



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I843763 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108139361

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 30 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C12N5/10 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/10/31 日本

2018-205995

(71)申請人：日商安斯泰來製藥股份有限公司(日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

日本

(72)發明人：伊藤美聖 ITO, MISATO (JP)；柏木梨佐 KASHIWAGI, RISA (JP)；川上政勝

KAWAKAMI, MASAKATSU (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2013/026099A1

期刊 Amelia J Johnston et al., Targeting of Fn14 Prevents Cancer-Induced Cachexia and Prolongs Survival. Cell. 162(6): doi:

10.1016/j.cell.2015.08.031. 2015 Sep 10; 1365-1378.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：7 共 72 頁

(54)名稱

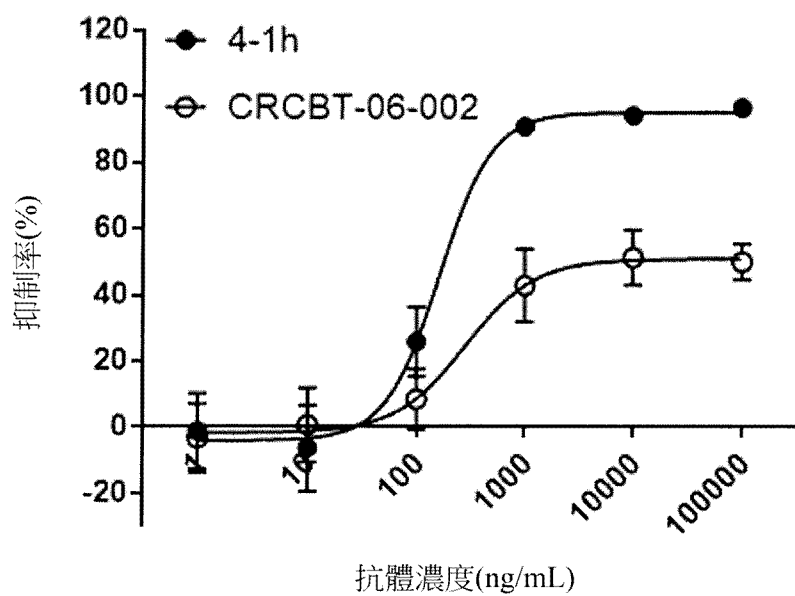
抗人類 Fn14 抗體

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種抗人類 Fn14 抗體，其藉由與人類 Fn14 結合，抑制由人類 Fn14 介導之作用，從而預防或治療癌症惡病質。

本發明者等人對抗人類 Fn14 抗體進行研究，提供一種抗人類 Fn14 抗體，其含有：包含序列編號 2 之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號 4 之胺基酸序列之輕鏈。

指定代表圖：



【圖1】



公告本

I843763

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗人類Fn14抗體

【英文發明名稱】

ANTI-HUMAN FN14 ANTIBODY

【中文】

本發明之課題在於提供一種抗人類Fn14抗體，其藉由與人類Fn14結合，抑制由人類Fn14介導之作用，從而預防或治療癌症惡病質。

本發明者等人對抗人類Fn14抗體進行研究，提供一種抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4之胺基酸序列之輕鏈。

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗人類Fn14抗體

【英文發明名稱】

ANTI-HUMAN FN14 ANTIBODY

【技術領域】

【0001】

本發明係關於一種抗人類Fn14抗體。

【先前技術】

【0002】

惡病質(cachexia)為與基礎疾病相關地產生之複合性代謝異常之症候群，係無關有無脂肪量之減少，以肌肉量之減少為特徵之疾病。作為臨床症狀，成人觀察到體重減少，兒童觀察到生長障礙(非專利文獻1)。進行性癌症患者於約80%中確認到惡病質，稱為癌症惡病質。惡病質因難治性不僅降低患者之預後及生活質量(QOL, Quality of life)，亦與死亡率之上升相關。然而，針對惡病質不存在有效之治療藥。惡病質之產生機理之不明確之處較多，近年來，將惡病質理解為由各種細胞激素介導之全身之炎症狀態(非專利文獻2)。

【0003】

纖維母細胞生長誘導因子14(Fn14, Fibroblast growth factor-inducible 14)(亦稱為TNFRSF12A)為腫瘤壞死因子受體超家族之一員。又，Fn14與TNF(Tumor Necrosis Factor, 腫瘤壞死因子)樣凋亡微弱誘導因子(Tweak, TNF-like weak inducer of apoptosis)結合，亦作為Tweak受

體而為人所知。已知 Tweak 依存性或非依存性之 Fn14 之活化使 NFkB(Nuclear Factor kB, 核因子kB)訊息傳遞途徑活化, 控制參與細胞之生長、移動、分化、及凋亡、以及血管新生、組織損傷、再生之炎症(非專利文獻3)。

【0004】

作為與癌症之關聯, 報告有Fn14於各種實體癌中過度表現(非專利文獻4)、及Fn14參與腫瘤之進行或轉移(非專利文獻5)。又, 報告稱於小鼠癌症惡病質模型中, 抗Fn14抗體對改善惡病質之症狀有效, 其作用係由腫瘤中之Fn14抑制所產生(非專利文獻6)。

【0005】

另一方面, Fn14之活化有可能引發炎症性細胞激素之產生, 使炎症狀態惡化。作為針對人類Fn14之促效劑抗體, 報告有正進行臨床開發之埃文單抗(Enavatuzumab)(專利文獻1), 但埃文單抗於第I相臨床試驗中報告有肝毒性(非專利文獻7), 且提示有可能因由埃文單抗治療引發之炎症所引起(非專利文獻8)。

【0006】

作為與人類Fn14結合而具有拮抗劑活性, 且於特定之條件下不具有促效劑活性之抗體, 報告有小鼠單株抗體CRCBT-06-002(專利文獻2)。CRCBT-06-002報告有抑制源自人類惡性黑色素瘤之細胞株A375細胞中之由Tweak刺激所引起之IL-8(Interleukin-8, 介白素-8)產生的拮抗劑活性、及於小鼠癌症惡病質模型中之有效性。然而, 殘留有於不存在Tweak下誘導自A375細胞產生IL-8之促效劑活性(專利文獻2)。

【0007】

不具有促效劑活性、可避免不理想之副作用之抗Fn14拮抗劑抗體尚屬未知。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0008】

[專利文獻1]國際公開第2009/020933號

[專利文獻2]國際公開第2013/026099號

[非專利文獻]

【0009】

[非專利文獻1]Evans WJ et al., Clin Nutr. 2008, Vol. 27, p.793-799

[非專利文獻2]Baracos VE et al., Nat Rev Dis Primers. 2018, Vol. 4
Article number 17105, p.1-18

[非專利文獻3]Winkles JA, Nat Rev Drug Discov. 2008, Vol. 7,
p.411-425

[非專利文獻4]Culp PA et al., Clin Cancer Res. 2010, Vol. 16,
p.497-508

[非專利文獻5]Hu G et al., Tumor Biol. 2017, Vol. 39 June, p.1-9

[非專利文獻6]Johnston AJ et al., Cell. 2015, Vol. 162, p.1365-1378

[非專利文獻7]Lam ET et al., Mol Cancer Ther. 2018, Vol. 17,
p.215-221

[非專利文獻8]Choi D et al., Am J Pharmacol Toxicol. 2017, Vol.
12, p.18-38

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0010】

本發明之課題在於提供一種保持較高之拮抗劑活性，並且促效劑活性較先前之抗體降低的安全性優異之抗人類Fn14抗體。

[解決問題之技術手段]

【0011】

本發明者等人於抗人類Fn14抗體之製作中反覆進行了大量之創新研究，結果製作出一種抗人類Fn14抗體，其包含：重鏈可變區，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號31至35之胺基酸序列之CDR(Complementarity Determining Region，互補決定區)1、包含序列編號2之胺基酸編號50至65之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號2之胺基酸編號98至114之胺基酸序列之CDR3；以及輕鏈可變區，其含有：包含序列編號4之胺基酸編號24至40之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號4之胺基酸編號56至62之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號4之胺基酸編號95至103之胺基酸序列之CDR3(實施例2~4)。發現該抗體與人類Fn14結合(實施例6)，抑制由Tweak刺激所引起之NFkB之活化及IL-8之產生(實施例7及8)，以及於不存在Tweak下不誘導IL-8產生(實施例8)。該等之結果，提供一種具有拮抗劑活性並且不具有促效劑活性之抗人類Fn14抗體，從而完成本發明。進而，發現將上述抗體小鼠化所得之(實施例4)抗體於小鼠癌症惡病質模型中，抑制體重及肌肉量之減少(實施例9)；以及於吉西他濱與抗體之併用下，與單獨投予抗體或單獨投予吉西他濱相比延長存活時間(實施例10)。

【0012】

根據本發明，例如提供以下之發明。

[1]

一種抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其包含：重鏈可變區，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號31至35之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號2之胺基酸編號50至65之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號2之胺基酸編號98至114之胺基酸序列之CDR3；以及輕鏈可變區，其含有：包含序列編號4之胺基酸編號24至40之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號4之胺基酸編號56至62之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號4之胺基酸編號95至103之胺基酸序列之CDR3。

[2]

如[1]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其選自以下(1)及(2)：

(1)含有包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段；以及

(2)藉由上述(1)之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之轉譯後修飾而產生之抗體或其抗原結合片段。

[3]

如[2]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區。

[4]

如[2]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其中轉譯後修

飾為重鏈可變區N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失。

[5]

如[2]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列，且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的重鏈可變區；及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區。

[6]

如[2]中所記載之抗人類Fn14抗體，其選自以下(3)及(4)：

(3)含有包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體；以及

(4)作為藉由上述(3)之抗體之轉譯後修飾而產生之抗體的抗人類Fn14抗體。

[7]

如[6]中所記載之抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈。

[8]

如[6]中所記載之抗人類Fn14抗體，其中轉譯後修飾為重鏈N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失。

[9]

如[8]中所記載之抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至454之胺基酸序列，且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的重鏈；及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈。

[10]

如[1]至[5]中任一項所記載之抗原結合片段，其為單鏈可變區片段、Fab、Fab'、或F(ab')₂。

[11]

一種多核苷酸，其包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區的鹼基序列。

[12]

一種多核苷酸，其包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區的鹼基序列。

[13]

一種表現載體，其包含如[11]及/或[12]中所記載之多核苷酸。

[14]

一種宿主細胞，其選自由以下(a)~(d)所組成之群：

(a)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；

(b)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；

(c)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；以及

(d)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

[15]

一種宿主細胞，其選自由以下(e)~(h)所組成之群：

(e)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；

(f)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；

(g)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸；以及

(h)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

[16]

一種生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法，其包括培養選自由以下(A)~(C)所組成之群中之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之步驟：

(A)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；

(B)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；以及

(C)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

[17]

一種生產抗人類Fn14抗體之方法，其包括培養選自由以下(D)~(F)所組成之群中之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體之步驟：

(D)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；

(E)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；以及

(F)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸；及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼該抗人類Fn14抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

[18]

一種抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其係藉由如[16]中所記載之方法生產。

[19]

一種抗人類Fn14抗體，其係藉由如[17]中所記載之方法生產。

[20]

一種醫藥組合物，其包含如[1]至[10]、[18]、及[19]中任一項所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段、以及藥學上所容許之賦形劑。

[21]

一種醫藥組合物，其包含如[3]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段、如[5]中所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段、及藥學上所容許之賦形劑。

[22]

一種醫藥組合物，其包含如[7]中所記載之抗人類Fn14抗體、如[9]中所記載之抗人類Fn14抗體、及藥學上所容許之賦形劑。

[23]

如[20]至[22]中任一項所記載之醫藥組合物，其為癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物。

[24]

一種預防或治療癌症惡病質之方法，其包括投予如[1]至[10]、[18]、及[19]中任一項所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之治療有效量之步驟。

[25]

如[1]至[10]、[18]、及[19]中任一項所記載之抗人類Fn14抗體或其

抗原結合片段，其用於預防或治療癌症惡病質。

[26]

一種如[1]至[10]、[18]、及[19]中任一項所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物。

[27]

一種醫藥組合物，其係癌症或癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，包含如[1]至[10]、[18]、及[19]中任一項所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段作為有效成分，且與抗癌劑併用。

[28]

一種醫藥組合物，其係癌症或癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，包含抗癌劑，且與如[1]至[10]、[18]、及[19]中任一項所記載之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段併用。

[發明之效果]

【0013】

本發明之抗人類Fn14抗體係藉由不顯示出針對人類Fn14之促效劑活性，抑制由Tweak刺激所引起之人類Fn14之活化而具有炎症抑制作用者，可用作癌症惡病質之預防或治療劑。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖1表示抗人類Fn14抗體對於A375細胞中之由Tweak刺激所引起之炎症性細胞激素IL-8產生的抑制效果。縱軸表示抑制率(%)，橫軸表示抗體濃度(ng/mL)。

圖2表示A375細胞中之由抗人類Fn14抗體刺激誘導所引起之IL-8之分泌作用。縱軸表示IL-8濃度(pg/mL)，橫軸表示抗體濃度(ng/mL)。

圖3表示小鼠化抗人類Fn14抗體4-1m對於由向小鼠移植小鼠結腸癌細胞株C26細胞所引發之體重減少之抑制作用。縱軸表示體重(g)，橫軸表示注入癌細胞後之經過天數。

圖4表示小鼠化抗人類Fn14抗體4-1m對於由向小鼠移植小鼠結腸癌細胞株C26細胞所引發之肌肉量減少之抑制作用。縱軸表示脛骨前肌之重量(mg)。

圖5表示小鼠化抗人類Fn14抗體4-1m對於由向小鼠移植小鼠結腸癌細胞株C26細胞所引發之肌肉功能降低之抑制作用。縱軸表示握力(g)。

圖6表示小鼠化抗人類Fn14抗體4-1m與吉西他濱之併用對於移植了小鼠結腸癌細胞株C26細胞之小鼠之存活時間的效果。縱軸表示存活率(%)，橫軸表示注入癌細胞後之經過天數。

圖7表示小鼠化抗人類Fn14抗體4-1m與吉西他濱之併用對於藉由向小鼠移植小鼠結腸癌細胞株C26細胞所形成之腫瘤之體積的效果。縱軸表示腫瘤體積(mm³)，橫軸表示注入癌細胞後之經過天數。

【實施方式】

【0015】

以下，對本發明詳細地進行說明。

【0016】

抗體存在IgG(Immunoglobulin G，免疫球蛋白G)、IgM(Immunoglobulin M，免疫球蛋白M)、IgA(Immunoglobulin A，免疫球蛋白A)、IgD(Immunoglobulin D，免疫球蛋白D)及

IgE(Immunoglobulin E，免疫球蛋白E)之5類。抗體分子之基本結構為各類共通，由分子量5萬~7萬之重鏈與2萬~3萬之輕鏈所構成。重鏈通常含有包含約440個胺基酸之多肽鏈，各類分別具有特徵性結構，與IgG、IgM、IgA、IgD、IgE對應地稱為Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 、Ig ϵ 。進而於IgG中存在IgG1、IgG2、IgG3、IgG4之亞類，各自對應之重鏈稱為Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3、Ig γ 4。輕鏈通常含有包含約220個胺基酸之多肽鏈，已知有L型與K型之2種，分別稱為Ig λ 、Ig κ 。抗體分子之基本結構之肽構成中，分別相同之2條重鏈及2條輕鏈利用雙硫鍵(S-S鍵)及非共價鍵進行結合，分子量為15萬~19萬。2種輕鏈可與任一重鏈成對。各抗體分子始終由2條相同之輕鏈與2條相同之重鏈形成。

【0017】

鏈內S-S鍵於重鏈中存在四個(於Ig μ 、Ig ϵ 中存在五個)，於輕鏈中存在兩個，胺基酸每100~110個殘基形成一個環，該立體結構於各環間類似，稱為結構單元或域。重鏈、輕鏈中均位於N末端之域即便為源自同種動物之同一類(亞類)之樣本，其胺基酸序列亦不一定，稱為可變區，各域分別稱為重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)。較可變區靠C末端側之胺基酸序列於各類或各亞類中大致一定而稱為恆定區(各域分別表示為CH1、CH2、CH3或CL)。

【0018】

抗體之抗原結合部位係由VH及VL所構成，結合之特異性取決於該部位之胺基酸序列。另一方面，與補體或各種Fc受體表現細胞之結合等生物學活性反映各類Ig之恆定區之結構的差。已知輕鏈與重鏈之可變區之可變性大致限定於在任一鏈中均存在的3個較小之超可變區，將該等區稱為互

補決定區(CDR；自N末端側起分別為CDR1、CDR2、CDR3)。可變區之剩餘部分稱為架構區(FR)，相對一定。

【0019】

抗體之包含VH及VL之各種抗原結合片段亦具有抗原結合活性，作為此種代表性抗原結合片段，可列舉：單鏈可變區片段(scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂。scFv係由利用連結子連結之VH與VL所構成之一價抗體片段，Fab係由輕鏈與包含VH、CH1域與鉸鏈區之一部分之重鏈片段所構成的一價抗體片段。Fab'係由輕鏈與包含VH、CH1域與鉸鏈區之一部分之重鏈片段所構成的一價抗體片段，於該鉸鏈區之部分包含構成重鏈間S-S鍵之半胱胺酸殘基。F(ab')₂片段係2個Fab'片段利用鉸鏈區中之重鏈間S-S鍵結合而成之二價抗體片段。

【0020】

<本發明之抗人類Fn14抗體>

本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段包含具有以下特徵之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。

如下抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其包含：重鏈可變區，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號31至35之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號2之胺基酸編號50至65之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號2之胺基酸編號98至114之胺基酸序列之CDR3；以及輕鏈可變區，其含有：包含序列編號4之胺基酸編號24至40之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號4之胺基酸編號56至62之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號4之胺基酸編號95至103之胺基酸序列之CDR3。

【0021】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段係如下抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【0022】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段具有上述特徵，進而包含重鏈恆定區及輕鏈恆定區。作為恆定區，可選擇任何亞類之恆定區(例如作為重鏈之I γ 1、I γ 2、I γ 3或I γ 4、作為輕鏈之I γ λ 或I γ κ 之恆定區)。於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段包含人類I γ 1恆定區作為重鏈恆定區、包含人類I γ κ 恆定區作為輕鏈恆定區。

【0023】

本說明書中所使用之與抗體之恆定區中之胺基酸變異導入相關之殘基編號係依據EU索引(Kabat等人，1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda)。L234A及L235A係人類I γ 1恆定區中之依據Kabat等人之EU索引之胺基酸234位及235位之白胺酸的經丙胺酸之置換。作為具有L234A及L235A之胺基酸變異之人類I γ 1恆定區，例如可列舉包含序列編號2之胺基酸編號126至455之胺基酸序列之人類I γ 1恆定區。

【0024】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體係如下抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編

號4所表示之胺基酸序列之輕鏈。

【0025】

於在細胞中表現抗體之情形時，已知抗體於轉譯後受到修飾。作為轉譯後修飾之例，可列舉：由羧肽酶所產生之重鏈C末端之離胺酸之缺失、由重鏈及輕鏈N末端之麩醯胺或麩胺酸之焦麩胺醯基化所產生之向焦麩胺酸之修飾、葡糖苷基化、氧化、脫醯胺化、糖化等，已知於各種抗體中產生此種轉譯後修飾(Liu H et al., J Phar Sci. 2008, Vol. 97 No.7, p.2426-2447)。

【0026】

本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段亦包含受到轉譯後修飾之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。作為受到轉譯後修飾之本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之例，可列舉受到重鏈可變區N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。於該領域中已知此種由N末端之焦麩胺醯基化或C末端離胺酸缺失進行之轉譯後修飾不會對抗體之活性帶來影響(Lyubarskaya Y et al., Anal Biochem. 2006、Vol. 348、p.24-39)。

【0027】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體係如下抗體或其抗原結合片段，其係藉由含有包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之轉譯後修飾所產生。又，於一實施形態中，該轉譯後修飾為重鏈可變區N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失。

【0028】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段係如下抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列，且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的重鏈可變區；及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【0029】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體係如下抗人類Fn14抗體，其係藉由含有包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體之轉譯後修飾而產生之抗體，轉譯後修飾為重鏈N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失。

【0030】

於一實施形態中，本發明之抗人類Fn14抗體係如下抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至454之胺基酸序列，且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的重鏈；及包含序列編號4之胺基酸序列之輕鏈。

【0031】

於一實施形態中，本發明之抗原結合片段為scFv、Fab、Fab'、或F(ab')₂。

【0032】

若為業者，則能夠基於本發明，製作抗體或其抗原結合片段與其他肽或蛋白質之融合體、或亦能夠製作結合有修飾劑之修飾體，該等形態之

抗體或其抗原結合片段亦包含於本發明之抗體。融合所使用之其他肽或蛋白質只要融合體與Fn14結合，則並無特別限定，例如可列舉：人類血清白蛋白、各種標籤肽、人工螺旋模體肽、麥芽糖結合蛋白、麩胱甘肽S轉移酶、各種毒素、其他可促進多聚物化之肽或蛋白質等。關於修飾所使用之修飾劑，只要修飾體與Fn14結合即可，則並無特別限定，例如可列舉：聚乙二醇、糖鏈、磷脂質、脂質體、低分子化合物等。

【0033】

於一實施形態中，本發明之抗體或其抗原結合片段之修飾所使用之修飾劑為聚乙二醇。

【0034】

本說明書中之所謂「抗人類Fn14抗體」係指與人類Fn14結合之抗體。是否與人類Fn14結合可使用公知之結合活性測定方法進行確認。作為測定結合活性之方法，例如可列舉酵素結合免疫吸附分析(ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)等方法。於使用ELISA之情形時，例如，使人類Fn14蛋白固相化於ELISA板上，對其添加受驗抗體並使之反應後，使經辣根過氧化酶(HRP)等酵素標記之抗IgG抗體等二次抗體反應。反應後，進行洗淨，其後藉由使用檢測其活性之試劑(例如，於HRP標記之情形時為TMB微孔過氧化物酶受質(Kirkegaard & Perry Laboratories公司、50-76-03))等之活性測定，對二次抗體之結合進行鑑定，藉此可確認受驗抗體是否與人類Fn14結合。作為具體之評價方法，可使用如於下述實施例6中所記載之方法。

【0035】

本發明之抗人類Fn14抗體只要為與人類Fn14結合之抗體即可，亦包

含除向人類Fn14之結合以外，亦與源自其他動物之Fn14(例如小鼠Fn14)結合之抗體。

【0036】

本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段可基於本說明書中所揭示的本發明之抗體之重鏈及輕鏈之序列資訊，使用該領域中公知之方法，由業者容易地製作。本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段並無特別限定，例如可依據下述〈本發明之生產抗人類Fn14抗體之方法及藉由該方法生產之抗人類Fn14抗體〉中所記載之方法製造。

【0037】

本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段可於視需要進而經純化後，依據通用方法進行製劑化，用於過度之血管新生等炎症性疾病、體重喪失、肌肉消耗、及惡病質等消耗性疾病之預防或治療。

【0038】

〈本發明之多核苷酸〉

本發明之多核苷酸包括：包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【0039】

於一實施形態中，包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸係包含編碼含有序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【0040】

作為包含編碼序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列所表示之

重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸，例如可列舉包含序列編號1之鹼基編號1至375之鹼基序列之多核苷酸。

【0041】

於一實施形態中，包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸係包含編碼含有序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈之鹼基序列的多核苷酸。

【0042】

作為包含編碼含有序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈之鹼基序列的多核苷酸，例如可列舉包含序列編號1所表示之鹼基序列之多核苷酸。

【0043】

於一實施形態中，包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸係包含編碼含有序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【0044】

作為包含編碼含有序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸，例如可列舉包含序列編號3之鹼基編號1至342之鹼基序列之多核苷酸。

【0045】

於一實施形態中，包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸係包含編碼含有序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

【0046】

作為包含編碼含有序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈之鹼基序列

的多核苷酸，例如可列舉包含序列編號3所表示之鹼基序列之多核苷酸。

【0047】

本發明之多核苷酸可基於其鹼基序列，使用該領域中公知之方法，由業者容易地製作。例如，本發明之多核苷酸可利用該領域中公知之基因合成方法進行合成。作為此種基因合成方法，可使用WO90/07861中所記載之抗體基因之合成方法等業者所公知之各種方法。

【0048】

<本發明之表現載體>

本發明之表現載體包括如下表現載體，其含有：包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及/或包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【0049】

於一實施形態中，作為本發明之表現載體，可列舉：含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、或含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體。

【0050】

作為用以表現本發明之多核苷酸之表現載體，只要能夠於真核細胞(例如動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母)及/或原核細胞(例如大腸桿菌)之各種宿主細胞中表現包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及/或包含編碼本發明之抗

人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸，並產生由該等編碼之多肽，則並無特別限制。作為此種表現載體，例如可列舉：質體載體、病毒載體(例如腺病毒、反轉錄病毒)等，例如可使用pEE6.4或pEE12.4。又，亦可向AG- γ 1或AG- κ (例如參照WO94/20632)等預先具有人類Ig恆定區基因之表現載體導入可變區基因片段而表現抗體基因。

【0051】

本發明之表現載體可包含與本發明之多核苷酸功能性地連結之啟動子。作為用以於動物細胞中表現本發明之多核苷酸之啟動子，例如可列舉：源自CMV(Cytomegalovirus，細胞巨大病毒)、RSV(Rous Sarcoma Virus，勞斯肉瘤病毒)、SV40(Simian Virus 40，猿猴病毒40)等病毒之啟動子、肌動蛋白啟動子、EF(elongation factor，延伸因子)1 α 啟動子、熱休克啟動子等。作為用以於細菌(例如艾氏菌屬菌)中表現之啟動子，例如可列舉：trp啟動子、lac啟動子、 λ PL啟動子、tac啟動子等。又，作為用以於酵母中表現之啟動子，例如可列舉：GAL1啟動子、GAL10啟動子、PH05啟動子、PGK啟動子、GAP啟動子、ADH啟動子等。

【0052】

於使用動物細胞、昆蟲細胞、或酵母作為宿主細胞之情形時，本發明之表現載體可包含起始密碼子及終止密碼子。於該情形時，本發明之表現載體可包含增強子序列、編碼本發明之抗體或其重鏈可變區或輕鏈可變區之基因的5'側及3'側之非轉譯區、分泌訊息序列、剪切接合部、多腺苷酸化部位、或可複製單元等。於使用大腸桿菌作為宿主細胞之情形時，本發明之表現載體可包含起始密碼子、終止密碼子、終止區、及可複製單

元。於該情形時，本發明之表現載體視目的可包含通常所使用之選擇標記物(例如耐四環素性基因、耐安比西林性基因、耐康黴素性基因、耐新黴素性基因、二氫葉酸還原酶基因)。

【0053】

<本發明之經轉形之宿主細胞>

作為本發明之經轉形之宿主細胞，可列舉：經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；以及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體。

【0054】

於一實施形態中，本發明之經轉形之宿主細胞包含經選自由以下(a)~(d)所組成之群中之本發明之表現載體轉形的宿主細胞。

(a)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；

(b)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；

(c)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼本

發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；以及

(d)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【0055】

於一實施形態中，本發明之經轉形之宿主細胞包含經選自由以下(e)～(h)所組成之群中之本發明之表現載體轉形的宿主細胞。

(e)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；

(f)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；

(g)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸；以及

(h)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

【0056】

作為進行轉形之宿主細胞，只要適於所使用之表現載體，且可經該表現載體轉形而表現抗體，則並無特別限定。作為進行轉形之宿主細胞，例如可列舉：本發明之技術領域中通常所使用之天然細胞或人工地建立之細胞等各種細胞(例如動物細胞(例如CHO-K1SV細胞)、昆蟲細胞(例如

Sf9)、細菌(艾氏菌屬菌等)、酵母(酵母菌屬、畢赤氏酵母屬等)等), 例如可使用CHO(Chinese Hamster Ovary, 中國倉鼠卵巢)細胞(CHO-K1SV細胞、CHO-DG44細胞等)、293細胞、NS0細胞等培養細胞。

【0057】

使宿主細胞轉形之方法並無特別限定, 例如可使用磷酸鈣法、電穿孔法等。

【0058】

<本發明之生產抗人類Fn14抗體之方法及藉由該方法生產之抗人類Fn14抗體>

本發明之生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法包含如下生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法, 其包括培養選自由以下(A)~(C)所組成之群中之宿主細胞, 使其表現抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之步驟。

(A)經如下表現載體轉形之宿主細胞, 上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸;

(B)經如下表現載體轉形之宿主細胞, 上述表現載體係含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體; 以及

(C)經如下表現載體轉形之宿主細胞, 上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多

核苷酸；及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【0059】

於一實施形態中，本發明之生產抗人類Fn14抗體之方法包含如下生產抗人類Fn14抗體之方法，其包括培養選自由以下(D)~(F)所組成之群中之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體之步驟。

(D)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；

(E)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；以及

(F)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼本發明之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸；及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

【0060】

本發明之生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法只要包括培養本發明之經轉形之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之步驟，則並無特別限定。於一實施形態中，作為該方法所使用之宿主細胞，可列舉上述(A)及(D)之宿主細胞。

【0061】

經轉形之宿主細胞之培養可藉由公知之方法進行。培養條件、例如

溫度、培養基之pH值、及培養時間係適當選擇。於宿主細胞為動物細胞之情形時，作為培養基，例如可使用包含約5~20%之胎牛血清之MEM培養基(Eagle H, Science. 1959, Vol. 130 No. 3373, p.432-437)、DMEM培養基(Dulbecco R and Freeman G, Virology. 1959, Vol. 8, p.396-397)、RPMI1640培養基(Moore GE et al., J Am Med Assoc. 1967, Vol. 199, p.519)、199培養基(Morgan JF et al., Proc Soc Exp Biol Med. 1950, Vol. 73, p.1-8)等。培養基之pH值較佳為約6~8，培養係視需要一面進行通氣或攪拌，一面於通常約30~40°C下進行約15~336小時。於宿主細胞為昆蟲細胞之情形時，作為培養基，例如可使用包含胎牛血清之Grace's培養基(Smith GE et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1985, Vol. 82, p.8404)等。培養基之pH值較佳為約5~8，培養係視需要一面進行通氣或攪拌，一面於通常約20~40°C下進行約15~100小時。於宿主細胞為大腸桿菌或酵母之情形時，作為培養基，例如適當為含有營養源之液體培養基。營養培養基較佳為包含經轉形之宿主細胞之生長所需之碳源、無機氮源或有機氮源。作為碳源，例如可列舉：葡萄糖、葡聚糖、可溶性澱粉、蔗糖等，作為無機氮源或有機氮源，例如可列舉：銨鹽類、硝酸鹽類、胺基酸、玉米漿(Corn Steep Liquor)、蛋白腴、酪蛋白、肉萃取物、大豆粕、馬鈴薯萃取液等。視需要可包含其他營養素(例如無機鹽(例如氯化鈣、磷酸二氫鈉、氯化鎂)、維生素類等)、抗生素(例如四環素、新黴素、安比西林、康黴素等)。培養基之pH值較佳為約5~8。於宿主細胞為大腸桿菌之情形時，作為較佳之培養基，例如可使用LB培養基、M9培養基(Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, Vol. 3, A2.2)等。培養係視需要一面進行通氣或攪拌，一面於通常約14~39°C下進行約3~24小時。於宿主

細胞為酵母之情形時，作為培養基，例如可使用Burkholder最小培養基(Bostian KA et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1980, Vol. 77, p.4504-4508)等。培養係視需要一面進行通氣或攪拌，一面於通常約20~35℃下進行約14~144小時。藉由如上所述之培養，能夠表現本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。

【0062】

本發明之生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法除培養本發明之經轉形之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之步驟以外，可進而包括自該經轉形之宿主細胞及/或培養上清液對抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段進行回收、例如單離或純化之步驟。作為單離或純化方法，例如可列舉：鹽析、溶劑沈澱法等利用溶解度之方法；透析、超濾、凝膠過濾等利用分子量之差之方法；離子交換層析法、羥基磷灰石層析法等利用帶電之方法；親和層析法等利用特異親和性之方法；逆相高效液相層析法等利用疏水性之差之方法；等電點電泳等利用等電點之差之方法等。例如，蓄積於培養上清液中之抗體可藉由各種層析法、例如使用蛋白A管柱或蛋白G管柱之管柱層析法進行純化。

【0063】

本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段亦包含藉由本發明之生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法生產之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。

【0064】

<本發明之醫藥組合物>

本發明之醫藥組合物包括包含本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結

合片段及藥學上所容許之賦形劑的醫藥組合物。本發明之醫藥組合物可使用該領域中通常所使用之賦形劑、即藥劑用賦形劑或藥劑用載體等，藉由通常所使用之方法而製備。作為該等醫藥組合物之劑型之例，例如可列舉注射劑、點滴用劑等非經口劑，可藉由靜脈內投予、皮下投予、及肌內投予等進行投予。於製劑化時，可於藥學上所容許之範圍內，使用與該等劑型相應之賦形劑、載體、添加劑等。

【0065】

本發明之醫藥組合物可包含複數種本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。例如，含有未受到轉譯後修飾之抗體或其抗原結合片段、及藉由該抗體或其抗原結合片段之轉譯後修飾而產生之抗體或其抗原結合片段的醫藥組合物亦包含於本發明中。

【0066】

於一實施形態中，含有抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之本發明之醫藥組合物亦包含下述中所記載之醫藥組合物。

含有如下抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，該抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段係含有包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段；以及藉由該抗體或其抗原結合片段之轉譯後修飾而產生之抗體或其抗原結合片段。

【0067】

本發明之醫藥組合物亦包含如下醫藥組合物，其含有重鏈C末端離胺酸之缺失抗體、受到N末端轉譯後修飾之抗體或其抗原結合片段、使重鏈C末端離胺酸缺失且受到N末端轉譯後修飾之抗體、及/或具有重鏈C末端

離胺酸且未受到N末端轉譯後修飾之抗體。

【0068】

於一實施形態中，含有抗人類Fn14抗體之本發明之醫藥組合物亦包含如下醫藥組合物，其含有下述(5)~(8)中之2種以上之抗人類Fn14抗體。

(5)含有包含序列編號2之胺基酸編號1至454之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體。

(6)含有包含序列編號2所表示之胺基酸序列且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體。

(7)含有包含序列編號2之胺基酸編號1至454之胺基酸序列且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體。

(8)含有包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體。

【0069】

於一實施形態中，含有抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之本發明之醫藥組合物亦包含下述所記載之醫藥組合物。如下醫藥組合物，其包含：含有包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體；含有包含序列編號2之胺基酸編號1至454之胺基酸序列且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體；以及藥學上所容許之賦形劑。

【0070】

上述製劑化時之本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之添加量根據患者之症狀程度或年齡、所使用之製劑之劑型、或抗體之結合效價等而有所不同，例如能夠以於投予時成為0.001 mg/kg~100 mg/kg左右之方式使用。

【0071】

本發明之醫藥組合物可用作活性型人類Fn14參與病況形成之疾病、例如癌症惡病質之預防或治療劑。

【0072】

本發明包含一種癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，其包含本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段。又，本發明包含一種治療或預防癌症惡病質之方法，其包括投予本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之治療有效量之步驟。又，本發明包含一種本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其用於預防或治療癌症惡病質。進而，本發明包含一種本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物。

【0073】

本發明提供一種醫藥組合物，其係癌症或癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，包含本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，且與抗癌劑併用。本發明提供一種預防或治療癌症或癌症惡病質之方法，其包括投予本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段及抗癌劑之有效量的步驟。本發明提供一種本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其用於預防或治療癌症或癌症惡病質，且與抗癌劑併用。本發明提供一種本

發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造癌症或癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，且該醫藥組合物係與抗癌劑併用。

【0074】

又，本發明提供一種醫藥組合物，其係癌症或癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，包含抗癌劑，且與本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段併用。本發明提供一種抗癌劑，其用於預防或治療癌症或癌症惡病質，且與本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段併用。本發明提供一種抗癌劑之用途，其用於製造癌症或癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物，且該醫藥組合物係與本發明之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段併用。

【0075】

於一實施形態中，本發明中所使用之抗癌劑為吉西他濱。

【0076】

本文中提供為了對本發明進而獲得理解而進行參照之特定實施例，但該等係以例示為目的者，並不限定本發明。

[實施例]

【0077】

關於使用市售之套組或試劑等之部分，只要未特別說明，則係依據隨附之操作說明進行實驗。

【0078】

(實施例1：人類及小鼠Fn14-Fc融合蛋白之取得)

本發明者等人製作人類Fn14-人類Fc融合蛋白及小鼠Fn14-小鼠Fc融合蛋白以用作用以取得抗Fn14抗體之抗原及用於篩選試驗之材料。人類

Fn14-人類Fc融合蛋白係利用肽連結子(序列編號9)連結人類Fn14序列之細胞外部分序列(NCBI(National Center of Biotechnology Information, 美國國家生物技術信息中心)登錄編號: NP_057723.1之第1號至第79號之胺基酸)之C末端與人類Fc區(NCBI登錄編號: P01857.1之第106號至第330號之胺基酸)之N末端而成的融合蛋白。又, 小鼠Fn14-小鼠Fc融合蛋白係連結小鼠Fn14序列之細胞外部分序列(NCBI登錄編號: AAF07882.1之第1號至第75號之胺基酸)之C末端與小鼠Fc區之N末端而成的融合蛋白, 具體而言, 係使用限制酶EcoRI與EcoRV, 將編碼小鼠Fn14序列之細胞外部分序列之基因組入至pFUSE-mIgG2B-Fc1(InvivoGen公司、pfuse-mg2bfc1)之hEF1-HTLV啟動子區與mIgG2B-Fc區之間的多選殖位點, 並使之表現的融合蛋白。分別製作向GS載體pEE12.4(Lonza公司)中組入有編碼上述融合蛋白之基因之表現載體, 並分別導入至CHO-K1SV細胞(Lonza公司)中。自該CHO-K1SV細胞之培養上清液依據通用方法分別純化人類Fn14-人類Fc融合蛋白及小鼠Fn14-小鼠Fc融合蛋白。

【0079】

(實施例2: 抗人類Fn14抗體之取得)

使用人類單株抗體開發技術「VelocImmune」(VelocImmune抗體技術: Regeneron公司(美國專利6596541號))製作小鼠抗體。藉由VelocImmune技術而獲得之抗體係具有人類抗體之可變區與小鼠抗體之恆定區之抗體(亦稱為嵌合抗體)。向VelocImmune小鼠注入引發免疫反應之佐劑並對自實施例1中所製作之人類Fn14-人類Fc融合蛋白使用FabRICATOR(Sigma公司、77661)切斷、去除人類Fc區所得之人類Fn14蛋白進行免疫。藉由依據通用方法使自進行了免疫之小鼠之淋巴結採集之

淋巴細胞與源自小鼠之骨髓瘤細胞SP2/0-Ag14(ATCC(American Type Culture Collection, 美國典型培養物保藏中心): CRL-1581)進行細胞融合而製作融合瘤, 並進行單株化。篩選產生與人類Fn14結合且抑制由Tweak刺激所引起之NFkB之活化(以下, 於下述實施例中, 稱為「Tweak誘導NFkB活化」)之抗體的融合瘤, 自培養上清液純化抗體。

【0080】

(實施例3: NFkB活化分析)

為了評價實施例2中所發現之抗體對於人類Fn14之促效劑作用, 藉由報導分析評價不存在Tweak下之抗體對於NFkB活化之作用。具體而言, 製作穩定地導入了組入有NFkB轉錄應答序列之螢光素酶報導載體pGL4.32(Promega公司、E8491)之HEK293細胞(ATCC、CRL-1573)(以下, 稱為NFkB/HEK293細胞), 用於評價。

【0081】

以 1.25×10^5 個細胞/mL使NFkB/HEK293細胞懸浮於含10%胎牛血清之DMEM(Sigma公司、D6429)中, 向透明底白色96孔板(Corning公司、3610)每1孔接種80 μ L。於設定為37°C、5%CO₂之CO₂培養箱中培養2小時後, 對實施例2中所獲得之純化抗體以最終濃度1 ng/mL至300 μ g/mL之約3倍公比利用上述培養基製作12個等級之稀釋系列, 其後每1孔添加20 μ L。於37°C、5%CO₂下培養一晚後, 使用螢光素酶測定試劑ONE-Glo螢光素酶分析系統(Promega公司), 測定螢光素酶表現量, 藉此將NFkB活化定量化。

【0082】

其結果, 篩選未誘導NFkB活化、即未顯示促效劑活性之抗人類Fn14

抗體，並命名為4-1。

【0083】

(實施例4：完全人類型抗體及小鼠化抗體之製作)

自實施例3中篩選之產生抗體之融合瘤選殖編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因，進行序列確定。於抗體之序列確定後，於重鏈可變區基因之5'側連接編碼訊息序列(Wittle N et al., Protein Engineering. 1987, Vol. 1 No.6, p.499-505)之基因，並且於3'側連接具有L234A及L235A之胺基酸變異之人類I γ 1恆定區基因(包含序列編號1之鹼基編號第376號至第1365號之鹼基序列)，將該重鏈基因插入至GS載體pEE6.4(Lonza公司)。又，於輕鏈可變區基因之5'側連接編碼訊息序列(Wittle N et al., Protein Engineering. 1987, Vol. 1 No.6, p.499-505)之基因，並且於3'側連接人類 κ 鏈之恆定區基因(包含序列編號3之鹼基編號第343號至第660號之鹼基序列)，將該輕鏈基因插入至GS載體pEE12.4。利用NotI-HF與PvuI-HF對該等GS載體進行限制酶切斷，並使用DNA(Deoxyribonucleic Acid，去氧核糖核酸)連接套組<Mighty Mix>(TaKaRa公司、6023)進行連接，而構建插入有重鏈與輕鏈之兩個基因之GS載體。自轉染了該載體之CHO-K1SV細胞之培養上清液依據通用方法純化抗體而取得4-1之完全人類型抗體，命名為4-1h。

【0084】

將所製作之4-1h之重鏈之鹼基序列表示於序列編號1，將由其所編碼之胺基酸序列表示於序列編號2，將輕鏈之鹼基序列表示於序列編號3，將由其所編碼之胺基酸序列表示於序列編號4。序列編號2所表示之重鏈之可變區包含序列編號2之胺基酸編號第1號至第125號之胺基酸序列，序列編

號4所表示之輕鏈之可變區包含序列編號4之胺基酸編號第1號至第114號之胺基酸序列。4-1h之重鏈可變區之CDR1、CDR2、及CDR3分別包含序列編號2之第31~35號、第50~65號、及第98~114號之胺基酸序列。4-1h之輕鏈可變區之CDR1、CDR2、及CDR3分別包含序列編號4之第24~40號、第56~62號、及第95~103號之胺基酸序列。

【0085】

於藉由小鼠體內試驗評價抗人類Fn14抗體時，為了減弱免疫原性風險而製作4-1h之小鼠化抗體(以下，稱為4-1m)。將4-1h之輕鏈及重鏈之架構區(FR)部分地置換為其他小鼠抗體之FR而製作編碼4-1m之可變區之鹼基序列。

【0086】

使用與上述4-1h之載體構建、抗體之表現及純化同樣之方法而取得4-1m。其中，重鏈之恆定區係使用編碼具有D265A胺基酸變異之小鼠Igy2a恆定區基因(包含序列編號5之鹼基編號第376號至第1365號之鹼基序列)之基因，輕鏈之恆定區係使用小鼠κ鏈之恆定區基因(包含序列編號7之鹼基編號第343號至第660號之鹼基序列)。

【0087】

將所製作之4-1m之重鏈之鹼基序列表示於序列編號5，將由其所編碼之胺基酸序列表示於序列編號6，將輕鏈之鹼基序列表示於序列編號7，將由其所編碼之胺基酸序列表示於序列編號8。序列編號6所表示之重鏈之可變區包含序列編號6之胺基酸編號第1號至第125號之胺基酸序列，序列編號8所表示之輕鏈之可變區包含序列編號8之胺基酸編號第1號至第114號之胺基酸序列。4-1m之重鏈可變區之CDR1、CDR2、及CDR3分別包含

序列編號6之第31～35號、第50～65號、及第98～114號之胺基酸序列。
4-1m之輕鏈可變區之CDR1、CDR2、及CDR3分別包含序列編號8之第24～40號、第56～62號、及第95～103號之胺基酸序列。

【0088】

(實施例5：完全人類型抗體之胺基酸修飾分析)

進行經純化之4-1h之胺基酸修飾分析，結果於純化抗體之大部分產生重鏈N末端之焦麩胺醯基化及C末端之離胺酸缺失。

【0089】

(實施例6：完全人類型抗體及小鼠化抗體之人類及小鼠Fn14結合ELISA)

評價實施例4中所取得之4-1h及4-1m對於Fn14蛋白之結合活性。利用磷酸緩衝液生理鹽水(PBS)將實施例1中所取得之人類Fn14-人類Fc融合蛋白及小鼠Fn14-小鼠Fc融合蛋白稀釋為1 µg/mL，向MaxiSorp 384孔透明板(Nunc公司、464718)每1孔添加15 µL，於4°C下培育一晚，藉此進行固相化。次日去除固相液，並利用含0.05%Tween-20之三羥甲基胺基甲烷緩衝生理鹽水(TBS-T)洗淨。每1孔添加50 µL之包含20%之Blocking One(Nacalai Tesque公司、03953-95)之PBS，於室溫下靜置1小時後，利用TBS-T洗淨。對實施例4中所取得之4-1h或4-1m使用包含5%Blocking One之TBS-T(以下，稱為稀釋液)，自最高濃度30 µg/mL藉由12個等級、4倍公比之稀釋，製作稀釋系列，每1孔添加20 µL。於室溫下培育1小時後，利用TBS-T洗淨。作為2次抗體，對4-1h每1孔添加20 µL利用稀釋液稀釋5000倍所得之辣根過氧化酶標記抗人類κ輕鏈抗體(SouthernBiotech公司、2060-05)，對4-1m每1孔添加20 µL利用稀釋液稀釋4000倍所得之辣根過氧化酶標記抗小鼠κ輕鏈抗體(SouthernBiotech公司、1050-05)。

於室溫下培育1小時後，利用TBS-T洗淨，添加TMB微孔過氧化酶受質(Kirkegaard & Perry Laboratories公司、50-76-03)，於評價4-1h時靜置3分鐘，於評價4-1m時靜置5分鐘後，添加2 M硫酸停止反應，利用SpectraMax Paradigm(Molecular Devices公司)測定450 nm之吸光度。藉由複本進行試驗，並藉由4參數羅吉斯曲線擬合算出EC₅₀值。

【0090】

其結果，確認到實施例4中所製作之4-1h及4-1m對人類Fn14及小鼠Fn14具有結合活性(表1)。

表1：4-1h及4-1m對於人類及小鼠Fn14之結合活性

◎[表1]

抗體名	EC ₅₀ (ng/mL)	
	人類	小鼠
4-1h	30.4	23.2
4-1m	18.2	16.5

【0091】

(實施例7：完全人類型抗體之Tweak誘導NFκB活化抑制分析)

為了評價實施例4中所取得之4-1h對於Fn14之拮抗劑活性，藉由報導分析評價Tweak誘導NFκB活化抑制作用。

【0092】

以 1.25×10^5 個細胞/mL使實施例3中所製作之NFκB/HEK293細胞懸浮於含10%胎牛血清之DMEM中，向透明底白色96孔板每1孔接種80 μL。於37°C、5%CO₂下培養一晚後，對實施例4中所獲得之4-1h以最終濃度0.1 ng/mL至10 μg/mL之約3倍公比利用上述培養基製作11個等級之稀釋系列，其後每1孔添加10 μL。於37°C、5%CO₂下培養30分鐘後，以最終濃度成為100 ng/mL之方式添加Tweak(Peprotech公司、310-06)10 μL。於

以37°C、5%CO₂培養5小時後，依據實施例3之方法將NFκB活化定量化。將僅添加有不合抗體之培養基之群設定為對照群，將Tweak添加群設為0%抑制，將Tweak未添加群設為100%抑制，藉由4參數羅吉斯曲線擬合算出進行50%抑制之抗體之濃度(IC₅₀值)。利用複本對各抗體進行實驗，將試行3次之IC₅₀值進行幾何平均，算出95%可信區間(表2)。於本試驗中，使用小鼠抗人類Fn14抗體CRCBT-06-002(專利文獻2)作為比較抗體。

【0093】

其結果，可知4-1h具有強於CRCBT-06-002之拮抗劑活性。

表2：4-1h對於Tweak誘導NFκB活化之抑制活性

◎[表2]

抗體名	IC ₅₀ (ng/mL) (95%可信區間)
4-1h	41.5 (27.2-63.4)
CRCBT-06-002	115 (72.7-183)

【0094】

(實施例8：完全人類型抗體之IL-8產生分析)

藉由體外IL-8產生分析而評價實施例4中所取得之4-1h之功能活性。以5×10⁴個細胞/mL使A375細胞(ATCC、CRL-1619)懸浮於含10%胎牛血清之DMEM中，向96孔平底板(IWAKI、3860-096)每1孔接種100 μL。於37°C、5%CO₂下培養一晚後，利用PBS洗淨。對實施例4中所取得之4-1h，利用上述培養基製作最終濃度1 ng/mL至100 μg/mL之10倍稀釋系列，添加至細胞。於最終濃度5 ng/mL之Tweak存在下(拮抗劑活性評價)或不存在下(促效劑活性評價)，於37°C、5%CO₂下培養一晚後，回收培養

上清液，使用人類 IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA 套組 (R&D 公司、D8000C) 測定培養上清液中之 IL-8 濃度。拮抗劑活性及促效劑活性評價中之最終容量分別以 65 μ L/孔及 100 μ L/孔進行實驗。於本試驗中，使用 CRCBT-06-002 作為比較抗體，並利用複本對各抗體進行實驗。

【0095】

於拮抗劑活性評價中，將僅添加有不合抗體之培養基之群設定為對照群，將 Tweak 添加群設為 0% 抑制，將 Tweak 未添加群設為 100% 抑制，算出抑制率。將 4 次之各實驗中之最大抑制率之算術平均 \pm 標準誤差示於表 3(表 3)。將拮抗劑活性之圖示於圖 1，將促效劑活性之圖示於圖 2。

【0096】

如表 3 及圖 1 所示，可知對於由 Tweak 刺激所引起之 IL-8 產生，4-1h 顯示出大致完全之抑制活性，相對於此，CRCBT-06-002 僅顯示出部分之抑制活性。又，如圖 2 所示，CRCBT-06-002 於不存在 Tweak 下抗體單獨誘導 IL-8 產生，相對於此，本發明之 4-1h 幾乎未誘導 IL-8 產生。

【0097】

根據以上可知 CRCBT-06-002 係具有促效劑作用之部分性拮抗劑抗體，相對於此，4-1h 為針對人類 Fn14 之促效劑作用極弱之完全拮抗劑抗體。

表 3：4-1h 及 CRCBT-06-002 對於由 Tweak 刺激所引起之 IL-8 產生之抑制活性

◎[表 3]

抗體名	最大抑制率(%) 平均 \pm 標準誤差
4-1h	96.4 \pm 0.4
CRCBT-06-002	53.0 \pm 6.8

【0098】

(實施例9：小鼠癌症惡病質模型中之作用)

荷有小鼠結腸癌細胞株C26(COLON 26)之小鼠係顯示出作為惡病質之特徵之體重減少及肌肉量之降低的代表性癌症惡病質模型之一(Aulino P et al., BMC Cancer. 2010, Vol. 10 363, p.1-15)(Bonetto A et al., J Vis Exp. 2016, Nov. 30 117, p.1-21)。

【0099】

使用BD Matrigel基質基底膜(無酚紅)(BD、356237)，將以 10^6 個細胞/100 μ L懸浮之C26細胞(National Cancer Institute)向雄性CD2F1小鼠(Charles River Laboratories Japan公司)之皮下注入100 μ L，藉此製作C26荷癌小鼠，於確認到C26荷癌小鼠之體重開始減少後，開始投予抗體。具體而言，於注入細胞後第25、28、30、32及35天，以3 mg/kg(投予容量10 mL/kg)向C26荷癌小鼠皮下投予經PBS稀釋之4-1m。向對照群藉由同樣之方法投予同型對照抗體。依據通用方法取得針對作為體內不存在之抗原的KLH(keyhole limpet hemocyanin，匙孔螺血藍蛋白)之小鼠IgG2a抗體，用作同型對照抗體。投予係以各群15隻開始，至作為實驗結束日之第37天，4-1m投予群死亡2隻，對照群死亡7隻。

【0100】

於實驗結束前一天(第36天)，使用小動物握力測定裝置(Melquest公司、GPM-100B)測定握力。於第37天測定體重後，測定所摘取之脛骨前肌之重量作為肌肉量。對在第36及37天測定之各指標，使用學生t檢驗判定與4-1m投予群及對照群之間之有意義差。於任一種情形時均將 $p < 0.05$ 之情形設為有意義，於存在有意義差之情形時於圖中記載符號(*) (圖中之

**表示於 $p < 0.01$ 下存在有意義差)。

【0101】

將至第37天為止繼時性地測定之體重之變化示於圖3。於對照群中於開始投予後體重之減少亦進展，但於4-1m投予群中體重減少被抑制，於第37天，與對照群相比，於4-1m投予群中確認到有意義之體重增加($p = 0.0019$)。又，肌肉量亦於4-1m投予群中確認到有意義之增加(圖4、 $p = 0.0009$)。進而，於4-1m投予群中握力亦有意義地增加(圖5、 $p = 0.0003$)，不僅對肌肉量，亦對肌肉功能顯示出改善效果。

【0102】

根據以上之結果，提示4-1m對惡液質有效，又，確認到體重減少後之治療性投予亦可能有效。

【0103】

(實施例10：對於小鼠癌症惡病質模型之存活時間之作用)

與實施例9同樣地製作C26荷癌小鼠。自C26荷癌小鼠之體重轉為減少之時刻起以各群5隻開始投予。具體而言，注入細胞後第22天至第70天係1週皮下投予3次，其後於第71、76、78、83及85天，以0.3 mg/kg(投予容量10 mL/kg)皮下投予經PBS稀釋之4-1m。向對照群中藉由與4-1m同樣之方法投予與實施例9相同之同型對照抗體。吉西他濱投予群係以10 mg/kg(投予容量10 mL/kg)皮下投予經PBS稀釋之吉西他濱(商品名：Gemzar、Eli Lilly and Company)。吉西他濱併用4-1m投予群係同一天投予4-1m與吉西他濱之兩者。使用游標卡尺(AS ONE、VCO1-150)繼時性地測定腫瘤之長徑及短徑，並依據以下之式算出腫瘤體積。

$$\text{腫瘤體積} = \text{長徑}(\text{mm}) \times \text{短徑}(\text{mm}) \times \text{短徑}(\text{mm}) / 2$$

以卡普蘭-邁耶存活率曲線將小鼠之存活率示於圖6。於對群間之存活曲線之不同進行比較之情形時，進行對數秩檢定，將 $p < 0.05$ 之情形設為有意義。存活時間中央值於對照群、4-1m投予群及吉西他濱投予群中分別為41天、57天及55天。吉西他濱併用4-1m投予群之存活時間中央值為83天，相對於4-1m單獨投予群或吉西他濱單獨投予群之存活曲線確認到有意義差。

另一方面，於抗體單獨及併用吉西他濱之任一種情形時均未觀察到由投予4-1m所引起之對腫瘤體積之影響(圖7)。

根據以上之結果顯示，4-1m未對腫瘤尺寸帶來影響而延長存活時間，藉由與吉西他濱之類之抗癌劑併用，可能對存活率之提高更有效。

[產業上之可利用性]

【0104】

本發明之抗人類Fn14抗體對人類Fn14參與病況形成之各種疾病之預防或治療有用。又，期待本發明之多核苷酸、表現載體、經轉形之宿主細胞及生產抗體之方法對生產上述抗人類Fn14抗體有用。

[序列表非關鍵文字]

【0105】

於以下之序列表之數字標題 < 223 > 中記載「人工序列(Artificial Sequence)」之說明。具體而言，序列表之序列編號1、5及3、7所表示之鹼基序列分別為抗人類Fn14抗體之重鏈及輕鏈之鹼基序列，序列編號2、4、6、及8所表示之胺基酸序列分別為由序列編號1、3、5及7所編碼之重鏈及輕鏈之胺基酸序列。序列編號9所表示之胺基酸序列為連接人類Fn14蛋白、及人類Fc區蛋白之肽連結子序列。

序列表

<110> 日商安斯泰來製藥股份有限公司(Astellas Pharma Inc.)

<120> 抗人類Fn14抗體

<130> A19011A00

<150> JP 2018-205995

<151> 2018-10-31

<160> 9

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 1365

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1h抗體之重鏈

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1365)

<400> 1

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggg gaa atc aat cat cgt gga agc acc aac tcc aac ccg tcc ctc aag 192
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

agt cga gac acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
Ser Arg Asp Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

agg ctg agg tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95	288
cgc gag ggt ata agt gga agt atg ggg atc tac gac tac agc gga atg Arg Glu Gly Ile Ser Gly Ser Met Gly Ile Tyr Asp Tyr Ser Gly Met 100 105 110	336
gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 115 120 125	384
aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 130 135 140	432
ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 145 150 155 160	480
ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 165 170 175	528
acc ttc ccg gct gtc cia cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 180 185 190	576
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 195 200 205	624
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu 210 215 220	672
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 225 230 235 240	720
gaa gcc gct ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 245 250 255	768
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 260 265 270	816
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	864

I843763

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac 912
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 960
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 1008
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga 1056
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag 1104
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1152
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1200
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1248
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca 1296
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc 1344
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1365
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 2

<211> 455

I843763

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成結構

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Asp Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Glu Gly Ile Ser Gly Ser Met Gly Ile Tyr Asp Tyr Ser Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

I843763

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 3
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1h抗體之輕鏈

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(660)

<400> 3
gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agg cag agt att tta tat agt 96
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

tcc aac aat aag aac tac tta act tgg tac cag cag aaa cca gga cag 144
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

I843763

cct cct aag ttg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc 192
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa 288
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

tat tat agt act cct tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc 336
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

aaa cgg act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat 384
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac 432
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc 480
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac 528
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac 576
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc 624
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 660
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 4
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列

I843763

<220>

<223> 合成結構

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180

185

190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 5

<211> 1368

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1m抗體之重鏈

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1368)

<400> 5

gat gtt cag ctg caa gag tct ggc cct ggc ctg gtc aag cct tct cag 48
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

tct ctg tct ctg acc tgc gct gtg tac ggc ggc tct ttc tct ggc tac 96
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

tac tgg tcc tgg atc cgg cag ttc cct ggc aac aag ctg gaa tgg atg 144
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ggc gag atc aac cac cgg ggc tcc acc aac tct aac ccc agc ctg aag 192
 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

tcc cgg atc tcc atc acc gtg gac acc tcc aag aac cag ttc ttt ctg 240
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
 65 70 75 80

cag ctc aac tcc gtg aca acc gag gac acc gcc acc tac tac tgt gcc 288
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

aga gag ggc atc tct ggc tcc atg ggc atc tac gac tac tcc ggc atg 336

I843763

Arg Glu Gly Ile Ser Gly Ser Met Gly Ile Tyr Asp Tyr Ser Gly Met	
100	105 110
gat gtg tgg ggc cag ggc aca ctg gtt acc gtg tct gcc gct aag acc	384
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr	
115	120 125
acc gct cct tcc gtg tat cct ctg gca cct gtg tgt ggc gac acc acc	432
Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr	
130	135 140
gga agt tct gtg acc ctg gga tgt ctg gtc aag ggc tac ttc ccc gag	480
Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu	
145	150 155 160
cct gtg aca ctg acc tgg aac tct ggc tct ctg tcc tct ggc gtg cac	528
Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His	
165	170 175
acc ttt cca gcc gtg ctg cag tct gac ctg tac acc ctg tct agc tcc	576
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser	
180	185 190
gtg acc gtg acc tcc tct acc tgg cct agc cag tcc atc acc tgt aac	624
Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn	
195	200 205
gtg gcc cat cct gcc tcc agc acc aag gtg gac aag aag atc gag cct	672
Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro	
210	215 220
cgg ggc cct acc atc aag cct tgt cct cca tgc aag tgc ccc gct cct	720
Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro	
225	230 235 240
aat ctg ctc gga ggc ccc tcc gtg ttc atc ttc cca cct aag atc aag	768
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys	
245	250 255
gac gtg ctg atg atc tcc ctg tct cct atc gtg acc tgc gtg gtg gtg	816
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val	
260	265 270
gcc gtg tcc gag gat gat cct gac gtg cag atc agt tgg ttc gtg aac	864
Ala Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn	
275	280 285
aac gtg gaa gtg cac acc gct cag acc cag aca cac aga gag gac tac	912
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr	
290	295 300

aac agc acc ctg aga gtg gtg tct gcc ctg cct atc cag cat cag gat 960
 Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 305 310 315 320

tgg atg tcc ggc aaa gag ttc aag tgc aaa gtg aac aac aag gac ctg 1008
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 325 330 335

cct gct cca atc gag cgg acc atc tct aag cct aag ggc tct gtc agg 1056
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
 340 345 350

gcc cct cag gtg tac gtt ttg cct cca cct gag gaa gag atg acc aag 1104
 Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365

aaa caa gtg acc ctg aca tgc atg gtc acc gac ttc atg ccc gag gac 1152
 Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 370 375 380

atc tac gtg gaa tgg acc aac aac ggc aag acc gag ctg aac tac aag 1200
 Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

aac acc gag cca gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tac ttc atg tac tcc 1248
 Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 405 410 415

aag ctg cgc gtc gag aag aag aac tgg gtc gag aga aac tcc tac tcc 1296
 Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 420 425 430

tgc tcc gtg gtg cac gag ggc ctg cac aat cac cac acc acc aag tcc 1344
 Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 435 440 445

ttc tct cgg acc cct ggc aag tga 1368
 Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455

<210> 6

<211> 455

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成結構

I843763

<400> 6

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Gly Ile Ser Gly Ser Met Gly Ile Tyr Asp Tyr Ser Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
115 120 125

Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr
130 135 140

Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
180 185 190

I843763

Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn
195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro
210 215 220

Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
245 250 255

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Ala Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
275 280 285

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
340 345 350

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
370 375 380

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 435 440 445

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455

<210> 7

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1m抗體之輕鏈

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(663)

<400> 7

gac atc gtg atg tct cag agc cct tcc tct ctg gcc gtg tcc gtg gga 48
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

gag aaa gtg acc atg tcc tgc aag tcc cgg cag tcc atc ctg tac tcc 96
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
 20 25 30

tcc aac aac aag aac tac ctg acc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag 144
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gcc tcc acc aga gaa tct ggc gtg 192
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

ccc gat aga ttc acc ggc tct ggc tct ggc acc gac ttt acc ctg acc 240
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

I843763

65	70	75	80	
atc tcc tcc gtg aag gcc gag gat ctg gct gtg tac tac tgc cag cag				288
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln				
	85	90	95	
tac tac agc acc cct tac acc ttt ggc tcc ggc acc aag ctg gaa atc				336
Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile				
	100	105	110	
aag aga gct gac gcc gct cct acc gtg tct atc ttc cca cct agc tcc				384
Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser				
	115	120	125	
gag cag ctg acc tct ggc gga gct tct gtc gtg tgc ttc ctg aac aac				432
Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn				
	130	135	140	
ttc tac ccc aag gac atc aac gtg aag tgg aag atc gac ggc tcc gag				480
Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu				
	145	150	155	160
aga cag aac ggc gtg ctg aac tct tgg acc gac cag gac tcc aag gac				528
Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp				
	165	170	175	
agc acc tac tcc atg tcc tcc aca ctg acc ctg aca aag gac gag tac				576
Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr				
	180	185	190	
gag cgg cac aac tcc tat acc tgc gag gct acc cac aag acc tcc acc				624
Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr				
	195	200	205	
tct cca atc gtg aag tcc ttc aac cgg aac gag tgc tga				663
Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys				
	210	215	220	

<210> 8
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成結構

<400> 8

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly

I843763

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
 180 185 190

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
 195 200 205

I843763

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215 220

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成結構

<400> 9

Ile Glu Gly Arg Met Asp Gly Gly Gly
1 5

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其包含：重鏈可變區，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號31至35之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號2之胺基酸編號50至65之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號2之胺基酸編號98至114之胺基酸序列之CDR3；以及輕鏈可變區，其含有：包含序列編號4之胺基酸編號24至40之胺基酸序列之CDR1、包含序列編號4之胺基酸編號56至62之胺基酸序列之CDR2、及包含序列編號4之胺基酸編號95至103之胺基酸序列之CDR3。

【第2項】

如請求項1之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其選自以下(1)及(2)：

(1)含有包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段；以及

(2)藉由上述(1)之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之轉譯後修飾而產生之抗體或其抗原結合片段。

【第3項】

如請求項2之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【第4項】

如請求項2之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其中轉譯後修飾為

重鏈可變區N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失。

【第5項】

如請求項2之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至125之胺基酸序列，且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的重鏈可變區；及包含序列編號4之胺基酸編號1至114之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【第6項】

如請求項2之抗人類Fn14抗體，其選自以下(3)及(4)：

(3)含有包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈的抗人類Fn14抗體；以及

(4)作為藉由上述(3)之抗體之轉譯後修飾而產生之抗體的抗人類Fn14抗體。

【第7項】

如請求項6之抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2所表示之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈。

【第8項】

如請求項6之抗人類Fn14抗體，其中轉譯後修飾為重鏈N末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈C末端之離胺酸缺失。

【第9項】

如請求項8之抗人類Fn14抗體，其含有：包含序列編號2之胺基酸編號1至454之胺基酸序列，且序列編號2之胺基酸編號1之麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的重鏈；及包含序列編號4所表示之胺基酸序列之輕鏈。

【第10項】

如請求項1至5中任一項之抗原結合片段，其為單鏈可變區片段、Fab、Fab'、或F(ab')₂。

【第11項】

一種多核苷酸，其包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區的鹼基序列及輕鏈可變區的鹼基序列。

【第12項】

一種表現載體，其包含如請求項11之多核苷酸。

【第13項】

一種宿主細胞，其選自由以下(a)~(d)所組成之群：

(a)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；

(b)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；

(c)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；以及

(d)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【第14項】

一種宿主細胞，其選自由以下(e)~(h)所組成之群：

(e)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；

(f)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；

(g)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸；以及

(h)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

【第15項】

一種生產抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之方法，其包括培養選自由以下(A)~(C)所組成之群中之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之步驟：

(A)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；

(B)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈

可變區之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；以及

(C)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如請求項3之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸；及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區之鹼基序列的多核苷酸。

【第16項】

一種生產抗人類Fn14抗體之方法，其包括培養選自由以下(D)~(F)所組成之群中之宿主細胞，使其表現抗人類Fn14抗體之步驟：

(D)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有：包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸、及包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸；

(E)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體係含有包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體、及含有包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸之表現載體；以及

(F)經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼如請求項7之抗人類Fn14抗體之重鏈之鹼基序列的多核苷酸；及經如下表現載體轉形之宿主細胞，上述表現載體含有包含編碼該抗人類Fn14抗體之輕鏈之鹼基序列的多核苷酸。

【第17項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至10中任一項之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段、以及藥學上所容許之賦形劑。

【第18項】

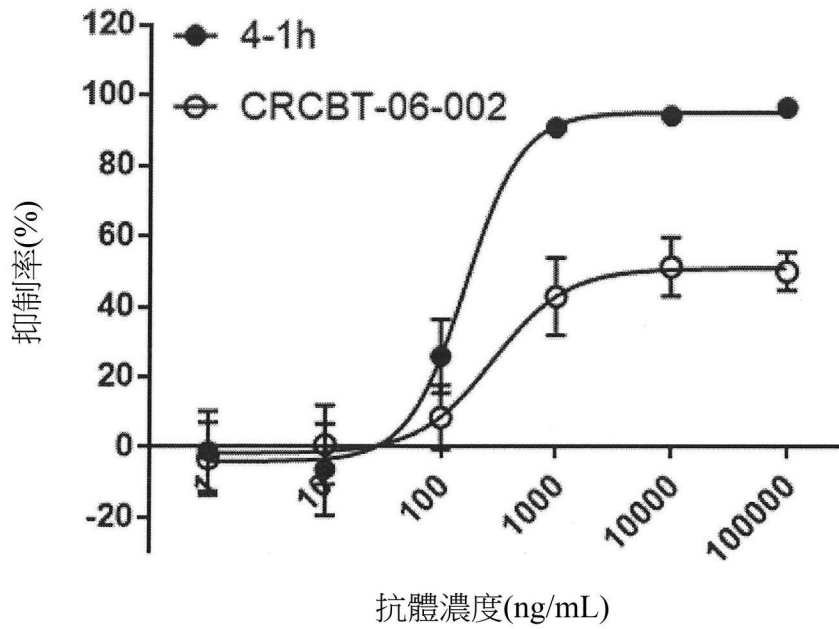
如請求項17之醫藥組合物，其為癌症惡病質之預防或治療用醫藥組

合物。

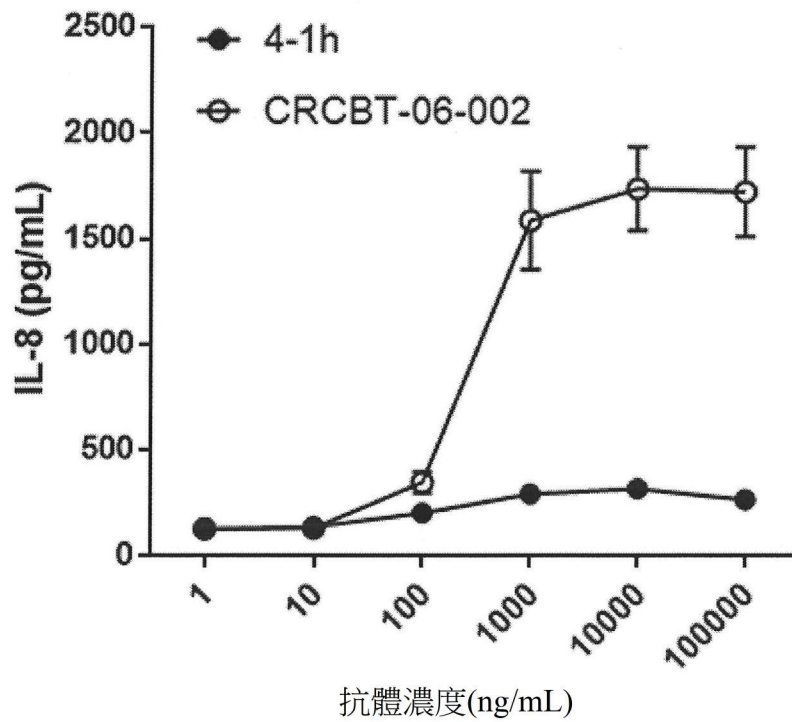
【第19項】

一種如請求項1至10中任一項之抗人類Fn14抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造癌症惡病質之預防或治療用醫藥組合物。

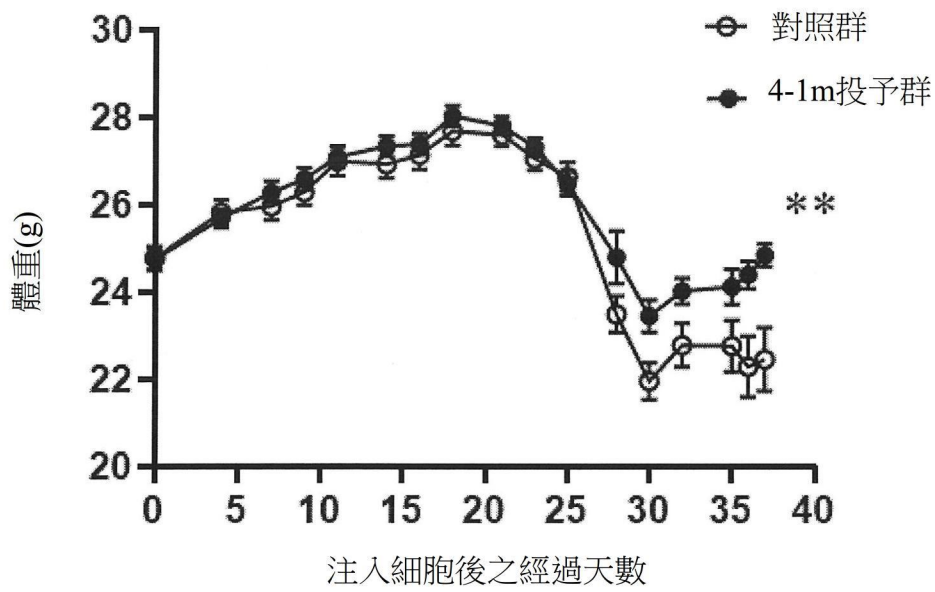
【發明圖式】



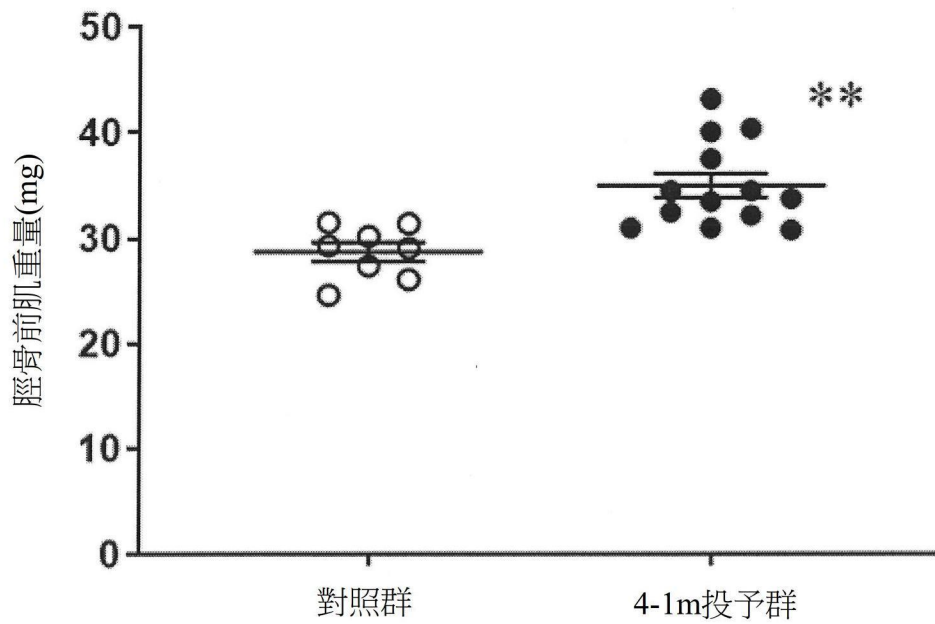
【圖1】



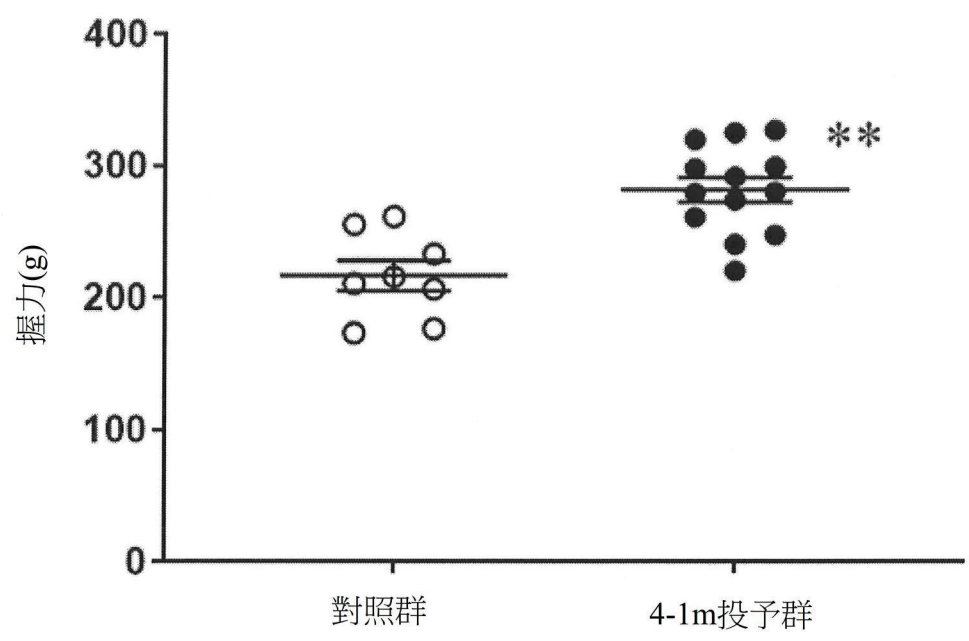
【圖2】



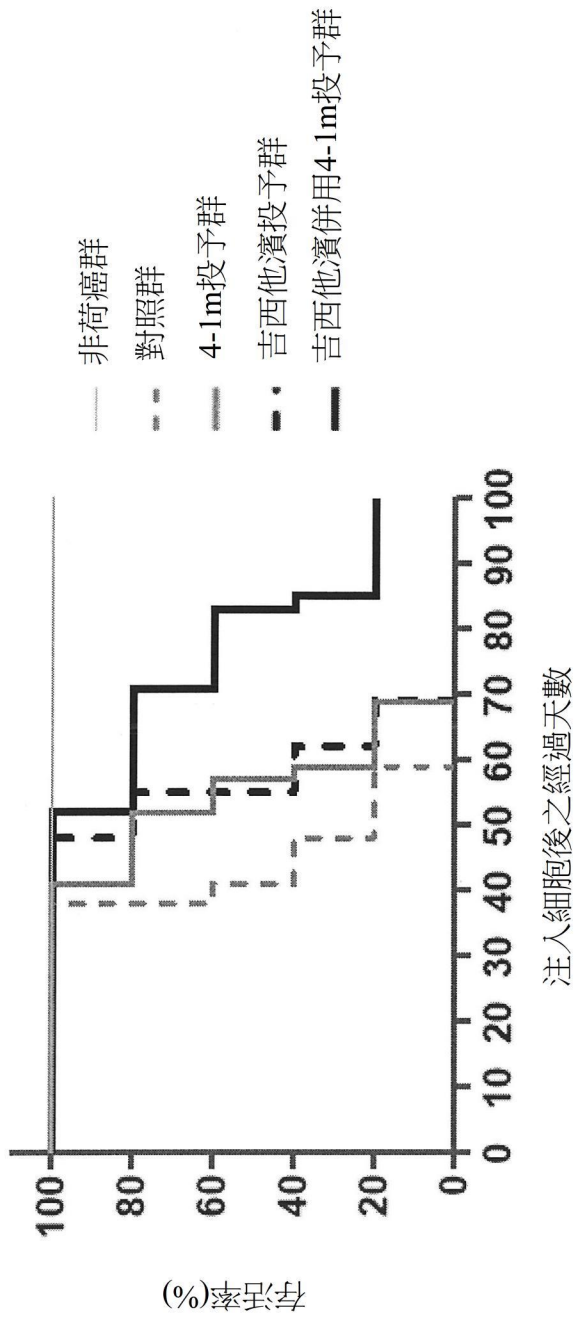
【圖3】



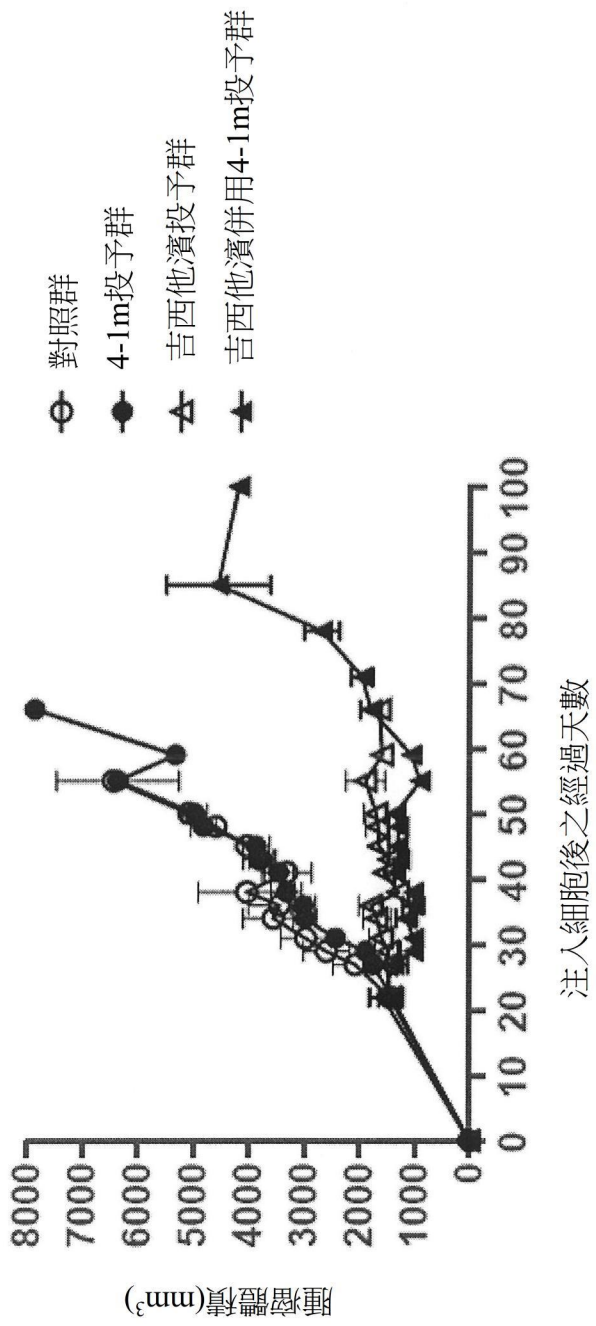
【圖4】



【圖5】



【圖6】



【圖7】