



(21)申請案號：105135374

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 01 日

(51)Int. Cl.：

*A61K45/06 (2006.01)**A61K31/16 (2006.01)**A61K31/404 (2006.01)**A61K31/7068(2006.01)**A61K31/713 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2015/11/02

歐洲專利局

15306743.4

(71)申請人：妮翠斯製藥公司(法國)NETRIS PHARMA (FR)

法國

(72)發明人：格蘭登 美樂蒂 GRANDIN, MELODIE (FR)；丹提 羅伯特 DANTE, ROBERT

(FR)；梅倫 派翠克 MEHLEN, PATRICK (FR)；第波 史蒂芬妮 DEPIL,

STEPHANE (FR)；古楊 喬登 GUYON, JORDAN (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：9 共 108 頁

(54)名稱

NTN1 中和劑與抑制後生控制之藥物之組合治療

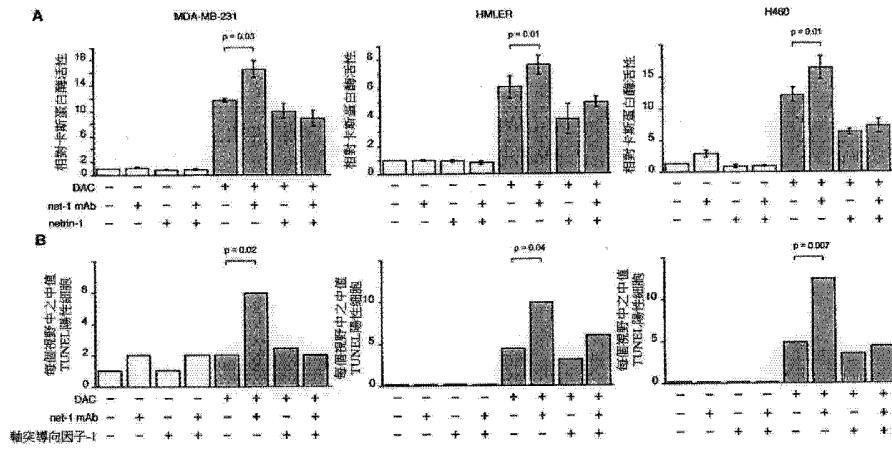
COMBINATION THERAPY OF NTN1 NEUTRALIZING AGENT WITH DRUGS INHIBITING
EPIGENETIC CONTROL

(57)摘要

本發明係關於一種醫藥或抗癌組合物，其可用於治療具有 NTN1、UNC5H 或 DAPK1 之表現之 DNA 甲基化依賴性損失之癌症。本發明亦關於一種治療此等癌症之方法。該組合物包含後生藥物及 NTN1 中和劑或能夠活體內表現 NTN1 中和劑之載體，其等係含在醫藥上可接受之載劑或媒劑中。該 NTN1 中和劑(諸如，與軸突導向因子-1 或軸突導向因子-1 受體結合之抗體)促進軸突導向因子-1 受體誘導之細胞凋亡。該後生藥物可為 DNA 甲基轉移酶抑制劑或 HDAC 抑制劑。

The pharmaceutical or anticancerous composition is useful in treating a cancer having a DNA methylation dependent loss of expression of NTN1, UNC5H or DAPK1. The invention also relates to a method of treatment of such cancers. The composition comprises an epigenetic drug and a NTN1 neutralizing agent or a vector capable of expressing a NTN1 neutralizing agent in vivo, in a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle. The NTN1 neutralizing agent, such as an antibody binding to netrin-1 or to a netrin-1 receptor, promotes netrin-1 receptors-induced apoptosis. The epigenetic drug may be a DNA methyltransferase inhibitor or an HDAC inhibitor.

指定代表圖：



【圖2】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

NTN1 中和劑與抑制後生控制之藥物之組合治療

【英文發明名稱】

COMBINATION THERAPY OF NTN1 NEUTRALIZING AGENT
WITH DRUGS INHIBITING EPIGENETIC CONTROL

【技術領域】

本發明係關於新穎醫藥或抗癌組合物。該等組合物可用於治療具有 NTN1、UNC5H 或 DAPK1 之表現之 DNA 甲基化依賴性損失之癌症。本發明亦關於一種治療此等癌症之方法。

【先前技術】

最近關注所謂的可限制癌症發展之依賴性受體。與大多數細胞受體對比，在其各自配體之存在下，其等可提供典型的正訊號，然而，缺少配體會觸發一連串導致凋亡性細胞死亡之訊號傳導事件。該蛋白質家族已成長且現包括超過二十個成員。該等原型依賴性受體為與所分泌的軸突導向因子-1(NTN1)(在九十年代初期描述之最早的吸引人的軸突導向因子)結合且現已證實展現許多生物功能之受體。該等受體為結腸直腸癌缺失蛋白(Deleted in Colorectal Carcinoma)(DCC)及非協調性-5-同源蛋白(Uncoordinated-5-Homologs)(UNC5H1-4/A-D)。已證實該等受體在配體限制之情況中觸發細胞凋亡之能力會限制腫瘤發展，且因此，在小鼠模型中，UNC5H3、DCC之失活或DCC誘導之細胞凋亡域之突變係與腫瘤發展相關。與該等觀測一致，就腫瘤逃逸機制而言，在許多癌症中，DCC及UNC5H係藉由雜合性喪失(loss-of-heterozygosity)或後生機制中任一者而

沉默(Hedrick等人，1994；Shin等人，2007；Bernet等人，2007)。或者，在一些其他癌症中，NTN1之自分泌表現藉由消除腫瘤對微環境中的NTN1可利用性之依賴而提供相似的腫瘤生長選擇性優勢(Llambi等人，2001)。NTN1之此種獲得可代表治療干預之機會：中斷NTN1結合至其受體將誘導凋亡性細胞死亡。已使用若干癌細胞及動物模型在活體外及活體內得到該概念之證據。

然而，大部分人類腫瘤看起來保留NTN1受體之表現而未得到NTN1表現，此表明依賴性受體(DR)促細胞凋亡路徑發生改變(Mian等人，2011；Krimpenfort等人，2012；Shin等人，2007)。在癌症中，後生修飾通常與抗細胞凋亡蛋白之表現增加及涉及細胞凋亡之執行的成員失活相關聯(Baylin及Ohm，2006)。照此，以往的著作已顯示DAPK1(造成UNC5H誘導之細胞凋亡之絲胺酸蘇胺酸激酶(Llambi等人，2005；Guenebeaud等人，2010))於各種癌症中係下調的(Raval等人，2007；Pulling等人，2009；Kilinc等人，2012)。其他機理分析已顯示位於DAPK1啟動子區域的CpG島狀物(CGi)之超甲基化與其下調之間存在直接關係(Raval等人，2007；Pulling等人，2009；Kilinc等人，2012；Mian等人，2011)，及在細胞系中，地西他濱(decitabine)(5-氮雜-2'-去氧胞苷，DAC)處理會抑制DAPK1啟動子的DNA甲基化且恢復DAPK1依賴性促細胞凋亡路徑(Lund等人，2011)。

現已明確確立癌症中DNA甲基化之重要意義(Jones, 2002；Jones, 1999)。此外，染色質修飾在癌症發展中具有重要作用。此等當中最重要的是可控制基因活性之組蛋白之共價修飾。DNA甲基化與組蛋白修飾之間之相互作用係最先由(Nan, 1998及Jones, 1998)之實驗確立，(Nan,

1998及Jones, 1998)證實胞嘧啶甲基化可在染色質壓實及基因沉默期間將經甲基化之DNA結合蛋白質及組蛋白脫乙酰酶吸引至經甲基化之CpG島狀物。

後生改變現被視作腫瘤發生中之重要事件。為此，已在過去的幾十年間開發若干後生藥物(表觀治療藥(epidrug))，且目前美國已將五種分子商業化為抗癌藥。DNMT1抑制劑：地西他濱(5'氮雜-2-去氧胞苷)及氮雜胞苷(Azacitidine)(5'氮雜胞苷)；該等分子為核苷類似物。HDAC(組蛋白脫乙酰酶)抑制劑：例如羧肟酸，諸如伏立諾他(Vorinostat)(SAHA)及貝林司他(Belinostat)；及環肽，諸如羅咪酯肽(Romidepsin)。

已提出DNA甲基化之抑制以對抗癌症。地西他濱在若干臨床試驗中顯示抗白血病效應且已由FDA批准用於治療脊髓發育不良症候群。然而，雖然最新的研究指出地西他濱在臨床前模型中顯示某些效應(Tsai等人，2012)，但將地西他濱用作單治療劑似乎不是治療實體腫瘤之有效方法(Nebbio等人，2012)。

已提出組合治療。例如，US 8,530,445揭示DNA甲基轉移酶抑制劑(例如阿札胞苷(azacitidine)或地西他濱)與1-(2-C-氰基-2-二氧基-β-D-阿拉伯戊呋喃糖基)-N4-棕櫚醯基胞嘧啶之組合。WO 02/067681揭示DNA甲基化抑制劑與抗癌藥物(其用作活體內抗癌藥物之活性受到異常DNA甲基化不利影響)之組合。

藥物組合之效應本質上係無法預期的。通常存在一種藥物部分地或完全地抑制另一藥物之效應之傾向。本發明係基於以下之意外觀測：藉由地西他濱或阿札胞苷抑制DNA甲基化會恢復與NTN1依賴性受體訊號傳導死亡通路相關之促細胞凋亡機制及將地西他濱或阿札胞苷與NTN1中和抗

體組合可實現小鼠中活體外腫瘤細胞死亡及腫瘤生長抑制。意外缺少任何此種拮抗劑干擾對於臨床應用而言具關鍵性且在假設該等藥物中之一者根據本發明以逆轉一些基於抑制促細胞凋亡通路之癌症之選擇性優勢之本發明內文中係顯著的。相反地，根據本發明之組合允許逆轉與NTN1受體相關之促細胞凋亡通路之抑制作用。該觀測之驚人性質係先前技術的例外。此為在人類及動物中進行組合治療尤其以誘導NTN1依賴性受體介導之癌細胞細胞凋亡開關道路。

【發明內容】

在第一態樣中，本發明提供一種組合，其包含至少一種後生藥物(或抑制後生控制之藥物)及至少一種NTN1中和劑。該後生藥物可為DNA甲基化之抑制劑(諸如DNA甲基轉移酶(DNMT)抑制劑(較佳DNMT1抑制劑或DNMT1抑制劑之混合物))、或具有組蛋白抑制活性之抑制劑(諸如HDAC抑制劑或HDAC抑制劑之混合物)、或DNMT1及HDAC抑制劑之混合物。NTN1中和劑可尤其係結合至NTN1之抗體。

第二態樣提供一種醫藥組合物，其包含與醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑混合之根據本發明之組合。

第三態樣係關於根據本發明之組合，其用於治療癌症。

第四態樣係關於一種以根據本發明之組合於製備用於治療癌症之藥物中之用途。

第五態樣係關於一種醫藥組合物，其包含呈同時、連續或分開用於治療(尤其用於治療癌症)之組合製劑形式之至少一種後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶及/或HDAC抑制劑)及至少一種NTN1中和劑。

第六態樣係關於一種用於治療癌症之方法，該方法包括同時、連續

或分開投與足量之至少一種後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶及/或HDAC抑制劑)及至少一種NTN1中和劑至個體。

第七態樣係關於一種供使用的後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶或HDAC抑制劑)或一種後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶或HDAC抑制劑)之用途，其用於製備用於治療癌症之藥物中，其中該治療包括同時、連續或分開投與NTN1中和劑至個體。

第八態樣係關於一種供使用之後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶或HDAC抑制劑)之用途或一種後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶或HDAC抑制劑)之用途，其用於製備用於治療癌症之藥物中，其中該後生藥物係與NTN1中和劑呈組合治療形式使用。

第九態樣係關於供使用的NTN1中和抗體或一種NTN1中和劑之用途，其用於製備用於治療癌症之藥物中，其中該治療包括同時、連續或分開地投與後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶或HDAC抑制劑)至個體。

第十態樣係關於一種供使用之NTN1中和劑之用途或一種NTN1中和劑之用途，其用於製備用於治療癌症之藥物中，其中該NTN1中和劑係與後生藥物(尤其係DNA甲基轉移酶或HDAC抑制劑)呈組合治療形式使用。

本發明之第十一態樣係一種供使用之NTN1中和劑之用途或一種NTN1中和劑之用途，其用於事先使腫瘤發生軸突導向因子-1成癮。

【圖式簡單說明】

圖1. 癌細胞系中之NGS甲基化圖譜。

A：用抗DAPK1、UNC5B及軸突導向因子-1之抗體免疫染色來自人類乳癌之組織微陣列(70個切片)。根據軸突導向因子-1之表現程度將樣本以四分位數分類。利用Chi2檢定比較軸突導向因子-1表現組之第一個及第

四個四分位數中DAPK1及UNC5B之表現程度(由展現陽性染色之切片之百分比建構的指數)。

B：表現高(第一個四分位數)或低程度(第四個四分位數)之NTN1及高或低程度之UNC5B之樣本及DAPK1轉錄本(樣本總數，97)之數量。低程度之NTN1轉錄本與低程度之DAPK1轉錄本相關聯(Chi2檢定， $p = 0.03$)。

C：已藉由RRBS(源自編碼資料庫之資料)測定人類乳腺上皮細胞(HMEC)甲基化圖譜。就其他細胞系而言，甲基化圖譜係由MeDP-定序實驗獲得：MDA-MB231、HMLER及H460細胞系。定序後，資料以bigwig格式獲得。峰代表在整合基因組瀏覽器(IgB)中所觀測到的結合對輸入結果。槓指示CpG島狀物在基因啟動子(從UCSC獲得之資料)處之預測位置。黑色平面方形指示寫碼外顯子而小的指示5' UTR區。灰色方形指示焦磷酸定序的CpG之位置。

(上方)：NTN1啟動子區之DNA甲基化圖譜。存在DNA甲基化圖譜之根據細胞系及核苷酸位置之變化。全局地，NTN1 CpG島狀物在HMEC細胞中係未甲基化的而其在三種其他細胞系中(尤其在MDA-MB231中)高度甲基化。

(中間)：UNC5B啟動子區之DNA甲基化圖譜。UNC5B CpG島狀物在所測試的各細胞系中係未甲基化的。不存在UNC5B表現調節中涉及DNA甲基化之明顯證據。

(下方)：DAPK1啟動子位點之DNA甲基化圖譜。DAPK1 CpG島狀物在HMEC中係未甲基化的，在MDA-MB231細胞中高度甲基化，但僅CpG島狀物之3'區在兩種HMLER及H460細胞系中均甲基化。據推測，

CpG島狀物之3'區之DNA甲基化與人類細胞系中之基因表現之間存在可能相關性。

(D-F)經地西他濱(DAC)處理(72小時，10 μ M)或未處理之人類癌細胞系中之基因表現。

使用總RNA及特異性人類DAPK1、UNC5B及NTN1引子進行定量即時RT-PCR。基因表現係以管家基因PBGD之表現之百分比顯示。

D：MDA-MB231中之基因表現圖譜：在該等細胞中，DAPK1得以完全表現而UNC5B及NTN-1係以極低程度表現。於去甲基化劑處理後，3個感興趣基因之表現速率明顯增加。

E：HMLER細胞中之基因表現圖譜；DAPK1在未處理之細胞以及NTN-1中係未表現的，但去甲基化劑細胞處理再誘導此兩種基因表現。UNC5B係在該細胞中於地西他濱處理之前及之後表現。

F：在H460細胞中，DAPK1及NTN1係以極低程度表現及依賴性受體UNC5B得以完全表現。於地西他濱處理後，DAPK1及NTN-1二者之表現具重要性地增加，及UNC5B之表現無統計學差異。

圖2. NTN1阻斷抗體「net-1 mAb」在低甲基化乳癌及肺癌細胞系中觸發細胞凋亡。用地西他濱(DAC，10 μ M，72小時)及/或net-1 mAb(10 μ g/mL，48小時)及/或重組NTN1(5 μ g/mL，48小時)處理MDA-MB-231、HMLER及H460細胞系。(A)在3個獨立實驗中測定卡斯蛋白酶-3活性，誤差槓，SEM；p-值、雙尾非成對學生t檢定。(B) 3個獨立實驗之TUNEL；p-值，曼惠特尼檢定(Mann Whitney test)。

圖3. 地西他濱(DAC)處理上調涉及軸突導向因子-1受體訊號傳導通路且(當與軸突導向因子-1阻斷抗體組合時)觸發免疫功能不全小鼠中

MDA-MB-231及H460異種移植植物之細胞凋亡之基因。

將腫瘤異種移植植物固定於福爾馬林中，用石蠟包埋，切成4 mm的切片。

(A及C) 藉由每個治療組4個獨立腫瘤之免疫組織化學染色測定DAPK1、UNC5B及神經軸突導向因子-1之表現程度，且表示為總腫瘤表面之百分比；p值，曼惠特尼檢定。

(B及D) 使用抗裂解卡斯蛋白酶-3之抗體測定每mm²中細胞之經活化卡斯蛋白酶-3中值數量及藉由TUNEL測定每mm²中細胞之DNA片段化中值數量；每個治療組4個獨立腫瘤之平均值；p值，曼惠特尼檢定。

(E-H)軸突導向因子-1中和抗體(NP01-014)與低劑量地西他濱(DAC)之組合減慢免疫功能不全小鼠中之腫瘤細胞生長。

(E)及(G)，具有預確立的MDA-MB-231及H460腫瘤之小鼠之治療方案之示意性代表圖。當腫瘤達到100 mm³時，小鼠經皮下注射地西他濱(0.4 mg/kg)或PBS及/或經腹膜內注射net1-mAb(10 mg/kg)。

(F)及(H)一週兩次測定腫瘤體積。藉由雙尾非成對學生t檢定測定PBS組與DAC + net1-mAb組之間之差異之統計學顯著性。(C)及(F)處理結束3天後測定腫瘤重量。藉由雙尾非成對學生t檢定測定組間差異之統計學顯著性。誤差槓，SEM。

圖4：用於實驗部分中之引子序列。

圖5 (A)藉由每個治療組至少3個獨立腫瘤之免疫組織化學染色測定石蠟包埋的腫瘤異種移植植物中DAPK1、UNC5B及軸突導向因子-1之表現程度，且表示為總腫瘤表面之百分比；p值，曼惠特尼檢定。

(B)測定經處理之異種移植植物中每mm²中細胞之裂解卡斯蛋白酶-3及

DNA片段化中值數；每個處理組至少3個獨立腫瘤之平均值；p值，曼惠特尼檢定。

(C-D) net-1 mAb與地西他濱(DAC)之組合降低免疫功能不全小鼠中之人類乳腺腫瘤。(C)麻醉後，在小鼠肩胛間區中植入 $\approx 60 \text{ mm}^3$ 患者衍生的腫瘤移植物。當腫瘤達到120-150 mm^3 時，小鼠經皮下注射地西他濱(0.4 mg/kg)或PBS及/或經腹膜內注射net-1 mAb (10 mg/kg)或人類IgG1對照同型抗體(Ctrl IgG1, 10 mg/kg)。箭頭指示處理期(21天)。

(D)一週兩次測定腫瘤體積。n=7隻小鼠/組。藉由雙尾非成對學生t檢定測定DAC+ Ctrl IgG1組與DAC + net1-mAb組之間之差異之統計學顯著性，*p < 0.001。誤差槓，SEM。

圖6：用地西他濱(DAC, 10 μM , 72小時)及/或NET1-H-mAb(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48小時)及/或同型mAb(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48小時)處理細胞。在3個獨立實驗中測定PI染色(A)及細胞凋亡指數(B)，誤差槓，SEM；p值，雙尾非成對學生t檢定。

(C)使用抗裂解卡斯蛋白酶-3之抗體測定每 mm^2 中細胞之經活化卡斯蛋白酶-3中值數量及

(D)藉由TUNEL檢定測定每 mm^2 中細胞之DNA片段化中值數量；每個處理組4個獨立腫瘤之平均值；p值，曼惠特尼檢定。

(E)具有預確立的H460皮下腫瘤之小鼠之治療方案之示意性代表圖。當腫瘤達到100 mm^3 時，小鼠經皮下注射地西他濱(0.5 mg/kg)或PBS及/或經腹膜內注射NET1-H-mAb(10 mg/kg)或同型mAb(10 mg/kg)。

(F)一週兩次測定腫瘤體積。藉由雙尾非成對學生t檢定測定DAC + 同型mAb組與DAC + NET1-H-mAb組之間之差異之統計學顯著性。

圖7. 經HDAC抑制劑處理或未處理之人類癌細胞系中之基因表現

使用總RNA及特異性人類DAPK1、UNC5B及NTN1引子進行定量即時RT-PCR。基因表現係以管家基因PBGD之表現之百分比顯示。

A：經曲古抑菌素A(trichostatin A)處理之MDA-MB-231細胞中之基因表現圖譜。處理後，NTN1及UNC5B之表現速率以劑量依賴方式顯著增加。

B：經伏立諾他處理之MDA-MB-231細胞中之基因表現圖譜。處理後，NTN1及UNC5B之表現速率以劑量依賴方式顯著增加。

C：經帕比司他(panobinostat)處理之MDA-MB-231細胞中之基因表現圖譜。處理後，DAPK1、NTN1及UNC5B之表現速率相比媒劑(DMSO)以劑量依賴方式顯著增加。

D：用帕比司他(20 nM，48小時)及/或net1-mAb (10 µg/mL，48小時)處理MDA-MB-231細胞並測定細胞死亡之程度。

圖8：活體外DNA甲基化抑制及功能性結果。

(A) 氮雜胞苷處理於活體外對DAPK1、UNC5B及NTN1之效應。72小時後藉由Q-RT-PCR測定經PBS或2 µM氮雜胞苷(Aza)每天處理之H460細胞中之基因表現；使用PBGD表現程度作為內部對照。(B-C)用氮雜胞苷(Aza，2 µM，72小時)、net1-mAb (10 µg/mL，48小時)或重組軸突導向因子-1 (5 µg/mL，48小時)單獨地或如所示以組合方式處理H460細胞。在3個獨立實驗中測定卡斯蛋白酶-3活性及細胞死亡率。誤差槓，SEM；p值，雙尾未成對學生t檢定，除了TUNEL檢驗以外，其中p值：曼惠特尼檢定。

圖9：活體內DNA甲基化、血管生成及增殖。

源自經PBS或地西他濱處理之小鼠之H460異種移植腫瘤。(A)血管表現程度，及(B)藉由免疫組織化學染色，使用源自每個處理組4個獨立腫瘤之CD31及KI67抗體，測定細胞增殖，且表示為總腫瘤表面之百分比或增殖及非增殖細胞之間的比率；p值，曼惠特尼檢定。(C)腫瘤重量；藉由雙尾非成對學生t檢定測定組間差異之統計學顯著性。誤差槓，SEM。

【實施方式】

在大部分人類癌症中，NTN1係上調的，且經由自分泌，阻斷經由其所謂的依賴性受體DCC及UNC5H所引起的細胞凋亡且藉此促進腫瘤發展。然而，在其他癌症中，該依賴性受體死亡通路之選擇性抑制依賴於受體或下游促細胞凋亡效應子蛋白質中任一者之沉默。發明者在此處證實大部分人類乳腺腫瘤展現NTN1及DAPK1(已知可轉導NTN1依賴性受體促細胞凋亡通路之絲胺酸蘇胺酸激酶)之表現之同時DNA甲基化依賴性損失。低NTN1癌細胞中藉由藥物(諸如地西他濱)抑制DNA甲基化會恢復NTN1及DAPK1二者之表現。因此，在不同的動物模型中，地西他濱與NTN1沉默策略或與抗-NTN1中和抗體之組合促進腫瘤細胞死亡且有效地阻斷腫瘤生長。因此，DNA甲基化抑制劑與NTN1中和劑之組合似乎為對抗癌症之有價值策略。

此外，在研究人類癌症中依賴性受體通路之後生變化期間，已獲得初步結果，表明組蛋白修飾可在乳腺腫瘤細胞系中DAPK1、UNC5B(亦稱為UNC5H2)及NTN1之轉錄抑制中發揮作用。

在一個實施例中，後生藥物及NTN1抑制劑之組合係尤其用於展現NTN1、或UNC5H(尤其係UNC5B)、或DAPK1之表現之DNA甲基化依賴性損失、或NTN1、UNC5H(尤其係UNC5B)及DAPK1中任何兩者或三者之表現之同時DNA甲基化依賴性損失之癌症上。

在另一個實施例中，該組合係用於表現一或若干NTN1受體諸如DCC

及/或UNC5H(尤其係UNC5B)之每一種癌症上，其中存在逃避NTN1受體介導之細胞凋亡之現象。

在一個較佳實施例中，後生藥物(諸如DNA甲基轉移酶抑制劑或HDAC抑制劑)及NTN1中和劑之組合可逆轉具有NTN1及DAPK1之表現之DNA甲基化依賴性損失之癌症中與NTN1受體相關之促細胞凋亡通路之抑制。

在另一個較佳實施例中，該組合可實現其中NTN1係上調的且阻斷經由其依賴性受體所引起的細胞凋亡之癌症中癌細胞之NTN1受體介導之細胞死亡或細胞凋亡有效。

如下所述之較佳實施例可適用於本發明之所有上述態樣。

癌症

本發明涉及的第一組癌症類型為其特徵展現NTN1、或UNC5H(尤其係UNC5B)或DAPK1之表現之同時DNA甲基化依賴性損失或NTN1、UNC5H(尤其係UNC5B)及DAPK1中任何兩者或三者之表現之同時DNA甲基化依賴性損失之癌症。

確定展現NTN1、UNC5H(尤其係UNC5B)及/或DAPK1之表現之同時DNA甲基化依賴性損失之癌症之方法可包括使用基於常規的方法或研究如所舉例NTN1、UNC5H(尤其係UNC5B)及DAPK之啟動子之直接甲基化之更具體方法(參見圖1A及對應之描述)分析甲基化組(methylome)。

此等癌症之一些實施例包括乳癌、非小細胞肺癌、侵襲性神經母細胞瘤、胰腺癌、原發性黑色素瘤、黑色素瘤轉移、卵巢癌、神經膠質母細胞瘤、急性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、侵襲性B細胞淋巴瘤、肉瘤、腎腺癌、頭頸癌、睪丸癌(例如胚胎癌、畸胎瘤、卵黃囊瘤(yolk sac tumors))、腎癌、胃癌、子宮癌。

本發明涉及的第二組癌症類型為其特徵係NTN1阻斷經由其依賴性受

體所引起的細胞凋亡(此一般係由於癌細胞或基質上調NTN1所致)之癌症。確定細胞表面是否表現NTN1依賴性受體DCC及/或UNC5且顯示NTN1之大量存在或NTN1基因表現之上調之方法係此項技術中所熟知的且包括(但不限於)FACS(螢光活化之細胞分選)之IHC(免疫組織化學)、定量PCR(例如,利用六聚物啟動之cDNA)或者與基於發色染料之蛋白質檢測技術(諸如銀或考馬斯藍(coomassie blue)染色)或溶液中或凝膠上蛋白質之基於螢光-及發光之檢測方法配對的西方墨點、墨點法及微陣列(諸如免疫染色)、以及免疫沉澱、ELISA、微陣列、RNA定序(RNA-seq)及質譜法。在本發明內文中,欲治療之癌症之實例列於本文中,包括任一上述癌症之難治愈形式。相對於正常組織或不過度表現NTN1之相似癌症,NTN1過度表現可因此使用如彼等本文所揭示並提供之引子之適宜引子藉由RT-PCR測定。

此等癌症之一些實施例包括轉移性乳癌、非小細胞肺癌、侵襲性神經母細胞瘤、胰腺癌、原發性黑色素瘤、黑色素瘤轉移、卵巢癌、神經膠質母細胞瘤、急性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、侵襲性B細胞淋巴瘤、肉瘤、腎腺癌、頭頸癌、睪丸癌(例如胚胎癌、畸胎瘤、卵黃囊瘤)、腎癌、胃癌、子宮癌。

NTN1中和劑

NTN1中和劑為干擾軸突導向因子-1與軸突導向因子-1受體相互作用,較佳阻斷軸突導向因子-1與其受體結合之能力、或干擾軸突導向因子-1誘導軸突導向因子-1受體二聚合或多聚合之能力之藥物。熟習此項技術者可參考以引用方式併入本文中的WO2007/099133,其揭示干擾軸突導向因子-1與其受體,減少或抑制軸突導向因子-1與受體之相互作用或結合,或減小或抑制軸突導向因子-1誘導軸突導向因子-1受體二聚合或多聚合(藉此促進軸突導向因子-1受體誘導之細胞凋亡)之能力。

在一個實施例中，該NTN1中和劑為係雙鏈RNA(dsRNA)(即，其可具有10個至50個核苷酸之長度)且減少編碼軸突導向因子-1之基因之表現之小干擾RNA或siRNA。第一鏈之部分與靶基因互補，亦即，其具有足以與靶基因雜交之互補性，例如，存在與靶基因或其一部分至少80%之同一性。AP：人類軸突導向因子-1 mRNA序列寄存編號：NM_004822。可使用的siRNA序列：序列NM_004822之第94-114位胺基酸。

在第二實施例中，該NTN1中和劑為與軸突導向因子-1結合且使得該軸突導向因子-1無法與其受體結合或誘導軸突導向因子-1受體(尤其係DCC及/或UNC5)之二聚合/多聚合之分子(例如抗體、多肽、小分子及類似物)。

在第三實施例中，該NTN1中和劑為與軸突導向因子-1受體結合(此結合使得NTN1受體介導之細胞凋亡)之分子(例如抗體、多肽、小分子及類似物)。特定言之，該NTN1中和劑抑制NTN1與受體之結合或受體之二聚合/多聚合。軸突導向因子-1受體可尤其係DCC、UNC5A、UNC5B、UNC5C或UNC5D。

抗-NTN1抗體

在一個較佳實施例中，該NTN1中和劑為與軸突導向因子-1結合之抗體。其較佳為與軸突導向因子-1特異性結合之多株或單株抗體。

NTN1多株抗體可尤其藉由藉助所選胺基酸序列使動物(諸如兔、小鼠等)免疫，收集且接著耗盡(例如)於含受體的免疫吸附劑上依本身為熟習此項技術者已知的方法獲得之抗血清。

軸突導向因子-1胺基酸序列係如SEQ ID NO:1上所描繪及軸突導向因子-1可全部或部分地用於設計抗體。

一般而言，可藉由Köhler及Milstein(Nature, 1975, 256(5517):495-7)所述之淋巴細胞融合及融合瘤培養之習知方法來獲得單

株抗體。亦已知其他用於製備單株抗體之方法(Harlow等人編，1988「Antibodies: a laboratory manual」)。可藉由使哺乳動物(例如小鼠、大鼠、兔或甚至人類等)免疫且使用淋巴細胞融合技術得到融合瘤(Köhler及Milstein，1975)來製備單株抗體。存在此習知技術之替代技術。可例如藉由表現從融合瘤選殖之核酸來製造單株抗體。亦可藉由將抗體的cDNA引入載體(其通常為在噬菌體表面處展現基因庫V之絲狀噬菌體(例如大腸桿菌之fUSE5，Scott，1990))中之噬菌體顯示技術來製造抗體。構築該等抗體庫之方案述於Marks等人(1991)中。對應於具有訊號肽(SEQ ID NO:2)之全長軸突導向因子-1或其適宜片段之cDNA可依該等方法用於製造單株抗體。

在一個較佳實施例中，該NTN1中和抗體為揭示於WO2015/104360中者，該文獻係以引用的方式併入本文中。其為與具有胺基酸序列SEQ ID NO:3或35或其變體之NTN1抗原決定基或多肽特異性結合之抗體。該等抗體具有與NTN1結合之性質且經由UNC5或DCC受體引起腫瘤細胞之細胞死亡或細胞凋亡。該等抗體較佳為單株抗體。後文中將描述抗體之各種形式(包括片段及其組合)。

在一個實施例中，基於IMGT CDR的定義，該抗體包含序列SEQ ID NO:5之CDR1-H、序列SEQ ID NO:6之CDR2-H、序列SEQ ID NO:7之CDR3-H、序列SEQ ID NO:8之CDR1-L、序列YAS之CDR2-L及序列SEQ ID NO:9之CDR3-L。基於Kabat CDR的定義，該抗體包含序列SEQ ID NO:28之CDR1-H、序列SEQ ID NO:29之CDR2-H、序列SEQ ID NO:30之CDR3-H、序列SEQ ID NO:31之CDR1-L、序列SEQ ID NO:32之CDR2-L及序列SEQ ID NO:9之CDR3-L。

在第一個系列之實施例中，本發明之多肽或抗體包含胺基酸序列SEQ ID NO:10、11、12或13。通常，其包含序列SEQ ID NO:10及11二

者、或SEQ ID NO:12及13二者。

在第二系列之實施例中，抗體係人類化的。較佳地，其包含選自SEQ ID NO:14至19 (VL)之群及/或選自SEQ ID NO:20至27 (VH)之群之胺基酸序列。通常，該抗體係人類化的且包含選自SEQ ID NO:14至19之群之胺基酸序列及選自SEQ ID NO:20至27之群之胺基酸序列。

具體實施例為下述人類化抗體。該表中所最先列出者對應於將鼠科CDR移植至人類IgG1中。稱為HUM的其他抗體為具有可變人類架構區之單株抗體。在一個典型實施例中，使用HUM03。該表亦給出人類IgG1之CH及CL之參考。

	VH SEQ ID NO :	恆定重鏈	VL SEQ ID NO :	恆定輕鏈
CDR移植物(移植至人類IgG1中之鼠科CDR)	19	人類IgG1 (GenBank : 經 AEL33691.1 修飾 之R97K)	27	人類IgG1 (GenBank : CAC20459.1)
HUM01	20	人類IgG1	14	人類IgG1
HUM02	21	人類IgG1	15	人類IgG1
HUM03	22	人類IgG1	16	人類IgG1
HUM04	23	人類IgG1	17	人類IgG1
HUM05	24	人類IgG1	17	人類IgG1
HUM06	25	人類IgG1	16	人類IgG1
HUM07	26	人類IgG1	17	人類IgG1
HUM08	22	人類IgG1	17	人類IgG1
HUM09	25	人類IgG1	18	人類IgG1
HUM10	21	人類IgG1	16	人類IgG1

NTN1受體多肽

在另一個實施例中，該藥物為含軸突導向因子-1受體之胞外域或該

胞外域之片段之化合物。例如，軸突導向因子-1受體之胞外域或該胞外域之片段之胺基酸序列以UniProt序列ID提供[胞外域位置範圍]：UNC5A：Q6ZN44[aas 26-306、或片段34-240]；UNC5B：Q8IZJ1[aas 27-377或片段29-244]；UNC5C：O95185[aas 41-380或片段61-258]；UNC5D：Q6UXZ4[aas 33-379]；DCC：P43146[aas 26-1097]。該藥物可與軸突導向因子-1結合。軸突導向因子-1受體可為DCC、UNC5A、UNC5B、UNC5C或UNC5D。

在一個實施例中，該胞外域或其部分係與抗體Fc部分結合。在一個較佳實施例中，該Fc部分為人類IgG之Fc或其部分。該人類IgG可為即IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在一個較佳實施例中，該IgG為IgG1。

在一個實施例中，該融合蛋白為單鏈，此意指該蛋白質係由包含DCC之第四個或第五個纖維蛋白樣域或UNC5之兩個Ig樣域及改良該化合物之醫藥參數之肽或蛋白質序列之兩個Ig樣域或分別由其組成之DCC或UNC5片段製成。

在另一個較佳實施例中，該融合蛋白為雙鏈，此意指該融合蛋白係由各包含DCC之第四個或第五個纖維蛋白樣域或UNC5之兩個Ig樣域及抗體Fc部分之兩個Ig樣域或分別由其組成之兩個鏈製成，其中兩個鏈係連在一起(較佳由一或多個(例如兩個)二硫鍵)。

在一個實施例中，該藥物包含DCC之第五個纖維蛋白域(Fn5或5Fbn)。較佳地，該藥物包含含此Fn5與抗體Fc部分之融合之DCC融合蛋白。在一個較佳實施例中，該Fc部分為人類IgG之Fc或其部分。該人類IgG可即IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在一個較佳實施例中，該IgG為IgG1。可例如從NCBI依ID 1630(如2012年7月14日所更新)得到該DCC基因，其編碼為Uniprot P43146 (在2012年7月11日進行更新)的DCC受體蛋白質。可用於本發明中且包含Fn5之DCC融合蛋白述於WO2012025618

中，該案係以引用的方式併入本文中。在一個實施例中，該融合蛋白具有WO2012025618中胺基酸序列SEQ ID NO:2、3或4。在一個實施例中，該融合蛋白係由WO2012025618中DNA序列SEQ ID NO:1編碼。含Fn5之融合蛋白之其他實例為述於WO2007099133中的具有麩胱甘肽-S-轉移酶(DCC-5Fbn-GST)之DCC-5-纖連蛋白融合蛋白。

在一個實施例中，該藥物包含UNC5之兩個Ig樣域。較佳地，該藥物包含含UNC5之兩個融合至抗體Fc部分之Ig樣域之UNC5融合蛋白。該人類IgG可為即IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在一個較佳實施例中，該IgG為IgG1。在一個實施例中，UNC5為UNC5A。在另一個實施例中，UNC5為UNC5B。在另一個實施例中，UNC5為UNC5C。在又一個實施例中，UNC5為UNC5D。

在一個實施例中，該UNC5A融合中之UNC5A蛋白質包含WO2014/041088中SEQ ID NO:1之胺基酸20至217或由其組成，該文件係以引用的方式併入本文中。該融合蛋白可進一步包含含該SEQ ID NO:1之胺基酸220至446之IgG1 Fc或由其組成。該Fc係例如經連接子諸如GT融合至UNC5A蛋白質。在一個實施例中，本發明係關於含該SEQ ID NO:1之胺基酸序列：Kappa2訊號肽序列：aas 1至19；UNC5A之Ig樣域：aas 20至217；連接子：aas 218-219；人類IgG1 Fc：aas 220至446或由其組成之UNC5A蛋白質之UNC5A融合。在一個實施例中，成熟融合蛋白不包含Kappa2訊號肽序列。在一個較佳實施例中，該融合蛋白為雙鏈。本發明亦包含具有在20-217胺基酸序列、或該SEQ ID NO:1之胺基酸20-446之全長上等於或大於90%，較佳大於96、95、94、93、92或91%之同一性百分比之變體序列。胺基酸代換可例如發生在20-217胺基酸序列或該SEQ ID NO:1之全長上位置9、72、74、87、144、164、170、193及/或210中之一或幾個位置。

在另一個實施例中，UNC5B融合中之UNC5B蛋白質包含WO2014/041088中SEQ ID NO:2之胺基酸20至215或由其組成。該融合蛋白可進一步包含含該SEQ ID NO:2之胺基酸218至444之IgG1 Fc或由其組成。該Fc係例如經連接子諸如GT融合至UNC5B蛋白質。在一個實施例中，本發明係關於含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列：Kappa2訊號肽序列：aas 1至19；UNC5B之Ig樣域：aas 20至215；連接子：aas 216-217；人類IgG1 Fc：aas 218至444或由其組成之UNC5B蛋白質之UNC5B-融合。在一個實施例中，成熟融合蛋白不包含Kappa2訊號肽序列。在一個較佳實施例中，該融合蛋白為雙鏈。本發明包含具有在20-215位胺基酸序列、或該SEQ ID NO:2之胺基酸20-444之全長上等於或大於90%，較佳大於96、95、94、93、92或91%之同一性百分比之變體序列。胺基酸代換可例如發生在20-215位胺基酸序列、或該SEQ ID NO:2之全長上位置29、74、100、109、113、146、149、155、172、184、189、201、213及/或214中之一或幾個位置。

在又一個實施例中，UNC5C融合中之UNC5C蛋白質包含WO2014/041088中SEQ ID NO:3之胺基酸20至217或由其組成。該融合蛋白可進一步包含含該SEQ ID NO:3之胺基酸220至446之IgG1 Fc或由其組成。該Fc係例如經連接子諸如GT融合至UNC5C蛋白質。在一個實施例中，本發明係關於含該SEQ ID NO:3之胺基酸序列：Kappa2訊號肽序列：aas 1至19；UNC5C之Ig樣域：aas 20至217；連接子：aas 218-219；人類IgG1 Fc：aas 220至446或由其組成之UNC5C蛋白質之UNC5C融合。在一個實施例中，成熟融合蛋白不包含Kappa2訊號肽序列。在一個較佳實施例中，該融合蛋白為雙鏈。本發明包含具有在20-217胺基酸序列、或該SEQ ID NO:3之胺基酸20-446之全長上等於或大於90%，較佳大於96、95、94、93、92或91%之同一性百分比之變體序列。胺基酸代換

可例如發生在20-217胺基酸序列、或該SEQ ID NO:3之全長上位置33、66、109、129、136、178、189及/或211中之一或幾個位置。

在又一個實施例中，UNC5D融合中之UNC5D蛋白質包含WO2014/041088中SEQ ID NO:4之胺基酸20至217或由其組成。該融合蛋白可進一步包含含該SEQ ID NO:4之胺基酸220至446之IgG1 Fc或由其組成。該Fc係例如經連接子諸如GT融合至UNC5D蛋白質。在一個實施例中，本發明係關於含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列：Kappa2訊號肽序列：aas 1至19；UNC5D之Ig樣域：aas 20至217；連接子：aas 218-219；人類IgG1 Fc：aas 220至446或由其組成之UNC5D蛋白質之UNC5D融合。在一個實施例中，成熟融合蛋白不包含Kappa2訊號肽序列。在一個較佳實施例中，該融合蛋白為雙鏈。本發明包含具有在20-217位胺基酸序列、或該SEQ ID NO:4之胺基酸20-446之全長上等於或大於90%，較佳大於96、95、94、93、92或91%之同一性百分比之變體序列。胺基酸代換可例如發生在20-217位胺基酸序列、或該SEQ ID NO:4之全長上位置38、79、80、115、131、178、186、201及/或212中之一或幾個位置。

載體

本發明可改成投與編碼其等多肽之核酸替代多肽本身。可照常使用能夠在患者中表現多肽之載體。

可將本發明之核酸分子選殖至載體中。熟習此項技術者可參考描述載劑及製備載劑之方法及其用途之WO2007/099133及WO2014/041088，其等可用於實施本發明。術語「載體」如本文中所使用尤其指質體、黏質體、病毒、噬菌體及其他的通常用於遺傳工程中之載體。在一個較佳實施例中，該等載體適用於轉化細胞、真核細胞(例如真菌細胞)、微生物之細胞(諸如酵母或原核細胞)。在一個尤佳實施例中，此等載體適用於穩定地轉化細菌細胞，例如，以轉錄本發明之核酸分子。例如，該載體可為

pUC18。特定言之，WO2007/099133揭示表現基於DCC之融合蛋白之載體，諸如，WO2007/099133之實例1中識別為7800及7809之載體。本發明因此提供WO2012025618中編碼SEQ ID NO:2、3或4之融合蛋白之載體、或WO2012025618中包含DNA序列SEQ ID NO:1之載體，以用於DCC融合蛋白。

WO2014/041088亦提供包含本發明之編碼如本文中所述且提供之融合蛋白之核酸分子之載體(諸如pUC18)。只要其與UNC5相關，本發明因此關於含編碼以下各物的核酸分子的載體例如pUC18：SEQ ID NO:1之融合在一起之胺基酸20-217及220-446、或序列SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:2之融合在一起之胺基酸20-215及218-444、或序列SEQ ID NO:2；SEQ ID NO:3之融合在一起之胺基酸20-217及220-446、或序列SEQ ID NO:3；或SEQ ID NO:4之融合在一起之胺基酸20-217及220-446、或序列SEQ ID NO:4。特定言之，本發明提供包含含SEQ ID NO :5之核苷酸序列73-666、或SEQ ID NO :6之73-660、或SEQ ID NO :7之73-666或SEQ ID NO :8之73-666之核酸分子之載體(諸如pUC18)。該等載體亦包含SEQ ID NO :9之核苷酸序列，尤其核苷酸7-693。一般而言，該載體可在真核寄主細胞中表現該核酸分子。該等「SEQ ID NO:」係指彼等揭示於WO2014/041088中者。

意欲放入根據本發明之組合物中之多肽較佳係藉由重組方法來製造。較佳地，蛋白質表現係在真核細胞中，隨後分離多肽且通常純化至醫藥上可接受之純度。就蛋白質表現而言，藉由標準方法將編碼其蛋白質之核酸插入表現載體中。在適宜的穩定真核寄主細胞(諸如CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞)中進行表現，且從該等細胞(上清液或細胞溶解後之細胞)回收蛋白質。HEK293細胞似乎極適合該目標且形成特定實施例。

在一個實施例中，本發明之核酸分子、及/或用來選殖本文中所述之多核苷酸之載體可經轉導、轉化或轉染或以其他方式引入至寄主細胞中。例如，該寄主細胞為真核或原核細胞，較佳係真核細胞。作為一非限制性實例，該寄主細胞為哺乳動物細胞。本文中所述之寄主細胞意欲尤其適用於產生本發明中所述且提供之UNC5融合蛋白。

一般而言，上文中所述之寄主細胞可為包含本發明中所提供之核酸分子或本文中所述之載體之原核或真核細胞(較佳係真核細胞)或衍生自該細胞且包含本文中所述核酸分子或載體之細胞。在一個較佳實施例中，該寄主細胞包含(即，經基因改造)本發明之核酸分子或本文中所述之載體以使得其包含本發明之整合至基因組中之核酸分子。例如，本文中所述之此種寄主細胞可為人類、酵母或真菌細胞。在一個特定態樣中，該寄主細胞能夠轉錄本發明之核酸分子。欲用於產生本文中所述寄主細胞之不同對應表現系統之實例的概述例如包含於Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516 ; Bitter (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544) ; Sawers (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996) ; Billman-Jacobe(Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4) ; Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463) ; 及Griffiths (Methods in Molecular Biology 75 (1997) , 427-440) 中。可藉由諸如例如述於 Sambrook 及 Russell(2001), Molecular Cloning :A Laboratory Manual, CHS Press, Cold Spring Harbor, NY USA ; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990中之標準方法進行以本發明之核酸分子或本文中所述之載體轉化或基因改造寄主細胞。

含本文中所述之核酸分子或本文中所述之載體之寄主細胞可為 HEK293 細胞 或 HEK293-Freestyle 細胞 (人類胚胎腎細胞系 293 ,

Invitrogen)。本發明因此提供一種用於生產如本文中所提供且描述之DCC及UNC5融合蛋白之方法。該方法包括在尤其如本文中所述之適宜寄主細胞中表現如本文中所提供且描述之核酸分子，且從該細胞或細胞培養上清液回收DCC或UNC5-融合蛋白之步驟。

DNA甲基轉移酶抑制劑

在一個較佳實施例中，該DNA甲基轉移酶抑制劑(或DNA甲基化抑制劑)為核苷類似物，特定言之係胞嘧啶類似物(諸如阿札胞苷及地西他濱)。據該技術解釋，將核苷類似物併入至DNA中且接著與DNA甲基轉移酶形成自殺型共價複合物。現有的核苷類似物之各種實施例(參考US 8,530,445及J. Fahy等人，Expert Opin. Ther. Patents 2012, 22(12):1427-1442，二者係以引用的方式併入本文中)為5-氮雜胞苷(阿札胞苷；商標名稱Vidaza)；5-氮雜-2'-去氧胞苷(地西他濱；商標名稱Dacogen)；紮布拉林(Zebularine)；5,6-二氫-5-阿札胞苷；5-氟-2'-去氧胞苷；5-氮雜胞苷之前藥(諸如NPEOC-DAC)、N4胺基官能受2-(對硝基苯基)乙氧基羰基(其係藉由細胞羧酸酯酶移除)保護之5-氮雜胞苷衍生物；CP-4200(阿札胞苷之反油酸酯)；地西他濱之前藥，諸如地西他濱-對-去氧烏苷(SGI-110)。

在一個較佳實施例中，該DNA甲基轉移酶抑制劑為阿札胞苷，包括相比阿札胞苷具有相似效應之前藥或其衍生物。

在另一個較佳實施例中，該DNA甲基轉移酶抑制劑為地西他濱，包括相比阿札胞苷具有相似效應之前藥或其衍生物。

在另一個較佳實施例中，該DNA甲基轉移酶抑制劑(或DNA甲基化抑制劑)為非核苷類似物；亦可參考US 8,530,445及J. Fahy等人)。該化合物可例如選自普魯卡因胺(procainamide)、普魯卡因(procaine)、聯胺胍(hydralazine)、((-)-表沒食子酸兒茶素-3-沒食子酸酯(EGCG)、RG108(亦稱為N-鄰苯二甲醯基-1-色胺酸)、SGI-1027。

HDAC抑制劑

在一個實施例中，該HDAC抑制劑為具有組蛋白抑制活性之羧胺酸，例如伏立諾他(SAHA)、曲古抑菌素A、帕比司他或貝林司他，或為具有組蛋白抑制活性之環肽(諸如羅咪酯肽)。

定義及本發明之其他實施例、變體及替代：

如本文中所使用，「與參考序列至少85%同一性之」序列為在其全長上與參考序列之全長具有85%或更大，特定言之90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%序列同一性之序列。

「序列同一性」百分比可藉由比較兩個序列(最佳於比較窗上比對)來確定，其中該多肽序列在比較窗中之部分相較參考序列(其不包括新增或缺失)可包括新增或缺失(即空位)以最佳比對這兩個序列。該百分比係藉由以下方式來計算：確定兩個序列中出現相同胺基酸殘基之位置的數量以得到匹配位置的數量，將相匹配位置的數量除以比較窗中位置的總數，及結果乘以100以得到序列同一性百分比。藉由全部逐對比對，例如，使用Needleman及Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*48:443之演算法，實施比較序列之最佳比對。序列同一性百分比可例如使用程式Needle以及BLOSUM62矩陣及隨後的參數空位-開放=10、空位-延伸=0.5輕易地確定。

在本發明內文中，「保守性胺基酸代換」為其中胺基酸殘基經另一具有具有相似化學性質(例如，帶電或疏水性)之側鏈基之胺基酸殘基代換之代換。一般而言，保守性胺基酸代換實質上將不改變蛋白質之功能性。含有具有相似化學性質之側鏈之胺基酸之群組之實例包括1)脂族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；2)脂族羥基側鏈：絲胺酸及蘇胺酸；3)含醯胺側鏈：天冬醯胺及麩醯胺酸；4)芳族側鏈：苯丙胺酸、

酪胺酸及色胺酸；5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸及組胺酸；6)酸性側鏈：天冬胺酸及麩胺酸；及7)含硫側鏈：半胱胺酸及甲硫胺酸。保守性胺基酸代換基團為：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸-色胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩胺酸-天冬胺酸，及天冬醯胺-麩醯胺酸。

在本申請案通篇中，術語「包含」應解釋為涵蓋所有具體提到的特徵以及可選額外未指定的特徵。如本文中所使用，術語「包含」的使用亦揭示其中不存在除了具體提到的特徵以外的特徵(即「由...組成」)之實施例。

「抗體」可為兩個重鏈經二硫鍵彼此連接且各重鏈經二硫鍵與輕鏈連接之天然或習知抗體。輕鏈存在兩種類型，拉目達(λ)及卡帕型(κ)。存在五個主要重鏈類別(或同型)，其等確定抗體分子之功能性活性：IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。各鏈包含不同序列域。輕鏈包括兩個域或區：可變域(VL)及恆定域(CL)。重鏈包括四個域：一個可變域(VH)及三個恆定域(CH1、CH2及CH3，統稱為CH)。輕鏈(VL)及重鏈(VH)二者之可變區決定結合識別及對抗原之特異性。輕鏈(CL)及重鏈(CH)之恆定區域賦予重要的生物性質，諸如抗體鏈締合、分泌、跨胎盤遷移性、補體結合、及與Fc受體(FcR)之結合。Fv片段為免疫球蛋白之Fab片段之N端部分且由一個輕鏈及一個重鏈之可變部分組成。抗體之特異性在於抗體結合位點與抗原決定子之間的結構互補性。抗體結合位點係由主要選自超變或互補決定區(CDR)之殘基組成。有時，選自非超變或架構區(FR)之殘基會影響總體域結構且因此影響結合位點。

「互補決定區」或「CDR」係指共同限定天然免疫球蛋白結合位點之天然Fv區之結合親和力及特異性之胺基酸序列。免疫球蛋白之輕鏈及重鏈各具有三個CDR，分別表示為CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L、及CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。習知的抗體抗原結合位點因此包含六個

CDR，包括選自重鏈及輕鏈V區中之各者之CDR組。

「架構區」(FR)係指內插於CDR之間之胺基酸序列，即，係指免疫球蛋白輕鏈及重鏈可變區之在單一物種之不同免疫球蛋白中相對保守之部分。免疫球蛋白之輕鏈及重鏈各具有四個FR，分別表示為FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L、及FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

如本文中所使用，「人類架構區」為與天然生成人類抗體之架構區實質上相同(約85%、或更大(特定言之90%、95%、97%、99%或100%))之架構區。

在本發明內文中，意欲基於IMGT定義(Lefranc等人 (2003) Dev Comp Immunol.27(1):55-77; www.imgt.org)來確定免疫球蛋白輕鏈或重鏈中之CDR/FR定義。

如本文中所使用，術語「抗體」表示習知抗體及其片段、以及單域抗體及其片段(特定言之單域抗體之可變重鏈)及嵌合、人類化、雙特異性或多特異性抗體。

如本文中所使用，抗體或免疫球蛋白亦包括「單域抗體」，其已在最近描述且係互補決定區為單域多肽之部分之抗體。單域抗體之實例包括重鏈抗體、天然缺少輕鏈之抗體、衍生自習知四鏈抗體之單域抗體、經基因改造之單域抗體。單域抗體可衍生自任何物種，包括(但不限於)小鼠、人類、駱駝、駱馬、山羊、兔及牛。單域抗體可為天然生成單域抗體(稱為缺少輕鏈之重鏈抗體)。特定言之，駱駝科(例如駱駝、單峰駝、駱馬、羊駝及原駝)產生天然缺少輕鏈之重鏈抗體。駱駝科重鏈抗體亦缺少CH1域。

該等缺少輕鏈之單域抗體之可變重鏈在相關技術中稱為「VHH」或「奈米抗體」。類似於習知VH域，VHH包含四個FR及三個CDR。奈米抗體具有超越習知抗體之優點：其等比IgG分子小約十倍，且因此，可藉由

活體外表現產生恰當倍數的功能性奈米抗體同時實現高產率。另外，奈米抗體極穩定，且抗蛋白酶作用。Harmsen及De Haard (Harmsen及De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 : 13-22)已評論奈米抗體之性質及生產。

如本文中所使用，術語「單株抗體」或「**mAb**」係指單一胺基酸組合物之針對特異性抗原之抗體分子，而不應被解釋為需要藉由任何特定方法產生抗體。單株抗體可由B細胞或融合瘤之單一純系產生，但亦可為重組的，即，藉由蛋白質基因改造產生。

(習知)抗體之「片段」包含完整抗體之部分，特定言之完整抗體之抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、(dsFv)₂、scFv、sc(Fv)₂、雙價抗體、從抗體片段形成之雙特異性及多特異性抗體。習知抗體之片段亦可為單域抗體，諸如重鏈抗體或VHH。

術語「**Fab**」表示具有約50,000 Da之分子量及抗原結合活性之抗體片段，其中H鏈N-端側約一半及整個L鏈(該等片段藉由用蛋白酶木瓜蛋白酶處理IgG而獲得)係經二硫鍵結合在一起。

術語「**F(ab')₂**」係指具有約100,000 Da之分子量及抗原結合活性之抗體片段，其略大於經由鉸鏈區之二硫鍵結合之Fab，該等片段藉由用蛋白酶胃蛋白酶處理IgG而獲得。

單鏈Fv(「**scFv**」)多肽為通常自包含經肽編碼連接子連接之VH及VL編碼基因之基因融合而表現之共價連接之VH:VL異二聚物。本發明之人類scFv片段包含保持適宜構形(特定言之藉由使用基因重組技術)之CDR。二價及多價抗體片段可藉由單價scFv之締合自發地形成，或可藉由經肽連接子諸如二價sc(Fv)₂偶聯單價scFv來產生。

「**dsFv**」為藉由二硫鍵穩定之VH:VL異二聚物。

「**(dsFv)₂**」表示經肽連接子偶聯之兩個dsFv。

術語「**雙特異性抗體**」或「**BsAb**」表示將兩種抗體之抗原結合位點組合於單一分子中之抗體。因此，BsAb能夠同時地結合兩種不同抗原。基因工程改造已越來越頻繁地用於設計、修飾、及製造具有所需結合性質及效應子功能組之抗體或抗體衍生物，如例如EP 2 050 764 A1中所述。

術語「**多特異性抗體**」表示將兩種或更多種抗體之抗原結合位點組合於單一分子中之抗體。

術語「**雙價抗體**」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含與相同多肽鏈(VH-VL)中之輕鏈可變域(VL)連接之重鏈可變域(VH)。藉由使用過短而無法使相同鏈上兩個域之間配對之連接子，迫使該等域與另一個鏈之互補域配對且建立兩個抗原結合位點。

在一特定實施例中，抗原決定基結合片段係選自由Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、(dsFv)₂、scFv、sc(Fv)₂、雙價抗體及VHH組成之群。

如本文中所使用，「**嵌合抗體**」為其中恆定區或其部分經改變、置換或交換以使可變區與不同物種或屬於另一抗體類別或亞類別之恆定區連接之抗體。「**嵌合抗體**」亦指其中可變區或其部分經改變、置換或交換以使恆定區與不同物種或屬於另一抗體類別或亞類別之可變區連接之抗體。

術語「**人類化抗體**」係指其中最初完全或部分非人類來源且已經過修飾以置換某些胺基酸(特定言之重鏈及輕鏈之架構區中之某些胺基酸)，以避免或最小化人類中的免疫反應之抗體。人類化抗體之恆定域大多數為人類CH及CL域。在一個實施例中，人類化抗體具有人類來源之恆定域。如本文中所使用，術語「**人類化抗體**」係指包含衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列(例如CDR)之嵌合抗體。

術語「**NTN1結合抗體**」用於涵蓋所有該等種類之抗體、片段或其組

合。

人類化之目標係減小異種抗體諸如鼠科抗體之免疫原性以引入至人類中同時維持抗體之全抗原結合親和力及特異性。可使用若干技術(諸如表面重塑及CDR移植)製造人類化抗體或適應於不被其他哺乳動物排斥之抗體。如本文中所使用，表面重塑技術使用分子建模、統計分析及誘變之組合以改變抗體可變區之非CDR表面以類似於靶寄主之已知抗體之表面。

抗體可使用多種其他技術加以人類化，包括CDR移植(EP0239400；WO91/09967；美國專利第5,530,101號及第5,585,089號)、鑲飾或表面重塑(EP0592106；EP0519596；Padlan (1991) *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498；Studnicka等人 (1994) *Protein Engineering* 7(6):805-814；Roguska等人(1994) *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*91:969-973)、及鏈改組(美國專利第5,565,332號)。可藉由相關技術中已知的多種方法(包括噬菌體顯示方法)來製造人類抗體。亦可參見美國專利第4,444,887號、第4,716,111號、第5,545,806號及第5,814,318號；及國際專利申請案WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735及WO91/10741。

在本發明內文中，如本文中所使用，術語「治療(treating)」或「療法(treatment)」意指逆轉、緩解、預防該術語適用之疾病或病症、或此疾病或病症之一或多種症狀或抑制其進展。

如本文中所使用，術語「治療癌症」意指抑制腫瘤惡性細胞之生長及/或從該腫瘤轉移之進展。此治療亦可導致腫瘤生長消退，即，可測量腫瘤尺寸縮小。在一個特定實施例中，此治療導致腫瘤或轉移之部分消退。在另一個特定實施例中，此治療導致腫瘤或轉移之完全消退。在某些態樣中，治療預防轉移。

根據本發明，術語「患者」或「有此需要的患者」意指感染或極有

可能感染惡性腫瘤之人類或非人類哺乳動物。

在一個特定實施例中，待治療患者可能先前經過其他抗癌治療法治療。特定言之，待治療患者可能先前經過基於奧沙利鉑之療程、基於順鉑之療程、基於卡鉑之療程及/或基於太平洋紫杉醇之療程、基於多烯紫杉醇之療程治療。

「治療有效量」意指活性劑之足以在可應用於任何醫學治療之合理效益/風險比下治療該癌症疾病之量。然而，應明瞭，活性劑之總日用量將由主治醫師在合理醫療判斷下決定。任何特定患者之特定治療有效劑量程度將取決於多種因素，包括所治療的疾病及該疾病之嚴重度；所使用的特異性多肽或抗體之活性；所使用的特定組合物、患者的年齡、體重、一般健康、性別及飲食；投藥時間、投藥途徑、及所使用的特定活性劑之排泄率；治療持續時間；與所使用的特定活性劑組合使用或相一致之藥物；及醫學技術中熟知的類似因素。在一個特定實施例中，投與患者之活性劑之該治療有效量為介於5 mg/m²至500 mg/m²範圍，更特定言之介於自150 mg/m²至450 mg/m²體表面積範圍之劑量。

在另一個實施例中，本發明之活性劑係依取決於待治療患者(年齡、體重、治療記錄等)之方案(該方案可由熟練醫師決定)重複地投與。

「醫藥上」或「醫藥上可接受」係指當適當地投與哺乳動物(特定言之人類)時不會產生不利、過敏或其他不良反應之分子實體及組合物。醫藥上可接受之載劑或賦形劑係指任何類型之非毒性固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、囊封材料或調配助劑。

醫藥組合物之形式(包括本發明之多肽或抗體)及投藥途徑自然地取決於待治療的病症、疾病之嚴重度、患者的年齡、體重及性別等。

本發明之活性劑可經調配以用於局部、口服、非經腸、鼻內、靜脈內、肌肉內、皮下或眼內投與及類似途徑。在一個特定實施例中，本發明

之活性劑係靜脈內投與。

特定言之，包含本發明活性劑之醫藥組合物可包含對於能夠注射之調配物而言係醫藥上可接受之媒劑。其等可特定言之為等滲無菌鹽水溶液(磷酸單鈉或磷酸二鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣或氯化鎂及類似物或此等鹽之混合物)、或根據情況添加無菌水或生理鹽水後可組成可注射溶液之乾燥(尤其為冷凍乾燥)組合物。

為製備醫藥組合物，可將有效量之本發明活性劑溶解或分散於醫藥上可接受之載劑或水性介質中。

適合可注射應用之醫藥形式包括無菌水溶液或分散液及用於無菌可注射溶液或分散液之臨時配製的製劑的無菌粉末。在所有情況中，該形式必須無菌且必須是流動程度可很容易藉由注射器注射之流體。其必須在製造及儲存之條件下為穩定的且必須保存在抗微生物諸如細菌及真菌之污染作用之條件下。

載劑可為包含(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液體聚乙二醇等)之溶劑或分散液介質及其適宜混合物。可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、若為分散液則藉由維持所需粒度、及藉由使用表面活性劑、穩定劑、抗凍劑或抗氧化劑維持適度流動性。可由抗細菌劑及抗真菌劑來防止微生物作用。在許多情況中，其將較佳包含等滲劑，例如糖或氯化鈉。

藉由將所需量的活性劑與上文所例舉的其他成分中若干者併入適宜溶劑中，依需要，隨後進行過濾滅菌，來製備無菌可注射溶液。一般而言，藉由將各種無菌活性成分併入含鹼性分散液介質及所需要的其他成分(選自彼等上文所列舉者)之無菌媒劑中，來製備分散液。就用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末而言，較佳的製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其自經其前面無菌過濾溶液產生活性成分加上任何其他所需成分之粉

末。

調配後，溶液將依與劑量調配物相容之方式且以此種具治療有效性之量投與。該等調配物係呈多種劑型(諸如上述可注射溶液類型)輕易地投與，但亦可使用藥物釋放膠囊及類似物。

就水溶液之非經腸投藥而言，例如，若需要則溶液應適當地進行緩衝且液體稀釋劑事先以足量鹽水或葡萄糖呈現等滲性。該等特定水溶液尤其適於靜脈內、肌肉內、皮下及腹膜內投與。就此而言，熟習此項技術者將根據本發明知曉可使用的無菌水性介質。例如，可將一種劑量溶解於1 mL等滲NaCl溶液中，且添加至1000 mL皮下輸注流體，或在所提出的輸注位置注射(參見，例如，「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版，第1035-1038頁及第1570-1580頁)。將根據所治療個體之病症而必要地發生某些劑量變化。負責投藥者將在任何事件中決定針對於個體之適宜劑量。

如本文中所使用，「同時地」用於意指兩種藥劑係同時地投與，而術語「以組合形式」用於意指其等若非同時地投與，則在其等皆可用於在相同時間框內發揮治療作用之時間框內「連續地」投與。因此，「連續地」投與可允許一種藥劑在另一藥劑後5分鐘、10分鐘或約幾小時內投與，只要先投與的藥劑之循環半衰期為使得其等均以治療有效量同時存在即可。組分投藥之間的時延將取決於組分之確切性質、其間之相互作用、及其各自的半衰期而變化。

與「以組合形式」或「連續地」對比，本文中「分開地」用以意指投與一種藥劑及另一藥劑之間的時間間隔是顯著的，即，先投與的藥劑當在投與第二藥劑時可不再以治療有效量存於血流中。

在本發明之一個較佳實施例中，DNA甲基轉移酶抑制劑係於NTN1中和劑或NTN1拮抗劑之前連續地或分開地投與。較佳地，該DNA甲基轉

移酶抑制劑係在於拮抗劑之前至少4小時，且更佳在拮抗劑之前至少72小時投與。

在一個尤佳實施例中，該拮抗劑係於DNA甲基轉移酶抑制劑之前連續地或分開地投與。較佳地，該拮抗劑係在DNA甲基轉移酶抑制劑之前至少一小時，且更佳在DNA甲基轉移酶抑制劑之前至少24小時投與。

較佳地，拮抗劑及DNA甲基轉移酶抑制劑以協同方式相互作用。如本文中所使用，術語「協同」意指拮抗劑及DNA甲基轉移酶抑制劑當以組合方式使用時產生出相比將兩種組分之個別效應相加所預期更大的效應。有利地，協同相互作用可允許對患者投與低劑量之各組分，藉此減小化學治療之毒性，同時產生及/或維持相同治療效應。因此，在一個尤佳實施例中，各組分可以次治療量投與。

表1：序列之描述：

SEQ ID NO :	描述	序列
1	NTN1 胺基酸(aa)序列(seq.)，訊號肽以粗體表示及線性抗原決定基圖譜以粗體及下劃線表示	<p>MMRAVWEALAAALAAVACLVGAVRGGPGLSMFAGQAAQ PDPCSDENGHPRRICIPDFVNAAFGKDVRVSSTCGRPPA RYCVVSEERGEERLRSCHLCNASDPKKAHPAFLTDLNPN HNLCWQSENYLQFPHNVTLTLSLGKKFEVTVSLOFCS PRPESMAIYKSMGYGRTWVPFQFYSTQCRKMYNRPBRA PITKQNEQEAVCTDSHTDMRPLSGGLIAFSTLDGRPSAH DFDNSPVLQDWTATDIRVAFSRLHTFGDENEDDSELAR DSYFYAVSDLQVGGRCCKCNGHAARCVRDRDDSLVCDGR HNTAGPECDRCKPFHYDRPWQRATAREANECVACNCN <u>LHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTAGRHC</u> YCKEGYYRDMGKPITHRKACKACDCHPVGAAGKTCNQT TGQCPCCKDGVGTITCNRCAGYQQSRSPIAPCIKIPVAPP TTAASSVEEPEDCDSYCKASKGKLNKMKYCKKDYAVQI HILKADKAGDWWKFTVNIISVYKQGTSRIRRGDQSLWIRS RDIACKCPKIKPLKYLKLLGNAEDSPDQSGIVADKSSSLVIQ WRDTWARRLRKFQQREKKGKCKKA</p>

2	NTN1核酸序列	<p> ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCTG GCGGCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGCGGTGCGCGG CGGGCCCGGGCTCAGCATGTTGCGGGCCAGGCGGG GCAGCCCGATCCCTGCTCGGACGAGAACGGCCACCC GCGCCGCTGCATCCCGGACTTTGTCAATGCGGCCTTC GGCAAGGACGTGCGCGTGTCCAGCACCTGCGGCCGG CCCCGGCGCGCTACTGCGTGGTGAGCGAGCGCGGC GAGGAGCGGCTGCGCTCGTGCCACCTCTGCAACGCGT CCGACCCCAAGAAGGCGCACCCGCCCGCCTTCCTCAC CGACCTCAACAACCCGCACAACCTGACGTGCTGGCAG TCCGAGAACTACCTGCAGTTCGCCACAACGTCACGCT CACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTCGAAGTGACCTAC GTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGGCCGAGTCCA TGGCCATCTACAAGTCCATGGACTACGGGCGCACGTG GGTGCCCTTCCAGTTCTACTCCACGCAGTGCCGCAAG ATGTACAACCGGCCGCACCGCGCGCCATCACCAAGC AGAACGAGCAGGAGGCCGTGTGCACCGACTCGCACAC CGACATGCGCCCGCTCTCGGGCGGCCTCATCGCCTTC AGCACGCTGGACGGGCGGCCCTCGGCGCACGACTTC GACAACTCGCCCGTGTGTCAGGACTGGGTACGGCCA CAGACATCCGCGTGGCCTTCAGCCGCCTGCACAGTT CGGCGACGAGAACGAGGACGACTCGGAGCTGGCGCG CGACTCGTACTTCTACGCGGTGTCCGACCTGCAGGTG GGCGGCCGTTGCAAGTGCAACGGCCACGCGGCCCGC TGCGTGCGGACCGCGACGACAGCCTGGTGTGCGACT GCAGGCACAACACGGCCGGCCCGGAGTGCAGCCGCT GCAAGCCCTTCCACTACGACCGGCCCTGGCAGCGCGC CACAGCCCGCAAGCCAACGAGTGCGTGGCCTGTAAC TGCAACCTGCATGCCCGCGCTGCCGCTTCAACATGG AGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGT CTGCCTCAACTGTGCCACAACACCGCCGGCCGCCAC TGCCATTACTGCAAGGAGGGCTACTACCGCGACATGG GCAAGCCCATCACCCACCGGAAGGCCTGCAAAGCCTG TGATTGCCACCCTGTGGGTGCTGCTGGCAAAACCTGC AACCAACCACCGGCCAGTGTCCCTGCAAGGACGGCG TGACGGGTATCACCTGCAACCGCTGCGCCAAAGGCTA CCAGCAGAGCCGCTCTCCATCGCCCCCTGCATAAAG ATCCCTGTAGCGCCGCCGACGACTGCAGCCAGCAGCG TGGAGGAGCCTGAAGACTGCGATTCTACTGCAAGGC CTCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAACATGAAAAAGTACT GCAAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAA GGCGGACAAGGCGGGGGACTGGTGAAGTTCACGGT GAACATCATCTCCGTGTATAAGCAGGGCACGAGCCGC ATCCGCCCGGTTGACCAGAGCCTGTGGATCCGCTCGC GGGACATCGCCTGCAAGTGTCCAAAATCAAGCCCCT CAAGAAGTACCTGCTGCTGGGCAACGCGGAGGACTCT CCGGACCAGAGCGGCATCGTGGCCGATAAAAGCAGCC TGGTGATCCAGTGGCGGGACACGTGGGCGCGGGCGC TGCGCAAGTTCAGCAGCGTGAGAAGAAGGGCAAGTG CAAGAAGGCCTAGCG </p>
---	----------	---

3	NTN1 aa 抗原決定基序列	VACNCLHARRCRFMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTA GRHCH
4	NTN1 抗原決定基cDNA序列	GTGGCCTGTAAGTCAACCTGCATGCCCGGCGCTGCC GCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAA GAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTCGCCACAACACC GCCGGCCGCCACTGCCAT
5	CDR1-H (IMGT) 之 aa 序列	GYTFTSYN
6	CDR2-H (IMGT) 之 aa 序列	IYPGNGDT
7	CDR3-H (IMGT) 之 aa 序列	ARGGTGFAY
8	CDR1-L (IMGT) 之 aa 序列	QSVSND
-	CDR2-L (IMGT) 之 aa 序列	YAS
9	CDR3-L (IMGT 及 Kabat) 之 aa 序列	QQDYSSPWT
10	小鼠4C11 VH之 aa序列	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQGLVTVS A
11	小鼠4C11 VL之 aa序列	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQK PGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQ AEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK
12	4C11 (VH + 小鼠IgG1 CH)之全 aa序列	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQGLVTVS AAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVT VTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTPSSPRPS ETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDD VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFK CRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAK DKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMN TNGSYFVYSKLVNQSINWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK

13	4C11 (VL + 小鼠 Kappa CL) 之全 aa 序列	SIVMTQTPKFLLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQK PGQSPKLLIYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQ AEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYKPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCBAT HKTSTSPIVKSFNRNEC
14	4C11 之人類化變體之 VL aa 序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNDVAWYQQK PGKAPKLLIYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIES EDAAYYFCQQDYSSPWTFGQG
15	4C11 之人類化變體之 VL aa 序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDVAWFQQR PGQSPRRLIYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFFTISSLE AEDAATYYCQQDYSSPWTFGQG
16	4C11 之人類化變體之 VL aa 序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDVAWYQQK PGQAPRLLIYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIES EDAAYYFCQQDYSSPWTFGQG
17	4C11 之人類化變體之 VL aa 序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDVAWYQQK PGQSPQLLIYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFFTISSLE AEDAATYYCQQDYSSPWTFGQG
18	4C11 之人類化變體之 VL aa 序列	DIVMTQTPSLPVPTEGEPASISCKASQSVSNDVAWYQQK PGQAPRLLIYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIES EDAAYYFCQQDYSSPWTFGQG
19	4C11 之人類化變體之 VL aa 序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNDVAWYQQK PGQAPRLLIYASNRYTGIPARFSGSGYGTDFLTISSLQS EDFAVYYCQQDYSSPWTFGQG
20	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDATVYYCARGGTGFAYWGQG
21	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYFTSYNMHWIRQ PPGKLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDATVYYCARGGTGFAYWGQG
22	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS QVLTMTNMDPVDATVYYCARGGTGFAYWGQG
23	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTISRDDSK NTAYLQMNLSKTEDATVYYCARGGTGFAYWGQG
24	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGPGLVKPSQTLSTCTVSGYFTSYNMHWVF QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTISVDTSK NQFSLKLSVTAADATVYYCARGGTGFAYWGQG
25	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDATVYYCARGGTGFAYWGQG
26	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDATVYYCARGGTGFAYWGQG
27	4C11 之人類化變體之 VH aa 序列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTSYNMHWVR QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYQKFKGRVTMTRDTS STVYMELSSLRSEDATVYYCARGGTGFAYWGQ
28	CDR1-H 之 aa 序	SYNMH

	列 (Kabat)	
29	CDR2-H 之 aa 序列 (Kabat)	AIYPGNGDTSYNQKFKG
30	CDR3-H 之 aa 序列 (Kabat)	GGTGFAY
31	CDR1-L 之 aa 序列 (Kabat)	KASQSVSNDVA
32	CDR2-L 之 aa 序列 (Kabat)	YASNRYT
33	正向引子	aaaagtactgcaagaaggactatgc
34	反向引子	ccctgcttatacacggagatg
35	NTN1 aa 抗原決定基序列	ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC
36	NTN1 抗原決定基cDNA序列	GCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGC TTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGC

依IMGT之CDR在適宜情況下以粗體突顯標示於表1中。

現將使用被視為非限制性實施例且參考附圖之實例更詳細地描述本發明。

材料及方法

腫瘤樣本：

藉由Centre Léon Bérard(Lyon, France)之腫瘤庫提供人類乳癌樣本。在乳腺手術期間於任何全身治療前獲得新鮮組織樣本並急速冷凍於液氮中。從Super Bio Chips(Cliniscience, Nanterre, France)獲得經石蠟包埋之乳腺腫瘤切片之組織微陣列。

異種移植之小鼠模型：

從Charles River(Ecully, France)獲得五週大的雌性無胸腺Swiss^{nu/nu}小鼠。將小鼠關在無特殊病原體動物設施中。將MDA-MB-231或MDA-MB-231-Luc shRNA細胞系之再懸浮於200 μ L PBS中之 2.10^6 個細胞植入至乳腺之脂肪墊中。將H460細胞(2.10^6 個細胞，含於200 μ L PBS中)皮下

注射於小鼠之右脇中。當腫瘤達到約100 mm³之體積時，一週兩次連續3週腹膜內注射10 mg/kg靶向NTN1之抗體net-1 mAb或等體積的PBS。一週3次連續3週將地西他濱(5'-氮雜-2'-去氧胞苷；Sigma-Aldrich，Saint Louis，MO)皮下注射於右脇中(給藥：0.4 mg/kg；媒劑：PBS)或在對照組中改用PBS。一週兩次用卡尺評估腫瘤體積，且用式 $V = \frac{1}{2}(\text{長度} \times \text{寬度}^2)$ 計算得。為評估治療在DNA甲基化、細胞死亡誘導、DNA甲基化及蛋白質表現上之效率，小鼠係經異種移植且僅在達到100 mm³後腫瘤切除前處理一週。

患者衍生的異種移植之小鼠模型：

將PDX-HBC-146關在LMT核心設施中。在異氟烷麻醉後，在小鼠之肩胛間區中植入 ≈ 60 mm³患者衍生的腫瘤移植物。當腫瘤達到120-150 mm³時，一週3次連續3週對小鼠皮下注射地西他濱(0.4 mg/kg)或PBS及/或一週兩次連續3週腹膜內注射net-1 mAb (10 mg/kg)或人類IgG1對照同型抗體(Ctrl IgG1，10 mg/kg)。

細胞系及治療：

將乳癌細胞系HMLER及MDA-MB231維持在補充10% FBS (Lonza，Basel，Switzerland)及1%青黴素/鏈黴素(InVitrogen，Carlsbad，CA，USA)之杜貝卡氏最低必需培養基F12 Glutamax (Dulbecco's Minimum Essential Medium F12 Glutamax)(DMEM-F12 Glutamax)(Life Technologies)中。此外，將人類EGF 10 ng/ml (Promocell，Heidelberg，Germany)、氫化可的松(hydrocortisone) 0.5 μ g/ml、嘌呤黴素0.5 μ g/ml (InVitrogen)及胰島素10 μ g/ml (InVitrogen)添加至用於HMLER細胞生長之培養基中。將MDA-MB-231-Luc細胞 (Cell Biolabs，San Diego，CA，USA)維持在補充10% FBS (Lonza)及1%青黴素/鏈黴素(InVitrogen)之杜貝卡氏最低必需培養基F12 Glutamax

(DMEM-F12 Glutamax)(Life Technologies)中。將衍生自MDA-MB-231-Luc細胞之穩定shRNA細胞系維持在補充2 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤黴素(InVitrogen)之相同培養基中。將H460肺癌細胞系維持在補充10% FBS (Lonza, Basel, Switzerland)及1%青黴素/鏈黴素(InVitrogen)之RPMI Glutamax (Life Technologies, Carlsbad, CA)中。將衍生自H460細胞之穩定shRNA細胞系維持在補充2 $\mu\text{g/ml}$ 用於shRNA篩選之嘌呤黴素(InVitrogen)之相同培養基RPMI Glutamax(Life Technologies)、10% FBS(Lonza, Basel, Switzerland)及1%青黴素/鏈黴素(InVitrogen)中。

接種二十四小時後，使細胞系在每天更換的含10 μM 地西他濱(Sigma-Aldrich)或5 μM 5-氮雜胞苷(Sigma-Aldrich)之新鮮培養基中生長3天。

細胞(六孔板中每孔 6.10^4 個)用10 μM 地西他濱或5 μM 5-氮雜胞苷處理，且接著於存在net-1 mAb抗-NTN1抗體10 $\mu\text{g/mL}$ (Netris-Pharma)下於存在或不存在重組Flag標記NTN1 5 $\mu\text{g/mL}$ (Adipogen)下在血清衍生的條件中培養48小時。

執行基因表現及siRNA實驗：

吾人使用編碼DAPK1之pcDNA3.1載體(Llambi等人，2005)以執行HMLER細胞中DAPK1之表現。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen)將空白質體或含HA標記DAPK構築體之質體轉染至HMLER細胞中。NTN1 siRNA先前已被描述(Delloye-Bourgeois等人，2009a)，且使用Lipofectamine 2000轉染至先前經地西他濱處理72小時或未處理之HMLER細胞中。使用擾碼siRNA (Sigma)作為對照。

細胞系中之穩定shRNA轉染：

使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen)，依製造商方案，將對照、DAPK1、UNC5B及NTN1 shRNA質體(Sigma Mission shRNA)轉染至次

匯合細胞中。轉染後，添加2 µg/mL嘌呤黴素至新鮮培養基作為篩選因子。在5天期間進行經轉染細胞篩選，細胞接著用胰蛋白酶消化且稀釋以在96孔板每孔中獲得0-2個純系。在shRNA轉染、篩選期間及所有隨後的實驗期間保持嘌呤黴素篩選(2 µg/mL)以保存基因下調。細胞擴增後，細胞用地西他濱處理或不處理且測試其於DAC處理之前及之後之DAPK1/UNC5B/NTN1表現程度。篩選出展現「正常」增殖速率及低程度的感興趣基因表現之純系。

異種移植細胞系及患者活檢組織之免疫組織化學分析：

使用DABmap套組依製造商說明書，於自動化免疫染色儀(Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France)上進行免疫組織化學染色。將組織樣本固定在10%緩衝福爾馬林中且包埋於石蠟中。暴露抗原(檸檬酸鹽緩衝液pH 7.3, 98°C, 35分鐘)後，使用用於暴露之Novolink套組(Leica)以大鼠抗小鼠NTN1靶向抗體(R&D)、兔多株抗-DAPK1 (Acris)或UNC5B抗體(Sigma)進行免疫染色。使用兔裂解卡斯蛋白酶-3特異性抗體(Cell Signaling)及原位細胞死亡檢測套組POD (Roche)進行凋亡細胞染色。使用兔多株CD31 (血小板內皮細胞黏附分子-1)抗體(ANASPEC)測定血管生成，且使用小鼠單株Mib1純系特異性抗體(DAKO)測定細胞增殖。

免疫染色組織切片及組織微陣列之定量分析：

使用配備三-CDD視訊攝影機(Sony, Japan)之光學顯微鏡(Eclipse E400, Nikon France, Champigny, France)進行圖像分析。藉由在對於異種移植腫瘤切片為X200放大率下，每次染色中至少40個視野的形態分析，及在對於組織微陣列為X40放大率下，每次總組織切片染色中一個視野之形態分析(Histolab, Microvision Instruments, Evry, France)測定定量值。測定腫瘤組織所佔據的總表面且將陽性染色之各表面表示為各視野總表面之百分比。

RNA分離及定量即時RT-PCR (Q-RT-PCR) :

使用TRIzol試劑(Ambion, Life Technologies)自活檢組織及使用Nucleospin RNAII套組(Macherey-Nagel, Hoerd, Germany)依製造商說明書自細胞系提取總RNA。使用iScript cDNA合成套組(BioRad, Ivry, France)逆轉錄1 µg RNA。使用Mini opticon (Biorad)及SYBR supermix qPCR套組(Biorad)進行定量RT-PCR (Q-RT-PCR)。使聚合酶在95 °C下活化3分鐘，接著進行45個擴增循環及30秒的冷卻。除此之外，已使用3個其他的一般管家基因驗證人類樣本及細胞系之基因表現模式以強化結果：PBGD、GAPDH及MBD2。靶基因之引子序列顯示於圖4中。

DNA提取：

將活檢組織樣本及異種移植細胞系於液氮中低溫研磨且使用Nucleospin組織DNA提取套組(Macherey Nagel)依製造商方案提取DNA並純化。使用標準方案直接提取來自細胞系的DNA(Auriol等人, 2005)

基因組DNA之亞硫酸氫鹽治療：

將200奈克的基因組DNA添加至1.8 µg標準質體DNA (pGL3 Basic)且使用Epitect亞硫酸氫鹽套組(Qiagen)依製造商方案轉化。

經亞硫酸氫鹽轉化之DNA之擴增及焦磷酸定序：

在啟動子區中設計生物素化NTN1、DAPK1及引子組(圖4)。作為基因組甲基化1之替代標記物，亦設計LINE-1引子。作為對照，使用引子之未經修飾及經修飾之GAPDH組以評估亞硫酸氫鹽DNA轉化之效率。在用於DAPK1及NTN1引子之1 mM MgCl₂之存在下中，使用Hotstartaq (Qiagen)套組，在總體積50 µL中擴增經修飾之DNA。

熱曲線如下：95 °C保持10分鐘，接著是50個95 °C保持30秒之循環，50 °C (NTN1)或52 °C (DAPK1)或58 °C (LINE-1)或57 °C (GAPDH)保持30秒繼而延伸1分鐘30秒(NTN1及DAPK1)或30秒(LINE-1及GAPDH)，接著最

後延伸10分鐘。引子序列顯示於圖4中。在焦磷酸定序分析之前藉由瓊脂糖凝膠(2%)電泳驗證PCR產物之品質及量。

使用Pyromark套組(Qiagen)對PCR產物進行焦磷酸定序。使用PyroMark真空準備工作臺(Qiagen)分離逆轉單鏈生物素化模板。將40微升的PCR產物添加至38 μ L結合緩衝液(Qiagen)及2 μ L鏈黴親和素(streptavidin)瓊脂糖高性能珠粒(GE Healthcare[®])中。以1400 rpm (每分鐘轉數)振盪混合物10分鐘。攪拌後，收集經生物素化DNA覆蓋之珠粒且藉由永久性真空留在過濾器探針上。將過濾器探針依次浸於不同浴中：乙醇70%中歷時5秒，PyroMark變性溶液中歷時5秒及PyroMark洗滌緩衝液1 \times 中歷時15秒(Qiagen)。接著，關閉真空且將固定DNA鏈之珠粒釋放至96孔板中，每孔中含有25 μ l退火緩衝液及0.3 μ M定序引子。將定序板保持在80 $^{\circ}$ C下2分鐘且保持在室溫下5分鐘。使用PyroGold試劑(Qiagen)在PyroMark Q96系統中進行焦磷酸定序反應。使用PyroMark軟體分析結果。

平均LINE-1甲基化程度係計算為所分析3個CpG位點處C之比例(%)之平均值。

卡斯蛋白酶-3活性及存活率分析：

如先前所述(Llambi等人，2005)，使用Ac-DEVD-AFC受質分析(Gentaur Biovision，Brussel，Belgium)，測量卡斯蛋白酶-3活性。或者，藉由吡啶橙及DAPI染色，使用NucleoCounter NC-3000系統(ChemoMetec A/S，Allerød，Denmark)，測量細胞死亡百分比。

螢光卡斯蛋白酶-3活性測量：

使用Cellplayer 96孔動力學卡斯蛋白酶3/7細胞凋亡套組，依製造商方案(Essen bioscience，Hertfordshire，UK)，測量細胞凋亡指數。將300個細胞接種於96孔板中，用地西他濱(DAC 10 μ M(最終濃度))或媒劑

(PBS)處理48小時，接著將細胞培養在富含動力學細胞凋亡試劑(1/5000e)及net-1 mAb (5 µg/mL)及/或重組NTN1 (5 µg/mL)之無血清培養基中，將DAC或PBS細胞再置於具有10X物鏡之IncuCyte FLR或ZOOM中，並置於37°C及5% CO₂下之標準細胞培養箱中48小時。作為增殖之標記物，且為校正細胞之差別性增殖，在最終時間點使用Vybrant Green計數含DNA物體的總數。使用該數值以計算得「細胞凋亡指數」，其定義為卡斯蛋白酶-3/7陽性物體的數量除以含DNA物體的總數。

TUNEL分析：

為檢測DNA片段化，將細胞培養在蓋玻片上，且在處理後，於4%多聚甲醛中固定20分鐘。接著，使用300 U/mL TUNEL酵素(300 U/mL)及6 µM生物素化dUTP (Roche Diagnostics, Maylan, France)進行末端去氧核苷酸基轉移酶介導之dUTP-生物素缺口末端標記(TUNEL)。

甲基-捕捉-定序(甲基-Cap-seq)：

將基因組DNA(1 µg)剪切至300-600 bp之平均長度。使用含MBD域珠粒依製造商推薦(MethylMiner, InVitrogen)分離甲基化DNA片段。在由BGI服務(中國北京)使用Illumina 2000高通量定序技術進行定序後，從各輸入及結合部分(Bound fraction)獲得30-40百萬個50 bp讀段且使用R/生物導體套裝進行分析。

結果

人類乳癌中DAPK1及NTN1之超甲基化與基因沉默相關聯。

過去曾證實，在乳癌及肺癌細胞系中，在實驗提取NTN1之後，UNC5B/H2藉由活化其促細胞凋亡搭配物DAPK1觸發細胞凋亡(Llambi等人，2005；Guenebeaud等人，2010；Delloye-Bourgeois等人，2009b；Delloye-Bourgeois等人，2009a)。此處假設係在具有低程度NTN1之乳腺腫瘤中，UNC5B受體因低程度DAPK1而無法觸發腫瘤細胞死亡。為解決

此點，已使用源自人類乳腺導管癌之組織微陣列(70個切片)藉由免疫組織化學分析法分析DAPK1、UNC5B及NTN1之表現程度。表現程度係以四分位數分類且展現最高或最低NTN1程度之樣本(分別為第一四分位數及第四四分位數)中UNC5B及DAPK1之表現模式顯示於圖1A中。該分析顯示，在展現低程度NTN1之樣本中，DAPK1亦以低程度表現(χ^2 檢定， $p = 0.04$)。相比之下，UNC5B表現程度均等地分佈低NTN1及高NTN1兩個組(圖1A、1B)中。為判定是否在mRNA層級下亦觀測到DAPK1及NTN1表現之該等同時變化，分析大組($N = 737$)之乳癌樣本。觀測到DAPK1與NTN1之間存在統計學顯著相關性(優勢率 = 4.7；Fischer準確檢定 $p = 0.003$ ；cBio數據平臺)。

藉由97個人類乳腺導管癌樣本群之NTN1、UNC5B及DAPK1轉錄本之RT-Q-PCR直接定量亦支持低程度NTN1與低程度DAPK1相關聯(χ^2 檢定， $p = 0.03$)之觀點。

在涉及癌症中基因下調之機制當中，DNA超甲基化係頻繁事件。為識別與致癌性轉化相關聯之差異甲基化區(DMR)，吾人審查源自對應於配對腫瘤正常乳癌樣本之TCGA乳腺群($N = 76$)之Illumina 450k甲基化陣列及RNASeq數據。正常及癌症樣本中跨越DAPK1及NTN1之5'端之各探針之甲基化程度間的比較指示探針所詢問的位於從DAPK1之轉錄開始位點(TSS)開始第365位及第838位及位於從NTN1-TSS開始第-765位及第1300位之區域當與其對應配對正常組織比較時在約30%的癌症樣本中超甲基化。

在人類乳癌($N = 737$)中，超甲基化探針組(圖1D及1F)在DAPK1及NTN1處之CpG甲基化之平均百分比與其表現程度(圖1D)反相關(分別地，Pearson's $r = -0.32$ ， $p < 10^{-18}$ 及Pearson's $r = -0.14$ ， $p = 6.6 \cdot 10^{-5}$)，此表明人類乳癌中DNA甲基化抑制DAPK1及NTN1轉錄。

為證實實驗模型中之此觀測，藉由用含MBD2之甲基-CpG-結合域(甲基-Cap-seq)之重組蛋白質選擇性下拉之甲基化DNA片段之平行定序確定三種癌細胞系之DNA甲基化模式。分析不同來源之兩種轉化乳腺細胞系(衍生自人類乳癌之MDA-MB-231細胞系及藉由人類乳腺細胞之活體外轉化所構築之HMLER細胞系(Elenbaas等人，2001；Morel等人，2008))、以及非小細胞肺癌細胞系H460。所獲得的資料(參考圖1C)指示DAPK1及NTN1之5'端CpG島狀物在所有三種癌細胞系中係甲基化的，同時該等CGi在未轉化人類乳腺細胞中係未甲基化的(ENCODE Project資料庫)。未進一步分析UNC5B之甲基化，因為其5'端CGi在所研究的所有細胞系中係未甲基化的。就兩種基因基因而言，選擇位於CGi之3'端之區以供藉由亞硫酸氫鹽焦磷酸定序進行DNA甲基化之定量分析。乳癌樣本之分析指示DAPK1及NTN1焦磷酸定序區之CpG甲基化之平均百分比與其表現程度反相關(分別地，Pearson's $r = -0.66$ ， $p = 0.003$ ，及Pearson's $r = -0.55$ ， $p = 0.008$)。

藉由地西他濱治理抑制DNA甲基化導致MDA-MB-231及HMLER中DAPK1及NTN1 mRNA均明顯上調，如藉由Q-RT-PCR測定(圖1D及1E)。藉由先前證實已選擇DAPK1沉默以阻斷UNC5H誘導之細胞凋亡(Delloye-Bourgeois等人，2009a)之肺癌細胞系H460得到相似的結果(圖1F)。總而言之，該等資料表明NTN1及DAPK1二者之後生調節係人類癌症中之一般機制。DMR之焦磷酸定序(圖1C，灰盒)支持DAPK1-CGi及NTN1-CGi處CpG甲基化之平均百分比與地西他濱藉由其去甲基化活性直接地影響DAPK1及NTN1表現之事實(圖1C)間之關聯性。於地西他濱治療後，須注意啟動子在三種所測試細胞系中係非甲基化之UNC5B在MDA-MB-231中上調但在HMLER或H460細胞中未上調(圖1)，此表明間接調節機制。作為對照，藉由LINE-1序列之焦磷酸定序估算西他濱(DAC)處理

後之全局甲基化程度(global methylation level)，作為基因組甲基化(Aparicio等人，2009；Perrin等人，2007)替代標記物，且指示經DAC處理之細胞系相比其未處理對應物具有降低的DNA甲基化程度。總而言之，該等資料支持在DNA甲基化抑制劑治療後，表現低程度NTN1及DAPK1之癌細胞再表現兩基因且因此可假設為NTN1干擾誘導之細胞凋亡做好準備之觀點。

地西他濱使癌細胞對活體外NTN1干擾脫敏。

已假設DNA甲基化機制之藥理學靶向可再建立功能性NTN1受體促細胞凋亡通路，且因此使細胞對NTN1干擾脫敏。為解決該問題，吾人先分析DAPK1-陰性HMLER細胞中之DAPK1強迫表現是否可再建立細胞凋亡誘導作用。如所期，在DAPK1轉染細胞中觀測到卡斯蛋白酶-3活性增加。另外，該細胞凋亡誘導作用藉由添加重組NTN1部分地逆轉。吾人因此藉由存活率分析或卡斯蛋白酶-3活性分析兩種分析法來分析經NTN1 siRNA轉染且經地西他濱處理之HMLER中之細胞死亡。儘管轉染於HMLER本身上影響輕微，但以地西他濱進行的處理強力地強化NTN1缺失誘導之細胞死亡。向治療角度看，吾人評估地西他濱與全人抗-NTN1抗體net-1 mAb之組合之效應，此已證實具有有前景的臨床前抗癌效應(Meier等人，*accompanying manuscript*)。用地西他濱或net-1 mAb、或兩種藥物之組合處理HMLER、MDA-MB-231或H460細胞。如所期，這三種細胞系僅抗net-1 mAb。相比之下，如所期(Lund等人，2011；Rodríguez-Paredes及Esteller，2011)，地西他濱誘導三種所測試細胞系某種程度之細胞凋亡，如藉由卡斯蛋白酶-3之活化(圖2A)及DNA片段化(圖2B)獲得證實。添加net-1 mAb至經地西他濱處理之細胞明顯地增進所研究細胞系中之細胞凋亡。此過程藉由同時添加重組軸突導向因子-1(NTN1)來改變(圖2A及2B)，此進一步支持net-1 mAb誘導之細胞死亡具

體與NTN1中和相關之觀點。

除此之外，由net-1 mAb與地西他濱之組合所誘導之促細胞凋亡活性不受限於地西他濱本身。用5-氮雜胞苷(DNA甲基化抑制劑)處理MDA-MB-231、HMLER及H460細胞系導致基因表現之相似修改且亦使得該等細胞系對抗-NTN1抗體敏感。因此，DNA甲基化之抑制允許該等細胞系中於NTN1中和後誘導細胞凋亡。

NTN1中和抗體與地西他濱之組合抑制小鼠中之腫瘤生長。

吾人接下來研究DNA甲基化之抑制是否亦可再建立活體內NTN1受體促細胞凋亡通路。裸小鼠在乳腺脂肪墊中以正位位點植入乳癌MDA-MB-231，或皮下植入H460細胞。當腫瘤明顯(100 mm³)時，以某一治療劑量(0.4 mg/kg)皮下注射地西他濱。LINE-1序列之焦磷酸定序指示地西他濱處理導致兩種異種移植細胞系中約8%(介於自5%至13%之範圍，根據所分析的CpG改變)的全局低甲基化。如圖3A及3C中所顯示，地西他濱處理與DAPK1、NTN1及UNC5B之再表現相關聯，如藉由在腫瘤切片上進行之免疫組織化學測定。

吾人因此評估地西他濱及/或抗-NTN1抗體net-1 mAb單獨及組合於該等異種移植模型中腫瘤細胞死亡之效應。在兩種異種移植腫瘤模型中，使用活性卡斯蛋白酶-3之免疫組織化學染色及藉由TUNEL之DNA片段化，評估細胞凋亡之誘導。顯示裂解卡斯蛋白酶-3之細胞之百分比在源自經net-1 mAb及地西他濱共處理之小鼠之腫瘤異種移植物切片中相比源自經PBS處理之動物以及源自經net-1 mAb或地西他濱中任一者處理之小鼠之腫瘤明顯增加(圖3A-D)。類似地，TUNEL分析顯示源自接受組合處理之小鼠之異種移植物中具有DNA片段化之細胞之百分比更大(圖3A-D)。該等觀測指示僅以地西他濱及net-1 mAb共處理小鼠會誘導異種移植物中細胞凋亡。

為評估於腫瘤生長之效應，分別對MDA-MB-231及H460使用相同模型及腹膜內注射net-1 mAb，或皮下注射治療劑量(0.4 mg/kg)地西他濱，或兩種處理之組合達18天及14天(圖3E及3G)。儘管未觀測到對照組與僅經net-1 mAb或地西他濱中任一者處理之小鼠之間有顯著差異，但兩種藥物之組合在攜帶MDA-MD-231異種移植物之小鼠中當相比對照組時強力地抑制腫瘤生長(圖3F)以及腫瘤重量(圖3F)。亦研究地西他濱與NTN1干擾之組合於植入H460細胞系之小鼠中之效應。證實H460腫瘤在免疫功能不全小鼠(Delloye-Bourgeois等人，2009a)中對NTN1干擾不敏感。如圖3H中所顯示，儘管僅地西他濱或僅net-1 mAb於腫瘤生長無明顯效應，但地西他濱及net-1 mAb二者之組合很好地抑制腫瘤生長。

為獲得對涉及地西他濱處理後NTN1中和之腫瘤抑制活性之機制的進一步理解，分析所治療腫瘤中之癌細胞增殖及腫瘤血管生成。雖然自經地西他濱處理之小鼠偵測到MDA-MB-231-異種移植物之增殖速率略減小，但經處理之樣本與對照之間之差異在統計學上不顯著且在H460-異種移植物中未觀測到。以針對CD31 (亦稱為血小板內皮細胞黏附分子)之抗體進行的MDA-MB-231-異種移植物切片染色指示抗-NTN1抗體處理導致減少的血管生成，此可能與已描述血管生成期間涉及NTN1之事實相關。然而，未觀測到僅經抗-NTN1抗體治療之小鼠(其中未偵測到腫瘤生長抑制)與經地西他濱與抗-NTN1抗體之組合治療之小鼠(其中腫瘤生長極度受到影響)間有統計學顯著差異。另外，在H460-異種移植物中未觀測到NTN1 mAb之此種抗血管生成效應。因此，組合地西他濱/NTN1 mAb之腫瘤生長抑制效應並非歸因於增殖改變或血管生成改變，而是歸因於細胞凋亡誘導。

為向接近人類病理之模型靠近，吾人分析地西他濱與NTN1抗體之組合之效應為攜帶人類腫瘤之小鼠模型(PDX模型)。如針對植入小鼠中之細

胞系所觀測到，地西他濱與net-1 mAb二者之組合刺激DAPK1、UNC5B及NTN1表現(圖5A)且誘導促細胞凋亡活性(圖5B)。類似地，儘管該組合與腫瘤細胞增殖變化或血管生成減少無關聯，但該組合物與患者衍生的異種移植中之腫瘤細胞死亡相關聯。另外，組合處理強力地減少患者衍生的腫瘤之生長(圖5C-D)。

藉由將地西他濱與NTN1干擾組合所誘導之腫瘤生長抑制係由UNC5B及DAPK1直接介導。

因為吾人證實地西他濱之全身性遞送與NTN1依賴性受體「組件」之再表現相關聯且因為吾人觀測到地西他濱加上NTN1阻斷抗體之組合與腫瘤細胞死亡及腫瘤生長抑制相關聯，故吾人分析細胞死亡及腫瘤生長抑制係歸因於再表現之組件。為解決該問題，吾人自MDA-MBD-231細胞產生穩定表現靶向DAPK1、NTN1或UNC5B轉錄本之shRNA之細胞。對應轉錄本之量化指示藉由對應MDA-MB-231-shDAPK1、MDA-MB-231-shNTN1及MDA-MB-231-shUNC5B細胞中的基因敲低有效地反作用於DAPK1、NTN1及UNC5B轉錄本之地西他濱誘導。與提出的作用模式一致，DAPK1或UNC5B之沉默足以完全阻斷由地西他濱+net-1 mAb之組合所誘導之細胞死亡，同時NTN1之沉默與由單單地西他濱所誘導之增加之細胞凋亡相關聯且該組合無進一步影響。從攜帶靶向DAPK1、UNC5B及NTN1轉錄本之shRNA之H460細胞獲得相似資料。

吾人接著研究MDA-MB-231-shRNA細胞當植入乳腺脂肪墊中時之反應。針對於DAPK1、UNC5B及NTN1表現及針對於活性卡斯蛋白酶-3之免疫組織化學染色指示shRNA之效率及所得的對地西他濱及對NTN1抗體治療之反應與活體外培養的細胞系所觀測到者相似。受關注的是，該組合地西他濱及net-1 mAb當在UNC5B或DAPK1被沉默同時不再具有腫瘤生長抑制效應，而NTN1之沉默足以對單單地西他濱提供腫瘤生長抑制效

應。該等資料一起支持回應於DNA甲基化抑制劑全身性遞送，依賴性受體「組件」在腫瘤中再表現而使得NTN1抗體釋放UNC5B介導之DAPK1-依賴性腫瘤細胞死亡之觀點。

將NET-1 mAb與表觀治療藥之組合為一治療選項

此處描述人類非小細胞肺癌(NSCLC)群(106個成對樣本，資料從TGCA獲得)中NTN1及DAPK1之表現之研究。患者中約78%顯示DAPK1表現減少且所分析樣本的27%中NTN1係下調的。在潛在性地涉及該等轉錄抑制之機制當中，DNA甲基化似乎發揮重要作用，因為已觀測到與成對正常組織相比，DAPK1及NTN1在分別33%及41%的腫瘤中在其5'端係超甲基化的。此外，觀測到總群之基因表現與DNA甲基化之間具有顯著相關性(分別就DAPK1及NTN1而言， $R = -0.302$ ， $p < 1.10^{-6}$ 及 $R = -0.205$ ， $p < 1.10^{-6}$ ；Pearson檢定，臨限p值 = 0.01)。亦已觀測到在DNA甲基化及基因表現之資料均可取得之樣本(TCGA，N= 707)當中，58.4%的腫瘤顯示NTN1未上調(倍數變化腫瘤/正常 < 1.3)且顯示相比正常組織之中值，DAPK1表現平均減少2.12倍及DAPK1 DNA甲基化程度增加78%。該等觀測支持低NET1腫瘤通常顯示DAPK1經由啟動子甲基化下調之觀點。

為進一步研究涉及NSCLC H460細胞中該通路變化之潛在後生機制(其顯示對NET-1干擾(Delloye-Bourgeois等人，2009a)無反應)，藉由Q-RT-PCR評估DAPK1、UNC5h2及NTN1表現及藉由焦磷酸定序DNA甲基化。儘管該等細胞中DAPK1未得以表現，但地西他濱(DAC)(DNMT1抑制劑)處理導致一般DNA甲基化損失及DAPK1及NTN1二者之增加之表現速率同時NTN1依賴性受體表現不受DAC處理之影響。因此，化學誘導之低甲基化直接影響NET1及其依賴性受體通路表現，儘管其不排除此處所顯示的DAC之效應經由主轉錄調節劑之間接再表現產生。

已因此使用依WO2015/104360製得之HUM3單株抗體測試DAC處理(藉由再表現NET1及DAPK1)是否可使H460細胞對NET1 mAb處理再敏感。儘管單獨該NET1 mAb無法對H460細胞存活產生任何效應，但NET1 mAb及DAC之共處理相比單獨DAC處理明顯增加細胞死亡(圖6A及6B)。有趣的是，添加重組NTN1至培養基導致活體外細胞死亡及細胞凋亡誘導的逆轉。使用阿札胞昔(另一DNMT1抑制劑)及利用如從ATCC獲得之其他癌細胞系：KASUMI、JURKAT及HL-60，得到相似結果。

為正式地證實組合表觀治療藥+NET1 mAb之作用模式藉由UNC5h2誘導之細胞凋亡發生，產生DAPK1、UNC5h2及NET-1由於特異性shRNA之組成性表現而穩定沉默之H460細胞系。於DAC處理後分析shRNA之效率。根據提出的作用模式，NET-1之沉默足以於存在或不存在NET1 mAb下於DAC處理後觸發相同程度之細胞凋亡誘導，而DAC + NET-1-mAb處理後DAPK1或UNC5h2表現之沉默係足以阻斷藉由將DAC+NET1 mAb組合所誘導之增加之細胞死亡。

為分析DAC+ NET1 mAb於腫瘤生長之可能效應，裸小鼠中植入H460細胞。DAC處理增加異種移植之腫瘤中DAPK1、NET1及UNC5h2之表現程度，及降低總全局DNA甲基化程度。受關注的是，DAC + NET-1 mAb之組合誘導經處理腫瘤中增加之細胞凋亡程度(圖6C及6D)，同時血管生成或增殖程度均未受到顯著影響。受關注的是，儘管DAC或NET-1 mAb中任一者未顯示對腫瘤生長抑制之任何顯著效應，但兩種分子之組合導致活體內減小的腫瘤生長及腫瘤重量(圖6E及6F)。

以HDAC抑制劑進行之實驗

此分析係關於經不同HDAC抑制劑處理或未處理之人類癌細胞系中之基因表現。使用具有特異性人類DAPK1、UNC5B及NTN1引子之總RNA進行定量即時RT-PCR。

用曲古抑菌素A處理MDA-MB-231細胞。處理後，NTN1及UNC5B之表現速率以劑量依賴方式顯著增加。(圖7A)

用伏立諾他處理MDA-MB-231細胞。處理後，NTN1及UNC5B之表現速率以劑量依賴方式顯著增加。(圖7B)

用帕比司他處理MDA-MB-231細胞。處理後，相比媒劑(DMSO)，DAPK1、NTN1及UNC5B之表現速率以劑量依賴方式顯著增加。(圖7C)

用帕比司他(20 nM，48小時)及/或net1-mAb(10 µg/mL，48小時)處理MDA-MB-231細胞且測量細胞死亡程度。(圖7D)

論述

當前結果提供DNA甲基化之抑制可使得實體腫瘤對介導腫瘤細胞凋亡之抗體敏感之概念之第一動物證據。雖然實驗上下調NTN1 (使用siRNA)或NTN1捕捉(使用誘餌分子)能夠誘導裸小鼠中人類異種移植物之活體外凋亡性細胞死亡及腫瘤生長減慢，但顯示低NTN1程度之癌細胞在活體外及活體內均抗NTN1中和。此處吾人提出低NTN1腫瘤中由NTN1依賴性受體觸發之細胞凋亡之阻斷可藉由下調如結腸直腸癌中大程度上列舉的受體、或藉由同時下調主要訊號傳導通路搭配物而在不同程度上發生。受關注的是，在此處所分析的乳癌組中，低NTN1表現與位於該基因5'端之CpG島狀物之超甲基化相關聯。另外，DAPK1 (NTN1依賴性受體通路中之必需搭配物)中亦發現超甲基化與基因沉默之間之此種相關性。亦在一些細胞系中探討該等特徵；在HMLER、MDA-MB-231及H460細胞中，NTN1係經下調且甲基化，及在HMLER及H460細胞中DAPK1 係經甲基化且下調。

後生DNA修飾之潛在可逆性提高DNA甲基化之抑制可誘導該等基因再表現之概率，且因此，使得細胞對NTN1中和劑再敏感。已顯示在活體外及活體內臨床前模型中，DNA甲基化之抑制劑與抗-NTN1抗體之組合

係與NTN1及DAPK1之再表現、及腫瘤細胞死亡及腫瘤生長抑制相關聯。有趣地看到，在本發明臨床前模型中，用作單治療劑之地西他濱在無腫瘤生長抑制效應情況下僅顯示適度。對地西他濱處理(用作單治療劑)之抵抗性不可能係劑量過量或不足的結果，因為若干報告已證實在一些小鼠模型中相似地西他濱劑量可有效減少腫瘤形成，包括由ApcMin誘導之腸道腫瘤、HRASG12V轉化人類腎臟上皮、白血病細胞、乳癌細胞系、及所植入的患者衍生的腫瘤。另外，在MDA-MB-231及H460異種移植腫瘤中於與抗NTN1抗體組合或未組合之地西他濱處理後觀測到DNA去甲基化，此指示DNA甲基化藉由活體內地西他濱處理有效地抑制。或者，該等資料將表明腫瘤生長條件可至少部分地克服地西他濱之抗腫瘤效應。此可至少部分地係當在臨床試驗中對實體癌症評估時不存在用作單一治療之去甲基化劑之所報告抗癌效應。使用地西他濱與其他後生改質劑及/或細胞毒性劑之組合之實驗方法及臨床試驗提供減慢腫瘤生長之感興趣方法。然而，該等方法並未充分利用地西他濱之為潛在隱蔽標靶及通路之再表現之重要態樣。此處所報告的資料不僅提供配體依賴性受體對在調節腫瘤發展中具重要性之證據而且主張基於特異性靶向DNA低甲基化處理後再表現之基因之新策略。照此，此處提出DNA甲基化之抑制劑可使腫瘤「準備好」NTN1成癮且因此DNA甲基化之抑制劑與抗-NTN1抗體之組合可證明是強效的治療方法。

全人類NTN1抗體(NET1-H-mAb)係處於後期監管臨床前評估中且特定言之在啮齒動物或石蟹獼猴中無毒性征兆。早期臨床試驗安排在2016年，且應快速利用此處所報告的支持以下觀點的資料：罹患具有NTN1及DAPK1啟動子兩者之超甲基化之乳癌之患者應對DNA甲基化之抑制劑與該抗-NTN1抗體之組合具有反應。

參考文獻

- Aparicio, A.等人 (2009). *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 4, 176–184。
- Auriol, E.等人 (2005). *Nucleic Acids Res.* 33, 4243–4254。
- Baylin, S.B.及Ohm, J.E. (2006). *Nat. Rev. Cancer* 6, 107–116。
- Bernet, A.等人 (2007). *Gastroenterology* 133, 1840–1848。
- Delloye-Bourgeois, C.等人 (2009a). *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 237–247。
- Delloye-Bourgeois, C.等人 (2009b). *J. Exp. Med.* 206, 833–847。
- Elenbaas, B.等人 (2001). *Genes Dev.* 15, 50–65。
- Guenebeaud, C.等人 (2010). *Mol. Cell* 40, 863–876。
- Hedrick, L.等人 (1994). *Genes Dev.* 8, 1174–1183。
- Kilinc, D.等人 (2012). *DNA Cell Biol.* 31, 826–832。
- Krimpenfort, P.等人 (2012). *Nature* 482, 538–541。
- Llambi, F.等人 (2001). *EMBO J.* 20, 2715–2722。
- Llambi, F.等人 (2005). *EMBO J.* 24, 1192–1201。
- Lund, P.等人 (2011). *Mol. Cancer Ther.* 10, 1611–1623。
- Mian, O.Y.等人 (2011). *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 1152–1162。
- Morel, A.-P.等人 (2008). *PloS One* 3, e2888。
- Nebbio, A.等人 (2012). *Mol. Oncol.* 6, 657–682。
- Perrin, D.等人 (2007). *Oncogene* 26, 2518–2524。
- Pulling, L.C.等人 (2009). *Carcinogenesis* 30, 2023–2030。
- Raval, A.等人 (2007). *Cell* 129, 879–890。
- Shin, S.K.等人 (2007). *Gastroenterology* 133, 1849–1857。
- Tsai, H.-C.等人 (2012). *Cancer Cell* 21, 430–446。
- Scott J.K., Smith G.P. *Science* 1990; 249:386-390。

J.D. Marks等人，J. Mol.Biol., 222 (1991), 第581頁。

Jones, P.A.及S.B.Baylin, Nat Rev Genet, 2002.3(6): 第415-28頁。

Jones, P.A.及P.W.Laird, Nat Genet, 1999.21(2): 第163-7頁。

Nan, X.等人，Nature, 1998.393(6683): 第386-9頁。

Jones, P.L.等人，Nat Genet, 1998.19(2): 第187-91頁。

Jones, P.A.及S.B.Baylin, Cell, 2007.128(4): 第683-92頁。

【序列表】

<110> 法商妮翠斯製藥公司
 <120> NTN1中和劑與抑制後生控制之藥物之組合治療
 <130> BET 14L3524
 <140> EP 15306743.4
 <141> 2015-11-02
 <160> 71
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> 現代人

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(24)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (339)..(381)
 <223> 線性抗原決定基

<400> 1

Met Met Arg Ala Val Trp Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

Cys Leu Val Gly Ala Val Arg Gly Gly Pro Gly Leu Ser Met Phe Ala
 20 25 30

Gly Gln Ala Ala Gln Pro Asp Pro Cys Ser Asp Glu Asn Gly His Pro
 35 40 45

Arg Arg Cys Ile Pro Asp Phe Val Asn Ala Ala Phe Gly Lys Asp Val
 50 55 60

Arg Val Ser Ser Thr Cys Gly Arg Pro Pro Ala Arg Tyr Cys Val Val
 65 70 75 80

Ser Glu Arg Gly Glu Glu Arg Leu Arg Ser Cys His Leu Cys Asn Ala
 85 90 95

Ser Asp Pro Lys Lys Ala His Pro Pro Ala Phe Leu Thr Asp Leu Asn
 100 105 110

Asn Pro His Asn Leu Thr Cys Trp Gln Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Phe
 115 120 125

Pro His Asn Val Thr Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Lys Phe Glu Val
 130 135 140

Thr Tyr Val Ser Leu Gln Phe Cys Ser Pro Arg Pro Glu Ser Met Ala
 145 150 155 160
 Ile Tyr Lys Ser Met Asp Tyr Gly Arg Thr Trp Val Pro Phe Gln Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Thr Gln Cys Arg Lys Met Tyr Asn Arg Pro His Arg Ala Pro
 180 185 190
 Ile Thr Lys Gln Asn Glu Gln Glu Ala Val Cys Thr Asp Ser His Thr
 195 200 205
 Asp Met Arg Pro Leu Ser Gly Gly Leu Ile Ala Phe Ser Thr Leu Asp
 210 215 220
 Gly Arg Pro Ser Ala His Asp Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu Gln Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Ala Phe Ser Arg Leu His Thr
 245 250 255
 Phe Gly Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ser Glu Leu Ala Arg Asp Ser Tyr
 260 265 270
 Phe Tyr Ala Val Ser Asp Leu Gln Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn
 275 280 285
 Gly His Ala Ala Arg Cys Val Arg Asp Arg Asp Asp Ser Leu Val Cys
 290 295 300
 Asp Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Pro Glu Cys Asp Arg Cys Lys Pro
 305 310 315 320
 Phe His Tyr Asp Arg Pro Trp Gln Arg Ala Thr Ala Arg Glu Ala Asn
 325 330 335
 Glu Cys Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe
 340 345 350
 Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys
 355 360 365
 Leu Asn Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His Tyr Cys Lys
 370 375 380
 Glu Gly Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Lys Pro Ile Thr His Arg Lys Ala
 385 390 395 400
 Cys Lys Ala Cys Asp Cys His Pro Val Gly Ala Ala Gly Lys Thr Cys

405

410

415

Asn Gln Thr Thr Gly Gln Cys Pro Cys Lys Asp Gly Val Thr Gly Ile
420 425 430

Thr Cys Asn Arg Cys Ala Lys Gly Tyr Gln Gln Ser Arg Ser Pro Ile
435 440 445

Ala Pro Cys Ile Lys Ile Pro Val Ala Pro Pro Thr Thr Ala Ala Ser
450 455 460

Ser Val Glu Glu Pro Glu Asp Cys Asp Ser Tyr Cys Lys Ala Ser Lys
465 470 475 480

Gly Lys Leu Lys Ile Asn Met Lys Lys Tyr Cys Lys Lys Asp Tyr Ala
485 490 495

Val Gln Ile His Ile Leu Lys Ala Asp Lys Ala Gly Asp Trp Trp Lys
500 505 510

Phe Thr Val Asn Ile Ile Ser Val Tyr Lys Gln Gly Thr Ser Arg Ile
515 520 525

Arg Arg Gly Asp Gln Ser Leu Trp Ile Arg Ser Arg Asp Ile Ala Cys
530 535 540

Lys Cys Pro Lys Ile Lys Pro Leu Lys Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Asn
545 550 555 560

Ala Glu Asp Ser Pro Asp Gln Ser Gly Ile Val Ala Asp Lys Ser Ser
565 570 575

Leu Val Ile Gln Trp Arg Asp Thr Trp Ala Arg Arg Leu Arg Lys Phe
580 585 590

Gln Gln Arg Glu Lys Lys Gly Lys Cys Lys Lys Ala
595 600

<210> 2
<211> 1817
<212> DNA
<213> 現代人

<400> 2
atgatgcgcg cagtgtggga ggcgctggcg gcgctggcgg cggtagcgtg cctggtgggc 60
gcggtgcgcg gcgggcccgg gctcagcatg ttgcggggcc aggcggcgca gcccgatccc 120
tgctcggacg agaacggcca cccgcgccgc tgcaccccgg actttgtcaa tgcggccttc 180
ggcaaggacg tgcgcgtgic cagcacctgc ggccggcccc cggcgcgcta ctgcgtggtg 240
agcgaagcgcg gcgaggagcg gctgcgctcg tgccacctct gcaacgcgctc cgaccccaag 300

aaggcgcacc egcccgcctt cctcaccgac ctcaacaacc cgcacaacct gacgtgctgg 360
cagtcggaga actacctgca gtccccgcac aacgtcacgc tcacactgtc cctcggcaag 420
aagttcgaag tgacctactg gagcctgcag ttctgctcgc cgcggcccga gtccatggcc 480
atctacaagt ccatggacta cggcgcacg tgggtgccct tccagticta ctccaogcag 540
tgccgcaaga tgtacaaccg gccgcaccgc gcgcccata ccaagcagaa cgagcaggag 600
gccgtgtgca ccgactcgca caccgacatg cgcgccctct cggcggccct catcgcttc 660
agcacgctgg acggcggccc ctccggcgac gacttcgaca actcggccgt gctgcaggac 720
tgggtcacgg ccacagacat ccgctggcc ttccagcggc tgcacacgtt cggcggacgag 780
aacgaggacg actcggagct ggccgcggac tcgtacttct acgggtgtc cgacctgcag 840
gtggcggccc ggtgcaagt caacggccac gcggcccgt gctgtcgcga ccgcgacgac 900
agcctgggtg gcgactcgca gcacaacacg gccggcccgg agtgcgaccg ctgcaagccc 960
ttccactacg accggccctg gcagcgcgcc acagcccgcg aagccaacga gtgcgtggcc 1020
tgtaactgca acctgcatgc ccggcgtgc cgcttcaaca tggagctcta caagcttccg 1080
gggcgcaaga ggggaggtgt ctgcctcaac tctcgcaca acaccgccg ccgccactgc 1140
cattactgca agggaggctt ctaccgac atgggcaagc ccatcacca ccggaaggcc 1200
tgcaaacct gtgattgcca cctgtgggt gctgctggca aaacctgca ccaaaccacc 1260
ggccagtgtc cctgcaagga cggcgtgacg ggtatcacct gcaaccgtg cgcgaaggc 1320
taccagcaga gccctctcc catcgcccc tgcataaaga tccctgtagc gccgccgacg 1380
actgcagcca gcagcgtgga ggagcctgaa gactgctgatt cctactgcaa ggctccaag 1440
gggaagctga agattaacat gaaaaagtac tgcaagaag actatgccgt ccagatccac 1500
atcctgaagg cggacaaggc ggggactgg tggaaatica cgtgaacat catctccgtg 1560
tataagcagg gcacgagccg catccgccg ggtgaccaga gctgtggat ccctcgcgg 1620
gacatgcct gcaagtgtcc caaaatcaag cccctcaaga agtacctgt gctgggcaac 1680
gcggaggact ctccggacca gagcggcatc gtggccgata aaagcagcct ggtgatccag 1740
tggcgggaca cgtggcgcg gcggctgcgc aagttccagc agcgtgagaa gaaggcaag 1800
tgcaagaagg cctagcg 1817

<210> 3
<211> 43
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 3

Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met
1 5 10 15

Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys Leu Asn
20 25 30

Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His
 35 40

<210> 4
 <211> 129
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 4
 gtggcctgta actgcaacct gcatgcccgg cgctgcccgt tcaacatgga gctctacaag 60
 ctttcggggc gcaagagcgg aggtgtctgc ctcaactgtc gccacaacac cgccggccgc 120
 cactgccat 129

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 6

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 7

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 8

Gln Ser Val Ser Asn Asp
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<400> 9

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
1 5<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> 家鼠<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(33)
<223> 根據IGMT之CDR<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(58)
<223> 根據IGMT之CDR<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(105)
<223> 根據IGMT之CDR

<400> 10

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110Thr Val Ser Ala
115<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> 家鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(52)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(97)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 11

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 12

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Asp
 165 170 175
 Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro
 180 185 190
 Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile
 210 215 220
 Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
 260 265 270

Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
 290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
 305 310 315 320

Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
 325 330 335

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala
 340 345 350

Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu
 355 360 365

Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
 370 375 380

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
 385 390 395 400

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
 405 410 415

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 家鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(52)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(97)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 13

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

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

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 14
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(52)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(97)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 14

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 15
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化抗體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> CDR according to IGMT

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(52)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(97)

<223> 根據IGMT之CDR

<400> 15

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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
100

<210> 16

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化變體

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> 根據IGMT之CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> 根據IGMT之CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> 根據IGMT之CDR

<400> 16

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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 17
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(52)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(97)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 17

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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
100

<210> 18
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化變體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(32)
<223> 根據IGMT之CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(52)
<223> 根據IGMT之CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(97)
<223> 根據IGMT之CDR

<400> 18

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
100

<210> 19
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(52)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(97)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 19

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 20
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 20

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 21
 <211> 109
 <212> FRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 21

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

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

Asn Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 22
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 22

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 23
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 23

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 24
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 人類化變體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(33)
<223> 根據IGMT之CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(58)
<223> 根據IGMT之CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(105)
<223> 根據IGMT之CDR

<400> 24

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210> 25
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化變體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(33)
<223> 根據IGMT之CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(58)
<223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 25

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 26
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化變體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> 根據IGMT之CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(105)
 <223> 根據IGMT之CDR

<400> 27

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

<210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用於人類軸突導向因子-1基因之PCR之正向引子

<400> 33
 aaaagtactg caagaaggac tatgc 25

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用於人類軸突導向因子-1基因之PCR之反向引子

<400> 34
 cccctgcttat acacggagat g 21

<210> 35
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 35
 Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg
 1 5 10 15

Lys Ser Gly Gly Val Cys
 20

<210> 36
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> cDNA

<400> 36
 gcccggcgcg gccgcttcaa catggagctc tacaagcttt cggggcgcaa gagcggaggt 60
 gtctgc 66

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 正向引子

<400> 37
 gagtgattcg cgtgggtacc 20

<210> 38
 <211> 18
 <212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子	
<400> 38	
ggctccgatg gtgaagcc	18
<210> 39	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引子	
<400> 39	
cggagtcaac ggatttggtc gtat	24
<210> 40	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子	
<400> 40	
agccittctcc atggtggatga agac	24
<210> 41	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引子	
<400> 41	
gatagaaatg tccccaacc tcg	23
<210> 42	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子	
<400> 42	
tcttcttggg tcttigacca gaa	23
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引子	
<400> 43	
cccgccacac agatctactt	20

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反向引子

<400> 44
 cagtaatcct ccagcccaaa

20

<210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 正向引子

<400> 45
 tgcaagaagg actatgccgt c

21

<210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反向引子

<400> 46
 gctcgtgcc tgcttataca c

21

<210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 正向引子

<400> 47
 cccacaacga atgaatgaac agc

23

<210> 48
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反向引子

<400> 48
 tgaagaccti tggtagtgc ca

22

<210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	正向引子	
<400>	49	
	atcaccaagg acacaaggtt tgc	23
<210>	50	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反向引子	
<400>	50	
	ggctggaaat tatcttctgc cgaa	24
<210>	51	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正向引子	
<400>	51	
	gcaaattgct ggctaaatat caggaa	26
<210>	52	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反向引子	
<400>	52	
	gtccactgt gttcaggcta aatctt	26
<210>	53	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正向引子	
<400>	53	
	agccaatggg aaaattactg cttac	25
<210>	54	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反向引子	
<400>	54	
	aggttgagat ccatgatttg atgag	25

<210> 55	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引子	
<400> 55	
tggaaaacca actccaactg tga	23
<210> 56	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子	
<400> 56	
tgatttcacc agacccaaaa ctgga	25
<210> 57	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引子	
<400> 57	
tagggagtgt tagatagtg	20
<210> 58	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子	
<400> 58	
aactacraac tacaataac	19
<210> 59	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引子	
<400> 59	
ttatggttat ttataagttt atgga	25
<210> 60	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子	

<400> 60 taaccaatc ctacaacac	19
<210> 61 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引子	
<400> 61 titttiggat tgggaaatg tataa	25
<210> 62 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引子	
<400> 62 aacccaaac tactacctct cctcc	25
<210> 63 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 定序引子	
<400> 63 ctcttgctac tctgctctgg	20
<210> 64 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引子	
<400> 64 gctaagtta gctgcctgg	20
<210> 65 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引子	
<400> 65 gtatttggtg atgggttaag g	21
<210> 66 <211> 21	

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反向引子
 <400> 66
 ataaaaacaa atcccctacc c 21

<210> 67
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 定序引子
 <400> 67
 caaataaac aatacctc 18

<210> 68
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 定序引子
 <400> 68
 taaccaatc ctacaacac 19

<210> 69
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 定序引子
 <400> 69
 caatcctaca acac 14

<210> 70
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 定序引子
 <400> 70
 aacccttaa tcaa 14

<210> 71
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 定序引子
 <400> 71

201720459

【發明摘要】

IPC 分類：
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】

NTN1 中和劑與抑制後生控制之藥物之組合治療

【英文發明名稱】

COMBINATION THERAPY OF NTN1 NEUTRALIZING AGENT
WITH DRUGS INHIBITING EPIGENETIC CONTROL

【中文】

本發明係關於一種醫藥或抗癌組合物，其可用於治療具有 NTN1、UNC5H 或 DAPK1 之表現之 DNA 甲基化依賴性損失之癌症。本發明亦關於一種治療此等癌症之方法。該組合物包含後生藥物及 NTN1 中和劑或能夠活體內表現 NTN1 中和劑之載體，其等係含在醫藥上可接受之載劑或媒劑中。該 NTN1 中和劑(諸如，與軸突導向因子-1 或軸突導向因子-1 受體結合之抗體)促進軸突導向因子-1 受體誘導之細胞凋亡。該後生藥物可為 DNA 甲基轉移酶抑制劑或 HDAC 抑制劑。

【英文】

The pharmaceutical or anticancerous composition is useful in treating a cancer having a DNA methylation dependent loss of expression of NTN1, UNC5H or DAPK1. The invention also relates to a method of treatment of such cancers. The composition comprises an epigenetic drug and a NTN1 neutralizing agent or a vector capable of expressing a NTN1 neutralizing agent in vivo, in a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle. The NTN1 neutralizing agent, such as an antibody binding to netrin-1 or to a netrin-1 receptor, promotes netrin-1

receptors-induced apoptosis. The epigenetic drug may be a DNA methyltransferase inhibitor or an HDAC inhibitor.

【指定代表圖】

圖2A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種醫藥組合物，其包含選自DNA甲基化抑制劑及具有組蛋白抑制活性之抑制劑之後生藥物，及NTN1中和劑或能夠活體內表現NTN1中和劑之載體，其等係含在醫藥上可接受之載劑或媒劑中。

【第2項】

如請求項1之組合物，其中該NTN1中和劑促進軸突導向因子(neurin)-1受體誘導之細胞凋亡。

【第3項】

如請求項1或2之組合物，其中該NTN1中和劑為與軸突導向因子-1或軸突導向因子-1受體結合之抗體。

【第4項】

如請求項1或2之組合物，其中該NTN1中和劑為含軸突導向因子-1受體之胞外域之化合物。

【第5項】

如請求項1或2之組合物，其中該軸突導向因子-1干擾藥物為降低編碼軸突導向因子-1之基因表現之siRNA。

【第6項】

如前述請求項中任一項之組合物，其中該後生藥物為DNA甲基轉移酶抑制劑。

【第7項】

如請求項6之組合物，其中該DNA甲基轉移酶抑制劑係選自由以下組成之群：阿札胞苷(azacitidine)；地西他濱(decitabine)；紮布拉林

(zebularine)；5,6-二氫-5-阿札胞苷；5-氟-2'-去氧胞苷；NPEOC-DAC；CP-4200；及地西他濱-對-去氧鳥苷(SGI-110)、普魯卡因胺(procainamide)、普魯卡因(procaine)、聯胺胼(hydralazine)、((-)-表沒食子酸兒茶素-3-沒食子酸酯(EGCG)、N-鄰苯二甲醯基-1-色胺酸(RG108)及SGI-1027。

【第8項】

如請求項1至5中任一項之組合物，其中該後生藥物為HDAC抑制劑。

【第9項】

如請求項8之組合物，其中該HDAC抑制劑為羧肟酸或環肽。

【第10項】

如請求項8之組合物，其中該HDAC抑制劑為伏立諾他(vorinostat)、曲古抑菌素A(trichostatine A)、帕比司他(panobinostat)、貝林司他(belinostat)或羅咪酯肽(romidepsin)。

【第11項】

如前述請求項中任一項之組合物，其係用於治療癌症。

【第12項】

如前述請求項中任一項之組合物，其係用於治療具有NTN1及DAPK1之表現之DNA甲基化依賴性損失之癌症。

【第13項】

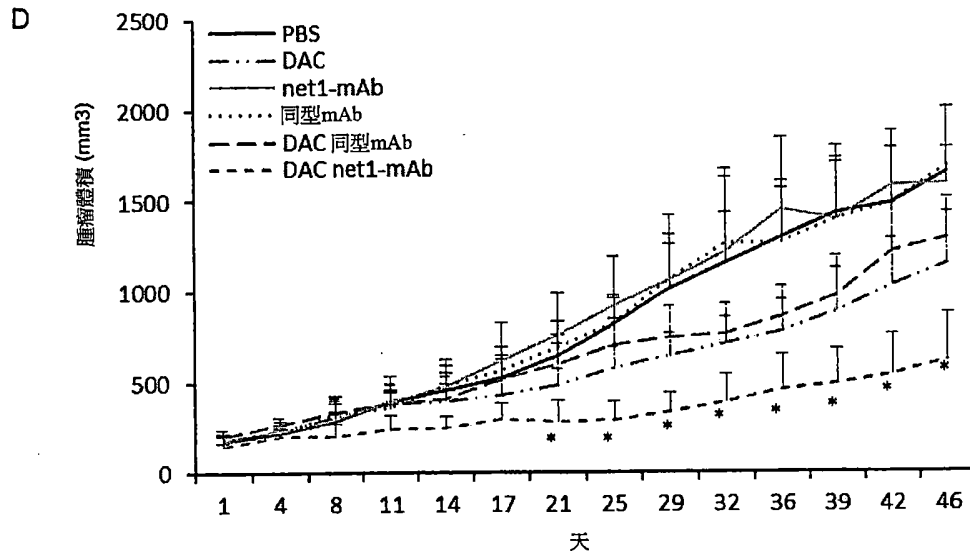
如前述請求項中任一項之組合物，其係用於治療具有阻斷經由NTN1依賴性受體所引起之細胞凋亡之上調NTN1之癌症。

【第14項】

一種如請求項11、12或13使用之組合物，其包含後生藥物及NTN1中和劑或能夠活體內表現NTN1中和劑之載體，以用於同時、分開或連續地投與患者。

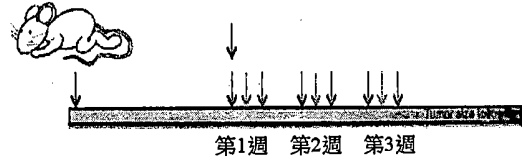
RTqPCR 引子 PBGD	正向 5'-GAGTGATT CGCGTGGGTACC-3' 反向 5'-GGCTCCGATGGTGAAGCC-3'
GAPDH	正向 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' 反向 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
DAPK1	正向 5'-GATAGAAATGTCCCCAACCTCG-3' 反向 5'-TCTTCTTGGATCCTTGACCAGAA-3'
UNC5B	正向 5'-CCCGCCACACAGATCTACTT-3' 反向 5'-CAGTAATCCTCCAGCCCCAAA-3'
NTN1	正向 5'-TGCAAGAAGGACTATGCCGTC-3' 反向 5'-GCTCGTGCCCTGCTTATACAC-3'
MBD2	正向 5'-CCCACAACGAATGAATGAACAGC-3' 反向 5'-TGAAGACCTTGGGTAGTTCCA-3'
UNC5A	正向 5'-ATCACCAAGGACACAAGGTTTGC-3' 反向 5'-GGCTGGAAATTATCTTCTGCCGAA-3'
UNC5C	正向 5'-GCAAATTGCTGGCTAAATATCAGGAA-3' 反向 5'-GCTCCACTGTGTTTCCAGGCTAAATCTT-3'
DCC	正向 5'-AGCCAATGGGAAAATTACTGCTTAC-3' 反向 5'-AGGTTGAGATCCATGATTTGATGAG-3'
NEO1	正向 5'-TGGAAAACCAACTCCAACGTGA-3' 反向 5'-TGATTTACCAGACCCAAAACCTGA-3'
焦磷酸定序擴增 引子	
LINE -1	正向 5' BIO-TAGGGAGTGTTAGATAGTGG-3' 反向 5'-AACTACRAACTACAATAAC
NTN1	正向 5' BIO-TTATGGTTATTTATAAGTTTATGGA-3' 反向 5'-TAACCCAATCCTACAACAC-3'
DAPK1	正向 5' BIO-TTTTTTGGATTGTGGAAATGTATAA-3' 反向 5'-AACCCCTAACTACTACCTCTCCTCC-3'
未經修飾之GAPDH	正向 5'-CTCTTGCTACTCTGCTCTGG-3' 反向 5'-GCTAAGTTTAGCCTGCCTGG-3'
經亞硫酸氫鹽處 理之GAPDH	正向 5'-GTATTTGTTGATGGGTTAAGG-3' 反向 5'-ATAAAAACAAATCCCCTACCC-3'
定序引子	
LINE-1-a	5'-CAAATAAAACAATACCTC-3'
NTN1-a	5'-TAACCCAATCCTACAACAC-3'
NTN1-b	5'-CAATCCTACAACAC-3'
DAPK1-a	5' AACCCCTAAATCAA 3'
DAPK1-b	5'-TTCTCTATAATTTA-3'

【圖4】



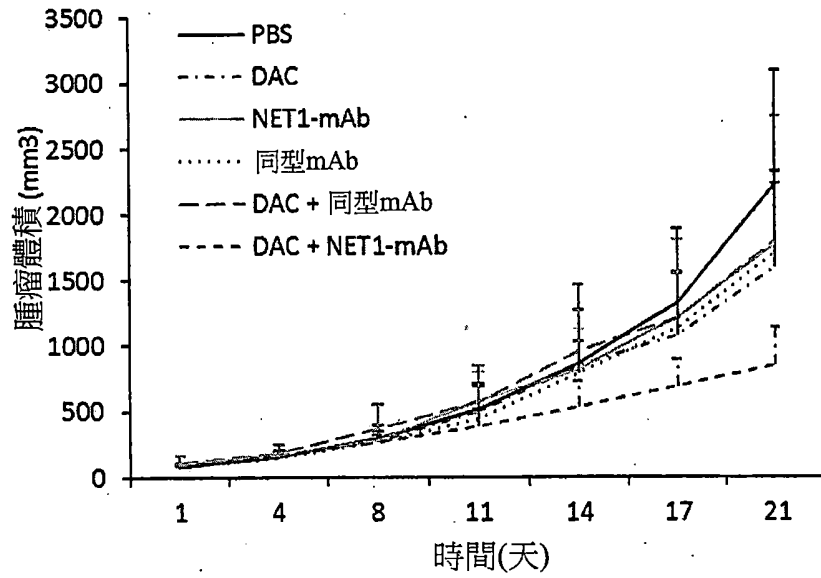
【續圖5】

E



- 細胞注射(10^6 個細胞/小鼠)
- 腫瘤尺寸 $\approx 100 \text{ mm}^3$: 方案開始時
- DAC (0.5 mg/kg) SC
- DAC (0.5 mg/kg) SC + NET1-H-mAb
或同型mAb (10 mg/kg) IP

F



【續圖6】

