



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201506039 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：103114228

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 18 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

(30)優先權：2013/04/19 日本

2013-088129

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

(72)發明人：佐佐木孝則 SASAKI, TAKANORI (JP)；佐藤雅人 SATO, MASAHITO (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：3 共 76 頁

(54)名稱

新穎抗人類 TWEAK 抗體

NOVEL ANTI-HUMAN TWEAK ANTIBODY

(57)摘要

本發明之課題為提供一種與以往之抗人類 TWEAK 抗體比較，具有優異活性之抗人類 TWEAK 抗體，以及使用該抗體來預防或治療，人類 TWEAK 參與病態形成之各種疾病之手段。作為本發明之解決手段，其係提供一種抗人類 TWEAK 抗體，其特徵為分別包含：由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列、由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列、或由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列、由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列、或由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

[Problem]

To provide an anti-human TWEAK antibody having excellent activity compared to conventional anti-human TWEAK antibodies and means for preventing or treating various diseases in which TWEAK is involved in disease pathology.

[Means for Solution]

An anti-human TWEAK antibody comprising a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 118 of SEQ ID NO:1, the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 125 of SEQ ID NO:5, or the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 121 of the SEQ ID NO:9, and a light chain variable region consisting of the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 108 of SEQ ID NO:3, the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 108 of SEQ ID NO:7, or the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 108 of SEQ ID NO:11, respectively.

201506039

## 發明摘要

※申請案號：103114228

※申請日：103年04月18日

※IPC分類：

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎抗人類 TWEAK 抗體

Novel anti-human TWEAK antibody

## ● 【中文】

本發明之課題為提供一種與以往之抗人類 TWEAK 抗體比較，具有優異活性之抗人類 TWEAK 抗體，以及使用該抗體來預防或治療，人類 TWEAK 參與病態形成之各種疾病之手段。作為本發明之解決手段，其係提供一種抗人類 TWEAK 抗體，其特徵為分別包含：由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列、由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列、或由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列、由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列、或由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

## 【 英文 】

## [Problem]

To provide an anti-human TWEAK antibody having excellent activity compared to conventional anti-human TWEAK antibodies and means for preventing or treating various diseases in which TWEAK is involved in disease pathology.

## [Means for Solution]

An anti-human TWEAK antibody comprising a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 118 of SEQ ID NO:1, the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 125 of SEQ ID NO:5, or the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 121 of the SEQ ID NO:9, and a light chain variable region consisting of the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 108 of SEQ ID NO:3, the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 108 of SEQ ID NO:7, or the amino acid sequence of amino acid numbers 1 to 108 of SEQ ID NO:11, respectively.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

新穎抗人類 TWEAK 抗體

Novel anti-human TWEAK antibody

## 【技術領域】

[0001] 本發明係關於新穎之抗人類 TWEAK 抗體。詳細而言，本發明之新穎抗人類 TWEAK 抗體係與以往之抗人類 TWEAK 抗體相比較，即使相對於人類 sTWEAK 及人類 mTWEAK 之任一種亦具有優異活性之抗人類 TWEAK 抗體。

## 【先前技術】

[0002] TWEAK(TNF-like weak inducer of apoptosis)係廣泛表現於包含巨噬細胞、T 細胞等之免疫活性細胞或腎間質細胞(Renal mesangial cell)等之細胞及組織之單次跨膜型蛋白質。TWEAK 之受體為 Fn14 蛋白質，TWEAK 係藉由形成 Fn14 蛋白質與複合體而活性化，並於細胞內傳達訊息。TWEAK 訊息之活性化，例如透過 NF- $\kappa$ B 轉錄因子之活性化，誘導單球走化活性因子(MCP-1)等發炎性之趨化激素(Chemokine)的表現，而引起發炎反應(Nat Rev Drug Discov.2008；7(5)：411-425)。

[0003] TWEAK 係作為膜型 TWEAK(mTWEAK)存在於

細胞膜上，細胞外區域係藉由 furin 型絲胺酸蛋白分解酶而切斷時，成為可溶型 TWEAK(sTWEAK) (J Biol Chem.2010；285(23)：17432-17441)。任一種 TWEAK 皆可形成 Fn14 蛋白質與複合體，雖於細胞內傳達訊息，但傳達訊息之最大活性與 sTWEAK 相比較，mTWEAK 較強 (J Immunol.2010；185(3)：1593-1605、Br J Pharmacol.2013；170(4)：748-764)。

[0004] TWEAK 已知有參與全身性紅斑性狼瘡、狼瘡性腎炎、風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis)、發炎性腸道疾病、多發性硬化症、乾癬、硬皮病等自我免疫疾病、腦中風、動脈硬化症、由於缺血性導致之急性腎衰竭、慢性腎衰竭、癌症、肌肉萎縮症(Muscular dystrophy)等疾病。

[0005] 全身性紅斑性狼瘡係將藉由 DNA-抗 DNA 抗體等免疫複合體之組織沉積所引起之全身性發炎性病變作為特徵之自我免疫疾病。症狀以採取重複緩解與惡化之慢性病程為多。又，由於侵入多數臟器故於臨床所見亦豐富多彩，觀察有腎障礙、中樞神經病變、血管病變、血液異常、關節症狀、皮膚病變等。全身性紅斑性狼瘡病態中，已報告有由於各種細胞引起細胞凋亡(Apoptosis)，故雖從細胞之 DNA 或 RNA 所釋放出，藉由表現於自我反應性 T 細胞之 mTWEAK 分子，促進單球之細胞凋亡 (J Immunol.2002；169(10)：6020-6029)。

[0006] 狼瘡性腎炎係多數全身性紅斑性狼瘡患者所

發病之腎炎，為有關係到生命之危險性高的疾病。小鼠之狼瘡性腎炎病態模型中，報告有藉由抗 TWEAK 抗體之給藥，改善蛋白尿，抑制在腎臟之 MCP-1 等趨化激素或細胞素 (Cytokine) 的產生 (J Immunol.2007 ; 179(11) : 7949-7958)。進而，即使在 Fn14 之遺傳性缺陷動物(基因剔除小鼠(Knockout mouse))之狼瘡性腎炎病態模型，亦報告有由於發現蛋白尿等腎病態改善作用，TWEAK 及 Fn14 係有參與狼瘡性腎炎病態 (J Immunol.2007 ; 179(11) : 7949-7958)。又，藉由 TWEAK 之刺激，報告有人類腎間質細胞細胞系中，誘導 MCP-1 等發炎介質 (Inflammatory mediator) 之表現，或藉由 TWEAK 刺激之細胞素的產生透過 NF- $\kappa$ B 的活性化，抑制藉由抗 TWEAK 抗體之細胞素的產生 (Cytokine 2009 ; 46(1) : 24-35)。進而，狼瘡性腎炎患者中，報告有在腎臟之 TWEAK 基因表現增大及對尿中之 TWEAK 蛋白質的分泌增大 (Nephrology (Carlton).2011 ; 16(4) : 426-432、J Autoimmun..2006 Dec ; 27(4) : 242-50)。

[0007] 風濕性關節炎係藉由存在於關節內之滑膜組織的異常增殖，於關節內產生慢性發炎之疾病，藉由進行引起關節破壞等各式各樣之機能障礙之自我免疫疾病。報告有於使用對於 TWEAK 之拮抗劑或對於 Fn14 之拮抗劑之試驗，由於被認為對於關節炎評分等有改善效果，故 TWEAK 及 Fn14 有參與風濕性關節炎之病態 (J Immunol.2006;177(4):2610-2620、Rheumatology(Oxford).

2008;47(4):442-450)。

[0008] 發炎性腸道疾病係與腸管內之免疫異常關連，將腸管作為主要之原因不明的難病。有腹痛、下痢、血便、下血、發熱、或體重減少等症狀，代表性者包含有克羅恩病或潰瘍性大腸炎等。於使用 TWEAK 之基因剔除小鼠(Knockout mouse)及對於 TWEAK 之拮抗劑之試驗，報告有由於被認為有發炎之改善效果，參與 TWEAK 訊息(Gastroenterology.2009；136(3)：912-923)。

[0009] 多發性硬化症係將發炎及髓磷脂(Myelin)損耗作為特徵之中樞神經系疾病。於小鼠 EAE 模型(實驗性自我免疫性腦炎模型)，已報告由於被認為藉由對於 TWEAK 之拮抗劑，有症狀的改善效果，在多發性硬化症病態有 TWEAK 的參與(Clin Immunol.2005；117(1)：15-23)。

[0010] 腦中風係由於缺血性導致缺氧及次要情況，而引起腦中神經細胞的壞死及損傷之疾病。小鼠腦缺血模型中，已報告有由於藉由對於 TWEAK 之拮抗劑，有症狀的改善，在腦中風有 TWEAK 的參與(J Cereb Blood Flow Metab.2007；27(3)：534-544)。

[0011] 急性腎衰竭係藉由外傷性或伴隨手術之出血、血壓急遽下、脫水症、藥的副作用等各式各樣因子而發病，數日當中就降低腎機能之嚴重病情，和細胞障礙與缺血性障礙大為不同。Fn14 已報告在人類缺血性腎中增大表現，又，小鼠急性腎衰竭模型中，已報告有由於被認為於使用對於 TWEAK 之拮抗劑或對於 Fn14 之拮抗劑之



試驗，對腎機能或生存率有改善效果，故於急性腎衰竭有 TWEAK 及 Fn14 參與(Kidney Int.2011；79(2)：179-188、J Am Soc Nephrol.2008；19(4)：695-703)。

[0012] TWEAK 或 Fn14 已知於各種腫瘤增大表現(PLOS ONE.2013；8(3)e57436)。又，亦報告有 TWEAK 之過剩表現細胞持有形質轉換能(Cancer Res.2004；64(24)：8968-8972)。進而，已報告有對於 TWEAK 之拮抗劑在 Xenograft 模型(罹癌移植模型)，抑制癌細胞增殖(Clin Cancer Res.2010；16(2)：497-508)。

[0013] TWEAK 已知與肌肉萎縮惡化有深度關係。例如，報告有肌肉萎縮模型中，於 TWEAK 基因缺陷小鼠減輕肌肉萎縮，反而於 TWEAK 過剩表現小鼠促進肌肉萎縮(J Clin Invest.2007；117：889-901、International myotonic dystrophy consortium meeting 9：O-39、2013、Am J Pathol.2012；180(4)：1603-1613)。

[0014] 據此，若能開發與 TWEAK 特異性鍵結，抑制 TWEAK 作用之單株抗體，TWEAK 被期待有用在參與病態形成之各種疾病的治療、預防。

[0015] 作為到目前為止對於研究一直在進行之顯示人類 TWEAK 之功能抑制作用之抗體，已報告有係小鼠單株抗體之 mP2D10 與其人類化單株抗體之 huP2D10-1 及 huP2D10-2(專利文獻 1)、或係小鼠單株抗體之 MTW-1(非專利文獻 1)。又，亦已報告有係倉鼠單株抗體之 TW212 與其人類化單株抗體(專利文獻 2)、或係兔子單株抗體之

TW305 與其人類化單株抗體(專利文獻 3)。惟，以往之抗體對於人類 TWEAK 之中和活性可說是不足夠的。

[0016] 又，作為規定抗體醫藥的有效給藥量的主要原因，雖可列舉對於具有抗體之抗原之鍵結活性或中和活性、存在於體內之抗原的量，但提昇鍵結活性或中和活性與給藥量的減低相關聯，作為結果可說是亦與患者經濟性負擔或醫療成本的減低相關聯極為有益的改良。

[0017] 由於這些原因，與以往之抗人類 TWEAK 抗體進行比較之活性中，取得優異之抗人類 TWEAK 抗體，但為了利用在給藥人類之各種疾病的治療、預防係有必要。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[0018]

[專利文獻 1] 國際公開第 2006/130374 號

[專利文獻 2] 國際公開第 2010/115555 號

[專利文獻 3] 國際公開第 2012/045671 號

[非專利文獻]

[0019]

[非專利文獻 1] 「(Biochemical and Biophysical Research Communications)」、(美國)、2003、Vol.306(4)、p.819-825

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

[0020] 本發明之課題係提供一種與以往之抗人類 TWEAK 抗體相比較具有優異活性之抗人類 TWEAK 抗體。

[用以解決課題之手段]

[0021] 本發明者們在抗人類 TWEAK 抗體之製作中重複相當之創意檢討的結果，發現：製作 1)包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之抗人類 TWEAK 抗體、2)包含由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之抗人類 TWEAK 抗體、以及 3)包含由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之抗人類 TWEAK 抗體(實施例 1~8)，此等之抗體具有對於人類 sTWEAK 之鍵結活性(實施例 9)、對於人類 mTWEAK 之鍵結活性(實施例 10)、人類 sTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制活性(實施例 11)、人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制活性(實施例 12)、人類 sTWEAK 刺激 MCP-1 表現抑制活性(實施例 13)、及人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現抑制活性(實施例 14)。此等之結果提供前述抗人類 TWEAK 抗

體，而完成本發明。

[0022] 亦即，本發明作為醫學上或產業上有用之物質及方法係包含以下之發明。

(1)選自以下之 1)~3)之任一種之抗人類 TWEAK 抗體。

1)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區；

2)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區；

3)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

(2)如上述(1)所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

(3)如上述(1)所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108

之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

(4)如上述(1)所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

(5)如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其中，前述抗體之重鏈恆定區為人類 Ig $\gamma$ 1 恆定區。

(6)如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其中，前述抗體之輕鏈恆定區為人類 Ig $\kappa$  恆定區。

(7)如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其中，前述抗體之重鏈恆定區為人類 Ig $\gamma$ 1 恆定區，前述抗體之輕鏈恆定區為人類 Ig $\kappa$  恆定區。

(8)如上述(2)所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(9)如上述(3)所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 5 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 7 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(10)如上述(4)所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 9 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 11 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(11)一種聚核苷酸，其係包含編碼如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基

序列。

(12)一種聚核苷酸，其係包含編碼如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列。

(13)一種表現載體，其係包含上述(11)及/或(12)所記載之聚核苷酸。

(14)一種上述(13)所記載之經表現載體而形質轉換之宿主細胞，其係選自由以下之(a)~(d)所成之群。

(a)一種經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；

(b)一種經兩表現載體而形質轉換之宿主細胞，該兩表現載體之一為包含：包含編碼如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，另一為包含：包含編碼該抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；

(c)一種經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；  
及

(d)一種經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼如上述(1)~(4)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷

酸。

(15)如上述(13)所記載之經表現載體而形質轉換之宿主細胞，其係選自由以下之(a)~(d)所成之群：

(a)一種經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼如上述(8)~(10)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸；

(b)一種經兩表現載體而形質轉換之宿主細胞，該兩表現載體之一為包含：包含編碼如上述(8)~(10)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸，另一為包含：包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸；

(c)一種經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼如上述(8)~(10)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸；及

(d)一種經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼如上述(8)~(10)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸。

(16)一種生產抗人類 TWEAK 抗體之方法，其係包含培養上述(14)或(15)所記載之宿主細胞，使抗人類 TWEAK 抗體表現之步驟。

(17)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係以上述(16)所記載之方法所生產。

(18)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號

1 之胺基酸編號 1 至 447 之胺基酸序列所構成、且胺基酸編號 1 之麩醯胺酸被焦麩胺酸修飾之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(19)一種醫藥組成物，其係包含如上述(1)~(10)、(17)、及(18)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體及藥學上所容許之賦形劑。

(20)一種全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防用或治療用醫藥組成物，其係包含如上述(1)~(10)、(17)、及(18)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體。

(21)一種用以預防或治療全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之方法，其係包含給藥如上述(1)~(10)、(17)、及(18)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之治療有效量之步驟。

(22)如上述(1)~(10)、(17)、及(18)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體，其係用以使用在全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防或治療。

(23)一種如上述(1)~(10)、(17)、及(18)中任一項所記載之抗人類 TWEAK 抗體之使用，其係在全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防或治療用醫藥組成物之製造。

#### [發明效果]

[0023] 藉由本發明，提供一種與以往抗人類 TWEAK 抗體相比較，相對於人類 sTWEAK 及人類 mTWEAK 之任一種皆具有優異活性之抗人類 TWEAK 抗體。本發明之抗



人類 TWEAK 抗體具有抑制人類 sTWEAK 與人類 mTWEAK 兩者機能之作用，有用於人類 TWEAK 參與病態形成之各種疾病之預防或治療。而且，如此之本發明之抗人類 TWEAK 抗體，帶來在給藥量的減低、給藥間隔的擴大、給藥方法的改善(例如皮下注射劑)等臨床適用之優異改善，對治療有效性及患者順應性的改善有顯著貢獻。

### 【圖式簡單說明】

[0024]

[圖 1]表示對於人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性之抑制活性。

[圖 2]表示對於人類 sTWEAK 刺激 MCP-1 表現之抑制活性。

[圖 3]表示對於人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現之抑制活性。

### 【實施方式】

[0025] 以下對於本發明進行詳述。

[0026] 抗體分子的基本構造以各類型共通係由分子量 5 萬~7 萬之重鏈與 2~3 萬之輕鏈所構成。重鏈通常約由包含 440 個胺基酸之多肽鏈所構成，每個類型都具有特徵性構造，被稱為對應 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 之  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  鏈。進而 IgG 中，存在 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，分別對應之重鏈被稱為  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、

$\gamma_3$ 、 $\gamma_4$ 。輕鏈通常由包含約 220 個之胺基酸之多肽鏈所構成，已知有 L 型與 K 型 2 種，分別稱為  $\lambda$ 、 $\kappa$  鏈。抗體分子之基本構造的肽構成係分別相同之 2 條重鏈及 2 條輕鏈藉由二硫鍵(S-S 鍵)及非共價鍵而鍵結，分子量為 15 萬～19 萬。2 種之輕鏈可與任一重鏈成對。各個抗體分子通常可由同一輕鏈 2 條與同一重鏈 2 條所構成。

[0027] 鏈內 S-S 鍵係於重鏈四個( $\mu$ 、 $\epsilon$  鏈五個)、於輕鏈二個、胺基酸每 100～110 殘基形成一個環(loop)，此立體構造於各環間類似，被稱為構造單位或結構域。重鏈、輕鏈同時位於胺基末端(N 末端)側之結構域，即使為來自同種動物之同一類型(次類型)的標品，其胺基酸序列亦並非一定，已被稱為可變區，各結構域分別被稱為重鏈可變區( $V_H$ )及輕鏈可變區( $V_L$ )。由可變區之羧基末端(C 末端)側之胺基酸序列，各類型或每一次類型幾乎一定故被稱為恆定區。

[0028] 抗體之抗原決定部位係藉由  $V_H$  及  $V_L$  所構成，鍵結之特異性係因此部位之胺基酸序列而異。另外，與補體或各種細胞的鍵結之生物學的活性係反映各類型 Ig 恆定區之構造的差異。輕鏈與重鏈之可變區的可變性已瞭解幾乎被限制在存在於任一鏈之 3 個小的超可變區，將此等之區域稱為相補性決定區域(CDR；分別來自 N 末端側之 CDR1、CDR2、CDR3)。可變區之殘留部分稱為框架區域(FR)，相對上係恆定。

[0029]

<本發明之抗人類 TWEAK 抗體>

本發明之抗人類 TWEAK 抗體中，係包含具有以下 1) ~ 3) 之任一種特徵之抗人類 TWEAK 抗體。

1) 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

2) 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

3) 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

[0030] 較佳為本發明之抗人類 TWEAK 抗體具有以下 1) ~ 3) 之任一種特徵，進而包含重鏈恆定區及輕鏈恆定區。作為恆定區，雖然什麼樣次類型之恆定區(例如作為重鏈恆定區之  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$  或  $\gamma 4$  之恆定區，作為輕鏈恆定區之  $\lambda$  或  $\kappa$  鏈之恆定區)皆可選擇，但作為重鏈恆定區，較佳為人類  $Ig\gamma 1$  恆定區，作為輕鏈恆定區，較佳為人類  $Ig\kappa$  恆定區。

[0031] 作為人類  $Ig\gamma 1$  恆定區，例如可列舉由從序列編號 1 之胺基酸編號 119 至 448 之胺基酸序列所構成之人

類 Ig $\gamma$ 1 恆定區。

[0032] 作為人類 Ig $\kappa$  恆定區，例如可列舉由從序列編號 3 之胺基酸編號 109 至 214 之胺基酸序列所構成之人類 Ig $\kappa$  恆定區。

[0033] 作為本發明之抗人類 TWEAK 抗體係具有以下 1)~3)之任一種特徵，重鏈恆定區為人類 Ig $\gamma$ 1 恆定區，輕鏈恆定區為人類 Ig $\kappa$  恆定區，更佳為抗人類 TWEAK 抗體。

[0034] 1 個實施形態中，本發明之抗人類 TWEAK 抗體係具有以下 i)~iii) )之任一種特徵之抗人類 TWEAK 抗體。

i)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

ii)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 5 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 7 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

iii)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 9 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 11 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

[0035] 將抗體於細胞表現時，已知有抗體轉譯後接受修飾。作為轉譯後修飾之例，可列舉藉由重鏈 C 末端之離胺酸之羧胜酶(Carboxypeptidase)切斷，藉由重鏈及輕鏈 N 末端之麩醯胺酸或麩胺酸之焦谷氨酸化

(Pyroglutamylated)對焦麩胺酸的修飾等，各種抗體中，已知有重鏈 C 末端之離胺酸缺失或重鏈 N 末端之麩醯胺酸的大部分受到對焦麩胺酸之修飾 (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Vol.97, p.2426)。又，如此轉譯後修飾會對抗體之活性造成影響亦為該領域所熟知 (Analytical Biochemistry, 2006, Vol.348, p.24-39)。

[0036] 本發明之抗體中，不僅具有完全長之重鏈之抗體，亦包含欠缺 C 末端之離胺酸之具有重鏈之抗體、重鏈 N 末端之麩醯胺酸或麩胺酸藉由焦麩胺酸化 (Pyroglutamylated) 受到對焦麩胺酸之修飾之抗體等、於細胞內之表現時收到轉譯後修飾之抗體。

[0037] 例如，前述 i)~iii) 所記載之本發明之抗人類 TWEAK 抗體中，亦分別包含以下 1)~3) 所記載之抗人類 TWEAK 抗體。

1) 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈，惟，包含序列編號 1 之胺基酸編號 1 之麩醯胺酸被焦麩胺酸修飾及/或欠缺序列編號 1 之胺基酸編號 448 之離胺酸之重鏈、以及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

2) 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係由序列編號 5 所示之胺基酸序列所構成之重鏈，惟，包含序列編號 5 之胺基酸編號 1 之麩胺酸被焦麩胺酸修飾及/或欠缺序列編號 5 之胺基酸編號 455 之離胺酸之重鏈、以及由序列編號 7 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

3)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係由序列編號 9 所示之胺基酸序列所構成之重鏈，惟，包含序列編號 9 之胺基酸編號 1 之麩醯胺酸被焦麩胺酸修飾及/或缺序列編號 9 之胺基酸編號 451 之離胺酸之重鏈、以及由序列編號 11 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

[0038] 本發明中亦包含具有以下 1)~3)之任一種特徵之抗人類 TWEAK 抗體。

1)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含：包含由序列編號 1 之胺基酸編號 31 至 35 之胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 1 之胺基酸編號 50 至 66 之胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 1 之胺基酸編號 99 至 107 之胺基酸序列所構成之 CDR3 之重鏈可變區、以及包含由序列編號 3 之胺基酸編號 24 至 34 之胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 3 之胺基酸編號 50 至 56 之胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 3 之胺基酸編號 89 至 97 之胺基酸序列所構成之 CDR3 之輕鏈可變區。

2)一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含：包含由序列編號 5 之胺基酸編號 31 至 35 之胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 5 之胺基酸編號 50 至 66 之胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 5 之胺基酸編號 99 至 114 之胺基酸序列所構成之 CDR3 之重鏈可變區、以及包含由序列編號 7 之胺基酸編號 24 至 34 之胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 7 之胺基酸編號 50 至 56 之胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 7 之胺基酸編號 89

至 97 之胺基酸序列所構成之 CDR3 之輕鏈可變區。

3) 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含：包含由序列編號 9 之胺基酸編號 31 至 35 之胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 9 之胺基酸編號 50 至 66 之胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 9 之胺基酸編號 99 至 110 之胺基酸序列所構成之 CDR3 之重鏈可變區、以及包含由序列編號 11 之胺基酸編號 24 至 34 之胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 11 之胺基酸編號 50 至 56 之胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 11 之胺基酸編號 89 至 97 之胺基酸序列所構成之 CDR3 之輕鏈可變區。

[0039] 本發明之抗人類 TWEAK 抗體係鍵結於人類 mTWEAK 及人類 sTWEAK 之抗體。抗體是否鍵結於人類 mTWEAK 或人類 sTWEAK，可使用公知之鍵結活性測定方法進行確認。作為測定鍵結活性之方法，例如可列舉 Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay(ELISA) 或 Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS)等方法。

[0040] 對於人類 mTWEAK 之鍵結活性之測定，例如可使用 FACS 進行實施。例示性之方法中，將表現人類 mTWEAK(由序列編號 16 所示之胺基酸序列所構成)或人類 mTWEAK 變異體(由序列編號 13 所示之胺基酸序列所構成)之細胞(例如 HEK293 細胞)添加被驗抗體於分注之支管使其進行反應。反應後並洗淨，將以藻紅素(PE)等螢光蛋白質標識之抗 IgG 抗體等二次抗體使其反應，藉由進行使用 BD FACSArray Bioanalyzer(BD Biosciences)等之螢光

值的測定，可確認被驗抗體是否鍵結於人類 mTWEAK。

[0041] 對於人類 sTWEAK 之鍵結活性之測定，例如可使用 ELISA 進行實施。例示性之方法中，將人類 sTWEAK 蛋白質(Peptidech 公司、310-06)(序列編號 15；附加蛋胺酸(Methionine)於序列編號 16 所示之野生型人類 mTWEAK 之胺基酸編號 97 至 249 之胺基酸序列之 N 末端者)固定化於 ELISA 平板，對於此添加被驗抗體使其反應。反應後，使以辣根過氧化酶(HRP)等酶標識之抗 IgG 抗體等二次抗體反應，並洗淨後，藉由使用檢出其活性之試藥(例如為 HRP 標識時，為 BM-Chemiluminescence ELISA Substrate(POD)(羅氏診斷公司))等進行活性測定，可確認被驗抗體是否鍵結於人類 sTWEAK。

[0042] 本發明之抗人類 TWEAK 抗體中，若為鍵結於人類 mTWEAK 及人類 sTWEAK 之抗體，除了對人類 mTWEAK 及人類 sTWEAK 的鍵結之外，亦包含鍵結於來自其他動物之 mTWEAK 及 sTWEAK(例如猴子 mTWEAK 及猴子 sTWEAK)之抗體。

[0043] 較佳為本發明之抗人類 TWEAK 抗體鍵結於人類 mTWEAK 及人類 sTWEAK，對於人類 mTWEAK 及人類 sTWEAK 具有中和活性。所謂對於人類 mTWEAK 及人類 sTWEAK 之中和活性，係意味著藉由對人類 mTWEAK 及/或人類 sTWEAK 之鍵結，透過人類 TWEAK 而帶來抑制任意之生物活性之活性，可評價將人類 TWEAK 之 1 個或複數之生物活性作為指標。作為如此之中和活性，例如



可列舉藉由人類 TWEAK 刺激之 NF- $\kappa$ B 之活性化抑制活性、及藉由人類 TWEAK 刺激之 MCP-1 表現抑制活性，作為活性之具體評價方法，可使用如後述實施例 11~14 所記載之方法。

[0044] 本發明之抗人類 TWEAK 抗體係揭示於本說明書，根據本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區及輕鏈可變區之序列情報，使用於該領域所周知之方法，可藉由本發明領域具有通常知識者輕易製作。本發明之抗人類 TWEAK 抗體雖並未特別限定，但例如可依據後述之<本發明之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法>所記載之方法進行製造。

[0045] 本發明之抗人類 TWEAK 抗體藉由必要進一步純化之後，依照常法被製劑化，可使用在全身性紅斑性狼瘡、狼瘡性腎炎、風濕性關節炎、發炎性腸道疾病、多發性硬化症、乾癬、硬皮病等自我免疫疾病、腦中風、動脈硬化症、由於缺血性之急性腎衰竭、慢性腎衰竭、癌症、Duchenne 型肌肉萎縮症、強直型肌肉萎縮症 (Myotonic dystrophy)、包含體肌炎等人類 TWEAK 參與病態形成之疾病的預防或治療。

[0046]

<本發明之聚核苷酸>

本發明之聚核苷酸中，係包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸、及包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之

鹼基序列之聚核苷酸。

[0047] 1 個實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸、包含編碼由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸、或包含編碼由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸。

[0048] 作為包含編碼由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所示之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含由序列編號 2 之鹼基序號 1 至 354 之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含由序列編號 6 之鹼基序號 1 至 375 之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含由序列編號 10 之鹼基序號 1 至 363 之鹼基序列之聚核苷酸。

[0049] 較佳之實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸、包含編碼由序列編號 5 所示之胺基

酸序列所構成之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸、或包含編碼由序列編號 9 所示之胺基酸序列所構成之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸。

[0050] 作為包含編碼由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含序列編號 2 所示之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 5 所示之胺基酸序列所構成之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含序列編號 6 所示之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 9 所示之胺基酸序列所構成之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含序列編號 10 所示之鹼基序列之聚核苷酸。

[0051] 1 個實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸、包含編碼由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸、或包含編碼由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸。

[0052] 作為包含編碼由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含由序列編號 4 之鹼基序號 1 至 324 之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區

之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含由序列編號 8 之鹼基序號 1 至 324 之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含由序列編號 12 之鹼基序號 1 至 324 之鹼基序列之聚核苷酸。

[0053] 較佳之實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸、包含編碼由序列編號 7 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸、或包含編碼由序列編號 11 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸。

[0054] 作為包含編碼由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含序列編號 4 所示之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 7 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含序列編號 8 所示之鹼基序列之聚核苷酸。作為包含編碼由序列編號 11 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸，例如，可列舉包含序列編號 12 所示之鹼基序列之聚核苷酸。

[0055] 本發明之聚核苷酸係根據其鹼基序列，使用於該領域所周知之方法，可藉由本發明領域具有通常知識者輕易製作。例如本發明之聚核苷酸可利用於該領域所周

知之基因合成方法進行合成。作為如此之基因合成方法，可列舉 WO90/07861 所記載之抗體基因之合成方法等本發明領域具有通常知識者所周知之各種方法。

[0056]

<本發明之表現載體、本發明之形質轉換之宿主細胞、本發明之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法、及藉由該方法所生產之抗人類 TWEAK 抗體>

本發明之表現載體係包含後述兩種聚核苷酸之表現載體，該兩種聚核苷酸為包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸及/或包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸。

[0057] 作為較佳之本發明之表現載體，可列舉包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸之表現載體、包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸之表現載體、或包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸之表現載體。

[0058] 作為用以表現本發明之聚核苷酸所使用之表現載體，係於真核細胞(例如動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母)及/或原核細胞(例如大腸菌)之各種宿主細胞中，表現包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸及/或包含編碼本發明之抗人

類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，藉由此等若為可產生經編碼之多肽者，並未特別限制。作為如此之表現載體，例如，可列舉質體載體、病毒載體(例如腺病毒、逆轉錄病毒)等，較佳可使用 pEE6.4 或 pEE12.4(Lonza 公司)。又，亦可於 AG- $\gamma$ 1 或 AG- $\kappa$ (例如參照 WO94/20632)等預先具有人類 Ig 恆定區基因之表現載體，表現導入可變區基因斷片之抗體基因。

[0059] 本發明之表現載體係可包含可與具本發明之聚核苷酸機能連結之基因啟動子。作為用以在動物細胞表現本發明之聚核苷酸之基因啟動子，例如，可列舉來自 CMV、RSV、SV40 等病毒之基因啟動子、肌動蛋白基因啟動子、EF(elongation factor)1 $\alpha$  基因啟動子、熱休克基因啟動子等。作為用以在細菌(例如大腸桿菌屬菌)表現之基因啟動子，例如，可列舉 trp 基因啟動子、lac 基因啟動子、 $\lambda$  PL 基因啟動子、tac 基因啟動子等。又，作為用以在酵母表現之基因啟動子，例如，可列舉 GAL1 基因啟動子、GAL10 基因啟動子、PH05 基因啟動子、PGK 基因啟動子、GAP 基因啟動子、ADH 基因啟動子等。

[0060] 本發明之經形質轉換之宿主細胞中，包含選自由以下之(a)~(d)所成之群之本發明之經表現載體而形質轉換之宿主細胞。

(a)經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈可變區之

鹼基序列之聚核苷酸；

(b)經兩表現載體而形質轉換之宿主細胞，該兩表現載體之一為包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，另一為包含：包含編碼該抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；

(c)經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；

(d)經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸。

[0061] 1 個實施形態中，本發明之經形質轉換之宿主細胞係選自由以下之(a)~(d)所成之群之本發明之經表現載體而形質轉換之宿主細胞。

(a)經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸；

(b) 經兩表現載體而形質轉換之宿主細胞，該兩表現載體之一為包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸，另一為包含：包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸；

(c)經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基

序列之聚核苷酸；

(d)經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸。

[0062] 使用動物細胞、昆蟲細胞、或酵母作為宿主細胞時，本發明之表現載體可包含起始密碼子及終止密碼子。此時，本發明之表現載體可包含增強序列、編碼本發明之抗體或其重鏈可變區或者輕鏈可變區之基因之 5'側及 3'側之非轉譯區域、分泌訊息序列、細胞剪接接合部、多聚腺苷酸化(Polyadenylation)部位、或可複製之單位等。使用大腸菌作為宿主細胞時，本發明之表現載體可包含起始密碼子、終止密碼子、終止子區域、及可複製之單位。此時，本發明之表現載體因應目的，可包含通常所使用之篩選標記(例如四環素耐性基因、安比西林(Ampicillin)耐性基因、康黴素耐性基因、新黴素耐性基因、二氫葉酸還原酶基因)。

[0063] 作為較佳之本發明之經形質轉換之宿主細胞，可列舉經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸、以及經表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體係包含：包含編碼本發明之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸。



[0064] 作為經形質轉換之宿主細胞，適合於使用之表現載體，以該表現載體被形質轉換，若為可表現抗體者，並未特別限定。作為經形質轉換之宿主細胞，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所樹立之細胞等各種細胞(例如動物細胞(例如 CHOK1SV 細胞)、昆蟲細胞(例如 Sf9)、細菌(大腸桿菌屬菌等)、酵母(酵母菌屬、畢赤酵母菌屬等)等)，較佳可使用 CHOK1SV 細胞、CHO-DG44 細胞、293 細胞、NS0 細胞等培養細胞。

[0065] 形質轉換宿主細胞之方法，雖並未特別限定，但例如，可使用磷酸鈣法、電穿孔法等。

[0066] 本發明之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法中係包含：包含培養本發明之經形質轉換之宿主細胞，使抗人類 TWEAK 抗體表現之步驟之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法。

[0067] 本發明之抗人類 TWEAK 抗體中亦包含：以本發明之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法所生產之抗人類 TWEAK 抗體。

[0068] 本發明之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法若為包含培養本發明之經形質轉換之宿主細胞，使抗人類 TWEAK 抗體表現之步驟，並未特別限定。作為於該方法所使用較佳之宿主細胞，可列舉前述較佳之本發明之經形質轉換之宿主細胞。

[0069] 經形質轉換之宿主細胞之培養可藉由周知之

方法進行。培養條件、例如可適當選擇溫度、培養基之 pH、及培養時間。宿主細胞為動物細胞時，作為培養基，例如可使用包含約 5~20%之胎兒牛血清之 MEM 培養基 (Science、1959、Vol.130、No.3373、p.432-7)、DMEM 培養基 (Virology、1959、Vol.8、p.396)、RPMI1640 培養基 (J.Am.Med.Assoc.、1967、Vol.199、p.519)、199 培養基 (Exp.Biol.Med.、1950、Vol.73、p.1-8)等。培養基之 pH 較佳約為 6~8，培養由於必要可一邊通氣或攪拌，一邊通常於約 30~40°C 下進行約 15~72 小時。宿主細胞為昆蟲細胞時，作為培養基，例如可使用包含胎兒牛血清之 Grace's 培養基 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA、1985、Vol.82、p.8404)等。培養基之 pH 較佳約為 5~8，培養由於必要可一邊通氣或攪拌，一邊通常於約 20~40°C 下進行約 15~100 小時。宿主細胞為大腸菌或酵母時，作為培養基，例如含有營養源之液體培養基為適當。營養培養基較佳為包含於經形質轉換之宿主細胞之生育所必需之碳源、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、玉米浸液、蛋白朮、酪蛋白、肉類萃取物、大豆粕、馬鈴薯萃取液等。依照所期望之其他營養素可包含(例如無機鹽(例如氯化鈣、磷酸二氫鈉、氯化鎂)、維他命類、抗生物質(例如、四環素、新黴素、安比西林、康黴素等)等)。培養基之 pH 較佳約為 5~8。宿主細胞為大腸菌時，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、Vol.3、A2.2) 等。培養由於必要可一邊通氣或攪拌，一邊通常於約 14~43°C 下進行約 3~24 小時。宿主細胞為酵母時，作為培養基，例如可使用 Burkholder 最小培養基 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA、1980、Vol.77、p.4505) 等。培養由於必要可一邊通氣或攪拌，一邊通常於約 20~35°C 下進行約 14~144 小時。藉由如上述般之培養，可使本發明之抗人類 TWEAK 抗體進行表現。

[0070] 本發明之生產抗人類 TWEAK 抗體之方法，除了培養本發明之經形質轉換之宿主細胞，使抗人類 TWEAK 抗體表現之步驟之外，進一步從該經形質轉換之宿主細胞回收抗人類 TWEAK 抗體，較佳係可包含進行單離或純化之步驟。作為單離或純化方法，例如可列舉鹽析、溶媒沈澱法等利用溶解度之方法；透析、限外過濾、凝膠過濾等利用分子量差異之方法；離子交換層析法、氫氧基磷灰石層析法等利用荷電之方法；親和層析法等利用特異性親和性之方法；逆相高速液體層析法等利用疏水性差異之方法；等電點電泳等等利用電點差異之方法等。較佳為累積於培養上清液中之抗體可藉由各種層析法、例如使用蛋白質 A 管柱或蛋白質 G 管柱之管柱層析法進行純化。

[0071]

<本發明之醫藥組成物>

本發明之醫藥組成物中，系包含：包含本發明之抗人類 TWEAK 抗體及藥學上所容許之賦形劑之醫藥組成物。本發明之醫藥組成物通常是在該領域所使用之賦形劑，亦即，使用藥劑用賦形劑或藥劑用載體等，可藉由通常使用之方法進行調製。作為此等醫藥組成物劑型之例，例如可列舉注射劑、點滴用劑等非經口劑，可藉由靜脈內給藥、皮下給藥等進行給藥。當製劑化時，於藥學性所容許的範圍，因應此等劑型可使用賦形劑、載體、添加劑等。

[0072] 本發明之醫藥組成物可包含複數種之本發明之抗人類 TWEAK 抗體。例如本發明亦包含重鏈 C 末端離胺酸之缺失抗體、受到 N 末端轉譯後修飾之抗體、受到缺失重鏈 C 末端離胺酸之 N 末端轉譯後修飾之抗體、及/或含有具重鏈 C 末端離胺酸之未受到 N 末端轉譯後修飾之抗體之醫藥組成物。

[0073] 例如，於含有前述 i)所記載之抗人類 TWEAK 抗體(亦即，包含由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈之抗人類 TWEAK 抗體)之本發明之醫藥組成物中，亦包含含有以下(1)~(4)當中 2 種以上之抗人類 TWEAK 抗體之醫藥組成物。

(1)一種抗人類 TWEAK 抗體，係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 477 之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(2)一種抗人類 TWEAK 抗體，係包含由序列編號 1 所

示之胺基酸序列所構成、胺基酸編號 1 之麩醯胺酸係由被焦麩胺酸修飾之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(3)一種抗人類 TWEAK 抗體，係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 447 之胺基酸序列所構成、胺基酸編號 1 之麩醯胺酸被焦麩胺酸修飾之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

(4)一種抗人類 TWEAK 抗體，係包含由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

即使對於含有前述 ii)及 iii)所記載之抗人類 TWEAK 抗體之本發明之醫藥組成物亦相同。

[0074] 在製劑化之本發明之抗人類 TWEAK 抗體之添加量雖因患者的症狀程度或年齡、所使用製劑之劑型、或抗體之鍵結力價等而不同，但例如可使用 0.001mg/kg~100mg/kg 程度。

[0075] 本發明之醫藥組成物係人類 TWEAK 參與病態形成之疾病，例如可作為全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防或治療用醫藥組成物使用。

[0076] 本發明中係包含本發明之抗人類 TWEAK 抗體，包含全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防或治療用醫藥組成物。又，本發明中，包含給藥本發明之抗人類 TWEAK 抗體之治療有效量之步驟，包含預防或治療全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之方法。又，本發明中用以使

用在全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防或治療，係包含本發明之抗人類 TWEAK 抗體。又，本發明中，在全身性紅斑性狼瘡或狼瘡性腎炎之預防或治療用醫藥組成物的製造，包含本發明之抗人類 TWEAK 抗體之使用。

[0077] 對於本發明雖全盤性記載，但為了進一步得到理解，雖提供所參照之特定實施例，但此等成為例示目的者，並非被限定於本發明者。

#### [實施例]

[0078] 對於使用市售之套組或試藥等之部分，若沒有特別限制係依照附加之協定進行實驗。

#### [0079]

(實施例 1：人類 mTWEAK 表現 HEK293 細胞之取得)

本發明者們取得人類 mTWEAK 表現載體及人類 mTWEAK 表現細胞。將人類 mTWEAK 變異體基因(序列編號 14(編碼序列編號 13 所示之胺基酸序列之鹼基序列))重組為哺乳細胞表現用載體之 pcDNA3.1 載體 (Life Technologies 公司) (於本說明書中亦稱為「人類 mTWEAK 表現載體」)。將此載體使用係轉染試藥之 Fugene HD(Promega 公司)導入基因於人類腎臟細胞系 HEK293 細胞 (ATCC：CRL-1573)。序列編號 13 所示之人類 mTWEAK 變異體係缺失由序列編號 16 所示之野生型人類 mTWEAK 之胺基酸編號 90 至 93 之胺基酸序列(藉由蛋白分解酶之切斷部位)之人類 mTWEAK，確認即使缺失此等

之胺基酸，亦活性化 TWEAK 訊息。將此細胞在含有 Hygromycin 之 DMEM 培養基進行選擇性培養之後，在極限稀釋法進行單株化。之後，藉由使用抗人類 TWEAK 抗體 (PE 標識 CARL-1；BD 公司)之流式細胞儀 (Flow cytometry)測定選別顯示高度蛋白質表現之選殖。

[0080]

(實施例 2：抗人類 TWEAK 抗體產生融合瘤 (Hybridoma) 之製作)

本發明者們為了取得抗人類 TWEAK 抗體，使用人類單株抗體開發技術「VelocImmune」(VelocImmune antibody technology：Regeneron 公司(美國專利 6596541 號))小鼠以製作抗體。於 VelocImmune 小鼠，與誘發免疫反應之佐劑一起，免疫人類 sTWEAK 蛋白質 (Peprotech 公司、310-06)及於實施例 1 所取得之人類 mTWEAK 表現 HEK293 細胞。數次免疫小鼠，確認血中抗體價的上昇，進行最終免疫。依常法，收集經免疫小鼠之脾臟或摘出淋巴節之淋巴球，藉由將此與小鼠骨髓瘤細胞 SP2/0 進行細胞融合來製作融合瘤。製作融合瘤之界限稀釋樣品，進行單株化。對於各選殖，進行擴大培養之後，培養基變更為無血清培養基之 CD 融合瘤培養基 (Life Technologies 公司)，培養 5 天。從所得之培養上清液使用 Protein G Purification kit (Generon 公司)來純化抗體。

[0081]

(實施例 3：細胞 ELISA 鍵結抑制分析)

本發明者們，為了測定抗體之抗原鍵結抑制活性，評價對於藉由抗體之人類大腸癌細胞系 HT29 細胞(ATCC：HTB-38)(內在表現人類 TWEAK 受體)之人類 sTWEAK 蛋白質的鍵結抑制。將 HT29 細胞於 384 孔培養板(Greiner 公司)每 1 孔播種  $1 \times 10^4$  個。去除培養基後，添加 10 $\mu$ L 之生物素標識人類 sTWEAK 蛋白質(經生物素化(Biotinylation)之 Peptide 公司之人類 sTWEAK 蛋白質；終濃度 200ng/mL)與融合瘤之培養上清液 30 $\mu$ L。在設定為 37 $^{\circ}$ C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱培養 1 小時後，在洗淨液(加入 0.1%牛血清之 HEPES 緩衝液)洗淨，添加 30 $\mu$ L 以稀釋液(加入 1%牛血清之 HEPES 緩衝液)稀釋成 2000 倍之辣根過氧化酶標識卵白素 (Streptavidin)(HRP-Streptavidin；Life Technologies 公司)。在設定為 37 $^{\circ}$ C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱培養 1 小時後，以洗淨液洗淨。加入化學發光檢出試藥之 POD(Roche 公司)，將其化學發光量以 EnVision 計數器(Perkin Elmer 公司)測定。

[0082]

(實施例 4：抗原 ELISA 鍵結分析)

本發明者們，為了測定抗體之抗原特異性鍵結活性，使用抗原 ELISA。將於人類 sTWEAK 蛋白質(Peptide 公司)0.5 $\mu$ g/mL 固相化於 384 孔培養板(Nunc 公司)。添加封鎖劑(Blocking One；NACALAITESQUE 公司)並在室溫靜置 1 小時後，以洗淨液(TBS-T：含有 0.05% Tween-20 之 Tris 緩衝液生理食鹽水(TBS)(pH7.4))洗淨，添加 30 $\mu$ L 之



融合瘤之培養上清液。室溫培養 1 小時後，在洗淨液洗淨，添加 30 $\mu$ L 以稀釋液(將 Blocking One 以磷酸緩衝液稀釋成 2 倍者)稀釋成 2000 倍之辣根過氧化酶標識山羊抗小鼠 Ig 抗體(HRP-goat anti-mouse Ig antibody；DAKO 公司)。室溫培養 1 小時後，以洗淨液洗淨。加入化學發光檢出試藥之 POD(Roche 公司)，將其化學發光量以 EnVision 計數器(Perkin Elmer 公司)測定。

[0083]

(實施例 5：人類 sTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制分析)

藉由 TWEAK 之刺激，從活性化 NF- $\kappa$ B，誘導 MCP-1 等趨化激素的表現，而誘發發炎反應(Nat Rev Drug Discov.2008；7(5)：411-425)，本發明者們，將 NF- $\kappa$ B 之活性化抑制作為指標，評價對於人類 sTWEAK 之抗體之中和活性。

[0084] 將 HEK293 細胞(ATCC：CRL-1573)(內在表現人類 TWEAK 受體)於實驗之 3 日前，以成為 4 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞/10cm 皿的方式，以 DMEM 培養基(Life Technologies 公司)於 10cm 皿(IWAKI 公司)以 17mL/皿播種，1 小時後，將 pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]Vector(Promega 公司)使用 Fugene HD(Promega 公司)導入細胞。藉此，可將 NF- $\kappa$ B 之活性化評價為螢光素酶(Luciferase)之活性指標。兩天後，回收細胞，以 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞/孔於 384 孔培養板(Greiner 公司)以 DMEM 培養基播種 30 $\mu$ L。加入 15 $\mu$ L 之來自融合瘤之抗體溶液(將融合瘤之培養上清液以蛋白質

G 管柱(Generon 公司)純化，以 DMEM 培養基稀釋之溶液)，在設定為 37°C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱靜置 5 分鐘。進而，添加以 DMEM 培養基調製之 15 $\mu$ L 人類 sTWEAK 蛋白質 (Peprotech 公司)溶液(終濃度 100ng/mL)、在設定為 37°C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱培養 5 小時。將培養上清液去除 20 $\mu$ L 之後，添加 40 $\mu$ L 之 One-Glo Luciferase Assay 溶液(Promega 公司)，於室溫攪拌 10 分鐘。之後，將化學發光量以 EnVision 計數器(Perkin Elmer 公司)測定。

[0085]

(實施例 6：人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制分析)

藉由 TWEAK 之刺激，活性化 NF- $\kappa$ B，誘導 MCP-1 等趨化激素的表現而誘發發炎反應，又，傳達訊息之最大活性與 sTWEAK 相比較，由於 mTWEAK 較強 (J Immunol.2010 ; 185(3) : 1593-1605 、 Br J Pharmacol.2013 ; 170(4) : 748-764)，故本發明者們，將 NF- $\kappa$ B 之活性化抑制作為指標，評價對於人類 mTWEAK 之抗體之中和活性。

[0086] 將 HEK293 細胞(ATCC：CRL-1573)於實驗之 3 天前以成為 4 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞/10cm 皿的方式，於 DMEM 培養基(Life Technologies 公司)以 10cm 皿(IWAKI 公司)以 17mL/ 皿播種，1 小時後，將 pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]Vector(Promega 公司)使用 Fugene HD(Promega 公司)導入細胞。藉此，可將 NF- $\kappa$ B 之活性化作為評價螢光素酶活性之指標。又，於實驗之 3 天前將 HEK293 細胞

(ATCC : CRL-1573)以成為  $4 \times 10^6$  細胞/10cm 皿的方式，於 DMEM 培養基(Life Technologies 公司)以 10cm 皿(IWAKI 公司)以 17mL/皿播種，1 小時後，將於實施例 1 所製作之人類 mTWEAK 表現載體使用 Fugene HD(Promega 公司)導入細胞。兩天後，導入 pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]Vector 回收 HEK293 細胞，以  $1 \times 10^4$  細胞/孔於 384 孔培養板(Greiner 公司)以 DMEM 培養基播種 30 $\mu$ L。加入 15 $\mu$ L 之來自融合瘤之抗體溶液(將融合瘤之培養上清液以蛋白質 G 管柱(Generon 公司)純化，並以 DMEM 培養基稀釋之溶液)，在設定為 37 $^{\circ}$ C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱靜置 5 分鐘。進而，將導入人類 mTWEAK 表現載體之 HEK293 細胞懸濁在 DMEM 培養基以成為  $5 \times 10^4$  細胞/孔的方式添加 15 $\mu$ L，在設定為 37 $^{\circ}$ C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱培養 5 小時。去除 20 $\mu$ L 培養上清液後，添加 40 $\mu$ L 之 One-Glo Luciferase Assay 溶液(Promega 公司)，於室溫攪拌 10 分鐘。之後，將化學發光量以 EnVision 計數器(Perkin Elmer 公司)測定。

[0087] 於實施例 3、4、5、及 6 之抗體的評價結果，清楚可知命名為 TBA3-25、TBA3-35、及 TBA4-1 之抗體(嵌合抗體)，對於人類 sTWEAK 及人類 mTWEAK 係具有高度鍵結活性及中和活性。

[0088]

(實施例 7：抗體之序列決定)

對於藉由前述之分析而被鑑定之抗體，本發明者們選

殖從融合瘤編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因。從各融合瘤萃取 RNA，使用 cDNA 擴增套組 (SMARTer RACE cDNA Amplification kit; Clontech 公司)，製作 cDNA。其次，使用 PCR，伸長及擴增重鏈及輕鏈之可變區。將此 PCR 產物以直接定序器 (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems 公司) 進行序列解析。又，將 PCR 產物對 pCR2.1-TOPO (Life Technologies 公司) 等 PCR 產物次選殖用載體進行重組後，解析基因序列以進行序列決定。

[0089] 抗體之序列決定後，為了提昇抗體之物性及安定性，對於前述之抗體 TBA3-35，於其重鏈及輕鏈之可變區導入胺基酸變異，製作抗體之改變體 (TBA3-35.1)。

[0090]

(實施例 8：完全人類型抗體之製作)

前述之抗體係可變區為來自人類，恆定區為來自小鼠之抗體。因此，本發明者們，使用 GS 載體 (Lonza 公司)，構築包含重鏈及輕鏈二基因之表現載體，製作完全人類型抗體。具體而言，於 TBA3-25、TBA3-35.1 及 TBA4-1 之各抗體之重鏈可變區基因之 5'側，將編碼訊息序列 (Nigel Whittle 們、Protein Engineering 1987; 1(6): 499-505.) 之基因，且於 3'側分別連接人類 Ig $\gamma$ 1 之恆定區基因 (由序列編號 2 之鹼基序號 355 至 1347 之鹼基序列所構成)，將此重鏈基因插入於 GS 載體 pEE6.4。又，於各抗體之輕鏈可變區基因之 5'側，將編碼訊息序列 (Nigel Whittle 們，前出) 之基因，且於 3'側分別連接人類  $\kappa$  鏈之

恆定區基因(由序列編號 4 之鹼基序號 325 至 645 之鹼基序列所構成)，此輕鏈基因插入於 GS 載體 pEE12.4。

[0091] 分別將所製作 TBA3-25 之完全人類型抗體(完全人類型 TBA3-25)之重鏈的鹼基序列示於序列編號 2，藉此將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 1，將該抗體之輕鏈之鹼基序列示於序列編號 4，藉此將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 3。序列編號 1 所示之重鏈之可變區係由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成，重鏈之 CDR1、CDR2、CDR3 係分別由序列編號 1 之胺基酸編號 31 至 35、50 至 66、99 至 107 之胺基酸序列所構成。序列編號 3 所示之輕鏈的可變區係由從序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成，輕鏈之 CDR1、CDR2、CDR3 係分別由序列編號 1 之胺基酸編號 24 至 34、50 至 56、89 至 97 之胺基酸序列所構成。

[0092] 分別將所製作之 TBA3-35.1 之完全人類型抗體(完全人類型 TBA3-35.1)之重鏈的鹼基序列示於序列編號 6，藉此將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 5，將該抗體之輕鏈之鹼基序列示於序列編號 8，藉此將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 7。序列編號 5 所示之重鏈之可變區係由序列編號 5 之胺基酸編號 1 至 125 之胺基酸序列所構成，重鏈之 CDR1、CDR2、CDR3 係分別由序列編號 5 之胺基酸編號 31 至 35、50 至 66、99 至 114 之胺基酸序列所構成。序列編號 7 所示之輕鏈之可變區係由序列編號 7 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成，輕鏈之

CDR1、CDR2、CDR3 係分別由序列編號 7 之胺基酸編號 24 至 34、50 至 56、89 至 97 之胺基酸序列所構成。

[0093] 分別將所製作之 TBA4-1 之完全人類型抗體 (完全人類型 TBA4-1) 之重鏈的鹼基序列示於序列編號 10，藉此將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 9，將該抗體之輕鏈之鹼基序列示於序列編號 12，藉此將所編碼之胺基酸序列示於序列編號 11。序列編號 9 所示之重鏈之可變區係由序列編號 9 之胺基酸編號 1 至 121 之胺基酸序列所構成，重鏈之 CDR1、CDR2、CDR3 係分別由序列編號 9 之胺基酸編號 31 至 35、50 至 66、99 至 110 之胺基酸序列所構成。序列編號 11 所示之輕鏈之可變區係由序列編號 11 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成，輕鏈之 CDR1、CDR2、CDR3 係分別由序列編號 11 之胺基酸編號 24 至 34、50 至 56、89 至 97 之胺基酸序列所構成。

[0094] 使用分別插入各抗體之重鏈與輕鏈基因之前述之 GS 載體，以一次性表現及恆常性表現之 2 種方法進行抗體表現。對於一次性表現，對於以 FreeStyle 293 Expression medium (Life Technologies 公司) 培養成約  $1 \times 10^6$  個/mL 之 FreeStyle 293 細胞 (Life Technologies 公司)，將前述之重鏈及輕鏈之雙表現載體使用轉染試藥之 293fectin (Life Technologies 公司) 進行轉染，培養 7 天。或者，對於約  $1 \times 10^7$  萬個之 CHO-K1SV 細胞，將前述之重鏈及輕鏈之雙表現載體使用電穿孔法進行轉染，於 CD-

CHO medium(Life Technologies 公司)中培養 14 天。將培養上清液使用蛋白質 A 或蛋白質 G(GEHealthcare Japan 公司)進行純化，得到各完全人類型抗體之純化抗體。對於恆常性表現，將分別插入各抗體之重鏈與輕鏈之基因之前述之 GS 載體以 NotI 與 PvuI 限制酶切斷，使用 Ligation-Convenience Kit(NIPPONGENE 公司)或 Ligation-high(TOYOBO 公司)進行結紮，構築插入重鏈與輕鏈之兩基因之 GS 載體。此表現載體已編碼完全長之重鏈及輕鏈與麩醯胺酸合成酶(Glutamine synthetase)，於 CHO-K1SV 細胞藉由轉染使抗體表現。將培養上清液以蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱(GEHealthcare Japan 公司)純化，得到各完全人類型抗體之純化抗體。分析經純化之完全人類型 TBA3-25 之胺基酸修飾之結果，純化抗體之大部分中，對重鏈 N 末端之麩醯胺酸的焦麩胺酸之修飾、及產生重鏈 C 末端離胺酸的缺失。

[0095]

(實施例 9：完全人類型抗體之對於人類 sTWEAK 之鍵結活性評價)

本發明者們，對於各完全人類型抗體，評價對於人類 sTWEAK 之鍵結活性。於本實施例，使用 huP2D10-2(專利文獻 1)作為比較抗體。

[0096] 將人類 sTWEAK 蛋白質(Peptidech 公司)以磷酸緩衝生理食鹽水(PBS(-))(未包含鈣與鎂之磷酸緩衝生理食鹽水)調製成 0.5 $\mu$ g/mL，固相化於 384 孔培養板(Nunc

公司)。將封鎖劑(Blocking One ; NACALAITESQUE 公司) 添加 120 $\mu$ l 並於室溫靜置 1 小時後，以洗淨液(TBS-T(pH7.4))洗淨。添加 30 $\mu$ L 以 PBS(-)調製完全人類型抗體(完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1 或完全人類型 TBA4-1)或 huP2D10-2 之稀釋系列(最終濃度為從 80nM 至 0.0000003nM 範圍為 15 階段)。室溫培養 1 小時後，在洗淨液洗淨，添加 30 $\mu$ L 以稀釋液(將 Blocking One 以磷酸緩衝液稀釋成 2 倍者)稀釋成 2000 倍之辣根過氧化酶標識山羊抗小鼠 Ig 抗體(HRP-goat anti-mouse Ig antibody ; DAKO 公司)。室溫培養 1 小時後，以洗淨液洗淨。加入 30 $\mu$ L 化學發光檢出試藥之 POD(Roche 公司)，將其化學發光量以 EnVision 計數器(Perkin Elmer 公司)測定，算出 EC50 值(表 1)。

表 1：完全人類型抗體之對於人類 sTWEAK 之鍵結活性

【表 1】

	EC50 ( $10^{-9}$ M)
完全人類型 TBA3-25	0.10
完全人類型 TBA3-35.1	0.08
完全人類型 TBA4-1	0.10
huP2D10-2	0.19

[0097] 其結果，非常清楚雖為完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1、及完全人類型 TBA4-1 之任一種，但具有與比較抗體 huP2D10-2 為同等以上之對於人類 sTWEAK 之鍵結活性。



[0098]

(實施例 10：完全人類型抗體之對於人類 mTWEAK 之鍵結活性評價)

本發明者們，對於各完全人類型抗體，評價對於人類 mTWEAK 之鍵結活性。於本實施例，使用 huP2D10-2 作為比較抗體。

[0099] 具體而言，在使用 BD FACSArray Bioanalyzer (Becton Dickinson 公司)之鍵結分析算出 EC50 值。將 HEK293 細胞(ATCC：CRL-1573)於實驗之 3 天前以成為  $4 \times 10^6$  細胞/10cm 皿的方式，於 DMEM 培養基(Life Technologies 公司)以 10cm 皿(IWAKI 公司)以 17mL/皿播種，1 小時後，將於實施例 1 所製作之人類 mTWEAK 表現載體使用 Fugene HD(Promega 公司)導入細胞。實驗當天，將導入人類 mTWEAK 表現載體之 HEK293 細胞以  $1 \times 10^5$  細胞/孔進行分注。並添加 30 $\mu$ L 以 FACS 緩衝液(加入 0.1%疊氮化鈉及 10%牛血清之磷酸緩衝液)調製完全人類型抗體(完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1 或完全人類型 TBA4-1)或 huP2D10-2 之稀釋系列(最終濃度為 80nM 至 0.001355nM 範圍為 11 階段)。於 4 $^{\circ}$ C 培養 6 小時後，以 FACS 緩衝液洗淨，加入 50 $\mu$ L 以 FACS 緩衝液稀釋成 100 倍之 PE 標識山羊抗人類 IgG(PE-goat anti-human IgG antibody；Jackson 公司)，於 4 $^{\circ}$ C 培養 1 小時。使用 BD FACSArray Bioanalyzer 測定 MFI(median fluorescence intensity)值，算出 EC50 值(表 2)。

表 2：完全人類型抗體之對於人類 mTWEAK 之鍵結活性

【表 2】

	EC50 (10 <sup>-9</sup> M)
完全人類型 TBA3-25	0.34
完全人類型 TBA3-35.1	0.31
完全人類型 TBA4-1	0.30
huP2D10-2	0.54

[0100] 其結果，清楚可知完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1、及完全人類型 TBA4-1 之任一種係具有與比較抗體 huP2D10-2 同等以上之對於人類 mTWEAK 之鍵結活性。

[0101]

(實施例 11：人類 sTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制分析)

本發明者們，對於各完全人類型抗體，使用 HEK293 細胞，評價對於人類 sTWEAK 之抗體之中和活性。於本實施例使用 huP2D10-2 作為比較抗體。本實施例除了取代來自融合瘤之抗體溶液，改添加 15 $\mu$ L 以 DMEM 培養基調製之各完全人類型抗體(完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1 或完全人類型 TBA4-1)或 huP2D10-2 之稀釋系列(最終濃度從 10000ng/mL 至 2.44ng/mL 之範圍為 7 階段)，其他依實施例 5 之方法進行。

[0102] 測定化學發光量後，算出對於各抗體之人類 sTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性之 IC50 值(表 3)。

表 3：人類 sTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制活性

【表 3】

	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
完全人類型 TBA 3-25	23.30
完全人類型 TBA 3-35.1	20.89
完全人類型 TBA 4-1	25.82
huP2D10-2	159.8

[0103] 其結果，清楚可知完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1、及完全人類型 TBA4-1 之任一種對於人類 sTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性，具有較比較抗體 huP2D10-2 更高的抑制作用。

[0104]

(實施例 12：人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制分析)

本發明者們，對於各完全人類型抗體，使用 HEK293 細胞，評價對於人類 mTWEAK 之抗體之中和活性。於本實施例，使用 huP2D10-2 作為比較抗體。本實施例除了取代來自融合瘤之抗體溶液，改添加 15 $\mu$ L 以 DMEM 培養基所調製之各完全人類型抗體(完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1 或完全人類型 TBA4-1)或 huP2D10-2 之稀釋系列(最終濃度為從 2000ng/mL 至 0.48ng/mL 之範圍為 7 階段)，依實施例 6 之方法進行。

[0105] 測定化學發光量後，算出對於各抗體之人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性之 IC<sub>50</sub> 值(表 4)。

表 4：人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性化抑制活性

【表 4】

	IC50 (ng/mL)
完全人類型 TBA3-25	34.17
完全人類型 TBA3-35.1	30.48
完全人類型 TBA4-1	37.69
huP2D10-2	691.2

[0106] 其結果，如表 4 及圖 1 所示，清楚可知相對於比較抗體 huP2D10-2 僅部分性抑制人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性，完全人類型 TBA3-25、完全人類型 TBA3-35.1、及完全人類型 TBA4-1 之任一種係完全抑制人類 mTWEAK 刺激 NF- $\kappa$ B 活性。

[0107]

(實施例 13：人類 sTWEAK 刺激 MCP-1 表現抑制分析)

本發明者們，將 MCP-1 基因之表現抑制作為指標，評價對於人類 sTWEAK 之抗體之中和活性。於本實施例，使用 huP2D10-2 及 TW305 之人類化抗體(專利文獻 3 之 Table 6B 所記載之 Antibody34)作為比較抗體。

[0108] 將人類近位尿管上皮細胞系 HK-2 細胞(ATCC：CRL-2190)(內在表現人類 TWEAK 受體)，於實驗當天以成為  $1 \times 10^5$  細胞/孔的方式，以 RPMI1640 培養基(Life Technologies 公司)於 96 孔培養板(IWAKI 公司)以  $120 \mu\text{L}$ /孔來播種。添加  $15 \mu\text{L}$  以 RPMI1640 培養基調製完全人類型 TBA3-25、huP2D10-2、或 Antibody34 之稀釋系列(最終濃度為從  $10000 \text{ ng/mL}$  至  $3.2 \text{ ng/mL}$  之範圍為 6 階

段)。添加 15 $\mu$ L 以 RPMI1640 培養基所調製之人類 sTWEAK 蛋白質 (Peptotech 公司) 溶液 (終濃度 300ng/mL)，在設定為 37°C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱培養 8 小時。去除培養上清液後，在 Cells-to-CT 套組 (Life Technologies 公司) 調製逆轉錄產物。對於其逆轉錄產物，使用 Taqman Gene Expression system (Life Technologies 公司) 及 Prism (Life Technologies 公司) 進行 MCP-1 基因 (ccl2) 量之測定。又，測定作為內在性對照之甘油醛-3-磷酸去氫酶 (gapdh) 基因量，修正 MCP-1 基因量。於此，使用 Hs00234140\_m1 作為 ccl2 之啟動子，使用 Hs02758991\_g1 (皆為 Life Technologies 公司) 作為 gapdh 之啟動子。

[0109] 測定 MCP-1 基因量後，算出對於各抗體之人類 sTWEAK 刺激 MCP-1 表現之 IC<sub>50</sub> 值 (表 5)。

表 5：人類 sTWEAK 刺激 MCP-1 表現抑制活性

【表 5】

	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
完全人類型 TBA 3-25	176.7
huP2D10-2	1327
Antibody 34	527.5

[0110] 其結果，如表 5 及圖 2 所示，清楚可知完全人類型 TBA3-25 相對於人類 sTWEAK 刺激 MCP-1 表現，係具有較比較抗體 huP2D10-2 及 Antibody34 更高的抑制作用。

[0111]

(實施例 14：人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現抑制分析)

本發明者們，將 MCP-1 基因之表現抑制作為指標，評價對於人類 mTWEAK 之抗體之中和活性。於本實施例，使用 huP2D10-2 及 Antibody34 作為比較抗體。

[0112] 於實驗之 3 天前將 HEK293 細胞(ATCC：CRL-1573)以成為  $4 \times 10^6$  細胞/10cm 皿的方式，於 RPMI1640 培養基(Life Technologies 公司)以 10cm 皿(IWAKI 公司)以 17mL/皿播種，1 小時後，將於實施例 1 所製作之人類 mTWEAK 表現載體使用 Fugene HD(Promega 公司)導入細胞。將 HK-2 細胞(ATCC：CRL-2190)於實驗當天以成為  $1 \times 10^5$  細胞/孔的方式，於 RPMI1640 培養基(Life Technologies 公司)於 96 孔培養板(IWAKI 公司)以 120 $\mu$ L/孔來播種。添加 15 $\mu$ l 於 RPMI1640 培養基調製完全人類型 TBA3-25、huP2D10-2、或 Antibody34 之稀釋系列(最終濃度為從 10000ng/mL 至 3.2ng/mL 之範圍為 6 階段)。將導入人類 mTWEAK 表現載體之 HEK293 細胞懸濁在 RPMI1640 培養基以成為  $5 \times 10^5$  細胞/孔的方式添加 15 $\mu$ L，在設定為 37 $^{\circ}$ C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱培養 8 小時。去除培養上清液後，在 Cells-to-CT 套組(Life Technologies 公司)調製逆轉錄產物。對於其逆轉錄產物，使用 Taqman Gene Expression system(Life Technologies 公司)及 Prism(Life Technologies 公司)進行 MCP-1 基因(cc12)量之測定。又，測定作為內在性對照之內 gapdh 基因量，修正 MCP-1 基因量。於此，使用 Hs00234140\_m1 作為

ccl2 之啟動子，使用 Hs02758991\_g1(皆為 Life Technologies 公司)作為 gapdh 之啟動子。

[0113] 測定 MCP-1 基因量後，算出對於各抗體之人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現之 IC50 值(表 6)。

表 6：人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現抑制活性

【表 6】

	IC50 (ng/mL)
完全人類型 TBA3-25	28.52
huP2D10-2	603.1
Antibody34	208.1

[0114] 其結果，如表 6 及圖 3 所示，清楚可知相對於比較抗體 huP2D10-2 及 Antibody34 僅部分抑制人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現，完全人類型 TBA3-25 係完全抑制人類 mTWEAK 刺激 MCP-1 表現。

[產業上之可利用性]

[0115] 本發明之抗人類 TWEAK 抗體係有用於人類 TWEAK 參與病態形成之各種疾病之預防或治療。

[序列表自由文字]

[0116] 於發現以下序列表之數字 <223>，記載「Artificial Sequence」之說明。具體而言，序列表之序列編號 2 及 4 所示之鹼基序列，係分別完全人類型 TBA3-25 之重鏈及輕鏈之鹼基序列，序列編號 1 及 3 所示之胺基酸序列係分別藉由序列編號 2 及 4 所編碼之重鏈及輕鏈之胺基酸序列

。序列表之序列編號6及8所示之鹼基序列係分別為完全人類型TBA3-35.1之重鏈及輕鏈之鹼基序列，序列編號5及7所示之胺基酸序列係分別藉由序列編號6及8所編碼之重鏈及輕鏈之胺基酸序列。序列表之序列編號10及12所示之鹼基序列係分別為完全人類型TBA4-1之重鏈及輕鏈之鹼基序列，序列編號9及11所示之胺基酸序列係分別藉由序列編號10及12所編碼之重鏈及輕鏈之胺基酸序列。序列表之序列編號14所示之鹼基序列係人類mTWEAK變異體之鹼基序列，序列編號13所示之胺基酸序列係人類mTWEAK變異體之胺基酸序列。序列表之序列編號15所示之胺基酸序列係本實施例所使用之人類sTWEAK蛋白質之胺基酸序列。



## 序列表

<110> Astellas Pharma Inc.  
 <120> Novel anti-human TWEAK antibody  
 <130> A14008TW  
 <150> JP2013-88129  
 <151> 2013-04-19  
 <160> 16  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> H-chain of anti-human TWEAK antibody  
 <400> 1  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ile Asp Leu  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asn Gly Glu Lys Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Gly Tyr Ser Tyr Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

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

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

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

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380

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

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 2  
<211> 1347  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> H-chain gene of anti-human TWEAK antibody

<400> 2  
caggtccaac tggtagcagtc tggggctgag gtaagaagc ctggggcctc agtgagggtc 60  
tcctgcaagg ttcccgata caccctcatt gatttatcca tgcactgggt gcgacaggct 120

cctggaaacg ggcttgaatg gatgggaggt tttgatcctg aaaatggtga aaaaatctac 180  
 gcggagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240  
 atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgttt attactgtgc aagtggatac 300  
 agctatggtc actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacagcctc 360  
 accaagggcc catcggctct cccctggca ccttcctcca agagcacctc tgggggcaca 420  
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480  
 tcaggcgcctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctacaggactc 540  
 tactccctta gtagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600  
 tgcaactgta atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct 660  
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720  
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 780  
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagcccgagg aggagcagta caacagcacg 900  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960  
 aagtgaagg tctccaaca agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc 1020  
 aaagggcagc cccgagaacc acagggtgac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggctct atcccagcga catcgcctg 1140  
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200  
 tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260  
 gggaactct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320  
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1347

<210> 3  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> L-chain of anti-human TWEAK antibody

<400> 3

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 4  
 <211> 645  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> L-chain gene of anti-human TWEAK antibody

<400> 4  
 gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggccagtc gaatttggg aggtgggtgg cctggatca acagaaaccg 120  
 gggaaagccc ctaacctct gatctataag gcgtctcgtt tagaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcaccag cctgcagcct 240  
 gatgatitg caacttatta ctgccaacag tataatagat attctcggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 5  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> H-chain of anti-human TWEAK antibody

<400> 5

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Asn Ser Gly Phe Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Val Gly Ile Ala Val Val Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe 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 Leu Leu 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

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> 6  
<211> 1368  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> H-chain gene of anti-human TWEAK antibody

<400> 6  
gaggatgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc caggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120  
ccaggggaagg ggtctggagtg ggtgtcagct attggttaata gtggttttta tacacactac 180  
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tactttgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gaaagtcggt 300  
atagcagtag ttggggacta ctaccagttc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360  
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tcccctggc accctcctcc 420  
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480  
ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540  
gtcctacagt cctcaggact ctactccctt agtagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600  
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660  
aagaaagtig agcccaaatic ttgtgacaaa atcacacat gccaccgtg cccagcacct 720

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 780  
 atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840  
 gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900  
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960  
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtcctcaaca aagccctccc agccccatc 1020  
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080  
 ccatcccgga atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140  
 tatcccagcg acatgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200  
 accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagaa gtcaccgtg 1260  
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320  
 cacaaccact acacgcagaa gaccctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1368

<210> 7  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> L-chain of anti-human TWEAK antibody

<400> 7

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 8  
 <211> 645  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> L-chain gene of anti-human TWEAK antibody

<400> 8  
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag ggtggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagttact gatctatggt gcatccagtt taaaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggtac tggcacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtctaca gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggagatcaa acggactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgicacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 9  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> H-chain of anti-human TWEAK antibody

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

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

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

Ala Ile Ile Ser Ser Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ile Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80



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

Ala Lys Asp Ser His Ile Ser Ile Phe Gly Ala Val Asp Ser Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

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

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

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

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
325 330 335

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 10  
<211> 1356  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> H-chain gene of anti-human TWEAK antibody

<400> 10  
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ggggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tctctgtcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggcgtg ggtggcaatt atatcatctg atggaataa taaatactat 180  
atagattccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acaacctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatagc 300  
catatttcca tttttggagc cgttgactcc tggggccagg gaacctggt caccgtctcc 360  
tcagcctcca ccaagggccc atcggcttcc cccctggcac cctcctcaa gaggacctc 420  
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg 480  
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc 540  
tcaggactct actcccttag tagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600  
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttag 660  
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacctgcc cagcacctga actcctgggg 720  
ggacctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 780  
cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag acctgagggt caagttcaac 840  
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcgga ggagcagtac 900  
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960  
aaggagtaca agtcaaggt ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc 1020  
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgiaca ccttgcccc atcccgggat 1080  
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgca aaggcttcta tcccagcgac 1140  
atgcccgtag agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200  
gtgctggact ccgacggctc ctctctcctc tacagcaagc tcacctgga caagagcagg 1260  
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctgca caaccactac 1320

accgagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga

1356

<210> 11  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> L-chain of anti-human TWEAK antibody

<400> 11

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 12  
 <211> 645  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-chain gene of anti-human TWEAK antibody

<400> 12  
 gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tacagagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggtc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa acggactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 13  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> human mTWEAK mutant

<400> 13

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro  
 1 5 10 15

Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu  
 20 25 30

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala  
 35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu  
 50 55 60

Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp  
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys  
 85 90 95

Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg  
 100 105 110

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

Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg  
 130 135 140

Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr  
 145 150 155 160

Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp  
 165 170 175

Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser  
 180 185 190

Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val  
 195 200 205

Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr  
 210 215 220

Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly  
 225 230 235 240

Leu Phe Gln Val His  
 245

<210> 14  
 <211> 738  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> gene of human mTWEAK mutant

<400> 14  
 atggccgccc gtcggagcca gaggcggagg gggcgcgggg gggagccggg caccgcccctg 60  
 ctggtcccgc ttgcgctggg cctgggacctg gcgctggcct gcctcggcct cctgctggcc 120  
 gtggtcagtt tggggagccg ggcacgcctg tccgccagg agcctgcccc ggaggagctg 180  
 gtggcagagg aggaccagga cccgtcggaa ctgaatcccc agacagaaga aagccaggat 240  
 cctgcgcctt tctgaaccg actagttagt gcacctaaag gccggaaaac acgggctcga 300  
 agagcgatcg cagcccatta tgaagttcat ccacgacctg gacaggacgg agcgcaggca 360  
 ggtgtggacg ggacagttag tggctgggag gaagccagaa tcaacagctc cagccctctg 420  
 cgctacaacc gccagatcgg ggagtttata gtcacccggg ctgggctcta ctacctgtac 480  
 tgcaggatgc actttgatga ggggaaggct gtctacctga agctggactt gctggtggat 540  
 ggtgtgctgg ccctcgcctg cctggaggaa ttctcagcca ctgcggccag ttccctcggg 600  
 ccccagctcc gcctctgcca ggtgtctggg ctgttggccc tgcggccagg gtcctccctg 660  
 cggatccgca ccttcccctg ggcccatctc aaggctgccc ccttcctcac ctacttcgga 720  
 ctcttccagg ttactga 738

<210> 15  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> human sTWEAK

<400> 15

Met Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr  
 1 5 10 15

Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp  
 20 25 30

Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro  
 35 40 45

Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly  
 50 55 60

Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val  
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys  
 85 90 95

Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu  
 100 105 110

Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser  
 115 120 125

Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe  
 130 135 140

Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His  
 145 150

<210> 16

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro  
 1 5 10 15

Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu  
 20 25 30

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala  
 35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu  
 50 55 60

Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp  
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro  
 85 90 95

Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu  
 100 105 110

Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly  
 115 120 125

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu  
 130 135 140

Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu  
 145 150 155 160

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr  
 165 170 175

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu  
 180 185 190

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg  
 195 200 205

Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu  
 210 215 220

Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu  
 225 230 235 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His  
 245

## 申請專利範圍

1. 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 118 之胺基酸序列所構成之重鏈可變區、及由序列編號 3 之胺基酸編號 1 至 108 之胺基酸序列所構成之輕鏈可變區。

2. 如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體，其中，前述抗體之重鏈恆定區為人類 Ig $\gamma$ 1 恆定區。

3. 如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體，其中，前述抗體之輕鏈恆定區為人類 Ig $\kappa$  恆定區。

4. 如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體，其中，前述抗體之重鏈恆定區為人類 Ig $\gamma$ 1 恆定區，前述抗體之輕鏈恆定區為人類 Ig $\kappa$  恆定區。

5. 如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 所示之胺基酸序列所構成之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

6. 一種聚核苷酸，其係包含編碼如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列。

7. 一種聚核苷酸，其係包含編碼如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列。

8. 一種表現載體，其係包含如請求項 6 及/或 7 之聚核苷酸。

9. 一種經如請求項 8 之表現載體而形質轉換之宿主細胞，其係選自由以下之(a)~(d)所構成之群；

(a)經下述表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載



體為包含：包含編碼如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；

(b)經下述兩表現載體，而形質轉換之宿主細胞，該兩表現載體之一為包含：包含編碼如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸，另一為包含：包含編碼該抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；

(c)經下述表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體為包含：包含編碼如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸；及

(d)經下述表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體為包含：包含編碼如請求項 1 之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈可變區之鹼基序列之聚核苷酸。

10. 一種經如請求項 8 之表現載體而形質轉換之宿主細胞，其係選自由以下之(a)~(d)所構成之群；

(a)經下述表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體為包含：包含編碼如請求項 5 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸；

(b)經下述兩表現載體，而形質轉換之宿主細胞，該兩表現載體之一為包含：包含編碼如請求項 5 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸，另一為包含：包含編碼該抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸；

(c)經下述表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體為包含：包含編碼如請求項 5 之抗人類 TWEAK 抗體之重鏈之鹼基序列之聚核苷酸；及

(d)經下述表現載體而形質轉換之宿主細胞，該表現載體為包含：包含編碼如請求項 5 之抗人類 TWEAK 抗體之輕鏈之鹼基序列之聚核苷酸。

11. 一種生產抗人類 TWEAK 抗體之方法，其係包含培養如請求項 9 或 10 之宿主細胞，使其表現抗人類 TWEAK 抗體之步驟。

12. 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係以如請求項 11 之方法生產。

13. 一種抗人類 TWEAK 抗體，其係包含由序列編號 1 之胺基酸編號 1 至 447 之胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩醯胺酸被焦麩胺酸修飾之重鏈、及由序列編號 3 所示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

14. 一種醫藥組成物，其係包含如請求項 1、12 或 13 之抗人類 TWEAK 抗體及藥學上所容許之賦形劑。

圖式

圖 1

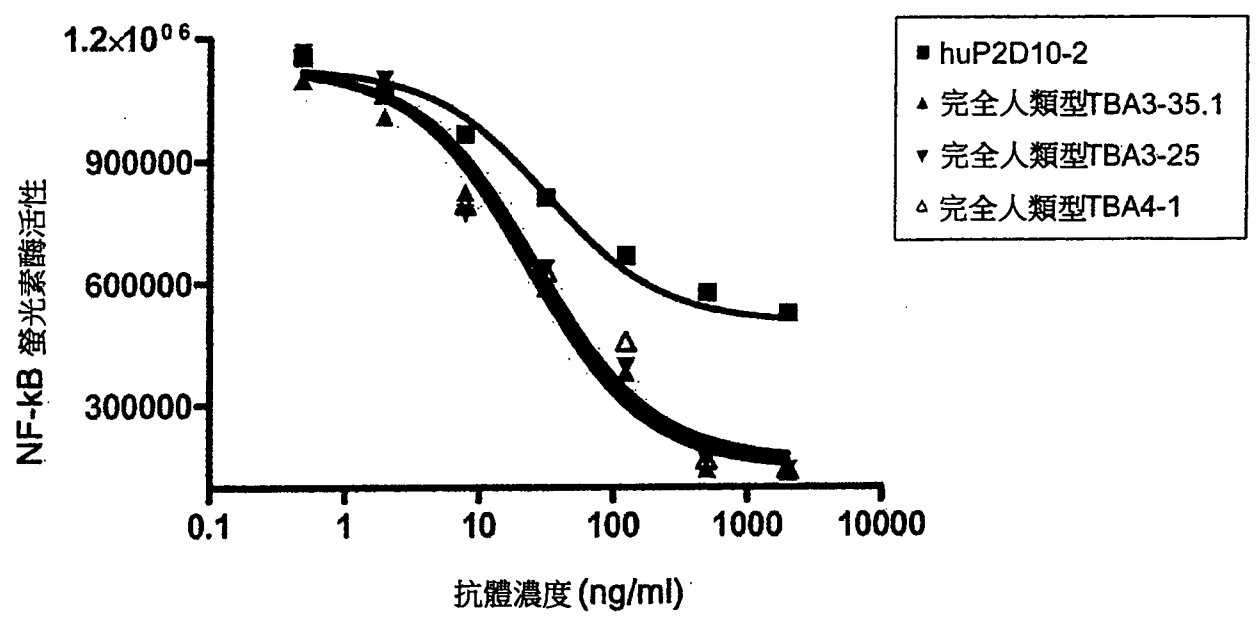


圖 2

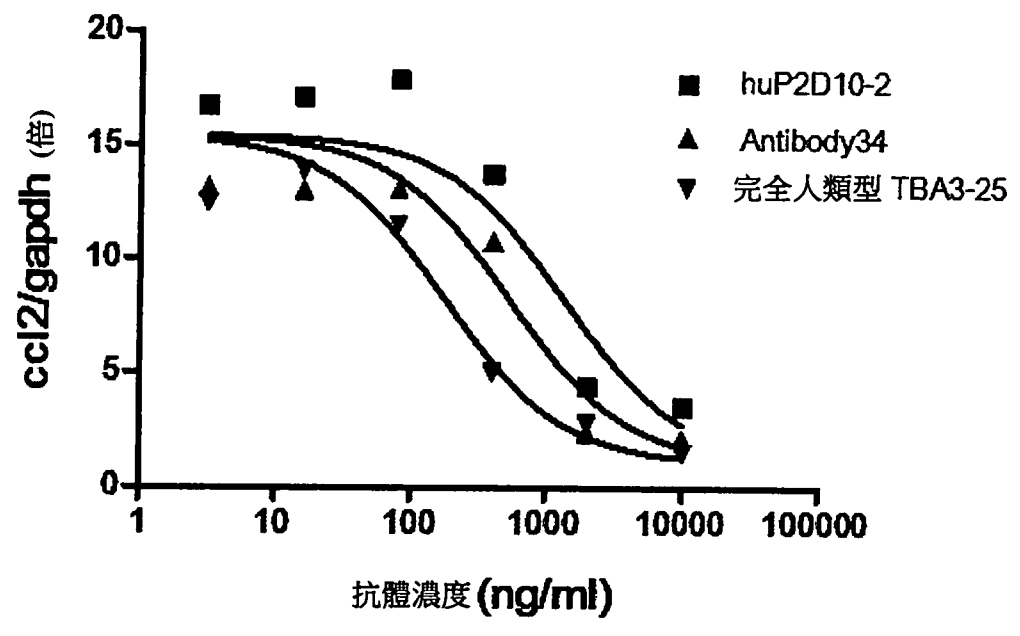


圖 3

