



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201008579 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098116062

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 14 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/15 美國 61/053,650

2009/02/03 美國 61/149,517

2009/04/27 美國 61/173,137

(71)申請人：生物基因艾迪克MA公司(美國) BIOGEN IDEC MA INC. (US)

美國

(72)發明人：賈柏 伊琳 GARBER, ELLEN (US)；柏克麗 琳達 BURKLY, LINDA (US)；麥可

森 珍妮佛 MICHAELSON, JENNIFER (US)；路葛佛史柯 艾力克西

LUGOVSKOY, ALEXEY (RU)；徐衍明 HSU, YEN MING (TW)；瀚夫 卡爾

HANF, KARL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：54 項 圖式數：38 共 215 頁

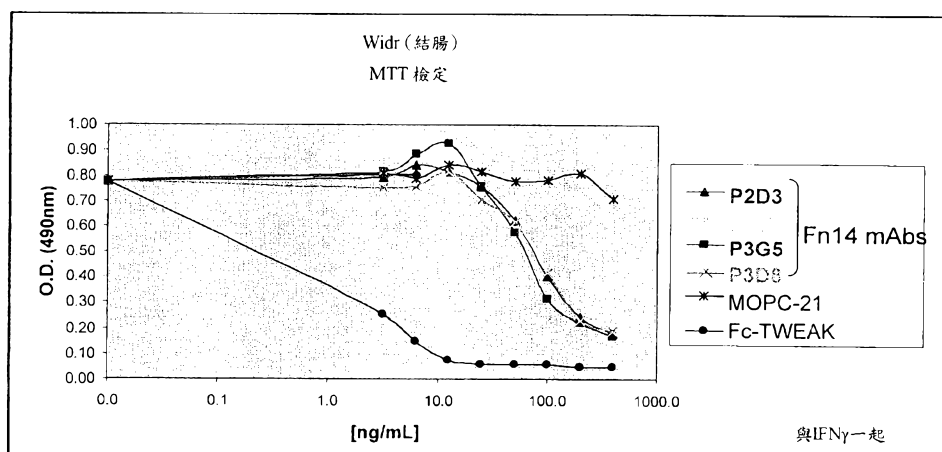
(54)名稱

抗FN14抗體及其用途

ANTI-FN14 ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明揭示與受體Fn14結合且誘導或增強表現Fn14之癌細胞之細胞死亡的抗體及抗體片段。亦揭示使用該等抗體及抗體片段以誘導個體之腫瘤細胞死亡且治療個體之病症的方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201008579 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098116062

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 14 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/15 美國 61/053,650

2009/02/03 美國 61/149,517

2009/04/27 美國 61/173,137

(71)申請人：生物基因艾迪克MA公司(美國) BIOGEN IDEC MA INC. (US)

美國

(72)發明人：賈柏 伊琳 GARBER, ELLEN (US)；柏克麗 琳達 BURKLY, LINDA (US)；麥可

森 珍妮佛 MICHAELSON, JENNIFER (US)；路葛佛史柯 艾力克西

LUGOVSKOY, ALEXEY (RU)；徐衍明 HSU, YEN MING (TW)；瀚夫 卡爾

HANF, KARL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：54 項 圖式數：38 共 215 頁

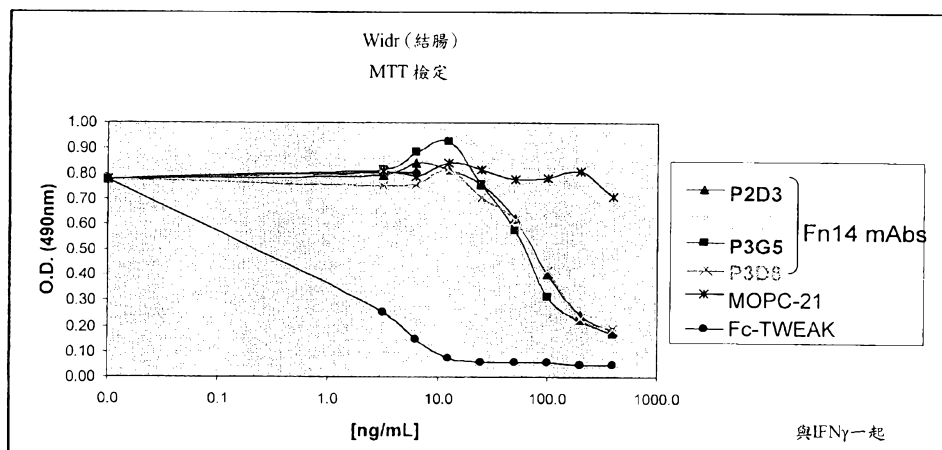
(54)名稱

抗FN14抗體及其用途

ANTI-FN14 ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明揭示與受體Fn14結合且誘導或增強表現Fn14之癌細胞之細胞死亡的抗體及抗體片段。亦揭示使用該等抗體及抗體片段以誘導個體之腫瘤細胞死亡且治療個體之病症的方法。



六、發明說明：

【先前技術】

腫瘤壞死因子(TNF)相關細胞激素為具有一系列功能之蛋白質的超家族，該等功能包括免疫調節及細胞凋亡調節中所牽涉之功能。TWEAK(細胞凋亡之TNF樣弱誘導劑)為此超家族中之一個成員。TWEAK受體Fn14為減少細胞黏著至細胞外基質且減少血清刺激性生長及遷移的生長因子調節之即刻早期反應基因(Meighan-Mantha等人，J. Biol. Chem. 274:33166-33176 (1999))。

【發明內容】

本發明至少部分係基於與Fn14結合且誘導腫瘤細胞死亡之抗體的鑑別及表徵。該等抗體以低劑量在癌症之動物模型中有效且在預防腫瘤生長方面具有持久作用。

在一態樣中，本發明之特徵在於一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽於抗原決定基處選擇性結合，該抗原決定基在SEQ ID NO: 1之位置42處包括胺基酸殘基色胺酸；及(ii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。

如本文所用之「於抗原決定基處結合，該抗原決定基在SEQ ID NO: 1之位置42處包括胺基酸殘基色胺酸」係指抗體或其抗原結合片段與SEQ ID NO: 1之野生型人類Fn14蛋白選擇性結合之能力，但不能與在位置42處含有取代色胺酸之丙胺酸的SEQ ID NO: 1突變體顯著結合。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合，且交叉阻斷單株抗體P4A8或P3G5與SEQ ID NO: 1結合；及(ii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。當Fn14結合蛋白與Fn14先前結合抑制單株抗體與Fn14在相同層面上稍後結合(在該層面上，單株抗體與Fn14先前結合抑制相同單株抗體與Fn14稍後結合)時，Fn14結合蛋白交叉阻斷單株抗體(例如，P4A8或P3G5)與Fn14結合。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合，且交叉阻斷包含P4A8之VH及VL域之單株抗體、包含P3G5之VH及VL域之單株抗體或包含P2D3之VH及VL域之單株抗體與SEQ ID NO: 1結合；及(ii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。

亦揭示一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)在抗體之恆定區中包含突變，該突變導致效應功能降低或不存在；及(iii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段與SEQ ID NO: 1多肽於抗原決定基處結合，該抗原決定基在SEQ ID NO: 1之位置42處包括胺基酸殘基色胺酸。

術語「效應功能」係指抗體之Fc區或恆定區結合免疫系統之蛋白質及/或細胞的功能性能力。具有降低之效應功能的抗體及對該等抗體工程化之方法在此項技術中已為熟知(參見, 例如WO 05/18572, WO 05/03175及US 6,242,195)且在本文中進一步詳細描述。典型效應功能包括結合補體蛋白(例如補體蛋白C1q)及/或Fc受體(FcR)(例如, FcγRI、FcγRII、FcγRIIa、FcγRIII及/或FcγRIIIb)之能力。能夠結合前述分子中之一或多者的功能性結果包括(但不限於)助噬作用、吞噬作用、抗原依賴性細胞毒性(ADCC)、補體依賴性細胞毒性(CDC)及/或效應細胞調節。效應功能降低係指至少部分藉由Fc與其同源受體或與補體蛋白或效應細胞結合而誘導之生物化學活性或細胞活性中之一或多者降低, 同時雖然具有降低、類似、相同或增加之結合親和力, 但仍維持抗體(或其片段)之可變區之抗原結合活性。效應功能(例如Fc與Fc受體或補體蛋白之結合性)降低可以「降低倍數」(例如降低1.5倍、2倍及其類似者)表示且可基於(例如)使用此項技術中已知之結合檢定所測定之結合活性降低百分比來計算(參見, 例如WO 05/18572)。Fc介導之受體過度交聯亦可為增強活性之因素。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如, 經分離抗體或其抗原結合片段), 其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽在與單株抗體P4A8、P3G5或P2D3(或包含P4A8之VH及VL域之單株抗體、包含P3G5之VH及VL域之單株抗體或包含P2D3之VH及VL域之單株抗體)相同之抗原決定

基處選擇性結合；及(ii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。

在一些實施例中，本文所述之Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)與SEQ ID NO: 1多肽之結合阻斷或降低TWEAK與多肽之結合。可在各種基於細胞之系統中量測TWEAK與Fn14之結合。舉例而言，可用編碼Fn14之載體轉染細胞且可藉由使經轉染細胞與連接可偵測標記之可溶性TWEAK蛋白接觸來量測TWEAK與該等細胞之結合。可將Fn14結合蛋白添加至細胞中，隨後添加可溶性TWEAK蛋白以判定Fn14結合蛋白是否阻斷或降低TWEAK與Fn14之結合。

本文亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合，且模擬至少一種由TWEAK與Fn14結合產生之生物活性，例如誘導IL-8、誘導卡斯蛋白酶(caspase)裂解及/或誘導NFkB活性(例如，促效劑抗體)。

本文進一步揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合，且亦與獼猴、小鼠及大鼠Fn14顯著(或可偵測地)結合。

本文亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合，且在與細胞表面上之Fn14結合之後內化至細胞中。

與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合且殺死腫瘤細胞之抗體或其抗原結合片段包括具有本文所述特徵之任何組合的抗體，該等特徵例如(i)促效劑活性或模擬至少一些由TWEAK與Fn14結合產生之生物效應，(ii)顯著阻斷TWEAK與Fn14結合，(iii)與包括W42之人類Fn14之抗原決定基結合，(iv)與人類、獼猴、大鼠及小鼠Fn14顯著結合，及(iv)至少一些效應功能之誘導缺乏或降低。舉例而言，在一實施例中，Fn14抗體為阻斷TWEAK與Fn14結合之促效劑抗體。抗體可與包涵W42之Fn14之抗原決定基進一步結合及/或具有效應功能降低之Fc區。

在某些實施例中，與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合且誘導或增強細胞死亡之經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)並非此項技術中已知之抗體，例如，如(例如)Nakayama等人，(2003) J. Immunol. 170:341，Nakayama等人，(2003) BBRC 306:819及Harada等人，(2002) BBRC 299:488中所述之ITEM-1、ITEM-2、ITEM-3或ITEM-4。

在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有在 10^{-2} 至 10^{-6}s^{-1} ，通常 10^{-2} 至 10^{-5}s^{-1} ，例如 10^{-2} 至 10^{-3}s^{-1} ，諸如 1×10^{-3} 至 $5\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 之範圍內的解離動力學(亦參見實例14)。在一實施例中，抗體以與單株抗體P4A8或其經修飾形式類似(例如，在單株抗體P4A8或其經修飾形式之五倍或十倍以內)之親和力及/或動力學與人類Fn14結合，其經修飾形式為例如其嵌合形式或人類化形式(例如，本文所述之人類

化形式)。可(例如)使用生物感測器技術(BIACORE™)來測試抗Fn14抗體之親和力及結合動力學。

在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有在 10^{-2} 至 10^{-6}s^{-1} ，通常 10^{-2} 至 10^{-5}s^{-1} 之範圍內的解離動力學。在一實施例中，抗體以與單株抗體P2D3或其經修飾形式類似(例如，在單株抗體P2D3或其經修飾形式之五倍或十倍以內)之親和力及/或動力學與人類Fn14結合，其經修飾形式為例如其嵌合形式或人類化形式(例如，本文所述之人類化形式)。

在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有在 10^{-2} 至 10^{-6}s^{-1} ，通常 10^{-2} 至 10^{-5}s^{-1} 之範圍內的解離動力學。在一實施例中，抗體以與單株抗體P3G5或其經修飾形式類似(例如，在單株抗體P3G5或其經修飾形式之五倍或十倍以內)之親和力及/或動力學與人類Fn14結合，其經修飾形式為例如其嵌合形式或人類化形式(例如，本文所述之人類化形式)。

在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有在 10^5 至 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，諸如 5×10^5 至 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，例如 7×10^5 至 $3\times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之範圍內的締合動力學(參見實例14)。在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有 10^5 至 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，諸如 5×10^5 至 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，例如 7×10^5 至 $3\times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之締合常數及 10^{-2} 至 10^{-3}s^{-1} ，諸如 1×10^{-3} 至 $5\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 之解離常數。抗體或其抗原結合片段可具有 10^{-10} 、 10^{-9} 或 10^{-8}M 或更低，諸如在 10^{-10}M 至 10^{-9}M ，例如 5×10^{-10} 至 $5\times 10^{-9}\text{M}$ 或 1×10^{-9} 至 $5\times 10^{-9}\text{M}$ 。

之範圍內的親合力常數(參見實例14)。此等動力學參數可為抗體或其抗原結合片段與可溶性Fn14蛋白結合之特徵，該可溶性Fn14蛋白為諸如可溶性人類Fn14蛋白，例如基本上由人類Fn14之胞外區或半胱胺酸富集區(例如，人類Fn14之胺基酸28-68、69、70或80附近，或胺基酸28附近至胺基酸68至80之胺基酸附近)組成之可溶性人類Fn14蛋白。

在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段與人類Fn14之殘基C49、W42、K48、D51、R58、A57、H60、R56、L46、M50及R58中之一或多者相互作用。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列至少80%一致之VH域；及(iii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，VH域與SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列至少90%一致。在一些實施例中，VH域與SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列至少95%一致。在一些實施例中，VH域與SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 5、SEQ ID

NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 80% 一致之 VL 域；及 (iii) 活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr 結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，VL 域與 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 90% 一致。在一些實施例中，VL 域與 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 95% 一致。在一些實施例中，VL 域與 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列一致。

亦揭示一種經分離 Fn14 結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其 (i) 與在細胞表面上表現之 SEQ ID NO: 1 多肽選擇性結合；(ii) 包含與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列至少 80% 一致之 VH 域；(iii) 包含與 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 80% 一致之 VL 域；及 (iv) 活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr 結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，(i) VH 域與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列至少 90% 一致，及 (ii) VL 域與 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 90% 一致。在一些實施例中，(i) VH 域與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列至少 95% 一致，及 (ii) VL 域與 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 95% 一致。在一些實施例中，(i) VH 域與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列一致，及 (ii) VL 域與 SEQ ID NO:

5、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 7之胺基酸序列一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少80%一致之VH域；及(iii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少90%一致。在一些實施例中，VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少95%一致。在一些實施例中，VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少80%一致之VL域；及(iii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少90%一致。在一些實施例中，VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少95%一致。在一些實施例中，VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID

NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少80%一致之VH域；(iii)包含與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少80%一致之VL域；及(iv)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，(i)VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少90%一致，及(ii)VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少90%一致。在一些實施例中，(i)VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少95%一致，及(ii)VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少95%一致。在一些實施例中，(i)VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列一致，及(ii)VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列一致。在一些實施例中，重鏈包含SEQ ID NO: 37或SEQ ID NO: 39且輕鏈包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 45。在一些實施例中，重鏈包含SEQ ID NO: 37且輕鏈包含SEQ ID NO: 43。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含(a)與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈互補決定區(CDR)，與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID

NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 4之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈CDR，與SEQ ID NO: 4之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 4之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR；及(iii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，第一重鏈CDR與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H1一致，第二重鏈CDR與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H2一致，且第三重鏈CDR與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H3一致。在一些實施例中，第一重鏈CDR與SEQ ID NO: 4之CDR-H1一致，第二重鏈CDR與SEQ ID NO: 4之CDR-H2一致，且第三重鏈CDR與SEQ ID NO: 4之CDR-H3一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VL域，該VL域包含(a)與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L2至少90%一致之第二輕鏈CDR，及與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L3至少90%一致之第三輕鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 7之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 7之CDR-L2至少90%一致之第二輕鏈CDR，及與SEQ ID NO: 7之CDR-L3至少90%一致之第三輕鏈CDR；及(iii)活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr結

腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，第一輕鏈CDR與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L1一致，第二輕鏈CDR與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L2一致，且第三輕鏈CDR與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L3一致。在一些實施例中，第一輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L1一致，第二輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L2一致，且第三輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L3一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含(a)與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈CDR，與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 4之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈CDR，與SEQ ID NO: 4之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 4之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR；(iii)包含VL域，該VL域包含(a)與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L2至少90%一致之第二輕鏈CDR，及與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L3至少90%一致之第三輕鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 7之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 7之CDR-L2至少90%一致之第二輕鏈CDR，及與SEQ ID NO: 7

之 CDR-L3 至少 90% 一致之第三輕鏈 CDR；及 (iv) 活體內或活體外誘導或增強癌細胞(例如，WiDr 結腸癌細胞)之細胞死亡。在一些實施例中，(i) 第一重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 2 之 CDR-H1 一致，第二重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 2 之 CDR-H2 一致，且第三重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 2 之 CDR-H3 一致；及 (ii) 第一輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 5 之 CDR-L1 一致，第二輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 5 之 CDR-L2 一致，且第三輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 5 之 CDR-L3 一致。在一些實施例中，(i) 第一重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 3 之 CDR-H1 一致，第二重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 3 之 CDR-H2 一致，且第三重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 3 之 CDR-H3 一致；及 (ii) 第一輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L1 一致，第二輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L2 一致，且第三輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L3 一致。在一些實施例中，(i) 第一重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 4 之 CDR-H1 一致，第二重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 4 之 CDR-H2 一致，且第三重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 4 之 CDR-H3 一致；及 (ii) 第一輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 7 之 CDR-L1 一致，第二輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 7 之 CDR-L2 一致，且第三輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 7 之 CDR-L3 一致。在一些實施例中，VH 域包含 SEQ ID NO: 8 之胺基酸 1-121。在一些實施例中，VL 域包含 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 1-111。在一些實施例中，VH 域包含 SEQ ID NO: 8 之胺基酸 1-121 且 VL 域包含 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 1-111。在一些實施例中，重鏈包含 SEQ ID NO: 8 且輕鏈包含 SEQ ID NO: 9。在一些實施例中，重鏈

包含SEQ ID NO: 16。在一些實施例中，重鏈包含SEQ ID NO: 16且輕鏈包含SEQ ID NO: 9。

本文所述之抗體或其抗原結合片段可視情況含有與人類生殖系構架區總計至少90%一致(或至少95%、98%或99%一致)之構架區。術語「總計」意謂在序列比較中將所有構架考慮在一起，而非個別構架區。舉例而言，本文所述之抗體或其抗原結合片段可包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之VH域構架區總計至少90%一致(或至少95%、98%或99%一致)之VH域構架區。在另一實例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段可包含與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之VL域構架區總計至少90%一致(或至少95%、98%或99%一致)之VL域構架區。在一些狀況下，本文所述之抗體或其抗原結合片段可包含(i)與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之VH域構架區總計至少90%一致之VH域構架區，及(ii)與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之VL域構架區總計至少90%一致之VL域構架區。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含SEQ ID NO: 11；及(iii)包含VL域，該VL域包含SEQ ID NO: 13。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID

NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含與SEQ ID NO: 11之CDR一致或與SEQ ID NO: 11之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 11之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致；及(iii)包含VL域，該VL域包含與SEQ ID NO: 13之CDR一致或與SEQ ID NO: 13之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 13之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含SEQ ID NO: 11；及(iii)包含VL域，該VL域包含SEQ ID NO: 14。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含與SEQ ID NO: 11之CDR一致或與SEQ ID NO: 11之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 11之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致；及(iii)包含VL域，該VL域包含與SEQ ID NO: 14之CDR一致或與SEQ ID NO: 14之CDR之不同之處在於至多一個、兩

個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 14之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含SEQ ID NO: 11；及(iii)包含VL域，該VL域包含SEQ ID NO: 15。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含與SEQ ID NO: 11之CDR一致或與SEQ ID NO: 11之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 11之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致；及(iii)包含VL域，該VL域包含與SEQ ID NO: 15之CDR一致或與SEQ ID NO: 15之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 15之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含SEQ ID NO: 12；及(iii)包含VL域，該VL域包含SEQ ID NO:

13。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含與SEQ ID NO: 12之CDR一致或與SEQ ID NO: 12之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 12之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致；及(iii)包含VL域，該VL域包含與SEQ ID NO: 13之CDR一致或與SEQ ID NO: 13之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 13之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含SEQ ID NO: 12；及(iii)包含VL域，該VL域包含SEQ ID NO: 14。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含與SEQ ID NO: 12之CDR一致或與SEQ ID NO: 12之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 12之

構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致；及(iii)包含VL域，該VL域包含與SEQ ID NO: 14之CDR一致或與SEQ ID NO: 14之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 14之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含SEQ ID NO: 12；及(iii)包含VL域，該VL域包含SEQ ID NO: 15。

亦揭示一種經分離Fn14結合蛋白(例如，經分離抗體或其抗原結合片段)，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含與SEQ ID NO: 12之CDR一致或與SEQ ID NO: 12之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 12之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致；及(iii)包含VL域，該VL域包含與SEQ ID NO: 15之CDR一致或與SEQ ID NO: 15之CDR之不同之處在於至多一個、兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，其中構架區與SEQ ID NO: 15之構架區總計至少90%、95%、97%、98%或99%一致。

在一實施例中，抗體或抗原結合片段包括全部六種來自

P4A8之CDR或緊密相關之CDR，例如一致或具有至少一個胺基酸改變但不多於兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，或本文所述之其他CDR。

在一實施例中，抗體或抗原結合片段包括全部六種來自P3G5之CDR或緊密相關之CDR，例如一致或具有至少一個胺基酸改變但不多於兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，或本文所述之其他CDR。

在一實施例中，抗體或抗原結合片段包括全部六種來自P2D3之CDR或緊密相關之CDR，例如一致或具有至少一個胺基酸改變但不多於兩個、三個或四個改變(例如，取代、缺失或插入)的CDR，或本文所述之其他CDR。

與Fn14蛋白相互作用之抗Fn14抗體或其抗原結合片段之胺基酸較佳未經突變(或，若經突變，則由保守胺基酸殘基置換)。在P4A8抗體之變體或源自P4A8之抗體的變體或抗原結合片段(例如，包含SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 13之抗體或抗原結合片段)之一實施例中，CDR L1之殘基S32未經改變。在另一實施例中，CDR L1之殘基Y34未經改變。在另一實施例中，CDR L1之殘基Y36未經改變。在另一實施例中，CDR L2之殘基Y54未經改變。在另一實施例中，CDR L3之殘基R96未經改變。在另一實施例中，CDR H1之殘基D31未經改變。在另一實施例中，CDR H1之殘基Y32未經改變。在另一實施例中，CDR H2之殘基S52未經改變。在另一實施例中，CDR H2之殘基Y54未經改變。在另一實施例中，CDR H2之殘基N55未經改變。在另一實

施例中，CDR H2之殘基Y57未經改變。在另一實施例中，CDR H3之殘基Y101未經改變。在另一實施例中，CDR H3之殘基Y105未經改變。在另一實施例中，CDR H3之殘基Y106未經改變。

在一實施例中，抗體或抗原結合片段係如本文所述，其限制條件為CDR中之至少一者、兩者、三者、四者、五者或六者或可變鏈中之一或兩者並非來自已知抗體(例如，ITEM-1、ITEM-2、ITEM-3或ITEM-4)。

在一實施例中，抗體或抗原結合片段不與其他TNF及TNFR家族成員交叉反應。

本文所述之抗體或抗原結合片段可為(例如)人類化抗體、完全人類抗體、單株抗體、單鏈抗體、單價抗體、多株抗體、嵌合抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、多價抗體、F_{ab}片段、F_{(ab')₂}片段、F_{ab'}片段、F_{sc}片段或F_v片段。

本文所述之抗體或抗原結合片段可為「多特異性」的，例如雙特異性、三特異性或具更高多特異性，意謂其同時識別且結合一或多個不同抗原(例如蛋白質)上所存在之兩個或兩個以上不同抗原決定基。因此，結合分子為「單特異性」抑或「多特異性」(例如「雙特異性」)的係指與該結合分子反應之不同抗原決定基之數目。多特異性抗體可對Fn14蛋白之不同抗原決定基具特異性，或可對Fn14以及對異源抗原決定基(諸如異源多肽或固體載體材料)具特異性。

如本文所用之術語「價」(如「多價抗體」中所用)係指結合分子中所存在之潛在結合域(例如抗原結合域)之數目。各結合域與一個抗原決定基特異性結合。當結合分子包含一個以上結合域時，各結合域可與相同抗原決定基特異性結合(對於具有兩個結合域之抗體而言，稱為「二價單特異性」)或與不同抗原決定基特異性結合(對於具有兩個結合域之抗體而言，稱為「二價雙特異性」)。抗體亦可為雙特異性的且對各特異性而言為二價的(稱為「雙特異性四價抗體」)。在另一實施例中，可製得四價微型抗體或域缺失抗體。

雙特異性二價抗體及其製造方法描述於(例如)美國專利第 5,731,168 號，第 5,807,706 號，第 5,821,333 號；及美國申請公開案第 2003/020734 號及第 2002/0155537 號中，所有該等案之揭示內容皆以引用的方式併入本文中。雙特異性四價抗體及其製造方法描述於(例如)WO 02/096948 及 WO 00/44788 中，該等案之揭示內容均以引用的方式併入本文中。一般而言，參見 PCT 公開案 WO 93/17715，WO 92/08802，WO 91/00360，WO 92/05793，WO 2007/109254；Tutt 等人，J. Immunol. 147:60-69 (1991)；美國專利第 4,474,893 號，第 4,714,681 號，第 4,925,648 號，第 5,573,920 號，第 5,601,819 號；Kostelny 等人，J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)。

抗體之重鏈及輕鏈可為大體上全長的。蛋白質可包括至少一個及視情況兩個完整重鏈及至少一個及視情況兩個完

整輕鏈或可包括抗原結合片段。在其他實施例中，抗體具有選自(例如)IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD及IgE之重鏈恆定區。重鏈恆定區通常為人類恆定區或人類恆定區之經修飾形式。在另一實施例中，抗體具有選自(例如) κ 或 λ ，尤其 κ (例如，人類 κ)之輕鏈恆定區。

在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段之結合使得細胞表面上之Fn14受體交聯或叢集。舉例而言，抗體或其抗原結合片段可(例如)藉由與蛋白質A結合而形成多聚體，或可為多價的。

本文所述之抗體或抗原結合片段可經修飾以增強效應功能，例如，以增強抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)或增強目標受體/Fn14之交聯。此可藉由將一或多個胺基酸取代引入抗體之Fc區中來達成。或者或另外，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，藉此允許在此區域中形成鏈間雙硫鍵。由此產生之同源二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增加之補體介導之細胞死亡及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。具有增強之抗腫瘤活性的同源二聚抗體亦可使用如Wolff等人，Cancer Research 53:2560-2565 (1993)中所述之異源雙功能交聯劑來製備。或者，可對具有雙Fc區且可藉此具有增強之補體溶解及ADCC能力之抗體工程化。參見Stevenson等人，Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。

本文亦提供編碼本文所述之抗體或其抗原結合片段之核

酸(例如DNA)。與此等核酸至少約80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致或在嚴格雜交條件下與此等核酸雜交之核酸亦涵蓋於本文中。

亦揭示一種產生本文所述之抗體或抗原結合片段之經分離細胞。本文亦提供包含編碼本文所述蛋白質之核酸的細胞(例如經分離細胞)。細胞可為(例如)藉由將哺乳動物B細胞與骨髓瘤細胞融合而獲得之融合細胞。

亦揭示一種醫藥組合物，其包含本文所述之抗體或抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。

在另一態樣中，本發明之特徵在於一種誘導腫瘤細胞死亡之方法，該方法包含使表現Fn14之腫瘤細胞與有效誘導腫瘤細胞死亡之量的本文所述抗體或抗原結合片段接觸。

亦揭示一種預防或減少腫瘤細胞生長之方法，該方法包含向具有腫瘤之哺乳動物投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含有效預防或減少腫瘤細胞生長之量的本文所述抗體或抗原結合片段。

亦揭示一種治療癌症之方法，該方法包含向患有癌症之哺乳動物投與包含治療有效量之本文所述抗體或抗原結合片段的醫藥組合物。癌症可為(例如)結腸癌或乳癌。

根據本文所述之方法治療之哺乳動物可為(例如)人類、小鼠、大鼠、乳牛、豬、狗、貓或猴。

應瞭解，當在本文中提及「抗體或抗原結合片段」時，此片語可由「蛋白質」替代。因此，抗體及其抗體結合片段之描述亦適用於蛋白質，諸如包含此等抗體或其抗體結

合片段之蛋白質。

除非另有規定，否則本文所用之所有技術術語及科學術語皆具有與一般熟習本發明所屬技術者通常所理解之含義相同的含義。儘管與本文所述之方法及材料類似或等價之方法及材料可用於本發明之實施或測試，但在下文描述例示性方法及材料。本文提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻皆以其全文引用的方式併入。在相衝突之狀況下，本申請案(包括定義)將占支配地位。材料、方法及實例僅為說明性的且並不意欲作限制。

本發明之其他特徵及優勢將自以下實施方式及申請專利範圍顯而易見。

【實施方式】

P4A8、P2D3、P3G5及P3D8為與人類Fn14特異性結合且拮抗(agonize)Fn14活性或模擬至少一些由TWEAK與細胞表面上之Fn14結合產生之活性的例示性抗體。已發現P2D3與P3D8具有相同胺基酸序列。本文所述之抗Fn14抗體誘導細胞死亡，例如藉由細胞凋亡(諸如卡斯蛋白酶依賴性細胞凋亡)及/或內源TNF- α 介導之細胞死亡，且可用以治療或預防Fn14介導之病症(諸如癌症)。

Fn14

Fn14為FGF誘導性受體。其常常在正常組織之細胞上以低量表現，且可在損傷或疾病中或在癌症(例如腫瘤)細胞上上調。在不受理論束縛之情況下，咸信Fn14受Fn14配位體(例如TWEAK)刺激可誘導腫瘤細胞死亡，且抗Fn14抗體

亦將有效殺死腫瘤細胞。亦咸信Fn14在人類腫瘤中過度表現。抗Fn14抗體可觸發腫瘤細胞死亡且因此在治療學上有益於治療癌症。

人類Fn14之序列展示為：

MARGSLRRLRLLLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGS
SWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCAAAPPAPFRLLW
PILGGALSLTFVLGLLSGFLVWRRRCRRREKFTTPIEETGGE
GCPAVALIQ(SEQ ID NO: 1)。

其他Fn14蛋白序列包括：小鼠Fn14(例如，NCBI寄存編號AAF07882或NP_038777或Q9CR75或AAH25860)、人類Fn14(例如，NCBI寄存編號NP_057723或BAA94792或Q9NP84或AAH02718或AAF69108)；大鼠Fn14(例如，NCBI寄存編號NP_851600或AAH60537)；及爪蟾Fn14(例如，NCBI寄存編號AAR21225或NP_001083640)。可將此等Fn14蛋白用作(例如)製備抗Fn14抗體之免疫原。如本文所述，可接著篩選抗Fn14抗體以鑑別促效劑抗體。

抗Fn14抗體

本揭示案包括抗Fn14促效劑抗體(諸如P4A8、P2D3、P3G5及P3D8)之特定實例的序列。諸如此等之特定抗體可(例如)藉由製備及表現編碼所述胺基酸序列之合成基因或藉由使人類生殖系基因突變以提供編碼所述胺基酸序列之基因而製得。此外，此等抗體及其他抗Fn14抗體(例如，促效劑抗體)可(例如)使用以下方法中之一或多者產生。

眾多方法可用於獲得抗體，尤其人類抗體。一種例示性

方法包括篩選蛋白質表現庫，例如噬菌體呈現庫或核糖體呈現庫。噬菌體呈現描述於(例如)U.S. 5,223,409；Smith (1985) *Science* 228:1315-1317；WO 92/18619；WO 91/17271；WO 92/20791；WO 92/15679；WO 93/01288；WO 92/01047；WO 92/09690及WO 90/02809中。Fab在噬菌體上之呈現描述於(例如)美國專利第5,658,727號，第5,667,988號及第5,885,793號中。

除使用呈現庫以外，其他方法亦可用於獲得Fn14結合抗體。舉例而言，Fn14蛋白或其肽可用作非人類動物中之抗原，該非人類動物為例如齧齒動物，例如小鼠、倉鼠或大鼠。

在一實施例中，非人類動物包括人類免疫球蛋白基因之至少一部分。舉例而言，可能以人類Ig基因座之大片段對小鼠抗體產生不足之小鼠品系工程化。使用融合瘤技術，可產生及選擇源自具有所要特異性之基因的抗原特異性單株抗體。參見，例如XENOMOUSE™，Green等人，(1994) *Nature Genetics* 7:13-21，U.S. 2003-0070185，WO 96/34096及WO 96/33735。

在另一實施例中，自非人類動物獲得單株抗體，且接著加以修飾，例如人類化或去免疫。Winter描述可用於製備本文所述之人類化抗體之例示性CDR移植方法(U.S. 5,225,539)。特定人類抗體之所有或一些CDR可由非人類抗體之至少一部分置換。僅可有必要置換結合該等CDR或結合該等CDR之決定子所需之CDR以得到與Fn14結合之適

用人類化抗體。

可藉由以來自人類Fv可變區之等價序列置換並不直接涉及抗原結合之Fv可變區之序列來產生人類化抗體。產生人類化抗體之通用方法係由Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi等人, (1986) *BioTechniques* 4:214; 及US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205及US 6,407,213提供。彼等方法包括分離、操縱及表現核酸序列, 該等核酸序列編碼來自重鏈或輕鏈中之至少一者之所有或一部分免疫球蛋白Fv可變區。該核酸之來源為熟習此項技術者所熟知且(例如)可自產生針對預定標靶之抗體的融合瘤(如上所述), 自生殖系免疫球蛋白基因或自合成構築體獲得。可接著將編碼人類化抗體之重組DNA選殖至適當表現載體中。

人類生殖系序列揭示於(例如)Tomlinson, I.A.等人, (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P.等人, (1995) *Immunol. Today* 16:237-242; Chothia, D.等人, (1992) *J. Mol. Bio.* 227:799-817; 及Tomlinson等人, (1995) *EMBO J* 14:4628-4638中。V BASE目錄提供人類免疫球蛋白可變區序列之詳盡目錄(由Tomlinson, I.A.等人, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK彙編)。此等序列可用作人類序列之來源, 例如用於構架區及CDR。亦可(例如)如美國專利第6,300,064號中所述使用一致人類構架區。

非人類Fn14結合抗體亦可由WO 98/52976及WO 00/34317中所揭示之方法藉由人類T細胞抗原決定基之特

異性缺失或「去免疫」來修飾。簡言之，可針對與II類MHC結合之肽分析抗體之重鏈及輕鏈可變區；此等肽表示潛在T細胞抗原決定基(如WO 98/52976及WO 00/34317中所定義)。為偵測潛在T細胞抗原決定基，可應用稱為「肽穿過(peptide threading)」之電腦模擬法，且另外可如WO 98/52976及WO 00/34317中所述在人類II類MHC結合肽之資料庫中搜尋 V_H 及 V_L 序列中所存在之基元。此等基元與18個主要II類MHC DR異型中之任一者結合，且因此構成潛在T細胞抗原決定基。所偵測之潛在T細胞抗原決定基可藉由取代可變區中之少數胺基酸殘基或較佳藉由單一胺基酸取代基來消除。儘可能進行保守性取代。常常但並非排他地，可使用對人類生殖系抗體序列中之位置常見的胺基酸。在鑑別去免疫變化之後，可藉由誘變或其他合成方法(例如，重新合成、卡匣置換等)來構築編碼 V_H 及 V_L 之核酸。經誘變之可變序列可視情況與人類恆定區(例如人類IgG1或 κ 恆定區)融合。

在一些狀況下，潛在T細胞抗原決定基將包括已知或預測對抗體功能重要之殘基。舉例而言，潛在T細胞抗原決定基通常偏向於CDR。另外，潛在T細胞抗原決定基可存在於對抗體結構及結合重要之構架殘基中。消除此等潛在抗原決定基之變化在一些狀況下將需要更多精細研究，例如藉由製造及測試有或無變化之鏈。若可能，則可藉由在CDR外進行取代來消除與CDR重疊之潛在T細胞抗原決定基。在一些狀況下，CDR內之改變為唯一選擇，且因此可

測試有或無此取代之變體。在其他狀況下，移除潛在T細胞抗原決定基所需之取代處於可能對抗體結合至關重要之構架內殘基位置處。在此等狀況下，測試有或無此取代之變體。因此，在一些狀況下，設計若干變體去免疫之重鏈及輕鏈可變區且測試各種重鏈/輕鏈組合以鑑別最佳去免疫抗體。可接著藉由結合去免疫程度考慮不同變體之結合親和力，尤其保留於可變區中之潛在T細胞抗原決定基之數目來進行最終去免疫抗體之選擇。去免疫可用於修飾任何抗體，例如包括非人類序列之抗體，例如合成抗體、鼠類抗體、其他非人類單株抗體或自呈現庫分離之抗體。

亦可使用使抗體人類化之其他方法。舉例而言，其他方法可說明抗體之三維結構、與結合決定子三維鄰近之構架位置，及免疫原性肽序列。參見，例如WO 90/07861；美國專利第5,693,762號，第5,693,761號，第5,585,089號，第5,530,101號及第6,407,213號；Tempest等人，(1991) *Biotechnology* 9:266-271。另一方法稱為「人體化(humaneering)」且描述於(例如)U.S. 2005-008625中。

抗體可包括人類Fc區，例如野生型Fc區或包括一或多個改變之Fc區。在一實施例中，恆定區經改變(例如經突變)以調節抗體之特性(例如，增加或減小下列項中之一或多者：Fc受體結合性、抗體糖基化、半胱胺酸殘基數目、效應細胞功能或補體功能)。舉例而言，人類IgG1恆定區可在一或多個殘基(例如殘基234及237中之一或多者)處突變。抗體可在重鏈之CH2區中具有突變，該等突變降低或

改變效應功能，例如Fc受體結合性及補體活化。舉例而言，抗體可具有諸如美國專利第5,624,821號及第5,648,260號中所述之突變的突變。如此項技術中所揭示(例如，Angal等人，(1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08)，抗體亦可具有使在免疫球蛋白之兩條重鏈之間的雙硫鍵穩定之突變，諸如IgG4之鉸鏈區中之突變。亦參見，例如U.S. 2005-0037000。

親和力成熟

在一實施例中，藉由(例如)誘變來修飾抗Fn14抗體以提供經修飾抗體之集合。接著評估經修飾抗體以鑑別一或多個具有改變之功能特性(改良之結合性、改良之穩定性、減小之抗原性或增加之活體內穩定性)的抗體。在一實施中，將呈現庫技術用於選擇或篩選經修飾抗體之集合。接著(例如)藉由使用較高嚴格度或較具競爭性結合及洗滌條件自第二庫鑑別較高親和力抗體。亦可使用其他篩選技術。

在一些實施中，誘變靶向已知或可能處於結合界面處之區域。舉例而言，若經鑑別之結合蛋白為抗體，則誘變可針對如本文所述之重鏈或輕鏈之CDR區域。此外，誘變可針對靠近或鄰近CDR之構架區，例如，尤其在CDR接合點之10個、5個或3個胺基酸內之構架區。在抗體之狀況下，誘變亦可限於一或數個CDR，例如以產生逐步改良。

在一實施例中，誘變用於產生與一或多個生殖系序列較類似之抗體。一種例示性生殖系方法可包括：鑑別一或多

個與經分離抗體之序列類似(例如，在特定資料庫中最類似)之生殖系序列。接著可在經分離抗體中以遞增、組合或兩者之方式產生突變(在胺基酸層面上)。舉例而言，產生包括編碼一些或所有可能生殖系突變之序列的核酸庫。接著評估經突變抗體，例如以鑑別相對於經分離抗體具有一或多個其他生殖系殘基且仍適用(例如，具有功能活性)之抗體。在一實施例中，將儘可能多的生殖系殘基引入經分離抗體中。

在一實施例中，誘變用於將一或多個生殖系殘基取代至或插入CDR區中。舉例而言，生殖系CDR殘基可來自與經修飾之可變區類似(例如，最類似)之生殖系序列。誘變之後，可評估抗體之活性(例如，結合性或其他功能活性)以判定生殖系殘基是否具有耐受性。可在構架區中進行類似誘變。

可以不同方式進行生殖系序列選擇。舉例而言，若生殖系序列滿足選擇性或相似性之預定準則，例如相對於供體非人類抗體至少某一百分比一致，例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%一致，則可選擇該生殖系序列。可使用至少2個、3個、5個或10個生殖系序列進行選擇。在CDR1及CDR2之狀況下，鑑別類似生殖系序列可包括選擇一種該序列。在CDR3之狀況下，鑑別類似生殖系序列可包括選擇一種該序列，但可包括使用獨立貢獻於胺基末端部分及羧基末端部分之兩個生殖系序列。在其他實施中，使用

一個以上或兩個以上生殖系序列，例如以形成一致序列。

在其他實施例中，抗體可經修飾以具有改變之糖基化模式(亦即，自原始或原生糖基化模式改變)。如此情形中所用之「改變」意謂使一或多個碳水化合物部分缺失及/或將一或多個糖基化位點添加至原始抗體中。可藉由改變胺基酸序列以含有糖基化位點一致序列來實現糖基化位點添加至目前所揭示之抗體中；該等技術在此項技術中已為熟知。增加抗體上碳水化合物部分之數目的另一方式係藉由糖苷與抗體之胺基酸殘基化學或酶促偶合。此等方法描述於(例如)WO 87/05330及Aplin及Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:259-306中。移除抗體上所存在之任何碳水化合物部分可如此項技術中所述(Hakimuddin等人，(1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52；Edge等人，(1981) *Anal. Biochem.* 118:131；及Thotakura等人，(1987) *Meth. Enzymol.* 138:350)以化學方式或酶促方式實現。關於藉由提供救助受體結合抗原決定基來增加活體內半衰期之修飾，參見，例如美國專利第5,869,046號。

在一實施例中，抗體具有與P4A8、P2D3、P3G5或P3D8之CDR序列僅有非實質性差異之CDR序列。非實質性差異包括微小胺基酸變化，諸如取代CDR(例如，Chothia或Kabat CDR)之序列中通常任何5-7個胺基酸中之一或兩者。胺基酸通常係由具有類似電荷、疏水性或立體化學特徵之相關胺基酸取代。該等取代將在技術者之一般技術範圍內。與CDR中之情況不同，在不會不利影響抗體之結合

特性的情況下可在結構構架區(FR)中產生較多實質性變化。FR之變化包括(但不限於)使源自非人類之構架人類化或對對抗原接觸或結合位點穩定化重要之某些構架殘基工程化，例如改變恆定區之種類或子類，改變可能改變效應功能(諸如Fc受體結合性)之特異性胺基酸殘基(Lund等人，(1991) *J. Immun.* 147:2657-62；Morgan等人，(1995) *Immunology* 86:319-24)，或改變恆定區所源自之物種。

抗Fn14抗體可呈全長抗體之形式或呈抗體片段之形式，該等片段為例如Fab、F(ab')₂、Fd、dAb及scFv片段。其他形式包括蛋白質，該蛋白質包括單一可變域，例如駱駝域或駱駝化域。參見，例如U.S. 2005-0079574及Davies等人，(1996) *Protein Eng.* 9(6):531-7。

本文提供包含抗Fn14抗體與其一或多種酸性變體之混合物的組合物，例如，其中酸性變體之量小於約80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或1%。亦提供包含抗Fn14抗體之組合物，該抗Fn14抗體包含至少一個去醯胺位點，其中組合物之pH值為約5.0至約6.5，使得(例如)至少約90%之抗Fn14抗體未經去醯胺(亦即，小於約10%之抗體經去醯胺)。在某些實施例中，小於約5%、3%、2%或1%之抗體經去醯胺。pH值可為5.0到6.0，諸如5.5或6.0。在某些實施例中，組合物之pH值為5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5。

「酸性變體」為所關注之多肽的變體，其比所關注之多肽更具酸性(例如，如陽離子交換層析所測定)。酸性變體

之一實例為去醯胺變體。

多肽分子之「去醯胺」變體為如下多肽，其中原始多肽之一或多個天冬醯胺殘基已轉化為天冬胺酸鹽，亦即，中性醯胺側鏈已轉化為具有全部酸性特徵之殘基。

如本文關於包含抗Fn14抗體之組合物所用之術語「混合物」意謂存在所要抗Fn14抗體與其一或多種酸性變體。酸性變體可主要包含去醯胺抗Fn14抗體與微量其他酸性變體。

在一實施例中，使去醯胺位點(NG)內或去醯胺位點附近之胺基酸突變以減少或消除抗體去醯胺。舉例而言，人類化P4A8重鏈SEQ ID NO: 11之CDR2在位置55(N; Asn)及56(G; Gly)處含有去醯胺位點(NG)。可將至少一個胺基酸取代引入在對應於SEQ ID NO: 11之位置54、55或56之位置處含有SEQ ID NO:11(或本文所述之其變體)之CDR2的抗體之CDR2內，以減少或消除抗體去醯胺，其中：位置54為Gly、Ala、Ser、Val、Thr、Leu、Ile、Met、Phe、Tyr或Trp；位置55為Asn、Gln、Arg、Asp、Ser、Gly或Ala；位置56為Gly、Ala、Ser、Val、Thr、Leu、Ile、Met、Phe、Tyr或Trp；其限制條件為當位置55為Asn時，位置56不為Gly。舉例而言，在去醯胺位點NG中，N或G可取代另一胺基酸。在一實施例中，在胺基酸位置55(N55)處之天冬醯胺經絲胺酸取代(亦即，CDR2之N55S突變體)。類似物之其他實例包括：位置54為Gly，位置55為Asn，且位置56為Val；位置54為Gly，位置55為Asn，且位

置 56 為 Ala；位置 54 為 Gly，位置 55 為 Asp，且位置 56 為 Gly；位置 54 為 Gly，位置 55 為 Gln，且位置 56 為 Gly；位置 54 為 Gly，位置 55 為 Ala，且位置 56 為 Gly；位置 54 為 Gly，位置 55 為 Gly，且位置 56 為 Gly；位置 54 係選自由 Gly、Ala、Ser、Val、Thr、Leu、Ile、Met、Phe、Tyr 及 Trp 組成之群，位置 55 為 Ala，且位置 56 為 Gly；且位置 54 係選自由 Gly、Ala、Ser、Val、Thr、Leu、Ile、Met、Phe、Tyr 及 Trp 組成之群，位置 55 為 Gly，且位置 56 為 Gly(參見，例如 WO2003/073982)。

在某些實施例中，經突變以消除去醯胺之抗體的結合親和力(K_D)、締合速率(on-rate)(締合 K_D)及/或解離速率(off-rate)(解離 K_D)與野生型抗體之彼者類似，例如具有小於約 5 倍、2 倍、1 倍(100%)、50%、30%、20%、10%、5%、3%、2%或 1%之差異。

在某些實施例中，抗 Fn14 抗體抑制血管生成。或者，抗 Fn14 抗體可刺激血管生成或對血管生成無作用。可在活體外或活體內檢定中，例如在針對 HUVEC 細胞之內皮細胞增殖檢定中，或在角膜囊袋檢定及此項技術中已知之其他檢定(例如，美國專利第 6,824,773 號中所述)中測定對血管生成之作用。

抗體片段

傳統上，抗體片段係經由完整抗體之蛋白水解消化而得。或者，此等片段可由重組宿主細胞直接產生。Fab、Fv 及 ScFv 抗體片段皆可在大腸桿菌(*E. coli*)中表現且自大

腸桿菌分泌，因此允許易於產生大量此等片段。可自抗體噬菌體庫分離抗體片段。或者，Fab'-SH片段可自大腸桿菌直接回收且經化學偶合以形成F(ab)₂片段(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根據另一方法，F(ab')₂片段可自重組宿主細胞培養物直接分離。包含救助受體結合抗原決定基殘基之具有增加之活體內半衰期的Fab及F(ab')₂片段描述於美國專利第5,869,046號中。在其他實施例中，所選抗體為單鏈Fv片段(scFv)。Fv及scFv含有無恆定區之完整組合位點；因此，其適合於在活體內使用期間降低之非特異性結合。可構築scFv融合蛋白以得到效應蛋白在scFv之胺基末端或羧基末端之融合。舉例而言，如美國專利第5,641,870號中所述，抗體片段亦可為「線抗體」。該等線抗體片段可為單特異性或雙特異性的。

雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩種不同抗原決定基具有結合特異性之抗體。例示性雙特異性抗體可與Fn14蛋白之兩種不同抗原決定基結合。其他該等抗體可將Fn14結合位點與另一蛋白質之結合位點組合。或者，可將抗Fn14臂與結合白血球上之觸發分子(諸如T細胞受體分子(例如CD3))或IgG之Fc受體(Fc-γ-R)(諸如Fc-γ-RI(CD64)、Fc-γ-RII(CD32)及Fc-γ-RIII(CD16))之臂組合，以使細胞防禦機制集中於且定位於Fn14表現細胞。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位於表現Fn14之細胞。此等抗體具有Fn14結合臂及結

合細胞毒性劑(例如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素- α 、長春花屬生物鹼(vinca alkaloid)、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、甲胺喋呤(methotrexate)或放射性同位素半抗原)之臂。可將雙特異性抗體製備為全長抗體或抗體片段(例如， $F(ab')_2$ 雙特異性抗體)。

全長雙特異性抗體之傳統製備係基於兩條免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共同表現，其中該兩條鏈具有不同特異性(Millstein等人，Nature 305:537-539 (1983))。在一不同方法中，使具有所要結合特異性之抗體可變域與免疫球蛋白恆定域序列融合。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及(必要時)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入獨立表現載體中且共同轉染至合適宿主細胞中。此在調整三個多肽片段之比例方面提供較大靈活性。然而，當至少兩條多肽鏈以等比率之表現產生高產率時，有可能將兩條或全部三條多肽鏈之編碼序列插入單一表現載體中。

根據美國專利第5,731,168號中所述之另一方法，可對一對抗體分子之間的界面工程化以使自重組細胞培養物回收之異源二聚體的百分比最大化。較佳界面包含 C_{H3} 域之至少一部分。在此方法中，一或多個來自第一抗體分子之界面的小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)置換。藉由以較小胺基酸側鏈(例如，丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈，在第二抗體分子之界面上產生具有與大側鏈相同或類似之尺寸的補償「空腔」。此提供使異源二聚體之產率增加超過其他不合需要之最終產物(諸如同源二

聚體)的機制。

雙特異性抗體包括交聯或「異源結合」抗體。舉例而言，呈異源結合物形式之抗體中之一者可與抗生物素蛋白偶合，另一者與生物素偶合。可使用任何便利的交聯方法製得異源結合抗體。

「微型雙功能抗體(diabody)」技術提供製造雙特異性抗體片段之替代性機制。該等片段包含由連接子與 V_L 連接之 V_H ，該連接子過短以致不允許同一鏈上之兩個域之間配對。因此，迫使一個片段之 V_H 及 V_L 域與另一片段之互補 V_L 及 V_H 域配對，藉此形成兩個抗原結合位點。

多價抗體

多價抗體可比二價抗體更快地由表現抗體所結合之抗原的細胞內化(及/或異化)。本文所述之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(例如，四價抗體)，其可易於藉由重組表現編碼抗體之多肽鏈的核酸來產生。多價抗體可包含二聚化域及三個或三個以上抗原結合位點。例示性二聚化域包含Fc區或鉸鏈區(或由Fc區或鉸鏈區組成)。多價抗體可包含三個至約八個(例如四個)抗原結合位點(或由三個至約八個(例如四個)抗原結合位點組成)。多價抗體視情況包含至少一條多肽鏈(例如，至少兩條多肽鏈)，其中該(該等)多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，多肽鏈可包含 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ ，其中 $VD1$ 為第一可變域， $VD2$ 為第二可變域， Fc 為Fc區之多肽鏈， $X1$ 及 $X2$ 表示胺基酸或肽間隔子，且 n 為0或1。

抗體產生

一些抗體(例如 Fab)可在例如大腸桿菌細胞之細菌細胞中產生。抗體亦可在真核細胞中產生。在一實施例中，抗體(例如 scFv)在諸如畢赤酵母(*Pichia*)(參見，例如 Powers 等人，(2001) *J Immunol Methods*. 251:123-35)、漢森酵母(*Hansenula*)或酵母(*Saccharomyces*)之酵母細胞中表現。

在一較佳實施例中，抗體係於哺乳動物細胞中產生。表現抗體之例示性哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)(包括 Urlaub 及 Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 中所述之 *dhfr*⁻ CHO 細胞，其與(例如)如 Kaufman 及 Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621 中所述之 DHFR 可選擇標記一起使用)、淋巴細胞株(例如 NS0 骨髓瘤細胞及 SP2 細胞)、COS 細胞及來自轉殖基因動物(例如轉殖基因哺乳動物)之細胞。舉例而言，細胞為乳腺上皮細胞。

除編碼多樣化免疫球蛋白域之核酸序列以外，重組表現載體亦可帶有其他序列，諸如調節載體在宿主細胞中之複製的序列(例如複製起點)及可選擇標記基因。可選擇標記基因有助於選擇載體已引入其中之宿主細胞(參見，例如美國專利第 4,399,216 號，第 4,634,665 號及第 5,179,017 號)。舉例而言，在載體已引入其中之宿主細胞上，可選擇標記基因通常賦予對諸如 G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤之藥物的抗性。

在抗體表現之例示性系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將

編碼抗體重鏈與抗體輕鏈之重組表現載體引入 *dhfr⁻* CHO 細胞中。在重組表現載體內，抗體重鏈基因及輕鏈基因各自操作性地連接至強化子/啟動子調節元件(例如，源自SV40、CMV、腺病毒及其類似物，諸如CMV強化子/AdMLP啟動子調節元件或SV40強化子/AdMLP啟動子調節元件)以推動高水準之基因轉錄。重組表現載體亦帶有DHFR基因，其允許選擇已使用甲胺喋呤選擇/擴增以載體轉染之CHO細胞。培養所選轉化體宿主細胞以允許表現抗體重鏈及輕鏈且自培養基回收抗體。標準分子生物學技術用於製備重組表現載體，轉染宿主細胞，選擇轉化體，培養宿主細胞，且自培養基回收抗體。舉例而言，可藉由親和層析以蛋白質A或蛋白質G偶合基質分離一些抗體。

對於包括Fc域之抗體而言，抗體產生系統較佳合成Fc區經糖基化之抗體。舉例而言，IgG分子之Fc域在CH2域中之天冬醯胺297處經糖基化。此天冬醯胺為以雙觸型寡糖修飾之位點。已證實此糖基化為由Fcγ受體及補體C1q介導之效應功能所需(Burton及Woof (1992) *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis等人，(1998) *Immunol. Rev.* 163:59-76)。在一實施例中，在將對應於天冬醯胺297之殘基適當糖基化之哺乳動物表現系統中產生Fc域。抗體之Fc域或其他區亦可包括其他真核轉譯後修飾。

抗體亦可由轉殖基因動物產生。舉例而言，美國專利第5,849,992號描述一種在轉殖基因哺乳動物之乳腺中表現抗體之方法。構築包括乳特異性啟動子及編碼所關注抗體之

核酸及供分泌用之信號序列的轉殖基因。由該等轉殖基因哺乳動物之雌性動物產生之乳包括其中所分泌之所關注抗體。抗體可自該乳純化，或直接用於一些應用。亦提供包含本文所述核酸中之一或多者的動物。

表徵

抗體之結合特性可由任何標準方法量測，該標準方法為例如以下方法中之一者：BIAcore™分析、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、螢光共振能量轉移(FRET)、x射線結晶分析、序列分析及掃描誘變。抗體較佳具有統計學上顯著之作用，其指示抗體促進Fn14之一或多種活性(例如，促進Fn14信號轉導)。

表面電漿共振(SPR)

所關注之蛋白質與標靶(例如Fn14)之結合相互作用可使用SPR分析。在未標記相互作用物中之任一者的情況下，SPR或生物分子相互作用分析(BIA)即時偵測生物特異性相互作用。在BIA晶片之結合表面處的質量變化(指示結合事件)引起表面附近之光的折射率改變(表面電漿共振(SPR)之光學現象)。折射率之變化產生可偵測信號，其經量測作為生物分子之間即時反應之指示。使用SPR之方法描述於(例如)美國專利第5,641,640號；Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag；Sjolander及Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345；Szabo等人，(1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705及由BIAcore International AB(Uppsala, Sweden)提供之線上資源中。來自SPR之資訊

可用於提供生物分子與標靶結合之平衡解離常數(K_d)及動力學參數(包括 K_{on} 及 K_{off})之精確及定量量度。

亦可藉由使用BIAcore層析技術評估不同抗體彼此競爭性地結合Fn14(例如人類Fn14)之能力來直接定位抗原決定基 (Pharmacia BIAtechnology Handbook, 「 Epitope Mapping」, 6.3.2部分, (1994年5月); 亦參見Johne等人, (1993) *J. Immunol. Methods*, 160:191-198)。例如在西方墨點法及免疫沈澱檢定中評估抗體之其他通用導則可見於 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow及Lane編, Cold Spring Harbor press (1988)中。

促效劑抗體

一旦已鑑別與Fn14結合之抗體, 即可對抗體進行檢定以判定抗體是否為Fn14之促效劑。可評估抗Fn14抗體增加或活化Fn14信號轉導之下游效應(例如, 增加或活化Fn14由天然配位體(例如TWEAK)接合之下游事件)或模擬由天然配位體(例如TWEAK)與Fn14結合引起之效應的能力。模擬可與天然配位體之效應程度相同或比天然配位體之效應程度更小或更大, 只要引起相同類型之效應即可。

舉例而言, 可評估抗體誘導或增強Fn14表現細胞(例如癌細胞, 諸如WiDr結腸癌細胞)之細胞死亡的能力。在另一實施例中, 評估抗體誘導或增強Fn14表現細胞(例如A375細胞)中之IL-8分泌, 誘導或增加NF-KB p52及/或細胞週期抑制劑p21 Waf1/Cip1表現或蛋白質含量之能力。

具有與小鼠或人類化P4A8之活性類似之活性的抗體可

用於治療如本文所述之癌症，例如，其中相同量之抗體產生小鼠或人類化P4A8所產生之作用的至少約50%、75%、80%、90%、95%、97%、98%或99%之作用。舉例而言，誘導P4A8所產生之IL-8量的至少約50%之量的IL-8產生之抗Fn14抗體；誘導至少50%與P4A8一樣有效地殺死細胞之抗體；及誘導NK-KB p52或p21表現至P4A8所產生之量的至少約50%之量的抗體可分別用於治療癌症。

寄存物

產生單株抗體 1.P4A8.3C7(P4A8)、單株抗體 1.P3G5.1E4(P3G5)及單株抗體 1.P2D3.3D5(P2D3)之融合瘤已於2009年4月7日在國際承認用於專利程序的微生物寄存之布達佩斯條約(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure)之條款下寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)，且具有寄存編號 HYB-53541(P4A8)、HYB-53362(P3G5)及 HYB-53363(P2D3)。當因對此所頒布之專利之期限結束之前寄存物之狀況要求時，若寄存處不能提供樣本，則申請者認可其有義務替換寄存物。申請者亦認可其有責任通知ATCC該專利頒布，屆時寄存物將為公眾可用。在彼時之前，寄存物將在37 C.F.R. § 1.14及35 U.S.C. § 112之條款下為專利委員可用。

具有降低之效應功能的抗體

抗體及抗體-抗原複合物與免疫系統細胞之相互作用觸

發多種反應，在本文中稱作效應功能。IgG抗體藉由與細胞表面Fc γ 受體家族之成員及與補體系統之C1q結合來活化免疫系統之效應路徑。由叢集之抗體連接效應蛋白觸發多種反應，包括釋放發炎性細胞激素、調節抗原產生、細胞攝粒作用及細胞死亡。在一些臨床應用中，此等反應對單株抗體之功效至關重要。在其他臨床應用中，其引起不合需要之副作用，諸如發炎及消除帶有抗原之細胞。因此，本發明進一步係關於Fn14結合蛋白，包括改變(例如降低)效應功能的抗體。

可使用許多已知檢定中之一者來測定本發明之抗Fn14抗體之效應功能。抗Fn14抗體之效應功能相對於第二抗Fn14抗體可降低。在一些實施例中，第二抗Fn14抗體可為特異性結合Fn14之任何抗體。在一些實施例中，第二抗Fn14抗體可為野生型抗體。在其他實施例中，第二Fn14特異性抗體可為本發明之抗體中之任一者，諸如P4A8。在其他實施例中，若已經修飾所關注之抗Fn14抗體以降低效應功能時，該第二抗Fn14抗體可為未經修飾或親本型式之抗體。

例示性效應功能包括Fc受體結合性、吞噬作用、細胞凋亡、促炎反應、下調細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)，等等。其他效應功能包括抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)，藉以使抗體結合導致細胞死亡之細胞毒性T細胞、自然殺手(natural killer, NK)細胞或巨噬細胞上之Fc受體；及補體依賴性細胞毒性(CDC)，其係經由補體級聯之活化而誘導細胞死亡(評論於Daeron, *Annu. Rev.*

Immunol. 15:203-234 (1997) ; Ward 及 Ghetie, *Therapeutic Immunol.* 2:77-94 (1995) ; 及 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) 中)。該等效應功能一般需要 Fc 區與結合域(例如抗體可變域)組合，且可使用此項技術中已知之標準檢定來評估(參見，例如 WO 05/018572、WO 05/003175 及 U.S. 6,242,195)。

可藉由使用缺乏 Fc 域之抗體片段(諸如 Fab、Fab'2 或單鏈 Fv)來避免效應功能。一替代方案已使用 IgG4 亞型抗體，其與 Fc γ RI 結合但與 C1q 及 Fc γ RII 及 RIII 結合不良。IgG2 亞型亦與 Fc 受體之結合性降低，但保持與 Fc γ RIIa 之 H131 異型及與 C1q 顯著結合。因此，需要 Fc 序列之其他變化以消除與所有 Fc 受體及與 C1q 之結合。

包括 ADCC 之若干抗體效應功能係由結合抗體之 Fc 區的 Fc 受體(FcR)介導。抗體對特定 FcR 之親和力及因此由該抗體介導之效應活性可藉由改變抗體之 Fc 區及/或恆定區之胺基酸序列及/或轉譯後修飾來調節。

FcR 係由其對免疫球蛋白同型之特異性來定義；IgG 抗體之 Fc 受體稱作 Fc γ R，IgE 抗體之 Fc 受體稱作 Fc ϵ R，IgA 抗體之 Fc 受體稱作 Fc α R，等。已鑑別 Fc γ R 之三個子類：Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32) 及 Fc γ RIII(CD16)。Fc γ RII 與 Fc γ RIII 均具有兩種類型：Fc γ RIIA(CD32) 與 Fc γ RIIB(CD32)；及 Fc γ RIIIA(CD16a) 與 Fc γ RIIIB(CD16b)。因為各 Fc γ R 子類係由兩個或三個基因編碼，且替代性 RNA 拼接產生多個轉錄物，所以存在 Fc γ R 同功異型物之廣泛多樣性。

舉例而言，Fc γ RII(CD32)包括同功異型物IIa、IIb1、IIb2、IIb3及IIc。

先前已將Fc γ R在人類及鼠類抗體上之結合位點定位於由殘基 233-239(如 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)；Woof 等人，*Molec. Immunol.* 23:319-330 (1986)；Duncan 等人，*Nature* 332:563 (1988)；Canfield及Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491 (1991)；Chappel 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:9036-9040 (1991)中之EU索引編號)組成之所謂「較低鉸鏈區」。在殘基 233-239 中，P238及S239為提及可能涉及結合之彼等者。可能涉及與Fc γ R結合之其他先前提及之區域為：人類Fc γ RI之G316-K338(人類IgG)(僅藉由序列比較；評估無取代突變體)(Woof等人，*Molec. Immunol.* 23:319-330 (1986))；人類Fc γ RIII之K274-R301(人類IgG1)(基於肽)(Sarmay等人，*Molec. Immunol.* 21:43-51 (1984))；及人類Fc γ RIII之Y407-R416(人類IgG)(基於肽)(Gergely等人，*Biochem. Soc. Trans.* 12:739-743 (1984)；及Shields等人，*J Biol Chem* 276:6591-6604 (2001)；Lazar GA等人，*Proc Natl Acad Sci* 103:4005-4010 (2006))。根據對Ig-FcR複合物之晶體結構的檢查，涉及FcR結合之胺基酸殘基之此等及其他段或區可為熟習此項技術者顯而易見(參見，例如Sondermann等人，2000 *Nature* 406(6793):267-73 及Sondermann等人，2002

Biochem Soc Trans. 30(4):481-6)。因此，本發明之抗Fn14抗體包括對上述殘基中之一或多者的修飾。

降低mAb效應功能之其他已知方法包括使涉及效應結合相互作用之在mAb表面上的胺基酸突變(Lund, J.等人，(1991) *J. Immunol.* 147(8):2657-62；Shields, R. L.等人，(2001) *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-604)；及使用不同亞型序列區段之組合(例如，IgG2與IgG4組合)以得到與Fc γ 受體之結合性比單獨任一亞型降低更多(Armour等人，*Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-1624；*Mol. Immunol.* 40 (2003) 585-593)。

對一些或所有Fc受體亞型具有改變及/或降低之親和力(及因此具有改變及/或降低之效應功能)的眾多Fc變體在此項技術中已知。參見，例如US 2007/0224188；US 2007/0148171；US 2007/0048300；US 2007/0041966；US 2007/0009523；US 2007/0036799；US 2006/0275283；US 2006/0235208；US 2006/0193856；US 2006/0160996；US 2006/0134105；US 2006/0024298；US 2005/0244403；US 2005/0233382；US 2005/0215768；US 2005/0118174；US 2005/0054832；US 2004/0228856；US 2004/132101；US 2003/158389；亦參見US 7,183,387；6,737,056；6,538,124；6,528,624；6,194,551；5,624,821；5,648,260。

在CDC中，抗體-抗原複合物結合補體，引起補體級聯活化且產生攻膜複合物。典型補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組份(C1q)與結合同源抗原之抗體(適當子類之

抗體)結合而引發；因此補體級聯之活化係部分由免疫球蛋白與C1q蛋白之結合親和力來調節。為活化補體級聯，有必要使C1q與IgG1、IgG2或IgG3之至少兩個分子但僅與連接抗原標靶之IgM之一個分子結合(Ward及Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995)第80頁)。為評估補體活化，可進行(例如)如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述之CDC檢定。

已提出IgG分子之各種殘基涉及與C1q之結合，該等殘基包括CH2域上之Glu318、Lys320及Lys322殘基，定位於緊鄰同一 β 股之轉角上的胺基酸殘基331，定位於較低鉸鏈區中之Lys235及Gly237殘基，及定位於CH2域之N末端區中之殘基231至238(參見，例如Xu等人，*J. Immunol.* 150:152A (摘要) (1993)；WO94/29351；Tao等人，*J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993)；Brekke等人，*Eur. J. Immunol.* 24:2542-47 (1994)；Burton等人，*Nature*, 288:338-344 (1980)；Duncan及Winter，*Nature* 332:738-40 (1988)；Idusogie等人，*J Immunol* 164:4178-4184 (2000)；U.S. 5,648,260；及U.S. 5,624,821)。作為IgG1之實例，人類IgG1之CH2域之COOH末端區的兩個突變-K322A及P329A-並不活化CDC路徑且經顯示引起C1q結合性降低100倍以上(US 6,242,195)。

因此，在本發明之某些實施例中，可將此等殘基中之一或多者加以修飾、取代或移除，或可插入一或多個胺基酸殘基以降低本文所提供之Fn14抗體之CDC活性。舉例而

言，在一些實施例中，可能需要降低或消除主題抗體之效應功能以降低或消除進一步活化免疫反應之潛力。具有降低之效應功能的抗體亦可在接受該等抗體之個體中降低血栓栓塞事件之風險。

在某些其他實施例中，本發明提供一種抗Fn14抗體，其展現與一或多種FcR受體之結合性降低，但維持其結合補體之能力(例如，至與原生、非變異或親本抗Fn14抗體類似之程度或在一些實施例中至小於原生、非變異或親本抗Fn14抗體之程度)。因此，本發明之抗Fn14抗體可結合及活化補體，同時展現與FcR(諸如FcγRIIa，例如在血小板上表現之FcγRIIa)之結合性降低。與FcγRIIa(諸如在血小板上表現之FcγRIIa)之結合性降低或無結合性但在至少一定程度上可結合C1q且活化補體級聯的抗體將降低血栓栓塞事件之風險，同時維持可能需要之效應功能。在替代性實施例中，本發明之抗Fn14抗體展現與一或多種FcR之結合性降低，但維持其結合一或多種其他FcR之能力。參見，例如US 2007-0009523、2006-0194290、2005-0233382、2004-0228856及2004-0191244，其描述產生與FcRI、FcRII及/或FcRIII之結合性降低之抗體的各種胺基酸修飾，以及引起與一種FcR之結合性增加但與另一FcR之結合性降低的胺基酸取代。

因此，涉及抗Fn14抗體之恆定區的效應功能可藉由改變恆定區及尤其Fc區之特性來調節。在某些實施例中，將具有降低之效應功能的抗Fn14抗體與具有效應功能且可為非

變異、原生或親本抗體(包含介導效應功能之原生恆定區或Fc區)之第二抗體相比。在特定實施例中，效應功能調節包括活性被消除或完全不存在之情形。

原生序列Fc區或恆定區包含與自然界中所見之Fc區或恆定鏈區之胺基酸序列一致的胺基酸序列。用於評估相對效應功能之對照分子較佳包含與測試抗體或變異抗體相同類型/亞型之Fc區。藉助於至少一個胺基酸修飾(諸如轉譯後修飾、胺基酸取代、插入或缺失)，變異或改變之Fc區或恆定區包含與原生序列重鏈區之胺基酸序列不同的胺基酸序列。因此，變異恆定區可含有一或多個胺基酸取代、缺失或插入，其引起轉譯後修飾改變，包括(例如)糖基化模式改變。親本抗體或Fc區為(例如)具有正常效應功能之用於構築具有改變(例如降低)之效應功能之恆定區(亦即，Fc)的變體。

可藉由對具有變異恆定區、Fc區或重鏈區之抗體工程化或產生具有變異恆定區、Fc區或重鏈區之抗體來產生具有改變(例如降低或消除)之效應功能的抗體。重組DNA技術及/或細胞培養及表現條件可用於產生具有改變之功能及/或活性的抗體。舉例而言，重組DNA技術可用於在影響抗體功能(包括效應功能)之區域(諸如Fc區或恆定區)中對一或多個胺基酸取代、缺失或插入工程化。或者，可藉由操縱產生抗體之宿主細胞及細胞培養及表現條件來達成轉譯後修飾(諸如糖基化模式(參見下文))之變化。

諸如胺基酸取代之胺基酸改變可改變本發明之抗Fn14抗

體之效應功能而不影響抗原結合親和力。舉例而言，上文所述之胺基酸取代(例如，Glu318、Kys320、Lys332、Lys235、Gly237、K332及P329)可用於產生具有降低之效應功能的抗體。

在其他實施例中，可對以下胺基酸殘基中之一或多者進行胺基酸取代：重鏈恆定區之234、235、236、237、297、318、320及322(參見US 5,624,821及US 5,648,260)。該等取代可改變效應功能，同時保持抗原結合活性。如與未經修飾或非變異抗體相比，在胺基酸234、235、236及237中之一或多者處之改變可降低Fc區對FcγRI受體之結合親和力。胺基酸殘基234、236及/或237可經(例如)丙胺酸取代，且胺基酸殘基235可經(例如)麩醯胺酸取代。在另一實施例中，抗Fn14 IgG1抗體可包含在位置234處以Ala取代Leu，在位置235處以Glu取代Leu，及在位置237處以Ala取代Gly。

或者或另外，可改變在318、320及322處之Fc胺基酸殘基。在小鼠及人類IgG中高度保守之此等胺基酸殘基介導補體結合。已顯示此等胺基酸殘基之改變降低C1q結合性，但並不改變抗原結合性、蛋白質A結合性或Fc與小鼠巨噬細胞結合之能力。

在另一實施例中，本發明之抗Fn14抗體為包含降低或消除效應功能之取代的IgG4免疫球蛋白。本發明之抗Fn14抗體之IgG4 Fc部分可包含以下取代中之一或多者：在殘基233處以脯胺酸取代麩胺酸、在殘基234處以丙胺酸或纈胺

酸取代苯丙胺酸及在殘基235處以丙胺酸或麩胺酸取代白胺酸(EU編號, Kabat, E. A.等人, (1991), 同上)。此外, 藉由在殘基297(EU編號)處以Ala取代Asn而移除IgG4 Fc區中之N-連接糖基化位點可進一步降低效應功能且消除任何可存在之殘餘效應活性。具有降低之效應功能的另一例示性IgG4突變體為在重鏈恆定區中含有突變S228P及L235E(PE突變)的IgG4亞型變體。此突變引起效應功能降低。參見US 5,624,821及US 5,648,260。如本文所述, 在IgG4情形中降低效應功能之另一例示性突變為S228P/T229A。

恆定區中之其他例示性胺基酸序列變化包括(但不限於)Bluestone等人所述之Ala-Ala突變(參見WO 94/28027及WO 98/47531; 亦參見Xu等人, 2000 *Cell Immunol* 200, 16-26)。因此, 在某些實施例中, 在恆定區內具有突變(包括Ala-Ala突變)之抗Fn14抗體可用於降低或消除效應功能。根據此等實施例, 抗Fn14抗體之恆定區包含在位置234處突變為丙胺酸或在位置235處突變為丙胺酸。另外, 恆定區可含有雙重突變: 在位置234處突變為丙胺酸及在位置235處二次突變為丙胺酸。

在一實施例中, 抗Fn14抗體包含IgG4構架, 其中Ala-Ala突變將描述在位置234處自苯丙胺酸至丙胺酸之突變及/或在位置235處自白胺酸至丙胺酸之突變。在另一實施例中, 抗Fn14抗體包含IgG1構架, 其中Ala-Ala突變將描述在位置234處自白胺酸至丙胺酸之突變及/或在位置235

處自白胺酸至丙胺酸之突變。或者或另外，抗Fn14抗體可帶有其他突變，包括CH2域中之點突變K322A(Hezareh等人，2001 *J Virol.* 75:12161-8)。

其他例示性胺基酸取代提供於WO 94/29351(以其全文引用的方式併入本文中)中，其陳述在CH2域之N末端區中具有突變之抗體，該等突變改變抗體與FcRI結合之能力，藉此降低抗體與C1q結合之能力，繼而降低抗體固定補體之能力。亦參見Cole等人(*J. Immunol.* (1997) 159:3613-3621)，其描述在IgG2中上部CH2區中之突變，該等突變使得FcR結合性較低。

產生包含胺基酸取代之上述抗體變體中之任一者的方法在此項技術中已為熟知。此等方法包括(但不限於)藉由編碼抗體或至少抗體之恆定區的所製備DNA分子之定點(或寡核苷酸介導)誘變、PCR誘變及卡匣誘變來製備。

定點誘變在此項技術中已為熟知(參見，例如Carter等人，*Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443 (1985)及Kunkel等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1987))。

PCR誘變亦適合於製造起始多肽之胺基酸序列變體。參見Higuchi, *PCR Protocols*，第177-183頁(Academic Press, 1990)；及Vallette等人，*Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989)。製備序列變體之另一方法卡匣誘變係基於Wells等人，*Gene* 34:315-323 (1985)所述之技術。

本發明之另一實施例係關於一種具有降低之效應功能的抗Fn14抗體，其中抗體之Fc區或其部分與具有天然降低之

效應誘導活性之Fc區(或與其部分)交換。舉例而言，人類IgG4恆定區展現補體活化降低或無補體活化。此外，不同IgG分子在其對FcR之結合親和力方面不同，其可至少部分歸因於IgG之鉸鏈區之長度及可撓性不同(結合親和力以IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2之順序降低)。舉例而言，IgG4展現與FcγRIIa之結合性降低或無結合性。關於嵌合分子及嵌合恆定區之實例，參見，例如Gillies等人(*Cancer Res.* 1999, 59:2159-2166)及Mueller等人(*Mol. Immunol.* 1997, 34:441-452)。

本發明亦係關於具有降低之效應功能的抗Fn14抗體，其中Fc區完全不存在。該等抗體亦可稱作本發明之抗體衍生物及抗原結合片段。該等衍生物及片段可與非抗體蛋白質序列或非蛋白質結構融合，尤其與經設計以在投與動物(例如人類個體)時有利於傳遞及/或生物可用性的結構融合(參見下文)。

如上文所討論，鉸鏈區內之變化亦影響效應功能。舉例而言，鉸鏈區之缺失可降低對Fc受體之親和力且可降低補體活化(Klein等人，1981 *PNAS USA* 78:524-528)。因此，本揭示案亦係關於在鉸鏈區中具有改變之抗體。

在特定實施例中，本發明之抗體可經修飾以抑制補體依賴性細胞毒性(CDC)。可藉由將一或多個胺基酸取代、插入或缺失引入抗體之Fc區中來達成經調節之CDC活性(參見，例如US 6,194,551及US 6,242,195)。或者或另外，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，藉此允許在此區域中形成鏈

間雙硫鍵。由此產生之同源二聚抗體可具有改良或降低之內化能力及/或增加或減小之補體介導性細胞死亡。參見 Caron 等人, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992); 及 Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992); WO 99/51642; Duncan 及 Winter *Nature* 322:738-40 (1988); US 5,648,260; US 5,624,821; 及 WO 94/29351。

應進一步瞭解, 效應功能可根據抗體之結合親和力而變。舉例而言, 與具有相對較低親和力之抗體相比, 具有高親和力之抗體可更有效地活化補體系統 (Marzocchi-Machado 等人, 1999 *Immunol Invest* 28:89-101)。因此, 可改變抗體使得對其抗原之結合親和力降低 (例如, 藉由以諸如一或多個胺基酸殘基之取代、添加或缺失的方法改變抗體之可變區)。具有降低之結合親和力的抗體可展現效應功能降低, 包括 (例如) ADCC 及/或 CDC 降低。

具有降低之效應功能的本發明抗 Fn14 抗體包括相對於親本或非變異抗 Fn14 抗體對一或多種 Fc 受體 (FcR) 之結合親和力降低的抗體。因此, 具有降低之 FcR 結合親和力的抗 Fn14 抗體包括與親本或非變異抗 Fn14 抗體相比展現對一或多種 Fc 受體之結合親和力降低 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、4 倍或 5 倍或 5 倍以上之抗 Fn14 抗體。在一些實施例中, 具有降低之效應功能的抗 Fn14 抗體相對於親本或非變異抗體以約小 10 倍之親和力與 FcR 結合。在其他實施例中, 具有降低之效應功能的抗 Fn14 抗體相對於親本或非變異抗體以約小 15 倍之親和力或以約小 20 倍之親和力與 FcR 結合。FcR

受體可為Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)及Fc γ RIII及其同功異型物及Fc ϵ R、Fc μ R、Fc δ R及/或Fc α R中之一或多者。在特定實施例中，具有降低之效應功能的抗Fn14抗體展現對Fc γ RIIa之結合親和力降低1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍或5倍或5倍以上。

因此，在某些實施例中，相對於第二抗Fn14抗體，本發明之抗Fn14抗體展現與補體蛋白之結合性降低。在某些實施例中，相對於第二抗Fn14抗體，本發明之抗Fn14抗體展現結合性降低約1.5倍或1.5倍以上、約2倍或2倍以上、約3倍或3倍以上、約4倍或4倍以上、約5倍或5倍以上、約6倍或6倍以上、約7倍或7倍以上、約8倍或8倍以上、約9倍或9倍以上、約10倍或10倍以上或約15倍或15倍以上。

本發明之某些實施例係關於一種包含一或多個選自SEQ ID NO: 2之CDR-H1、SEQ ID NO: 2之CDR-H2及SEQ ID NO: 2之CDR-H3的重鏈CDR序列之抗Fn14抗體，其中該抗體進一步包含較之原生或親本Fc區賦予降低之效應功能的變異Fc區。在其他實施例中，抗Fn14抗體包含CDR中之至少兩者，且在其他實施例中，抗體包含重鏈CDR序列中之全部三者。

本發明之其他實施例係關於一種包含一或多個選自SEQ ID NO: 5之CDR-L1、SEQ ID NO: 5之CDR-L2及SEQ ID NO: 5之CDR-L3的輕鏈CDR序列之抗Fn14抗體，該抗體進一步包含較之原生或親本Fc區賦予降低之效應功能的變異Fc區。在其他實施例中，抗Fn14抗體包含輕鏈CDR中之至

少兩者，且在其他實施例中，抗體包含輕鏈CDR序列中之全部三者。

在本發明之其他實施例中，具有降低之效應功能的抗Fn14抗體包含SEQ ID NO: 5之全部三個輕鏈CDR序列且包含SEQ ID NO: 2之全部三個重鏈CDR序列。

在其他實施例中，本發明係關於一種包含SEQ ID NO: 9之胺基酸1-111之V_L序列的抗Fn14抗體，該抗體進一步包含較之原生或親本Fc區賦予降低之效應功能的變異Fc區。

在其他實施例中，本發明係關於一種包含SEQ ID NO: 8之胺基酸1-121之V_H序列的抗Fn14抗體，該抗體進一步包含較之原生或親本Fc區賦予降低之效應功能的變異Fc區。

具有改變之糖基化的抗Fn14抗體

聚糖移除產生應極大地降低與跨物種Fc受體家族之所有成員之結合性的結構變化。在糖基化抗體(包括抗Fn14抗體)中，與Fc二聚體之CH2域中之保守N-連接位點連接之聚糖(寡糖)封閉於CH2域之間，使得糖殘基與相對CH2域上之特異性胺基酸殘基接觸。不同糖基化模式與抗體之不同生物特性相關(Jefferis及Lund, 1997, *Cham. Immunol.*, 65:111-128; Wright及Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.*, 15: 26-32)。某些特異性糖型(glycoform)賦予潛在有利之生物特性。聚糖之損失改變域之間的間隔且增加其相對於彼此之遷移率且預期對Fc受體家族之所有成員的結合性皆具有抑制作用。舉例而言，以各種糖基化抗體進行之活體外研究已證實移除CH2聚糖改變Fc結構，使得抗體與Fc受

體及補體蛋白C1Q之結合性極大地降低。降低效應功能之另一已知方法為抑制在Fc之CH2域中位置297(EU編號)處之N-連接聚糖產生或移除在Fc之CH2域中位置297(EU編號)處之N-連接聚糖(Nose等人, 1983 *PNAS* 80:6632; Leatherbarrow等人, 1985 *Mol. Immunol.* 22:407; Tao等人, 1989 *J. Immunol.* 143:2595; Lund等人, 1990 *Mol. Immunol.* 27:1145; Dorai等人, 1991 *Hybridoma* 10:211; Hand等人, 1992 *Cancer Immunol. Immunother.* 35:165; Leader等人, 1991 *Immunology* 72:481; Pound等人, 1993 *Mol. Immunol.* 30:233; Boyd等人, 1995 *Mol. Immunol.* 32:1311)。亦已知不同糖型可顯著影響治療劑之特性, 包括藥物動力學、藥效學、受體相互作用及組織特異性靶向(Graddis等人, 2002, *Curr Pharm Biotechnol.* 3:285-297)。

詳言之, 對於抗體而言, 除抗體之效應功能(例如, 與誘導CDC之補體複合物C1之結合性及與負責調節ADCC路徑之FcγR受體之結合性)以外, 寡糖結構可影響與蛋白酶抗性、由FcRn受體介導之抗體的血清半衰期、吞噬作用及抗體反饋有關之特性(Nose及Wigzell, 1983; Leatherbarrow及Dwek, 1983; Leatherbarrow等人, 1985; Walker等人, 1989; Carter等人, 1992, *PNAS*, 89:4285-4289)。

因此, 調節抗體之效應功能的另一方式包括改變抗體恆定區之糖基化。改變之糖基化包括(例如)糖基化殘基數目減少或增多、糖基化殘基之模式或位置變化以及糖結構變化。人類IgG上所見之寡糖影響人類IgG之效應功能的程度

(Raju, T.S. *BioProcess International* 2003年4月44-53)；人類IgG寡糖之微異質性可影響生物功能，諸如CDC及ADCC、與各種Fc受體之結合性及與C1q蛋白之結合性(Wright A.及Morrison SL. *TIBTECH* 1997, 15 26-32；Shields等人，*J Biol Chem.* 2001 276(9):6591-604；Shields等人，*J Biol Chem.* 2002, 277(30):26733-40；Shinkawa等人，*J Biol Chem.* 2003 278(5):3466-73；Umana等人，*Nat Biotechnol.* 1999年2月，17(2):176-80)。舉例而言，IgG結合C1q且活化補體級聯之能力可取決於定位於兩個CH2域之間的碳水化合物部分(其通常錨定於Asn297處)之存在、不存在或修飾(Ward及Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995))。

可由標準技術鑑別含Fc多肽(例如抗體，諸如IgG抗體)中之糖基化位點。糖基化位點之鑑別可根據實驗或基於序列分析或模擬數據。已描述一致基元，亦即，由各種糖基轉移酶識別之胺基酸序列。舉例而言，N-連接糖基化基元之一致基元常為NXT或NXS，其中X可為除脯胺酸以外之任何胺基酸。亦已描述用於定位潛在糖基化基元之若干演算法。因此，為鑑別抗體或含Fc片段內之潛在糖基化位點，例如，藉由使用公開可用之資料庫，諸如由生物序列分析中心(Center for Biological Sequence Analysis)提供之網站(參見用於預測N-連接糖基化位點之NetNGlyc服務及用於預測O-連接糖基化位點之NetOGlyc服務)來檢查抗體之序列。

活體內研究已證實去糖基抗體之效應功能降低。舉例而言，去糖基抗CD8抗體不能耗盡小鼠中帶有CD8之細胞(Isaacs, 1992 *J. Immunol.* 148:3062)且去糖基抗CD3抗體在小鼠或人類中並不誘發細胞激素釋放症候群(Boyd, 1995同上；Friend, 1999 *Transplantation* 68:1632)。

重要地，儘管CH2域中之聚糖移除似乎對效應功能具有顯著影響，但抗體之其他功能及物理特性保持不變。特定言之，已顯示聚糖移除對血清半衰期及與抗原之結合性具有極小影響至無影響(Nose, 1983同上；Tao, 1989同上；Dorai, 1991同上；Hand, 1992同上；Hobbs, 1992 *Mol. Immunol.* 29:949)。

儘管去糖基方法存在活體內驗證，但存在關於去糖基mAb之殘餘效應功能的報導(參見，例如Pound, J. D.等人，(1993) *Mol. Immunol.* 30(3):233-41；Dorai, H.等人，(1991) *Hybridoma* 10(2):211-7)。Armour等人顯示與FcγRIIa及FcγRIIb蛋白之殘餘結合性(*Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-1624；*Mol. Immunol.* 40 (2003) 585-593)。因此，效應功能(尤其補體活化)之進一步降低對在一些情況下保證活性完全除去可為重要的。出於彼原因，IgG2與IgG4及G1/G4雜交體之去糖基形式預期適用於本發明之方法及具有降低之效應功能的本發明之抗體組合物。

可修飾或改變本發明之抗Fn14抗體以引發效應功能降低(與第二Fn14特異性抗體相比)同時視情況保持Fc部分之其他有價值屬性。

因此，在某些實施例中，本發明係關於具有降低之效應功能的去糖基抗Fn14抗體，其特徵在於在抗體之Fc部分之CH2域中保守N-連接位點處的修飾。Fc二聚體之CH2域中保守N-連接位點之修飾可產生去糖基抗Fn14抗體。該等修飾之實例包括使Fc二聚體之CH2域中保守N-連接位點突變、移除與CH2域中之N-連接位點連接之聚糖，及防止糖基化。舉例而言，去糖基抗Fn14抗體可藉由將重鏈CH2域中之標準N-連接Asn位點變為Gln殘基而產生(參見，例如WO 05/03175及US 2006-0193856)。

在本發明之一實施例中，修飾包含在重鏈糖基化位點處之突變以防止在該位點處糖基化。因此，在本發明之一實施例中，去糖基抗Fn14抗體係藉由使重鏈糖基化位點突變，亦即，N298Q(使用Kabat EU編號為N297)突變來製備且在適當宿主細胞中表現。舉例而言，此突變可藉由遵循關於來自Amersham-Pharmacia Biotech®(Piscataway, NJ, USA)之獨特位點誘變套組的製造商推薦方案來實現。

突變抗體可在宿主細胞(例如NSO或CHO細胞)中穩定表現且接著經純化。作為一實例，可使用蛋白質A層析及凝膠過濾層析來進行純化。熟習此項技術者將顯而易見，亦可使用表現及純化之其他方法。

在本發明之另一實施例中，去糖基抗Fn14抗體具有降低之效應功能，其中在該抗體或抗體衍生物之Fc部分之CH2域中保守N-連接位點處的修飾包含移除CH2域聚糖，亦即，去糖基化。此等去糖基抗Fn14抗體可由習知方法產生

且接著以酶促方式去糖基化。將抗體以酶促方式去糖基化之方法為熟習此項技術者所熟知(Williams, 1973 ; Winkelhake及Nicolson, 1976 *J. Biol Chem.* 251:1074-80)。

在本發明之另一實施例中，可藉由使產生抗體之宿主細胞在包含諸如衣黴素(tunicamycin)之糖基化抑制劑的培養基中生長來達成去糖基化(Nose及Wigzell, 1983)。亦即，修飾為減少或防止在該抗體之Fc部分之CH₂域中保守N-連接位點處之糖基化。

在本發明之其他實施例中，重組X多肽(或含有該等多肽之細胞或細胞膜)可用作抗原以產生可接著去糖基化之抗Fn14抗體或抗體衍生物。

在替代性實施例中，本發明之去糖基抗Fn14抗體或具有減少之糖基化的抗Fn14抗體可由Taylor等人(WO 05/18572及US 2007-0048300)中所述之方法產生。舉例而言，在一實施例中，抗Fn14去糖基抗體可藉由改變第一胺基酸殘基(例如，藉由取代、插入、缺失，或藉由化學修飾)而產生，其中改變之第一胺基酸殘基藉由位阻或電荷或兩者來抑制第二殘基之糖基化。在某些實施例中，藉由胺基酸取代來修飾第一胺基酸殘基。在其他實施例中，胺基酸取代基係選自由Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Asn、Gln、Trp、Pro、Ser、Thr、Tyr、Cys、Met、Asp、Glu、Lys、Arg及His組成之群。在其他實施例中，胺基酸取代基為非傳統胺基酸殘基。第二胺基酸殘基可在糖基化基元附近或內部，例如，含有胺基酸序列NXT或NXS之N-連接糖基化

基元附近或內部。在一例示性實施例中，根據Kabat編號，第一胺基酸殘基為胺基酸299且第二胺基酸殘基為胺基酸297。舉例而言，根據Kabat編號，第一胺基酸取代基可為T299A、T299N、T299G、T299Y、T299C、T299H、T299E、T299D、T299K、T299R、T299G、T299I、T299L、T299M、T299F、T299P、T299W及T299V。在特定實施例中，胺基酸取代基為T299C。

亦可藉由修飾本發明之抗體使得該抗體含有阻斷部分來降低效應功能。例示性阻斷部分包括具有足夠空間體積(steric bulk)及/或電荷使得發生糖基化減少之部分，例如，藉由阻斷糖苷酶將多肽糖基化之能力。或者或另外，阻斷部分可降低效應功能，例如，藉由抑制Fc區結合受體或補體蛋白之能力。在一些實施例中，本發明係關於一種包含變異Fc區之Fn14結合蛋白(例如抗Fn14抗體)，該變異Fc區包含第一胺基酸殘基及N-糖基化位點，該第一胺基酸殘基以側鏈化學物修飾以較之未經修飾之第一胺基酸殘基達成空間體積增加或靜電荷增加，藉此降低N-糖基化位點處之糖基化程度或以其他方式改變N-糖基化位點處之糖基化。在某些此等實施例中，變異Fc區較之對照(非變異Fc區)賦予降低之效應功能。在其他實施例中，具有增加之空間體積的側鏈為選自由Phe、Trp、His、Glu、Gln、Arg、Lys、Met及Tyr組成之群之胺基酸殘基的側鏈。在其他實施例中，具有增加之靜電荷的側鏈化學物為選自由Asp、Glu、Lys、Arg及His組成之群之胺基酸殘基的側

鏈。

因此，在一實施例中，糖基化及Fc結合性可藉由以帶電側鏈化學物(諸如D、E、K或R)取代T299來調節。歸因於不利之靜電相互作用，所得抗體將具有減少之糖基化以及對Fc受體降低之Fc結合親和力。

在另一實施例中，經去糖基化且能夠形成半胱胺酸加合物之T299C變異抗體較之其去糖基化抗體對應物可展現較小效應功能(例如FcγRI結合性)(參見，例如WO 05/18572)。因此，鄰近糖基化基元之第一胺基酸改變可抑制抗體在第二胺基酸殘基處之糖基化；當第一胺基酸為半胱胺酸殘基時，抗體可展現甚至進一步降低之效應功能。另外，較之其他亞型中去糖基化之影響，抑制IgG4亞型之抗體糖基化可對FcγRI結合性具有更顯著影響。

在其他實施例中，本發明係關於展現與一或多種FcR受體之結合性降低且視情況亦展現與一或多種Fc受體及/或補體之結合性增加或正常的具有改變之糖基化的抗Fn14抗體，例如，至少維持與原生、對照抗Fn14抗體相同或類似之對一或多種Fc受體及/或補體之結合親和力的具有改變之糖基化的抗體。舉例而言，主要以Man₅GlcNAc₂N-聚糖作為所存在之聚糖結構的抗Fn14抗體(例如，其中Man₅GlcNAc₂N-聚糖結構係以比Ig組合物之下一主要聚糖結構多至少約5莫耳%之含量存在)較之Man₅GlcNAc₂N-聚糖結構並非主要之抗Fn14抗體群體可展現改變之效應功能。主要具有此聚糖結構之抗體展現與FcγRIIa及FcγRIIb

之結合性降低、與FcγRIIIa及FcγRIIIb之結合性增加，及與C1複合物之C1q次單元之結合性增加(參見US 2006-0257399)。此聚糖結構當其為主要聚糖結構時賦予ADCC增加、CDC增加、血清半衰期增加、B細胞之抗體產生增加及經巨噬細胞之吞噬作用減少。

一般而言，醣蛋白上之糖基化結構將視表現宿主及培養條件而變(Raju, TS. *BioProcess International* 2003年4月44-53)。該等差異可引起效應功能與藥物動力學變化(Israel等人, *Immunology*. 1996, 89(4):573-578; Newkirk等人, *P. Clin. Exp.* 1996, 106(2):259-64)。舉例而言，半乳糖基化(galactosylation)可隨細胞培養條件而變，其可視免疫球蛋白組合物之特異性半乳糖模式而致使一些免疫球蛋白組合物具免疫原性(Patel等人, 1992. *Biochem J.* 285:839-845)。非人類哺乳動物細胞所產生之醣蛋白的寡糖結構傾向於與人類醣蛋白之寡糖結構較緊密相關。此外，蛋白質表現宿主系統可經工程化或選擇以表現主要Ig糖型或替代地可天然產生具有主要聚糖結構之醣蛋白。產生具有主要糖型之醣蛋白的工程化蛋白質表現宿主系統之實例包括基因剔除/突變(Shields等人, 2002, *JBC*, 277:26733-26740)、遺傳工程化(Umana等人, 1999, *Nature Biotech.*, 17:176-180)或兩者之組合。或者，某些細胞天然表現主要糖型-例如雞、人類及乳牛(Raju等人, 2000, *Glycobiology*, 10:477-486)。因此，熟習此項技術者藉由選擇許多表現宿主系統中之至少一者可獲得具有改變之糖基

化(例如主要一種特異性聚糖結構)之抗Fn14抗體或抗體組合物的表現。可用於產生本發明之抗Fn14抗體的蛋白質表現宿主系統包括動物細胞、植物細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及其類似物。舉例而言，US 2007-0065909、2007-0020725及2005-0170464描述在細菌細胞中產生去糖基化免疫球蛋白分子。作為另一實例，Wright及Morrison在糖基化不足之CHO細胞株中產生抗體(1994 *J Exp Med* 180:1087-1096)且顯示在此細胞株中所產生之抗體不能進行補體介導之細胞溶解。醣蛋白產生之技術中所見之表現宿主系統之其他實例包括：CHO細胞：Raju WO 99/22764及Presta WO 03/35835；融合瘤細胞：Trebak等人，1999, *J. Immunol. Methods*, 230:59-70；昆蟲細胞：Hsu等人，1997, *JBC*, 272:9062-970；及植物細胞：Gerngross等人，WO 04/74499。在給定細胞或提取物已引起給定基元糖基化之程度上，技術上公認之用於判定基元是否已經糖基化之技術為可用的，例如使用凝膠電泳及/或質譜分析。

改變抗體之糖基化位點的其他方法描述於(例如)US 6,350,861及US 5,714,350、WO 05/18572及WO 05/03175中；此等方法可用於產生具有改變、降低之糖基化或無糖基化之本發明之抗Fn14抗體。

具有降低之效應功能的去糖基抗Fn14抗體或本文所述之其他抗體可為包含修飾或可經結合以包含功能部分之抗體。該等部分包括阻斷部分(例如，PEG部分、半胱胺酸加合物等)、可偵測部分(例如，螢光部分、放射性同位素部

分、放射不透部分等，包括診斷部分)及/或治療部分(例如，細胞毒性劑、消炎劑、免疫調節劑、抗感染劑、抗癌劑、抗神經退化劑、放射性核種等)。

Fn14相關病症

抗Fn14抗體(諸如本文所述之抗體)可用於治療多種病症，諸如Fn14相關病症。舉例而言，抗體可用於治療患者之癌症，例如實體腫瘤癌症。可用抗Fn14抗體治療之癌症的實例包括結腸癌及乳癌。可治療之癌症的其他實例包括：肛門癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、繼發性骨癌、腸癌(結腸直腸癌)、腦癌、繼發性腦癌、乳癌、繼發性乳癌、子宮頸癌、兒科癌症、內分泌癌、眼癌、膽囊癌、胃腸癌(例如胃癌)、食道癌、頭頸癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、腎癌、喉癌、白血病、急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓白血病、慢性淋巴球性白血病、慢性骨髓白血病、肝癌、繼發性肝癌、肺癌(例如NSCLC)、繼發性肺癌、繼發性淋巴結癌、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin Lymphoma)、黑色素瘤、間皮瘤、骨髓瘤、神經內分泌癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、陰莖癌、前列腺癌、直腸癌、皮膚癌、軟組織肉瘤、脊髓癌、胃癌、睪丸癌、胸腺癌、甲狀腺癌、未知原發性癌症、陰道癌、陰門癌及子宮癌(子宮內膜癌)。

可治療之腫瘤包括具有Fn14表現之腫瘤，例如相對於在正常成年細胞上之Fn14表現量具有高Fn14表現之腫瘤。

術語「治療」係指以有效改良病狀、症狀或與病症相關之參數或預防病症(包括由該病症引起之繼發性損害)之發展或惡化達統計學上顯著之程度或達熟習此項技術者可偵測之程度的量、方式及/或模式投與本文所述之組合物。

可向處於此等病症中之一者的風險中、經診斷患有此等病症中之一者或已患有此等病症中之一者的個體以提供全部治療作用之量投與抗Fn14抗體且歷時提供全部治療作用之時間。抗Fn14抗體可單獨或與其他藥劑組合投與。在組合療法之狀況下，投與之量及時間可為提供(例如)協同治療作用之量及時間。此外，投與抗Fn14抗體(與或不與第二藥劑一起)可用作初級治療，例如一線治療；或用作二級治療，例如，用於對先前投與之療法具有不足反應之個體(亦即，除用抗Fn14抗體之療法以外的療法)。在一些實施例中，抗Fn14抗體可與另一化學治療劑組合使用。在一些實施例中，組合療法包括使用兩種或兩種以上抗Fn14抗體，例如本文所述之抗Fn14抗體中之至少一者與另一抗Fn14抗體之組合，例如本文所述之抗Fn14抗體中之兩者或兩者以上。

在某些實施例中，接受抗Fn14抗體之個體在腫瘤細胞上具有Fn14表現，例如相對於正常成年細胞上之Fn14表現量具有高Fn14表現。在某些實施例中，接受抗Fn14抗體之個體並非為在其腫瘤細胞之表面上不具有可偵測之Fn14量的個體。可藉由免疫組織化學或FACS使用(例如)本文所述之抗體來量測腫瘤細胞上之Fn14量。

在某些實施例中，以本文所述之Fn14抗體(例如Fn14促效劑抗體)治療之個體並非為患有因Fn14促效劑抗體或可能因Fn14促效劑抗體而惡化之疾病的個體。舉例而言，在某些實施例中，以Fn14抗體(例如促效劑抗體)治療之個體並非為患有以下疾病之個體：自體免疫疾病、類風濕性關節炎、多發性硬化症、中風、纖維化、神經退化性疾病、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、ALS、全身性紅斑性狼瘡症，或美國專利第7,169,387號、WO 03/086311、WO 2006/088890或WO 2006/089095中所闡述之疾病。在某些實施例中，接受抗Fn14抗體之個體並非為患有或可能出現發炎性或自體免疫疾病之個體，該發炎性或自體免疫疾病為例如類風濕性關節炎、腸病、狼瘡、克隆氏病(Crohn's disease)、多發性硬化症、糖尿病、牛皮癬、急性移植物抗宿主疾病(GVHD)、胰腺炎、遲發型過敏(DTH)。

在某些實施例中，接受抗Fn14抗體之個體已接受或正接受或將接受消炎治療。舉例而言，可在以抗Fn14 Ab治療同時、之前及/或之後用消炎劑治療個體。例示性消炎劑包括甲胺喋呤、TNF- α 阻斷劑、Tweak阻斷劑、改變病情抗風濕藥物(DMARD)、諸如水楊酸鹽(阿司匹靈(Aspirin))之非類固醇消炎藥、金化合物、羥氯喹(Hydroxychloroquine)、青黴胺(penicillamine)、類固醇及免疫抑制藥物。

在某些實施例中，一種方法包含測定個體之腫瘤細胞上所表現之Fn14的量，且接著，若該量高於正常細胞(例如與癌細胞相同類型或譜系之正常細胞)上之量，則以抗

Fn14抗體治療個體；且若該量低於正常細胞(例如與癌細胞相同類型或譜系之正常細胞)上之量或若不存在可偵測量之Fn14，則不以抗Fn14抗體治療個體。

在某些實施例中，一種方法包含判定Fn14是否在個體之腫瘤細胞上表現(以最低臨限量)，且接著，若偵測到Fn14表現(以最低臨限量)，則以抗Fn14抗體治療個體；且若未偵測到Fn14表現(以最低臨限量)，則不以抗Fn14抗體治療個體。

癌症

抗Fn14抗體可用於治療經診斷患有癌症或處於癌症風險中之個體，該癌症為例如結腸癌或乳癌。癌症可為原發性、繼發性或轉移性的。

療法：抗Fn14抗體(諸如本文所述之抗體)可單獨或與另一癌症療法(諸如護理標準療法)組合用於治療癌症或降低癌症出現之風險。除本文所述之組合治療以外，抗Fn14抗體可與吉西他濱(Gemcitabine)(例如用於治療胰腺癌)、紫杉酚(taxol)或曲妥珠單抗(trastuzumab)(例如用於治療乳癌)、伊立替康(Irinotecan)、貝伐單抗(bevacizumab)、5-氟尿嘧啶或西妥昔單抗(cetuximab)(例如用於治療結腸癌)或曲妥珠單抗(例如用於治療胃癌)組合使用。

其他癌症治療包括手術、化學療法、輻射療法、免疫療法及單株抗體療法。Fn14抗體可與此等治療方式中之任一者組合使用。療法之選擇視腫瘤之位置及等級及疾病之階段以及患者之一般狀態而定。

在不損害身體其餘部分之情況下完全移除癌症為治療目標。有時此可藉由手術實現，但癌症傾向於藉由微觀轉移侵襲相鄰組織或擴散至遠端部位常常限制其有效性。化學療法之有效性常常受對體內其他組織之毒性限制。輻射亦可對正常組織造成損害。

手術：理論上，癌症若藉由手術完全移除則可治癒，但此並非始終為可能的。當在手術之前癌症已轉移至體內其他部位時，完全手術切除通常為不可能的。在癌症發展之一模型中，腫瘤局部生長，接著擴散至淋巴結，隨後至身體其餘部分。此已引起僅局部治療之普及，諸如用於小癌症之手術。甚至小局限性腫瘤亦日益被視為具有轉移潛力。

癌症之手術程序的實例包括乳癌之乳房切除術及前列腺癌之前列腺切除術。手術之目標可為僅移除腫瘤或移除整個器官。單一癌細胞為肉眼不可見的但可再長成新腫瘤。

除移除原發腫瘤以外，手術常常為分期所必需，例如，確定疾病程度且判定其是否已轉移至區域性淋巴結。分期為預後及需要輔助療法之主要決定因素。

手術偶爾為緩解性治療所必需，以控制諸如脊髓壓迫或腸阻塞之症狀。

抗Fn14抗體可在手術之前、期間及/或之後與手術組合使用。舉例而言，抗體可在手術之部位處局部投與，例如於腫瘤切除區域中及/或腫瘤切除區域周圍之組織上，或作為已經歷手術之患者復原之後的療法。

輻射療法：輻射療法(亦稱為放射線療法、X射線療法或放射)為使用電離輻射以殺死癌細胞且縮小腫瘤。可經由體外電子束放射線療法(EBRT)以外部方式或經由近接療法以內部方式投與輻射療法。輻射療法之作用為局部的且限於所治療之區域。輻射療法損害或破壞所治療之區域(「目標組織」)中之細胞。輻射療法之目標為損害儘可能多的癌細胞，同時限制對附近健康組織之傷害。因此，在允許許多部分之間的健康組織復原之情況下，在該等部分中給與輻射療法。

輻射療法可用於治療幾乎每一類型之實體腫瘤，包括腦癌、乳癌、子宮頸癌、喉癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮膚癌、胃癌、子宮癌或軟組織肉瘤。輻射亦用於治療白血病及淋巴瘤。對各部位之輻射劑量視許多因素而定，該等因素包括各癌症類型之輻射敏感性及附近是否存在可受輻射損害之組織及器官。

抗Fn14抗體可(例如)在輻射療法之前、期間及/或之後與輻射療法組合使用。舉例而言，抗體可在已受輻射/正受輻射/將受輻射之部位處局部投與。

化學療法：化學療法為以可破壞癌細胞之藥物治療癌症。「化學療法」通常係指與靶向療法成對比，一般影響快速分裂細胞之細胞毒性藥物。化學療法藥物以各種可能方式干擾細胞分裂，例如干擾DNA複製或新形成之染色體分離。化學療法之大多數形式靶向所有快速分裂細胞且對癌細胞不具特異性，儘管一定程度之特異性可來自許多癌

細胞不能修復DNA損害，而正常細胞一般可以。

癌症療法中所用之化學治療劑的實例包括：安吖啶 (Amsacrine)、博萊黴素 (Bleomycin)、硫酸布他卡因 (Busulfan)、卡西他濱 (Capecitabine)、卡鉑 (Carboplatin)、卡莫司汀 (Carmustine)、苯丁酸氮芥 (Chlorambucil)、順鉑 (Cisplatin)、克拉屈濱 (Cladribine)、氯法拉濱 (Clofarabine)、左旋天冬醯胺酶 (Crisantaspase)、環磷醯胺 (Cyclophosphamide)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、達卡巴嗪 (Dacarbazine)、放線菌素 D (Dactinomycin)、道諾黴素 (Daunorubicin)、多西他賽 (Docetaxel)、小紅莓 (Doxorubicin)、表柔比星 (Epirubicin)、依託泊苷 (Etoposide)、氟達拉濱 (Fludarabine)、5-氟尿嘧啶 (5FU)、吉西他濱、格立得植入物 (Gliadel implant)、羥基脲 (Hydroxycarbamide)、黃膽素 (Idarubicin)、異環磷醯胺 (Ifosfamide)、伊立替康、甲醯四氫葉酸 (Leucovorin)、微脂體小紅莓 (Liposomal doxorubicin)、微脂體道諾黴素 (Liposomal daunorubicin)、洛莫司汀 (Lomustine)、美法倫 (Melphalan)、巯基嘌呤 (Mercaptopurine)、美司鈉 (Mesna)、甲胺喋呤、絲裂黴素 (Mitomycin)、米托蒽醌 (Mitoxantrone)、奧賽力鉑 (Oxaliplatin)、太平洋紫杉醇 (Paclitaxel)、培美曲塞 (Pemetrexed)、噴司他汀 (Pentostatin)、丙卡巴肼 (Procarbazine)、雷替曲賽 (Raltitrexed)、鏈脲黴素 (Streptozocin)、喃氟啶-尿嘧啶 (Tegafur-uracil)、替莫唑胺 (Temozolomide)、替尼泊甌

(Teniposide)、噻替派(Thiotepa)、硫鳥嘌呤(Tioguanine)、拓朴替康(Topotecan)、曲奧舒凡(Treosulfan)、長春鹼(Vinblastine)、長春新鹼(Vincristine)、長春地辛(Vindesine)及長春瑞濱(Vinorelbine)。

因為一些藥物在一起比單獨更好地起作用，所以常常同時給與兩種或兩種以上藥物。兩種或兩種以上化學治療劑常常以組合化學療法使用。抗Fn14抗體可(例如)在使用化學治療劑之前、期間或之後與化學療法(例如，與一或多種化學治療劑)組合使用。

靶向療法：靶向療法在於使用對癌細胞之失調蛋白質具特異性之藥劑。小分子靶向療法藥物一般為在癌細胞內突變、過度表現或其他方面關鍵之蛋白質上之酶促域的抑制劑。重要實例為酪胺酸激酶抑制劑伊馬替尼(imatinib)及吉非替尼(gefitinib)。單株抗體療法為另一策略，其中治療劑為與癌細胞表面上之蛋白質特異性結合之抗體。實例包括抗Fn14抗體、乳癌中通常使用之抗HER2/neu抗體曲妥珠單抗(HERCEPTIN®)及多種B細胞惡性疾病中通常使用之抗CD20抗體利妥昔單抗(rituximab)。

靶向療法亦可涉及作為「歸位器件(homing device)」之小肽，其可與細胞表面受體或包圍腫瘤之受感染細胞外基質結合。若核種在細胞附近衰變，則與此等肽(例如RGD)連接之放射性核種最終殺死癌細胞。

抗Fn14抗體可(例如)在使用靶向療法之前、期間或之後與另一靶向療法(例如，本文所述之靶向療法)組合使用。

光動力療法：光動力療法(PDT)為用於癌症之三元治療，其涉及光敏劑、組織氧及光(常使用雷射)。PDT可用作(例如)基底細胞癌(BCC)或肺癌之治療；PDT亦可適用於在手術移除大腫瘤之後移除微小惡性組織。

抗Fn14抗體可(例如)在使用光動力療法之前、期間或之後與光動力療法組合使用。

免疫療法：癌症免疫療法係指經設計以誘導患者之自身免疫系統對抗腫瘤之一組不同治療策略。用於產生針對腫瘤之免疫反應的當前方法包括用於淺表性膀胱癌之膀胱內BCG免疫療法，及(例如)在腎細胞癌及黑色素瘤患者中使用干擾素(例如干擾素- γ)及其他細胞激素以誘導免疫反應。

同種異體造血幹細胞移植可視為免疫療法之形式，此係由於供體之免疫細胞將常常以移植物抗腫瘤效應攻擊腫瘤。

抗Fn14抗體可(例如)在使用其他免疫療法之前、期間或之後與本文所述之免疫療法組合使用。

激素療法：藉由提供或阻斷某些激素可抑制一些癌症之生長。激素敏感性腫瘤之常見實例包括某些類型之乳癌及前列腺癌。移除或阻斷雌激素或睪固酮常常為重要的額外治療。在某些癌症中，投與激素促效劑(諸如孕激素)可為治療學上有益的。

抗Fn14抗體可(例如)在使用激素療法之前、期間或之後與本文所述之激素療法組合使用。

結腸癌：結腸癌為始於大腸(結腸)或直腸(結腸末端)之癌症。該癌症有時稱作「結腸直腸癌」。最常見類型為結腸癌。諸如淋巴瘤、類癌、黑色素瘤及肉瘤之其他類型結腸癌為罕見的。

病因：根據美國癌症學會(American Cancer Society)，結腸直腸癌為美國癌症相關死亡之主要病因之一。結腸癌不存在單一病因。早期所有結腸癌皆以良性息肉之形式起始，其緩慢發展成癌症。若患者具有：結腸直腸息肉、體內他處之癌症、結腸癌之家族病史、潰瘍性結腸炎、克隆氏病、乳癌之個人病史，則存在較高結腸癌風險，及/或某些遺傳症候群亦增加結腸癌出現之風險。

症狀：許多結腸癌病例無症狀。然而，以下症狀可指示結腸癌：腹瀉、便秘或其他腸習性變化、便血、原因未明貧血、腹痛及下腹壓痛、腸阻塞、原因未明體重減輕及大便變細。在適當篩選下，可在症狀出現之前偵測到結腸癌，此時其為最可治癒的。

檢查及測試：儘管可感覺到腹部腫塊，但身體檢查很少顯示任何問題。直腸檢查可揭示直腸癌而非結腸癌患者中之腫塊。診斷結腸直腸癌之成像測試包括：結腸鏡檢查及乙狀結腸鏡檢查。糞便潛血測試(FOBT)可偵測大便中之少量血液，其可表明結腸癌。然而，此測試在結腸癌患者中常常為陰性的。出於此原因，通常連同結腸鏡檢查或乙狀結腸鏡檢查一起進行FOBT。全血球計數可揭示低鐵含量貧血之跡象。

若患者患有結腸直腸癌，則將進行其他測試-分期以觀察癌症是否已擴散：0期：腸最內層上之極早期癌症；I期：癌症處於結腸內層中；II期：癌症已擴散穿過結腸之肌肉壁；III期：癌症已擴散至淋巴結；IV期：癌症已擴散至其他器官。

治療：治療部分地取決於癌症階段。一般而言，治療可包括：殺死癌細胞之化學療法藥物、移除癌細胞之手術及/或破壞癌性組織之輻射療法。此外，本文所述之抗Fn14抗體可單獨或與本文所述之另一治療組合用於治療結腸癌。可藉由常常在結腸鏡檢查期間移除癌細胞來治療0期結腸癌。此外，本文所述之抗Fn14抗體可單獨或與本文所述之另一治療(例如手術或化學療法)組合用於治療0期結腸癌。對於I期、II期及III期癌症而言，需要較廣泛手術以移除癌性結腸部分。又，本文所述之抗Fn14抗體可單獨或與本文所述之另一治療(例如手術、化學療法或放射線療法)組合用於治療I期、II期或III期結腸癌。幾乎所有III期結腸癌患者應在手術之後接受化學療法歷時約6-8個月。5-氟尿嘧啶為用於治療III期結腸癌之化學治療劑的實例。化學療法亦用於治療IV期結腸癌患者。伊立替康、奧賽力鉑及5-氟尿嘧啶為三種最常用藥物。亦使用卡西他濱。此外，本文所述之抗Fn14抗體可單獨、與本文所述之另一治療(例如手術、化學療法或放射線療法)組合用於治療IV期結腸癌。對於已擴散至肝臟之IV期疾病患者而言，可使用各種特異性地針對肝臟之治療。此可包括切去癌症、切除

或冷凍療法。化學療法或輻射有時可直接傳遞至肝臟中。此外，本文所述之抗Fn14抗體可單獨或與本文所述之另一治療(例如手術、化學療法或放射線療法)組合用於治療已轉移至肝臟或體內其他位置之結腸癌。儘管輻射療法偶爾用於結腸癌患者，但對於III期直腸癌患者而言其通常與化學療法組合使用。類似地，本文所述之抗Fn14抗體可(例如)與輻射療法組合用於治療IV期結腸癌。

預後：患者之健康程度取決於許多者，包括癌症階段。一般而言，當在早期治療時，大於90%之患者在其診斷之後存活至少5年。然而，僅約39%之結腸直腸癌在早期發現。一旦癌症已擴散，則5年存活率顯著下降。若患者之結腸癌在5年內不復發，則將其視為治癒。I期、II期及III期級癌症視為潛在可治癒的。在大多數狀況下，IV級癌症不可治癒。

可能性併發症：併發症包括轉移、結腸內癌瘤復發、第二原發性結腸直腸癌出現。

預防：結腸癌可幾乎始終在其最早及最可治癒階段藉由結腸鏡檢查發覺。幾乎所有50歲及50歲以上之男性及女性應作結腸鏡檢查。膳食及生活方式調整為重要的。一些證據表明低脂肪及高纖維膳食可降低結腸癌風險。抗Fn14抗體可用於降低結腸癌出現之風險或預防結腸癌出現，例如在鑑別為處於結腸癌風險中之患者中。

乳癌：乳癌為始於乳房組織之癌症。乳癌之兩種主要類型為乳腺管癌及小葉癌。在極少狀況下，乳癌可始於乳房

之其他區域。許多乳癌為雌激素敏感性的(雌激素受體陽性癌症或ER陽性癌症)。一些乳癌為HER2陽性的。

病因：風險因素包括：

年齡及性別-乳癌出現之風險隨年齡而增加。大多數晚期乳癌病例在超過50歲之女性中發現。女性患乳癌之可能性比男性大100倍。

乳癌家族病史-若近親已患有乳癌、子宮癌、卵巢癌或結腸癌，則存在較高乳癌風險。約20-30%患有乳癌之女性具有該疾病之家族病史。

遺傳學-最常見基因缺陷見於BRCA1及BRCA2基因中。在此等基因中之一者中具有突變之女性具有高達80%之機率在其一生中某時患上乳癌。其他遺傳缺陷已與乳癌相關聯，包括ATM基因、CHEK-2基因及p53腫瘤抑制基因中所見之遺傳缺陷，但此等遺傳缺陷為罕見的。

月經週期-經期開始較早(12歲之前)或停經期較晚(55歲之後)之女性具有增加之乳癌風險。

酒精飲用-一天飲酒多於1-2杯可增加乳癌風險。

分娩-從未有過小孩或僅在30歲之後有小孩之女性具有增加之乳癌風險。懷孕一次以上或在早年受孕降低乳癌風險。

DES-服用乙炔雌酚(diethylstilbestrol, DES)以防止流產之女性在40歲之後可具有增加之乳癌風險。

激素替代療法(HRT)-對於已接受激素替代療法歷時數年或數年以上之女性而言，存在較高乳癌風險。

肥胖-肥胖已與乳癌相關聯，儘管此關聯為有爭論的。

輻射-兒童或青年時接受以治療胸部區域之癌症的輻射療法增加乳癌出現之風險。

症狀：早期乳癌通常並不引起症狀。隨著癌症生長，症狀可包括：硬的，具有不平邊緣且通常無痛之乳房腫塊或腋窩中之腫塊；乳房或乳頭之尺寸、形狀或感覺變化-例如紅色、凹陷或起皺；乳頭溢液-可為血色、透明至黃色或綠色，且看似膿液。在男性中，乳癌症狀包括乳房腫塊、乳房疼痛及壓痛。

晚期乳癌之症狀可包括：骨痛、乳房疼痛或不適、皮膚潰瘍、一個手臂(緊挨癌症乳房)腫脹及體重減輕。

檢查及測試：醫生將詢問症狀及風險因素，且進行身體檢查，其包括兩個乳房、腋窩以及頸部及胸部區域。其他測試可包括：乳房攝影檢查、乳房MRI、乳房超音、乳房活組織檢查、針抽吸或乳房腫塊移除以移除所有或部分乳房腫塊以供較精密檢查。若患者患有乳癌，則進行其他測試(例如分期)以觀察癌症是否已擴散以幫助指導未來治療。

乳癌階段處於0期至IV期之範圍內。一般而言，乳癌可為原位(非侵襲性)乳癌或侵襲性乳癌。期數愈高，癌症愈晚期。

治療：治療係基於許多因素，包括癌症類型及階段、癌症是否對某些激素敏感及癌症是否過度產生(過度表現)稱為HER2/neu之基因。一般而言，癌症治療可包括：化學療

法、輻射療法、移除癌性組織之手術-腫塊切除術移除乳房腫塊；乳房切除術移除所有或部分乳房及可能之附近結構。此外，本文所述之抗Fn14抗體可單獨或與本文所述之另一治療組合用於治療乳癌。其他治療包括：激素療法及靶向療法。激素療法之實例為藥物他莫昔芬(tamoxifen)。此藥物阻斷可幫助乳癌細胞存活及生長之雌激素作用。大多數患有雌激素敏感性乳癌之女性得益於此藥物。已顯示一類稱為芳香酶抑制劑之較新穎藥物(諸如依西美坦(exemestane, Aromasin))在患有乳癌之停經後女性中正如他莫昔芬一樣好地起作用或甚至比他莫昔芬更好地起作用。靶向療法使用鑑別細胞中可導致癌症之某些變化的特殊抗癌藥物。一種該藥物為曲妥珠單抗(HERCEPTIN®)。對於患有IV期HER2陽性乳癌之女性而言，已顯示HERCEPTIN®加上化學療法比單獨化學療法更好地起作用。研究亦已顯示在患有早期HER2陽性乳癌之女性中，此藥物加上化學療法將癌症復發之風險削減50%。本文所述之抗Fn14抗體可與HERCEPTIN®(單獨或與化學療法一起)組合用於治療。

癌症治療可為局部或全身性的。輻射及手術為局部治療之形式。化學療法為全身性治療之類型。

大多數女性接受治療組合。對於患有I期、II期或III期乳癌之女性而言，主要目標為治療癌症且預防其復發。對於患有IV期癌症之女性而言，目標為改良症狀且幫助其活得更久。在大多數狀況下，IV期乳癌不可治癒。本文所述之

抗Fn14抗體可單獨或與本文所述之另一治療組合用於治療0期、I期、II期、III期或IV期乳癌。

0期-腫塊切除術加上輻射或乳房切除術為標準治療。

I期及II期--腫塊切除術加上輻射或乳房切除術與某種淋巴結移除為標準治療。亦可在手術之後推薦激素療法、化學療法及生物療法。

III期-治療涉及手術，可能繼之以化學療法、激素療法及生物療法。

IV期-治療可涉及手術、輻射、化學療法、激素療法或該等治療之組合。

乳癌經適當治療者之5年存活率如下：

0期為100%

I期為100%

IIA期為92%

IIB期為81%

IIIA期為67%

IIIB期為54%

IV期為20%

可能性併發症：乳癌可擴散至身體其他部分。有時，癌症甚至在移除整個腫瘤且附近淋巴結未發現癌症之後亦復發。來自癌症治療之副作用或併發症為可能的。舉例而言，輻射療法可引起乳房暫時性腫脹及該區域周圍疼痛。

預防：健康膳食及生活方式稍加變化一般可降低總體癌症機率。

乳癌若早期發現則較易治療且常可治癒。早期偵測涉及：乳房自檢(BSE)、醫學專業人員所進行之臨床乳房檢查及/或篩選性乳房攝影檢查。

醫藥組合物

可將抗Fn14抗體(諸如本文所述之抗體)調配為醫藥組合物以供投與個體，(例如)來治療本文所述之病症。醫藥組合物通常包括醫藥學上可接受之載劑。如本文所用之「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、塗料、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其生理學上相容之類似物。組合物可包括醫藥學上可接受之鹽，例如酸加成鹽或鹼加成鹽(參見，例如Berge, S.M.等人，(1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19)。

醫藥調配為公認技術且進一步描述於(例如)Gennaro (編), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第20版，Lippincott Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472)；Ansel等人，*Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*，第7版，Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727)；及Kibbe (編), *Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association*，第3版(2000) (ISBN: 091733096X)中。

醫藥組合物可呈多種形式。此等形式包括(例如)液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如，可注射及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體

及栓劑。較佳形式可視預期投藥模式及治療應用而定。本文所述之藥劑的組合物通常呈可注射或可輸注溶液之形式。

在一實施例中，將抗Fn14抗體與諸如氯化鈉、七水合磷酸氫鈉、磷酸二氫鈉之賦形劑物質及穩定劑一起調配。抗Fn14抗體可(例如)在緩衝溶液中以合適之濃度提供且可儲存於2-8℃下。

該等組合物可由非經腸模式(例如，靜脈內、皮下、腹膜內或肌肉內注射)投與。如本文所用之片語「非經腸投藥」及「非經腸投與」意謂除腸內及局部投與以外之通常藉由注射而投藥之模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

可將組合物調配為溶液、微乳液、分散液、脂質體或適合於以高濃度穩定儲存之其他有序結構。可藉由將本文所述之藥劑以所需量併入具有上文列舉之成份中之一者或其組合的適當溶劑中，必要時繼之以過濾殺菌來製備無菌可注射溶液。一般而言，藉由將本文所述之藥劑併入含有鹼性分散介質及來自上文列舉之彼等者之所需其他成份的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌散劑的狀況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其自先前無菌過濾溶液得到本文所述之藥劑加上任何其他所要成份之散劑。可(例如)藉由使用諸如卵磷脂之塗料，

在分散液之狀況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持溶液之適當流動性。可藉由在組合物中包括延遲吸收之試劑(例如，單硬脂酸鹽及明膠)來達成可注射組合物之持久吸收。

在某些實施例中，抗Fn14抗體可與載劑一起製備，該載劑將保護化合物免於快速釋放，諸如受控釋放調配物，包括植入物及微囊封傳遞系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法已取得專利或一般已知。參見，例如 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson 編，Marcel Dekker, Inc., New York (1978)。

抗Fn14抗體可(例如)用使其在循環中(例如在血液、血清或其他組織中)之穩定性及/或滯留改良(例如)至少1.5倍、2倍、5倍、10倍或50倍之部分來修飾。

舉例而言，抗Fn14抗體可與聚合物締合(例如結合)，該聚合物為例如大體上不具抗原性之聚合物，諸如聚氧化烯或聚氧化乙烯。合適之聚合物以重量計將大體上變化。可使用數量平均分子量處於約200至約35,000道爾頓(Dalton)(或約1,000至約15,000及2,000至約12,500)範圍內之聚合物。

舉例而言，抗Fn14抗體可與水溶性聚合物結合，該水溶性聚合物為例如親水性聚乙烯聚合物，例如聚乙醇或聚乙烯吡咯啉酮。該等聚合物之實例包括聚氧化烯均聚物，

諸如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、其共聚物及其嵌段共聚物，其限制條件為維持嵌段共聚物之水溶性。其他適用之聚合物包括聚氧化烯，諸如聚氧化乙烯、聚氧化丙烯，及聚氧化乙烯與聚氧化丙烯之嵌段共聚物；聚甲基丙烯酸酯；卡波姆(carbomer)；及分枝或未分枝多糖。

在一些實施中，抗Fn14抗體亦可與標記或其他藥劑偶合或以其他方式締合，該藥劑為例如另一治療劑，諸如細胞毒性劑或細胞生長抑制劑，但在許多實施例中，此組態並非必要。細胞毒性劑及化學治療劑之實例包括紫杉酚、細胞遲緩素B(cytochalasin B)、短桿菌素D(gramicidin D)、長春鹼、小紅莓、道諾黴素、類美登素(maytansinoid)(例如美登素醇(maytansinol)或DM1類美登素-美登素(maytansine)之含硫氫基衍生物)、米托蒽醌、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-去氫睪固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、紫杉烷(taxane)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)及其類似物或同系物。

當抗Fn14抗體與第二藥劑(例如化學治療劑)組合使用時，兩種藥劑可獨立調配或一起調配。藥劑可以協同有效量調配或以其他方式使用。亦可能以小於單一療法將使用之量使用該等藥劑中之一或兩者。舉例而言，可(例如)在臨投與之前將各別醫藥組合物混合且一起投與或可(例如)

同時或在不同時間獨立投與。

亦可能使用其他Fn14結合劑或促效劑藥劑。藥劑可為任何類型之可投與個體之化合物(例如，小有機分子或小無機分子、核酸、蛋白質或肽模擬劑)。在一實施例中，藥劑為生物劑，例如分子量介於5-300 kDa之間的蛋白質。舉例而言，Fn14促效劑藥劑可活化Fn14接合之下游事件。除與Fn14結合之促效劑抗體以外，例示性Fn14促效劑藥劑亦包括TWEAK及可溶形式之TWEAK(參見，例如美國專利第7,109,298號)。該等藥劑可作為與本文所述之一或多種抗體的組合療法之一部分來投與。本文所述之其他治療劑亦可以醫藥組合物之形式(例如)由標準方法或本文所述之方法提供。

投藥

可由多種方法將抗Fn14抗體投與個體，例如有需要之個體，例如人類個體。對於許多應用而言，投藥途徑為靜脈內注射或輸注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜內(IP)或肌肉內注射中之一者。亦可能使用關節內傳遞。亦可使用非經腸投藥之其他模式。該等模式之實例包括：動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、經氣管、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內及硬膜外及胸骨內注射。在一些狀況下，投藥可直接至癌症部位，例如至腫瘤中及/或鄰近腫瘤。

亦可針對個別狀況調整抗體之投藥途徑及/或模式，例如藉由(例如)使用斷層攝影成像監測個體(例如)來顯現腫

瘤。

抗體可以固定劑量或以mg/kg劑量投與。亦可選擇劑量以減少或避免針對抗Fn14抗體之抗體產生。調整給藥方案以提供所要反應，例如治療反應或組合治療作用。一般而言，可使用抗Fn14抗體(及視情況第二藥劑)之劑量以向個體提供生物可用量之藥劑。舉例而言，可投與在0.1-100 mg/kg、0.5-100 mg/kg、1 mg/kg-100 mg/kg、0.5-20 mg/kg、0.1-10 mg/kg或1-10 mg/kg之範圍內的劑量。亦可使用其他劑量。

組合物可包含約10至100 mg/ml或約50至100 mg/ml或約100至150 mg/ml或約100至200 mg/ml之抗體。

在某些實施例中，組合物中之抗Fn14抗體主要呈單體形式，例如，至少約90%、92%、94%、96%、98%、98.5%或99%呈單體形式。如(例如)藉由UV在A280 nm下偵測，某些抗Fn14抗體組合物可包含小於約5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%或0.1%之聚集體。如(例如)藉由UV在A280 nm下偵測，某些抗Fn14抗體組合物包含小於約5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%、0.2%或0.1%之片段。

如本文所用之單位劑型或「固定劑量」係指適於作為單次劑量用於待治療之個體的實體離散單位；各單位含有預定量之活性化合物，該量經計算以與所需醫藥載劑相結合及視情況與其他藥劑相結合產生所要治療作用。可給與單次或多次劑量。或者或另外，可經由連續輸注來投與抗體。

可(例如)以週期性時間間隔經足以包涵至少2劑、3劑、5劑、10劑或10劑以上之時段(療程)投與抗Fn14抗體劑量,例如,每日一或兩次,或每週約一至四次,或較佳每週一次、每兩週一次、每三週一次、每月一次,例如歷時約1週至12週之間,較佳2週至8週之間,更佳約3週至7週之間,且甚至更佳歷時約4週、5週或6週。可影響有效治療個體所需之劑量及時序的因素包括(例如)疾病或病症之嚴重度、調配物、傳遞途徑、先前治療、個體之一般健康狀況及/或年齡,及所存在之其他疾病。此外,以治療有效量之化合物治療個體可包括單次治療或較佳可包括一系列治療。亦可將動物模型用於確定適用劑量,例如初始劑量或方案。

若個體處於癌症或本文所述之其他病症出現之風險中,可在癌症或病症完全發作之前投與抗體,例如作為預防性措施。該預防性治療之持續時間可為抗體之單次劑量或治療可持續(例如,多次劑量)。舉例而言,可用抗體治療處於病症風險中或具有患病傾向之個體歷時數天、數週、數月或甚至數年以預防病症出現或暴發。

醫藥組合物可包括「治療有效量」之本文所述藥劑。可基於所投與藥劑之作用或藥劑之組合作用(若使用一種以上藥劑)來確定該等有效量。藥劑之治療有效量亦可根據以下因素而變:諸如個體之疾病病況、年齡、性別及體重,及化合物在個體中引發所要反應之能力,例如改善至少一個病症參數或改善至少一種病症症狀。治療有效量亦

為其中治療有益作用超過組合物之任何毒性作用或有害作用的量。

療法用之器件及套組

可用醫療器件投與包括抗Fn14抗體之醫藥組合物。該器件可設計有諸如可攜性、室溫儲存及使用簡易之特徵，使得其可(例如)由未經培訓之個體或由在此領域中之應急人員自醫醫療設施及其他醫療設備移除用於緊急情況。該器件可包括(例如)一或多個用於儲存包括抗Fn14抗體之醫藥製劑的外殼，且可經組態以傳遞抗體之一或多個單位劑量。該器件可經進一步組態以作為亦包括抗Fn14抗體之單一醫藥組合物或作為兩種獨立醫藥組合物投與第二藥劑，例如化學治療劑。

可用注射器投與醫藥組合物。亦可用無針皮下注射器件投與醫藥組合物，該器件為諸如為US 5,399,163；5,383,851；5,312,335；5,064,413；4,941,880；4,790,824或4,596,556中所揭示之器件。熟知植入物及模組之實例包括：US 4,487,603，其揭示一種用於以受控速率分配藥物之可植入微輸注泵；US 4,486,194，其揭示一種用於經由皮膚投與藥劑之治療器件；US 4,447,233，其揭示一種用於以精確輸注速率傳遞藥物之藥物輸注泵；US 4,447,224，其揭示一種用於連續藥物傳遞之可變流動可植入輸注裝置；US 4,439,196，其揭示一種具有多腔室區室之滲透藥物傳遞系統；及US 4,475,196，其揭示一種滲透藥物傳遞系統。許多其他器件、植入物、傳遞系統及模組

亦為已知的。

可在套組中提供抗Fn14抗體。在一實施例中，該套組包括(a)含有包括抗Fn14抗體之組合物的容器，及視情況(b)資訊材料。該資訊材料可為描述性、指導性、銷售性材料或關於本文所述之方法及/或使用藥劑用於達成治療效益的其他材料。

在一實施例中，套組亦包括用於治療本文所述之病症的第二藥劑，例如化學治療劑。舉例而言，套組包括：含有包括抗Fn14抗體之組合物的第一容器及包括第二藥劑之第二容器。

套組之資訊材料的形式不受限制。在一實施例中，資訊材料可包括關於化合物生產、化合物分子量、濃度、失效日期、批次之資訊或產地資訊等。在一實施例中，資訊材料係關於投與抗Fn14抗體之方法(例如以合適之劑量、劑型)或投藥模式(例如，本文所述之投藥劑量、劑型或模式)，以治療已患有癌症或本文所述之其他病症或處於癌症或本文所述之其他病症之風險中的個體。可以多種格式提供資訊，包括印刷文本、電腦可讀材料、視訊記錄或音訊記錄，或提供實質性材料之鏈路或位址的資訊(例如在網際網路上)。

除抗體以外，套組中之組合物亦可包括其他成份，諸如溶劑或緩衝液、穩定劑或防腐劑。抗體可以任何形式，例如液體、乾燥或凍乾形式，較佳以大體上純的及/或無菌形式提供。當在液體溶液中提供藥劑時，液體溶液較佳為

水溶液。當以乾燥形式提供藥劑時，一般藉由添加合適之溶劑來進行復水。可視情況在套組中提供例如無菌水或緩衝液之溶劑。

套組可包括一或多個用於含有藥劑之組合物的容器。在一些實施例中，套組含有用於組合物及資訊材料之獨立容器、分隔器或區室。舉例而言，瓶、小瓶或注射器中可含有組合物，且塑膠套筒或封包中可含有資訊材料。在其他實施例中，單一未分隔容器內含有套組之獨立元件。舉例而言，在附著呈標籤形式之資訊材料的瓶、小瓶或注射器中含有組合物。在一些實施例中，套組包括複數個(例如一盒)個別容器，其各自含有藥劑之一或多個單位劑型(例如，本文所述之劑型)。容器可包括組合單位劑量，例如，包括(例如)所要比率之抗Fn14抗體與第二藥劑的單位。舉例而言，套組包括複數個注射器、安瓿、箔封包、發泡包裝或醫療器件，例如，其各自含有單次組合單位劑量。套組之容器可為氣密的、防水的(例如，對水分變化或蒸發為不透的)及/或不透光的。

套組視情況包括適合於投與組合物之器件，例如注射器或其他合適之傳遞器件。器件可經提供預負載有藥劑中之一或兩者或可為空的，但適合於負載。

靶向Fn14表現細胞

本文所述之抗Fn14抗體可用於使有效負載靶向Fn14表現細胞或靶向與Fn14相關之組織或其他結構。舉例而言，抗體可與可傳遞外源基因(例如，對於基因療法而言)之病毒

或類病毒粒子或與脂質體(例如，囊封治療劑或外源基因之脂質體)連接。使用抗體以靶向病毒之例示性方法描述於Roux等人，(1989) *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86:9079-9083中。亦參見，例如 *Curr Gene Ther.* (2005) 5:63-70及 *Hum Gene Ther.* (2004) 15:1034-1044。

本發明之抗Fn14抗體亦可與含有諸如化學治療劑之治療劑的脂質體連接。抗體與脂質體之連接可由任何已知之交聯劑實現，該交聯劑為諸如已廣泛用於使毒素或化學治療劑與抗體偶合以供靶向傳遞之異源雙功能交聯劑。舉例而言，可使用碳水化合物引導之交聯試劑4-(4-順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸醯肼(MPBH)來實現與脂質體之結合(Duzgunes等人，(1992) *J. Cell. Biochem. Abst.*增刊16E 77)。亦可由熟知之方法來製備含有抗體之脂質體(參見，例如DE 3,218,121；Epstein等人，(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-92；Hwang等人，(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-34；U.S. 4,485,045及4,544,545)。

診斷用途

抗Fn14抗體可在診斷方法中用於活體外(例如生物樣本，諸如組織、活組織)或活體內(例如，個體中之活體內成像)偵測Fn14的存在。舉例而言，可將人類或有效人類抗Fn14抗體投與個體以偵測個體內之Fn14。舉例而言，可(例如)用MRI可偵測標記或放射性標記來標記抗體。可使用用於偵測可偵測標記之方式來評估個體。舉例而言，可對個體掃描以評估抗體在個體內之定位。舉例而言，(例

如)由NMR或其他斷層攝影成像方式使個體成像。

適用於診斷性成像之標記的實例包括放射性標記，諸如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 及 ^{188}Rh ；螢光標記，諸如螢光素(fluorescein)及若丹明(rhodamine)；核磁共振活性標記；可由正電子發射斷層攝影(「PET」)掃描儀偵測之正電子發射同位素；化學發光劑，諸如蟲螢光素(luciferin)；及酶促標記，諸如過氧化酶或磷酸酶。亦可採用短程輻射發射體，諸如可由短程偵測探針偵測之同位素。可使用已知技術以該等試劑標記蛋白質配位體。舉例而言，參見Wensel及Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York(關於抗體之放射性標記的技術)及Colcher等人，(1986) *Meth. Enzymol.* 121:802-816。

可使用諸如放射性核掃描之已知技術使用(例如) γ 相機或發射斷層攝影術使個體活體內「成像」。參見，例如A.R. Bradwell等人，「Developments in Antibody Imaging」，*Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin等人(編)，第65-85頁(Academic Press 1985)。或者，可使用諸如位於布魯克赫文國家研究所(Brookhaven National Laboratory)之指定Pet VI的正電子發射橫軸斷層攝影掃描儀，其中放射性標記發射正電子(例如， ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 及 ^{13}N)。

MRI對比劑：磁共振成像(MRI)使用NMR來顯現活個體之內部特徵，且適用於預後、診斷、治療及手術。MRI可

在無放射性示蹤化合物之情況下使用以達成明顯效益。一些MRI技術概括於EP0 502 814 A中。一般而言，與不同環境中水質子之弛豫時間常數T1及T2有關之差異用於產生影像。然而，此等差異可能不足以提供清晰高解析度影像。

此等弛豫時間常數之差異可由對比劑增強。該等對比劑之實例包括許多磁性試劑、順磁性試劑(其主要改變T1)及鐵磁性或超順磁性試劑(其主要改變T2反應)。螯合劑(例如EDTA、DTPA及NTA螯合劑)可用於連接一些順磁性物質(例如， Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Gd^{3+})(且降低其毒性)。其他試劑可呈(例如)直徑小於10 μm 至約10 nm之粒子的形式。粒子可具有鐵磁性、反鐵磁性或超順磁性特性。粒子可包括(例如)磁鐵礦(Fe_3O_4)、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、肥粒鐵(ferrite)及過渡元素之其他磁性礦物化合物。磁性粒子可包括一或多種有或非磁性材料之磁性晶體。非磁性材料可包括合成或天然聚合物(諸如瓊脂糖、葡聚糖、糊精、澱粉及其類似物)。

抗Fn14抗體亦可以含有NMR活性 ^{19}F 原子或複數個該等原子之指示基團標記，此係由於(i)大體上所有天然豐富之氟原子為 ^{19}F 同位素且因此大體上所有含氟化合物具NMR活性；(ii)許多化學活性多氟化合物(諸如三氟乙酸酐)以相對較低的價格市售可得；及(iii)已發現醫學上可接受用於人類之許多氟化合物，諸如用於載運氧作為血色素替代品之全氟化聚醚。在允許該培育時間之後，使用諸如Pykett (1982) *Scientific American*, 246:78-88所述之裝置中之一者的裝置進行全身MRI以定位Fn14分布且使Fn14分布

成像。

在另一態樣中，本揭示案提供一種活體外偵測樣本(例如，生物樣本，諸如血清、血漿、組織、活組織)中Fn14之存在的方法。主題方法可用於診斷病症，例如癌症。該方法包括：(i)使樣本或對照樣本與抗Fn14抗體接觸；及(ii)(例如)藉由偵測抗Fn14抗體與Fn14之間的複合物形成或藉由偵測抗體或Fn14之存在來針對Fn14的存在評估樣本。舉例而言，可將抗體固定於(例如)支撐物上，且偵測抗原在支撐物上之滯留，及/或將抗原固定於(例如)支撐物上，且偵測抗體在支撐物上之滯留。可包括對照樣本。相對於對照樣本，在樣本中形成複合物之統計學上顯著變化可指示樣本中Fn14的存在。一般而言，抗Fn14抗體可用於包括螢光偏振、顯微法、ELISA、離心、層析及細胞分選(例如，螢光活化細胞分選)之應用。

以下為實施本發明之實例。該等實例不應視為以任何方式限制本發明之範疇。

實例

實例1：抗Fn14抗體

藉由投與表現人類表面Fn14之CHO細胞在Fn14不足小鼠中產生抗Fn14抗體P4A8、P3G5、P2D3及P3D8，且用Fn14-myc-His蛋白加強免疫。此作為較早免疫策略似乎必需之免疫策略並不成功。抗體於活體外結合人類Fn14蛋白與獼猴Fn14蛋白。人類Fn14蛋白(上部)與獼猴Fn14蛋白(下部)之比對如下：

1 MARGSLRRLRLRLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCM 50
|||||

1 MARGSLRRLRLRLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSHGSSWSADLDKCM 50

51 DCASCRARPHSDFCLGCAAAPPAPFRLLWPILGGALSLTFVLGLLSGFLV 100
|||||

51 DCASCRARPHSDFCLGCSAAPPAPFRLLWPILGGALSLTFVLGLLSGFLV 100

101 WRRCCRREKFTTPIEETGGEGCPAVALIQ 129 (SEQ ID NO:1)
|||||

101 WRRCCRREKFTTPIEETGGEGCPAVALIQ 129 (SEQ ID NO:10)

下文進一步描述之P4A8之特性包括以下：約1.6 nM或2 nM之單價結合親和力；觸發腫瘤細胞凋亡之活體外功效的EC₅₀為170 pM；與人類、獼猴、大鼠及小鼠Fn14之物種交叉反應性；誘導活體外腫瘤細胞死亡之能力；在活體內腫瘤異種移植模型中有效；活體外及活體內誘導NF-kB信號轉導及誘導卡斯蛋白酶-3/7；於小鼠中2天之半衰期；於大鼠中>5天之半衰期；及不與其他TNF家族成員受體結合。

實例2：抗Fn14抗體於活體外殺死腫瘤細胞

以漸增濃度之抗Fn14抗體(P2D3、P4A8、P3G5或P3D8)、陽性對照促效劑(Fc-TWEAK)或陰性對照(MOPC21)各自與IFN- γ 組合來處理Widr結腸癌細胞。藉由如MTT檢定所評定之生存力降低程度來量測細胞死亡。抗體P2D3、P4A8、P3G5及P3D8以及Fc-TWEAK能夠殺死腫瘤細胞(圖1)。Widr MTT檢定中之P4A8之EC₅₀為約30 ng/ml。在MTT檢定中以人類化P4A8IgG1(hP4A8IgG1；下

述)獲得類似結果。另外，用多聚體型式之hP4A8IgG1(藉由使hP4A8IgG1與蛋白質A結合而產生)處理顯示增強之作用(圖15)。

由TUNEL檢定來量測P4A8抗體活體外殺死WiDr結腸癌細胞之能力。以P4A8抗體或陽性對照(Fc-TWEAK)各自與IFN- γ 組合來處理WiDr細胞，或保留不處理。P4A8抗體與Fc-TWEAK均能夠殺死腫瘤細胞(圖2A及圖2B)。

測試抗Fn14抗體活體外殺死MDA-MB231乳癌細胞之能力。以漸增濃度之抗體P2D3、P4A8、P3G5或P3D8或陽性對照促效劑(Fc-TWEAK)各自與IFN- γ 組合來處理癌細胞。藉由如MTT檢定所評定之生存力降低程度來量測細胞死亡。MDA-MB231細胞於活體外對抗Fn14抗體具有抗性(圖3)。

使P4A8快速內化至所測試之所有細胞中。內部顆粒之外觀自小而多(WiDr)變至大而少(MDA-MB231)。另外，以P4A8處理細胞誘導或穩定Fn14本身。此現象並非由Fn14 mRNA增加而造成。

實例3：誘導介白素-8分泌

測試P2D3、P4A8、P3G5及P3D8抗體以評估其活體外誘導介白素-8(IL-8)分泌之能力。以漸增濃度之MOPC21陰性對照、hFcTWEAK陽性對照或P2D3、P4A8、P3G5或P3D8抗體處理A375細胞。量測在各濃度下分泌至培養基中之IL-8的含量。抗體中之每一者誘導IL-8分泌且因此能夠充當Fn14促效劑(圖4)。

實例4：活體內治療腫瘤

為測試抗Fn14抗體活體內治療癌症之能力，將WiDr結腸癌細胞異種移植物植入小鼠中。在腫瘤植入之後，以抗Fn14抗體(P2D3、P4A8、P3G5或P3D8)、陰性對照(PBS、MOPC21或P1.17)或陽性對照(Fc-TWEAK)治療動物。所用劑量、投藥途徑及投藥頻率展示於圖5中。由腫瘤體積(mm^3 ，上部畫面)或腫瘤重量(公克，下部畫面)量測腫瘤生長。Fn14抗體於活體內有效治療腫瘤(圖5)。

亦測試抗Fn14抗體及對照之毒性。如動物重量(圖6)所量測，甚至在重複給藥之後對該等治療中之任一者亦未觀測到明顯毒性。

實例5：治療大腫瘤

在大腫瘤中測試抗Fn14抗體活體內治療癌症之能力。將Widr結腸癌細胞異種移植物植入小鼠中。在腫瘤植入之後，以抗Fn14抗體(P4A8；100 μg)或陰性對照(PBS或MOPC21)治療動物。每週一次投與抗體且在整個研究中持續，或在第16天開始給藥且較早(第37天)結束，或較晚(第37天)開始給藥且貫穿至研究結束。由腫瘤體積(mm^3)來量測腫瘤生長。甚至當治療較晚開始或較早終止時，抗Fn14抗體亦於活體內有效治療腫瘤(圖7)。

實例6：劑量反應

檢查WiDr細胞異種移植物之劑量反應。測試各種劑量之P4A8抗Fn14抗體及PBS陰性對照(隨時間(天數)之腫瘤體積(mm^3))。功效隨抗體之劑量增加而增加(圖8)。

亦以測試/對照之百分比(% T/C)來分析劑量反應。如圖9所示，功效隨抗體之劑量增加而增加。亦測試各種劑量之抗體及對照的毒性。如體重變化百分比(圖10)所量測，甚至在重複給藥之後對該等治療中之任一者亦未觀測到明顯毒性。

實例7：活體內治療乳癌細胞腫瘤

為測試抗Fn14抗體活體內治療癌症之能力，將MDA-MB231乳癌細胞異種移植物植入小鼠中。在腫瘤植入之後，以抗Fn14抗體(P2D3或P4A8)或陰性對照(PBS或MOPC21)治療動物。所用劑量、投藥途徑及投藥頻率展示於圖11中。由腫瘤體積(mm³)來量測腫瘤生長。Fn14抗體於活體內有效治療腫瘤(圖11)。

實例8：抗體交叉反應性

抗Fn14抗體P4A8及P2D3與來自多個物種之Fn14交叉反應。如圖12所示，如流式細胞儀所測定(平均螢光值，MFI)，兩種抗體均與人類、獼猴及鼠類Fn14反應。EC₅₀值亦提供於圖中。P4A8亦與大鼠Fn14交叉反應。選殖恆河猴Fn14且測定其與人類Fn14一致。因此，抗體與恆河猴Fn14之結合特徵與抗體與人類Fn14之結合特徵相同。

對編碼人類(NM_016639)、獼猴(參見實例1)、小鼠(NM_013749)、大鼠(NM_181086)及爪蟾(NM_001090171)Fn14之全長Fn14 cDNA工程化以移除外來5'及3' UTR且添加一致最優化Kozak序列，接著次選殖至pNE001(源自Invitrogen表現載體pCEP4之完全序列經證實之基於pUC之

EBV表現載體)中，其中異源基因表現係由CMV-IE啟動子及SV40聚腺苷酸化信號控制，但缺乏EBNA基因及潮黴素抗性基因。將Fn14表現載體(人類：pEAG2121，獼猴：pEAG2120，小鼠：pEAG2126，大鼠：pEAG2275且爪蟾：pEAG2237)與帶有EGFP報導體之EBV表現載體以1:1莫耳比共同轉染至293E細胞中。轉染後2天將細胞用於FACS中，以所關注之單株抗體染色(以稀釋滴定)且在綠色EGFP陽性活細胞上設門(gating)。此類型之檢定取決於Fn14之細胞表面密度且因此反映給定轉染之表觀EC₅₀值：此直接結合檢定並不測定真實K_d值。

以下展示人類、獼猴、大鼠及小鼠之全長Fn14推導蛋白質序列之比對：

	1				50
人類	MARGslRRLl	rLLVLGlwLa	LLRsVAGEQA	PGTAPCSrGS	SWSADLDKCM
獼猴	MARGslRRLl	rLLVLGlwLa	LLRsVAGEQA	PGTAPCSHGS	SWSADLDKCM
小鼠	MAsawpRsLp	qiLLVLGfgLv	LmRaaAGEQA	PGTsPCSSGS	SWSADLDKCM
大鼠	MApGwpRpLp	qLLVLGfgLv	LiRatAGEQA	PGnAPCSSGS	SWSADLDKCM
一致序列	MARG--RRL-	-LLVLG--L-	LLR-VAGEQA	PGTAPCSSGS	SWSADLDKCM
	51				100
人類	DCASCrARPH	SDFCLGCAAA	PPApFRLLWP	ILGGALSLTf	VLgLlSGFLV
獼猴	DCASCrARPH	SDFCLGCsAA	PPApFRLLWP	ILGGALSLTf	VLgLlSGFLV
小鼠	DCASCpARPH	SDFCLGCAAA	PPAhFRLLWP	ILGGALSLvl	VLaLvSsFLV
大鼠	DCASCpARPH	SDFCLGCAAA	PPAhFRmLWP	ILGGALSLal	VLaLvSGFLV
一致序列	DCASC-ARPH	SDFCLGCAAA	PPA-FRLLWP	ILGGALSLT-	VL-L-SGFLV
	101		130	與huFn14之一致性	
人類	WRRCCRREKF	TTPIEETGGE	GCPaVALIQ*	100.0	(SEQ ID NO:1)
獼猴	WRRCCRREKF	TTPIEETGGE	GCPaVALIQ*	98.5	(SEQ ID NO:10)
小鼠	WRRCCRREKF	TTPIEETGGE	GCPgVALIQ*	81.5	(SEQ ID NO:28)
大鼠	WRRCCRREKF	TTPIEETGGE	GCPgVALIQ*	83.1	(SEQ ID NO:29)
一致序列	WRRCCRREKF	TTPIEETGGE	GCP-VALIQ*		(SEQ ID NO:30)

與一致序列一致之位置為大寫字母，而與一致序列不同之位置為小寫字母。預測信號序列自殘基1延伸至殘基27且預測跨膜域自殘基79延伸至殘基101。上文指示與人類

Fn14之總體一致性百分比。

圖 16 展示抗 huFn14 mAb P2D3、P3D8、P3G5 及 P4A8 之組與人類及獼猴表面 Fn14 之直接結合 FACS 檢定：所有皆以類似 EC_{50} 值結合。圖 17 展示抗 huFn14 mAb P2D3、P3D8、P3G5 及 P4A8 之組與鼠類表面 Fn14 之直接結合 FACS 檢定：所有皆以與靈長類動物 Fn14 結合之表觀 EC_{50} 值類似之類似表觀 EC_{50} 值結合。人類化 P4A8(H1/L1)(huP4A8)(下述)以與真實鼠類 P4A8 mAb 之親和力等價之親和力與人類 Fn14 結合。圖 18A 及圖 18B 分別展示具有不同重鏈效應功能之 huP4A8 變體對人類或大鼠 Fn14 之直接結合 FACS 數據：對 huP4A8 與人類及大鼠 Fn14 之結合觀測到類似表觀 EC_{50} 。

圖 19A 展示儘管 P4A8 與人類、獼猴及小鼠表面 Fn14 結合良好，但可偵測到未與爪蟾 Fn14 結合。圖 19B 及圖 19C 展示 Fc-huTWEAK 融合蛋白與 muFc-muTWEAK 融合蛋白均與人類、獼猴、小鼠及爪蟾表面 Fn14 結合良好，指示 P4A8 不能與爪蟾 Fn14 結合並非由於其 Fn14 之表面呈現的缺陷。以下展示在人類(上部)與爪蟾(下部)Fn14 之間的間隙比對，其共有 48.3% 之相似性且僅共有 40.8% 之一致性：

```

1  MARGSLRRLRLRLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCM 50
   . | ||| | | | . | | | : | | . : | | | |||
1  ...MTPRNLLRTFV.PLLLLVLSSAASQ.....GECPEGRAYSQDLGKCM 41

51 DCASCRARPHSDFCLGCAAAPPAP.FRLWPILGGALSLTFVLGLLSGFL 99
   :|. |: |||| | . | | :| | | . :: :||
42 ECSVCKNSEKSDFCQNCPSKTEQPDFPWIWVIGFSAGGVFLIIVILSLTV 91

100 VWRRCCRREKFTTPIEETGGEGCPAVALIQ* 130 (SEQ ID NO:1)
     |||: ||||| ||| |. |||
92 YLTHCRRKSKFTTPIEETGSHSAEAL.LIH* 121 (SEQ ID NO:31)

```

此等結果表明 P4A8 結合位點為類似的，但與 Fn14 上之 TWEAK 結合位點微有不同。

亦已顯示 P4A8 不與其他 TNF 家族受體結合，且就此而言，其對 Fn14 具選擇性。

實例 9：使 P4A8 抗原決定基定位於 Fn14 殘基 W42 (P4A8 對 W42A 突變之敏感性)

以編碼具有 W42A 突變之野生型人類、獼猴、大鼠、小鼠及人類 Fn14 之核酸轉染 293E 細胞。由 FACS 測定 P4A8 與此等細胞之結合。結果展示於圖 13 中。如直方圖所指示，P4A8 與具有 W42A 突變之人類 Fn14 蛋白的結合相對於野生型人類 Fn14 蛋白顯著較差。類似地，P3G5 抗體與具有 W42A 突變之人類 Fn14 蛋白之結合亦顯著較差 (未圖示)。

圖 20 為 Fn14 胞外域之間隙比對 (人類 Fn14 中之殘基 E28 至 P80)。使用 Stratagene 之 QuikChange II 套組遵循製造商之推薦方案，藉由定點誘變在全長人類、獼猴及小鼠 Fn14 cDNA 之 EBV 表現載體中構築 W42A 突變體。藉由對所引入之限制位點變化進行篩選來鑑別突變質體。藉由 W42A 突變體表現載體中之 DNA 定序來證實所得質體中之 Fn14 cDNA 序列：人類 Fn14 W42A 指定 pEAG2251，鼠類 W42A 指定 pEAG2250，且獼猴 W42A 指定 pEAG2249。在 293E 細胞中瞬間過度表現人類、獼猴及鼠類 Fn14 中之野生型 huFn14 及 W42A 突變體且如先前所述在 FACS 檢定中檢定 Fc-TWEAK 或 P4A8 mAb 之結合性。圖 21A 展示 Fc-TWEAK 與所有 W42A 突變體結合，而圖 21B 展示 P4A8 結合性在所

檢查之所有物種中因突變至 W42A 而消除。吾人對 huFn14 表現質體 pEAG2121 進行定點誘變以產生其他點突變體以供其他抗原決定基定位研究。圖 22 展示當殘基 W42 突變至大疏水性殘基 W42F 或 W42Y (分別 pYL373 及 pYL374) 時，P4A8 結合性恢復正常。

一組 huFn14 點突變體係藉由在 pEAG2121 模板 (huFn14 之 EBV 表現載體) 上進行定點誘變將爪蟾殘基在許多位置處取代至人類序列中而製得：pYL391 T33Q、pYL392 S40R、pYL393 L65Q、pYL396 M50A、pYL397 R56K、pYL398 R56P (比爪蟾變化更強之取代) 及 pYL399 H60K。直接結合 FACS 檢定顯示整個突變體組結合 Fc-TWEAK (圖 23A)。在直接結合 FACS 檢定中對人類、獼猴、大鼠及小鼠 Fn14 且對整個 huFn14 突變體組 (W42A、T33Q、S40R、L65Q、M50A、R56K、R56P 及 H60K) 測試 Nakayama 等人 (2003, J. Immunol. 170:341) 所述之促效劑抗 Fn14 mAb (P4A8、P3G5、P2D3 及 P3D8) 及 ITEM-1、ITEM-2、ITEM-3 及 ITEM-4 促效劑 mAb。P4A8 與突變體組之結合展示於圖 23B 中，P3G5 結果展示於圖 23C 中，P2D3 結果展示於圖 23D 中，ITEM-1 結果展示於圖 23E 中，ITEM-4 結果展示於圖 23F，ITEM-2 結果展示於圖 23G 中，且 ITEM-3 結果展示於圖 23H 中。該等結果指示 P3G5 及 P4A8 對 Fn14 W42A 取代敏感，但 P2D3 (及 P3D8) 及四種 ITEM 抗 Fn14 mAb 對 W42A 變化不敏感。所測試之所有抗體皆與人類、獼猴、大鼠及小鼠 Fn14 結合。

實例 10：免疫組織化學

測試抗 Fn14 抗體 P4A8 作為免疫組織化學 (IHC) 試劑以偵測石蠟組織切片之切片中之 Fn14 的用途。獲得正常胰腺組織及胰腺腫瘤組織之石蠟切片。P4A8 能夠將石蠟切片中之 Fn14 染色且結果證實與正常組織相比，Fn14 在胰腺腫瘤中過度表現。

P4A8 亦用於量測正常組織中之 Fn14 含量。將人類組織晶片 (冷凍及石蠟) 以 P4A8 染色。結果顯示上皮細胞、內皮及肌肉之主要輕度染色，但偶爾最低或中度染色，及細胞質分布 (不突出膜)。

實例 11：抗 Fn14 抗體之序列

P4A8 抗體之 VH 域的胺基酸序列為：

QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYGMHWVKQ
SHAKSLEWIGVISTYNGYTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTA
YMELARLTSEDSAIYYCARAYYGNLYYAMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO: 2)。編碼 P4A8 之 VH 域的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 17) 描繪於圖 14A 中。

P3G5 抗體之 VH 域的胺基酸序列為：

QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYGIHWVKQS
HAKSLEWIGVISTYNGYTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAY
MELARLTSEDSAIYYCARAYYGNLYYAMDYWGQGTSVTV
SS (SEQ ID NO: 3)。編碼 P3G5 之 VH 域的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 18) 描繪於圖 14B 中。

P2D3 抗體之 VH 域的胺基酸序列為：

QVSLKESGPGILQPSQTL~~SLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQP~~
 SGKGLEWLA~~HIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQVFL~~
 KITSVDTADTATYYCARR~~GPDIYGYYPMDYWGQGTSVTV~~
 SS(SEQ ID NO: 4)。編碼P2D3之VH域的DNA序列(SEQ ID
 NO: 19)描繪於圖14C中。

P4A8抗體之VL域的胺基酸序列為：

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS~~CRASKSVSTSSYSYMHWYQ~~
 QKPGQPPKLLIKY~~ASNLESGV~~PARFSGSGSGTDFILNIHPVE
 EEDAATYYC~~QHSRELPFTFGSGTKLEIK~~(SEQ ID NO: 5)。
 編碼P4A8之VL域的DNA序列(SEQ ID NO: 20)描繪於圖
 14D中。

P3G5抗體之VL域的胺基酸序列為：

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS~~CRANKSVSTSSYSYMHWYQ~~
 QKPGQPPKLLIKY~~ASNLESGV~~PARFSGSGSGTDFILNIHPVE
 EEDAATYYC~~QHSRELPFTFGSGTKLEIK~~(SEQ ID NO: 6)。
 編碼P3G5之VL域的DNA序列(SEQ ID NO: 21)描繪於圖
 14E中。

P2D3抗體之VL域的胺基酸序列為：

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS~~CRASKSVSTSSYSYMHWYQ~~
 QKPGQPPKLLIKY~~TSNLESGV~~PARFSGSGSGTDFILNIHPVE
 EEDAATYYC~~QHSRELPWTFGGTKLEIK~~(SEQ ID NO: 7)。
 編碼P2D3之VL域的DNA序列(SEQ ID NO: 22)描繪於圖14F
 中。

上文所描繪之可變域序列中之每一者的CDR(CDR-



2

•

H2(中)及 CDR-H3(右)加下劃線。

抗 Fn14 抗體鼠類 κ 亞群 III 輕鏈可變域之比對如下：

```

P4A8      1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKL 50
          |||
P3G5      1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRANKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKL 50
          |||
P2D3      1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKL 50

P4A8      51 LIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFILNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPF 100
          |||
P3G5      51 LIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFILNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPF 100
          |||
P2D3      51 LIKYTSNLESGVPARFSGSGSGTDFILNIHPVEEEDAATYYCQHSREL PW 100

P4A8      101 TFGSGTKLEIK 111 (SEQ ID NO:5)
          |||
P3G5      101 TFGSGTKLEIK 111 (SEQ ID NO:6)
          |||
P2D3      101 TFGGGTKLEIK 111 (SEQ ID NO:7)

```

P4A8、P3G5 及 P2D3 中之每一者之輕鏈的 CDR-L1(左)、CDR-L2(中)及 CDR-L3(右)加下劃線。

實例 12：嵌合抗體

編碼重鏈及輕鏈之鼠類 P4A8 可變區的 cDNA 用於構築表現鼠類-人類嵌合體(chP4A8)之載體，其中 muP4A8 可變區與人類 IgG1 及 κ 恆定區連接。以下展示嵌合 P4A8-huIgG1 重鏈 cDNA 插入物之序列(自信號序列之引發子 ATG 至終止子 TGA)：

1 ATGGGATGCA GCTGGGTCAT GCTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
51 GCACTCCCAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GCCTGAGGTG GTGAGGCCTG
101 GGGTCTCAGT GAAGATTTC TGAAGGGTT CCGGCTACAC ATTCAGTGAT
151 TATGGTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT
201 TGGAGTTATT AGTACTTACA ATGGTTATAC AACTACAAC CAGAAGTTTA
251 AGGGCAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTGCCA GATTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT ACTGTGCAAG
351 AGCCTACTAT GGTAACCTTT ACTATGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA
401 CCTCAGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCAACGA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC
451 CTGGCACCTT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAAGTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAGACTCA CACATGCCCA
751 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
801 CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
901 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC

1051 CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
 1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC
 1251 GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAAGCTCA
 1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
 1401 TCCCGGTTGA (SEQ ID NO:32)

以下展示推導成熟chP4A8重鏈蛋白質序列：

1 QVQLQQSGPE VVRPGVSVKI SCKGSGYTFT DYGMHWVKQS HAKSLEWIGV
 51 ISTYNGYTNY NQKFKGKATM TVDKSSSTAY MELARLTSED SAIYYCARAY
 101 YGNLYYAMDY WGQGSVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP
 401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:33)

以下展示嵌合P4A8輕鏈cDNA插入物之序列(自信號序列之引發子ATG至終止子TAG)：

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG
51 TTCCACTGGT GACATTGTGC TGACACAGTC TCCTGCTTCC TTAGCTGTAT
101 CTCTGGGGCA GAGGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCAA AAGTGTCAGT
151 ACATCTAGCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC
201 ACCCAAATC CTCATCAAGT ATGCATCCAA CCTAGAATCT GGGGTCCCTG
251 CCAGGTTTCTG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCATCCT CAACATCCAT
301 CCAGTGGAGG AGGAGGATGC TGCAACCTAT TACTGTCAGC ACAGTAGGGA
351 GCTTCCATTC ACGTTCGGCT CGGGGACAAA GTTGGAATA AACGTACGG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGT CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAG (SEQ ID NO:34)

以下展示推導成熟chP4A8-人類κ輕鏈蛋白質序列：

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSSYSYMHY QQKPGQPPKL
51 LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFILNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPE
101 TFGSGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:35)

將表現載體(chP4A8重鏈載體pXW362及chP4A8輕鏈載體pXW364)共同轉染至293-EBNA細胞中且針對抗體分泌及特異性來測試經轉染細胞(經空載體及分子上選殖之不相關mAb載體轉染之細胞充當對照)。改良性培養基之西方墨點分析(以抗人類重鏈及輕鏈抗體顯色)指示經chP4A8轉染之細胞合成且有效分泌重鏈及輕鏈。與人類Fn14之直接FACS結合證實chP4A8之特異性。

構築在CHO細胞中穩定表現chP4A8之表現載體。藉由與編碼輕鏈及重鏈之載體共同轉染得到分泌chP4A8-huIgG1 κ mAb之穩定CHO細胞株。據稀釋滴定FACS檢定，藉由與經表面表現之人類Fn14直接結合，證實chP4A8之結合親和力與鼠類P4A8 mAb之結合親和力等價。

實例13：人類化抗體

以下描繪兩個人類化P4A8(huP4A8)重鏈(生殖系huVH1-18構架/一致HUMVH1 FR4/P4A8H CDR)之實例(各自展示胺基酸及DNA序列；CDR加下劃線且回復突變以粗體展示)：

型式H1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYGMHWVRQAPGQ
GLEWMGVISTYNGYTNYNQKFKGRVTMTVDKSTSTAYMELRSLRSD
DTAVYYCARAYYGNLYYAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG
GGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCAC
TGATTATGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCT

AGAGTGGATGGGAGTTATTAGTACTTACAATGGTTATACAAACTA
 CAACCAGAAGTTTAAGGGCAGAGTCACAATGACTGTAGACAAATC
 CACGAGCACAGCCTATATGGAACCTTCGGAGCTTGAGATCTGACGA
 TACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGCCTACTATGGCAACCTTTAC
 TATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
 CA (SEQ ID NO:23)

型式 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYGMHWVRQAPGQ
 GLEWIGVISTYNGYTNYNQKFKGRATMTVDKSTSTAYMELRSLRSD
 DTAVYYCARYYGNLYYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:12)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG
 GGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCAC
 TGATTATGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCT
 CGAGTGGATCGGAGTTATTAGTACTTACAATGGTTATACAAACTAC
 AACCAGAAGTTTAAGGGAAGAGCCACAATGACTGTAGACAAATCC
 ACGAGCACAGCCTATATGGAACCTTCGGAGCTTGAGATCTGACGAT
 ACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGCCTACTATGGCAACCTTTACT
 ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC
 A (SEQ ID NO:24)

以下描繪三個人類化 P4A8(huP4A8)輕鏈(K037659構架 /
 P4A8L CDR)之實例(各自展示胺基酸及 DNA 序列；CDR加
 下劃線且回復突變以粗體展示)：

型式 L1

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQ

PPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQH
SRELPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:13)

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCCTGGCTGTATCTCTG
 GGGCAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGT
 ACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGA
 CAGCCACCCAAACTCCTCATCAAATATGCATCCAACCTAGAATCTG
 GGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCTC
 CCTCAACATCCATCCCATGGAGGAGGACGATACCGCAATGTATTTT
 TGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCGGAGGGACA
 AAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:25)

型式 L2

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQ
 PPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFILNIHPMEEDDTAMYFCQH
SRELPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:14)

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCCTGGCTGTATCTCTG
 GGGCAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGT
 ACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGA
 CAGCCACCCAAACTCCTCATCAAATATGCATCCAACCTAGAATCTG
 GGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
 TCCTCAACATCCATCCAATGGAGGAGGACGATACCGCAATGTATTT
 CTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCGGAGGGAC
 AAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:26)

型式 L3

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQ
PPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFILNIHPMEEDDTATYYCQHS
RELPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCCTGGCTGTATCTCTG
GGGCAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGT
ACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGA
CAGCCACCCAAACTCCTCATCAAATATGCATCCAACCTAGAATCTG
GGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
TCCTCAACATCCATCCAATGGAGGAGGACGATACCGCAACCTATT
ACTGTCAACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCGGAGGGA
CAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:27)

構築 H1 huP4A8-huIgG1 重鏈之穩定 CHO 表現載體
pYL310。以下展示 pYL310 之 H1 huP4A8-huIgG1 重鏈 cDNA
插入物之序列(自信號序列之引發子 ATG 至終止子 TGA)：

1 ATGGGATGCA GCTGGGTCAT GCTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGCGT
51 GCACTCCCAG GTCCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTTTCC TGCAAGGGTT CCGGCTACAC ATTCAGTGAT
151 TATGGCATGC ACTGGGTGCG GCAGGCCCTT GGACAAGGGC TAGAGTGGAT
201 GGGAGTTATT AGTACTTACA ATGGTTATAC AAACCTACAAC CAGAAGTTTA
251 AGGGCAGAGT CACAATGACT GTAGACAAAT CCACGAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTCGGA GCTTGAGATC TGACGATACG GCCGTGTATT ACTGTGCAAG
351 AGCCTACTAT GGCAACCTTT ACTATGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC

451 CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGA ACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAGACTCA CACATGCCCC
751 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
801 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
901 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
1051 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
1251 GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAAGCTCA
1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
1401 TCCCGGTTGA (SEQ ID NO:36)

以下展示由pYL310編碼之推導成熟 huP4A8-IgG1 H1 重

鏈蛋白質序列：

```

1  QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKGSGYTFT DYGMHWVRQA PGQGLEWMGV
51  ISTYNGYTNV NQKFKGRVTM TVDKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAY
101 YGNLYYAMDY WGQGTLLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKHTTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:37)

構築 H2 huP4A8-huIgG1 重鏈之穩定 CHO 表現載體 pYL320。以下展示 pYL320 之 H2 huP4A8-huIgG1 重鏈 cDNA 插入物之序列(自信號序列之引發子 ATG 至終止子 TGA)：

```

1  ATGGGATGCA GCTGGGTCAT GCTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGCGT
51  GCACTCCCAG GTCCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTTTCC TGCAAGGGTT CCGGCTACAC ATTCAGTGAT
151 TATGGCATGC ACTGGGTGCG GCAGGCCCTT GGACAAGGGC TCGAGTGGAT
201 CGGAGTTATT AGTACTTACA ATGGTTATAC AAACACTAAC CAGAAGTTTA
251 AGGGAAGAGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCACGAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTCGGA GCTTGAGATC TGACGATACG GCCGTGTATT ACTGTGCAAG
351 AGCCTACTAT GGCAACCTTT ACTATGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA

```

401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC
451 CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTG TG ACAAGACTCA CACATGCCCA
751 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
801 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
901 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
1051 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
1251 GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
1401 TCCCGGTTGA (SEQ ID NO:38)

以下展示由 pYL320 編碼之推導成熟 huP4A8-IgG1 H2 重鏈蛋白質序列：

```

1  QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKGSGYTFT DYGMHWVRQA PGQGLEWIGV
51  ISTYNGYTNV NQKFGRATM TVDKSTSTAY MELRSLRSDS TAVYYCARAY
101 YGNLYYAMDY WGQGLTLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:39)

亦構築全長型式 L2 huP4A8- κ 輕鏈之穩定 CHO 表現載體 pYL317 cDNA。以下展示 pYL317 之 huP4A8 L2 κ 輕鏈 cDNA 插入物之序列(自信號序列之引發子 ATG 至終止子 TAG)：

```

1  ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCTGG
51  TTCCACTGGT GACATTGTGC TGACACAGTC TCCTGCTTCC CTGGCTGTAT
101 CTCTGGGGCA GAGGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCAA AAGTGTCAGT
151 ACATCTAGCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC
201 ACCCAAATC CTCATCAAAT ATGCATCCAA CCTAGAATCT GGGGTCCCTG
251 CCAGGTTTCA TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCATCCT CAACATCCAT
301 CCAATGGAGG AGGACGATAC CGCAATGTAT TTCTGTCAGC ACAGTAGGGA

```

```

351  GCTTCCATTC ACGTTCGGCG GAGGGACAAA GTTGGAAATA AAACGTACGG
401  TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451  TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501  GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551  AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601  AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651  CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701  ACAGGGGAGA GTGTTAG (SEQ ID NO:40)

```

以下展示由pYL317編碼之推導成熟huP4A8 L2 κ 輕鏈蛋白質序列：

```

1  DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSSYSYMHWY QQKPGQPPKL
51  LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFILNIH PMEEDDTAMY FCQHSRELPF
101  TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151  QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLKADY EKHKVYACEV
201  THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

```

亦構築全長型式L1 huP4A8- κ 輕鏈cDNA變體之穩定CHO表現載體pYL321。以下展示pYL321之huP4A8 L1 κ 輕鏈cDNA插入物之序列(自信號序列之引發子ATG至終止子TAG)：

```

1  ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCTGG
51  TTCCACTGGT GACATTGTGC TGACACAGTC TCCTGCTTCC CTGGCTGTAT
101  CTCTGGGGCA GAGGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCAA AAGTGTCAGT
151  ACATCTAGCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC

```

```

201 ACCCAAAC TC CATCAA ATGCATCCA C TAGAATCT GGGTCCCTG
251 CCAGGTT CAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCTCCCT CAACATCCAT
301 CCCATGGAGG AGGACGATAC CGCAATGTAT TTCTGTCAGC ACAGTAGGGA
351 GCTTCCATTC ACGTTCGGCG GAGGGACAAA GTTGAAATA AACGTACGG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAACTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAC TCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAG (SEQ ID NO:42)

```

以下展示由pYL321編碼之推導成熟huP4A8 L1 κ 輕鏈蛋白質序列：

```

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSSYSYMHWY QQKPGQPPKL
51 LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FCQHSRELPF
101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S LTLTLKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

```

構築全長型式L3 huP4A8- κ 輕鏈cDNA變體之穩定CHO表現載體pYL322。以下展示pYL322之huP4A8 L3 κ 輕鏈cDNA插入物之序列(自信號序列之引發子ATG至終止子TAG)：

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCTGG
51 TTCCACTGGT GACATTGTGC TGACACAGTC TCCTGCTTCC CTGGCTGTAT
101 CTCTGGGGCA GAGGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCAA AAGTGTCAGT
151 ACATCTAGCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC
201 ACCCAAATC CTCATCAAAT ATGCATCCAA CCTAGAATCT GGGGTCCCTG
251 CCAGGTTTCTG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCATCCT CAACATCCAT
301 CCAATGGAGG AGGACGATAC CGCAACCTAT TACTGTCAAC ACAGTAGGGA
351 GCTTCCATTC ACGTTCGGCG GAGGGACAAA GTTGGAATA AAACGTACGG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAG (SEQ ID NO:44)

以下展示由pYL322編碼之推導成熟huP4A8 L3 κ輕鏈蛋白質序列：

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSSYSYMHWY QQKPGQPPKL
51 LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFILNIH PMEEDDTATY YCQHSRELFP
101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:45)

藉由共同轉染重鏈質體與輕鏈質體在293E細胞中瞬間表現所有六種型式之huP4A8。組裝所有型式之huP4A8且使其以類似效價分泌(由ELISA定量來自瞬間轉染細胞之於改良性培養基中之效價且正規化以供結合檢定)。圖24展示如與在293E細胞中瞬間過度表現之表面人類Fn14直接結合之FACS稀釋滴定所檢定，所有型式之瞬間表現huP4A8皆具有與chP4A8等價之生物活性。圖25展示如競爭ELISA(與塗布於96孔盤之孔上的huFn14-huFc融合蛋白結合，由恆定量之經生物素標記鼠類P4A8競爭性地結合)所檢定，所有六種型式之huP4A8皆保持與chP4A8基本上等價之Fn14結合親和力。藉由以pYL310與pYL321共同轉染，得到分泌huP4A8-huIgG1 κ (H1/L1)mAb之穩定CHO細胞株。此抗體在重鏈之成熟序列中於Asn301(IgG1之CH2域中之天然糖基化位點)處具有糖基化。Asn301對應於以Kabat EU編號機制之Asn297(參見Kabat等人，1991「Sequences of proteins of immunological interest」NIH公開案第91-3242號)。

構築含有上述H1/L1組合且具有去糖基化S228P/T299A huIgG4重鏈(huP4A8-aglyG4P重鏈)的人類化型式之P4A8。產生IgG4重鏈S228P變化以消除半抗體且產生T299A變化以消除CH2之N-連接聚糖且藉此削弱效應功能。就抗體依賴性細胞毒性(ADCC)與補體介導之細胞毒性(CMC)而言，去糖基化抗體展現降低之效應功能。以下描繪重鏈(SEQ ID NO: 8)之成熟序列，殘基S228P及T299A加下劃線且呈

粗體(VH域對應於殘基1-121；IgG4恆定域對應於殘基122-447)：

```

1  QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKGSGYTFT DYGMHWVRQA PGQGLEWMGV
51  ISTYNGYTNY NQKFGRVTM TVDKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAY
101 YGNLYYAMDY WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK
201 TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD
251 TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNSA
301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
351 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
401 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG
(SEQ ID NO:8)

```

此蛋白質係由以下核苷酸序列編碼：

```

1  ATGGGATGCA GCTGGGTCAT GCTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGCGT
51  GCACTCCCAG GTCCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTTTCC TGCAAGGGTT CCGGCTACAC ATTCAGTGAT
151 TATGGCATGC ACTGGGTGCG GCAGGCCCCT GGACAAGGGC TAGAGTGGAT
201 GGGAGTTATT AGTACTTACA ATGGTTATAC AACTACAAC CAGAAGTTTA
251 AGGGCAGAGT CACAATGACT GTAGACAAAT CCACGAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTCGGA GCTTGAGATC TGACGATACG GCCGTGTATT ACTGTGCAAG
351 AGCCTACTAT GGCAACCTTT ACTATGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC

```

451 CTGGCGCCCT GCTCCAGATC TACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGA ACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGA CTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACGAAGACC TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAG AGTTGAGTCC AAATATGGTC CCCCATGCCC ACCGTGCCCCA
751 GCACCTGAGT TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCC AAAACC
801 CAAGGACACT CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG
851 TGGACGTGAG CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT
901 GGC GTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA
951 CAGCGCGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
1001 TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC
1051 TCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAGCCACA
1101 AGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCAGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA
1151 GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1201 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
1251 CCTCGATTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAGGCTA ACCGTGGACA
1301 AGAGCAGGTG GCAGGAGGGG AATGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
1351 GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCTGGGTTG
1401 A (SEQ ID NO:46)

抗體之 huP4A8 κ 輕鏈 (SEQ ID NO: 9)之成熟序列如下

(VL域對應於殘基1-111)：

```

1  DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSSYSYMHWY QQKPGQPPKL

51  LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FCQHSRELPF

101  TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV

151  QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV

201  THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:9)

```

除上述去糖基化 huIgG4 重鏈以外，T299A 去糖基化 huP4A8-huIgG1 重鏈亦可與 SEQ ID NO: 9 之輕鏈組合使用。以下描繪 T299A 去糖基化 huP4A8-huIgG1 重鏈 (SEQ ID NO: 16) 之成熟序列，殘基 T299A 加下劃線且呈粗體 (VH 域對應於殘基 1-121)：

```

1  QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKGSGYTFT DYGMHWVRQA PGQGLEWMGV

51  ISTYNGYTNV NQKFKGRVTM TVDKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAY

101  YGNLYYAMDY WGQGLTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

151  KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ

201  TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

251  PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

301  NSAYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

351  QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP

401  VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:16)

```

此蛋白質係由以下核苷酸序列編碼：

1 ATGGGATGCA GCTGGGTCAT GCTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGCGT
51 GCACTCCCAG GTCCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTTTCC TGCAAGGGTT CCGGCTACAC ATTCACTGAT
151 TATGGCATGC ACTGGGTGCG GCAGGCCCTT GGACAAGGGC TAGAGTGGAT
201 GGGAGTTATT AGTACTTACA ATGGTTATAC AACTACAAC CAGAAGTTTA
251 AGGGCAGAGT CACAATGACT GTAGACAAAT CCACGAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTCGGA GCTTGAGATC TGACGATACG GCCGTGTATT ACTGTGCAAG
351 AGCCTACTAT GGCAACCTTT ACTATGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC
451 CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAAGTCAAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAGACTCA CACATGCCCCA
751 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
801 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
901 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951 GCAGTACAAC AGCGCGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
1051 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG

1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACCT ACAAGACCAC
 1251 GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCCTCTAC AGCAAGCTCA
 1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
 1401 TCCCGGTTGA (SEQ ID NO:47)

以下展示由pEAG2228編碼之推導成熟huP4A8-agly IgG1
 重鏈蛋白質序列：

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKGSGYTFT DYGMHWVRQA PGQGLEWMGV
 51 ISTYNGYTNY NQKFKGRVTM TVDKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAY
 101 YGNLYYAMDY WGQGTLLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKHTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 NSAYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:48)

人類化P4A8 IgG1之特徵包括：溶解度超過12 mg/ml；
 pI(計算值)為8.1；pI(IEF)為9.1-9.2；活體外細胞毒性之
 EC₅₀為30 ng/ml(WiDr細胞MTT檢定)；視動物模型而定，

活體內異種移植物之 EC_{50} 為3.2 mg/kg或6.4 mg/kg(如本文進一步展示)；據FACS，與WiDr細胞結合之 EC_{50} 為0.12 nM。

實例14：結合親和力

使用ELISA直接結合檢定來評估hP4A8.IgG1對Fn14之 EC_{50} 。在4°C下用碳酸鈉(pH 9.5)中之2 µg/ml小鼠Fn14-小鼠Fc塗布96孔ELISA盤隔夜。在室溫下以PBS中之3% BSA將盤阻斷1小時。將hP4A8.IgG1之濃度自2 µg/ml滴定至11 pg/ml且在室溫下培育時間為1小時。由HRP山羊抗人IgG偵測經結合之hP4A8.IgG1。在此ELISA條件下hP4A8.IgG1之 EC_{50} 為約6.79 ng/ml。

在另一實驗中，根據製造商之說明書，使用Biacore胺偶合套組將鼠類或人類化P4A8之各種同功異型物固定於CM5感應晶片上。簡言之，在10 mM乙酸鹽(pH 5.0)中將蛋白質稀釋至30 µg/ml且將10 µl注射於已用1:1 N-羥基丁二醯亞胺(NHS):1-乙基-3(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)之10 µl注射液活化之晶片表面上。另外，使各實驗中之一個流槽保持未衍生化(underivatized)以作為背景對照。接著以1 M乙醇胺之50 µl注射液將過量游離胺基封端。典型固定量為約1200 RU。

在1號Biacore緩衝液(10 mM HEPES pH 7.0+150 mM NaCl+3.4 mM EDTA+0.005% P-20清潔劑+0.05% BSA)中製備處於0.3 nM至30 nM範圍內之濃度系列的人類Fn14。此等實驗中所用之可溶Fn14蛋白之胺基酸序列為

EQAPGTAPCSRGSSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLG
CAAAPPAPFRLWPEQKLISEEDLHHHHHH。使樣本以非
連續順序以50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率在抗體及對照表面上流過
歷時5分鐘，接著在1號Biacore緩衝液中解離15分鐘。在各
週期之後，以15 mM NaOH使晶片再生。

對於各濃度系列而言藉由將Y軸上之注射前反應設為零
且將X軸上之注射起點設為零，使原始數據正規化。藉由
將活性表面上之反應減去未衍生化表面上之反應且接著將
活性表面上之結合數據減去相同表面上之唯緩衝液反應
(buffer only response)(所謂數據之「雙重參考」)，從而使
數據進一步正規化。接著對於各濃度系列而言藉由使用
Biaevaluation軟體內針對1:1結合之馬誇特-李文柏格演算
法(Marquardt-Levenberg algorithm)擬合數據，來測定整體
締合及解離速率常數。自速率常數之比率計算親合力常數
($K_D = k_d/k_a$)。以大於95%純度之單體可溶性人類Fn14進行
結合檢定。

在結合檢定之前進行人類Fn14之吸光度掃描。使用由
Pace等人之方法自胺基酸序列計算之消光係數(Pace, C.N.,
Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G.及Gray, T. (1995) 「How
to measure and predict the molar absorption coefficient of a
protein」 *Protein Science*, 4:2411-23)。

在結合檢定之前進行吸光度掃描。因為mAb在此等實驗
中為固定物質，所以對於測定精確速率常數而言不需要精
確知曉質量、濃度或分子量，因此150 kDa之近似分子量

及1.5之近似質量消光係數用於自280 nm下之吸光度評估抗體之濃度。

表1：自速率常數之比率計算親合力常數($K_D=k_d/k_a$)

P4A8同功異型物	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
親本mAb(n=6)	$8.2\pm 2.3\times 10^5$	$1.6\pm 0.5\times 10^{-3}$	$2.0\pm 0.6\times 10^{-9}$
鼠類IgG1(n=4)	$2.7\pm 1.1\times 10^6$	$2.6\pm 0.3\times 10^{-3}$	$1.1\pm 0.6\times 10^{-9}$
鼠類IgG2a(n=6)	$2.4\pm 2.4\times 10^6$	$3.4\pm 2.6\times 10^{-3}$	$1.5\pm 1.5\times 10^{-9}$
嵌合(n=2)	$5.5\pm 2.4\times 10^5$	$1.5\pm 0.3\times 10^{-3}$	$3.5\pm 2\times 10^{-9}$
鼠類IgG1-agly(n=2)	$5.6\pm 3\times 10^5$	$1.5\pm 0.4\times 10^{-3}$	$3.0\pm 1.3\times 10^{-9}$
人類化IgG1(n=5)	$1.7\pm 0.9\times 10^6$	$2.9\pm 0.9\times 10^{-3}$	$2.6\pm 2.1\times 10^{-9}$
人類化IgG1-RRS(n=3)	$1.8\pm 0.3\times 10^6$	$3\pm 0.1\times 10^{-3}$	$1.7\pm 0.3\times 10^{-9}$
人類化IgG4(P) agly(n=5)	$2.0\pm 1.6\times 10^6$	$2.9\pm 0.7\times 10^{-3}$	$3.4\pm 3.1\times 10^{-9}$
人類化IgG4(P) agly RRS(n=3)	$2.9\pm 2\times 10^6$	$4.7\pm 2\times 10^{-3}$	$2.2\pm 1.3\times 10^{-9}$

人類化P4A8與可溶性單體人類Fn14之單價結合親和力(或「固有親和力」)係在約1 nM至4 nM或5 nM之範圍內。

P4A8全抗體與固定Fn14(二價Fn14-Fc)之二價結合親和力(親和力分量)為約50 pM。

實例15：卡斯蛋白酶檢定

卡斯蛋白酶檢定量測裂解之卡斯蛋白酶3及7之量。回應hP4A8處理來量測卡斯蛋白酶裂解之誘導。卡斯蛋白酶3及7視為「執行者」卡斯蛋白酶(與誘導細胞凋亡最為接近)，且因此此檢定與hP4A8之建議MOA有關。

將WiDr腫瘤細胞接種於96孔盤中且在80 U/ml hIFN γ 存在下暴露於一系列濃度(1 μ g/ml，以1:3稀釋滴定)之hP4A8。在培養物中3天後，使用Promega卡斯蛋白酶-Glo 3/7檢定試劑以量測裂解之卡斯蛋白酶3及7的存在。以與未經處理之細胞相比的倍數變化來呈現數據。

結果顯示在WiDr細胞中卡斯蛋白酶3/7回應hP4A8刺激

而誘導，甚至當在甚至最低濃度下測試時回應多聚體型式之hP4A8(hP4A8多聚體)亦觀測到最大作用(圖26)。當測試漸增濃度之單體形式之P4A8時觀測到劑量反應。在離體腫瘤中獲得類似結果。

實例16：NFkB誘導檢定

NF-kB檢定量測標準(p50、p65)及非標準(p52、RelB)NF-kB路徑之誘導。已公認TWEAK/Fn14路徑經NF-kB發送信號，因此此為用於證實hP4A8之促效劑活性的相關檢定。

使WiDr腫瘤細胞在6孔培養皿中生長且暴露於1 µg/ml P4A8(在此檢定中，使用鼠類型式之P4A8)或100 ng/ml hFc-TWEAK以供比較。在處理後不同時間點(處於1分鐘至24小時之範圍內)，自培養物製備核提取物。接著由ELISA套組(活性基元-TransAM NFkB家族轉錄因子檢定套組)對核提取物進行分析以量測個別NF-kB次單元(p50、p65、p52、RelB、c-Rel)。所有值皆相對於未受刺激之細胞而正規化。

結果顯示在WiDr細胞中NFkB次單元p50、p52、p65、RelB回應P4A8而誘導，指示標準NF-kB路徑與非標準NF-kB路徑均受刺激(圖27)。在離體腫瘤中獲得類似結果。

實例17：效應功能

活體外評估hP4A8之ADCC活性。在WiDr及MDA-MB231腫瘤細胞株中量測活性。將hP4A8.IgG1(亦即，具有與人類IgG1連接之VH1及VL1序列的人類化P4A8)與Fc殘缺型

式之P4A8(hP4A8-IgG1agly及hP4A8.IgG4Pagly)相比。

在IL-2存在下將自供體PBMC分離之NK細胞培育隔夜。以⁵¹Cr標記WiDr及MDA-MB-231靶細胞。將經培養之NK細胞與經標記之靶細胞以5:1比率在不同濃度之抗體存在下於37℃下一起培育4小時(亦以2:1之比率進行，數據未展示)。檢定中包括自發釋放對照(無NK細胞)及最大釋放對照(經Triton-X-10處理之靶細胞)。在培育期之後量測上清液之Cpm。溶解%計算如下：

$$\text{溶解}\% = \frac{(\text{樣本 cpm} - \text{自發 cpm}) \times 100}{(\text{最大 cpm} - \text{自發 cpm})}$$

在WiDr實驗與MDA-MB231實驗中，對hIgG1觀測到顯著ADCC活性，但對Fc殘缺(hP4A8-IgG1agly及hP4A8IgG4Pagly)P4A8抗體未觀測到顯著ADCC活性。陽性對照顯示一定活性，但不如hP4A8.IgG1一樣穩固(圖28)。此等研究證實，如抗體在活體外檢定中誘導ADCC之能力所量測，hP4A8.IgG1具有ADCC能力。

亦測定糖基化對活性之影響。在WiDr細胞中使用MTT檢定(上述)以測試糖基化對活體外活性是否具有影響。在此檢定中比較hP4A8.IgG1(完全效應功能)與hP4A8.IgG4Pagly(無效應功能)。在此檢定中測試研究參考標準物質。結果顯示與活體外hP4A8.IgG4Pagly相比，hP4A8.IgG1之活性略微增強且可再現。

亦已顯示hP4A8.IgG1之Fc效應功能在上述WiDr檢定與

MDA-MB231 檢定中於活體內均促進 P4A8 活性。將 6.4 mg/kg P4A8 hIgG1 投與任一動物模型比投與相同劑量之 P4A8hIgG4Pagly 更為有效(圖 29)。

實例 18：人類化 P4A8.IgG1 之活體內短期及長期功效

在帶有 WiDr 人類結腸腫瘤之無胸腺裸小鼠中評估以每週一次時程(qw)腹膜內(i.p.)投與6週之劑量處於 0.9 mg/kg 至 25.6 mg/kg 範圍內的以單劑形式投與之 P4A8.hIgG1 Fn14 抗體之功效。在腫瘤細胞接種後第 12 天當平均腫瘤體積為約 200 mm³時開始以 QW 時程(如箭頭所指示)用 12.8 mg/kg 之 IDEC 151(陰性對照)及 12.8 mg/kg、6.4 mg/kg、3.2 mg/kg、1.8 mg/kg 及 0.9 mg/kg 之 P4A8.hIgG1 腹膜內治療小鼠。數據為每一治療組 10 隻小鼠之平均值±SEM。*對所有給藥組而言，自 20 至 60 天與 IDEC 151 陰性對照相比， $p < 0.001$ 。

與同型匹配陰性對照抗體相比，P4A8hIgG1 在 0.9-25.6 mg/kg 範圍內之劑量下顯示統計學上顯著($p < 0.001$)之功效(圖 30、圖 31 及圖 32)。跨越 0.9 mg/kg、1.8 mg/kg、3.2 mg/kg 及 6.4 mg/kg 劑量組觀測到劑量依賴性功效。在 6.4 mg/kg 劑量以上，跨越 6.4 mg/kg、12.8 mg/kg 及 25.6 mg/kg 劑量組未觀測到劑量依賴性(圖 30 及圖 31)。跨越所測試之劑量範圍，以 qw×6 之時程，在此模型中以單劑形式投與之 P4A8hIgG1 的最低有效劑量似乎為 0.9 mg/kg(圖 30 及圖 31)。以相同給藥時程，最高有效劑量為 6.4 mg/kg。如圖 32 所示，在終止給藥之後 P4A8.hIgG1 抗體維持功效 50 天以

上。如無體重減輕所指示，以qw×6之時程充分耐受所有處於0.9 mg/kg至25.6 mg/kg範圍內之劑量(n=10隻小鼠/治療組)。

除每週給藥時程以外，亦發現當每隔一週或每三週一次投與時，投與P4A8hIgG1對帶有WiDr人類結腸腫瘤之無胸腺裸小鼠有效(圖37)。當腫瘤相對較大(約500 mm³)且仍觀測到腫瘤鬱積時在此研究中開始治療。儘管該抗體之半衰期係在抗體之正常至較低範圍內(在帶有腫瘤之小鼠中小於2.5天)，但抗體即使不頻繁投與亦令人驚訝地活體內有效。

在帶有MDA-MB-231乳癌腫瘤之SCID小鼠中評估以每週一次時程(qw)腹膜內(i.p)投與6週之劑量處於6.4 mg/kg至25.6 mg/kg範圍內的以單劑形式投與之P4A8.hIgG1 Fn14抗體之功效。在腫瘤細胞接種後第16天當平均腫瘤體積為約200 mm³時開始以QW時程(如箭頭所指示)用25.6 mg/kg之IDEC 151(陰性對照)及25.6 mg/kg、12.8 mg/kg及6.4 mg/kg之P4A8hIgG1腹膜內治療帶有MDA-MB-231人類乳房腫瘤之小鼠。數據為每一治療組9隻個小鼠之平均值±SEM。*自23至63天與IDEC 151陰性對照相比， $p < 0.001$ 。

與同型匹配陰性對照抗體相比，P4A8.hIgG1在6.4-25.6 mg/kg範圍內之劑量下顯示統計學上顯著($p < 0.001$)之功效(圖33)。以平均陰性對照之百分比表示之測試組平均腫瘤尺寸的比較呈現於圖34中，虛線表示國家癌症研究所(National Cancer Institute)關於活性之準則(42%)。

對此模型尚未測定P4A8.hIgG1以單劑形式投與時之最低有效劑量。跨越6.4 mg/kg、12.8 mg/kg及25.6 mg/kg劑量組未觀測到劑量依賴性。如無顯著體重減輕所指示，充分耐受此等劑量。

出乎意料地，P4A8.hIgG1在MDA-MB-231人類乳房腫瘤檢定中展現大於親本抗體P4A8之功效。兩種抗體在WiDr人類結腸腫瘤檢定中展現類似功效。

實例 19：P4A8.hIgG1之多聚化增強活性

P4A8.hIgG1與蛋白質A之多聚化在MTT檢定中增強WiDr細胞死亡以及WiDr細胞中之卡斯蛋白酶活化(圖15及圖26)。

實例 20：人類化P4A8 IgG1在胃癌中之功效

顯示人類化P4A8 IgG1抗體在Hs746T胃癌異種移植模型中以所測試之各種測試展現抗腫瘤作用(圖35及圖36A)。另外，藉由在N87胃異種移植模型中以每週一次給藥用3.2 mg/kg、6.4 mg/kg及12.8 mg/kg人類化P4A8IgG1治療顯示單劑功效(腫瘤尺寸減小70-80%)(圖36B)。

因此，P4A8有效殺死活體內動物模型中之腫瘤細胞且具有持久作用。

實例 21：在P4A8 Fn14界面處之胺基酸殘基相互作用

由蒸氣擴散法使鼠類P4A8 Fab/人類Fn14胞外域之複合物結晶且將其置於20°C之溫度下。具有繞射品質之板狀晶體在10-14天內於含有30% PEG 8000、100 mM乙酸鈉(pH 5)、0.2 M硫酸鋰之結晶溶液中生長。按原樣收集晶體

($0.2 \times 0.2 \times 0.01 \text{ mm}^3$)且在液氮中急驟冷凍。在國家同步加速器光源(National Synchrotron Light Source)(Upton, NY)之光束線 X25 下收集達 $3.5 \text{ \AA}$ 解析度之繞射數據。使用 HKL2000 程式(HKL Research, Charlottesville, VA, USA)之數據處理揭示晶體屬於 P21 空間群且近似晶胞尺寸為 $a=61.1 \text{ \AA}$, $b=103.3 \text{ \AA}$, $c=76.1 \text{ \AA}$ 且 $\beta=97.2^\circ$, 其與每個不對稱單元 2 個 P4A8 Fab-Fn14 複合物一致。利用人類化 P4A8 之同源模型及內部 Fn14 NMR 結構以 MOLREP(Vagin 及 Teplyakov, *J Appl Crystallogr* 1997, 30:1022-1025)進行分子置換使 P4A8 Fab 及 Fn14 分子得以置放, 所得 R 因子為 46%。在電子密度圖中僅可說明 Fn14 之半胱氨酸富集域的殘基 50-67。密度圖中缺少 H3 CDR 及 Fn14 胞外域之 N 末端殘基。藉由使 huFn14 胞外域之最新 NMR 結構(He 及 Dang, *Protein Science* 2009, 18:650-656)與 P4A8 Fab/Fn14 晶體結構之 NMR 結構重疊來產生界面之更完整模型。接著, 以軟體 ROSETTA(Das 及 Baker, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, 77:363-82)模擬 H3 CDR 且進行總體複合物之限制性最優化精化。表 2 突出在 P4A8/Fn14 界面處之胺基酸相互作用。

表 2：在 P4A8/Fn14 界面之胺基酸相互作用。

CDR L1	CDR L2	CDR L3
RASKSVST <u>SSYS</u> YMH	<u>Y</u> ASNLES	<u>S</u> REL <u>P</u> FT
S32 (P4A8) *C49 (Fn14)	Y54 (P4A8) *K48 (Fn14)	R96 (P4A8) D51 (Fn14)
Y34 (P4A8) W42 (Fn14)		
Y36 (P4A8) K48 (Fn14)		

CDR H1	CDR H2	CDR H3
GYTFT <u>DY</u> GMH	VISTYNGYTNYNQKFKG	AYYGNLYYAMDY
D31 (P4A8) *R58 (Fn14)	S52 (P4A8) *A57 (Fn14)	Y101 (P4A8) L46 (Fn14)
Y32 (P4A8) R58 (Fn14)	Y54 (P4A8) H60 (Fn14)	Y105 (P4A8) M50 (Fn14)
	N55 (P4A8) *A57 (Fn14)	Y106 (P4A8) R58 (Fn14)
	Y57 (P4A8) R56 (Fn14)	
	N59 (P4A8) *R56 (Fn14)	

具有界面殘基之P4A8 CDR以粗體突出/加下劃線。

*表示H鍵相互作用。

實例 22：細胞株對 P4A8、P4A8 多聚體及 TWEAK 之敏感性

在 FACS 緩衝液 (PBS, 1% BSA, 0.1% 疊氮化鈉) 中藉由將細胞與曲線劑量之 P4A8 混合，以 10 µg/ml 起始，接著以 1:2 連續稀釋來進行細胞株之 FACS 分析。以相同方式製備 mAb IDEC 151 作為對照且接著在 4°C 下將各抗體與細胞一起培育 30 min。以 FACS 緩衝液洗滌 2 次之後，在 4°C 下將細胞與經 PE 標記之抗 hu IgG Fc 特異性抗體 (Jackson Labs West Grove, PA) 一起培育 30 min。洗滌 2 次之後，將細胞固定於 2% 三聚甲醛中且在 Caliber Facscan (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上獲取。使用 Flow Jo 軟體 (Tree Star Inc. Ashland, OR) 分析數據且測定 MFI (平均螢光強度)。細胞株之表現量 (參見表 3) 係由以下準則根據其在 1.25 µg/ml P4A8 之濃度下的 MFI 來評定：

- 負 <10 MFI
- 低 10-29 MFI
- 中 30-59 MFI

高 60+MFI

藉由一式三份以 9 $\mu\text{g/ml}$ 起始將細胞塗於含有 80 U/ml 人類 INF γ 連同 Tweak-Fc、Hu P4A8、Hu P4A8-PA 或 IDEC 151 對照 mAb 之 1:3 連續稀釋液的培養基中來設置 MTT 檢定。將細胞培育 3-4 天且使用單溶液細胞效價 MTT 檢定 (One Solution Cell Titer MTT assay) (Promega Madison WI) 來顯色。對各個別樣本而言，藉由使用下式來測定存活百分比：存活% = (經處理孔之 OD / 未經處理孔之平均 OD) $\times$ 100。針對各處理條件計算平均值且接著相對於抑制劑濃度繪製存活%。

MTT 檢定之結果 (參見表 3) 係使用以下準則由其在 9 $\mu\text{g/ml}$ 下抑制增殖之能力來評定：

無活性 -(負)

> 80% 存活 +/-

約 80% 存活 +

約 60% 存活 ++

約 40% 存活 +++

< 20% 存活 ++++

表 3：對 P4A8、P4A8 多聚體及 TWEAK 之細胞株敏感性

腫瘤類型	細胞株	表現(FACS)	MTT 敏感性		
			P4A8	P4A8 多聚體	TWEAK
結腸	WiDr	中	+++	++++	++++
	HT-29	中	+++	ND	++++
	HCT-15	中	+/-	ND	+/-
	HCT-116	中	+	+	+
	SW-620	中	-	+/-	+
	Geo	中	-	+	++

	Dld-1	中	-	-	-
	Lovo	低	-	ND	++
	Km-12	低	-	-	+
	Colo-205	負	-	-	-
乳房	NCI-ADR	極高	+/-	+/-	+
	MDA-MB231	中	+/-	+	++
	SUM-159	中	-	ND	-
	Mx1	中	+	++	++
	DU4475	低	-	ND	-
	BT-549	負	-	ND	-
	ZR-75-1	負	-	-	-
	MCF-7	ND	+/-	ND	++
胰腺	BxPc-3	中	+/-	+	+++
	CFPAC-1	中	-	ND	-
	Su86.86	中	-	-	+
	Panc-1	低/中	+/-	+/-	+
	SW1990	中	-	+/-	+/-
	AsPC-1	低	+	+	+
	HCC1806	高	+/-	+	+
胃	Hs746T	中	-	++	++
	NCI-N87	中	-	++	++
卵巢	ES-2	高	+/-	+/-	+/-
	SKOV-3	中	+	++	+++
NSCL	HOP62	中/高	+/-	+	++
	A549	中	+/-	+/-	+/-
	NCI-H23	低	+/-	+	+
黑色素瘤	MDA-MB435	中	-	ND	-
	SK-MEL-2	中	+/-	++	++

ND=未進行

實例 23：抗體交叉阻斷

如下評估抗體交叉阻斷。將可溶性人類 Fn14 固定於表面上。接著使表面與未經標記之第一抗體接觸。隨後，添加經生物素標記之第二抗體且量測第二抗體與表面之結合性。第二抗體結合性之消除指示第一抗體交叉阻斷第二抗體與 Fn14 結合。

一組抗體交叉阻斷所選抗 Fn14 抗體結合之能力描繪於圖

38A(P2D3為經生物素標記之第二抗體)、圖38B(P3G5為經生物素標記之第二抗體)、圖38C(P4A8為經生物素標記之第二抗體)、圖38D(ITEM-4為經生物素標記之第二抗體)及圖38E(ITEM-3為經生物素標記之第二抗體)中。在此等實驗中，P1B12及P1C12用作無關對照抗體。*表示未使用未經標記之第一抗體的情況。

其他實施例

儘管本發明已結合其實施方式加以描述，但前述描述意欲說明且不限制隨附申請專利範圍之範疇所界定的本發明範疇。其他態樣、優勢及修改係在以下申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖1為展示如MTT檢定所量測，抗Fn14單株抗體P2D3、P4A8、P3G5及P3D8可活體外殺死WiDr結腸癌細胞之圖；

圖2A及圖2B為展示如TUNEL檢定所量測，抗Fn14單株抗體(P4A8)可活體外殺死Widr結腸癌細胞之線形圖(圖2A)及條形圖(圖2B)。

圖3為展示如MTT檢定所量測，活體外對Fn14單株抗體P2D3、P4A8及P3G5具抗性之Fn14+乳房腫瘤株(MDA-MB231)之實例的圖；

圖4為展示如在各種抗體濃度上由ng/ml IL-8所量測，Fn14單株抗體P4A8、P2D3、P3G5及P3D8在IL-8誘導檢定中為促效劑之圖；

圖5為展示如由在腫瘤接種後之天數上腫瘤體積

(mm³)(上部)或由第45天腫瘤重量(公克)所量測，抗Fn14單株抗體P2D3、P3G5及P4A8活體內有效治療Widr細胞結腸腫瘤之線形圖(上部)及條形圖(下部)；

圖6為展示如由在腫瘤植入後之天數上重量(g)所量測，在以抗Fn14單株抗體P2D3、P3G5及P4A8治療之動物中無明顯毒性之圖；

圖7為展示如由在腫瘤接種後之天數上腫瘤體積(mm³)所量測，抗Fn14單株抗體P4A8之各種劑量及給藥時序對治療大Widr腫瘤之功效的圖；

圖8為展示如由在腫瘤接種後之天數上腫瘤體積(mm³)所量測，Widr腫瘤對P4A8抗Fn14單株抗體之劑量反應的圖；

圖9為展示如由在腫瘤接種後之天數上測試/對照百分比所量測，Widr腫瘤對P4A8抗Fn14單株抗體之劑量反應的圖；

圖10為展示如由在腫瘤植入後之天數上體重變化百分比所量測，在以各種劑量之抗Fn14單株抗體P4A8治療之動物中無明顯毒性之圖；

圖11為展示如由在腫瘤接種後之天數上腫瘤體積(mm³)所量測，抗Fn14單株抗體P2D3及P4A8活體內有效治療MDA-MB231乳房細胞腫瘤之圖；

圖12為展示抗Fn14單株抗體P4A8及P2D3與來自多個物種(人類(hu)、鼠類(mu)及獼猴(cyno))之Fn14交叉反應之圖；

圖 13 為展示 P4A8 與具有 W42A 突變之人類 Fn14 的結合相對於野生型 Fn14 顯著較差之直方圖；

圖 14A-14F 為 P4A8 抗體之 VH 域(圖 14A)、P3G5 抗體之 VH 域(圖 14B)、P2D3 抗體之 VH 域(圖 14C)、P4A8 抗體之 VL 域(圖 14D)、P3G5 抗體之 VL 域(圖 14E)及 P2D3 抗體之 VL 域(圖 14F)的 DNA 序列；

圖 15 為展示如 MTT 檢定所量測，hP4A8IgG1 及多聚體型式之 hP4A8IgG1 活體外殺死 WiDr 結腸癌細胞之圖；

圖 16 為展示抗 Fn14 單株抗體 P2D3、P3D8、P3G5 及 P4A8 以類似 EC₅₀ 值與人類及獼猴表面 Fn14 結合之圖；

圖 17 為展示抗 Fn14 單株抗體 P2D3、P3D8、P3G5 及 P4A8 以類似 EC₅₀ 值與鼠類表面 Fn14 結合之圖；

圖 18A 及圖 18B 為展示具有不同重鏈效應功能之 huP4A8 變體以類似 EC₅₀ 值與人類(圖 18A)及大鼠(圖 18B)Fn14 結合之圖；

圖 19A 為展示 P4A8 與人類、獼猴及小鼠表面 Fn14 結合而不與爪蟾 Fn14 結合之直方圖；

圖 19B 為展示 Fc-huTWEAK 融合蛋白與人類、獼猴、小鼠及爪蟾表面 Fn14 結合之直方圖；

圖 19C 為展示 muFc-muTWEAK 融合蛋白與人類、獼猴、小鼠及爪蟾表面 Fn14 結合之直方圖；

圖 20 為 Fn14 胞外域之間隙比對；

圖 21A 為展示 Fc-TWEAK 與所有 Fn14 W42A 突變體結合之直方圖；

圖 21B 為展示 P4A8 與 Fn14 之結合性因突變至 W42A 而消除之直方圖；

圖 22 為展示當殘基 W42 突變至大疏水性殘基 W42F 或 W42Y 時 P4A8 與 Fn14 之結合性恢復正常之直方圖；

圖 23A 為展示 Fc-TWEAK 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23B 為展示 P4A8 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23C 為展示 P3G5 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23D 為展示 P2D3 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23E 為展示 ITEM-1 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23F 為展示 ITEM-4 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23G 為展示 ITEM-2 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 23H 為展示 ITEM-3 與一組人類 Fn14 點突變體結合之直方圖；

圖 24 為展示如與在 293E 細胞中瞬間過度表現之表面人類 Fn14 直接結合之 FACS 稀釋滴定所檢定，不同型式之 huP4A8 具有與 chP4A8 等價之生物活性的圖；

圖 25 為展示如競爭 ELISA 所檢定，不同型式之 huP4A8 保

持與chP4A8基本上等價之Fn14結合親和力之圖；

圖 26 為展示在 WiDr 細胞中卡斯蛋白酶 3/7 回應 hP4A8 及多聚體型式之 hP4A8(hP4A8 多聚體)之刺激而活化之圖；

圖 27 為展示在 WiDr 細胞中 NFkB 次單元回應 P4A8 而誘導之圖；

圖 28 為展示 hP4A8.IgG1 及 Fc 殘缺型式之 P4A8(hP4A8-IgG1agly 及 hP4A8.IgG4Pagly)之 ADCC 活性的圖；

圖 29 為展示在 WiDr 及 MDA-MB231 檢定中活體內投與 P4A8hIgG1 及 P4A8hIgG4Pagly 之結果的圖；

圖 30、圖 31 及圖 32 為展示以各種劑量投與帶有 WiDr 人類結腸腫瘤之無胸腺裸小鼠之 P4A8.hIgG1 抗體之活體內功效的圖；

圖 33 及圖 34 為展示以各種劑量投與帶有 MDA-MB-231 乳癌腫瘤之 SCID 小鼠之 P4A8.hIgG1 抗體之活體內功效的圖；

圖 35 為展示人類化 P4A8IgG1 在 Hs746T 胃癌異種移植模型中之功效的圖；

圖 36A 及圖 36B 為展示人類化 P4A8IgG1 在 Hs746T(圖 36A)及 N87(圖 36B)胃癌異種移植模型中之功效的圖；

圖 37 為展示以各種給藥時程投與帶有 WiDr 人類結腸腫瘤之無胸腺裸小鼠之 P4A8.hIgG1 抗體之活體內功效的圖；

圖 38A 為描繪一組抗體交叉阻斷抗體 P2D3 與人類 Fn14 結合之能力的圖；

圖 38B 為描繪一組抗體交叉阻斷抗體 P3G5 與人類 Fn14 結

合之能力的圖；

圖38C為描繪一組抗體交叉阻斷抗體P4A8與人類Fn14結合之能力的圖；

圖38D為描繪一組抗體交叉阻斷抗體ITEM-4與人類Fn14結合之能力的圖；及

圖38E為描繪一組抗體交叉阻斷抗體ITEM-3與人類Fn14結合之能力的圖。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98116062

※申請日：98.5.14

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K 39/395

一、發明名稱：(中文/英文)

抗FN14抗體及其用途

ANTI-FN14 ANTIBODIES AND USES THEREOF

C07K 16/28

A61P 35/00

二、中文發明摘要：

本發明揭示與受體Fn14結合且誘導或增強表現Fn14之癌細胞之細胞死亡的抗體及抗體片段。亦揭示使用該等抗體及抗體片段以誘導個體之腫瘤細胞死亡且治療個體之病症的方法。

三、英文發明摘要：

Antibodies and antibody fragments that bind to the receptor Fn14 and induce or enhance cell killing of Fn14-expressing cancer cells are disclosed. Also disclosed are methods of using the antibodies and antibody fragments to induce death of a tumor cell and treat disorders and in a subject.

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽於抗原決定基處選擇性結合，該抗原決定基在SEQ ID NO: 1之位置42處包括胺基酸殘基色胺酸；及(ii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。
2. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合，且交叉阻斷單株抗體P4A8或P3G5與SEQ ID NO: 1結合；及(ii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。
3. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽在與單株抗體P4A8、P3G5或P2D3相同之抗原決定基處選擇性結合；及(ii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段與該SEQ ID NO: 1多肽之結合阻斷TWEAK與該多肽結合。
5. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少80%一致之VH域；及(iii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。
6. 如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少90%

一致。

7. 如請求項6之抗體或其抗原結合片段，其中該VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少95%一致。
8. 如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列一致。
9. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少80%一致之VL域；及(iii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。
10. 如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少90%一致。
11. 如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少95%一致。
12. 如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列一致。
13. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少80%一致之VH域；(iii)包含與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或

SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少80%一致之VL域；及
(iv)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。

14. 如請求項13之抗體或其抗原結合片段，其中(i)該VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少90%一致；及(ii)該VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少90%一致。
15. 如請求項13之抗體或其抗原結合片段，其中(i)該VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少95%一致；及(ii)該VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少95%一致。
16. 如請求項13之抗體或其抗原結合片段，其中(i)該VH域與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列一致；及(ii)該VL域與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之胺基酸序列一致。
17. 如請求項13之抗體或其抗原結合片段，其中重鏈包含SEQ ID NO: 37或SEQ ID NO: 39且輕鏈包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 45。
18. 如請求項13之抗體或其抗原結合片段，其中重鏈包含SEQ ID NO: 37且輕鏈包含SEQ ID NO: 43。
19. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含(a)與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈互補決定區(CDR)，與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H2至少90%一致之

第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 4之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈CDR，與SEQ ID NO: 4之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 4之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR；及(iii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。

20. 如請求項19之抗體或其抗原結合片段，其中該第一重鏈CDR與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H1一致，該第二重鏈CDR與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H2一致，且該第三重鏈CDR與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H3一致。
21. 如請求項19之抗體或其抗原結合片段，其中該第一重鏈CDR與SEQ ID NO: 4之CDR-H1一致，該第二重鏈CDR與SEQ ID NO: 4之CDR-H2一致，且該第三重鏈CDR與SEQ ID NO: 4之CDR-H3一致。
22. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VL域，該VL域包含(a)與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L2至少90%一致之第二輕鏈CDR，及與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L3至少90%一致之第三輕鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 7之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 7之

CDR-L2至少90%一致之第二輕鏈CDR，及與SEQ ID NO: 7之CDR-L3至少90%一致之第三輕鏈CDR；及(iii)於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。

23. 如請求項22之抗體或其抗原結合片段，其中該第一輕鏈CDR與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L1一致，該第二輕鏈CDR與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L2一致，且該第三輕鏈CDR與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L3一致。
24. 如請求項22之抗體或其抗原結合片段，其中該第一輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L1一致，該第二輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L2一致，且該第三輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L3一致。
25. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其(i)與在細胞表面上表現之SEQ ID NO: 1多肽選擇性結合；(ii)包含VH域，該VH域包含(a)與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈CDR，與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR，或(b)與SEQ ID NO: 4之CDR-H1至少90%一致之第一重鏈CDR，與SEQ ID NO: 4之CDR-H2至少90%一致之第二重鏈CDR，及與SEQ ID NO: 4之CDR-H3至少90%一致之第三重鏈CDR；(iii)包含VL域，該VL域包含(a)與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之CDR-L1至少90%一致之第一輕鏈CDR，與SEQ ID NO: 5

或 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L2 至少 90% 一致之第二輕鏈 CDR，及與 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L3 至少 90% 一致之第三輕鏈 CDR，或 (b) 與 SEQ ID NO: 7 之 CDR-L1 至少 90% 一致之第一輕鏈 CDR，與 SEQ ID NO: 7 之 CDR-L2 至少 90% 一致之第二輕鏈 CDR，及與 SEQ ID NO: 7 之 CDR-L3 至少 90% 一致之第三輕鏈 CDR；及 (iv) 於活體內或活體外誘導或增強癌細胞之細胞死亡。

26. 如請求項 25 之抗體或其抗原結合片段，其中 (i) 該第一重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 2 之 CDR-H1 一致，該第二重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 2 之 CDR-H2 一致，且該第三重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 2 之 CDR-H3 一致；及 (ii) 該第一輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 5 之 CDR-L1 一致，該第二輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 5 之 CDR-L2 一致，且該第三輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 5 之 CDR-L3 一致。

27. 如請求項 25 之抗體或其抗原結合片段，其中 (i) 該第一重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 3 之 CDR-H1 一致，該第二重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 3 之 CDR-H2 一致，且該第三重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 3 之 CDR-H3 一致；及 (ii) 該第一輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L1 一致，該第二輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L2 一致，且該第三輕鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 6 之 CDR-L3 一致。

28. 如請求項 25 之抗體或其抗原結合片段，其中 (i) 該第一重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 4 之 CDR-H1 一致，該第二重鏈 CDR 與 SEQ ID NO: 4 之 CDR-H2 一致，且該第三重鏈 CDR 與

SEQ ID NO: 4之CDR-H3一致；及(ii)該第一輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L1一致，該第二輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L2一致，且該第三輕鏈CDR與SEQ ID NO: 7之CDR-L3一致。

29. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含與人類生殖系構架區總計至少90%一致之構架區。
30. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之VH域的構架區總計至少90%一致之VH域構架區。
31. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之VL域的構架區總計至少90%一致之VL域構架區。
32. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含(i)與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之VH域的構架區總計至少90%一致之VH域構架區，及(ii)與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之VL域的構架區總計至少90%一致之VL域構架區。
33. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該VH域包含SEQ ID NO: 8之胺基酸1-121。
34. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該VL域包含SEQ ID NO: 9之胺基酸1-111。
35. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該VH域包含

SEQ ID NO: 8之胺基酸1-121且該VL域包含SEQ ID NO: 9之胺基酸1-111。

36. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈包含SEQ ID NO: 8且該輕鏈包含SEQ ID NO: 9。

37. 如請求項25之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈包含SEQ ID NO: 16且該輕鏈包含SEQ ID NO: 9。

38. 如請求項1至37中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段誘導或增強WiDr結腸癌細胞之細胞死亡。

39. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為人類化抗體。

40. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為完全人類抗體。

41. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為單株抗體。

42. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為單鏈抗體。

43. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為多株抗體、嵌合抗體、F_{ab}片段、F_{(ab')₂}片段、F_{ab'}片段、F_{sc}片段或F_v片段。

44. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為多特異性抗體。

45. 如請求項44之抗體或其抗原結合片段，其中該多特異性抗體為雙特異性抗體。

46. 如請求項1至38中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為多價抗體。
47. 一種經分離細胞，其產生如請求項1至46中任一項之抗體或其抗原結合片段。
48. 如請求項47之細胞，其中該細胞為藉由使哺乳動物B細胞與骨髓瘤細胞融合而獲得之融合細胞。
49. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至46中任一項之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。
50. 一種誘導腫瘤細胞死亡之方法，該方法包含使表現Fn14之腫瘤細胞與有效誘導該腫瘤細胞死亡之量的如請求項1至46中任一項之抗體或其抗原結合片段接觸。
51. 一種預防或減少腫瘤細胞生長之方法，該方法包含向具有腫瘤之哺乳動物投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含有效預防或減少腫瘤細胞生長之量的如請求項1至46中任一項之抗體或其抗原結合片段。
52. 一種治療癌症之方法，該方法包含向患有癌症之哺乳動物投與包含治療有效量之如請求項1至46中任一項之抗體或其抗原結合片段的醫藥組合物。
53. 如請求項52之方法，其中該癌症為結腸癌或乳癌。
54. 如請求項51至53中任一項之方法，其中該哺乳動物為人類。

八、圖式：

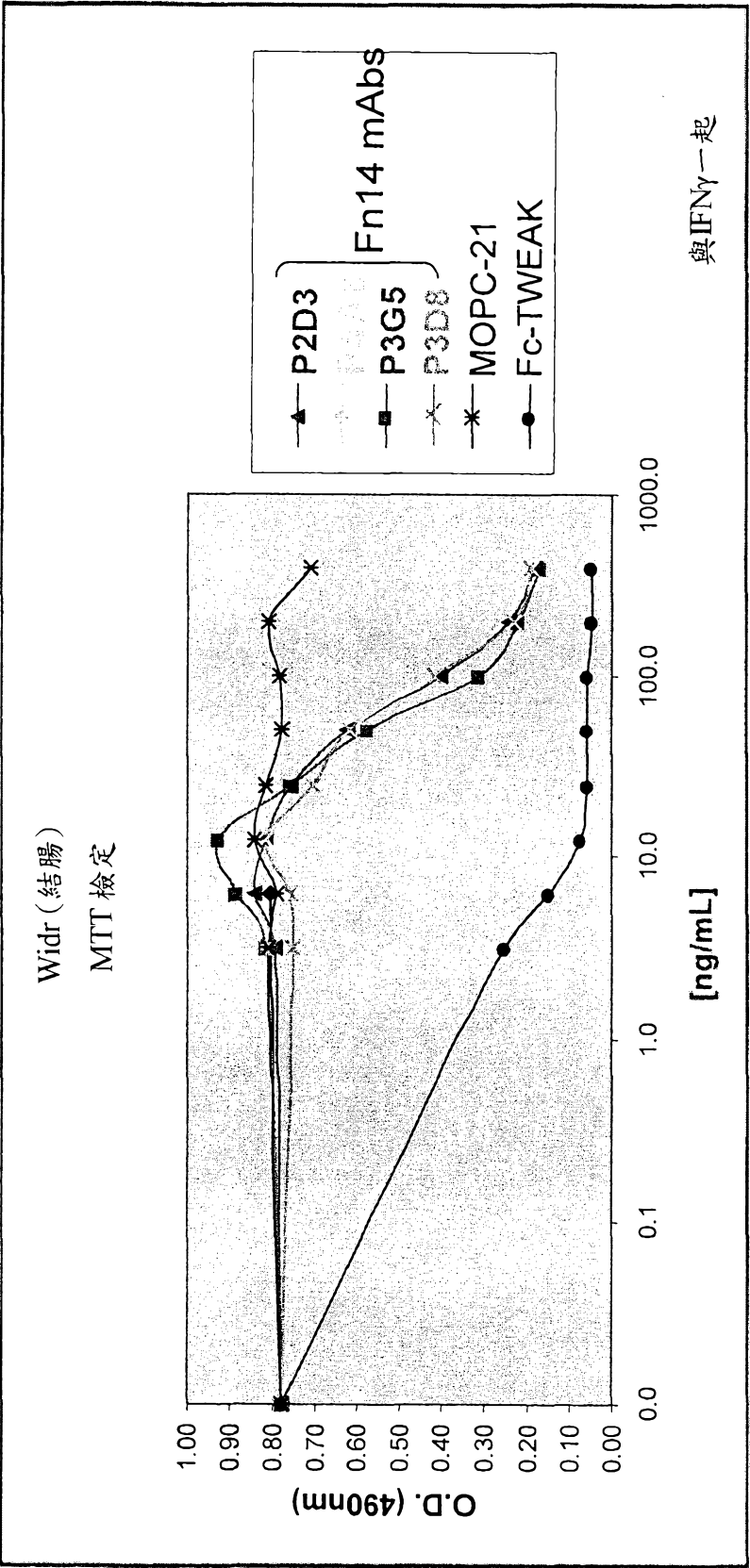


圖1

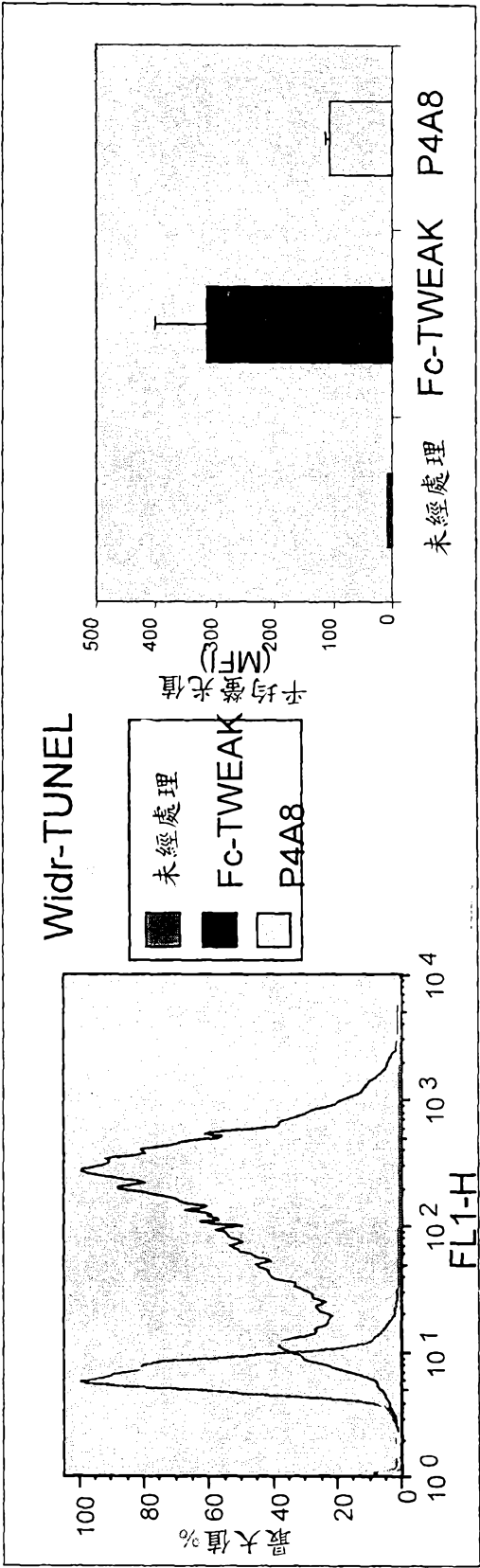


圖2A

圖2B

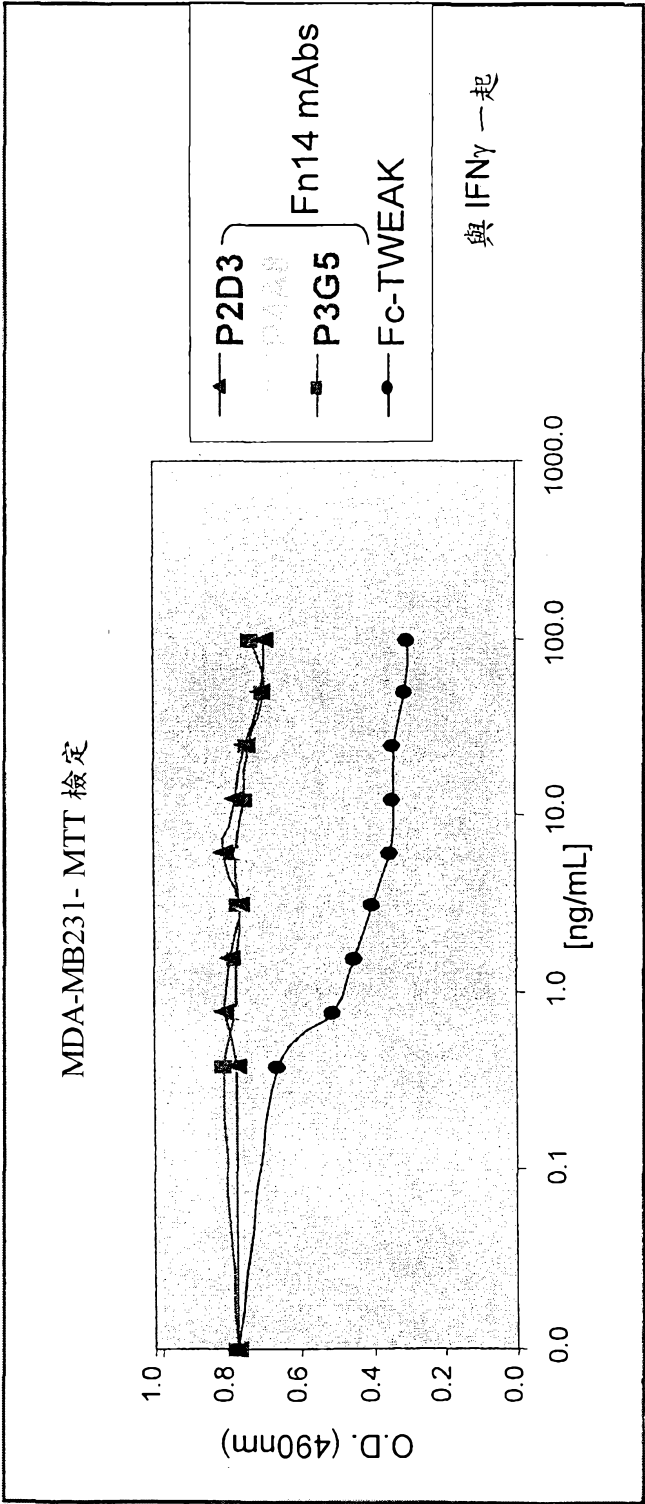


圖3

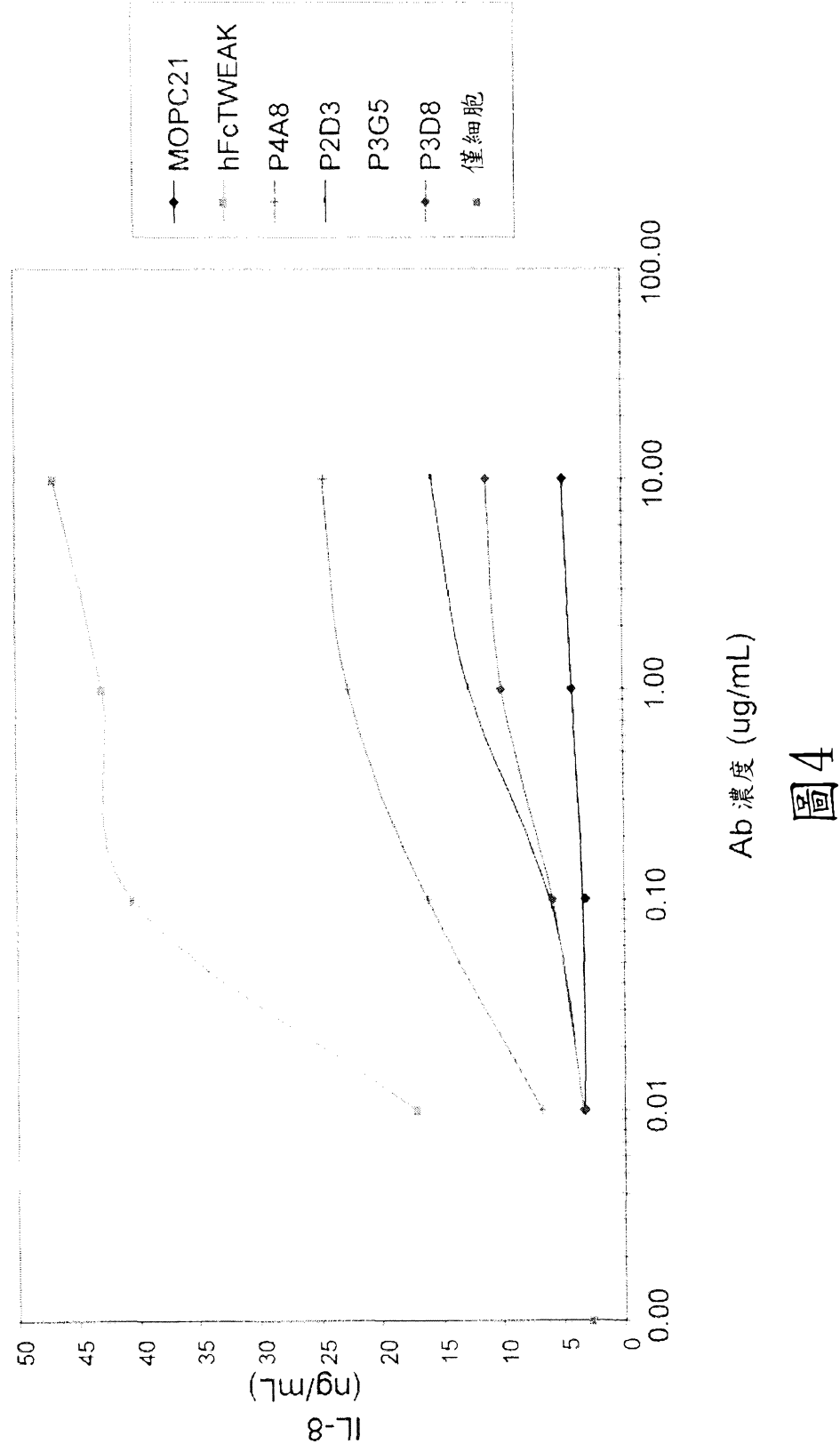


圖4

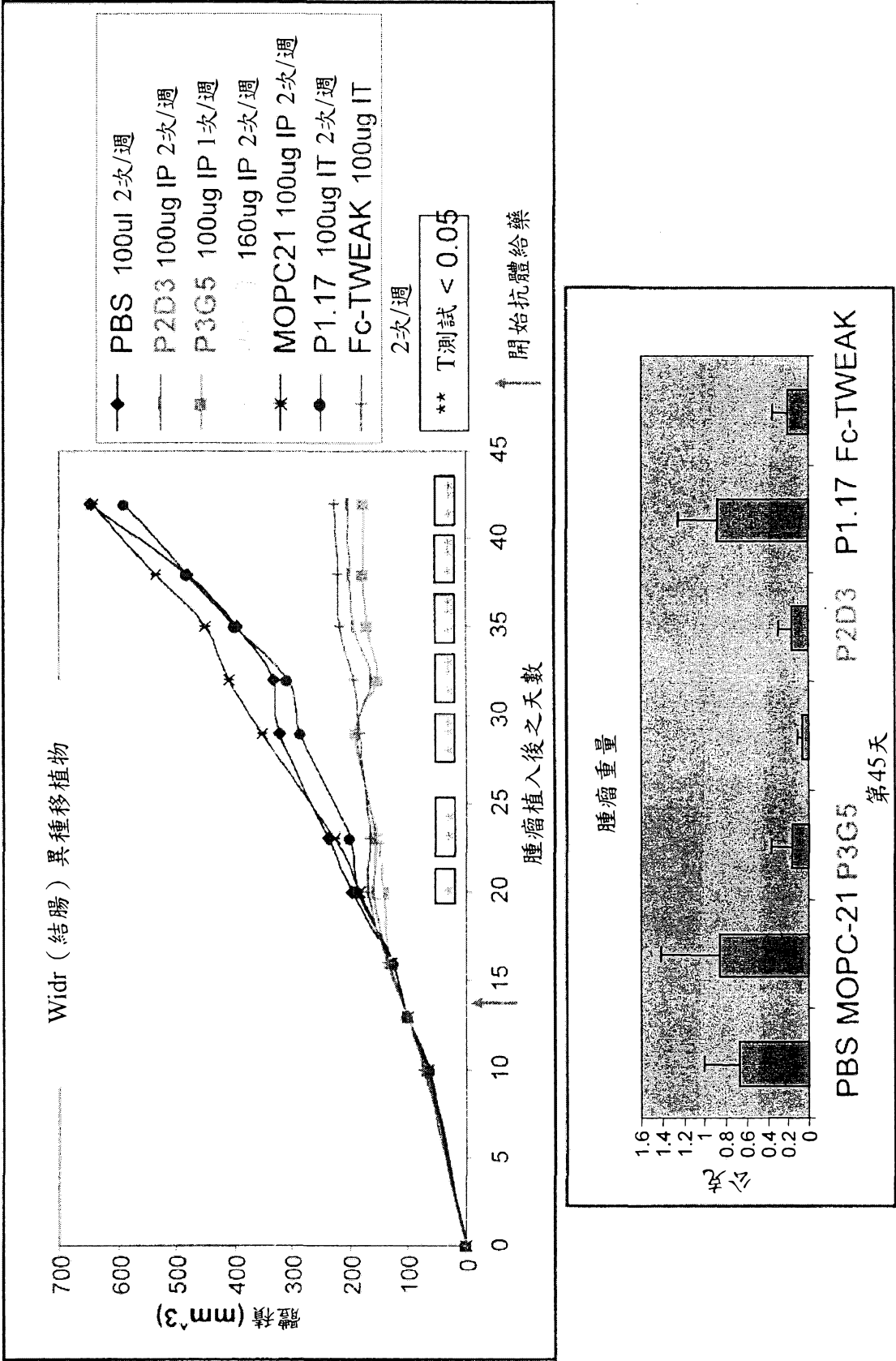


圖5

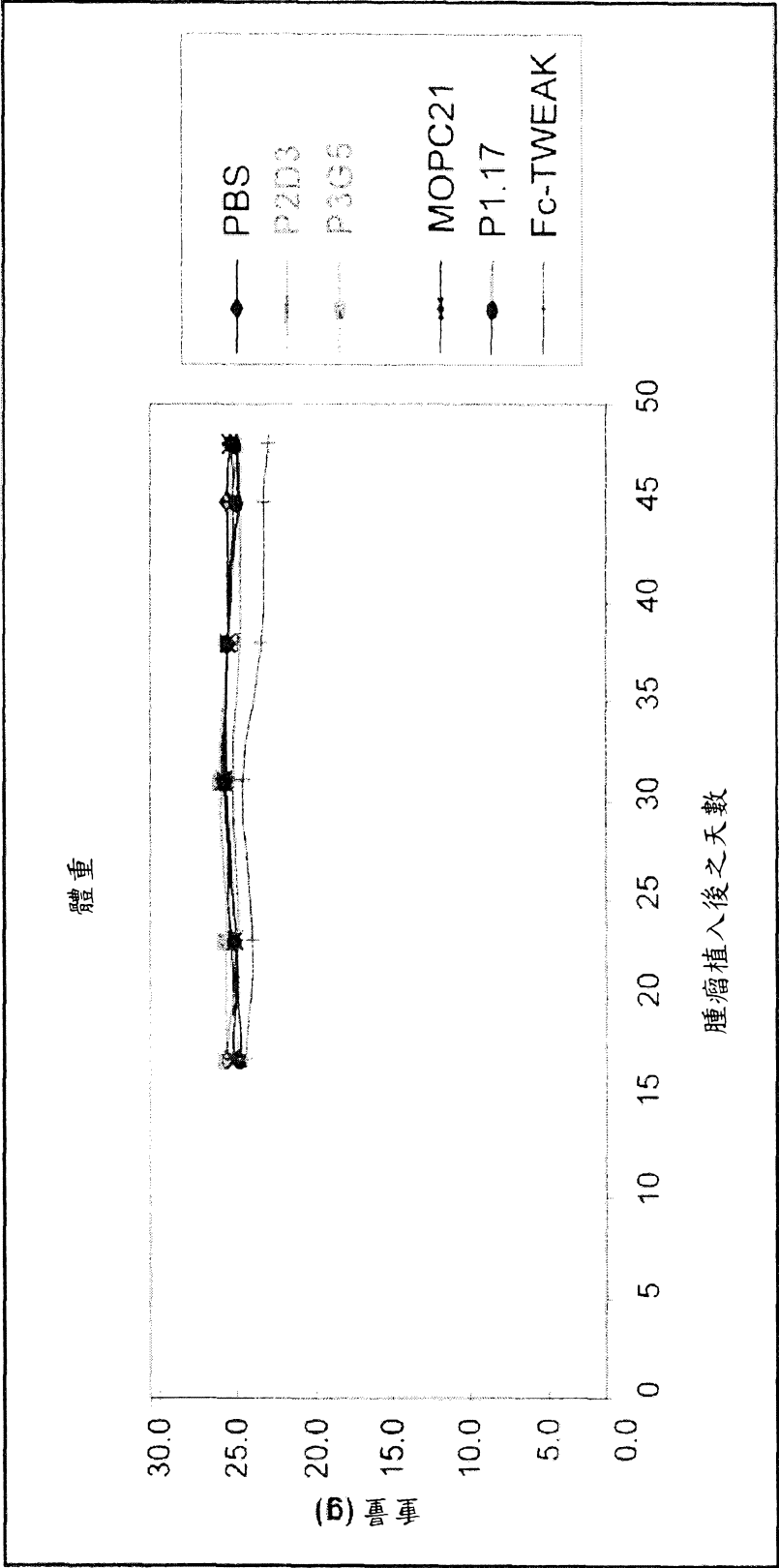


圖6

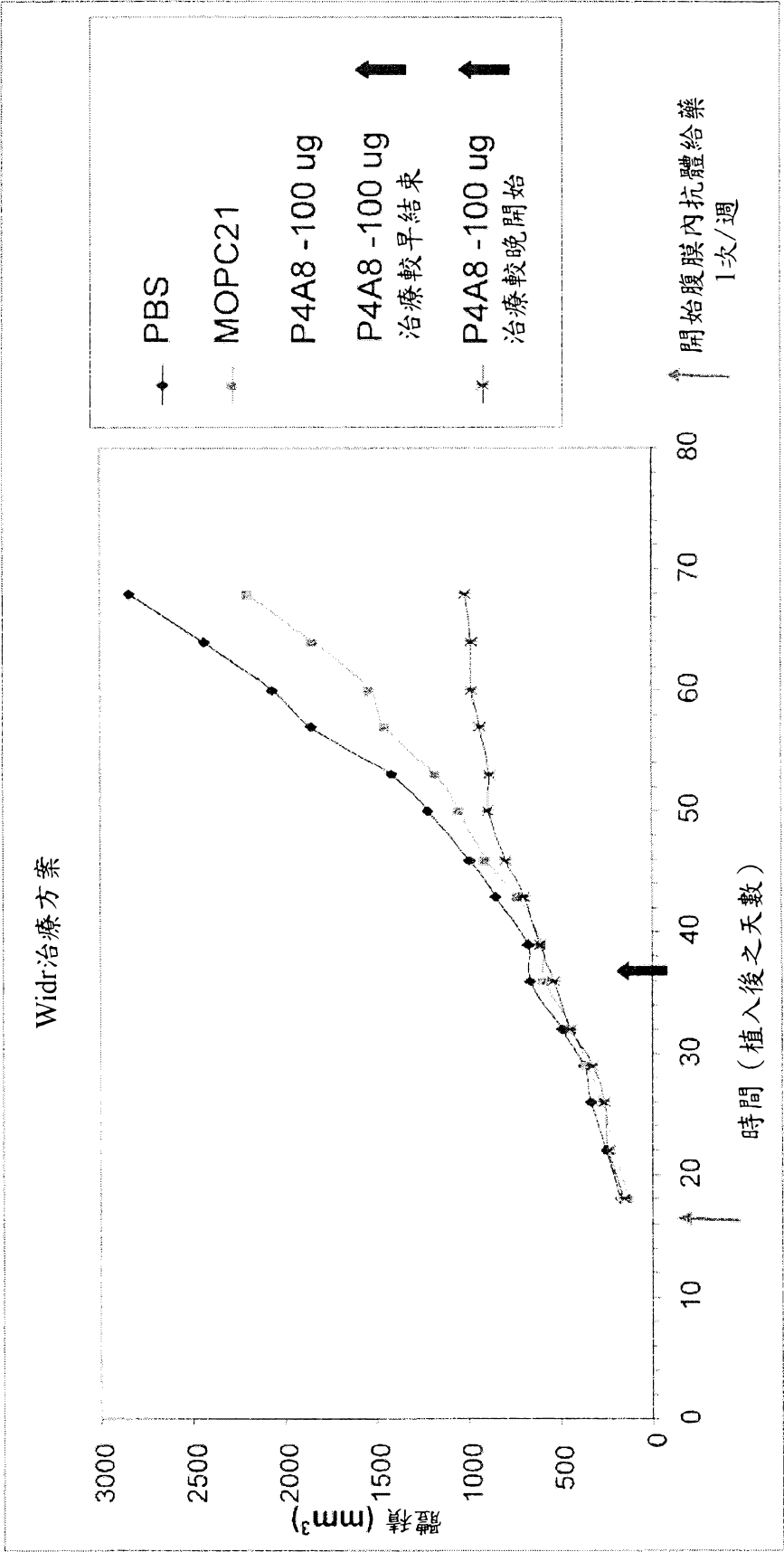


圖7

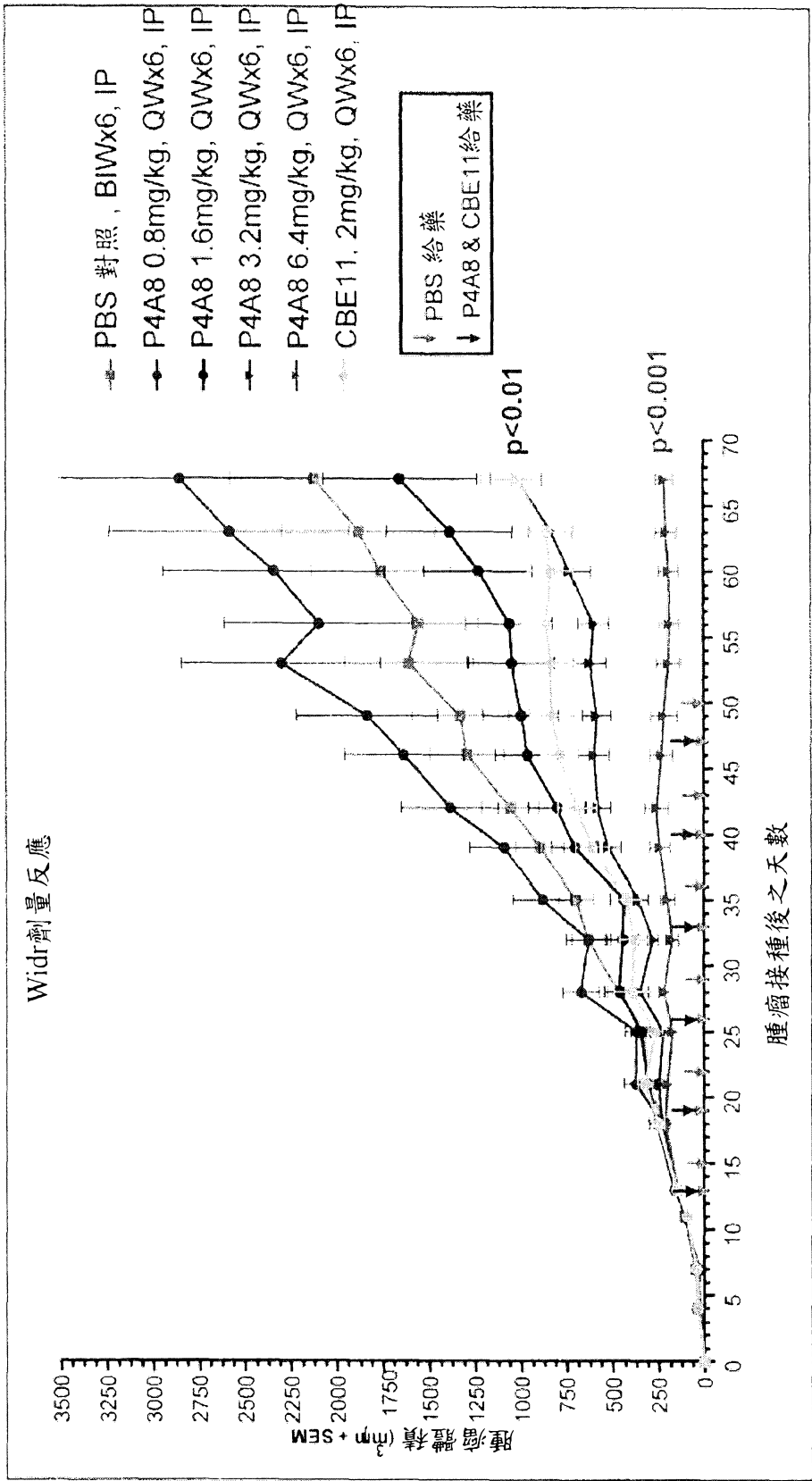


圖8

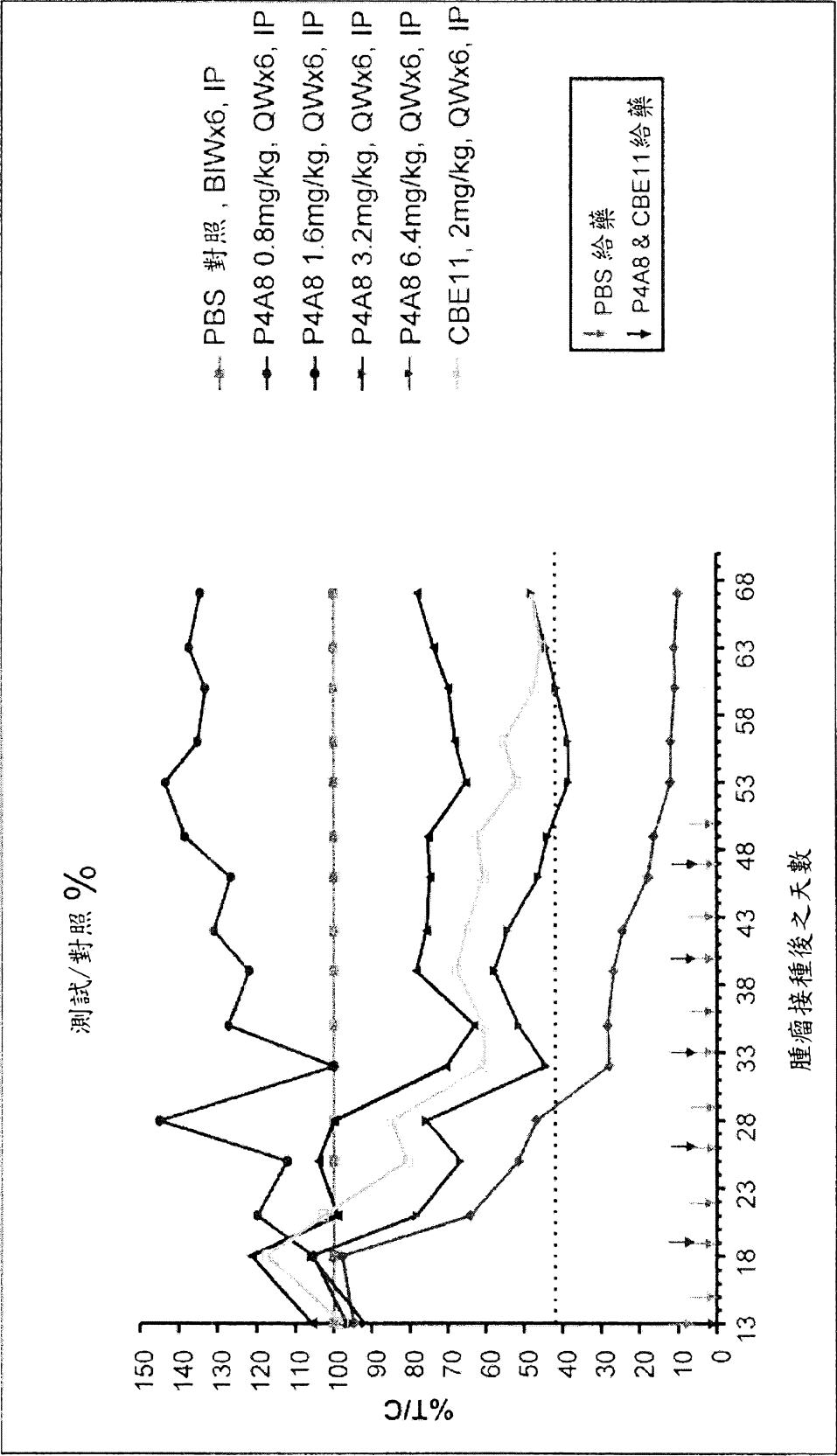


圖9

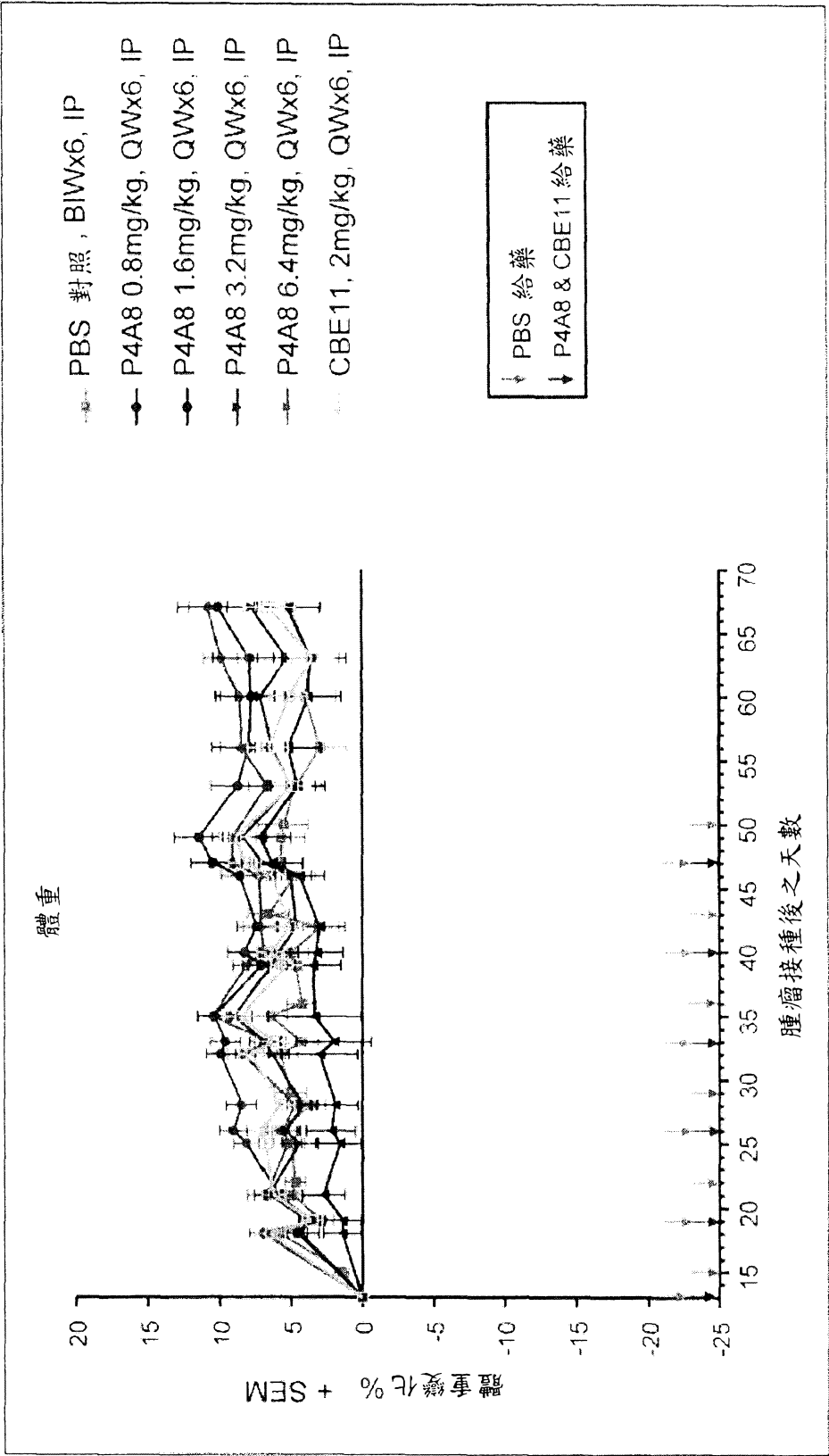


圖10

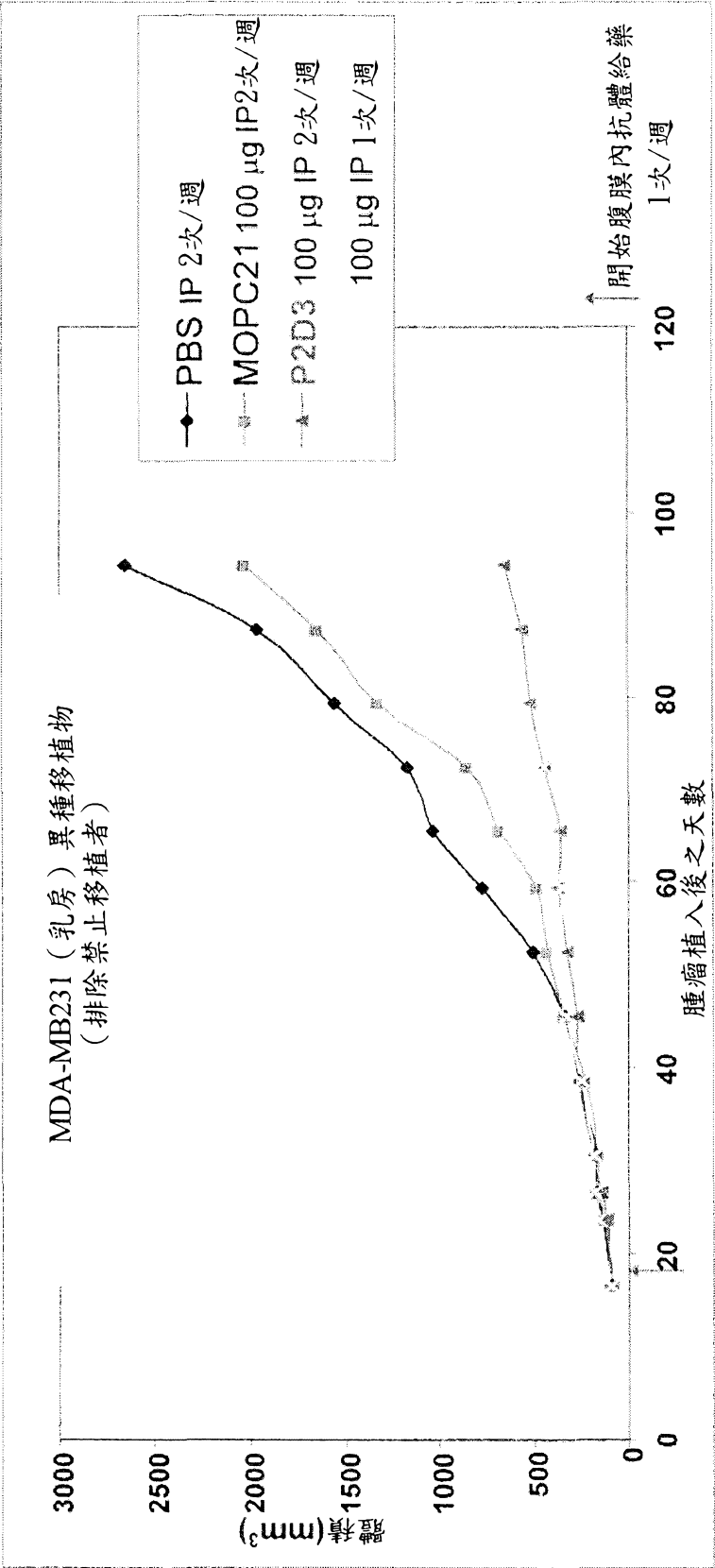


圖11

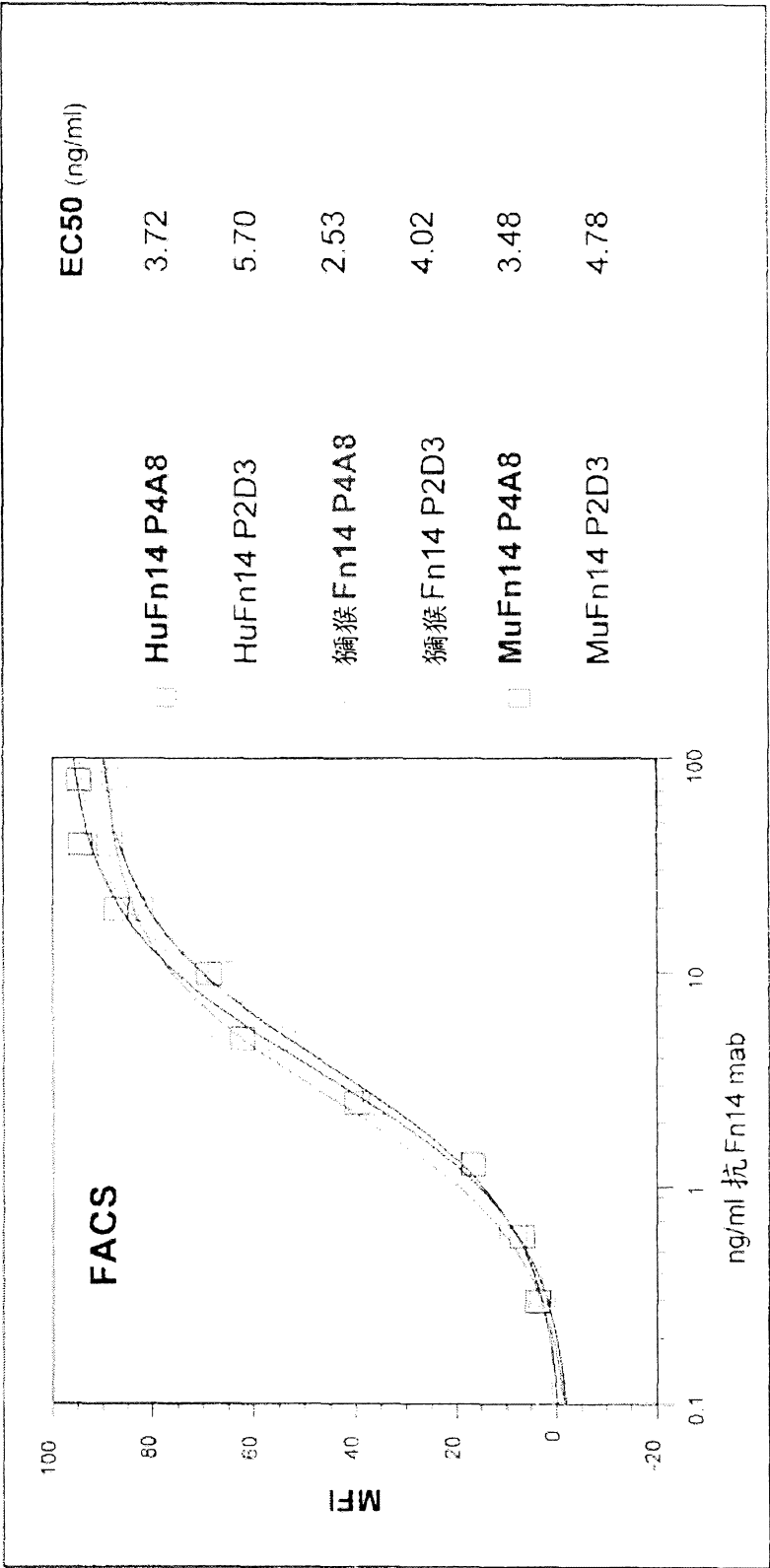


圖12

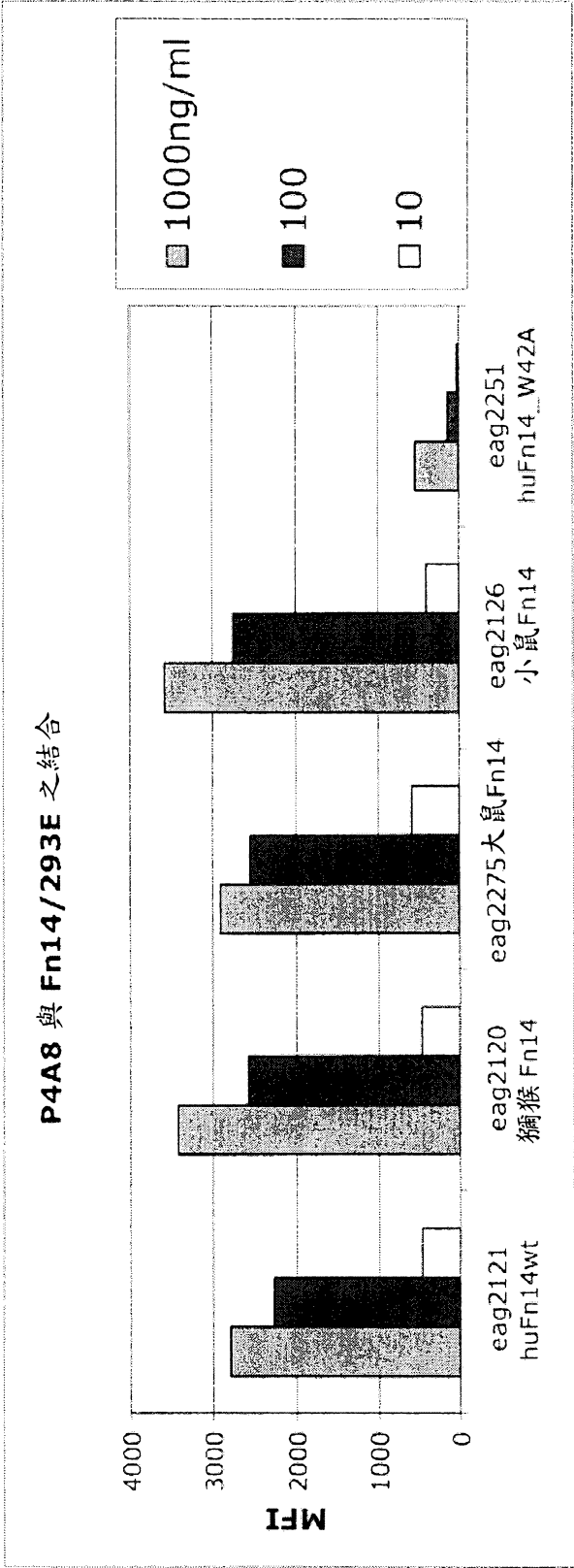


圖13

P4A8 重鏈轉譯 DNA:

1 CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGTGGTGAGGCCCTGGGGTCTCAGTGAAGATT 60
Q V Q L Q Q S G P E V V R P G V S V K I

61 TCCTGCAAGGTTCCGGCTACACATTCACTGATTATGGTATGCACTGGGTGAAGCAGAGT 120
S C K G S G Y T F T D Y G M H W V K Q S

121 CATGCAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACAATGGTTATACAAACTAC 180
H A K S L E W I G V I S T Y N G Y T N Y

181 AACCAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAT 240
N Q K F K G K A T M T V D K S S S T A Y

241 ATGGAACCTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGCCTAC 300
M E L A R L T S E D S A I Y Y C A R A Y

301 TATGGTAACCTTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC 360
Y G N L Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S

361 TCA 363
S

圖14A

P3G5 重鏈轉譯 DNA:

```
1  CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGGTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATT 60
   Q V Q Q L Q Q S G P E V V R P G V S V K I

61  TCCTGCAAGGGTTCGGCTACACATTCACTGATTATGGTATACACTGGGTGAAGCAGAGT 120
   S C K G S G Y T F T D Y G I H W V K Q S

121 CATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACAATGGTTATACAAACTAC 180
   H A K S L E W I G V I S T Y N G Y T N Y

181 AACCAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAT 240
   N Q K F K G K A T M T V D K S S S T A Y

241 ATGGAACCTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGCCTAC 300
   M E L A R L T S E D S A I Y Y C A R A Y

301 TATGGTAACCTTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC 360
   Y G N L Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S

361 TCA 363
   S
```

圖14B

P2D3 重鍵轉譯 DNA:

1 CAGGTTTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTG 60
Q V S L K E S G P G I L Q P S Q T L S L

61 ACTTGTTCTTCTCTGGGTTTTCAC TGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTG 120
T C S F S G F S L S T S G M G V S W I R

121 CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGC 180
Q P S G K G L E W L A H I Y W D D K R

181 TATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTT 240
Y N P S L K S R L T I S K D T S R N Q V

241 TTCCTCAAGATCACCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGG 300
F L K I T S V D T A D T A T Y Y C A R R

301 GGACCCGATTACTACGGCTACTATCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC 360
G P D Y Y G Y Y P M D Y W G Q G T S V T

361 GTCTCCTC 368
V S

圖14C

P4A8 輕鏈轉譯 DNA:

```
1 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGCAGAGGCCACC 60
  D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T

61 ATCTCATGCGGCCAGCAAAAGTGCAGTACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTAC 120
  I S C R A S K S V S T S S Y S Y M H W Y

121 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCT 180
  Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S N L E S

181 GGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCATCCTCAACATCCAT 240
  G V P A R F S G S G S G T D F I L N I H

241 CCAGTGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTC 300
  P V E E E D A A T Y Y C Q H S R E L P F

301 ACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA 333
  T F G S G T K L E I K
```

圖14D

P3G5 輕鏈轉譯 DNA:

1 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACC 60
D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T

61 ATCTCATGCAAGGCGCAACAAAGTGCAGTACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTAC 120
I S C R A N K S V S T S S Y S Y M H W Y

121 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCAAGTATGCATCCCAACCTAGAAATCT 180
Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S N L E S

181 GGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCATCCTCAACATCCAT 240
G V P A R F S S G S G T D F I L N I H

241 CCAGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTC 300
P V E E E D A A T Y Y C Q H S R E L P F

301 ACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA 333
T F G S G T K L E I K

圖14E

P2D3 輕鏈轉譯 DNA:

```
1 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGCAGAGGCCACC 60
  D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T

61 ATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTAC 120
  I S C R A S K S V S T S S Y S Y M H W Y

121 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCAAGTATACATCCAACCTAGAATCT 180
  Q Q K P G Q P P K L L I K Y T S N L E S

181 GGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCATCCTCAACATCCAT 240
  G V P A R F S G S G S G T D F I L N I H

241 CCAGTGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCGTGG 300
  P V E E E D A A T Y Y C Q H S R E L P W

301 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA 333
  T F G G G T K L E I K
```

圖14F

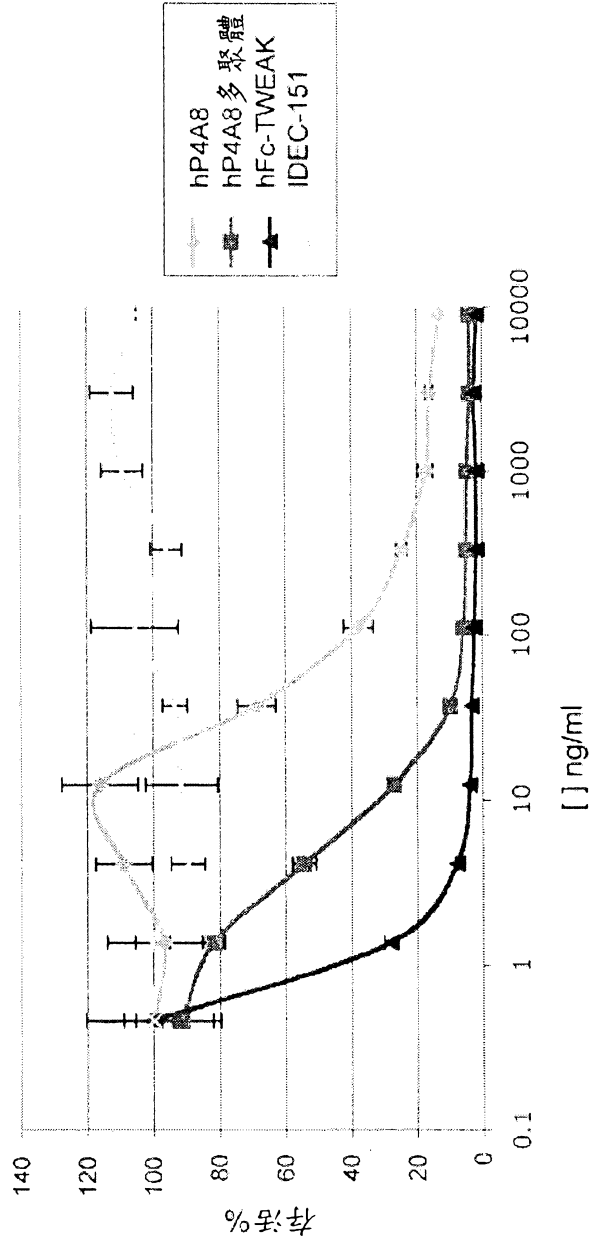


圖15

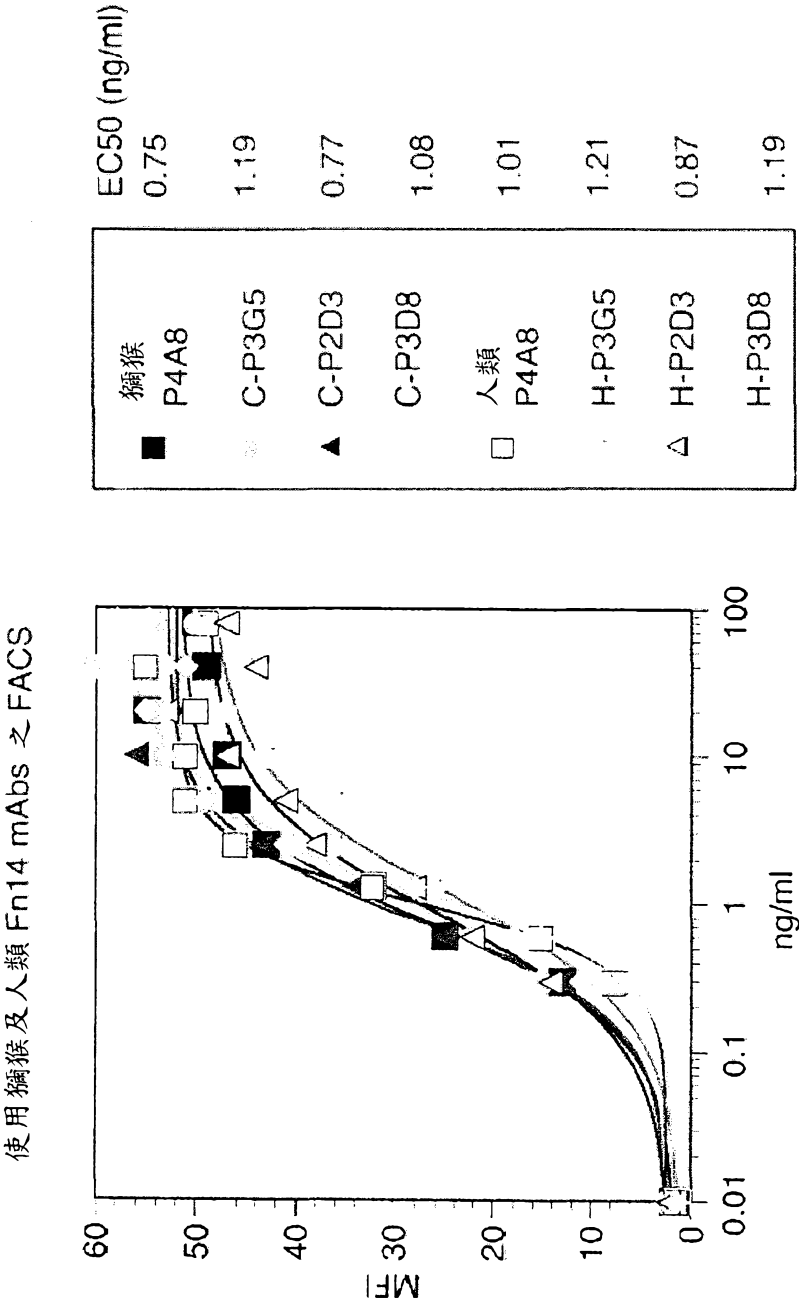


圖16

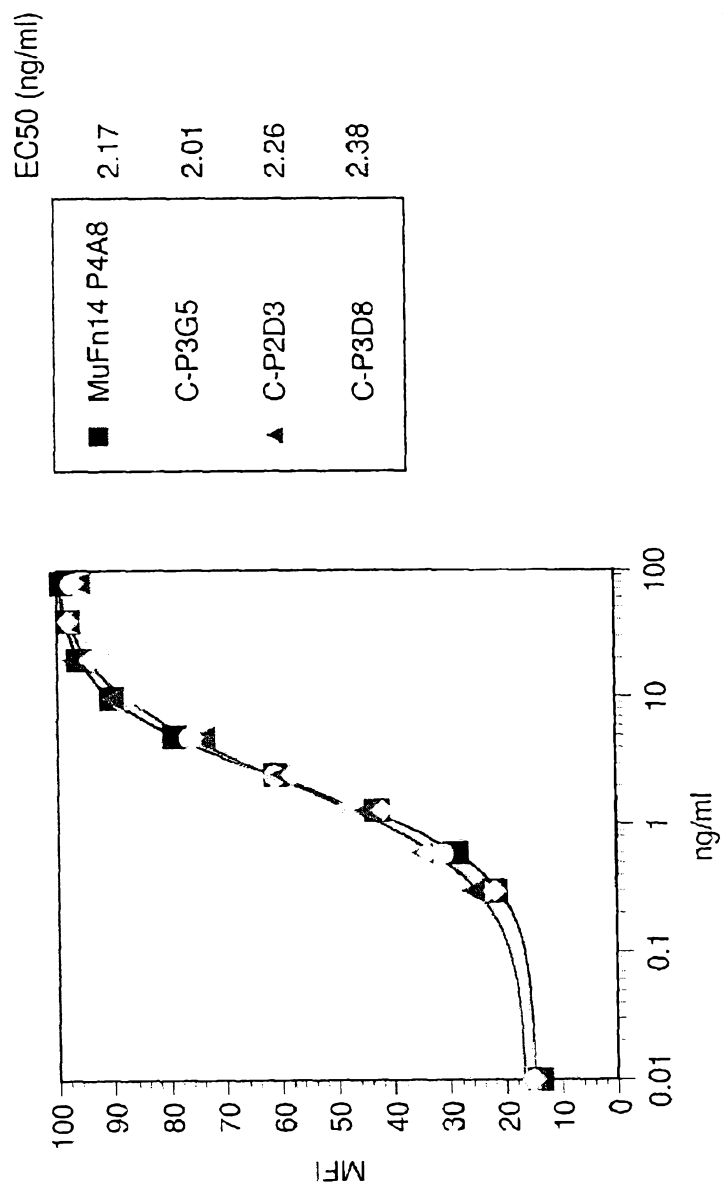


圖17

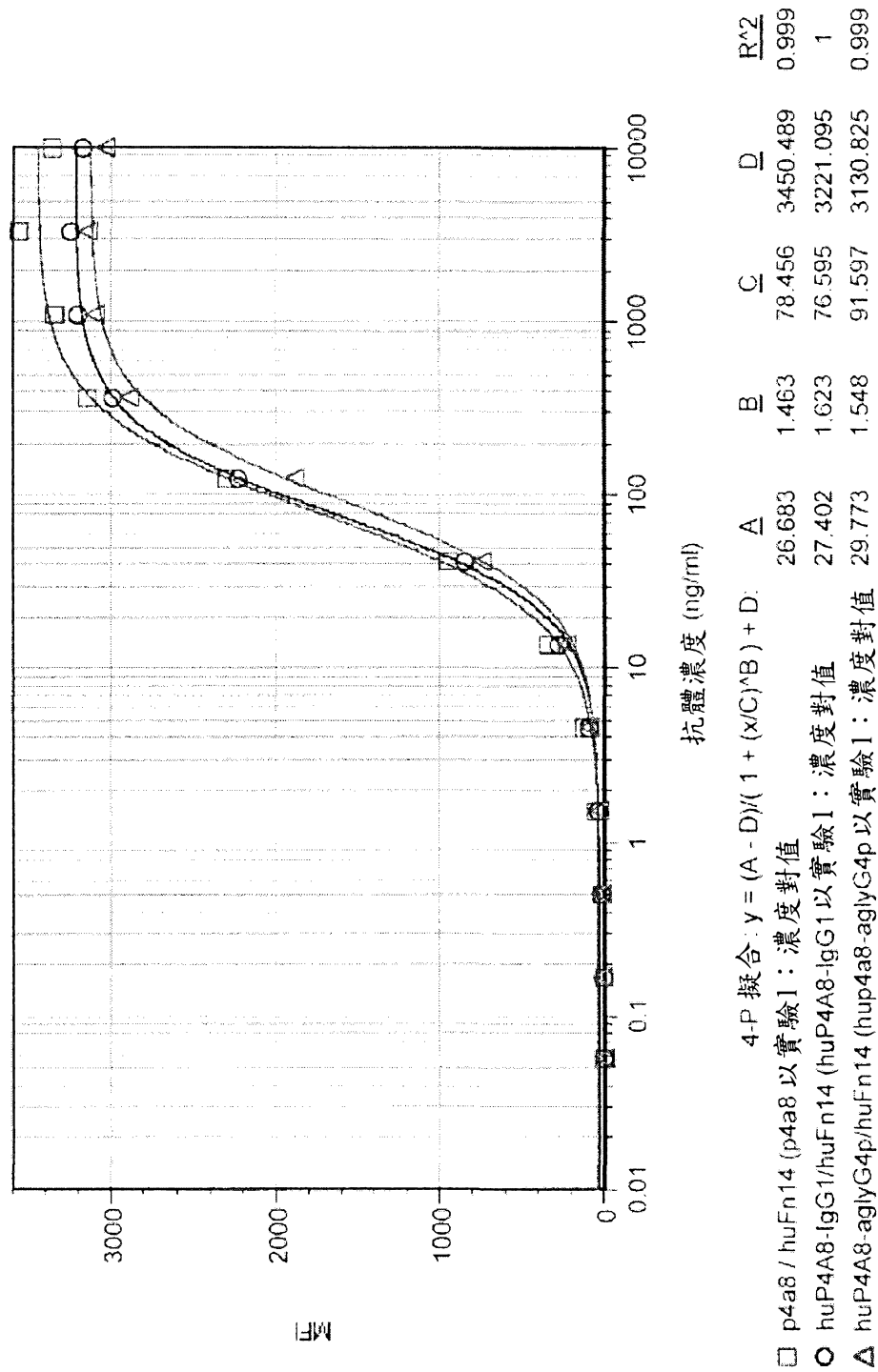


圖18A

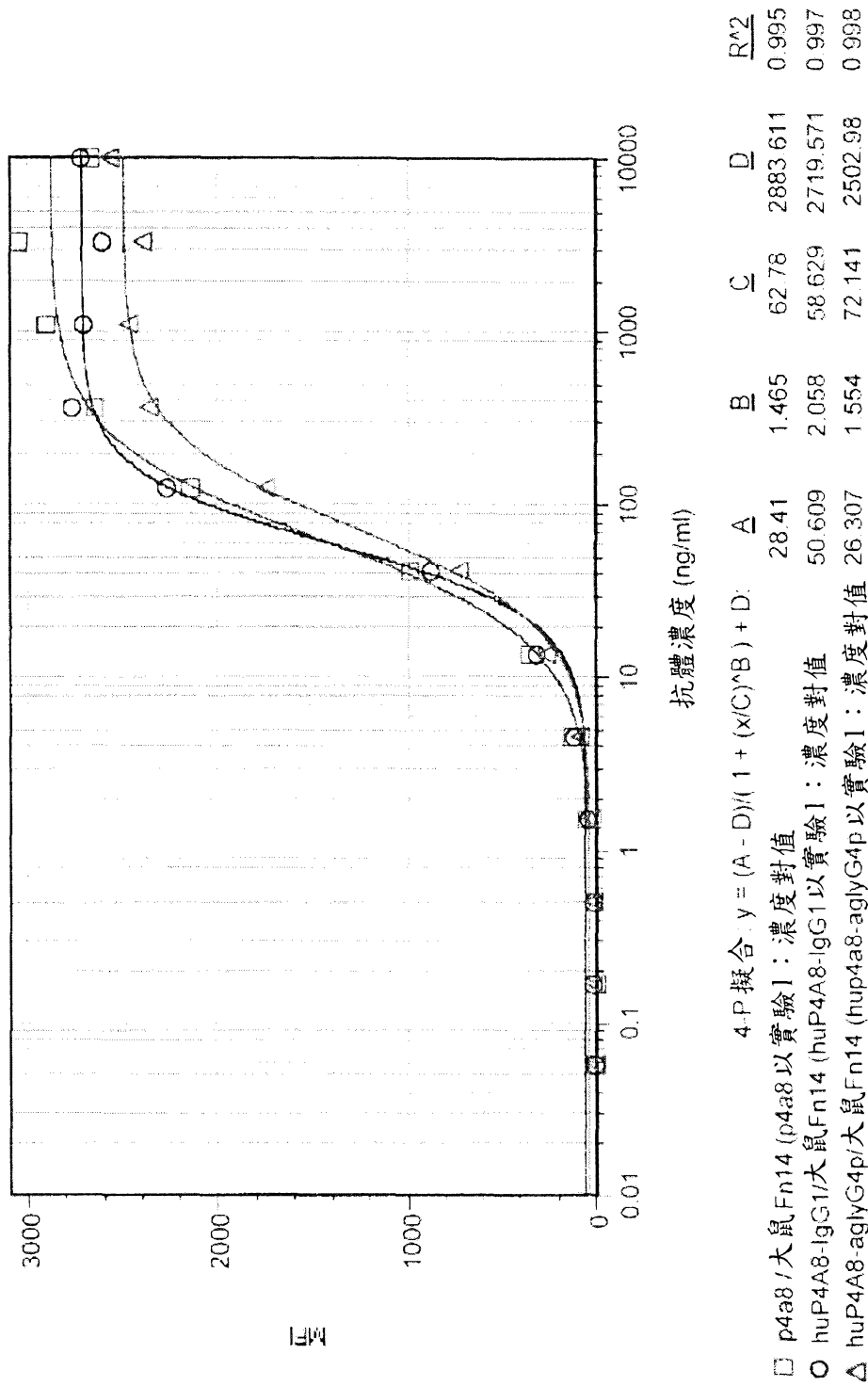


圖18B

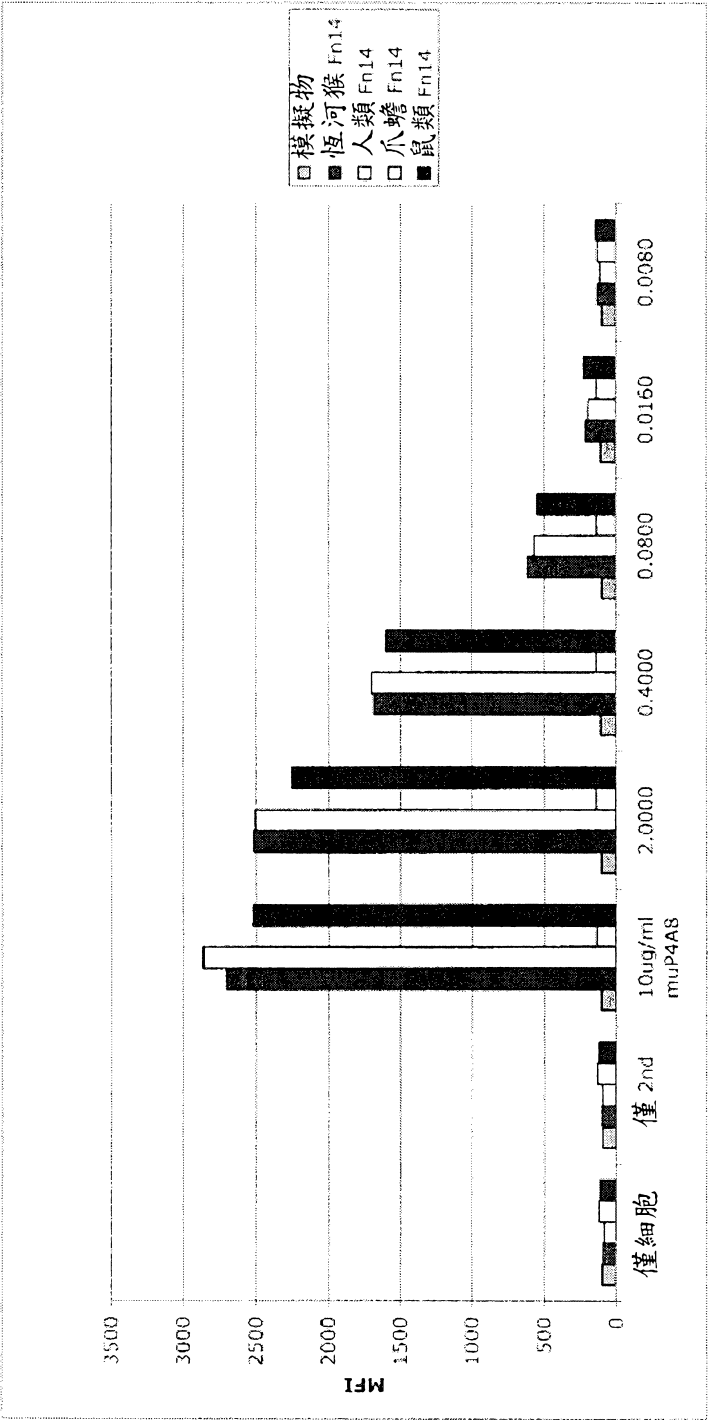


圖19A

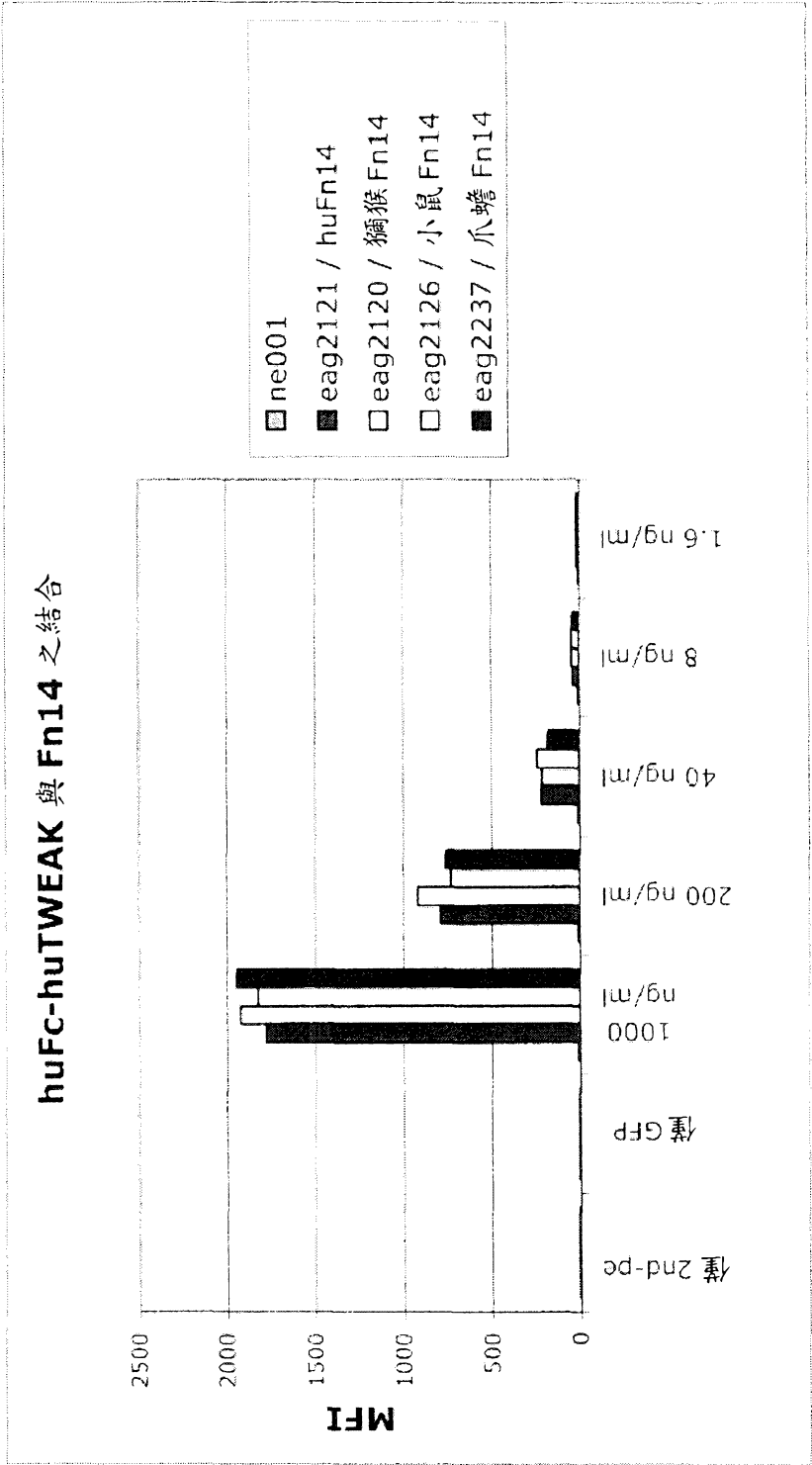


圖19B

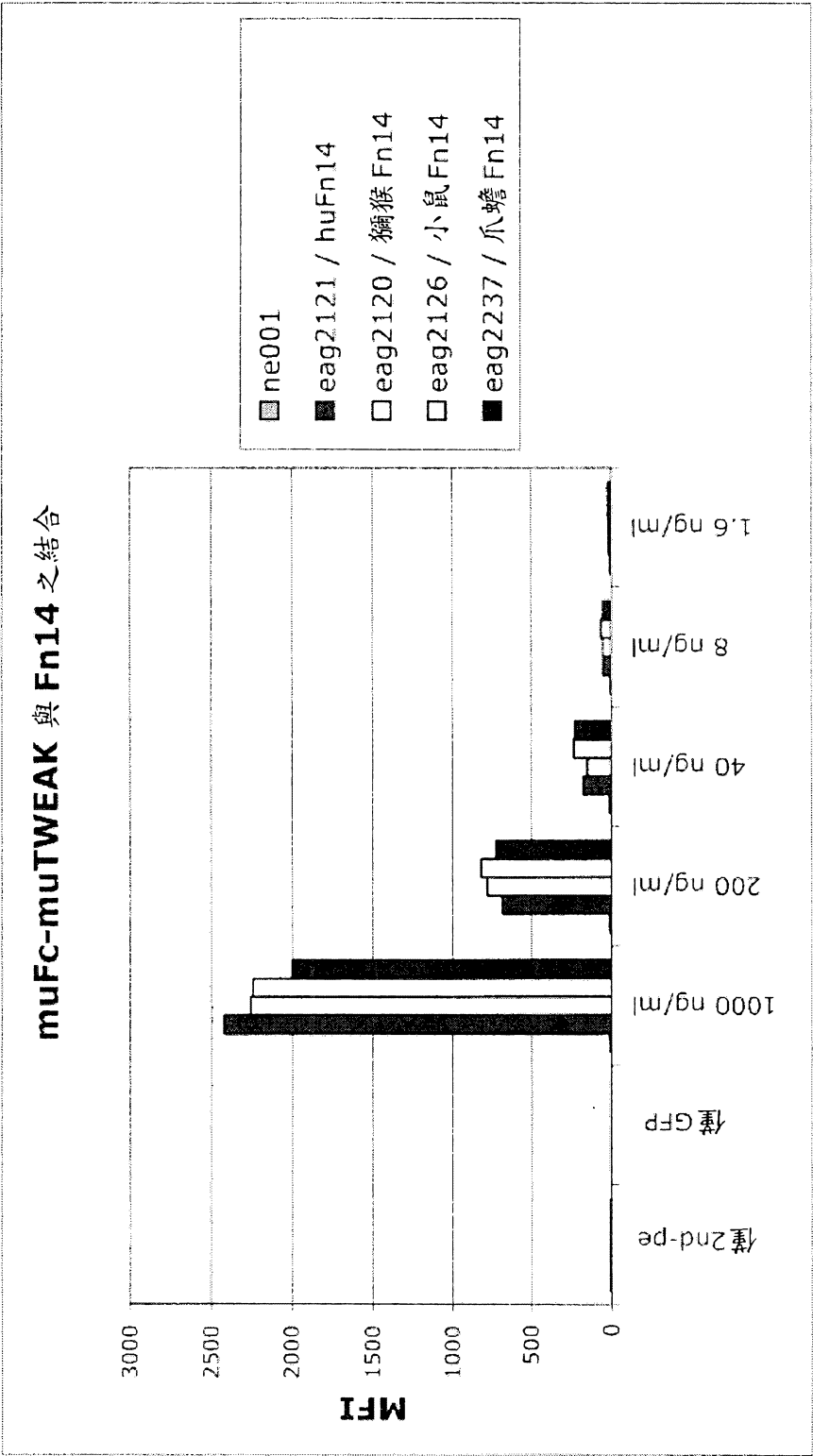


圖19C

人類、獼猴、鼠類及爪蟾Fn14之胞外域の間隙比對 (E28至P80)

huFn14	EQAPGTAPCSRGSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCAAAPAP-FRLLLWP
cyFn14	EQAPGTAPCSHGSSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCSAAPAP-FRLLLWP
muFn14	EQAPGTSPCSSGSSWSADLDKCMDCASCPARPHSDFCLGCAAAPAH-FRLLLWP
XeFn14	-----QGECPEGRAYSQDLGKMECSVCKNSEKSDFCQNCPSKTEQPDFWIWV

圖20

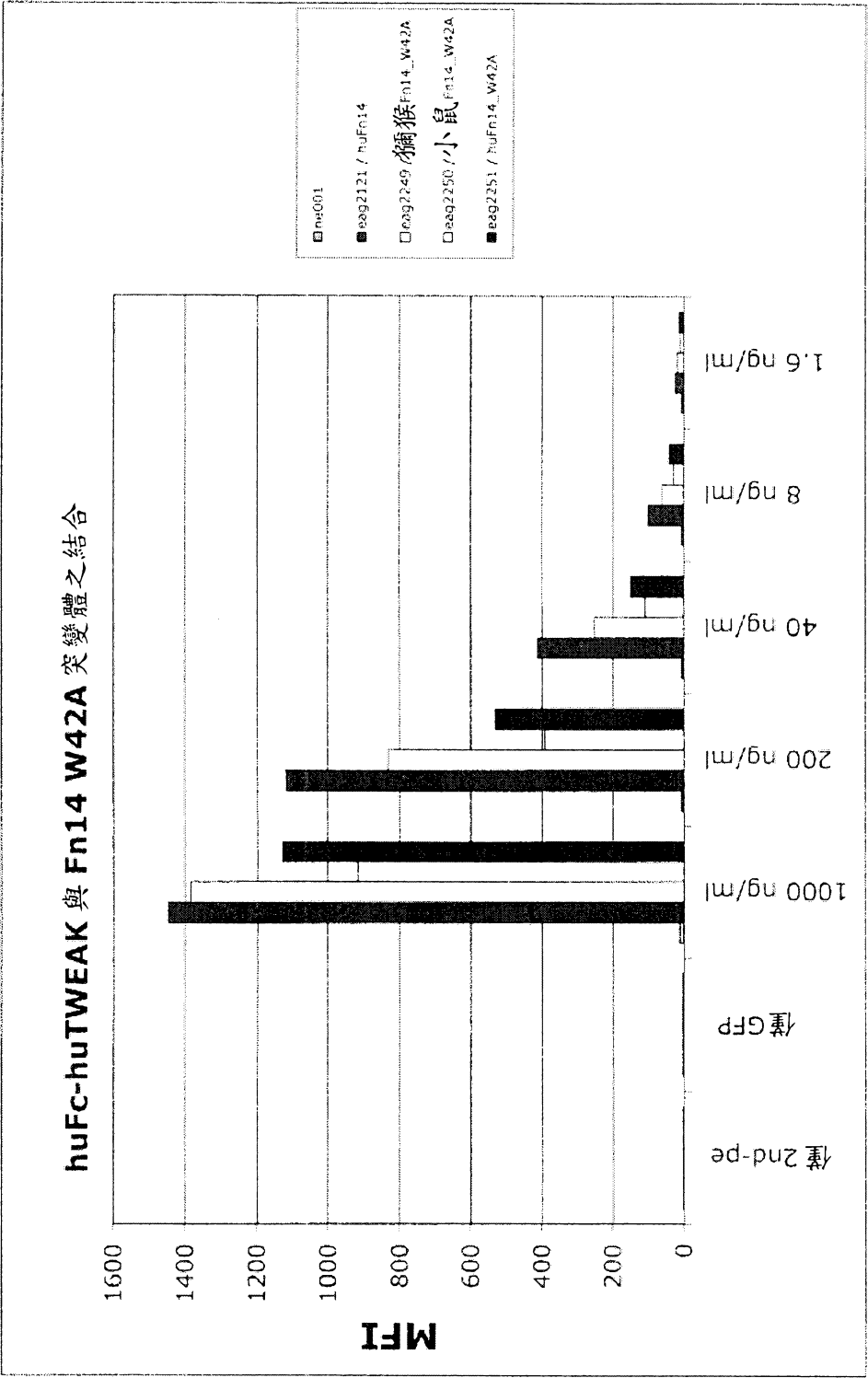


圖21A

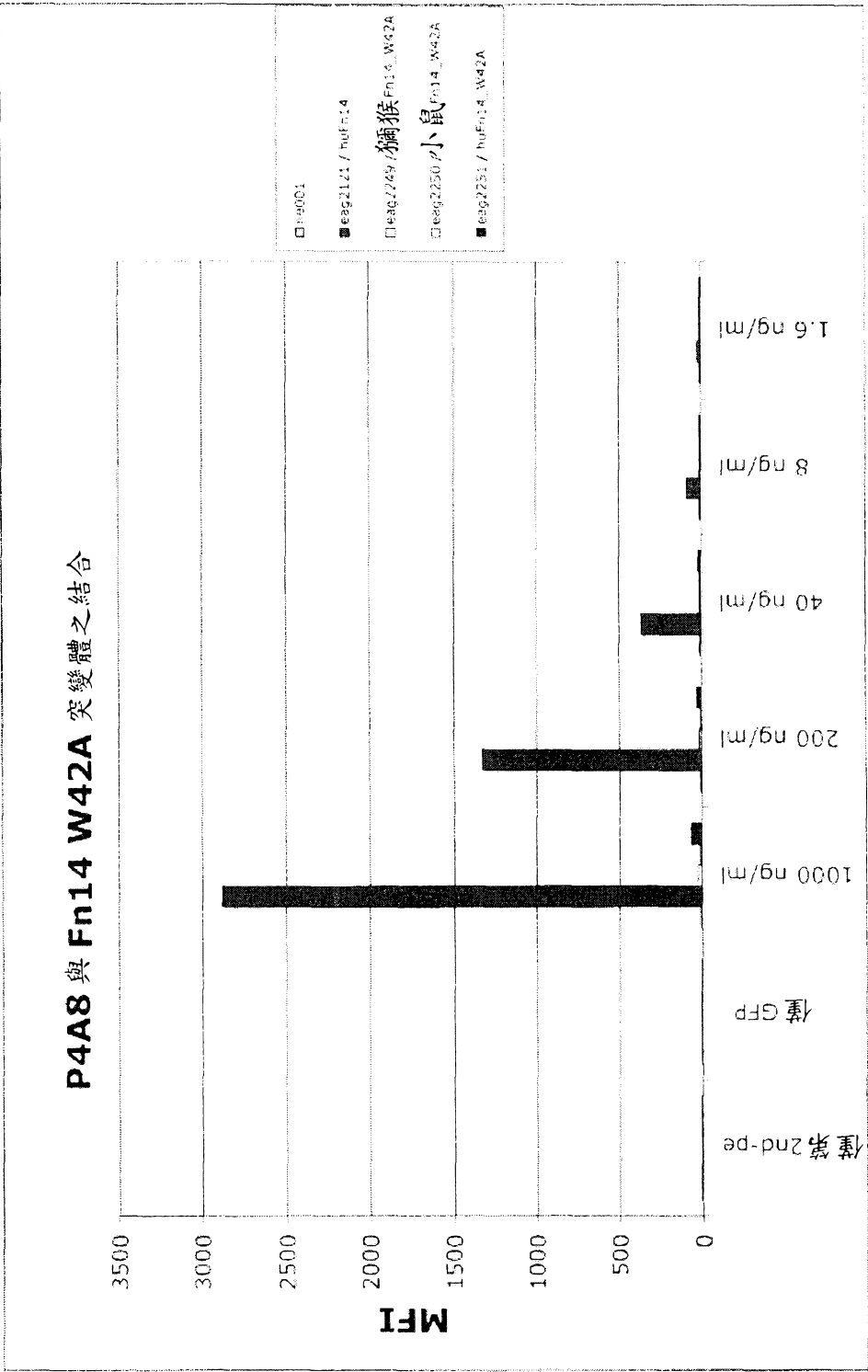


圖21B

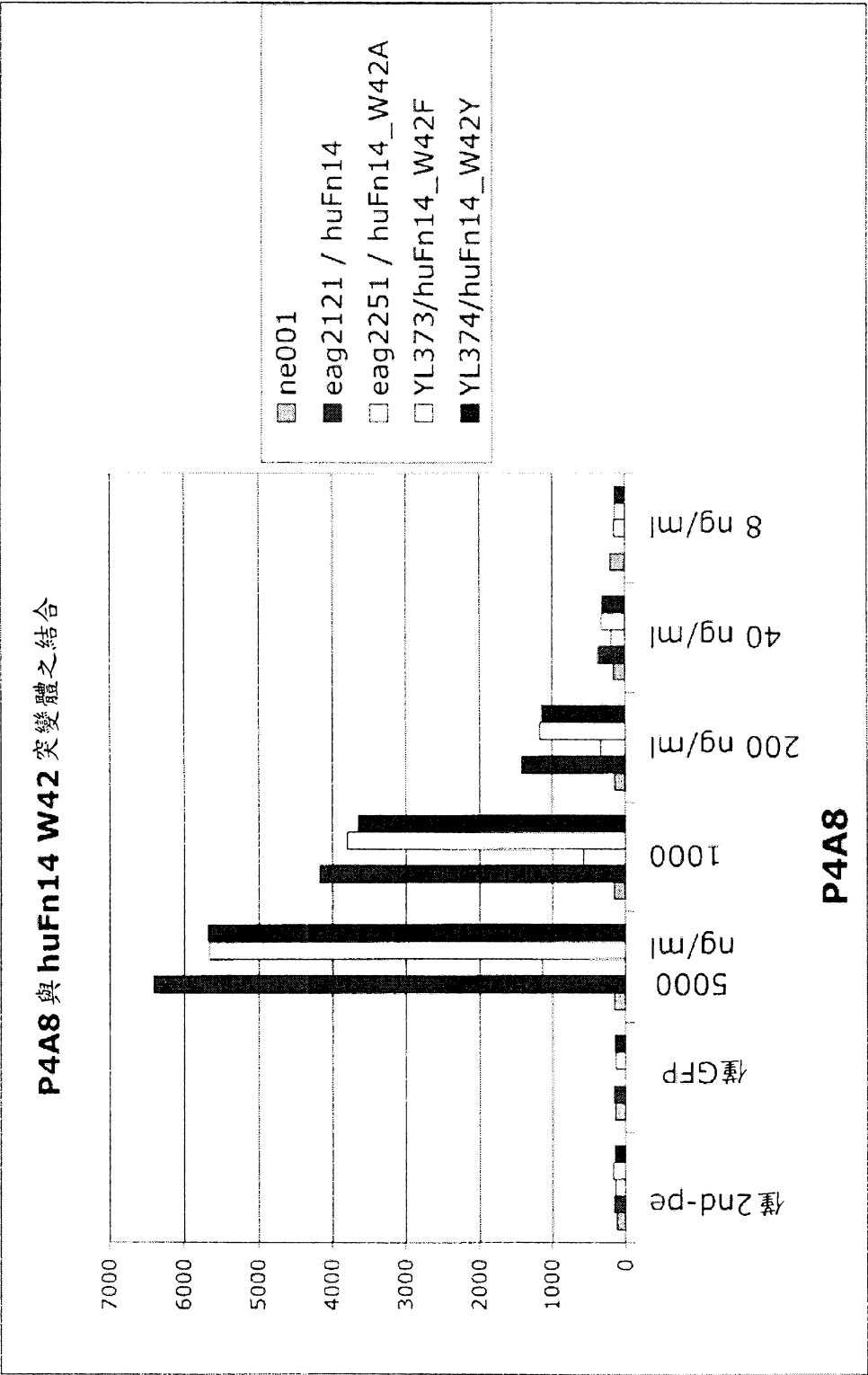


圖22

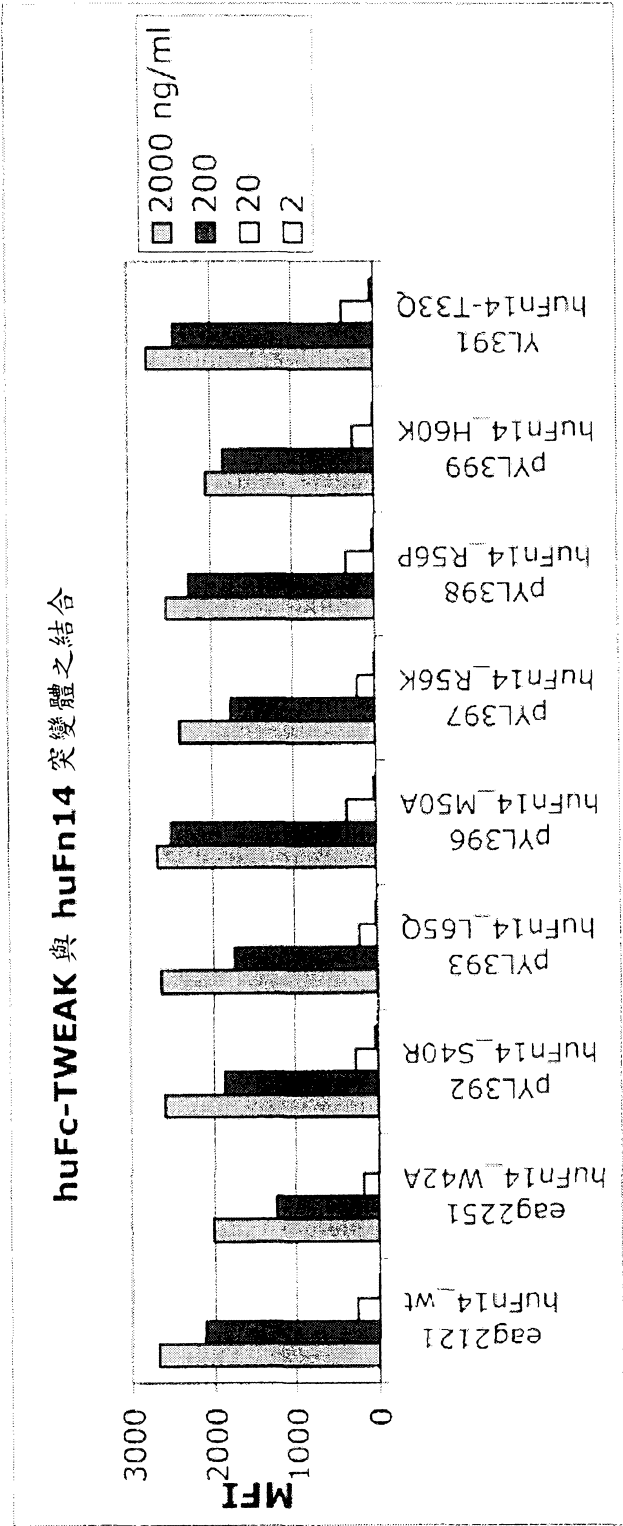


圖23A

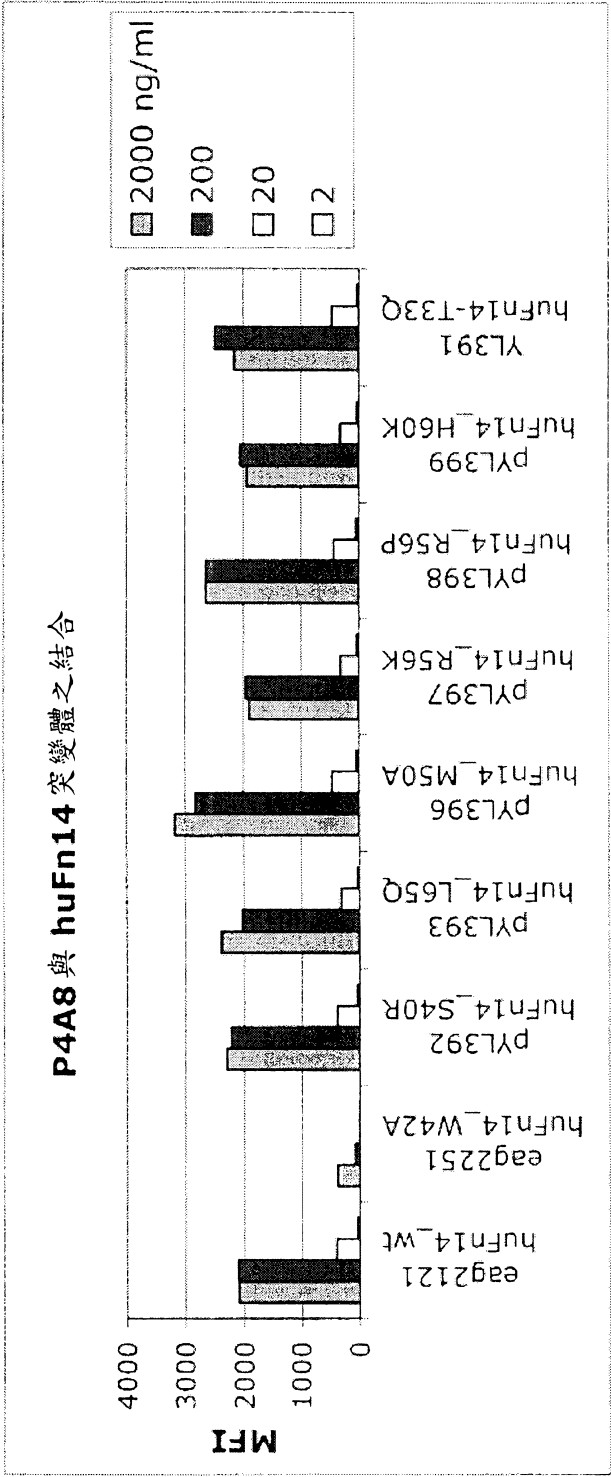


圖23B

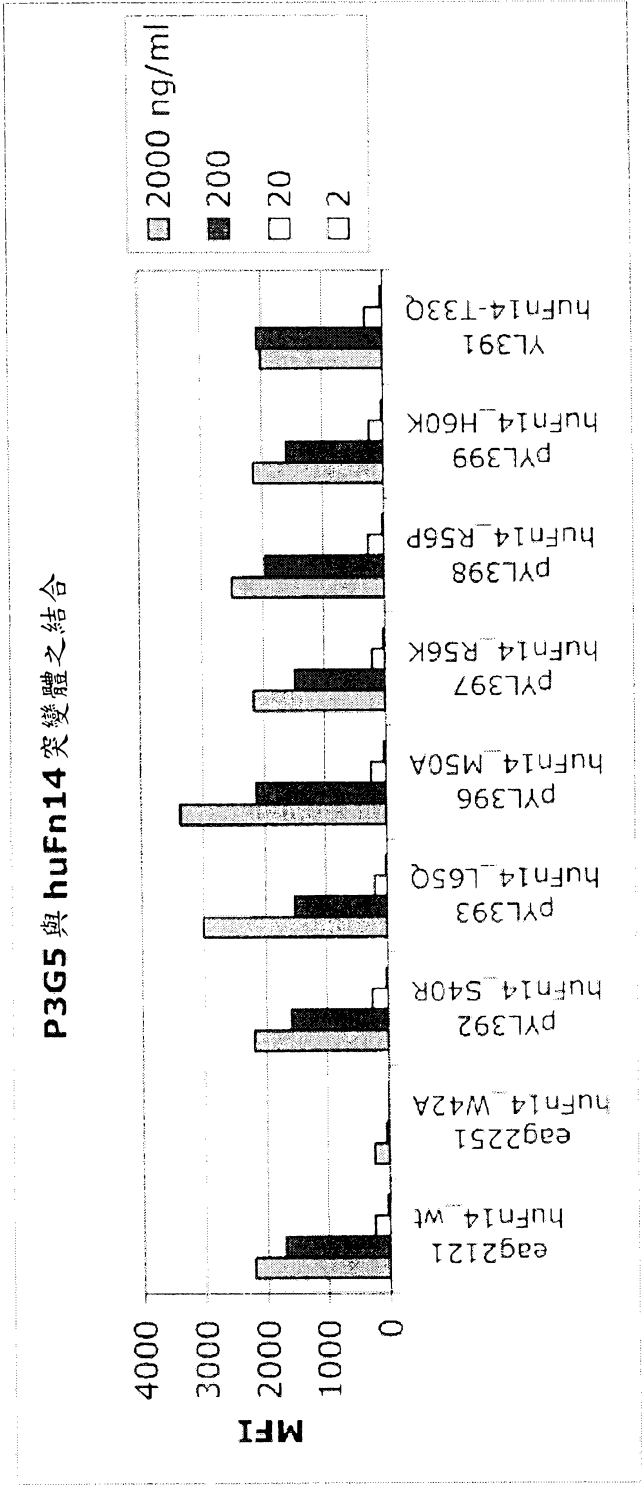


圖23C

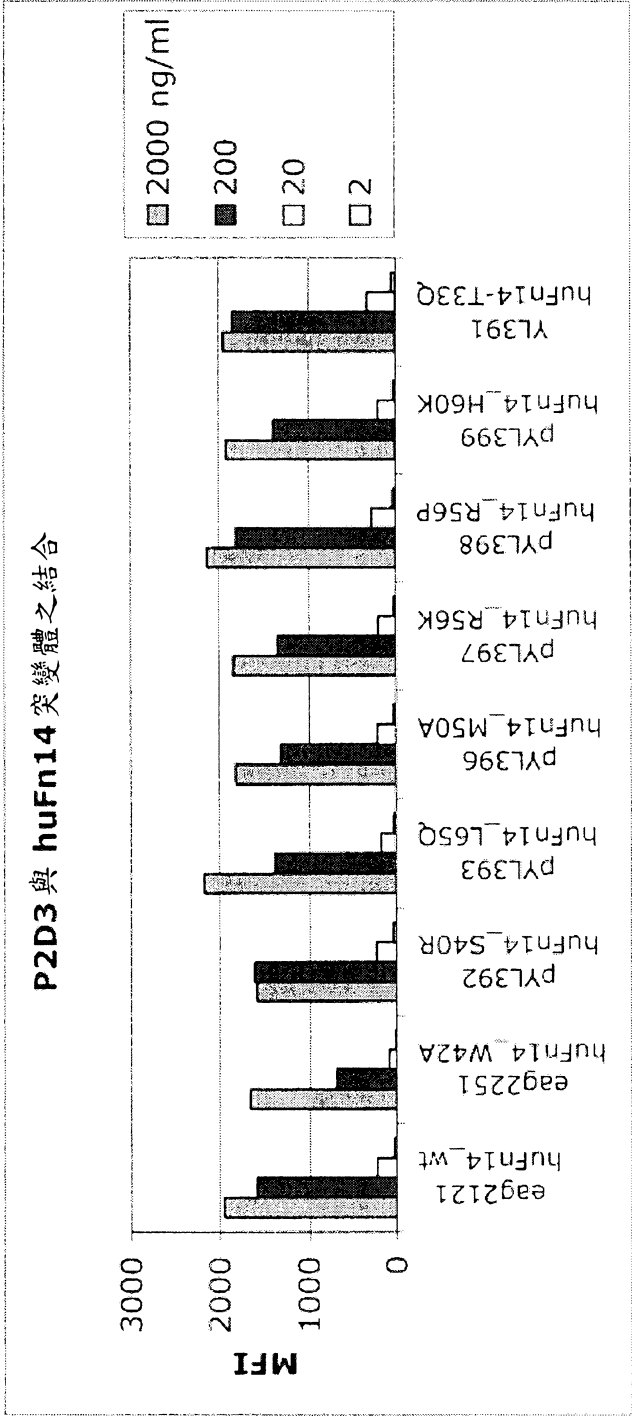


圖23D

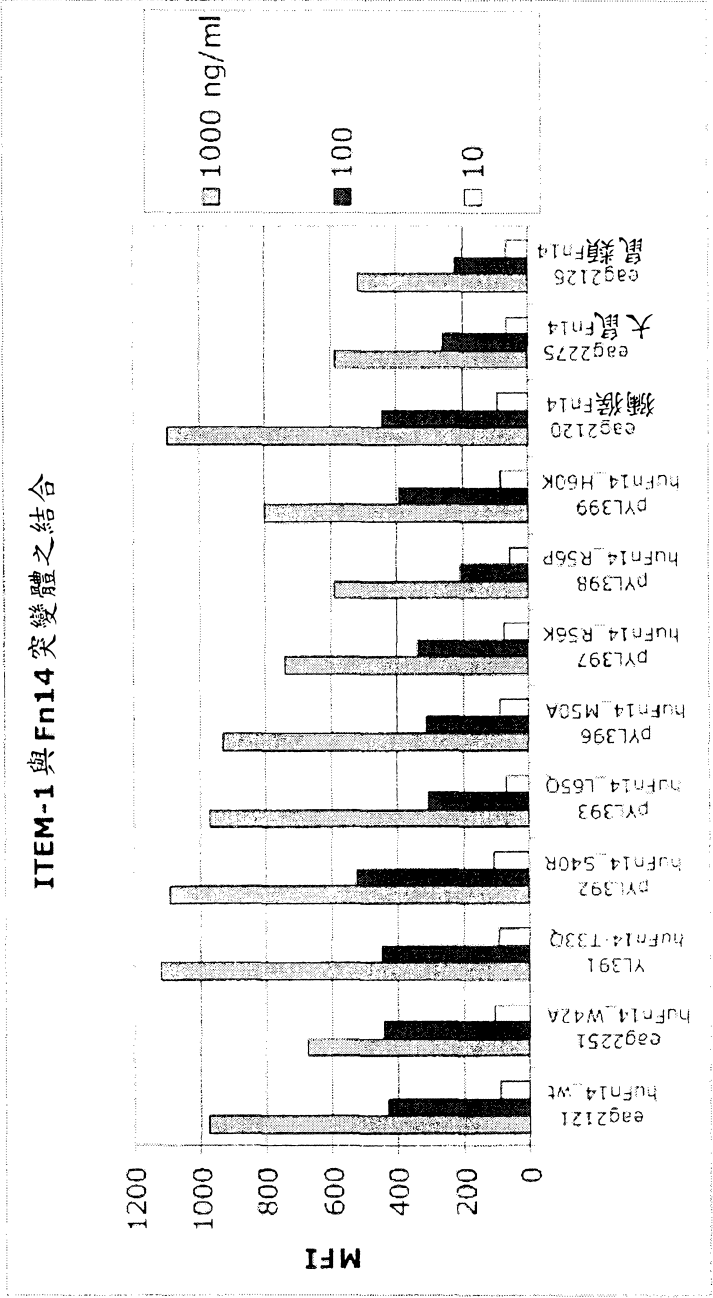


圖23E

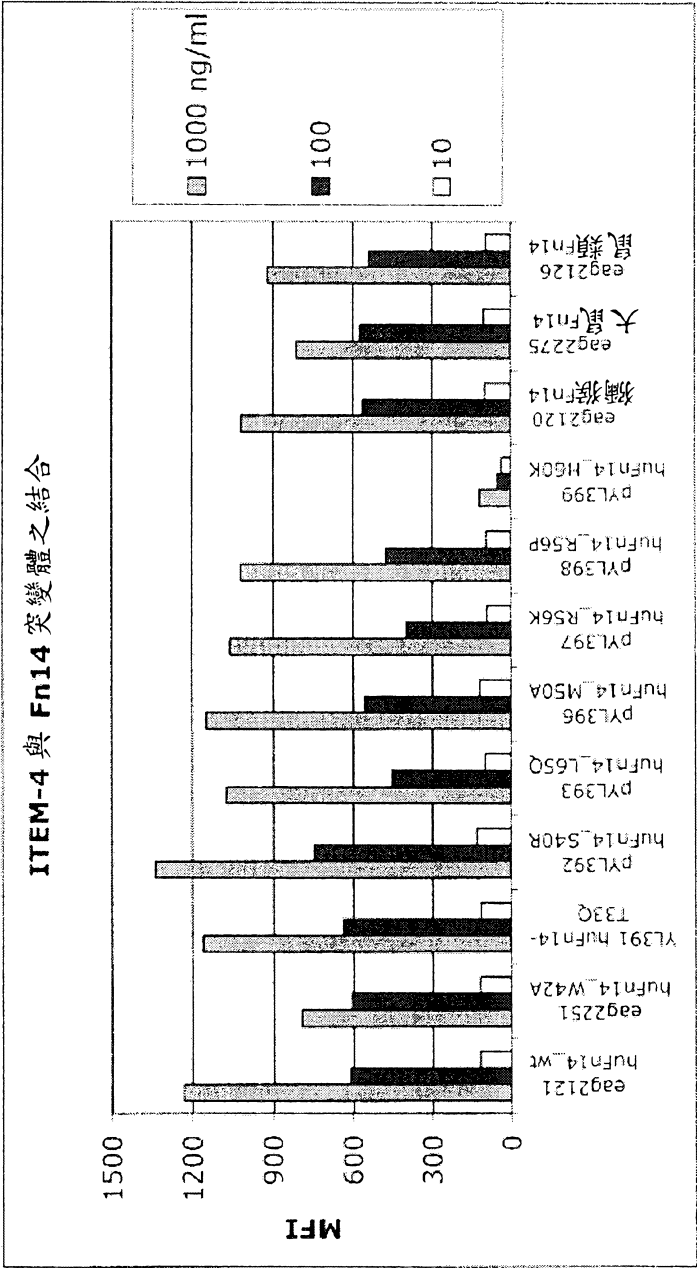


圖23F

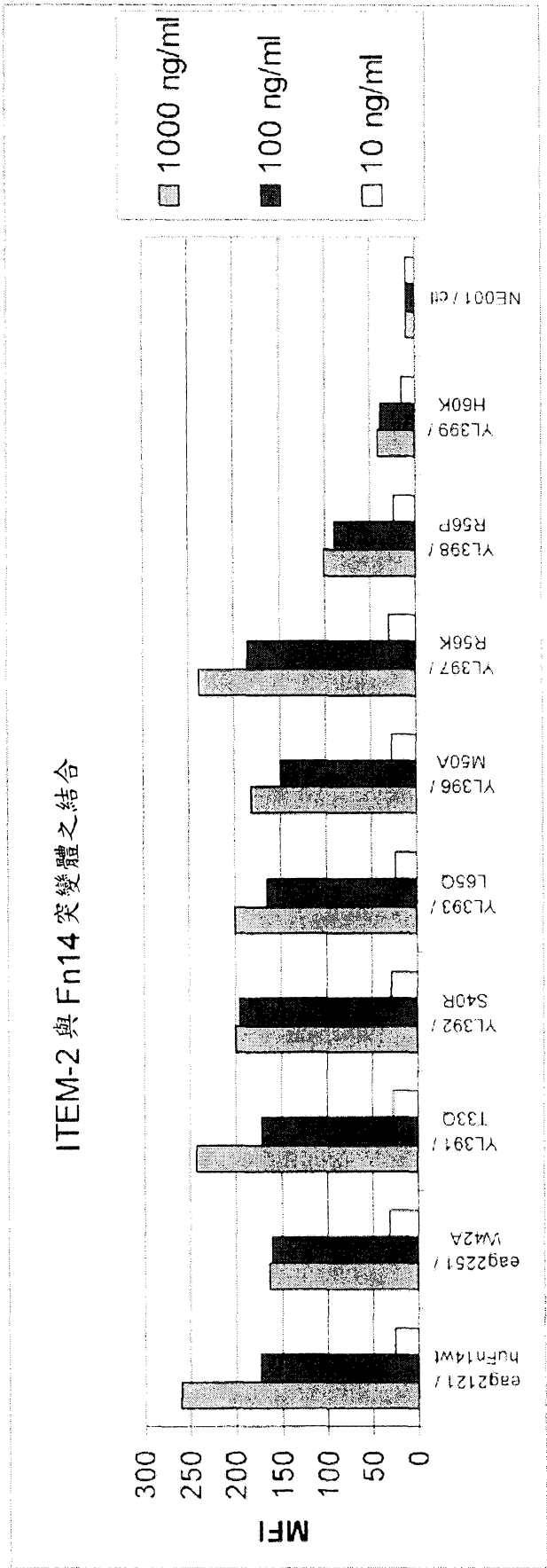


圖23G

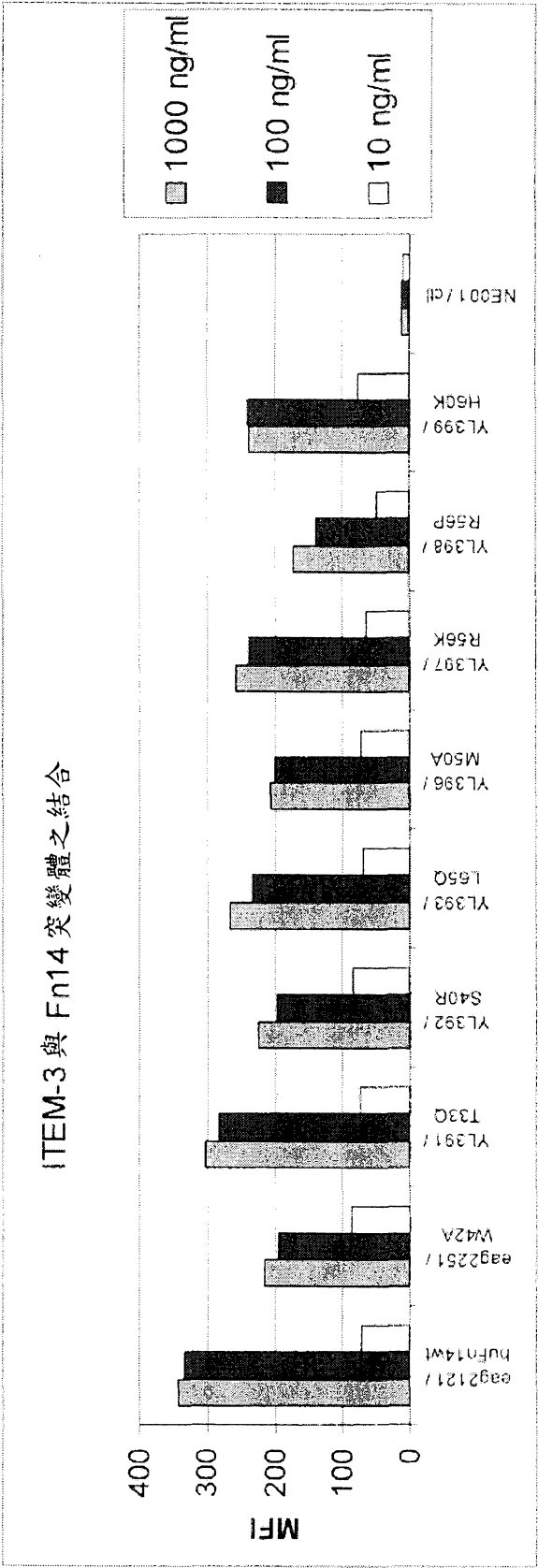


圖23H

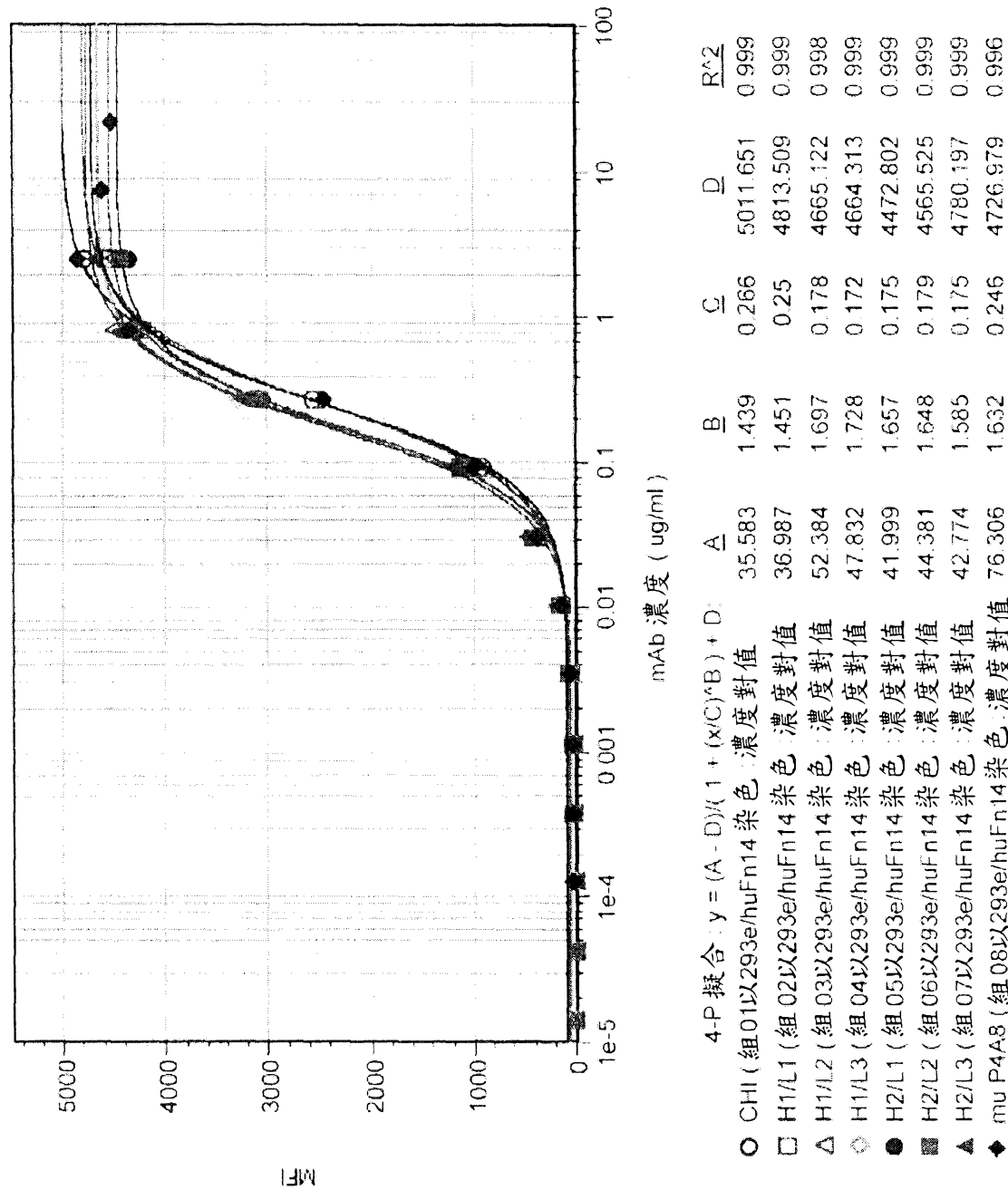


圖24

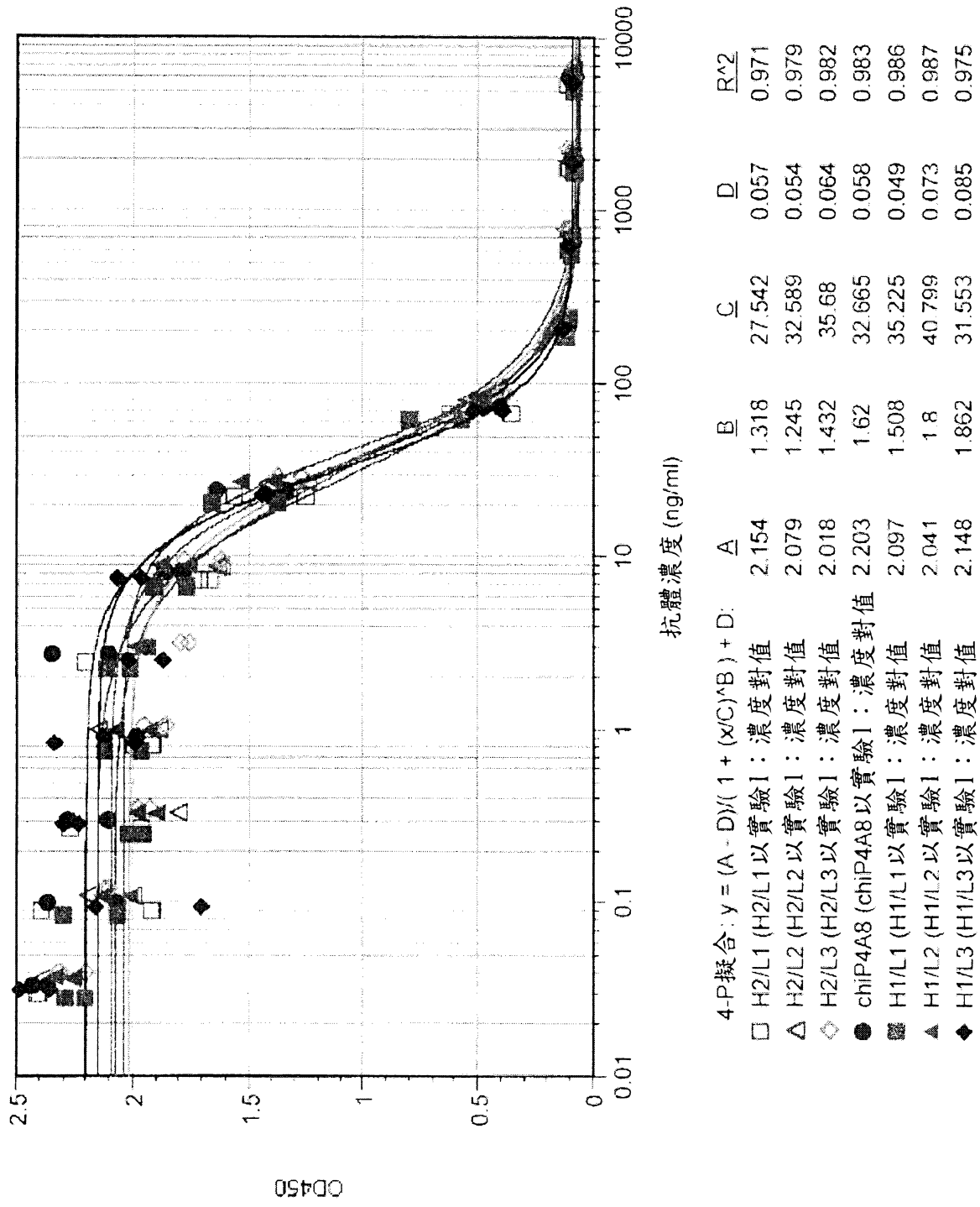


圖25

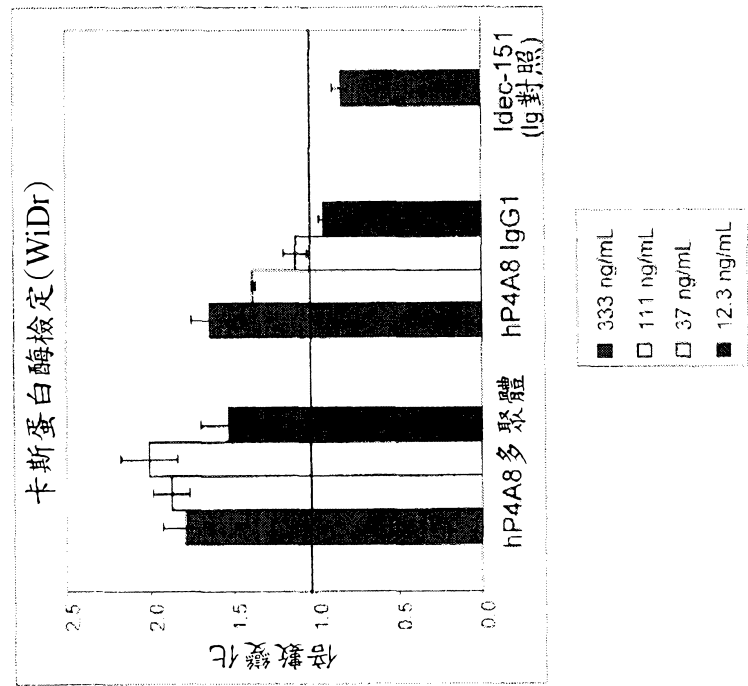


圖26

WiDr 中之 NFκβ 誘導

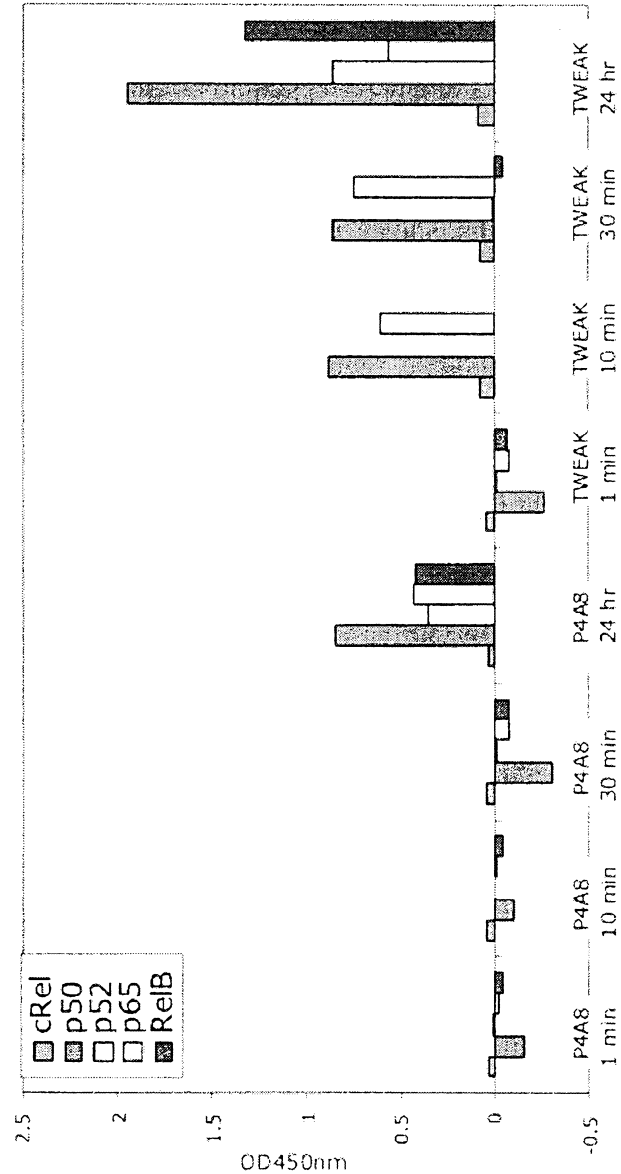


圖27

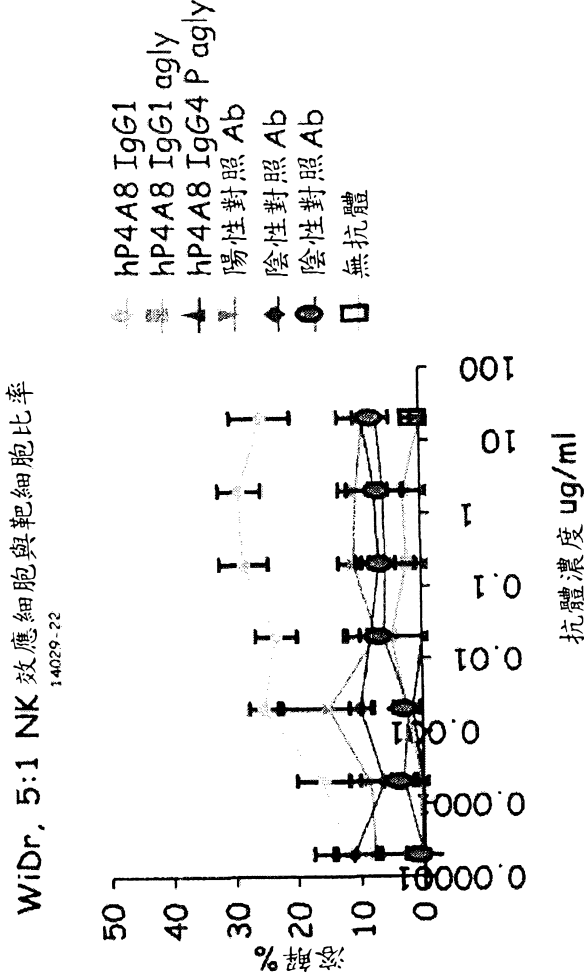


圖28

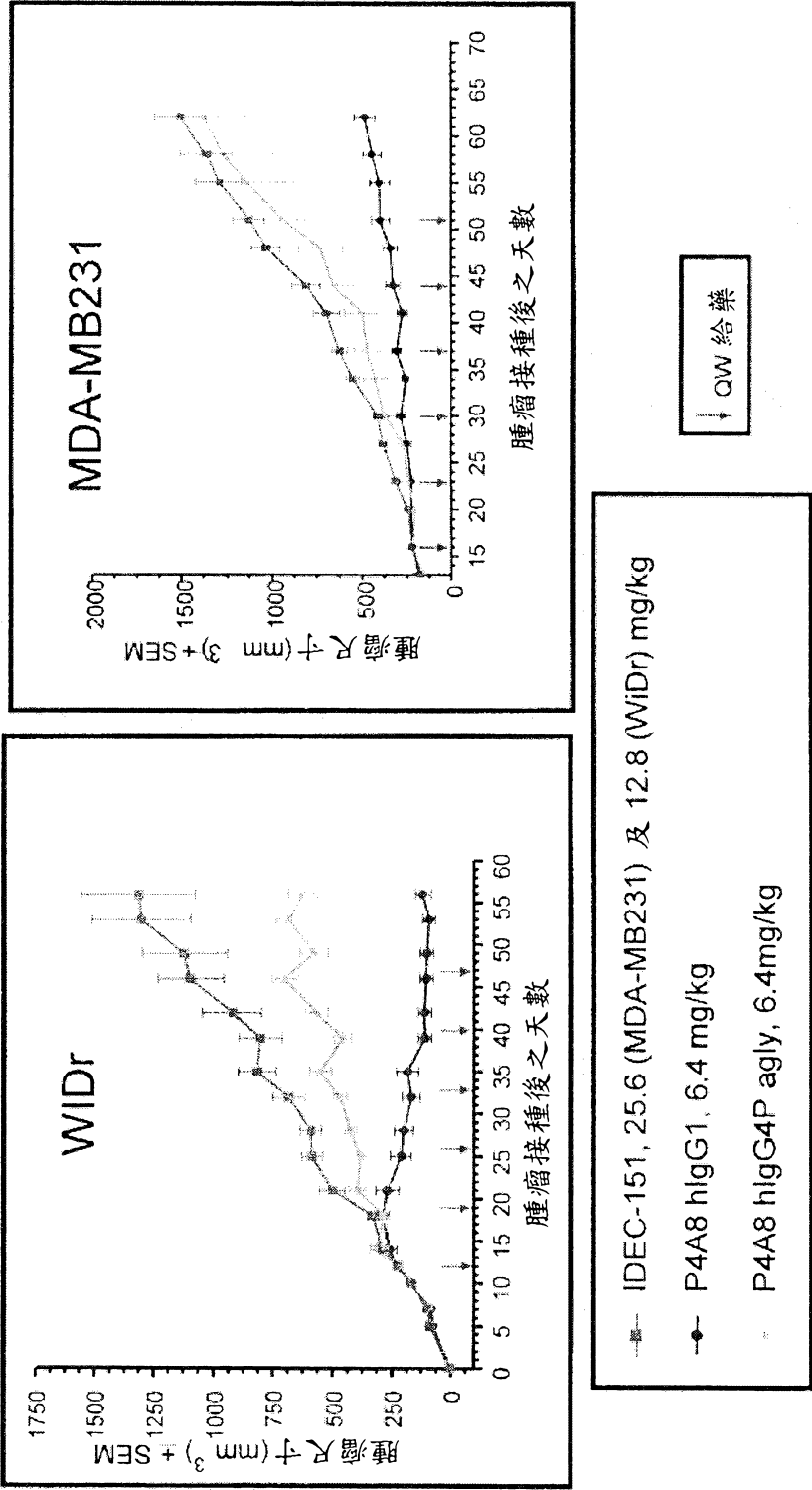


圖29

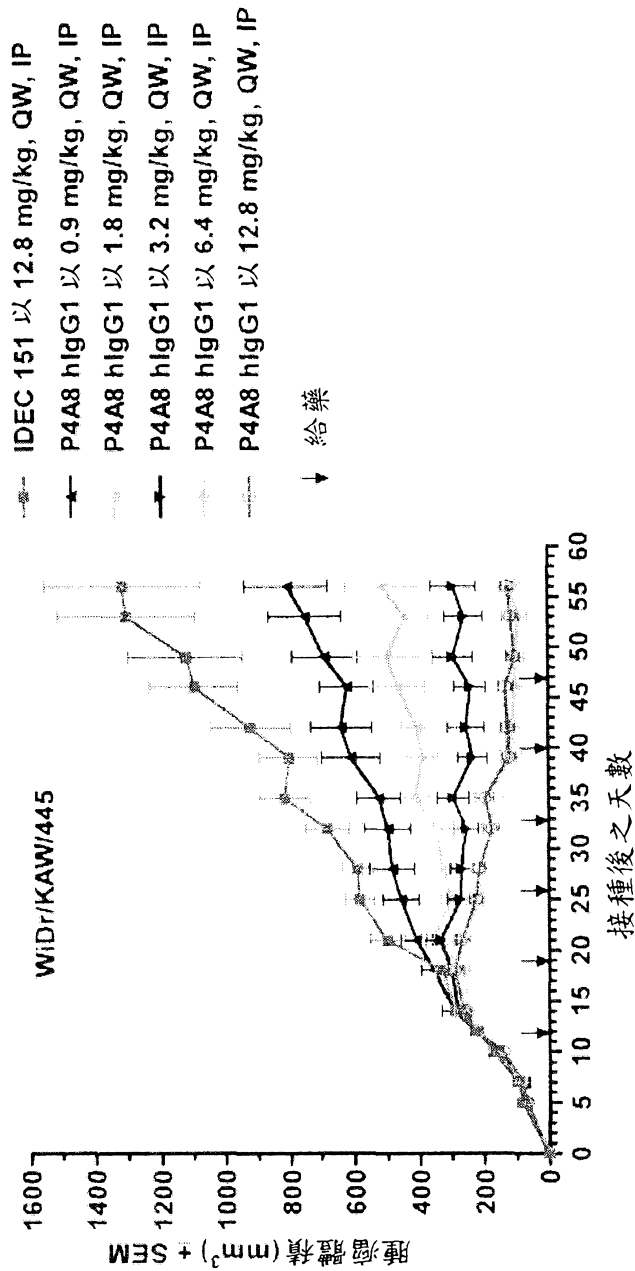


圖30

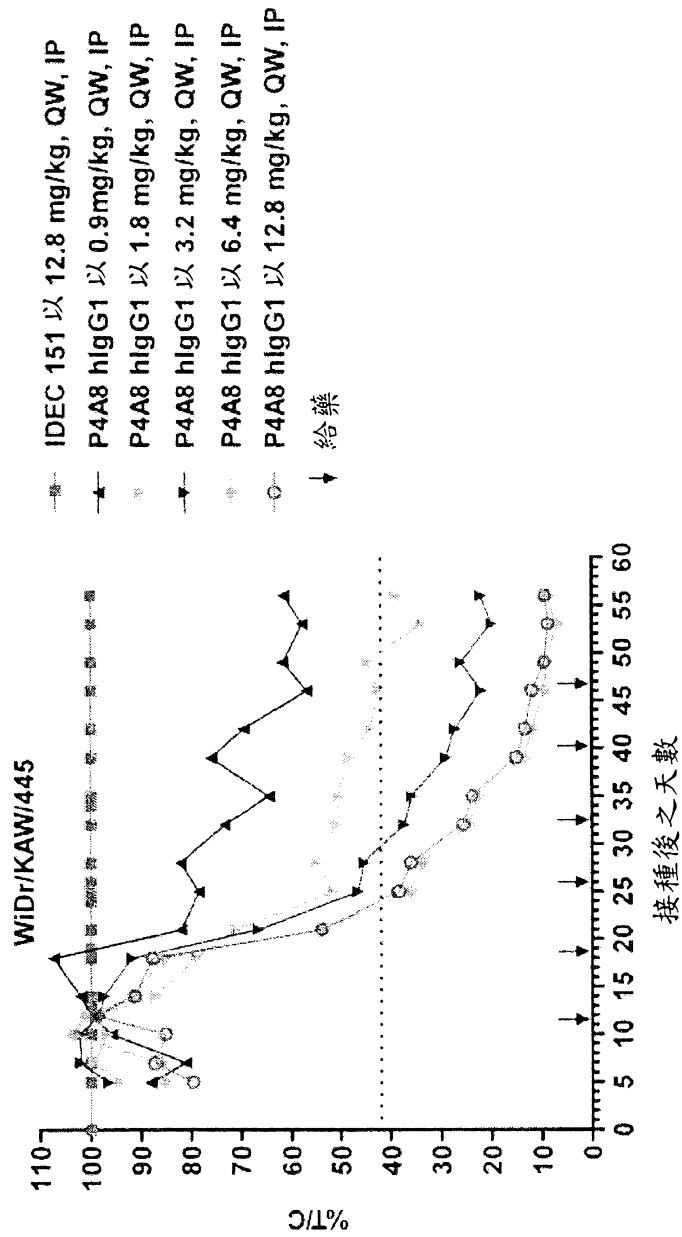


圖31

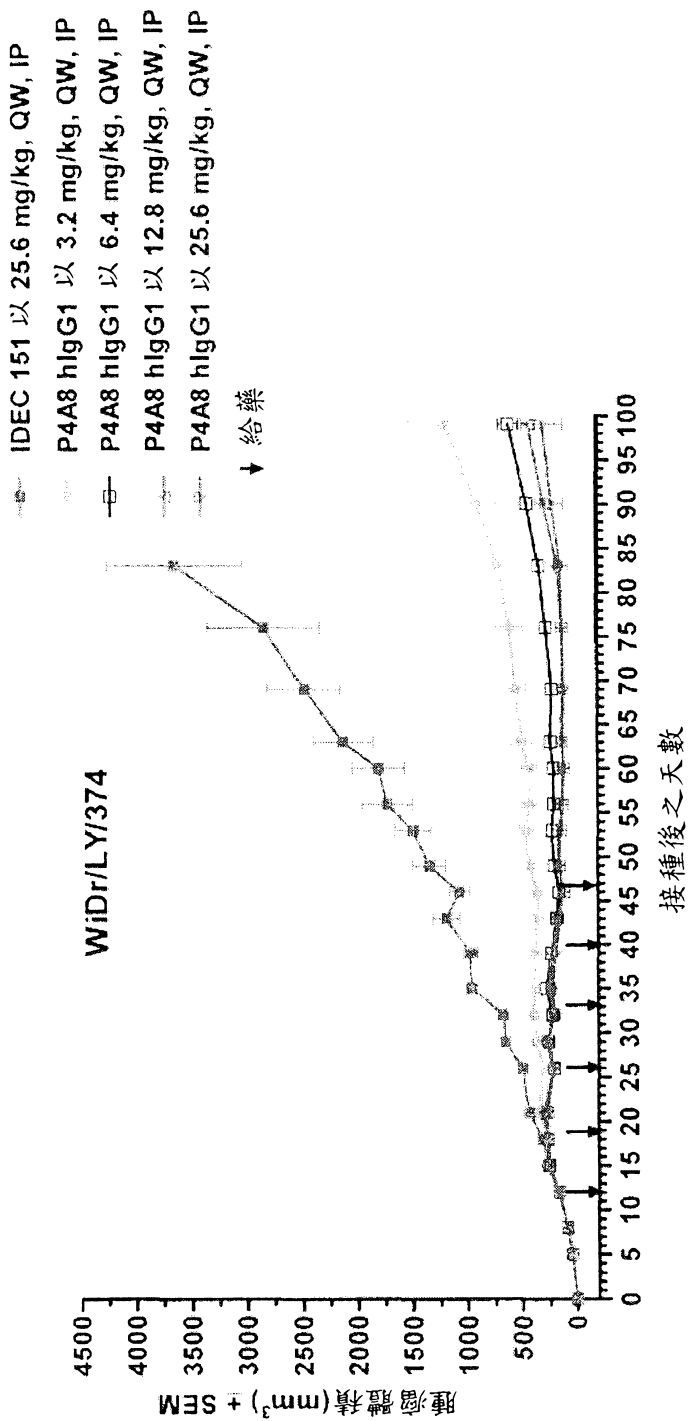


圖32

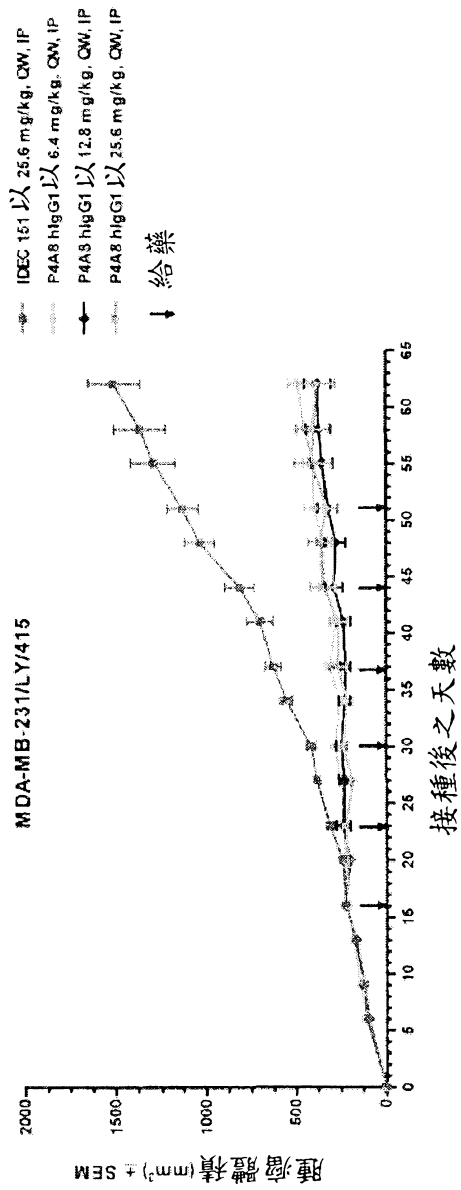


圖33

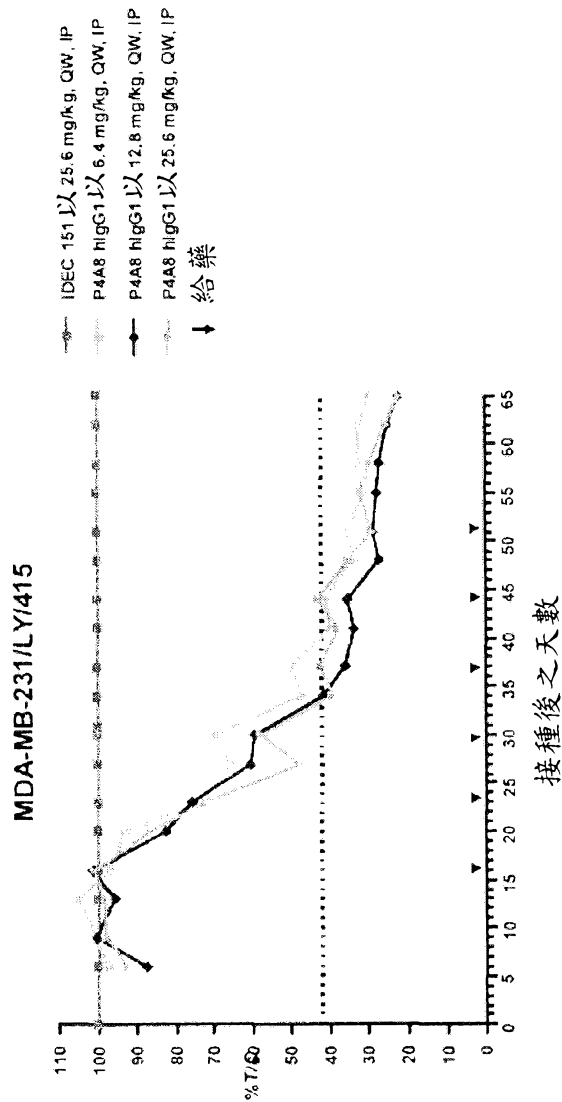


圖34

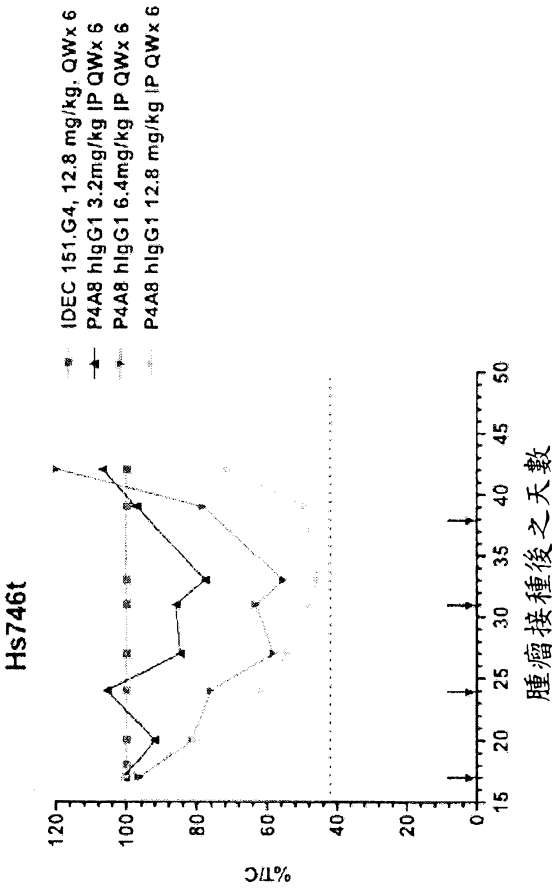


圖35

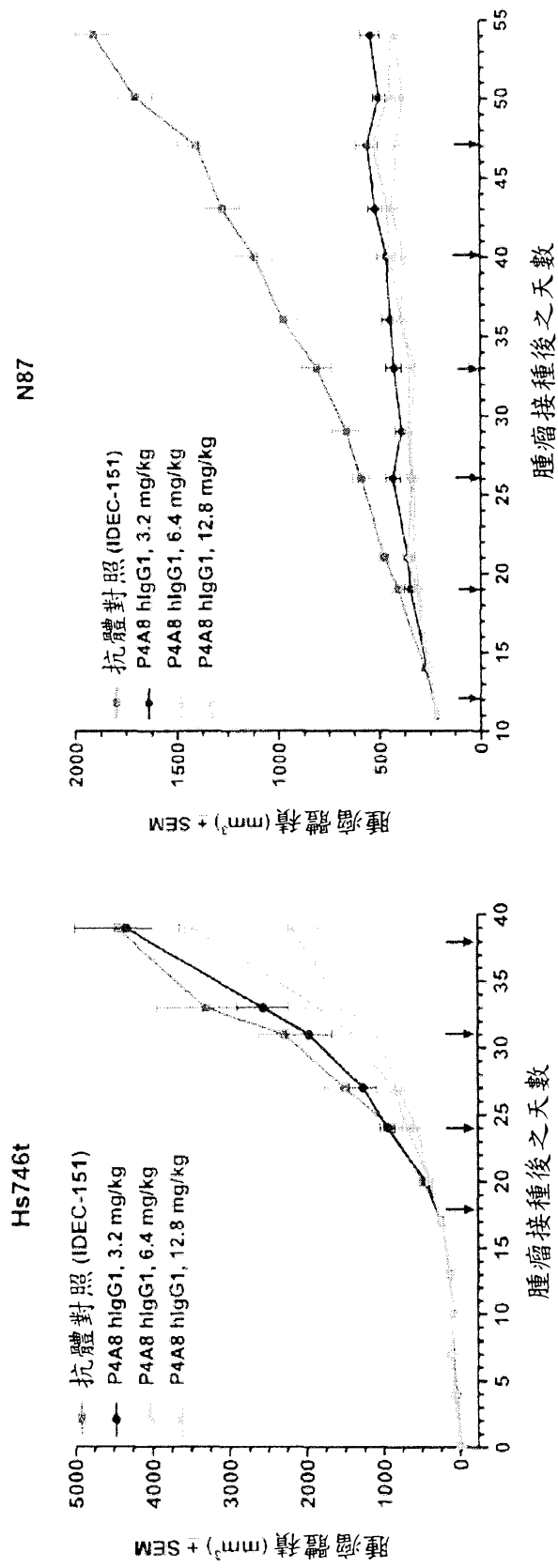


圖36A

圖36B

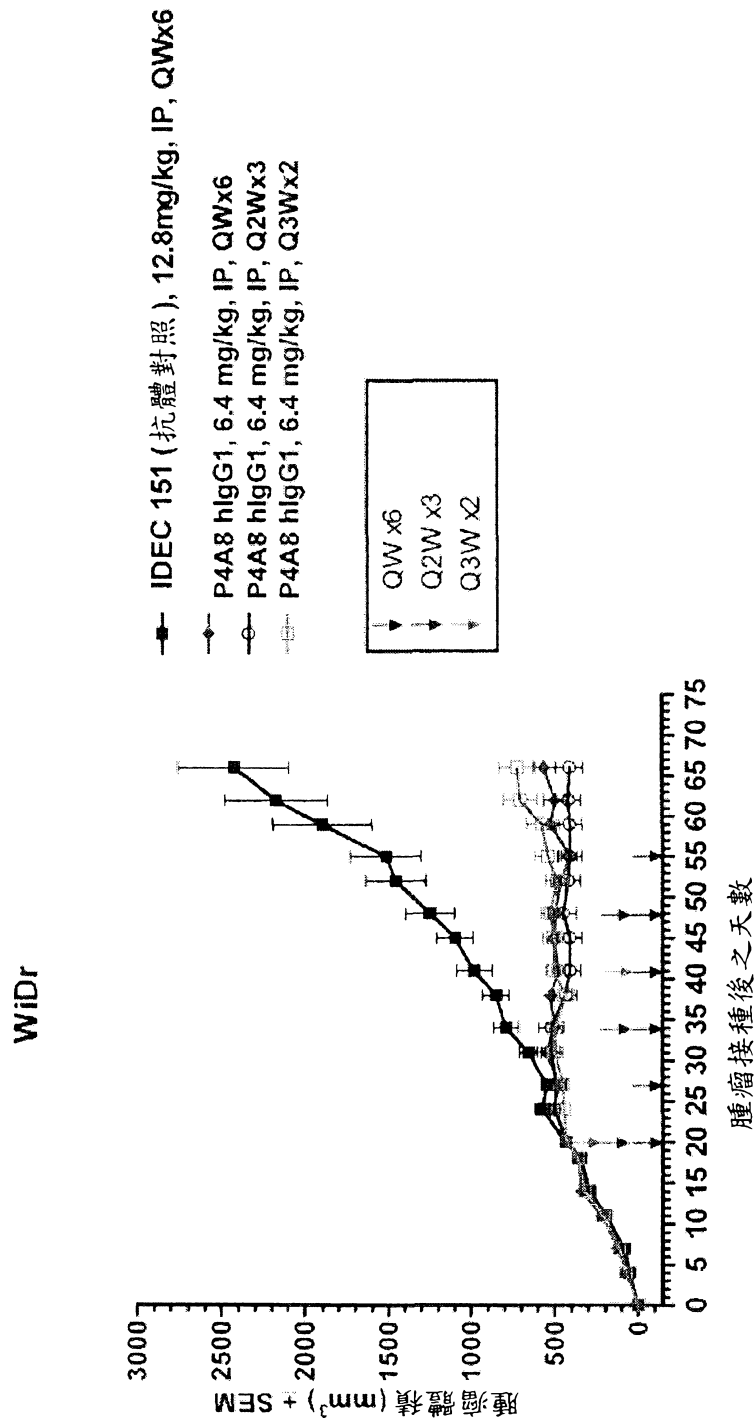


圖37

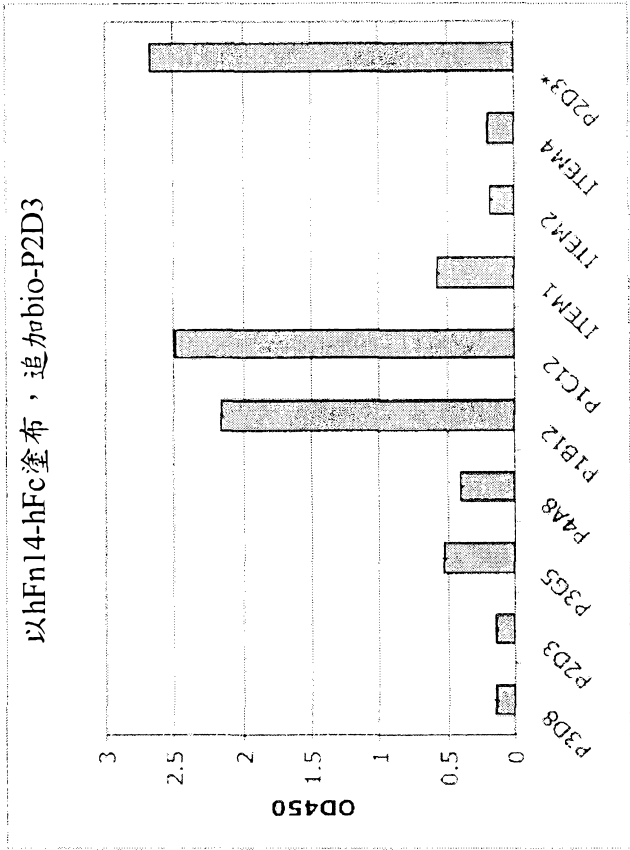


圖38A

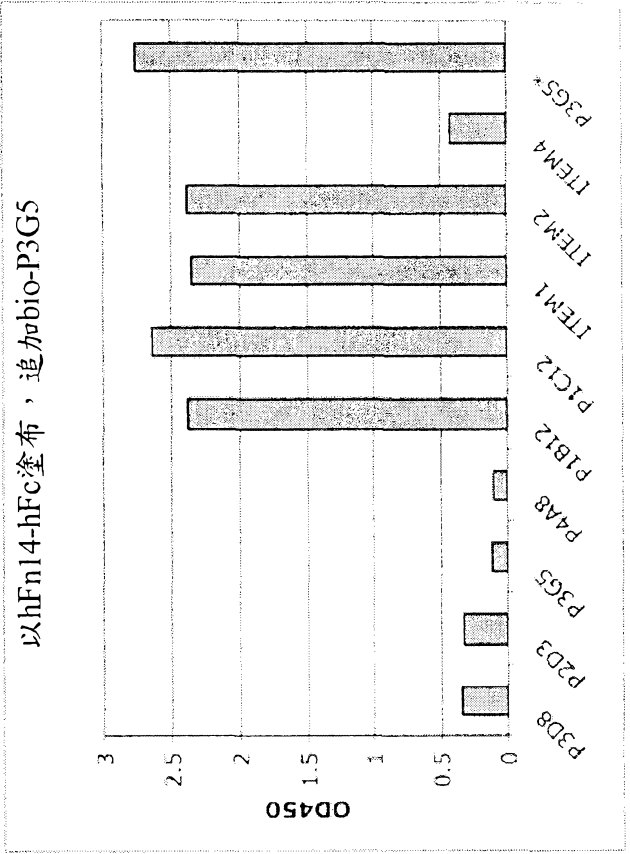


圖38B

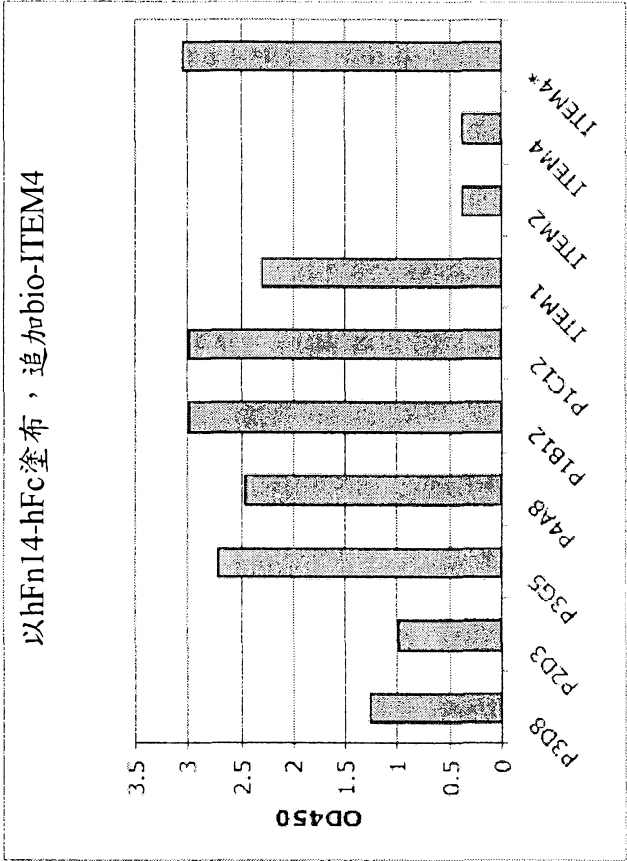


圖38D

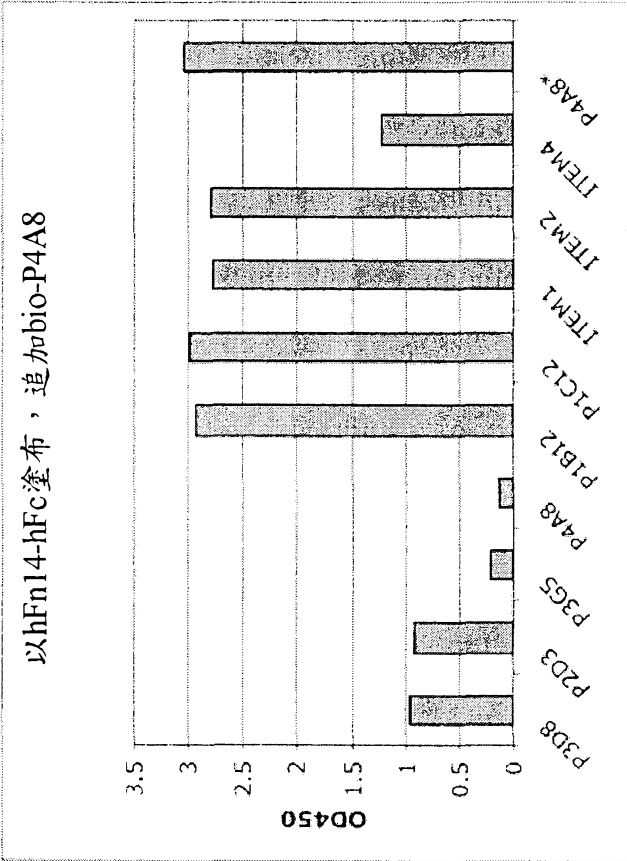


圖38C

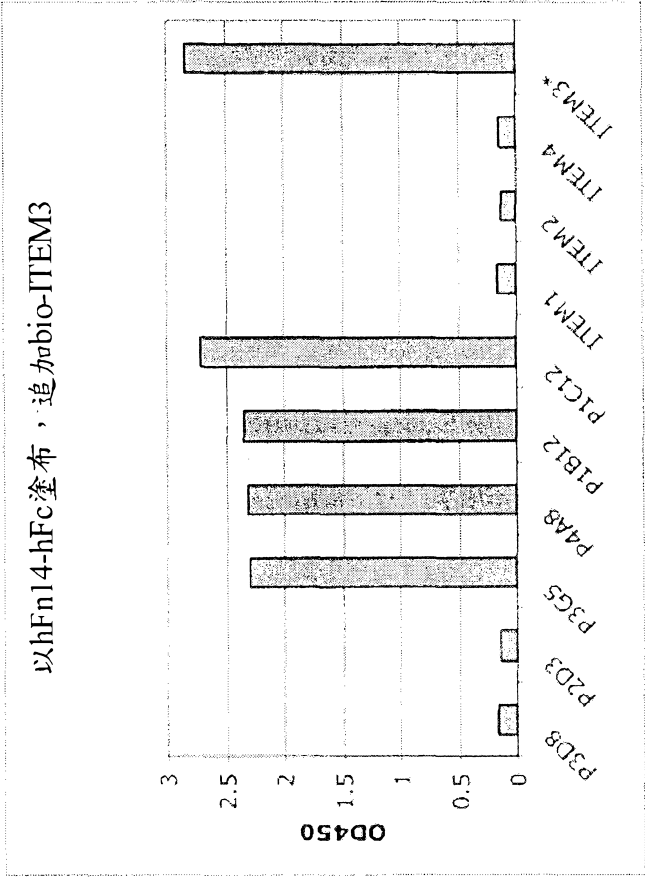


圖38E

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)