

明 細 書

発明の名称：抗ヒトFn14抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗ヒトFn14抗体に関する。

背景技術

[0002] 悪液質（cachexia）は基礎疾患に関連して生ずる複合的代謝異常の症候群であり、脂肪量の減少の有無に関わらず筋肉量の減少を特徴とする疾患である。臨床症状として成人では体重減少、小児では成長障害がみられる（非特許文献1）。進行性がん患者では約80%に悪液質が認められ、がん悪液質と称される。悪液質は、治療抵抗性によって患者の予後や生活の質（Quality of life；QOL）を低下させるだけでなく、死亡率の上昇に関連している。しかしながら、悪液質に対して効果的な治療薬は存在していない。悪液質の発生機序は不明な点が多いが、近年、悪液質は種々のサイトカインを介する全身の炎症状態として捉えられるようになってきている（非特許文献2）。

[0003] 線維芽細胞増殖因子誘導性14（Fibroblast growth factor-inducible 14；Fn14）（TNFRSF12Aとも称する）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの一員である。また、Fn14は、TNF様アポトーシス弱誘導因子（TNF-like weak inducer of apoptosis；Tweak）と結合し、Tweak受容体としても知られている。Tweak依存的又は非依存的なFn14の活性化は、NFκBシグナル伝達経路を活性化し、細胞の増殖、移動、分化、及び、アポトーシス、並びに血管新生、組織損傷、再生に関与する炎症を制御することが知られている（非特許文献3）。

[0004] がんとの関連としては、種々の固形がんにおいてFn14が過剰発現していること（非特許文献4）、及びFn14が腫瘍の進行や転移に関与していることが報告されている（非特許文献5）。また、マウスがん悪液質モデル

においては抗F n 1 4 抗体が悪液質の症状の改善に有効であり、その作用は腫瘍におけるF n 1 4 阻害によることが報告されている（非特許文献6）。

[0005] 一方で、F n 1 4 の活性化は炎症性サイトカインの産生を惹起し、炎症状態を悪化させる可能性がある。ヒトF n 1 4 に対するアゴニスト抗体として、臨床開発が進められているE n a v a t u z u m a b（特許文献1）が報告されているが、E n a v a t u z u m a bは第Ⅰ相臨床試験において肝毒性が報告されており（非特許文献7）、E n a v a t u z u m a b処置により惹起された炎症による可能性が示唆されている（非特許文献8）。

[0006] ヒトF n 1 4 に結合してアンタゴニスト活性を有し、かつ、特定の条件下においてアゴニスト活性を有さない抗体としては、マウスモノクローナル抗体C R C B T－0 6－0 0 2が報告されている（特許文献2）。C R C B T－0 6－0 0 2は、ヒト悪性黒色腫由来細胞株A 3 7 5細胞でのT w e a k 刺激によるⅠ L－8 産生を阻害するアンタゴニスト活性、及び、マウスがん悪液質モデルにおける有効性が報告されている。しかし、T w e a k 非存在下でA 3 7 5細胞からのⅠ L－8 産生を誘導するアゴニスト活性は残存している（特許文献2）。

[0007] アゴニスト活性を有さず、望ましくない副作用を回避することができる、抗F n 1 4 アンタゴニスト抗体は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2 0 0 9／0 2 0 9 3 3号

特許文献2：国際公開第2 0 1 3／0 2 6 0 9 9号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：E v a n s W J et al.、C l i n N u t r. 2 0 0 8、V o l. 2 7、p. 7 9 3－7 9 9

非特許文献2：B a r a c o s V E et al.、N a t R e v D i s P r i m e r s. 2 0 1 8、V o l. 4 A r t i c l e n u m b e r 1 7 1 0 5、p. 1－1 8

非特許文献3: Winkles JA、Nat Rev Drug Discov. 2008、Vol. 7、p. 411-425

非特許文献4: Culp PA et al.、Clin Cancer Res. 2010、Vol. 16、p. 497-508

非特許文献5: Hu G et al.、Tumor Biol. 2017、Vol. 39 June、p. 1-9

非特許文献6: Johnston AJ et al.、Cell. 2015、Vol. 162、p. 1365-1378

非特許文献7: Lam ET et al.、Mol Cancer Ther. 2018、Vol. 17、p. 215-221

非特許文献8: Choi D et al.、Am J Pharmacol Toxicol. 2017、Vol. 12、p. 18-38

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明の課題は、高いアンタゴニスト活性を保持しつつ、従来の抗体よりもアゴニスト活性を低減した、安全性に優れた抗ヒトFn14抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、抗ヒトFn14抗体の作製において相当の創意検討を重ねた結果、配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号98から114までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域、並びに配列番号4のアミノ酸番号24から40までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号56から62までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4のアミノ酸番号95から103までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体を作製した（実施例2～4）。この抗体が、ヒトFn14に結合し（実施例6）、Tweak刺激に

よるNFκBの活性化及びIL-8の産生を阻害すること（実施例7及び8）、並びにTweak非存在下においてIL-8産生を誘導しないこと（実施例8）を見出した。これらの結果、アンタゴニスト活性を有しつつ、アゴニスト活性を有さない抗ヒトFn14抗体を提供し、本発明を完成した。さらには、上記抗体をマウス化した（実施例4）抗体が、マウスがん悪液質モデルにおいて、体重及び筋量の減少を抑制すること（実施例9）、並びにゲムシタピンと抗体との併用下で、抗体単独投与又はゲムシタピン単独投与に比べて生存期間を延長すること（実施例10）を見出した。

[0012] 本発明によれば、例えば、以下の発明が提供される。

[1]

配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号98から114までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域、並びに、配列番号4のアミノ酸番号24から40までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号56から62までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4のアミノ酸番号95から103までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。

[2]

以下の（1）及び（2）から選択される、[1]に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント：

（1）配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント；並びに

（2）上記（1）の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの翻訳後修飾により生じた抗体又はその抗原結合フラグメント。

[3]

配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、[2]に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。

[4]

翻訳後修飾が、重鎖可変領域N末端のピログルタミル化及び／又は重鎖C末端のリジン欠失である、[2]に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。

[5]

配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、[2]に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。

[6]

以下の(3)及び(4)から選択される、[2]に記載の抗ヒトFn14抗体：

(3) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトFn14抗体；並びに

(4) 上記(3)の抗体の翻訳後修飾により生じた抗体である、抗ヒトFn14抗体。

[7]

配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、[6]に記載の抗ヒトFn14抗体。

[8]

翻訳後修飾が、重鎖N末端のピログルタミル化及び／又は重鎖C末端のリジン欠失である、[6]に記載の抗ヒトFn14抗体。

[9]

配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 4 5 4 までのアミノ酸配列からなる重鎖であって、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖、及び、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、[8] に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体。

[1 0]

一本鎖可変領域フラグメント、F a b、F a b'、又は F (a b')₂である、[1] ~ [5] のいずれかに記載の抗原結合フラグメント。

[1 1]

[3] に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[1 2]

[3] に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[1 3]

[1 1] 及び／又は [1 2] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[1 4]

以下の (a) ~ (d) からなる群より選択される、宿主細胞：

(a) [3] に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) [3] に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；

(c) [3]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) [3]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[1 5]

以下の(e)～(h)からなる群より選択される、宿主細胞：

(e) [7]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(f) [7]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；

(g) [7]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(h) [7]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[1 6]

以下の(A)～(C)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程を包含する抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法：

(A) [3]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(B) [3]に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの

重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；並びに

(C) [3] に記載の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[17]

以下の(D)～(F)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトF n 1 4 抗体を発現させる工程を包含する、抗ヒトF n 1 4 抗体を生産する方法：

(D) [7] に記載の抗ヒトF n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(E) [7] に記載の抗ヒトF n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；並びに

(F) [7] に記載の抗ヒトF n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、該抗ヒトF n 1 4 抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[18]

[16] に記載の方法で生産された抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント。

[19]

[17]に記載の方法で生産された抗ヒトFn14抗体。

[20]

[1]～[10]、[18]、及び[19]のいずれかに記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント、並びに薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[21]

[3]に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント、[5]に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[22]

[7]に記載の抗ヒトFn14抗体、[9]に記載の抗ヒトFn14抗体、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[23]

がん悪液質の予防又は治療用医薬組成物である、[20]～[22]のいずれかに記載の医薬組成物。

[24]

[1]～[10]、[18]、及び[19]のいずれかに記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの治療有効量を投与する工程を含む、がん悪液質を予防又は治療する方法。

[25]

がん悪液質の予防又は治療に使用するための、[1]～[10]、[18]、及び[19]のいずれかに記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。

[26]

がん悪液質の予防又は治療用医薬組成物の製造における、[1]～[10]、[18]、及び[19]のいずれかに記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。

[27]

[1] ~ [10]、[18]、及び[19]のいずれかに記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含む、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物であって、かつ抗がん剤と併用されるものである、医薬組成物。

[28]

抗がん剤を含む、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物であって、[1] ~ [10]、[18]、及び[19]のいずれかに記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントと併用されるものである、医薬組成物。

発明の効果

[0013] 本発明の抗ヒトFn14抗体は、ヒトFn14に対するアゴニスト活性を示さずに、Tweak刺激によるヒトFn14の活性化を阻害することによって、炎症抑制作用を有するものであり、がん悪液質の予防又は治療剤として使用できる可能性がある。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] A375細胞におけるTweak刺激による炎症性サイトカインIL-8産生に対する抗ヒトFn14抗体の阻害効果を示す。縦軸は阻害率(%)、横軸は抗体濃度(ng/mL)を示す。

[図2] A375細胞における抗ヒトFn14抗体刺激誘導によるIL-8の分泌作用を示す。縦軸はIL-8濃度(pg/mL)、横軸は抗体濃度(ng/mL)を示す。

[図3] マウス結腸癌細胞株C26細胞をマウスに移植することによって惹起される体重減少に対するマウス化抗ヒトFn14抗体4-1mの阻害作用を示す。縦軸は体重(g)を、横軸はがん細胞注入後の経過日数を示す。

[図4] マウス結腸癌細胞株C26細胞をマウスに移植することによって惹起される筋量減少に対するマウス化抗ヒトFn14抗体4-1mの阻害作用を示す。縦軸は前脛骨筋の重量(mg)を示す。

[図5] マウス結腸癌細胞株C26細胞をマウスに移植することによって惹起さ

れる筋機能低下に対するマウス化抗ヒトF n 1 4 抗体4 - 1 mの阻害作用を示す。縦軸は握力（g）を示す。

[図6]マウス結腸癌細胞株C 2 6細胞を移植したマウスの生存期間に対するマウス化抗ヒトF n 1 4 抗体4 - 1 mのゲムシタピンとの併用効果を示す。縦軸は生存率（％）を、横軸はがん細胞注入後の経過日数を示す。

[図7]マウス結腸癌細胞株C 2 6細胞をマウスに移植することによって形成される腫瘍の体積に対するマウス化抗ヒトF n 1 4 抗体4 - 1 mのゲムシタピンとの併用効果を示す。縦軸は腫瘍体積（mm³）を、横軸はがん細胞注入後の経過日数を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 以下に、本発明について詳述する。

[0016] 抗体にはI g G、I g M、I g A、I g D及びI g Eの5つのクラスが存在する。抗体分子の基本構造は、各クラス共通で、分子量5万～7万の重鎖と2万～3万の軽鎖から構成される。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、I g G、I g M、I g A、I g D、I g Eに対応してI g γ、I g μ、I g α、I g δ、I g εとよばれる。さらにI g Gには、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4のサブクラスが存在し、それぞれに対応する重鎖はI g γ 1、I g γ 2、I g γ 3、I g γ 4とよばれている。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、L型とK型の2種が知られており、それぞれI g λ、I g κとよばれる。抗体分子の基本構造のペプチド構成は、それぞれ相同な2本の重鎖及び2本の軽鎖が、ジスルフィド結合（S - S結合）及び非共有結合によって結合され、分子量15万～19万である。2種の軽鎖は、どの重鎖とも対をなすことができる。個々の抗体分子は、常に同一の軽鎖2本と同一の重鎖2本からできている。

[0017] 鎖内S - S結合は、重鎖に四つ（I g μ、I g εには五つ）、軽鎖には二つあって、アミノ酸100～110残基ごとに一つのループを成し、この立体構造は各ループ間で類似していて、構造単位又はドメインとよばれる。重

鎖、軽鎖ともにN末端に位置するドメインは、同種動物の同一クラス（サブクラス）からの標品であっても、そのアミノ酸配列が一定せず、可変領域とよばれており、各ドメインは、それぞれ、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）とよばれている。可変領域よりC末端側のアミノ酸配列は、各クラス又はサブクラスごとにほぼ一定で定常領域とよばれている（各ドメインは、それぞれ、CH1、CH2、CH3又はCLと表される）。

[0018] 抗体の抗原結合部位はVH及びVLによって構成され、結合の特異性はこの部位のアミノ酸配列によっている。一方、補体や各種Fc受容体発現細胞との結合といった生物学的活性は各クラスIgの定常領域の構造の差を反映している。軽鎖と重鎖の可変領域の可変性は、どちらの鎖にも存在する3つの小さな超可変領域にほぼ限られることがわかっており、これらの領域を相補性決定領域（CDR；それぞれN末端側からCDR1、CDR2、CDR3）とよばれている。可変領域の残りの部分はフレームワーク領域（FR）とよばれ、比較的一定である。

[0019] 抗体のVH及びVLを含む各種抗原結合フラグメントも抗原結合活性を有し、このような代表的な抗原結合フラグメントとして、一本鎖可変領域フラグメント（scFv）、Fab、Fab'、F(ab')₂が挙げられる。scFvは、リンカーで連結されたVHとVLから構成される、一価の抗体フラグメントであり、Fabは、軽鎖と、VH、CH1ドメインとヒンジ領域の一部とを含む重鎖フラグメントから構成される、一価の抗体フラグメントである。Fab'は、軽鎖と、VH、CH1ドメインとヒンジ領域の一部とを含む重鎖フラグメントから構成される、一価の抗体フラグメントであり、このヒンジ領域の部分には重鎖間S-S結合を構成していたシステイン残基が含まれる。F(ab')₂フラグメントは、2つのFab'フラグメントがヒンジ領域中の重鎖間S-S結合で結合した二価の抗体フラグメントである。

[0020] <本発明の抗ヒトFn14抗体>

本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントには、以下の

特徴を有する抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントが含まれる。

配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号98から114までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域、並びに配列番号4のアミノ酸番号24から40までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号56から62までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4のアミノ酸番号95から103までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。

[0021] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントである。

[0022] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントは、上記の特徴を有し、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域をさらに含む。定常領域としては、どのようなサブクラスの定常領域（例えば、重鎖としてIg γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3又はIg γ 4、軽鎖としてIg λ 又はIg κ の定常領域）も選択可能であり得る。1つの実施形態において、本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントは、重鎖定常領域としてヒトIg γ 1定常領域、軽鎖定常領域としてヒトIg κ 定常領域を含む。

[0023] 本明細書中で使用される抗体の定常領域におけるアミノ酸変異導入に関する残基番号については、EUインデックス（Kabataら，1991，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Ins

t i t u t e o f H e a l t h , B e t h e s d a) に従う。L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A とは、ヒト I g γ 1 定常領域における K a b a t らの E U インデックスに従うアミノ酸 2 3 4 位及び 2 3 5 位のロイシンのアラニンでの置換である。L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A のアミノ酸変異を有するヒト I g γ 1 定常領域としては、例えば、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 2 6 から 4 5 5 までのアミノ酸配列からなるヒト I g γ 1 定常領域が挙げられる。

[0024] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒト F n 1 4 抗体である。

[0025] 抗体を細胞で発現させる場合、抗体が翻訳後に修飾を受けることが知られている。翻訳後修飾の例としては、カルボキシペプチダーゼによる重鎖 C 末端のリジンの欠失、重鎖及び軽鎖 N 末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾、グリコシル化、酸化、脱アミド化、糖化等が挙げられ、種々の抗体において、このような翻訳後修飾が生じることが知られている (L i u H e t a l . , J P h a r S c i . 2 0 0 8 , V o l . 9 7 N o . 7 , p . 2 4 2 6 - 2 4 4 7) 。

[0026] 本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントには、翻訳後修飾を受けた抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントも含まれる。翻訳後修飾を受けた本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの例としては、重鎖可変領域 N 末端のピログルタミル化及び／又は重鎖 C 末端のリジン欠失を受けた抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントが挙げられる。このような N 末端のピログルタミル化又は C 末端リジン欠失による翻訳後修飾が抗体の活性に影響を及ぼすものではないことは当該分野で知られている (L y u b a r s k a y a Y e t a l . , A n a l B i o c h e m . 2 0 0 6 , V o l . 3 4 8 , p . 2 4 - 3 9) 。

[0027] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 1 2 5 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 1 1 4 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変

領域を含む抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの翻訳後修飾により生じた抗体又はその抗原結合フラグメントである。また、1つの実施形態において当該翻訳後修飾は、重鎖可変領域N末端のピログルタミル化及び／又は重鎖C末端のリジン欠失である。

[0028] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域、及び、配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントある。

[0029] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトF n 1 4 抗体の翻訳後修飾により生じた抗体であり、翻訳後修飾が、重鎖N末端のピログルタミル化及び／又は重鎖C末端のリジン欠失である、抗ヒトF n 1 4 抗体である。

[0030] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体は、配列番号2のアミノ酸番号1から454までのアミノ酸配列からなる重鎖であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖、及び、配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトF n 1 4 抗体である。

[0031] 1つの実施形態において、本発明の抗原結合フラグメントは、s c F v、F a b、F a b'、又はF (a b')₂である。

[0032] 当業者であれば、本発明に基づいて、抗体又はその抗原結合フラグメントと他のペプチドや蛋白質との融合体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾体を作製することも可能であり、これらの形態の抗体又はその抗原結合フラグメントも本発明の抗体に含まれる。融合に用いられる他のペプチドや蛋白質は、融合体がF n 1 4 に結合する限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、各種タグペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マ

ルトース結合蛋白質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチド又は蛋白質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、修飾体がF n 1 4 に結合する限り特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リポソーム、低分子化合物等が挙げられる。

[0033] 1つの実施形態において、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントの修飾に用いられる修飾剤はポリエチレングリコールである。

[0034] 本明細書における「抗ヒトF n 1 4 抗体」とは、ヒトF n 1 4 に結合する抗体を意味する。ヒトF n 1 4 に結合するか否かは、公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。結合活性を測定する方法としては、例えば、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 等の方法が挙げられる。ELISAを用いる場合は、例えば、ヒトF n 1 4 蛋白質をELISAプレートに固相化し、これに対して被験抗体を添加して反応させた後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 等の酵素で標識した抗IgG抗体等の二次抗体を反応させる。反応後、洗浄した後、その活性を検出する試薬 (例えば、HRP標識の場合、TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories 社、50-76-03)) 等を用いた活性測定により、二次抗体の結合を同定することで、被験抗体がヒトF n 1 4 に結合するか否かを確認することができる。具体的な評価方法としては、後記実施例6に記載されるような方法を用いることができる。

[0035] 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体には、ヒトF n 1 4 に結合する抗体であれば、ヒトF n 1 4 への結合に加え、他の動物由来のF n 1 4 (例えば、マウスF n 1 4) にも結合する抗体も含まれる。

[0036] 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントは、本明細書に開示される、本発明の抗体の重鎖及び軽鎖の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の

抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントは、特に限定されるものではないが、例えば、後述の＜本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体を生産する方法及び該方法により生産された抗ヒト F n 1 4 抗体＞に記載の方法に従い製造することができる。

[0037] 本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントは、必要によりさらに精製された後、定法に従って製剤化され、過剰な血管新生等の炎症性疾患、体重喪失、筋肉消耗、及び、悪液質等の消耗性疾患の予防又は治療に用いることができる。

[0038] ＜本発明のポリヌクレオチド＞

本発明のポリヌクレオチドには、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。

[0039] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0040] 配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列に示される重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1の塩基番号1から375までの塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0041] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0042] 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0043] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号4のアミノ酸番号1から1 1 4までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0044] 配列番号4のアミノ酸番号1から1 1 4までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号3の塩基番号1から3 4 2までの塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0045] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトF n 1 4抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0046] 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号3に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0047] 本発明のポリヌクレオチドは、その塩基配列に基づき、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、WO 9 0 / 0 7 8 6 1に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種々の方法が使用され得る。

[0048] <本発明の発現ベクター>

本発明の発現ベクターには、本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び／又は本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターが含まれる。

[0049] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターとしては、本発明の抗ヒト

F n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、又は本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドと該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとを含む発現ベクターが挙げられる。

[0050] 本発明のポリヌクレオチドを発現させるために用いる発現ベクターとしては、真核細胞（例えば、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母）及び／又は原核細胞（例えば、大腸菌）の各種の宿主細胞中で本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び／又は本発明の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを発現し、これらによりコードされるポリペプチドを産生できるものである限り、特に制限されるものではない。このような発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等が挙げられ、例えば、p E E 6. 4 や p E E 1 2. 4 を使用することができる。また、A G - γ 1 や A G - κ （例えば、W O 9 4 / 2 0 6 3 2 を参照）等の予めヒト I g 定常領域遺伝子を有する発現ベクターに可変領域遺伝子断片を導入して抗体遺伝子を発現することもできる。

[0051] 本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。動物細胞で本発明のポリヌクレオチドを発現させるためのプロモーターとしては、例えば、C M V、R S V、S V 4 0 などのウイルス由来プロモーター、アクチンプロモーター、E F (e l o n g a t i o n f a c t o r) 1 α プロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。細菌（例えば、エシェリキア属菌）で発現させるためのプロモーターとしては、例えば、t r p プロモーター、l a c プロモーター、 λ P L プロモーター、t a c プロモーターなどが挙げられる。また、酵母で発現させるためのプロモーターとしては、例えば、G A L 1 プロモーター

一、GAL10プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが挙げられる。

[0052] 宿主細胞として動物細胞、昆虫細胞、又は酵母を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン及び終止コドンを含み得る。この場合、本発明の発現ベクターは、エンハンサー配列、本発明の抗体又はその重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域をコードする遺伝子の5'側及び3'側の非翻訳領域、分泌シグナル配列、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、あるいは複製可能単位などを含んでいてもよい。宿主細胞として大腸菌を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域、及び複製可能単位を含み得る。この場合、本発明の発現ベクターは、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでいてもよい。

[0053] <本発明の形質転換された宿主細胞>

本発明の形質転換された宿主細胞としては、本発明の抗ヒトFn14抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、並びに、本発明の抗ヒトFn14抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞が挙げられる。

[0054] 1つの実施形態において、本発明の形質転換された宿主細胞には、以下の（a）～（d）からなる群より選択される、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれる。

（a）本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；

(c) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0055] 1つの実施形態において、本発明の形質転換された宿主細胞は、以下の(e)～(h)からなる群より選択される、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれる。

(e) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(f) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；

(g) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(h) 本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0056] 形質転換する宿主細胞としては、使用する発現ベクターに適合し、該発現ベクターで形質転換されて、抗体を発現することができるものである限り、特に限定されるものではない。形質転換する宿主細胞としては、例えば、本

発明の技術分野において通常使用される天然細胞又は人工的に樹立された細胞など種々の細胞（例えば、動物細胞（例えば、CHO-K1SV細胞）、昆虫細胞（例えば、Sf9）、細菌（エシェリキア属菌など）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）など）が挙げられ、例えば、CHO細胞（CHO-K1SV細胞、CHO-DG44細胞等）、293細胞、NS0細胞等の培養細胞を使用することができる。

[0057] 宿主細胞を形質転換する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等を用いることができる。

[0058] <本発明の抗ヒトFn14抗体を生産する方法及び該方法により生産された抗ヒトFn14抗体>

本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法には、以下の（A）～（C）からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程を包含する、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法が含まれる。

（A）本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（B）本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；並びに

（C）本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽

鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0059] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトF n 1 4抗体を生産する方法には、以下の（D）～（F）からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトF n 1 4抗体を発現させる工程を包含する、抗ヒトF n 1 4抗体を生産する方法が含まれる。

（D）本発明の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（E）本発明の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；並びに

（F）本発明の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0060] 本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程を包含している限り、特に限定されるものではない。1つの実施形態において、該方法で使用される宿主細胞としては、前述の（A）及び（D）の宿主細胞が挙げられる。

[0061] 形質転換された宿主細胞の培養は公知の方法により行うことができる。培養条件、例えば、温度、培地のpH、及び培養時間は、適宜選択される。宿主細胞が動物細胞の場合、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（Eagle H、Science.1959、Vol. 130 No. 3373、p. 432-437）、DMEM培地（Dulbecco R and Freeman G、Virology.1959、

Vol. 8、p. 396-397)、RPMI 1640培地(Moore GE et al.、J Am Med Assoc. 1967、Vol. 199、p. 519)、199培地(Morgan JF et al.、Proc Soc Exp Biol Med. 1950、Vol. 73、p. 1-8)等を用いることができる。培地のpHは約6~8であるのが好ましく、培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約30~40℃で約15~336時間行われる。宿主細胞が昆虫細胞の場合、培地としては、例えば、胎児牛血清を含むGrace's培地(Smith GE et al.、Proc Natl Acad Sci USA. 1985、Vol. 82、p. 8404)等を用いることができる。培地のpHは約5~8であるのが好ましく、培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約20~40℃で約15~100時間行われる。宿主細胞が大腸菌又は酵母である場合、培地としては、例えば、栄養源を含有する液体培地が適当である。栄養培地は、形質転換された宿主細胞の生育に必要な炭素源、無機窒素源又は有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源又は有機窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが挙げられる。所望により他の栄養素(例えば、無機塩(例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類など)、抗生物質(例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等)を含んでいてもよい。培地のpHは約5~8であるのが好ましい。宿主細胞が大腸菌の場合、好ましい培地としては、例えば、LB培地、M9培地(Mol. Clo.、Cold Spring Harbor Laboratory、2001、Vol. 3、A2. 2)等を用いることができる。培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約14~39℃で約3~24時間行われる。宿主細胞が酵母の場合、培地としては、例えば、Burkholder最小培地(Bostian KA et al

、Proc Natl Acad Sci USA, 1980, Vol. 77, p. 4504-4508)等を用いることができる。培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約20～35℃で約14～144時間行われる。上述のような培養により、本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させることができる。

[0062] 本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程に加えて、さらには、該形質転換された宿主細胞及び/又は培養上清から抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを回収、例えば単離又は精製する工程を含むことができる。単離又は精製方法としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。例えば、培養上清中に蓄積された抗体は、各種クロマトグラフィー、例えば、プロテインAカラム又はプロテインGカラムを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製することができる。

[0063] 本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントには、本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法で生産された抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントも含まれる。

[0064] <本発明の医薬組成物>

本発明の医薬組成物には、本発明の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が含まれる。本発明の医薬組成物は、当該分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤

、点滴用剤等の非経口剤が挙げられ、静脈内投与、皮下投与、及び筋肉内投与等により投与することができる。製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。

[0065] 本発明の医薬組成物は、複数種の本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを含み得る。例えば、翻訳後修飾を受けていない抗体又はその抗原結合フラグメント、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの翻訳後修飾により生じた抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

[0066] 1つの実施形態において、抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する本発明の医薬組成物には、下記に記載の医薬組成物も含まれる。

配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメント、並びに、該抗体又はその抗原結合フラグメントの翻訳後修飾により生じた抗体又はその抗原結合フラグメントである、抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する医薬組成物。

[0067] 本発明の医薬組成物には、重鎖C末端リジンの欠失抗体、N末端翻訳後修飾を受けた抗体又はその抗原結合フラグメント、重鎖C末端リジンを欠失しN末端翻訳後修飾を受けた抗体、及び／又は重鎖C末端リジンを有しN末端翻訳後修飾を受けていない抗体を含有する医薬組成物も含まれる。

[0068] 1つの実施形態において、抗ヒトF n 1 4抗体を含有する本発明の医薬組成物には、下記(5)～(8)のうち2種以上の抗ヒトF n 1 4抗体を含有する医薬組成物も含まれる。

(5) 配列番号2のアミノ酸番号1から454までのアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトF n 1 4抗体。

(6) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトF n 1 4抗体。

(7) 配列番号2のアミノ酸番号1から454までのアミノ酸配列からなる重鎖であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトF n 1 4抗体。

(8) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトF n 1 4抗体。

[0069] 1つの実施形態において、抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する本発明の医薬組成物には、下記に記載の医薬組成物も含まれる。配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトF n 1 4抗体、配列番号2のアミノ酸番号1から454までのアミノ酸配列からなる重鎖であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトF n 1 4抗体、並びに、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[0070] 上記製剤化に当たっての本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいは抗体の結合力価等により異なるが、例えば、投与時に0.001mg/kg～100mg/kg程度となるように用いることができる。

[0071] 本発明の医薬組成物は、活性型ヒトF n 1 4が病態形成に関与する疾患、例えば、がん悪液質の予防又は治療剤として用いることができる。

[0072] 本発明には、本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、がん悪液質の予防又は治療用医薬組成物が含まれる。また、本発明には、本発明の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの治療有効量を投与する工程を包含する、がん悪液質を治療又は予防する方法が含ま

れる。また、本発明には、がん悪液質の予防又は治療に使用するための、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントが含まれる。さらに、本発明には、がん悪液質の予防又は治療用医薬組成物製造における、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの使用が含まれる。

[0073] 本発明は、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物であって、かつ抗がん剤と併用されるものである、医薬組成物を提供する。本発明は、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント及び抗がん剤の有効量を投与する工程を包含する、がん又はがん悪液質の予防又は治療する方法を提供する。本発明は、がん又はがん悪液質の予防又は治療に使用するための、抗がん剤と併用されるものである、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。本発明は、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物製造における、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの使用であって、該医薬組成物が抗がん剤と併用されるものである、使用を提供する。

[0074] また、本発明は、抗がん剤を含む、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物であって、かつ本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントと併用されるものである、医薬組成物を提供する。本発明は、がん又はがん悪液質の予防又は治療に使用するための、本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントと併用されるものである、抗がん剤を提供する。本発明は、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物製造における、抗がん剤の使用であって、該医薬組成物が本発明の抗ヒトF n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントと併用されるものである、使用を提供する。

[0075] 1つの実施形態において、本発明において使用される抗がん剤は、ゲムシタビンである。

[0076] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提

供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0077] 市販のキット又は試薬等を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコールに従って実験を行った。

[0078] (実施例1：ヒト及びマウスFn14-Fc融合タンパク質の取得)

本発明者らは、抗Fn14抗体を取得するための抗原及びスクリーニング試験に用いる材料として使用するため、ヒトFn14-ヒトFc融合タンパク質及びマウスFn14-マウスFc融合タンパク質を作製した。ヒトFn14-ヒトFc融合タンパク質は、ヒトFn14配列の細胞外部分配列(NCBIアクセッション番号：NP_057723.1の1番目から79番目のアミノ酸)のC末端と、ヒトFc領域(NCBIアクセッション番号：P01857.1の106番目から330番目のアミノ酸)のN末端をペプチドリinker(配列番号9)で連結した融合タンパク質である。また、マウスFn14-マウスFc融合タンパク質は、マウスFn14配列の細胞外部分配列(NCBIアクセッション番号：AAF07882.1の1番目から75番目のアミノ酸)のC末端と、マウスFc領域のN末端を連結した融合タンパク質であり、具体的にはマウスFn14配列の細胞外部分配列をコードする遺伝子をpFUSE-mIgG2B-Fc1(In vivoGen社、pfuse-mg2bfc1)のhEF1-HTLVプロモーター領域とmIgG2B-Fc領域の間のマルチクロニングサイトに制限酵素EcoRIとEcoRVを用いて組み込み、発現させた融合タンパク質である。GSベクターpEE12.4(Lonza社)に前述の融合タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターをそれぞれ作製し、CHO-K1SV細胞(Lonza社)にそれぞれ導入した。当該CHO-K1SV細胞の培養上清から、定法に従い、ヒトFn14-ヒトFc融合タンパク質及びマウスFn14-マウスFc融合タンパク質をそれぞれ精製した。

[0079] (実施例2：抗ヒトFn14抗体の取得)

ヒトモノクローナル抗体開発技術「ベロシミュン」(VelocImmune antibody technology: Regeneron社(米国特許6596541号))マウスを用いて抗体を作製した。ベロシミュン技術により得られた抗体は、ヒト抗体の可変領域とマウス抗体の定常領域を有する抗体(キメラ抗体とも称する)である。ベロシミュンマウスに、免疫反応を惹起するアジュバントと共に、実施例1で作製したヒトFn14-ヒトFc融合タンパク質からFabRICATOR(Sigma社、77661)を用いてヒトFc領域を切断・除去したヒトFn14タンパク質を免疫した。定法に従い、免疫したマウスのリンパ節から採取したリンパ球を、マウス由来ミエローマ細胞SP2/O-Ag14(ATCC:CRL-1581)と細胞融合することでハイブリドーマを作製し、モノクローン化した。ヒトFn14に結合し、かつ、Tweak刺激によるNFkBの活性化(以下、後記実施例において、「Tweak誘導NFkB活性化」と称する)を抑制する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、培養上清から抗体を精製した。

[0080] (実施例3: NFkB活性化アッセイ)

実施例2で見出した抗体のヒトFn14に対するアゴニスト作用を評価するために、Tweak非存在下での抗体のNFkB活性化に対する作用を、レポーターアッセイで評価した。具体的には、NFkB転写応答配列が組み込まれたルシフェラーゼレポーターベクターpGL4.32(Promega社、E8491)を安定的に導入したHEK293細胞(ATCC、CRL-1573)(以下、NFkB/HEK293細胞と称する)を作製し、評価に用いた。

[0081] NFkB/HEK293細胞を10%ウシ胎児血清含有DMEM(Sigma社、D6429)で 1.25×10^5 cells/mLに懸濁し、クリアボトム白色96ウェルプレート(Corning社、3610)に1ウェルあたり80 μ L播種した。37℃、5%CO₂に設定したCO₂インキュベーターで2時間培養後、実施例2で得た精製抗体について、最終濃度1 ng/mL

Lから300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの約3倍公比で12段階の希釈系列を上記の培地で作製した後、1ウェルあたり20 μL 添加した。37℃、5%CO₂で一晩培養した後、ルシフェラーゼ測定試薬ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega社)を用いて、ルシフェラーゼ発現量を測定することにより、NF κ B活性化を定量化した。

[0082] その結果、NF κ B活性化を誘導しなかった、すなわちアゴニスト活性を示さなかった抗ヒトFn14抗体を選別し、4-1と命名した。

[0083] (実施例4：完全ヒト型抗体及びマウス化抗体の作製)

実施例3で選別した抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子をクローニングし、配列決定した。抗体の配列決定後、重鎖可変領域遺伝子の5'側にシグナル配列(Wittle *et al.*, Protein Engineering, 1987, Vol. 1 No. 6, p. 499-505)をコードする遺伝子を、そして3'側にL234A及びL235Aのアミノ酸変異を有するヒトIg γ 1定常領域遺伝子(配列番号1の塩基番号376番目から1365番目までの塩基配列からなる)をそれぞれ繋げ、この重鎖遺伝子をGSベクターpEE6.4(Lonza社)に挿入した。また軽鎖可変領域遺伝子の5'側にはシグナル配列(Wittle *et al.*, Protein Engineering, 1987, Vol. 1 No. 6, p. 499-505)をコードする遺伝子を、そして3'側にヒト κ 鎖の定常領域遺伝子(配列番号3の塩基番号343番目から660番目までの塩基配列からなる)をそれぞれ繋げ、この軽鎖遺伝子をGSベクターpEE12.4に挿入した。これらのGSベクターをNotI-HFとPvuII-HFで制限酵素切断し、DNA Ligation Kit<Mighty Mix>(TaKaRa社、6023)を用いてライゲーションを行い、重鎖と軽鎖の両遺伝子が挿入されたGSベクターを構築した。このベクターをトランスフェクトしたCHO-K1SV細胞の培養上清から、定法に従い抗体を精製して4-1の完全ヒト型抗体を取得し、4-1hと命名した。

- [0084] 作製した4-1hの重鎖の塩基配列を配列番号1に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号2に、軽鎖の塩基配列を配列番号3に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号4にそれぞれ示す。配列番号2に示される重鎖の可変領域は、配列番号2のアミノ酸番号1番目から125番目までのアミノ酸配列からなり、配列番号4に示される軽鎖の可変領域は、配列番号4のアミノ酸番号1番目から114番目までのアミノ酸配列からなる。4-1hの重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3は、それぞれ、配列番号2の31～35番目、50～65番目、及び98～114番目のアミノ酸配列からなる。4-1hの軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3は、それぞれ、配列番号4の24～40番目、56～62番目、及び95～103番目のアミノ酸配列からなる。
- [0085] 抗ヒトFn14抗体をマウス*in vivo*試験で評価する際に、免疫原性リスクを減弱させるために、4-1hのマウス化抗体（以下、4-1mと称する）を作製した。4-1hの軽鎖及び重鎖のフレームワーク領域（FR）を部分的に他のマウス抗体のFRと置き換えて、4-1mの可変領域をコードする塩基配列を作製した。
- [0086] 上述の4-1hのベクター構築、抗体の発現及び精製と同様の方法を用いて、4-1mを取得した。但し、重鎖の定常領域にはD265Aアミノ酸変異を有するマウスIgγ2a定常領域遺伝子（配列番号5の塩基番号376番目から1365番目までの塩基配列からなる）をコードする遺伝子を、軽鎖の定常領域にはマウスκ鎖の定常領域遺伝子（配列番号7の塩基番号343番目から660番目までの塩基配列からなる）を用いた。
- [0087] 作製した4-1mの重鎖の塩基配列を配列番号5に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号6に、軽鎖の塩基配列を配列番号7に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。配列番号6に示される重鎖の可変領域は、配列番号6のアミノ酸番号1番目から125番目までのアミノ酸配列からなり、配列番号8に示される軽鎖の可変領域は、配列番号8のアミノ酸番号1番目から114番目までのアミノ酸配列からなる。

る。4-1 mの重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3は、それぞれ、配列番号6の31～35番目、50～65番目、及び98～114番目のアミノ酸配列からなる。4-1 mの軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3は、それぞれ、配列番号8の24～40番目、56～62番目、及び95～103番目のアミノ酸配列からなる。

[0088] (実施例5：完全ヒト型抗体のアミノ酸修飾分析)

精製した4-1 hのアミノ酸修飾分析をした結果、精製抗体の大部分において、重鎖N末端のピログルタミル化及びC末端のリジン欠失が生じていた。

[0089] (実施例6：完全ヒト型抗体及びマウス化抗体のヒト及びマウスFn14結合ELISA)

実施例4で取得した4-1 h及び4-1 mの、Fn14タンパク質に対する結合活性を評価した。実施例1で取得したヒトFn14-ヒトFc融合タンパク質及びマウスFn14-マウスFc融合タンパク質をリン酸バッファ-生理食塩水(PBS)にて1 µg/mLに希釈し、マキシソープ384ウェル透明プレート(Nunc社、464718)に1ウェルあたり15 µL添加し、一晚4℃でインキュベートすることで、固相化した。翌日固相液を除き、0.05%Tween-20含有トリス緩衝生理食塩水(TBST)で洗浄した。20%のBlocking One(ナカライテスク社、03953-95)を含むPBSを1ウェルあたり50 µL添加し、室温で1時間静置した後、TBSTで洗浄した。実施例4で取得した4-1 h又は4-1 mを、5%Blocking Oneを含むTBST(以下、希釈液と称する)を用いて、最高濃度30 µg/mLから12段階、4倍公比の希釈により、希釈系列を作製し、1ウェルあたり20 µL添加した。室温で1時間インキュベートした後、TBSTで洗浄した。2次抗体として、4-1 hには希釈液で5000倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒトカッパー軽鎖抗体(Southern Biotech社、2060-05)を、4-1 mには希釈液で4000倍希釈したホースラディッ

シュペルオキシダーゼ標識抗マウスカッパー軽鎖抗体 (Southern Biotech社、1050-05) を、1 ウェルあたり $20 \mu\text{L}$ 添加した。室温で1時間インキュベートした後、TBS-Tで洗浄し、TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories社、50-76-03) を添加して4-1 h評価時は3分間、4-1 m評価時は5分間静置した後、2 M硫酸を加えて反応を停止させ、 450 nm の吸光度をSpectraMax Paradigm (Molecular Devices社) で測定した。デュプリケートで試験を行い、 EC_{50} 値を4-パラメーターロジスティック曲線当てはめにより算出した。

[0090] この結果、実施例4で作製した4-1 h及び4-1 mが、ヒトFn14及びマウスFn14に対して結合活性を有することが確認された(表1)。

表1：4-1 h及び4-1 mのヒト及びマウスFn14に対する結合活性
[表1]

抗体名	$\text{EC}_{50} (\text{ng/mL})$	
	ヒト	マウス
4-1 h	30.4	23.2
4-1 m	18.2	16.5

[0091] (実施例7：完全ヒト型抗体のTweak誘導NFkB活性化阻害アッセイ)

実施例4で取得した4-1 hのFn14に対するアンタゴニスト活性を評価するために、Tweak誘導NFkB活性化阻害作用をレポーターアッセイで評価した。

[0092] 実施例3で作製したNFkB/HEK293細胞を10%ウシ胎児血清含有DMEMで $1.25 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ に懸濁し、クリアボトム白色96ウェルプレートに1ウェルあたり $80 \mu\text{L}$ 播種した。 37°C 、5% CO_2 で一晩培養後、実施例4で得た4-1 hについて、最終濃度 0.1 ng/mL から $10 \mu\text{g/mL}$ までの約3倍公比で11段階の希釈系列を前記培地で

作製した後、1ウェルあたり10 μ L添加した。37℃、5%CO₂で30分培養後、Tweak (Peprotech社、310-06)を最終濃度100ng/mLとなるよう10 μ L添加した。37℃、5%CO₂で5時間培養した後、実施例3の方法に従いNF κ B活性化を定量化した。抗体を含まない培地のみを添加した群をコントロール群として設定し、Tweak添加群を0%阻害、Tweak非添加群を100%阻害として、4-パラメーターロジスティック曲線当てはめにより50%阻害する抗体の濃度(IC₅₀値)を算出した。各抗体についてデュプリケートで実験し、3試行のIC₅₀値を幾何平均し、95%信頼区間を算出した(表2)。本試験では、比較抗体として、マウス抗ヒトFn14抗体CRCBT-06-002(特許文献2)を用いた。

[0093] その結果、4-1hはCRCBT-06-002よりも強いアンタゴニスト活性を有することが明らかとなった。

表2：4-1hのTweak誘導NF κ B活性化に対する阻害活性

[表2]

抗体名	IC ₅₀ (ng/mL) (95%信頼区間)
4-1h	41.5 (27.2-63.4)
CRCBT-06-002	115 (72.7-183)

[0094] (実施例8：完全ヒト型抗体のIL-8産生アッセイ)

実施例4で取得した4-1hの機能的活性を*in vitro* IL-8産生アッセイで評価した。A375細胞(ATCC、CRL-1619)を10%ウシ胎児血清含有DMEMで5 $\times$ 10⁴cells/mLに懸濁し、96ウェル平底プレート(IWAKI、3860-096)に1ウェルあたり100 μ L播種した。37℃、5%CO₂で一晩培養後、PBSで洗浄した。実施例4で取得した4-1hについて、最終濃度1ng/mLから100 μ

g/mLまでの10倍希釈系列を前記培地で作製し、細胞に添加した。最終濃度5 ng/mLのTweak存在下（アンタゴニスト活性評価）又は非存在下（アゴニスト活性評価）、37℃、5%CO₂で一晩培養後、培養上清を回収し、培養上清中のIL-8濃度をHuman IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA kit（R&D社、D8000C）を用いて測定した。アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性評価における最終容量は、それぞれ65 µL/ウェル及び100 µL/ウェルで実験した。本試験では、比較抗体として、CRCBT-06-002を用い、各抗体についてデュプリケートで実験した。

[0095] アンタゴニスト活性評価においては、抗体を含まない培地のみを添加した群をコントロール群として設定し、Tweak添加群を0%阻害、Tweak非添加群を100%阻害として、阻害率を算出した。4回のそれぞれの実験における最大阻害率の算術平均±標準誤差を表3に示す（表3）。アンタゴニスト活性のグラフを図1に、アゴニスト活性のグラフを図2に示す。

[0096] 表3及び図1で示すように、Tweak刺激によるIL-8産生に対し、4-1 hはほぼ完全な阻害活性を示すのに対し、CRCBT-06-002は部分的な阻害活性しか示さないことが明らかとなった。また、図2に示すように、CRCBT-06-002はTweak非存在下において抗体単独でIL-8産生を誘導したのに対し、本発明の4-1 hはIL-8産生をほとんど誘導しなかった。

[0097] 以上より、CRCBT-06-002はアゴニスト作用を有する部分的アンタゴニスト抗体であるのに対し、4-1 hはヒトFn14に対するアゴニスト作用が極めて弱い完全アンタゴニスト抗体であることが明らかとなった。

表3：4-1 h及びCRCBT-06-002のTweak刺激によるIL-8産生に対する阻害活性

[表3]

抗体名	最大阻害率 (%) 平均±標準誤差
4-1 h	96.4 ± 0.4
CRCBT-06-002	53.0 ± 6.8

[0098] (実施例9: マウスがん悪液質モデルにおける作用)

マウス結腸癌細胞株C26 (COLON 26) を担癌したマウスは、悪液質の特徴である体重減少及び筋量の低下を示す、代表的ながん悪液質モデルの一つである (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] BD Matrigel Matrix Basement membrane Phenol-red Free (BD、356237) を用いて 10^6 cells / 100 μ L に懸濁したC26細胞 (National Cancer Institute) を、雄性CD2F1マウス (日本チャールス・リバー社) の皮下に100 μ L 注入することによりC26担癌マウスを作製し、C26担癌マウスの体重が減少し始めたのを確認した後に、抗体投与を開始した。具体的には、細胞注入後25、28、30、32及び35日目にC26担癌マウスにPBSによって希釈した4-1 mを3 mg / kg (投与容量10 mL / kg) で皮下投与した。対照群にはアイソタイプコントロール抗体を同様の方法で投与した。アイソタイプコントロール抗体として、生体内に存在しない抗原であるKLH (keyhole limpet hemocyanin) に対するマウスIgG2a抗体を定法に従い取得して用いた。投与は各群15匹で開始し、実験終了日である37日目までに4-1 m投与群は2匹、対照群は7匹死亡した。

[0100] 実験終了前日 (36日目) に、小動物握力測定装置 (メルクエスト社、G

PM-100B)を用いて握力を測定した。37日目に体重を測定後、摘出した前脛骨筋の重量を筋量として測定した。36及び37日目に測定した各指標について、4-1m投与群及び対照群との間の有意差をStudentのt検定を用いて判定した。いずれの場合にも $p < 0.05$ の場合を有意とし、有意差がある場合グラフ中に印(*)を記載した(グラフ中の**は $p < 0.01$ で有意差があることを示す)。

[0101] 37日目まで継続的に測定した体重の変化を図3に示す。対照群では投与開始後も体重の減少が進行したが、4-1m投与群では体重減少が抑制され、37日目では対照群に比較して4-1m投与群で有意な体重増加が認められた($p = 0.0019$)。また、筋量も、4-1m投与群で有意な増加が認められた(図4、 $p = 0.0009$)。さらに、4-1m投与群では握力も有意に増加しており(図5、 $p = 0.0003$)、筋量だけでなく筋機能に対しても改善効果を示した。

[0102] 以上の結果から、4-1mは悪液質に対して有効であり、また、体重減少が認められた後の治療的投与でも有効である可能性が示唆された。

[0103] (実施例10：マウスがん悪液質モデルにおける生存期間に対する作用)

実施例9と同様にC26担癌マウスを作製した。C26担癌マウスの体重が減少に転じるタイミングから各群5匹で投与を開始した。具体的には、細胞注入後22日目から70日目までは1週間に3回、その後71、76、78、83及び85日目に、PBSによって希釈した4-1mを 0.3 mg/kg (投与容量 10 mL/kg)で皮下投与した。対照群には実施例9と同一のアイソタイプコントロール抗体を、4-1mと同様の方法で投与した。ゲムシタビン投与群は、PBSによって希釈したゲムシタビン(商品名：ジェムザール、イーライリリー・アンド・カンパニー)を 10 mg/kg (投与容量 10 mL/kg)で皮下投与した。ゲムシタビン併用4-1m投与群は、4-1mとゲムシタビンの両方を同日に投与した。腫瘍の長径及び短径を、ノギス(アズワン、VC01-150)を用いて継続的に測定し、以下の式に従って腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積＝長径（mm）×短径（mm）×短径（mm）／2

マウスの生存率をカプラン・マイヤー生存率曲線で図6に示す。群間の生存曲線における違いを比較する場合はログランク検定を行い、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。生存期間中央値は対照群、4-1m投与群及びゲムシタピン投与群でそれぞれ41日、57日及び55日であった。ゲムシタピン併用4-1m投与群の生存期間中央値は83日であり、4-1m単独又はゲムシタピン単独投与群の生存曲線に対し有意差が認められた。

一方、抗体単独及びゲムシタピン併用のどちらの場合においても、4-1m投与による腫瘍体積への影響は認められなかった（図7）。

以上の結果から、4-1mは腫瘍サイズに影響を及ぼさずに生存期間を延長し、ゲムシタピンのような抗がん剤と併用することで、生存率の向上により有効である可能性が示された。

産業上の利用可能性

[0104] 本発明の抗ヒトFn14抗体は、ヒトFn14が病態形成に関与する各種疾患の予防又は治療に有用である。また、本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換された宿主細胞及び抗体を生産する方法は、前記抗ヒトFn14抗体を生産するのに有用であると期待される。

配列表フリーテキスト

[0105] 以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には配列表の配列番号1、5及び3、7で表される塩基配列は、それぞれ抗ヒトFn14抗体の重鎖及び軽鎖の塩基配列であり、配列番号2、4、6、及び8で表されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1、3、5及び7によりコードされる重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号9で表されるアミノ酸配列は、ヒトFn14タンパク質、及び、ヒトFc領域タンパク質を繋ぐペプチドリンカー配列である。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号98から114までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域、並びに、配列番号4のアミノ酸番号24から40までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号56から62までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4のアミノ酸番号95から103までのアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項2] 以下の(1)及び(2)から選択される、請求項1に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント：
- (1) 配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント；並びに
- (2) 上記(1)の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメントの翻訳後修飾により生じた抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項3] 配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から114までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、請求項2に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項4] 翻訳後修飾が、重鎖可変領域N末端のピログルタミル化及び／又は重鎖C末端のリジン欠失である、請求項2に記載の抗ヒトFn14抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項5] 配列番号2のアミノ酸番号1から125までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域、及び、配列番号4の

アミノ酸番号 1 から 1 1 4 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 2 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項 6] 以下の (3) 及び (4) から選択される、請求項 2 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体：

(3) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒト F n 1 4 抗体；並びに

(4) 上記 (3) の抗体の翻訳後修飾により生じた抗体である、抗ヒト F n 1 4 抗体。

[請求項 7] 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項 6 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体。

[請求項 8] 翻訳後修飾が、重鎖 N 末端のピログルタミル化及び／又は重鎖 C 末端のリジン欠失である、請求項 6 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体。

[請求項 9] 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 4 5 4 までのアミノ酸配列からなる重鎖であって、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖、及び、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項 8 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体。

[請求項 10] 一本鎖可変領域フラグメント、F a b、F a b'、又は F (a b')₂ である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗原結合フラグメント。

[請求項 11] 請求項 3 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項 12] 請求項 3 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項 13] 請求項 1 1 及び／又は請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

- [請求項14] 以下の（a）～（d）からなる群より選択される、宿主細胞：
- （a）請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；
 - （b）請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；
 - （c）請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに
 - （d）請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。
- [請求項15] 以下の（e）～（h）からなる群より選択される、宿主細胞：
- （e）請求項7に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；
 - （f）請求項7に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；
 - （g）請求項7に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿

主細胞；並びに

(h) 請求項7に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[請求項16]

以下の(A)～(C)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程を包含する抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法：

(A) 請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(B) 請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；並びに

(C) 請求項3に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[請求項17]

以下の(D)～(F)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトF n 1 4抗体を発現させる工程を包含する、抗ヒトF n 1 4抗体を生産する方法：

(D) 請求項7に記載の抗ヒトF n 1 4抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基

配列を含むポリヌクレオチド、を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(E) 請求項 7 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、で形質転換された宿主細胞；並びに

(F) 請求項 7 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、該抗ヒト F n 1 4 抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

- [請求項18] 請求項 1 6 に記載の方法で生産された抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項19] 請求項 1 7 に記載の方法で生産された抗ヒト F n 1 4 抗体。
- [請求項20] 請求項 1 ～ 1 0、1 8、及び 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント、並びに薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
- [請求項21] 請求項 3 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント、請求項 5 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメント、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
- [請求項22] 請求項 7 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体、請求項 9 に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
- [請求項23] がん悪液質の予防又は治療用医薬組成物である、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項24] 請求項 1 ～ 1 0、1 8、及び 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗ヒト F n 1 4 抗体又はその抗原結合フラグメントの治療有効量を投与する工程を包含する、がん悪液質を予防又は治療する方法。
- [請求項25] がん悪液質の予防又は治療に使用するための、請求項 1 ～ 1 0、1

8、及び19のいずれか1項に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項26] がん悪液質の予防又は治療用医薬組成物の製造における、請求項1～10、18、及び19のいずれか1項に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。

[請求項27] 請求項1～10、18、及び19のいずれか1項に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含む、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物であって、かつ抗がん剤と併用されるものである、医薬組成物。

[請求項28] 抗がん剤を含む、がん又はがん悪液質の予防又は治療用医薬組成物であって、請求項1～10、18、及び19のいずれか1項に記載の抗ヒトF n 1 4抗体又はその抗原結合フラグメントと併用されるものである、医薬組成物。