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 62
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (15)

<400> 62
 agc tat agc atg aac
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5

15

<210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 63
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5

<210> 64
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>

[0024]

<221> CDS

<222> (1)... (51)

<400> 64

tcc att act agt ggt agt tat tac ata cac tac gca gac tca gtg aag 48
Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

ggc

Gly

51

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 65

Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 66

<211> 33

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (33)

<400> 66

gag aga gga tgg ggc tac tac ggt atg gac gtc 33
Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 67

Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 68

<211> 387

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

[0025]

<222> (1)... (387)

<400> 68

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg	48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp	
1 5 10 15	
ctc cca ggt gcc aga tgt gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc	96
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
20 25 30	
ctg tct gca tct gtt gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt	144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	
35 40 45	
cag gac att gac agt gct tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa	192
Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
50 55 60	
gct cct aag atc ctg atc cat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc	240
Ala Pro Lys Ile Leu Ile His Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val	
65 70 75 80	
cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc	288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
85 90 95	
atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag	336
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	
100 105 110	
ttt aat agt tac ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc	384
Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
115 120 125	
aaa	387
Lys	

<210> 69

<211> 129

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 69

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60
Ala Pro Lys Ile Leu Ile His Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0026]

```

      85          90          95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      100      105      110
Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      115      120      125
Lys

```

<210> 70
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (33)

```

<400> 70
cgg gca agt cag gac att gac agt gct tta gcc
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala
  1          5          10

```

33

<210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

```

<400> 71
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala
  1          5          10

```

<210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (21)

```

<400> 72
gat gcc tcc agt ttg gaa agt
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
  1          5

```

21

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

```

<400> 73
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
  1          5

```

[0027]

<210> 74
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (27)

<400> 74
 caa cag ttt aat agt tac ccg tac act
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

27

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 75
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 76
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (408)

<400> 76
 atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtc ctg tcc cag gta cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

agt agt gac ttc tgg ggc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg 192
 Ser Ser Asp Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg att gga tat atc tct tcc cgt ggg agc acc aac tac aac ccc 240
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

[0028]

tcc ctc aag agg cga gtc acc ata tca gtc gac acg tcc agg aac cag	288
Ser Leu Lys Arg Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln	
85 90 95	

ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat	336
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr	
100 105 110	

tac tgt gcg aga tct gcg gga gta acg gat ttt gac ttc tgg ggc cag	384
Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln	
115 120 125	

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
130 135	

<210> 77
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 77
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Asp Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Arg Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 78
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (15)

<400> 78	15
agt gac ttc tgg ggc	
Ser Asp Phe Trp Gly	
1 5	

[0029]

<210> 79
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 79
 Ser Asp Phe Trp Gly
 1 5

<210> 80
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (49)

<400> 80
 tat atc tct tcc cgt ggg agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag agg 48
 Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Arg
 1 5 10 15

c 49

<210> 81
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 81
 Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Arg
 1 5 10 15

<210> 82
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (27)

<400> 82
 tct gcg gga gta acg gat ttt gac ttc 27
 Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe
 1 5

<210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

[0030]

<400> 83

Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe

1

5

<210> 84

<211> 387

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (387)

<400> 84

atg	gac	atg	atg	gtc	ccc	gct	cag	ctc	ctg	ggg	ctc	ctg	ctg	ctc	tgg	48
Met	Asp	Met	Met	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	
1				5					10					15		

ttc	cca	ggt	tcc	aga	tgc	gac	atc	cag	atg	acc	cag	tct	cca	tct	tcc	96
Phe	Pro	Gly	Ser	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	
			20					25					30			

gtg	tct	gca	tct	gta	gga	gac	aga	gtc	acc	atc	act	tgt	cgg	gcg	agt	144
Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	
		35					40					45				

cag	ggt	att	agc	agc	tgg	tta	gcc	tgg	tat	cag	cat	aaa	cca	ggg	aaa	192
Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	
	50					55					60					

gcc	cct	aag	ctc	ctg	atc	tat	gtt	gca	tcc	agt	ttg	caa	agt	ggg	gtc	240
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	
65					70					75					80	

cca	tca	agg	ttc	agc	ggc	agt	gga	tct	ggg	aca	gat	ttc	act	ctc	acc	288
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	
				85					90					95		

atc	agc	agc	ctg	cag	cct	gaa	gat	ttt	gca	act	tac	tat	tgt	caa	cag	336
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
			100					105					110			

gct	aat	agt	ttc	cct	ctc	act	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	gtg	gag	atc	384
Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	
		115					120					125				

aaa

Lys

387

<210> 85

<211> 129

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0031]

<400> 85
 Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys

<210> 86
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (33)

<400> 86
 cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg tta gcc
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

33

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 87
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (21)

<400> 88
 gtt gca tcc agt ttg caa agt

21

[0032]

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 89
Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 90
<211> 27
<212> DNA
<213> 人 (Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1)... (27)

<400> 90
caa cag gct aat agt ttc cct ctc act
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

27

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 91
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 92
<211> 153
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 92
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

[0033]

```

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
      100      105      110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
      115      120      125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
      130      135      140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145      150

```

<210> 93
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

```

<400> 93
Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala
 1      5      10      15
Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln
      20      25      30
Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys
      35      40      45
Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr
      50      55      60
Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr
65      70      75      80
Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln
      85      90      95
Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg
      100      105      110
Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala
      115      120      125
Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met
      130      135      140
Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
145      150

```

<210> 94
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

```

<400> 94
Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
 1      5      10      15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
      20      25      30
Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
      35      40      45
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
      50      55      60
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65      70      75      80
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
      85      90      95
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

```

[0034]

			100					105					110				
Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val		
		115						120					125				
Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile		
		130						135					140				
Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn		
145						150					155				160		
Thr	Ser																

<210> 95
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 95

Met	Phe	His	Val	Ser	Phe	Arg	Tyr	Ile	Phe	Gly	Leu	Pro	Pro	Leu	Ile		
1				5					10					15			
Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Cys	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys		
			20					25					30				
Asp	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ser	Val	Leu	Met	Val	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu		
		35					40					45					
Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	Ile	Gly	Ser	Asn	Cys	Leu	Asn	Asn	Glu	Phe		
	50					55					60						
Asn	Phe	Phe	Lys	Arg	His	Ile	Cys	Asp	Ala	Asn	Lys	Glu	Gly	Met	Phe		
65					70					75					80		
Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Arg	Lys	Leu	Arg	Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser		
			85						90					95			
Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	His	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr		
			100					105					110				
Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr	Gly	Gln	Val	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala		
		115					120					125					
Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu		
	130					135					140						
Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu		
145					150					155					160		
Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Trp	Asn	Lys	Ile	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Glu		
				165					170					175			

His

<210> 96
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 96

Met	Leu	Leu	Ala	Met	Val	Leu	Thr	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Ser	Val		
1				5					10					15			
Ala	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Thr	Leu	Ala	Gly	Ile	Leu	Asp	Ile	Asn	Phe		
			20					25					30				
Leu	Ile	Asn	Lys	Met	Gln	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Lys	Cys	His	Cys	Ser		
		35					40					45					
Ala	Asn	Val	Thr	Ser	Cys	Leu	Cys	Leu	Gly	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Cys		
	50					55					60						

[0035]

Thr	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Gln	Met	Thr	Asn	Thr	Thr
65					70					75					80
Met	Gln	Thr	Arg	Tyr	Pro	Leu	Ile	Phe	Ser	Arg	Val	Lys	Lys	Ser	Val
				85					90					95	
Glu	Val	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Cys	Pro	Tyr	Phe	Ser	Cys	Glu	Gln	Pro
			100					105					110		
Cys	Asn	Gln	Thr	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Thr	Phe	Leu	Lys	Ser	Leu
		115					120					125			
Leu	Glu	Ile	Phe	Gln	Lys	Glu	Lys	Met	Arg	Gly	Met	Arg	Gly	Lys	Ile
130						135					140				

<210> 97

<211> 146

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 97

Met	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Thr	Val
1				5				10					15		
Ala	His	Lys	Ser	Ser	Pro	Gln	Arg	Pro	Asp	His	Leu	Leu	Ile	Arg	Leu
			20					25					30		
Arg	His	Leu	Met	Asp	Ile	Val	Glu	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Glu	Asn	Asp
		35				40						45			
Leu	Asp	Pro	Glu	Leu	Leu	Thr	Ala	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Gly	Gln	Cys
	50					55				60					
Glu	His	Glu	Ala	Phe	Ala	Cys	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Pro	Ser
65					70					75					80
Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Asn	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu
			85					90						95	
Arg	Arg	Arg	Leu	Pro	Ala	Lys	Arg	Thr	Gly	Asn	Lys	Gln	Arg	His	Met
			100					105					110		
Ala	Lys	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Leu	Tyr	Glu	Lys	Lys	Thr	Pro	Lys	Glu
		115				120						125			
Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His
	130					135					140				
Leu	Ser														
145															

抗IL-21抗体VH比对

M	E	F	G	L	S	W	V	F	L	V	A	L	L	R	G	V	Q	C	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	78	VH	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	597	VH
.	.	L	.	.	R	.	.	.	.	.	.	I	.	E	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	328	VH	
.	.	K	H	L	W	F	F	L	L	.	.	A	P	.	W	.	L	S	.	.	.	Q	.	.	.	.	P	.	L	.	K	.	S	E	T	.	.	.	552	VH	
.	.	K	H	L	W	F	F	L	L	.	.	A	P	.	W	.	L	S	.	L	.	Q	.	.	.	.	P	.	L	.	K	.	S	E	T	.	.	.	75	VH	

C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	F	I	W	Y	D	G	S	D	K	Y	78	VH	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	597	VH
.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	S	.	N	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	328	VH	
.	.	I	V	.	.	G	S	I	.	.	D	F	W	-	-	-	.	I	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	I	G	Y	S	.	S	-	S	R	G	S	T	N	552	VH	
.	.	I	V	.	.	G	S	I	.	.	R	T	Y	R	W	G	.	I	.	.	P	.	.	.	E	.	.	.	I	G	S	.	Y	-	Y	R	G	S	T	F	75	VH		

Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	78	VH			
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	597	VH
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	328	VH	
.	.	N	P	.	L	.	R	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	F	S	.	K	L	S	.	V	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	552	VH	
.	.	N	P	.	L	.	S	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	F	S	.	K	L	S	.	V	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	75	VH	

G	D	S	S	D	W	Y	G	D	Y	Y	F	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	78	VH
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	597	VH
.	.	R	G	W	G	Y	Y	G	M	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	328	VH
.	.	A	G	V	T	.	F	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	552	VH
.	.	S	G	Y	.	G	Y	D	W	F	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	75	VH

CDR 3																																
-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

信号序列以红色标示

根据Kabat的CDR界限和V区编号

•表示与78VH的序列同一性

—表示为最大化总序列同源性而插入的缺失

图 1

1	10																				78 VL																										
	M	E	T	P	A	Q	L	L	F	L	L	L	L	W	L	P	D	T	T	G	E	I	V	L	T	Q	S	P	C	T	L	S	L	S	P	G	E	R	597 VL								
M D	.	R	V	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	P	C	A	.	Q	.	.	.	.	S	S	.	.	A	.	V	.	D	328 VL									
M D	.	M	V	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	F	.	G	S	R	O	D	.	Q	M	.	.	.	S	S	V	.	A	.	V	.	D	552 VL							
	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	75 VL							
20	30										40										50										78 VL																
	A	T	L	S	C	I	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	I	G	A	S	S	R	A	T	I	G	597 VL			
V	.	I	T	.	.	.	.	.	-	D	I	D	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	K	I	.	H	I	D	.	.	.	L	E	S	.	328 VL				
V	.	I	T	.	.	.	.	.	-	G	I	.	W	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	K	.	.	K	.	.	I	V	.	.	.	L	Q	S	.	552 VL					
	.	.	.	.	.	.	.	.	-	S	V	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	D	.	.	.	N	.	.	.	75 VL						
	CDR 1																				CDR 2																										
60	70										80										90										78 VL																
	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	I	Q	Q	Y	G	S	-	-	W	T	I	597 VL				
V	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	F	N	.	Y	P	Y	.	328 VL		
V	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	N	.	F	P	L	.	552 VL
	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	S	N	-	W	I	.	597 VL	
																					CDR 3																										
105																															78 VL																
	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K																					597 VL																
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																					328 VL																
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																					552 VL																
	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.																					75 VL																
	.	.	.	.	.	R	L	.	.	.																																					

—表示为最大化总序列同源性而插入的缺失

102

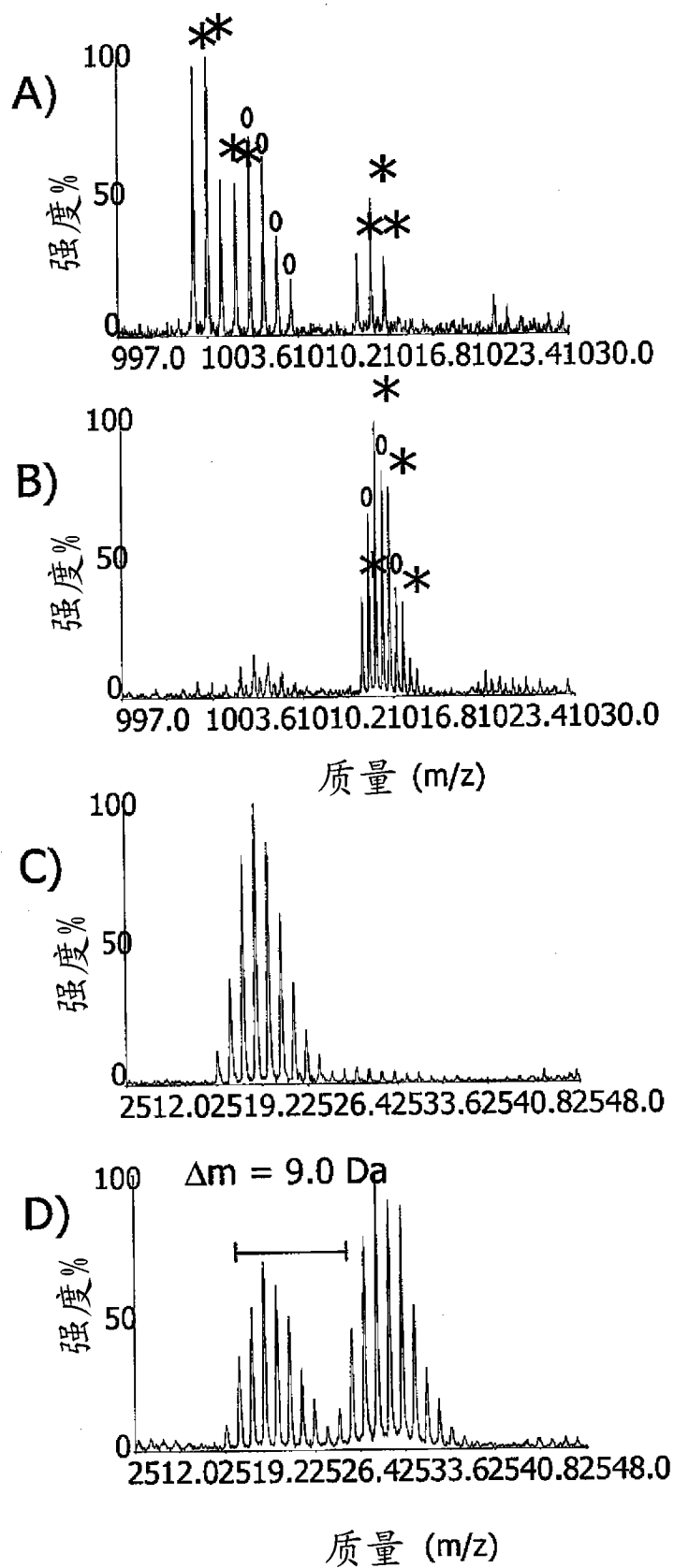


图 3

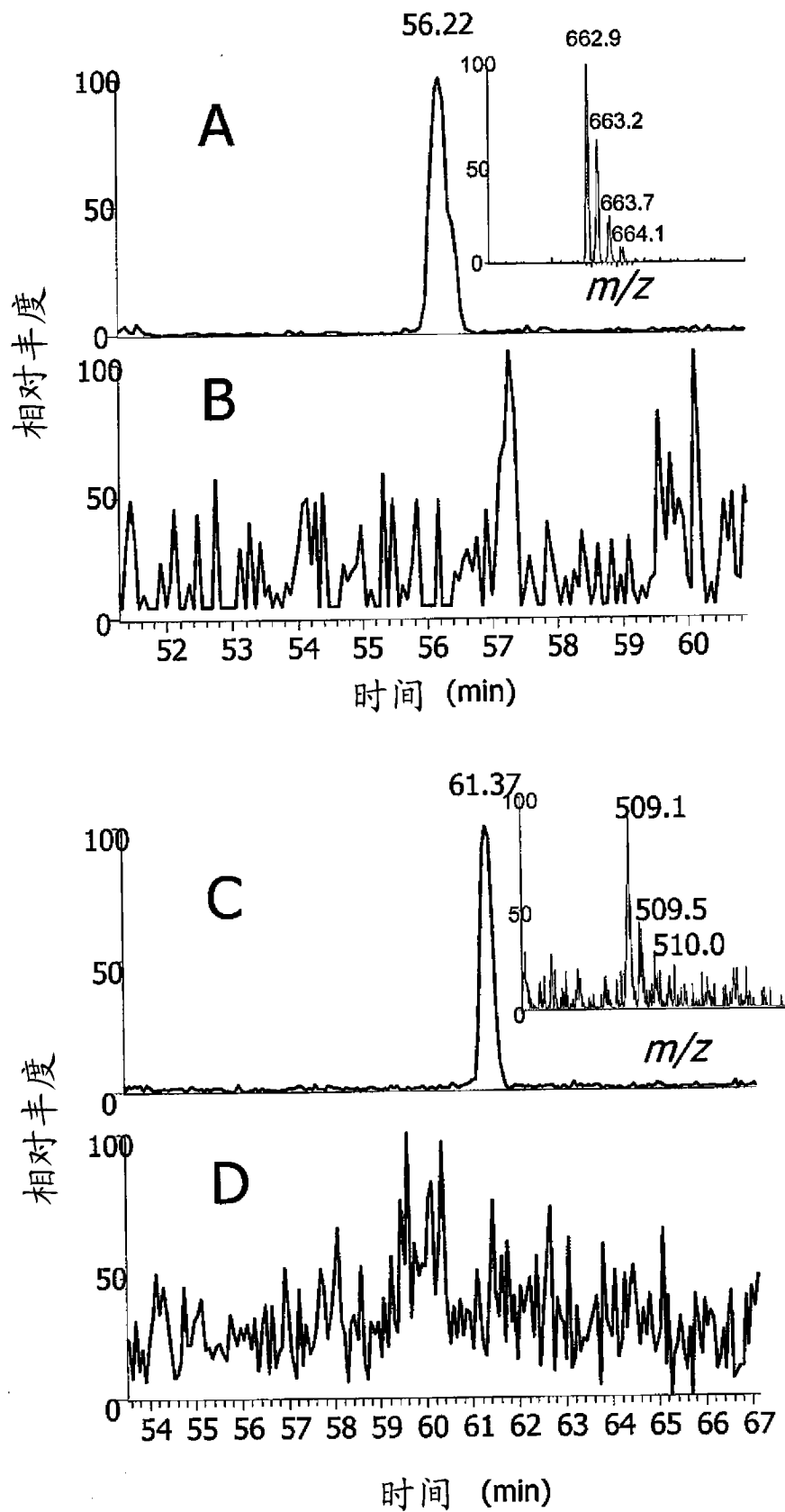


图 4