



(21)申請案號：105136406 (22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 09 日

(51)Int. Cl. : A61K45/06 (2006.01) A61K38/00 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/10 美國 62/253,437

(71)申請人：耶魯大學(美國) YALE UNIVERSITY (US)

美國

(72)發明人：陳 列平 CHEN, LIEPING (US)；王俊 WANG, JUN (CN)；孫靜瑋 SUN, JINGWEI (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

WO 2013/034660A1

期刊 Rina Takamiya et al: The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- β secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. Glycobiology vol. 23 no. 2 pp. 178-187, 2013.

期刊 Macauley, Matthew S., Paul R. Crocker, and James C. Paulson. "Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease." Nature Reviews Immunology 14.10 (2014): 653-666.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：27 共 157 頁

(54)名稱

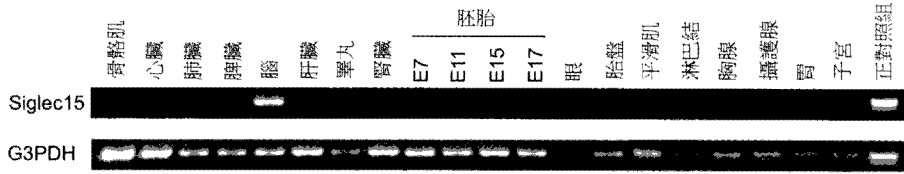
用於治療癌症之組成物及方法

(57)摘要

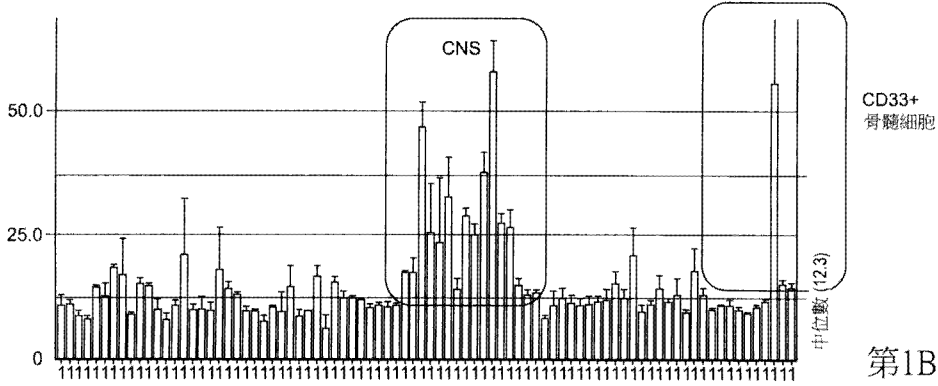
本發明係針對有其需要之個體，經由調節 Siglec 15 及/或其結合配體之表現及/或活性，而提供用於治療癌症之方法與組成物、用於增強對抗腫瘤之免疫反應之方法、用於治療自體免疫疾病之方法、及用於降低發炎反應之方法。

The present invention provides methods and compositions for treating a cancer, methods for increasing an immune response against a tumor, methods for treating an autoimmune disease, and methods for decreasing an inflammation response in a subject in need thereof by modulating the expression and/or activity of Siglec 15 and/or its binding ligands.

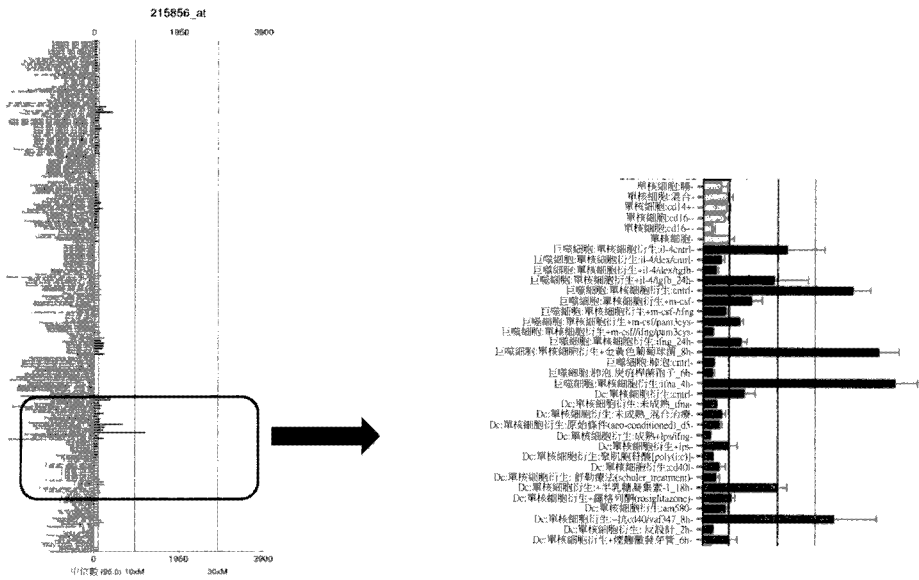
指定代表圖：



第1A圖



第1B圖



第1C圖

I847955

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療癌症之組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
CANCERS

【中文】

本發明係針對有其需要之個體，經由調節 Siglec 15 及/或其結合配體之表現及/或活性，而提供用於治療癌症之方法與組成物、用於增強對抗腫瘤之免疫反應之方法、用於治療自體免疫疾病之方法、及用於降低發炎反應之方法。

【英文】

The present invention provides methods and compositions for treating a cancer, methods for increasing an immune response against a tumor, methods for treating an autoimmune disease, and methods for decreasing an inflammation response in a subject in need thereof by modulating the expression and/or activity of Siglec 15 and/or its binding ligands.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無化學式

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)

用於治療癌症之組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
CANCERS

【0001】

相關申請案

本申請案請求 2015 年 11 月 10 日提出申請之美國臨時申請案 No. 62/253,437 之優先權，該案全部內容併入本文以資參考。

【技術領域】

【0002】 本發明係經由調節 Siglec 15 及/或其結合配體之表現及/或活性，而提供用於治療癌症之方法與組成物、用於增強對抗腫瘤之免疫反應之方法、用於治療自體免疫疾病之方法、及用於降低發炎反應之方法。

【先前技術】

【0003】 於工業化國家中，癌症已被認為是死亡的主要原因之一。癌症係由單一轉形細胞之子代進行性生長所引起。治療癌症需要去除或破壞所有惡性細胞而不引致病患死亡。達此目的之有吸引力之方式為誘發能區別腫瘤細胞及其正常細胞對應物之對抗腫瘤之免疫反應。的確，就特異性破壞腫瘤而對正常組織無毒性而言，免疫系統具有巨大潛力。免疫系統檢測及破壞異常細胞之天然能力可

防止許多癌症進展。此外，免疫系統之長期記憶可防止癌症復發。

【0004】 然而，癌症細胞有時能經由減低腫瘤抗原於其表面之表現而避免被免疫系統檢測及破壞，使得免疫系統對其之檢測更為困難。替代地，癌症細胞可於其表面表現誘發免疫細胞失活之蛋白質，或誘導周圍環境中之細胞釋放壓制免疫反應並促進腫瘤細胞增殖與存活之物質。因此，業界對於鑑定出調節對抗腫瘤之免疫反應之新分子以供新穎免疫治療劑之開發持續存在需求 [Sznol M and Chen L, *Clin Cancer Res* 19(5): 1021-1034, 2013]。

【0005】 免疫細胞之細胞膜係被可被各種結合聚醣之蛋白識別之各種聚醣例如唾液酸之緻密外層覆蓋。結合唾液酸之類免疫球蛋白凝集素(Siglecs)為第 I 型膜蛋白之家族，其經由聚醣識別而調控先天及適應性免疫系統中之細胞功能 [Kameda Y. *et al.*, *J. Bone Miner. Res.* 2013; 28(12): 24463-75]。Siglecs 蛋白含有結合唾液酸之成分與類 Ig 分子；其參與細胞黏附相互作用、神經元、腦功能與神經元發育。Siglec 家族有兩個較小成員：Siglec 14 與 Siglec 15；此二分子均具有可被磷酸化之小胞內功能區與膜內功能區；由於其大小夠小而得以穿越細胞膜傳送訊息。彼等 Siglec 成員於小鼠及人類中均發現，於物種間屬高度進化保留。

【0006】 先前之微陣列數據指出，Siglec 15 存在週邊、巨噬細胞與單核細胞之骨髓細胞中。Siglec 15 通常於

單核細胞、巨噬細胞、樹突細胞、B 細胞與蝕骨細胞上表現。單核細胞、骨髓細胞與 B 細胞中之 Siglec 15 表現可被 RANK 配體與 M-CSF 誘發及向上調節 [Stuible M, *et al.*, *J Biol Chem.* 2014, 289(10): 6498-512; Takamiya R, *et al.*, *Glycobiology.* 2013; 23(2): 178-87]。Siglec-15 缺陷小鼠展現由蝕骨細胞發育受損產生之輕度骨硬化症 [Kameda Y. *et al.*, *J. Bone Miner. Res.* 28(12): 24463-75, 2013]。Siglec 15 於蝕骨細胞分化及骨骼重建中之作用雖已被廣泛研究，惟關於 Siglec 15 之免疫功能所知甚少 [Stuible M, *et al.*, *J Biol Chem.* 2014, 289(10): 498-512]。新近之研究顯示於肺、直腸腺癌與肝細胞癌腫瘤中，Siglec 15 與 CD68 間之表現與共定位，並發現其等係於巨噬細胞中表現，進一步支撐表現 Siglec 15 於骨髓細胞中之表現 [Takamiya R, *et al.*, *Glycobiology.* 2013; 23(2): 178-Takamiya R, *et al.*, *Glycobiology.* 2013; 23(2): 178-87

【0007】 因此，此項技藝中對於鑑定調節對抗腫瘤之免疫反應之另外分子，俾使擴大成功率及充分利用抗腫瘤自體免疫療法有所需求。

【發明內容】

【0008】 本發明至少部分係基於發現 Siglec 15 於壓制對抗癌症之免疫反應中扮演關鍵角色，因此，提供操控 Siglec 15 途徑以作為未來開發癌症治療藥物之理論基礎。特別是，已發現降低 Siglec 15 之表現會縮減腫瘤大小及延長具有腦瘤小鼠之存活期。此外，於腦發炎小鼠模式中經

由阻斷 Siglec 15 與其配體間之相互作用抑制 Siglec 15 活性，以及於 Siglec 15 基因剔除小鼠中徹底破壞 Siglec 15 之表現促進腦發炎。

【0009】 因此，本發明提供經由抑制或壓制 Siglec 15 及/或其結合配體例如 MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn 之表現及/或活性而針對個體治療癌症或增強對癌症之免疫反應之方法。於另一態樣中，本發明包含經由增強 Siglec 15 及/或其結合配體例如 MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn 之表現及/或活性而針對個體治療自體免疫疾病、或降低發炎反應之方法。

【0010】 於一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體治療癌症之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低該個體之 Siglec 15 之表現及/或活性，從而治療該個體之癌症。

【0011】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 Siglec 15 之小分子抑制劑、Siglec 15 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 Siglec 15 融合蛋白、或靶向 Siglec 15 之抑制性胜肽或核酸之組群。於其他具體實例中，該 Siglec 15 融合蛋白係 Siglec 15-Fc 融合蛋白。

【0012】 於若干具體實例中，該調節劑阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於若干具體實例中，該結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於若干具體實例中，該調節劑係於殘基 143 處具有單一置換突變之突變體 Siglec 15 蛋白。於其他具體實例中，該調節劑係具有 IgV

功能區缺失之突變體 Siglec 15 蛋白。於其他具體實例中，該結合配體係 Sialyl-Tn。於若干具體實例中，該調節劑係可溶性 Sialyl-Tn 分子。於其他具體實例中，該調節劑係特异性結合 Sialyl-Tn 之抗體或其抗原結合片段。

【0013】 於若干具體實例中，該調節劑降低 MAG 及/或 LRRC4C 之表現及/或活性量。於其他具體實例中，該調節劑降低含 Sialyl-Tn 之蛋白質之表現及/或活性量。於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 之小分子抑制劑、MAG 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 MAG 融合蛋白、靶向 MAG 之抑制性胜肽或核酸、LRRC4C 之小分子抑制劑、LRRC4C 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 LRRC4C 融合蛋白、或靶向 LRRC4C 之抑制性胜肽或核酸之組群。

【0014】 於若干具體實例中，該癌症係選自包括腦癌、肺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌、直腸腺癌、肝細胞癌、與 Ewing 氏肉瘤之組群。於其他具體實例中，該腦癌係神經膠母細胞瘤。於若干具體實例中，該癌症係結腸癌、子宮內膜樣癌、腎臟癌(例如，腎乳頭狀細胞癌、腎透明細胞癌)、肝癌、甲狀腺癌、肺癌(例如，肺腺癌、肺鱗狀細胞癌)、頭頸癌、乳癌、子宮頸癌、攝護腺癌、膀胱癌、神經膠母細胞瘤、直腸癌、或膽管癌。於一具體實例中，該癌症係腦癌。於一具體實例中，該癌症係神經膠母細胞瘤。於一具體實例中，該癌症非血液衍生之癌症。於一具體實例中，該癌症非白血病。於一具體實

例中，該癌症非急性類骨髓性白血病(AML)。

【0015】 於若干具體實例中，該個體未罹患進行中之自體免疫疾病。

【0016】 於其他具體實例中，該個體係人類。

【0017】 於一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體縮減腫瘤大小之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低 Siglec 15 之表現及/或活性，從而縮減該個體之腫瘤大小。

【0018】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 Siglec 15 之小分子抑制劑、Siglec 15 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 Siglec 15 融合蛋白、或靶向 Siglec 15 之抑制性胜肽或核酸之組群。於若干具體實例中，該 Siglec 15 融合蛋白係 Siglec 15-Fc 融合蛋白。

【0019】 於若干具體實例中，該調節劑阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於若干具體實例中，該結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於其他具體實例中，該結合配體係 Sialyl-Tn。於若干具體實例中，該調節劑係於殘基 143 處具有單一置換突變之突變體 Siglec 15 蛋白。於其他具體實例中，該調節劑係具有 IgV 功能區缺失之突變體 Siglec 15 蛋白。

【0020】 於若干具體實例中，該調節劑降低 MAG 與 LRRC4C 之表現及/或活性。於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 之小分子抑制劑、MAG 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 MAG 融合蛋白、靶向 MAG 之抑制

性胜肽或核酸、LRRC4C 之小分子抑制劑、LRRC4C 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 LRRC4C 融合蛋白、或靶向 LRRC4C 之抑制性胜肽或核酸之組群。

【0021】 於若干具體實例中，該腫瘤與選自包括腦癌、肺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌、直腸腺癌、肝細胞癌、與 Ewing 氏肉瘤組群之癌症相關聯。於若干具體實例中，該腦癌係神經膠母細胞瘤。於若干具體實例中，該癌症係結腸癌、子宮內膜樣癌、腎臟癌(例如，腎乳頭狀細胞癌、腎透明細胞癌)、肝癌、甲狀腺癌、肺癌(例如，肺腺癌、肺鱗狀細胞癌)、頭頸癌、乳癌、子宮頸癌、攝護腺癌、膀胱癌、神經膠母細胞瘤、直腸癌、或膽管癌。於一具體實例中，該癌症係腦癌。於一具體實例中，該癌症係神經膠母細胞瘤。於一具體實例中，該癌症非血液衍生之癌症。於一具體實例中，該癌症非白血病。於一具體實例中，該癌症非急性類骨髓性白血病(AML)。

【0022】 於若干具體實例中，該個體未罹患進行中之自體免疫疾病。

【0023】 於其他具體實例中，該個體係人類。

【0024】 於一態樣中，本發明提供延長罹患癌症個體存活期之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低 Siglec 15 之表現及/或活性，從而延長該個體之存活期。

【0025】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 Siglec 15 之小分子抑制劑、Siglec 15 之拮抗劑抗體或其抗

原結合片段、重組 Siglec 15 融合蛋白、或靶向 Siglec 15 之抑制性胜肽或核酸之組群。於若干具體實例中，該 Siglec 15 融合蛋白係 Siglec 15-Fc 融合蛋白。

【0026】 於若干具體實例中，該調節劑阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於其他具體實例中，該結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於其他具體實例中，該結合配體係 Sialyl-Tn。於若干具體實例中，該調節劑係於殘基 143 處具有單一置換突變之突變體 Siglec 15 蛋白。於其他具體實例中，該調節劑係具有 IgV 功能區缺失之突變體 Siglec 15 蛋白。

【0027】 於若干具體實例中，該調節劑降低 MAG 與 LRRC4C 之表現及/或活性。於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 之小分子抑制劑、MAG 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 MAG 融合蛋白、靶向 MAG 之抑制性胜肽或核酸、LRRC4C 之小分子抑制劑、LRRC4C 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 LRRC4C 融合蛋白、或靶向 LRRC4C 之抑制性胜肽或核酸之組群。

【0028】 於若干具體實例中，該癌症係選自包括腦癌、肺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌、直腸腺癌、肝細胞癌、與 Ewing 氏肉瘤之組群。於若干具體實例中，該腦癌係神經膠母細胞瘤。於若干具體實例中，該癌症係結腸癌、子宮內膜樣癌、腎臟癌(例如，腎乳頭狀細胞癌、腎透明細胞癌)、肝癌、甲狀腺癌、肺癌(例如，肺腺癌、肺鱗狀細胞癌)、頭頸癌、乳癌、子宮頸癌、攝護

腺癌、膀胱癌、神經膠母細胞瘤、直腸癌、或膽管癌。於一具體實例中，該癌症係腦癌。於一具體實例中，該癌症係神經膠母細胞瘤。於一具體實例中，該癌症非血液衍生之癌症。於一具體實例中，該癌症非白血病。於一具體實例中，該癌症非急性類骨髓性白血病(AML)。

【0029】 於若干具體實例中，該個體未罹患進行中之自體免疫疾病。

【0030】 於其他具體實例中，該個體係人類。

【0031】 於一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體增強對抗腫瘤之免疫反應之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低 Siglec 15 之表現及/或活性，從而增強該個體對抗腫瘤之免疫反應。

【0032】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 Siglec 15 之小分子抑制劑、Siglec 15 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 Siglec 15 融合蛋白、或靶向 Siglec 15 之抑制性胜肽或核酸之組群。於若干具體實例中，該 Siglec 15 融合蛋白係 Siglec 15-Fc 融合蛋白。

【0033】 於若干具體實例中，該調節劑阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於若干具體實例中，該結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於其他具體實例中，該結合配體係 Sialyl-Tn。於若干具體實例中，該調節劑係於殘基 143 處具有單一置換突變之突變體 Siglec 15 蛋白。於其他具體實例中，該調節劑係具有 IgV 功能區缺失

之突變體 Siglec 15 蛋白。

【0034】 於若干具體實例中，該調節劑降低 MAG 與 LRRC4C 之表現及/或活性。於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 之小分子抑制劑、MAG 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 MAG 融合蛋白、靶向 MAG 之抑制性胜肽或核酸、LRRC4C 之小分子抑制劑、LRRC4C 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 LRRC4C 融合蛋白、或靶向 LRRC4C 之抑制性胜肽或核酸之組群。

【0035】 於若干具體實例中，該腫瘤與選自包括腦癌、肺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌、直腸腺癌、肝細胞癌、與 Ewing 氏肉瘤組群之癌症相關聯。於若干具體實例中，該腦癌係神經膠母細胞瘤。於若干具體實例中，該癌症係結腸癌、子宮內膜樣癌、腎臟癌(例如，腎乳頭狀細胞癌、腎透明細胞癌)、肝癌、甲狀腺癌、肺癌(例如，肺腺癌、肺鱗狀細胞癌)、頭頸癌、乳癌、子宮頸癌、攝護腺癌、膀胱癌、神經膠母細胞瘤、直腸癌、或膽管癌。於一具體實例中，該癌症係腦癌。於一具體實例中，該癌症係神經膠母細胞瘤。於一具體實例中，該癌症非血液衍生之癌症。於一具體實例中，該癌症非白血病。於一具體實例中，該癌症非急性類骨髓性白血病(AML)。

【0036】 於若干具體實例中，該個體未罹患進行中之自體免疫疾病。

【0037】 於其他具體實例中，該個體係人類。

【0038】 於另一態樣中，本發明提供針對有其需要

之個體治療自體免疫疾病之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑增強個體中 Siglec 15 之表現及/或活性，從而治療該個體之自體免疫疾病。

【0039】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 Siglec 15 之小分子活化劑、Siglec 15 之促效劑抗體或其抗原結合片段、或活化 Siglec 15 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸之組群。

【0040】 於若干具體實例中，該調節劑促進 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於若干具體實例中，該結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於其他具體實例中，該結合配體係 Sialyl-Tn。於若干具體實例中，該調節劑增強 MAG 與 LRRC4C 之表現及/或活性。

【0041】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 之小分子活化劑、MAG 之促效劑抗體或其抗原結合片段、活化 MAG 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸、LRRC4C 之小分子活化劑、LRRC4C 之促效劑抗體或其抗原結合片段、或活化 LRRC4C 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸之組群。

【0042】 於其他具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 蛋白質、編碼 MAG 蛋白質之核酸、LRRC4C 蛋白質或編碼 LRRC4C 蛋白質之核酸之組群。於一具體實例中，該調節劑係合成之 Sialyl-Tn、或帶有 Sialyl-Tn 之合成胜肽。

【0043】 於若干具體實例中，該自體免疫疾病係發

炎性腦疾病。於其他具體實例中，該發炎性腦疾病係多發性硬化症。於其他具體實例中，該發炎性腦疾病係實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)。於若干具體實例中，該個體係人類。

【0044】 於一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體治療自體免疫疾病之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 蛋白、編碼 Siglec 15 蛋白之核酸、從而治療該個體之自體免疫疾病。

【0045】 於若干具體實例中，該 Siglec 15 蛋白係選自包括全長 Siglec 15 蛋白、Siglec 15 之功能性片段、或 Siglec 15 之 IgV 功能區之組群。

【0046】 於若干具體實例中，該自體免疫疾病係發炎性腦疾病。於其他具體實例中，該發炎性腦疾病係多發性硬化症。於其他具體實例中，該發炎性腦疾病係實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)。於若干具體實例中，該個體係人類。

【0047】 於另一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體降低腦發炎反應之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑增強 Siglec 15 之表現及/或活性，從而降低該個體之腦發炎反應。

【0048】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 Siglec 15 之小分子活化劑、Siglec 15 之促效劑抗體或其抗原結合片段、或活化 Siglec 15 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸之組群。

【0049】 於若干具體實例中，該調節劑促進 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於若干具體實例中，該結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於其他具體實例中，該結合配體係 Sialyl-Tn。於其他具體實例中，該調節劑增強 MAG 與 LRRC4C 之表現及/或活性。

【0050】 於若干具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 之小分子活化劑、MAG 之促效劑抗體或其抗原結合片段、活化 MAG 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸、LRRC4C 之小分子活化劑、LRRC4C 之促效劑抗體或其抗原結合片段、或活化 LRRC4C 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸之組群。

【0051】 於其他具體實例中，該調節劑係選自包括 MAG 蛋白質、編碼 MAG 蛋白質之核酸、LRRC4C 蛋白質或編碼 LRRC4C 蛋白質之核酸之組群。

【0052】 於若干具體實例中，該腦發炎反應與多發性硬化症相關聯。於若干具體實例中，該腦發炎反應與實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)相關聯。於若干具體實例中，該個體係人類。

【0053】 於一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體降低腦發炎反應之方法，該方法包括給予該個體有效量之 Siglec 15 蛋白，或編碼 Siglec 15 蛋白之核酸，從而降低該個體之腦發炎反應。

【0054】 於若干具體實例中，該 Siglec 15 蛋白係選自包括全長 Siglec 15 蛋白、Siglec 15 之功能性片段、或

Siglec 15 之 IgV 功能區之組群。

【0055】 於若干具體實例中，該腦發炎反應與多發性硬化症相關聯。於若干具體實例中，該腦發炎反應與實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)相關聯。於若干具體實例中，該個體係人類。

【0056】 於另一態樣中，本發明提供鑑定可用於治療個體自體免疫疾病或癌症化合物之方法，該方法包括提供測試化合物；測定該測試化合物對 Siglec 15 表現及/或活性之影響；及挑選調節 Siglec 15 表現及/或活性之化合物，從而鑑定可用於治療個體自體免疫疾病或癌症之化合物。

【0057】 於若干具體實例中，Siglec 15 之表現及/或活性增強表示該化合物可用於治療自體免疫疾病。於其他具體實例中，Siglec 15 之表現及/或活性降低表示該化合物可用於治療癌症。

【0058】 於一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體鑑定可用於增強對抗腫瘤之免疫反應之化合物之方法，該方法包括提供測試化合物；測定該測試化合物對 Siglec 15 表現及/或活性之影響；及挑選降低 Siglec 15 表現及/或活性之化合物，從而鑑定可用於增強個體對抗腫瘤之免疫反應之化合物。

【0059】 於另一態樣中，本發明提供針對有其需要之個體鑑定可用於降低腦發炎反應化合物之方法，該方法包括提供測試化合物；測定該測試化合物對 Siglec 15 表現

及/或活性之影響；及挑選增強 Siglec 15 表現及/或活性之化合物，從而鑑定可用於降低個體腦發炎反應之化合物。

【0060】 於一態樣中，本發明提供 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑係調節 Siglec 15 與 MAG、LRRC4C 及/或 Sialyl-Tn 間之相互作用。於若干具體實例中，該調節劑結合於 Siglec 15 之 IgV 功能區。於其他具體實例中，該調節劑係結合於包含 Siglec 15 之殘基 143 之抗原決定區。

【0061】 於若干具體實例中，該調節劑係 Siglec 15 之抑制劑。於其他具體實例中，抑制劑係選自包括 Siglec 15 之小分子抑制劑、Siglec 15 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組 Siglec 15 融合蛋白、或靶向 Siglec 15 之抑制性胜肽或核酸之組群。

【0062】 於若干具體實例中，該調節劑係 Siglec 15 之活化劑。於其他具體實例中，該活化劑係選自包括 Siglec 15 之小分子活化劑、Siglec 15 之促效劑抗體或其抗原結合片段、或活化 Siglec 15 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸之組群。

【0063】 茲利用下述圖式及詳細敘述說明本發明；其對申請專利範圍中所述之本發明範圍並不構成侷限。

【圖式簡單說明】

【0064】

第 1A 圖描述於不同小鼠組織中使用 RT-PCR 之 Siglec 15 之 RNA 表現模式。第 1B 圖描述於人類組織中使用微陣列分析之 Siglec 15 之 RNA 表現模式。第 1C 圖以圖表描述

根據微陣列分析之 Siglec 15 表現模式。Siglec 15 通常於單核細胞、巨噬細胞、樹突細胞、B 細胞與蝕骨細胞表現。

第 2 圖描述 Siglec 15 於人類癌症中相對於正常組織之表現量。

第 3A 圖描述使用 NCI60 微陣列數據 (BioGPS; 任意單位) 所測定人類 Siglec 15 於人類癌症細胞株中之表現。第 3B 圖描述使用 FACS 所測定人類 Siglec 15 於人類癌症細胞株中之表現。

第 4A 圖描述 Siglec 15 與結合配體，髓鞘相關糖蛋白 (MAG) 和包含 4C 之富含白胺酸重複序列 (LRRC4C) 間之相互作用。Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間之相互作用於小鼠與人類間相當保留。第 4B 圖描述使用 Octet 鏈黴抗生物素蛋白生物感測器所測定之 Sialyl-Tn 抗原與 Siglec 15-mIg 融合蛋白或對照 mIg 間之結合。

第 5 圖描述 MAG 於正常組織與癌症中之 mRNA 表現。MAG 於腦或腫瘤相關之腦中大量表現。

第 6 圖描述 LRRC4C 於正常組織與癌症中之 mRNA 表現。LRRC4C 於例如腦癌、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌與 Ewing 氏肉瘤等癌症中之表現係向上調節。

第 7 圖以圖表描述 Siglec 15-MAG 或 LRRC4C 相互作用之結合功能區。具體而言，Siglec 15 之 IgV 功能區為其與 MAG 和 LRRC4C 相互作用所必需。IgV 功能區中之 R143A 突變防止與 MAG 或 LRRC4C 之結合，表明兩種配體都結合於 Siglec 15 中 IgV 功能區之殘基 143。

第 8A 圖描述以抗 CD3 抗體 OKT3 刺激及暴露於固定化人類 Siglec 15 或對照 IgG 之 PBMC 中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量。第 8B 圖描述在與過度表現模擬質體(Mock)、全長 FASLG(FASLG)、全長 Siglec 15(Siglec15 FL)、編碼 Siglec15 胞外功能區與 B7-H6 跨膜功能區之建構體(Siglec15 ATM)、或 LRRC4C 之 293T.m.OKT3 細胞一起培育後，於 Jurkat NF-AT 報導基因(reporter)細胞中所觀測之螢光素酶活性值。

第 9A 圖描述以固定化抗 CD3、及以固定化小鼠 Siglec-15-mIgG 融合蛋白(S15-mIg)或對照 IgG (mIg)刺激之小鼠脾臟細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量。第 9B 圖描述以固定化抗 CD3、及可溶性小鼠 Siglec-15-mIgG 融合蛋白(S15-mIg)或對照 IgG (mIg)刺激之小鼠脾臟細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量。第 9C 圖描述得自與過度表現全長小鼠 Siglec 15 (KbOVA-S15)或模擬質體對照組(KbOVA-對照組)之 293T-KbOVA 細胞共培養之 OT-1 基因轉殖小鼠之活化脾臟細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量。第 9D 圖描述過度表現小鼠 Siglec 15 之三個 293T-KbOVA 細胞株中之 Siglec 15 表現量。第 9E 圖描述存在得自與具有增強 Siglec 15 表現量(於第 9D 圖中測定) 293T-KbOVA 細胞共培養之 OT-1 基因轉殖小鼠之活化脾臟細胞上清液中之 IFN- γ 量。第 9F 圖描述存在得自與具有增強 Siglec 15 表現量之 293T-KbOVA 細胞共培養之 OT-1 基因轉殖小鼠之活化脾臟細胞上清液中之 TNF- α 量。

第 10A 圖描述經由基於黏附性之細胞毒性分析(ACEA Biosciences)所示之 293T-KbOVA 標靶細胞殺死 OT-1 T 細胞之劑量反應。第 10B 圖係於增加量之 OT-1 T 細胞存在下，針對過度表現 Siglec15 (293T-KbOVA-S15)之 293T-KbOVA 細胞之黏附性信號與經模擬質體轉染之 293T-KbOVA 細胞(293T-KbOVA-對照)之黏附性信號進行比較；其中之比率表示 OT-1 T 細胞對 293T-KbOVA 細胞之比例。

第 11A 圖為實施例 8 中所述 OT-1 活體內活化模式之示意圖。第 11B 圖描述從 OT-1/RagKO 小鼠靜脈轉移脾臟細胞後，於野生型(WT)或 Siglec 15 全身性基因剔除(KO)小鼠之血液(左圖)與脾臟(右圖)中，OT-1 細胞佔總 CD8 T 細胞族群之百分比。該 OT-1 細胞百分比係使用 OT-1 四聚體，利用 FACS 染色監測。第 11C 圖描述於第 5 天利用抗 EdU 染色所測定之血液 OT-1 細胞之增殖，並計算為 EdU 陽性 OT-1 細胞/總 OT-1 陽性細胞之百分比。第 11D 圖描述在無刺激下，單離並培養過夜及針對膜聯蛋白(annexin) V 染色之脾臟細胞中之細胞凋亡。細胞凋亡係計算為膜聯蛋白 V-陽性 OT-1 細胞/總 OT-1 陽性細胞之百分比。

第 12A 圖描述依照第 11A 圖中所述計畫，於靜脈轉移得自 OT-1/RagKO 小鼠之脾臟細胞後，不同時間之小鼠血液中 OT-1 細胞佔總 CD8 T 細胞族群之百分比。WT，野生型小鼠；KO，Siglec 15 全身性基因剔除小鼠；LysM-Cre KO，巨噬細胞特異性 Siglec 15 基因剔除小鼠。第 12B 圖描述相較於野生型，於 OT-1 T 細胞反應期間所評估之全身

性 KO 與 LysM-Cre KO 小鼠血漿中之 IL-10 量。

第 13 圖描述 11 月齡之野生型(WT)或 Siglec 15 基因剔除(S15KO)小鼠血液中骨髓細胞、CD8+細胞、與 CD4+細胞之百分比。

第 14 圖描述與過度表現模擬質體(對照組)、全長 LRRC4C、或 Siglec 15 之 293T 細胞共培養之巨噬細胞上清液中之細胞介素量。

第 15 圖描述 Siglec 15 抗體 S15m02 具有作為破壞 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 結合之阻斷抗體之作用，而 Siglec 15 抗體 S15m03 不影響 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間之相互作用。

第 16 圖描述添加 Siglec 15 之阻斷抗體，S15m02，導致 EAE 小鼠比注射對照 mAb 或接受 S15m03 抗體之對應小鼠形成更嚴重之疾病症狀。

第 17 圖描述添加 Siglec 15-Fc 融合蛋白至 EAE(實驗性自體免疫性腦脊髓炎)小鼠導致彼等小鼠中之發炎加速。

第 18 圖描述 Siglec 15 基因剔除(KO)小鼠(上面線條)比野生型(WT)小鼠(下面線條)展現更嚴重之 EAE 疾病症狀，指出 Siglec 15 於腦發炎反應調控中之抑制角色。

第 19A 圖描述以 MOG 胜肽進行免疫處理並於第 0 天與第 1 天以百日咳毒素強化，隨後從第 6 天開始，每週兩次，以 100 μ g Siglec 15-mIg 融合蛋白(Siglec15-mIg)或對照 mIg(左圖)、或 Siglec 15-hIg 融合蛋白(Siglec15-hIg)或對照 hIg(右圖)，總共 4 個劑量處理 WT 小鼠之 EAE 臨床評分。

第 19B 圖描述於 5ug/ml Siglec15-mIg(S15-mIg)或對照 mIg (mIg)存在下，以 MOG 胜肽(60 μ g/ml)再刺激經對照 mIg 處理 12 天之小鼠 3 天所得脾臟細胞中之 ^3H -胸腺嘧啶核苷併入。

第 20 圖描述經由 Siglec 15-Fc 處理阻斷 Siglec，顯著縮減神經膠母細胞瘤小鼠之腫瘤大小。

第 21 圖描述經由 Siglec 15-Fc 處理阻斷 Siglec，顯著延長神經膠母細胞瘤小鼠之存活期。

第 22 圖描述 Siglec15-Fc 與抗 PDL1 處理在神經膠母細胞瘤小鼠縮減腫瘤大小及促進存活效益上之加乘效應。

第 23A 圖描述於第 0 天以含螢光素酶報導基因之 GL261 神經膠母細胞瘤細胞顱內接種之野生型(WT)或 Siglec 15 基因剔除(Siglec15 KO)小鼠腦中之螢光素酶活性。第 23B 圖呈現以 GL261 細胞接種後第 13 天與第 18 天，WT 與 KO 小鼠腦中螢光素酶活性之影像。第 23C 圖呈現以 GL261 接種之 WT 與 KO 小鼠之存活曲線。

第 24A 圖描述於第 14 天，兩個組別(WT 與 KO)之腦或脾臟中 CD8 T 細胞之百分比與總數。第 24B 圖描述於第 14 天，兩個組別(WT 與 KO)之腦或脾臟中 CD4 T 細胞之百分比與總數。第 24C 圖描述於第 14 天，兩個組別(WT 與 KO)之腦或脾臟中樹突細胞(DC)、巨噬細胞、與小神經膠質細胞之百分比與總數。第 24D 圖描述於第 14 天，得自荷瘤 WT 或 KO 小鼠，並以 GL-261 腫瘤細胞再刺激過夜之腦淋巴細胞中，IFN- γ 陽性 CD8 或 CD4 T 細胞之百分比與總數。

第 25A 圖描述利用以抗 Siglec 15 單株抗體之 FACS 染色測定之 MC38-S15-與 MC38-S15+細胞上之 Siglec 15 表現(第 25A 圖)。第 25B 圖描述 MC38-S15-與 MC38-S15+細胞經由皮下注射接種於 B6 小鼠後之腫瘤成長(第 25B 圖)。

第 26 圖描述接種 MC38-S15+穩定細胞株，並以對照抗體、抗 Siglec 15 抗體 m01、或 Siglec 15-mIg 融合蛋白處理之 B6 小鼠中之平均腫瘤大小；顯示各組別之平均腫瘤大小。

第 27A 圖概述所提出之作為配體之 Siglec 15 之作用機制。第 27B 圖概述所提出之作為受體之 Siglec 15 之作用機制。

【實施方式】

【0065】 本發明至少部分係基於發現 Siglec 15 於壓制對抗癌症之免疫反應中扮演關鍵角色，因此，提供操控 Siglec 15 途徑以作為未來開發癌症治療藥物之理論基礎。特別是，已發現降低 Siglec 15 之表現即可縮減腫瘤大小及延長具有腦瘤小鼠之存活期。此外，於腦發炎小鼠模式中經由阻斷 Siglec 15 與其配體間之相互作用，以及於 Siglec 15 基因剔除小鼠中徹底破壞 Siglec 15 表現而抑制 Siglec 15 活性，均促使腦發炎惡化。因此，本發明提供治療癌症之方法、治療自體免疫疾病之方法、調控對癌症之免疫反應之方法、及經由調節 Siglec 15 以及其相同途徑中之結合夥伴之表現及/或活性而調控個體之發炎反應之方法。

【0066】

I. 定義

為了更容易理解本發明，首先定義特定術語。除非本文另行界定，否則所使用與本發明有關之科學與技術術語應具有一般熟習此項技藝者通常理解之意義。術語之意義與範圍應清晰明瞭，然而，如果任何潛在模稜兩可發生，本文所提供之定義優先於任何字典或外在之定義。除非本文另行指示，否則本文列舉之數值範圍僅意欲用於作為個別提及之各別列舉或落在該範圍內之個別數值之速記 (shorthand) 方法，且各個別數值如同被單獨引用般地被併入說明書中。

【0067】 下述說明中，為達解釋之目的，提出具體數值、物料與組態，俾使提供對本發明之徹底理解。然而，一般熟習此項技藝者將明顯可見，本發明可於無此等具體細節之情況下實施。於若干情況中，可省略或簡化熟知之特徵，以免模糊本發明。再者，說明書中提及之用詞，例如"一具體實例"或"具體實例"，意指與該具體實例關聯所述之特定特點、結構或特徵包含於本發明之至少一具體實例中。於說明書中不同地方出現之用詞，例如"於一具體實例中"，未必然全部意指相同具體實例。

【0068】 除非於本文中另行指示或顯然與上下文相抵觸，否則於敘述本發明之上下文中(尤其是於下述申請專利範圍之場合中)之"一(a)"與"一(an)"及"該(the)"等詞及類似提示語之使用，擬被解釋為包含單數與複數二者(即，一或多個)。舉例而言，"一元件(an element)"意指一個元件或

一個以上之元件。除另行指明，否則"包含(comprising)"、"具有(having)"、"包括(including)"、及"含有(containing)"等詞擬被解釋為開放式術語(即，意指"包括惟不限於")。

【0069】 本文所用之"Siglec15"一詞亦為所謂結合唾液酸之類 Ig 凝集素 15、類 CD33 抗原 3、類 CD33 分子 3、CD33L3 與 HsT1361，係凝集素家族蛋白之成員，其含有結合唾液酸之成分與類 Ig 分子。人類 Siglec15 mRNA 之序列可於例如 GenBank Accession GI: 225637536 (NM_213602.2；SEQ ID NO: 1)找到。人類 Siglec15 多肽序列之序列可於例如 GenBank Accession No. GI:4 7106069 (NP_998767.1；SEQ ID NO: 2)找到。

【0070】 本文所用之"MAG"一詞亦為所謂髓鞘相關糖蛋白、結合唾液酸之類 Ig 凝集素 4A、SIGLEC4A 或 GMA，係第一型膜蛋白及免疫球蛋白超級家族之成員。MAG 為 NOGO-66 之功能性受體，被認為參與神經元髓鞘形成。MAG 亦存在骨髓細胞中，尤其是小神經膠質細胞中。MAG 基因剔除(KO)小鼠有胞噬作用之問題。MAG 結合於唾液酸化之糖共軛接合物並傳介特定髓鞘-神經元之細胞-細胞相互作用。針對此基因已有編碼不同同功型之三種選擇性剪接轉錄本被敘述。人類 MAG mRNA 之序列可於例如 GenBank Accession GI: 312836849 (NM_002361.3；SEQ ID NO: 3)找到。人類 MAG 多肽序列之序列可於例如 GenBank Accession No. GI: 11225258(NP_002352.1；SEQ ID NO: 4)找到。

【0071】 本文所用之"LRRC4C"一詞，亦已知為含有

4C 之富含白胺酸重複序列(LRR)、軸突生長誘向因子(netrin)-G1 配體、NGL1、或 KIAA1580；LRRC4C 為與關聯神經元生長、樹突形成、與軸突伸展相關之 LRR 家族分子。LRRC4C 主要定位於興奮性突觸之突觸後側，並與突觸前配體、軸突生長誘向因子 G1 相互作用，以調控興奮性突觸形成。人類 LRRC4C mRNA 之序列可於例如 GenBank Accession GI: 385724810 (NM_020929.2；SEQ ID NO: 5) 找到。人類 LRRC4C 多肽序列之序列可於例如 GenBank Accession No. GI: 51317373 (NP_065980.1；SEQ ID NO: 6) 找到。

【0072】 本文所用之"Sialyl-Tn"一詞，亦已知為"STn"、"Sialyl-Tn 抗原"、與"Neu5Ac α 2-6GalNAc α -O-Ser/Thr"，係指 Tn 抗原經唾液酸取代之形式。Tn 抗原為經由糖苷鍵連接於絲胺酸或蘇胺酸之 N-乙醯半乳糖胺(GalNAc)寡糖，為 O-聚糖。Sialyl-Tn 係含有唾液酸 α -2,6 鍵結連接於 GalNAc α -O-Ser/Thr 之截短 O-聚糖。Sialyl-Tn 表現由異常糖基化途徑之活化所引起，一般發生於腫瘤細胞中。Sialyl-Tn 之生合成與唾液酸轉移酶 ST6GalNAc1 之表現及 COSMC (核心 1 β 3-Gal-T-特異性分子伴隨蛋白)之突變有關。Sialyl-Tn 表現已於超過 80%之包括胃、結腸、乳房、肺、食道、攝護腺、與子宮內膜樣癌等人類惡性腫瘤中被報導，且與不良預後有關[Munkley, Int. J. Mol. Sci. (2016), 17(3):275]。

【0073】 應注意的是，除非另行指明，否則全文中之分子名稱，例如 Siglec15、MAG 或 LRRC4C，係包括基

因與蛋白質二者。因此，"Siglec15"一詞用於有關分子時，係包括 Siglec15 蛋白質與 Siglec15 基因二者。

【0074】 "Siglec 15 之量"一詞包括 Siglec 15 mRNA 或 cDNA 之量，及/或 Siglec 15 蛋白、DNA、mRNA、或 cDNA 之蛋白質濃度、表現、活性、功能、或穩定性。於一具體實例中，本文所用之"量"一詞係指 Siglec 15 可測量之量；該量可為(a)以分子、莫耳或每單位體積或細胞之量測得之絕對量，或(b)例如經由密度分析測得之相對量。

【0075】 本文所用之"Siglec 15 之調節劑"係指調節 Siglec 15 之 mRNA 表現及/或蛋白質表現；及/或 Siglec 15 之 mRNA 及/或蛋白質穩定性；及/或 Siglec 15 之生物活性之任何化合物或分子。調節劑可直接或間接調節 Siglec 15 之表現及/或活性。Siglec 15 之調節劑直接作用於 Siglec 15 者，例如結合於 Siglec 15 並抑制或活化其功能之抗體。於另一具體實例中，該 Siglec 15 之調節劑係間接作用於 Siglec 15(例如經由另一分子，例如 Siglec 15 之結合搭檔)，導致 Siglec 15 活性之增強或降低。適用於本發明方法之例示製劑，包括干擾核酸分子(例如，反義 RNA、sdRNA、與 siRNA)、胞內抗體、重組融合蛋白、抑制性胜肽、或小分子。適用於本發明方法之製劑於下文中詳細討論。

【0076】 本文所用"調節"一詞之各種形式包括刺激(例如，增強或向上調控特定反應或活性)及抑制(例如，降低或向下調節特定反應或活性)。於若干具體實例中，該調節劑係 Siglec 15 之抑制劑。於若干具體實例中，該調節劑

係 Siglec 15 之活化劑。

【0077】 本文所用之"抑制"一詞係指降低 Siglec 15 之表現、穩定性、及/或生物活性。舉例而言，"抑制"一詞係指降低或向下調控如本文所敘述 Siglec 15 之表現、穩定性、及/或活性之能力。

【0078】 本文所用之"刺激"一詞係指增強 Siglec 15 之表現、穩定性、及/或生物活性。舉例而言，"刺激"一詞係指增強或向上調節如本文所述 Siglec 15 之表現、穩定性、及/或活性之能力。

【0079】 本文所用之"Siglec 15 活性抑制劑"或"Siglec 15 拮抗劑"包括部分或完全阻斷、抑制、或中和由 Siglec 15 傳介之生物活性之任何分子。於若干具體實例中，Siglec 15 拮抗劑抑制 Siglec 15 多肽。於其他具體實例中，Siglec 15 拮抗劑抑制 Siglec 15 之配體，例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn。

【0080】 本文所用之"Siglec 15 活性促效劑"或"Siglec 15 促效劑"包括部分或完全刺激或加強其所結合抗原之生物活性之任何分子。例示之 Siglec 15 促效劑結合於 Siglec 15 並於結合後經由 Siglec 15 刺激訊息傳遞，模擬 Siglec 15 與例如 MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 等天然配體之相互作用。Siglec 15 活性之其他例示促效劑係與其結合並經由例如 MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 等 Siglec 15 配體傳遞訊息，模擬該配體與 Siglec 15 之相互作用。

【0081】 本文所用之"抗體"一詞擬意指由兩條重(H)

鏈與兩條輕(L)鏈以雙硫鍵互相連接之四條多肽鏈組成之免疫球蛋白分子。各重鏈由重鏈變異區(於本文中縮寫為HCVR或VH)與重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由3個功能區，CH1、CH2與CH3組成。各輕鏈由輕鏈變異區(於本文中縮寫為LCVR或VL)與輕鏈恆定區組成。輕鏈恆定區由1個功能區，CL組成。VH與VL區可進一步細分成稱為互補決定區(CDR)之高度變異區，其散佈於更保留，稱為架構區(FR)之區域中。各個VH與VL由3個CDR與4個FR組成，從胺基端至羧基端依下述順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0082】 本文所用抗體之"抗原結合部分"或"抗原結合片段"(或簡稱"抗體部分")係指全長抗體之一部分，通常是標靶結合或變異區。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂與 Fv 片段。抗體之"功能性片段"之用詞係與全長抗體同樣具定性生物活性之化合物。舉例而言，拮抗性抗 Siglec 15 抗體之功能性片段可以阻斷、抑制、或中和由 Siglec 15 傳介之生物活性之方式結合於 Siglec 15。本文所用有關抗體之"功能性片段"係指 Fv、scFv、雙功能抗體(diabody)、F(ab)與 F(ab')₂片段。"Fv"片段係含有完全標靶識別與結合部位之最小抗體片段。此區域由一重鏈與一輕鏈變異功能區以牢固、非共價結合之二聚體(VH-VL二聚體)組成。於此組態中，各變異功能區之3個CDR相互作用以於VH-VL二聚體表面界定標靶結合部位。scFv含有以連結胜肽連接之一重鏈與一輕鏈變異功能區，該連結胜肽之大

小容許 VH 與 VL 功能區相互作用以形成標靶結合部位。總而言之，該 6 個 CDR 賦予抗體或抗體片段之標靶結合特異性。然而，即使單一變異功能區(或對標靶僅含 3 個 CDR 特異性之一半之 Fv)亦具識別與結合標靶之能力，雖然親和力較整體結合部位低。

【0083】 本文所用之"拮抗劑抗體"或"阻斷抗體"等詞係指抑制或降低其結合抗原之生物活性之抗體。例示之拮抗劑抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。

【0084】 本文所用之"促效劑抗體"一詞係指刺激或加強其結合抗原之生物活性之抗體。例示之促效劑抗體於結合後經由抗原刺激訊息傳遞，模擬抗原與天然配體之相互作用。

【0085】 本文所用之"個體"一詞，係指動物，例如哺乳動物，包括靈長類動物(例如人類、非人類靈長類動物例如猴子、與黑猩猩)、非靈長類動物(例如母牛、豬、駱駝、駱馬、馬、山羊、兔、綿羊、倉鼠、天竺鼠、貓、狗、大鼠、小鼠、與鯨)、禽類(例如鴨或鵝)、及鯊魚。於一具體實例中，該個體係人類，例如正在治療或評估疾病、疾患(disorder)或症狀(condition)之人、處於疾病、疾患或症狀風險中之人、具有疾病、疾患或症狀之人、及/或正在治療或評估如本文所述之疾病、疾患或症狀之人。於若干具體實例中，該個體未罹患進行中之自體免疫疾病。於一具體實例中，該個體約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 歲。於另一具體實例中，該個體約 5 至 10、10 至 15、15 至 20、

20 至 25、25 至 30、30 至 35、35 至 40、40 至 45、45 至 50、50 至 55、55 至 60、60 至 65、65 至 70、70 至 75、75 至 80、80 至 85、85 至 90、90 至 95、95 至 100 歲。上文詳述範圍之中間數值與範圍亦擬為本發明之一部分。此外，擬包括使用任何上文詳述數值組合作為上限及/或下限之數值範圍。

【0086】 本文所用之"處理"或"治療"等詞係指有益或期望之結果包括，惟不限於，無論可檢測或不可檢測之一或多種病徵之減輕或改善、疾患程度之縮減、疾患狀況之穩定(即，不惡化)、疾患之改善或緩和。"治療"亦可意指與缺乏治療之預期存活期相較，存活期延長。

【0087】 本文所用之"有效量"一詞係指治療之用量，其足以降低或改善疾患或其一或多種病徵之嚴重性及/或持續時間、抑制或預防疾患進展、導使疾患消退、抑制或預防一或多種與疾患關聯病徵之復發、形成、發病或進展、檢測疾患、或增強或增進另外療法之預防或治療效果(例如，預防性或治療劑)。有效量可能需要多於一個劑量。

【0088】

II. 本發明之方法

本發明至少部分係基於發現 Siglec 15 於免疫調控上具關鍵性角色。Siglec 15 已在蝕骨細胞分化中被廣泛研究，於其中扮演非免疫性角色。除了在蝕骨細胞分化中之角色外，如本文所述，Siglec 15 經由壓制免疫細胞包括 T 細胞與巨噬細胞之活性而調控免疫反應。因此，Siglec 15 於癌

症細胞或腫瘤微環境中之向上調節可抑制個體對抗癌症之免疫反應。再者，缺乏 Siglec 15 可能促成與自體免疫相關之症狀。

【0089】 不拘泥於理論下，提出 Siglec 15 可經由扮演配體及/或受體而發揮免疫調節功能(第 27 圖)。Siglec 15 於骨髓細胞中表現，並於腦微環境、癌症細胞、與腫瘤微環境中過度表現。於腦、癌症細胞、或於腫瘤微環境中過度表現時，Siglec 15 可具配體之功能，經由骨髓細胞直接或間接影響 T 細胞反應。T 細胞與骨髓細胞二者皆可表現負責 Siglec 15 免疫壓抑功能之受體(第 27A 圖)。另外或替代地，Siglec 15 配體於腦微環境、癌症細胞、或於腫瘤微環境中之表現可經由扮演受體角色之 Siglec 15 而誘發訊息傳遞(第 27B 圖)。因此，Siglec 15 可經由骨髓：T 細胞相互作用或免疫壓制細胞介素例如 IL-10 與 TGF- β 而間接影響 T 細胞反應。

【0090】 於不同態樣中，本發明係有關經由促進或抑制 Siglec 15 活性而調節免疫功能之方法。

【0091】

A. 經由降低 Siglec 15 表現及/或活性以增強免疫反應之方法

於一態樣中，本發明提供經由給予個體有效量之 Siglec 15 調節劑，以於個體中增強免疫或發炎反應之方法，其中該調節劑係於個體中降低 Siglec 15 之表現及/或活性。於一具體實例中，此方法可於個體中用以增加 T 細

胞例如 CD4 T 細胞及/或 CD8 T 細胞之數量。於另一具體實例中，此方法可於個體中用以增強 T 細胞例如 CD4 T 細胞及/或 CD8 T 細胞之活性。

【0092】 前述方法可於個體中用以治療將受益於增加或加強免疫反應之疾患。舉例而言，可使用降低 Siglec 15 表現及/或活性之 Siglec 15 之調節劑，以治療有其需要之個體之癌症。此類方法可包括給予有其需要之個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低個體中 Siglec 15 之表現及/或活性量，從而治療個體之癌症。

【0093】 於另一態樣中，本發明提供有其需要之個體縮減腫瘤大小之方法。該方法包括給予有其需要之個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低個體中 Siglec 15 之表現及/或活性量，從而縮減個體之腫瘤大小。

【0094】 於一態樣中，本發明之特徵在於延長有其需要之個體存活期之方法。該方法包括給予有其需要之個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低個體中 Siglec 15 之表現及/或活性量，從而延長個體之存活期。

【0095】 於另一態樣中，本發明之特徵在於增強有其需要之個體對抗腫瘤之免疫反應之方法。該方法包括給予有其需要之個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑降低個體中 Siglec 15 之表現及/或活性量，從而增強個體對抗腫瘤之免疫反應。

【0096】 適用於本發明方法之 Siglec 15 之調節劑包括可調控 Siglec 15 之表現及/或活性，例如，Siglec 15 之

mRNA 表現及/或蛋白質表現、Siglec 15 之 mRNA 及/或蛋白質穩定性、及/或 Siglec 15 之生物活性之任何化合物或分子。調節劑可直接或間接調節 Siglec 15 之表現及/或活性。於若干具體實例中，該調節劑抑制 Siglec 15 之表現及/或活性。Siglec 15 之抑制性調節劑可直接作用於 Siglec 15，例如結合於 Siglec 15 並抑制其功能之拮抗劑抗體。替代地，Siglec 15 之抑制性調節劑可間接作用於 Siglec 15 (例如，經由另一分子，如 Siglec 15 之結合搭檔)，導致降低活性。適用於本發明方法之例示調節劑包括小分子抑制劑、拮抗劑抗體或其抗原結合片段、重組融合蛋白(例如可溶性 Siglec 15 融合蛋白，舉例而言，可溶性 Siglec 15-Fc)、抑制性胜肽、或干擾核酸分子(例如，反義 RNA、sdRNA、與 siRNA)。適用於本發明方法之調節劑於下文中詳細討論。

【0097】 本發明之 Siglec 15 之調節劑亦可阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。Siglec 15 之結合配體可利用此項技藝中已知之任何方法鑑定。舉例而言，Siglec 15 與結合配體間之蛋白質-蛋白質相互作用可利用共免疫沈澱法鑑定，其中係經由於活體外與抗體形成共沈澱物，而可確定一對受關注蛋白質之結合。替代地，可使用酵母雙雜合蛋白或噬菌體呈現方法，以篩選 Siglec 15 之結合配體。於若干具體實例中，化學交聯分析及隨後之質譜測定法分析，可用於鑑定相互作用之蛋白質。

【0098】 於若干具體實例中，適用於本發明之 Siglec 15 之結合配體可利用受體陣列技術鑑定。受體陣列技術係

被廣泛採用於篩選標靶蛋白對應受體之技術[Zhu Y *et al*, *Nat Commun*, 4: 2043, 2013; Yao S *et al*, *Immunity*, 34(5): 729-740, 2011]。簡言之，該受體陣列包含含多元槽之固體支撐結構，其中各個多元槽含有經編碼受體蛋白之基因轉染之細胞。如先前所述，使標靶基因(編碼分泌蛋白)或該標靶基因之胞外功能區(編碼跨膜蛋白，例如免疫調節劑)基因融合於標籤基因(小鼠 IgG2a Fc、人類 IgG1 Fc、FLAG、或 6xHIS)，以製備融合基因[Chapoval, AI. *et al.*, *Mol Biotechnol* 21(3): 259-264, 2002]。於轉染個別融合基因至 293T 細胞中後，使用純化之重組融合蛋白針對該受體陣列進行篩選。施用對抗該標籤之經螢光標記之二次抗體，以檢測標靶蛋白，例如，根據本發明方法鑑定之免疫調節劑，與經轉染之 293T 細胞之結合，並使用 Applied Biosystems 8200 細胞檢測系統篩選並經由 CDS 8200 軟體進行分析。前述參考文獻之全部內容併入本文以資參考。

【0099】 於若干具體實例中，Siglec 15 之結合配體為 MAG。於其他具體實例中，Siglec 15 之結合配體為 LRRC4C。於若干具體實例中，Siglec 15 之結合配體為 Sialyl-Tn。

【0100】 Siglec 15 與其配體例如 MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn 之結合部位可利用此項技藝中已知之任何方法確定。舉例而言，可使用此項技藝中已知之標準方法產生功能區缺失之 Siglec 15 突變體蛋白並加以純化。於若干具體實例中，適用於本發明方法之調節劑為具降低配體結

合活性之突變體 Siglec 15 蛋白。例如，調節劑可為於殘基 143 處具單一置換突變之突變體 Siglec 蛋白。於其他具體實例中，適用於本發明方法之調節劑係具 IgV 功能區缺失之突變體 Siglec 15 蛋白。

【0101】 適用於本發明方法之 Siglec 15 之調節劑可經由抑制參與 Siglec 15 途徑之活性，舉例而言，經由降低 Siglec 15 之任何結合配體例如 MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 之表現及/或活性，而增強對抗腫瘤之免疫反應。於若干具體實例中，適用於本發明方法之調節劑係 MAG 或 LRRC4C 之小分子抑制劑、MAG 或 LRRC4C 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段、本質上具抑制性之重組 MAG 融合蛋白、本質上具抑制性之重組 LRRC4C 融合蛋白、或靶向 MAG 或 LRRC4C 之抑制性蛋白質或核酸。於其他具體實例中，該調節劑係特異性地結合 Sialyl-Tn 之抗體或其抗原結合片段。此類抗體或其抗原結合片段可結合 Sialyl-Tn 並掩飾其與 Siglec 15 之結合。於其他具體實例中，該調節劑係可溶性 Sialyl-Tn 分子，視需要偶合於支架，例如支架胜肽。適用於本發明方法之調節劑於下文中詳細討論。

【0102】 前述方法可用於治療將受益於增加或加強個體中之免疫反應之疾患。此類疾患包括，惟不限於，癌症。舉例而言，可採用給予降低 Siglec 15 表現及/或活性之 Siglec 15 調節劑，以刺激對抗癌症之免疫反應(例如，刺激對抗癌症之 T 細胞反應)、縮減腫瘤大小、及/或延長癌症個體之存活期。

【0103】 本文所述之"癌症"一詞係指由可擴散到鄰接組織或身體其他部分之細胞未受控制、不正常增殖所引起之一類型疾病。癌細胞可形成癌細胞聚集在一起之固態腫瘤，或如白血病呈分散細胞存在。適合經由降低 Siglec 15 表現或活性治療之癌症類型包括，惟不限於，固態腫瘤及/或血液腫瘤。於一具體實例中，癌症係上皮起源。可利用經由前述方法治療之例示癌症類型包括，惟不限於，腎上腺癌、肛門癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦/CNS 腫瘤、乳癌、卡斯特雷曼氏症(castleman disease)、子宮頸癌、結腸/直腸癌、子宮內膜樣癌、食道癌、眼癌、膽囊癌、胃腸癌、腎臟癌、喉與下咽癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、皮膚淋巴瘤、惡性間皮瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良症候群、鼻腔與副鼻竇癌、鼻咽癌、神經胚細胞瘤、非霍奇金氏(non-hodgkin)淋巴瘤、口腔與口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、陰莖癌、腦下垂體瘤、攝護腺癌、視網膜胚細胞瘤、橫紋肌肉瘤、唾液腺癌、皮膚癌、小腸癌、胃癌、睪丸癌、胸腺癌、甲狀腺癌、子宮肉瘤、陰道癌、陰門癌、瓦登斯特隆(waldenstrom)巨球蛋白血症、與威爾姆氏(wilms)瘤。於若干具體實例中，癌症係選自包括腦癌、肺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌、直腸腺癌、肝細胞癌、與依汶氏(Ewing)肉瘤之組群。

【0104】 於若干具體實例中，該癌症係結腸癌、子宮內膜樣癌、腎臟癌(例如腎乳突細胞癌、腎透明細胞癌)、肝癌、甲狀腺癌、肺癌(例如肺腺癌、肺鱗狀細胞癌)、頭

頸癌、乳癌、子宮頸癌、攝護腺癌、膀胱癌、神經膠母細胞瘤、直腸癌、或膽管癌。於一具體實例中，該癌症係腦癌。於一具體實例中，該癌症係神經膠母細胞瘤。於一具體實例中，該癌症非血液衍生之癌症。於一具體實例中，該癌症非白血病。於一具體實例中，該癌症非急性類骨髓性白血病(AML)。

【0105】 使用"有效量"之本發明之調節劑(與包含此類調節劑之治療組成物)係達到期望結果所需之劑量與時間週期之有效量。舉例而言，調節劑之有效量可根據例如疾病狀況、年齡、性別、生殖功能狀態與體重、及該製劑於生物體中引出期望反應之能力等因素而不同。劑量方案可經調整以提供最適反應。舉例而言，可每日提供數個分割劑量或可視緊急情況依比例減少劑量。

【0106】 本文所用之"治療"係指介入以賦予例如罹患疾病或處於形成疾病風險之病患好處。治療包括為了改善病患狀況之目的，例如緩和一或多種病徵或延緩疾病之發作或進展，而採取及避免採取之行動。

【0107】 於一具體實例中，本發明係有關治療癌症之組合療法，其中將降低 Siglec 15 表現及/或活性之 Siglec 15 調節劑與檢查點抑制劑，例如 PD-L1 拮抗劑或 PD-1 拮抗劑組合，給予個體。PD-1 為 T 細胞上之檢查點蛋白，其阻止 T 細胞攻擊表現 PD-L1 之體內細胞。若干癌細胞過度表現 PD-L1，俾使其等逃避 T 細胞之檢測。PD-L1 與 PD-1 之抑制劑可增強對抗癌細胞之免疫反應，因此與 Siglec 15

活性之拮抗劑結合使用時可協同促進腫瘤細胞死亡。可與 Siglec 15 活性之拮抗劑結合使用之例示抗 PD-L1 抑制性抗體包括，惟不限於，阿替珠單抗 (atezolizumab) (Genentech)、阿維單抗 (avelumab) (Pfizer)、與度伐單抗 (durvalumab) (AstraZeneca)。可與 Siglec 15 活性之拮抗劑結合使用之例示抗 PD-1 抑制性抗體包括，惟不限於，派姆單抗 (pembrolizumab) (Merck) 與納武單抗 (nivolumab) (Bristol-Myers Squibb)。

【0108】 於若干具體實例中，前述方法進一步包括篩選步驟，其中係篩選於癌症或腫瘤微環境中向上調節 Siglec 15 之癌症病患。舉例而言，於一具體實例中，從個體得到含癌細胞之生物試樣，測定 Siglec 15 表現，並與適當對照組，例如得自正常個體、指示正常個體之表現量參考值等之可比較試樣，進行比較。於含癌細胞生物試樣中之 Siglec 15 之向上調節可指出，該個體將受益於降低 Siglec 15 表現及/或活性之製劑。

【0109】 於若干具體實例中，前述方法可包括篩選步驟，其中正罹患自體免疫疾病之病患被排除在用 Siglec 15 調節劑治療之外。於其他具體實例中，適用於本發明方法之 Siglec 15 之調節劑不會引起個體之非特異性自體免疫疾病。可挑選接受包含 Siglec 15 調節劑治療之個體，俾使其不會自發性地形成自體免疫疾病。

【0110】

B. 經由增強 Siglec 15 之表現及/或活性以降低發炎之方法

本發明之另一態樣係經由給予個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，於個體中提供降低有害免疫或發炎反應之方法，其中該調節劑係於個體中增強 Siglec 15 之表現及/或活性。於一具體實例中，此方法可用於降低個體中之例如 CD4 T 細胞及/或 CD8 T 細胞等 T 細胞之數量。於另一具體實例中，此方法可用於降低個體中之例如 CD4 T 細胞及/或 CD8 T 細胞等 T 細胞之活性。

【0111】 前述方法可用於治療將得益於減低個體中之免疫反應或發炎反應之疾患。舉例而言，可使用增強 Siglec 15 表現及/或活性之 Siglec 15 之調節劑，以治療有其需要之個體之自體免疫疾病。該方法包括給予個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑增強個體中 Siglec 15 之表現及/或活性，從而治療該個體之自體免疫疾病。

【0112】 本發明之另一態樣提供治療有其需要之個體之自體免疫疾病之方法。該方法包括給予個體有效量之 Siglec 15 蛋白或編碼該 Siglec 15 蛋白之核酸，從而治療該個體之自體免疫疾病。

【0113】 於一態樣中，本發明之特徵在於降低有其需要之個體腦發炎反應之方法。該方法包括給予個體有效量之 Siglec 15 之調節劑，其中該調節劑增強 Siglec 15 之表現及/或活性量，從而降低個體之腦發炎反應。

【0114】 於另一態樣中，本發明提供有其需要之個體降低腦發炎反應之方法。該方法包括給予個體有效量之 Siglec 15 蛋白、或編碼該 Siglec 15 蛋白之核酸，從而降低

該個體之腦發炎反應。

【0115】 適用於前述方法之 Siglec 15 之調節劑包括，例如，經由調節 Siglec 15 之 mRNA 表現及/或蛋白質表現、Siglec 15 之 mRNA 及/或蛋白質穩定性、及/或 Siglec 15 之生物活性，可正向調控 Siglec 15 之表現及/或活性之任何化合物或分子。調節劑可直接或間接調節 Siglec 15 之表現及/或活性。於若干具體實例中，該調節劑增強 Siglec 15 之表現及/或活性。Siglec 15 之刺激性調節劑可直接作用於 Siglec 15，例如結合於 Siglec 15 並刺激其功能之促效劑抗體。於其他具體實例中，Siglec 15 之刺激性調節劑係間接作用於 Siglec 15 (例如，經由另一分子，如 Siglec 15 之結合搭檔)，導致增強活性。適用於本發明方法之例示調節劑包括小分子活化劑、促效劑抗體或其抗原結合片段、或活化 Siglec 15 之轉錄及/或轉譯之蛋白質與核酸。替代地，用於本發明方法以增強 Siglec 15 之表現及/或活性之調節劑包括 Siglec 15 蛋白、或編碼該 Siglec 15 蛋白之核酸。於若干具體實例中，該 Siglec 15 蛋白係選自包括全長 Siglec 15 蛋白、Siglec 15 之功能性片段、或 Siglec 15 之 IgV 功能區之組群。適用於本發明方法之調節劑於下文中詳細討論。

【0116】 本發明之 Siglec 15 之調節劑亦可促進 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。Siglec 15 之結合配體可利用此項技藝中已知之任何方法鑑定。舉例而言，Siglec 15 與結合配體間之蛋白質-蛋白質相互作用可經由共免疫

沈澱法分析鑑定，其中係經由於活體外與抗體形成共沈澱物，而確定一對受關注蛋白質之結合。替代地，可使用酵母雙雜合蛋白或噬菌體呈現分析，以篩選 Siglec 15 之結合配體。於若干具體實例中，化學交聯分析及隨後進行質譜測定法，可用於分析相互作用之蛋白質。

【0117】 於若干具體實例中，適用於本發明之 Siglec 15 之結合配體可利用如本文所述之受體陣列技術進行鑑定。

【0118】 於若干具體實例中，Siglec 15 之結合配體為 MAG。於其他具體實例中，Siglec 15 之結合配體為 LRRC4C。於若干具體實例中，Siglec 15 之結合配體為 Sialyl-Tn。

【0119】 適用於實施本文所述方法之特定具體實例中之例示之 Siglec 15 之調節劑可經由刺激涉及 Siglec 15 途徑之活性，舉例而言，經由增強 Siglec 15 之結合配體例如 MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 之表現及/或活性而降低發炎。於若干具體實例中，適用於本發明方法之調節劑係 MAG 或 LRRC4C 之小分子活化劑、MAG 或 LRRC4C 之促效劑抗體或其抗原結合片段、活化 MAG 或 LRRC4C 之轉錄及/或轉譯之蛋白質或核酸。於其他具體實例中，適用於本發明方法之調節劑係 MAG 蛋白質或編碼該 MAG 蛋白質之核酸。於另一具體實例中，適用於本發明方法之調節劑係 LRRC4C 蛋白質或編碼該 LRRC4C 蛋白質之核酸。於一具體實例中，該調節劑係合成之 Sialyl-Tn 分子。舉例而言，

Sialyl-Tn 可單獨給藥或偶合，例如共價或非共價共軛接合於支架分子而給藥。於一具體實例中，該調節劑係攜帶 Sialyl-Tn 之合成胜肽。Sialyl-Tn 可結合並活化 Siglec 15，而作為 Siglec 15 活性之促效劑。增強 Siglec 15 表現及/或活性之適用於本發明方法之調節劑於下文中詳細討論。

【0120】 可用本發明方法治療之疾病包括，惟不限於，自體免疫疾病或癌症。"治療"係指賦予例如罹患疾病或處於形成疾病風險之病患好處之任何類型之處理。治療包括為了改善病患狀況之目的，例如緩和一或多種病徵或延緩疾病之發作或進展，而採取及避免採取之行動。

【0121】 本文所述之"自體免疫疾病"為由身體對正常存在身體中之物質與組織之異常免疫反應所引起之彼等疾病包括，惟不限於，類風溼性關節炎(RA)、幼年型慢性關節炎(JCA)、甲狀腺炎、移植物抗宿主病(GVHD)、硬皮症、糖尿病、格雷弗氏(Graves)病、過敏、與例如惟不限於腎臟移植、心臟移植、骨髓移植、肝臟移植、胰臟移植、小腸移植、肺臟移植與皮膚移植等同種組織移植相關之急性或慢性免疫疾病。於若干具體實例中，自體免疫疾病係發炎性腦疾病。於其他具體實例中，發炎性腦疾病係多發性硬化症。於其他具體實例中，發炎性腦疾病係實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)。

【0122】

III. 醫藥調配物

包含本發明 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑之醫藥調

配物可經由混合具期望純度之蛋白質或核酸與視需要之生理上可接受之載劑、賦形劑或安定劑 [Remington's 醫藥 Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]，以水溶液、凍乾或其他乾燥調配物之形式製備。可接受載劑、賦形劑、或安定劑於所用劑量與濃度下對接受者不具毒性；包括緩衝劑例如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸與其他有機酸；抗氧化劑包括抗壞血酸與甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨、氯化六氫季銨、氯化苄烷銨、氯化本索寧、苯酚、丁醇或苄醇、烷基對羥苯甲酸酯例如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯、鄰苯二酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇、與間甲酚)；低分子量(低於約 10 個殘基)多肽；蛋白質例如血清白蛋白、明膠、或免疫球蛋白；親水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸例如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸、或離胺酸；單醣、雙醣、與其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合劑例如 EDTA；糖類例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；形成鹽之相對離子例如鈉；金屬錯合物(例如鋅蛋白錯合物)；及/或非離子性界面活性劑例如 Tween™、Pluronic™ 或聚乙二醇(PEG)。

針對所治療特定適應症之需要，本文之調配物亦可含有一種以上之活性化合物。舉例而言，欲治療自體免疫疾病時，則含有 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑之本發明調配物可組合已知用於治療自體免疫疾病之藥物，例如甲基去氫皮質醇、丙酮化去炎松(kenalog)、美卓佑(medrol)、去

氫皮質醇、固體膚(cortef)、氫皮質酮、皮質酮、丙酮特安皮質醇(triamcinolone acetonide)、倍他米松磷酸酯鈉(celestone soluspan)、乙酸甲基去氫皮質醇、去氫皮質醇磷酸鈉 ODT(orapred ODT)、去氫皮質醇磷酸鈉口服液(veripred 20)、舒汝美卓佑(Solu-Medrol)或甲基去氫皮質醇鈉。若欲治療癌症，則含有 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑之本發明調配物可組合已知用於治療癌症之藥物，例如乙酸阿比特龍(Abiraterone Acetate)、ABITREXATE [胺甲喋呤(Methotrexate)]、ABRAXANE (白蛋白穩定化之太平洋紫杉醇奈米粒子調配物)、ADCETRIS [貝倫妥單抗-維多汀(Brentuximab Vedotin)]、賀癌寧(Ado-Trastuzumab Emtansine)、ADRIAMYCIN [鹽酸多柔比星(Doxorubicin Hydrochloride)]、ADRUCIL [氟尿嘧啶(Fluorouracil)]、馬來酸阿法替尼(Afatinib Dimaleate)、AFINITOR [依維莫司(Everolimus)]、ALDARA [咪喹莫特(Imiquimod)]、阿地介白素(Aldesleukin)、阿侖滋單抗(Alemtuzumab)、ALIMTA [培美曲塞二鈉(Pemetrexed Disodium)]、ALOXI[鹽酸帕洛諾司瓊(Palonosetron Hydrochloride)]、AMBOCHLORIN[氮芥苯丁酸(Chlorambucil)]、胺基乙醯丙酸、阿那曲唑(Anastrozole)、阿瑞吡坦(Aprepitant)、AREDIA[帕米膦酸二鈉(Pamidronate Disodium)]、ARIMIDEX (阿那曲唑)、AROMASIN [諾曼癌素(Exemestane)]、ARRANON [奈拉濱(Nelarabine)]、三氧化二砷、ARZERRA [奧法木單抗(Ofatumumab)]、菊歐文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)天冬醯胺酸酶、AVASTIN [貝伐單抗(Bevacizumab)]、阿西替尼

(Axitinib)、阿扎胞苷 (Azacitidine)、鹽酸苯達莫司汀 (Bendamustine Hydrochloride)、貝伐單抗、貝沙羅汀 (Bexarotene)、BEXXAR [托西莫單抗 (Tositumomab) 與 碘 131 托西莫單抗]、博萊黴素 (Bleomycin)、硼替佐米 (Bortezomib)、BOSULIF [伯舒替尼 (Bosutinib)]、卡巴他賽 (Cabazitaxel)、蘋果酸卡博替尼 (Cabozantinib-S-Malate)、CAMPATH (阿侖滋單抗)、CAMPTOSAR [鹽酸愛萊諾迪肯 (Irinotecan Hydrochloride)]、卡培他濱 (Capecitabine)、卡鉑 (Carboplatin)、卡菲佐米 (Carfilzomib)、CEENU [洛莫司汀 (Lomustine)]、CERUBIDINE [鹽酸道諾黴素 (Daunorubicin Hydrochloride)]、西妥昔單抗 (Cetuximab)、氮芥苯丁酸、順鉑 (Cisplatin)、CLAFEN (環磷醯胺)、氯伐拉濱 (Clofarabine)、COMETRIQ (蘋果酸卡博替尼)、COSMEGEN [放線菌黴素 D (Dactinomycin)]、克里唑替尼 (Crizotinib)、環磷醯胺、CYFOS [依弗醯胺 (Ifosfamide)]、阿糖胞苷 (Cytarabine)、達拉非尼 (Dabrafenib)、達卡巴嗪 (Dacarbazine)、DACOGEN [地西他濱 (Decitabine)]、放線菌黴素 D、達沙替尼 (Dasatinib)、鹽酸道諾黴素、地西他濱、地加瑞克 (Degarelix)、地尼白介素 (Denileukin Diftitox)、地諾單抗 (Denosumab)、鹽酸右雷佐生 (Dexrazoxane Hydrochloride)、歐洲紫杉醇 (Docetaxel)、鹽酸多柔比星、EFUDEX (氟尿嘧啶)、ELITEK [拉布立酶 (Rasburicase)]、ELLENCÉ [鹽酸依匹紅黴素 (Epirubicin Hydrochloride)]、ELOXATIN [奧沙利鉑 (Oxaliplatin)]、艾曲波帕 (Eltrombopag Olamine)、EMEND (阿瑞吡坦)、恩雜魯胺 (Enzalutamide)、

鹽酸依匹紅黴素、ERBITUX(西妥昔單抗)、甲磺酸艾日布林(Eribulin Mesylate)、ERIVEDGE [維莫德吉(Vismodegib)]、鹽酸厄洛替尼(Erlotinib Hydrochloride)、ERWINAZE (菊歐文氏菌天冬醯胺酸酶)、滅必治(Etoposide)、依維莫司、EVISTA [鹽酸雷洛昔芬(Raloxifene Hydrochloride)]、諾曼癌素、FARESTON [托瑞米芬(Toremifene)]、FASLODEX [氟維司群(Fulvestrant)]、FEMARA [利妥唑(Letrozole)]、非格司亭(Filgrastim)、FLUDARA [磷酸氟達拉濱(Fludarabine Phosphate)]、磷酸氟達拉濱、FLUOROPLEX(氟尿嘧啶)、氟尿嘧啶、醛葉酸、FOLOTYN [普拉曲沙(Pralatrexate)]、氟維司群、吉非替尼(Gefitinib)、鹽酸吉西他濱(Gemcitabine Hydrochloride)、吉妥珠單抗(Gemtuzumab Ozogamicin)、GEMZAR(鹽酸吉西他濱)、GILOTRIF(馬來酸阿法替尼)、GLEEVEC [苯磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate)]、HALAVEN (甲磺酸艾日布林)、HERCEPTIN[曲妥珠單抗(Trastuzumab)]、HYCAMTIN [鹽酸托普迪肯(Topotecan Hydrochloride)]、替伊莫單抗(Ibritumomab Tiuxetan)、ICLUSIG [鹽酸普納替尼(Ponatinib Hydrochloride)]、依弗醯胺、苯磺酸伊馬替尼、咪喹莫特、INLYTA (阿西替尼)、INTRON A(重組干擾素 α -2b)、碘 131 托西莫單抗與托西莫單抗、伊匹單抗(Ipilimumab)、IRESSA(吉非替尼)、鹽酸愛萊諾迪肯、ISTODAX [羅米地辛(Romidepsin)]、易莎平(Ixabepilone)、JAKAFI[磷酸魯索利替尼(Ruxolitinib Phosphate)]、JEVTANA (卡巴他賽)、Kadcyla(賀癌寧)、KEOXIFENE(鹽酸雷洛昔

芬)、KEPIVANCE [帕利夫明(Palifermin)]、KYPROLIS(卡菲佐米)、二對甲苯磺酸拉帕替尼(Lapatinib Ditosylate)、來那度胺(Lenalidomide)、利妥唑、甲醯四氫葉酸鈣(Leucovorin Calcium)、乙酸亮丙瑞林(Leuprolide Acetate)、洛莫司汀、LUPRON(乙酸亮丙瑞林)、MARQIBO [硫酸長春花新鹼(Vincristine Sulfate)微脂體]、MATULANE [鹽酸丙卡巴肼(Procarbazine Hydrochloride)]、鹽酸甲基二氯乙基胺(Mechlorethamine Hydrochloride)、MEGACE [乙酸甲地孕酮(Megestrol Acetate)]、乙酸甲地孕酮、MEKINIST [曲美替尼(Trametinib)]、硫醇嘌呤(Mercaptopurine)、美司鈉(Mesna)、METHAZOLASTONE [帝盟多(Temozolomide)]、胺甲喋呤、絲裂黴素(Mitomycin)、MOZOBIL [普樂沙福(Plerixafor)]、MUSTARGEN(鹽酸甲基二氯乙基胺)、MUTAMYCIN(絲裂黴素 C)、MYLOSAR(阿扎胞苷)、MYLOTARG(吉妥珠單抗)、奈米粒子太平洋紫杉醇(白蛋白穩定化之太平洋紫杉醇奈米粒子調配物)、NAVELBINE [酒石酸溫諾平(Vinorelbine Tartrate)]、奈拉濱、NEOSAR(環磷醯胺)、NEUPOGEN(非格司亭)、NEXAVAR [甲苯磺酸索拉非尼(Sorafenib Tosylate)]、尼羅替尼(Nilotinib)、NOLVADEX [檸檬酸它莫西芬(Tamoxifen Citrate)]、NPLATE [羅米司亭(Romiplostim)]、奧法木單抗、高三尖杉酯鹼(Omacetaxine Mepesuccinate)、ONCASPAR [培門冬酶(Pegaspargase)]、ONTAK (地尼白介素)、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、白蛋白穩定化之太平洋紫杉醇奈米粒子調配物、帕利夫明、鹽酸帕洛諾司瓊、帕米

磷酸二鈉、帕尼單抗(Panitumumab)、鹽酸帕唑帕尼(Pazopanib Hydrochloride)、培門冬酶、長效型干擾素(Peginterferon α -2b)、PEG-INTRON(長效型干擾素 α -2b)、培美曲塞二鈉、帕妥株單抗(Pertuzumab)、PLATINOL(順鉑)、PLATINOL-AQ(順鉑)、普樂沙福、泊馬度胺(Pomalidomide)、POMALYST(泊馬度胺)、鹽酸普納替尼、普拉曲沙、強的松(Prednisone)、鹽酸丙卡巴肼、PROLEUKIN(阿地介白素)、PROLIA(地諾單抗)、PROMACTA(艾曲波帕)、PROVENGE [西普魯塞(Sipuleucel)-T]、PURINETHOL(硫醇嘌呤)、鐳 223 二氯化物、鹽酸雷洛昔芬、拉布立酶、重組干擾素 α -2b、瑞戈菲尼(Regorafenib)、REVLIMID(來那度胺)、RHEUMATREX(胺甲喋呤)、利妥昔單抗(Rituximab)、羅米地辛、羅米司亭、RUBIDOMYCIN(鹽酸道諾黴素)、磷酸魯索利替尼、西普魯塞-T、甲苯磺酸索拉非尼、SPRYCEL(達沙替尼)、STIVARGA(瑞戈菲尼)、蘋果酸蘇尼替尼(Sunitinib Malate)、SUTENT(蘋果酸蘇尼替尼)、SYLATRON(長效型干擾素 α -2b)、SYNOVIR [沙利竇邁(Thalidomide)]、SYNRIBO(高三尖杉酯鹼)、TAFINLAR(達拉非尼)、檸檬酸它莫西芬、TARABINE PFS(阿糖胞苷)、TARCEVA(鹽酸厄洛替尼)、TARGRETIN(貝沙羅汀)、TASIGNA(尼羅替尼)、TAXOL(太平洋紫杉醇)、TAXOTERE(歐洲紫杉醇)、TEMODAR(帝盟多)、帝盟多、替昔羅莫司(Temsirolimus)、沙利竇邁、TOPOSAR(滅必治)、鹽酸托普迪肯、托瑞米芬、TORISEL(替昔羅莫司)、托西莫單抗與碘 131 托西莫單抗、TOTECT(鹽

酸右雷佐生)、曲美替尼、曲妥珠單抗、TREANDA(鹽酸苯達莫司汀)、TRISENOX(三氧化二砷)、TYKERB(二對甲苯磺酸拉帕替尼)、凡德他尼(Vandetanib)、VECTIBIX(帕尼單抗)、VelP、VELBAN [硫酸長春花鹼(Vinblastine Sulfate)]、VELCADE(硼替佐米)、VELSAR(硫酸長春花鹼)、維羅非尼(Vemurafenib)、VEPESID(滅必治)、VIADUR(乙酸亮丙瑞林)、VIDAZA(阿扎胞苷)、硫酸長春花鹼、硫酸長春花新鹼、酒石酸溫諾平、維莫德吉、VORAXAZE [谷卡匹酶(Glucarpidase)]、伏立諾他(Vorinostat)、VOTRIENT(鹽酸帕啞帕尼)、WELLCOVORIN(甲醯四氫葉酸鈣)、XALKORI(克里啞替尼)、XELODA(卡培他濱)、XGEVA(地諾單抗)、XOFIGO(鐳 223 二氯化物)、XTANDI(恩雜魯胺)、YERVOY (伊匹單抗)、ZALTRAP [阿柏西普(Ziv-Aflibercept)]、ZELBORAF(維羅非尼)、ZEVALIN(替伊莫單抗)、ZINECARD (鹽酸右雷佐生)、阿柏西普、啞來磷酸(Zoledronic Acid)、ZOLINZA(伏立諾他)、ZOMETA(啞來磷酸)、與 ZYTIGA (乙酸阿比特龍)。於一具體實例中，Siglec 15 之調節劑可組合 PD-L1 拮抗劑，例如抗 PD-L1 拮抗劑抗體或其抗原結合部分。於另一具體實例中，Siglec 15 之調節劑可組合 PD-1 拮抗劑，例如抗 PD-1 拮抗劑抗體或其抗原結合部分。

【0123】 於膠態藥物(例如微脂體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子與奈米膠囊)或巨乳液傳輸系統中，該等活性成分亦可包裝於例如利用凝聚技術或界面聚合反應製備之分別為例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊與聚(甲基丙烯酸

酸甲酯)微膠囊之微膠囊中。此等技術係揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。

【0124】 用於活體內給藥之調配物必須無菌；利用通過無菌過濾膜之過濾易於達成。

【0125】 通常，組成物之成分係呈分開或混合在一起之單位劑量型供應，例如，於指示活性劑量之例如安甌或小袋之密封容器中，係呈乾燥凍乾粉末或無水濃縮物。給藥方式為輸注時，組成物可用含無菌藥用級水或生理鹽水之輸注瓶施給。給藥方式係經由注射時，可提供無菌注射用水或生理鹽水之安甌，俾使可於給藥前混合該等成分。於一替代具體實例中，一或多種本發明之醫藥組成物係呈液體形式，於顯示製劑量與濃度之密封容器中供應。

【0126】 活性劑可併入適於非經腸給藥之醫藥組成物中，通常係製備為可注射溶液。可注射溶液可由於燧石或琥珀色小瓶、安甌或預充式注射器中之液體或凍乾劑型組成。液體或凍乾劑量可進一步包含緩衝劑(例如 L-組胺酸、琥珀酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀、氯化鈉)、低溫保護劑(例如蔗糖、海藻糖或乳糖)、增積劑(例如甘露糖醇)、安定劑(例如 L-甲硫胺酸、甘胺酸、精胺酸)、佐劑(玻尿酸酶)。

【0127】 本發明之組成物，例如 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑，可呈多種形式；包括，舉例而言，液體、半固體與固體劑型，例如液體溶液(如，可注射與可輸注溶液)、微乳液、分散液、微脂體或懸浮液、錠劑、丸劑、粉劑、

微脂體與栓劑。較佳形式視預期給藥方式與治療應用而定。包含本文所述 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑之醫藥組成物可調配以給藥特定組織。舉例而言，於特定具體實例中，可能需要給予 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑至多種器官中之結締組織、腦組織、及/或腫瘤部位。

【0128】 適用於本發明方法之 Siglec 15 與 Siglec 15 之調節劑可利用包括非經腸給藥(例如注射、輸注)之任何適當方法給藥，及可經由皮下、腹膜內、肺內、與鼻內給藥，及，需要用於局部治療時之病灶內給藥，例如，腫瘤內給藥。非經腸輸注包括靜脈內、動脈內、腹膜內、肌內、皮內或皮下給藥。此外，Siglec 15 與 Siglec 15 之調節劑可經由脈衝式輸注適當地給藥，特別是減少劑量時。給藥可經由注射給予，例如靜脈內或皮下注射。無論給藥是短暫或長期，可根據各種因素挑選給藥途徑。可考慮其他給藥方法，包括局部，特別是經皮、經黏膜、直腸、口服或局部給藥，例如經由在接近所需部位安置導管。注射，尤其是靜脈內注射，為所關注。

【0129】 於若干具體實例中，本發明之方法包括給予個體治療有效量之本文所述之 Siglec 15。於若干具體實例中，本發明之方法包括給予個體治療有效量之 Siglec 15 之調節劑。Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑之治療有效量係足以於個體中治療例如自體免疫疾病或癌症之疾病之量。本文所述 Siglec 15 或 Siglec 15 之調節劑之治療有效劑量，將由於個體而有些不同，將取決於例如個體之年齡、體重

與症狀以及遞送途徑等因素。此等劑量可根據熟習此項技藝人士已知之程序確定。於一例示具體實例中，Siglec 15 拮抗劑之治療有效量係於個體中有效降低 Siglec 15 之水準或活性之數量。於另一例示具體實例中，Siglec 15 促效劑之治療有效量係於個體中有效增強 Siglec 15 之水準或活性之數量。

【0130】 於一具體實例中，本文所述之治療方法係於人類中進行。

【0131】

IV. 用於本發明方法之 Siglec 15 調節劑

如上所述，降低 Siglec 15 之表現可縮減腫瘤大小並延長具腦瘤小鼠之存活期，然而降低 Siglec 15 之表現及/或活性會使腦部炎症惡化，表明 Siglec 15 於調控對癌症與炎症之免疫反應上，扮演免疫調節分子之關鍵性角色。因此，調節，例如抑制或活化 Siglec 15 之表現及/或活性之分子，及/或調節，例如抑制或活化 Siglec 15 結合搭檔(例如 MAG 或 LRRC4C)之表現及/或活性之分子，於本發明方法中均有用。例示之調節劑可調節，例如，抑制或促進 Siglec 15 與 Siglec 15 配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)間之結合。抑制性調節劑(即，抑制劑)或活化調節劑(即，活化劑)可為核酸、多肽、抗體、或小分子化合物。於若干具體實例中，抑制劑或活化劑於轉錄、mRNA 穩定性、轉譯、蛋白質穩定性/降解、蛋白質修飾、與蛋白質結合層次上起作用。

【0132】

A. 抑制性調節劑

於若干具體實例中，用於本發明方法之調節劑係抑制性調節劑。於若干具體實例中，抑制性調節劑為小分子，例如 Siglec 15 之小分子抑制劑、Siglec 15 結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之小分子抑制劑。於其他具體實例中，用於本發明方法之抑制性調節劑係胞內結合分子，其作用為特異性抑制 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之表現、穩定性、及/或活性。於其他具體實例中，抑制性調節劑為 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)之拮抗劑抗體或其抗原結合片段。於若干具體實例中，抑制性調節劑為 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)之重組融合蛋白。於其他具體實例中，Siglec 15 融合蛋白係 Siglec 15-Fc 融合蛋白。於若干具體實例中，用於本發明方法之抑制性調節劑係核酸分子，其作用為特異性降低 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)之表現、穩定性、及/或活性。

【0133】 本文所用之"胞內結合分子"一詞意欲包括利用結合於蛋白質或編碼該蛋白質之核酸(例如 mRNA 分子)，於胞內起作用以抑制蛋白質之表現或活性之分子。

【0134】 本發明之 Siglec 15 之調節劑亦可調節，例如，阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用。於若干具體實例中，Siglec 15 之結合配體係選自包括 MAG 與 LRRC4C 之組群。於若干具體實例中，該調節劑係於殘基 143 處具

有單一置換突變之突變體 Siglec 15 蛋白。於其他具體實例中，該調節劑係具有 IgV 功能區缺失之突變體 Siglec 15 蛋白。於若干具體實例中，Siglec 15 之調節劑結合於 Siglec 15 之 IgV 功能區。於其他具體實例中，Siglec 15 之調節劑結合於 Siglec 15 之殘基 143。於若干具體實例中，Siglec 15 之調節劑係結合於 Siglec 15 之配體(例如 MAG 或 LRRC4C)中之區域，於其中發生 Siglec 15 與其配體間之相互作用。

【0135】

i. 抑制性核酸

於一具體實例中，本文所述之方法包括使用抑制性核酸靶向 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)。核酸抑制劑可編碼靶向 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)並抑制其表現或活性之小干擾 RNA (例如，RNAi 劑)。“RNAi 劑”一詞係指具有與標靶 RNA 足夠之序列互補性以引導 RNA 干擾之 RNA 或其類似物。實例亦包括可用於製造該 RNA 之 DNA。

【0136】 *RNA 干擾*：RNA 干擾(RNAi)係指標靶分子(例如標靶基因、蛋白質或 RNA)被向下調節之序列特異性或選擇性過程。通常，干擾 RNA (“RNAi”)為導致催化降解特異性 mRNA 之雙股短干擾 RNA (siRNA)、短髮夾型 RNA (shRNA)、或單股微型 RNA (miRNA)，亦可用於降低或抑制基因表現。RNA 干擾(RNAi)為雙股 RNA (dsRNA)誘發動物與植物細胞及細菌中之基因表現之序列特異性調控之過程 (Aravin and Tuschl, *FEBS Lett.* 26:5830-5840, 2005、Herbert

et al., *Curr. Opin. Biotech.* 19:500-505, 2008 ; Sharp, *Genes Dev.*, 15:485-490, 2001、Valencia-Sanchez *et al.* *Genes Dev.* 20:515-524, 2006)。於哺乳動物細胞中，RNAi 可由小干擾 RNA (siRNA) 之 21 個核苷酸(nt)雙鏈分子 (Chiu *et al.*, *Mol. Cell.* 10:549-561, 2002)、由微型 RNA (miRNA)、功能性短小髮夾型 RNA (shRNA)、或使用 DNA 模板與 RNA 聚合酶 II 或 III 啟動子於活體內表現之其他 dsRNA 觸發 (Zeng *et al.*, *Mol. Cell* 9:1327-1333, 2002、Paddison *et al.*, *Genes Dev.* 16:948-958, 2002、Denti, *et al.*, *Mol. Ther.* 10:191-199, 2004、Lee *et al.*, *Nature Biotechnol.* 20:500-505, 2002、Paul *et al.*, *Nature Biotechnol.* 20:505-508, 2002、Rossi, *Human Gene Ther.* 19:313-317, 2008、Tuschl, T., *Nature Biotechnol.* 20:440-448, 2002、Yu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9):6047-6052, 2002)。

【0137】 *siRNA* 分子："短干擾 RNA"或"siRNA" (亦為所謂"小干擾 RNA")一詞係指 RNA 製劑，較佳為長度約 10 至 50 個核苷酸之雙股製劑，較佳為長度介於約 15 至 25 個核苷酸間，更佳為長度約 17、18、19、20、21、22、23、24、或 25 個核苷酸，該等股視需要具有包含例如 1、2 或 3 個突出核苷酸(或核苷酸類似物)之突出端，其能引導或傳介 RNA 干擾。天然存在之 siRNA 係經由細胞之 RNAi 機制從更長(例如，長度大於 25 個核苷酸)之 dsRNA 分子產生。

【0138】 一般而言，本文所述之方法可使用於各股包含 16 至 30，例如 16、17、18、19、20、21、22、23、

24、25、26、27、28、29、或 30 個核苷酸之 dsRNA 分子，其中有一股與 mRNA 中之標靶區實質上完全相同，例如至少 80% (或 80%以上，例如 85%、90%、95%、或 100%) 完全相同，例如，具有 3、2、1、或 0 個誤配之核苷酸；另一股與第一股互補。dsRNA 分子可化學合成或可於活體外或活體內從 DNA 模板轉錄，例如 shRNA。可使用此項技藝中已知之任何方法設計 dsRNA 分子。陰性對照之 siRNA 不應與相應之基因體 (appropriate genome) 有顯著之序列互補性。此類陰性對照可利用隨機拼湊所挑選 siRNA 之核苷酸序列設計；可進行同源性搜索以確保陰性對照缺少與相應基因體中任何其他基因之同源性。陰性對照之 siRNA 可經由引入一或多個鹼基誤配至該序列中予以設計。

【0139】 本文所述之方法可使用 iRNA 與經修飾之 siRNA 衍生物二者，例如經修飾以改變性質 (例如組成物之特異性及 / 或藥物動力學，例如，增強體內半衰期) 之 siRNA，例如，交聯之 siRNA。因此，本發明包括給予包含具有兩個核酸互補股之 siRNA，俾使兩股交聯之 siRNA 衍生物給藥之方法。寡核苷酸修飾包括，惟不限於，2'-O-甲基、2'-氟、2'-O-甲氧乙基與硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、4'-硫代核糖 (Wilson and Keefe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10:607-614, 2006; Prakash *et al.*, *J. Med. Chem.* 48:4247-4253, 2005; Soutschek *et al.*, *Nature* 432:173-178, 2004)。

【0140】 於若干具體實例中，siRNA 衍生物於其 3' 末端具有生物素分子 (例如，光可切割生物素)、胜肽 (例

如，Tat 胜肽)、奈米粒子、胜肽模擬物、有機化合物(例如，染料如螢光染料)、或樹枝狀聚合物。相較於對應之 siRNA，以此方式修飾 siRNA 衍生物可增進細胞攝取或增強所產生 siRNA 衍生物之細胞靶向活性，相較於對應之 siRNA，可用於追蹤細胞中之 siRNA 衍生物，或增進 siRNA 衍生物之穩定性。

【0141】 抑制性核酸組成物可為未共軛接合或可共軛接合於另一部分，例如奈米粒子，以增強組成物之性質，例如，藥物動力學參數如吸收、功效、生體可利用率、及/或半衰期。共軛接合可利用此項技藝中已知之方法，例如使用 Lambert *et al.*, *Drug Deliv. Rev.*:47(1), 99-112, 2001; Fattal *et al.*, *J. Control Release* 53(1-3):137-43, 1998; Schwab *et al.*, *Ann. Oncol. 5 Suppl.* 4:55-8, 1994; 與 Godard *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10, 1995 之方法達成。抑制性核酸分子亦可使用此項技藝中已知之任何方法標記；例如，核酸組成物可用螢光團(例如 Cy3、螢光素、或玫瑰紅)標記。可使用套組[例如 SILENCER™ siRNA 標記套組(Ambion)]進行標記。此外，可放射性標記 siRNA，例如使用 ³H、³²P、或其他適當同位素。

【0142】 *siRNA 傳輸*：直接於生理鹽水或其他賦形劑中傳輸之 siRNA 可靜默組織(例如眼、肺、與中樞神經系統)中之標靶基因[Bitko *et al.*, *Nat. Med.* 11:50-55 (2005); Shen *et al.*, *Gene Ther.* 13:225-234 (2006); Thakker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*(2004)]。於成年小鼠中，siRNA 之有

效傳輸可利用"高壓"傳輸技術，經由尾靜脈快速注射(5秒鐘內)大量含 siRNA 溶液至動物中而達成(Lewis, *Nature Genetics* 32:107-108, 2002)。

【0143】 微脂體與奈米粒子亦可用於傳輸 siRNA 至動物中。使用例如穩定之核酸脂質顆粒(SNALP)、二油醯磷脂醯膽鹼(DOPC)系傳輸系統、以及例如 Lipofectamine(脂質體) 2000、TransIT-TKO 之脂化複合物等微脂體之傳輸方法已顯示有效地抑制標靶 mRNA [de Fougerolles, *Human Gene Ther.* 19:125-132(2008); Landen *et al.*, *Cancer Res.* 65:6910-6918 (2005); Luo *et al.*, *Mol. Pain* 1:29 (2005); Zimmermann *et al.*, *Nature* 441:111-114 (2006)]。使 siRNA 共軛接合於胜肽、RNA 適配體、抗體、或例如動態多共軛接合物(dynamic polyconjugates)、環糊精系奈米粒子、去端肽膠原蛋白、與幾丁聚醣之聚合物，可增進 siRNA 之穩定性及/或攝取[Howard *et al.*, *Mol. Ther.* 14:476-484 (2006); Hu-Lieskovan *et al.*, *Cancer Res.* 65:8984-8992 (2005); Kumar, *et al.*, *Nature* 448:39-43; McNamara *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015 (2007); Rozema *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12982-12987 (2007); Song *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23:709-717 (2005); Wolfrum *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 25:1149-1157 (2007)]。

【0144】 病毒傳介之傳輸機制亦可用於經由表現 siRNA 誘發標靶基因之特異性靜默，例如，在 RNA Pol II 啟動子轉錄控制下，產生攜帶 siRNA 之重組腺病毒。以此

等重組腺病毒感染 HeLa 細胞容許減少之內源性標靶基因表現。注射此重組腺病毒載體到表現 siRNA 標靶基因之基因轉殖小鼠中，導致活體內標靶基因表現縮減；文獻同前 (*Id.*)。於動物模式中，全胚胎電穿孔可有效地傳輸合成之 siRNA 到移植後之小鼠胚胎中 [Calegari *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(22):14236-40 (2002)]。

【0145】 使用工程化 RNA 前驅物誘發 RNAi：如本文所述被引入細胞或整個生物體中之工程化 RNA 前驅物，將導致期望 siRNA 分子之生成。此 siRNA 分子接著將與 RNAi 途徑之內源性蛋白質成分結合，以結合並靶向用於切割、去穩定、及/或轉譯抑制破壞之特異性 mRNA 序列。以此方式，被工程化 RNA 前驅物產生之 siRNA 所靶向之 mRNA 將從細胞或生物體中耗盡，導致細胞或生物體中由該 mRNA 編碼之蛋白質濃度降低。

【0146】 反義："反義"核酸可包括與編碼蛋白質之"正義"核酸互補，例如與雙股 cDNA 分子之編碼股互補或與標靶 mRNA 之序列互補之核苷酸序列。反義核酸可與標靶序列之全部編碼股或僅其部分(例如，標靶基因之編碼區)互補。於另一具體實例中，反義核酸分子係與編碼所挑選之標靶基因之核苷酸序列編碼股之"非編碼區"(例如，5'與3'非轉譯區)反義。

【0147】 反義核酸可經設計俾使其與標靶 mRNA 之全部編碼區互補，惟亦可為僅與標靶 mRNA 之部分編碼或非編碼區反義之寡核苷酸。舉例而言，該反義寡核苷酸可

與標靶 mRNA 轉譯起始點之周圍區域(例如介於所關注標靶基因核苷酸序列之 -10 與 +10 區域間)互補。反義寡核苷酸之長度可為，例如，約 7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、或更多個核苷酸。

【0148】 本發明之反義核酸可使用此項技藝中已知程序之化學合成與酵素連接反應建構。舉例而言，反義核酸(例如，反義寡核苷酸)可使用天然存在之核苷酸或經設計以增強分子之生物穩定性或增強反義與正義核酸間所形成雙鏈分子之物理穩定性之各種經修飾之核苷酸化學合成，例如，可使用硫代磷酸酯衍生物及經吡啶取代之核苷酸。反義核酸亦可使用其中核酸已於反義位向被次選殖之表現載體以生物方式產生(即，從嵌入核酸所轉錄之 RNA 將與所關注標靶核酸具反義位向，於下節進一步敘述)。

【0149】 根據本文所揭示有關 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 與 LRRC4C)之序列，熟習此項技藝者易於挑選並合成任何數量之適當反義分子，以供依照本發明使用。舉例而言，可製備包含跨越標靶核酸長度 15 至 30 個核苷酸之一系列寡核苷酸之"基因步移"，隨後測試標靶基因表現之抑制。視需要，可於寡核苷酸間留下 5 至 10 個核苷酸間隙以縮減合成及測試之寡核苷酸數目。於若干具體實例中，反義分子靶向 Siglec 15 之 IgV 功能區。於其他具體實例中，反義分子靶向與 Siglec 15 發生交互作用之 MAG 或 LRRC4C 中之區域。於若干具體實例中，反義分子靶向跨越 Siglec 15 殘基 143 之區域。

【0150】 本發明之反義核酸分子一般係給予個體(例如直接注射於組織部位)，或於原位產生，俾使其與編碼標靶蛋白之細胞 mRNA 及/或基因體 DNA 雜交或結合，從而抑制該蛋白質之表現，例如抑制轉錄及/或轉譯。替代地，反義核酸分子可經修飾以靶向所挑選之細胞，然後全身性給藥。為了全身性給藥，可修飾反義分子，俾使特異性結合在經挑選之細胞表面表現之受體或抗原，例如經由連接該反義核酸分子至結合細胞表面受體或抗原之胜肽或抗體。反義核酸分子亦可使用本文所述之載體傳輸至細胞。為了達到足夠胞內濃度之反義分子，可使用其中反義核酸分子置於強 pol II 或 pol III 啟動子控制下之載體建構體。

【0151】 *CRISPR 技術*：可令 CRISPR 複合體結合於多核苷酸，以修飾標靶多核苷酸(例如，Siglec 15 及/或其結合配體如 MAG 與 LRRC4C 之 DNA 或 RNA)之表現；其中該 CRISPR 複合體包含與標靶多核苷酸內之標靶序列雜交之引導序列複合之 CRISPR 酵素；其中該引導序列連接至與反式激活(tracr)序列雜交之反式激活配對序列。於若干具體實例中，CRISPR 複合體之結合標靶多核苷酸導致增強標靶多核苷酸之表現。於另一具體實例中，CRISPR 複合體之結合標靶多核苷酸導致降低標靶多核苷酸(例如，Siglec 15 及/或其結合配體如 MAG 與 LRRC4C 之 DNA 或 RNA)之表現。

【0152】 本發明包括成簇有規律間隔排列之短迴文重複序列(CRISPR)技術，係用於產生具客製化特異性之

RNA 引導性核酸酶，以供標靶基因體編輯之方法。由此等核酸酶傳介之基因體編輯已於各式各樣生物醫學上之重要細胞類型及傳統上已對基因操縱具挑戰性之生物體中，應用於迅速、容易且有效地修飾內源性基因。

【0153】 一般而言，"CRISPR 系統"一詞統稱涉及 CRISPR 關聯("Cas")基因之表現或引導其活性之轉錄本及其他/元件，包括編碼 Cas 基因之序列、tracr(反式激活 CRISPR)序列(例如，tracrRNA 或具活性之部分 tracrRNA)、tracr 配對序列(包括內源性 CRISPR 系統脈絡中之"定向重複(direct repeat)序列"與經 tracrRNA 過程之部分定向重複序列)、引導序列(於內源性 CRISPR 系統脈絡中亦稱為"間隔序列")、或 CRISPR 基因座之其他序列與轉錄本。於本發明明具體實例中，引導序列與引導 RNA 等詞互換使用。於若干具體實例中，CRISPR 系統之一或多個元件係衍生自第 I 型、第 II 型、或第 III 型 CRISPR 系統。於若干具體實例中，CRISPR 系統之一或多個元件係衍生自包含內源性 CRISPR 系統之特定生物體，例如釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)。一般而言，CRISPR 系統之特徵為於標靶序列位點促進形成 CRISPR 複合體之元件[於內源性 CRISPR 系統脈絡中亦稱為原型間隔序列(protospacer)]。於形成 CRISPR 複合體之脈絡中，"標靶序列"係指所設計之引導序列與其具互補性之序列，其中標靶序列與引導序列間之雜交促進 CRISPR 複合體之形成。標靶序列可包含任何多核苷酸，例如 DNA 或 RNA 多核苷酸(例如，Siglec 15 及/或其結合配體

如 MAG 與 LRRC4C 之 DNA 或 RNA)。於若干具體實例中，標靶序列位於細胞之細胞核或細胞質中。

【0154】 於本發明之較佳具體實例中，CRISPR/Cas 系統為第 II 型 CRISPR 系統，Cas 酵素為 Cas9，其催化 DNA 切割。利用衍生自釀膿鏈球菌之 Cas9 或任何密切相關之 Cas9 之酵素作用，而於與引導序列之 20 個核苷酸雜交且於標靶序列 20 個核苷酸之後具有原型間隔序列鄰近基序 (PAM) 序列 NGG 之標靶部位序列處產生雙股斷裂。藉由 Cas9 部位特異性之 DNA 識別與切割之 CRISPR 活性係由引導序列、部分與引導序列雜交之 tracr 序列及 PAM 序列所界定。CRISPR 系統之更多態樣見述於 Karginov and Hannon, The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archae, *Mol. Cell* 2010, 37(1): 7。

【0155】 含有 Cas9、Cas1、Cas2、與 Csn1 四個基因簇以及兩個非編碼 RNA 元件、tracrRNA 與重複序列(定向重複序列)獨特陣列之得自釀膿鏈球菌 SF370 之第 II 型 CRISPR 基因座，係由短延伸之非重複序列(間隔序列，各為約 30 個 bp)所間隔。此系統中，標靶 DNA 雙股斷裂(DSB)係以四個連續步驟產生。首先，從 CRISPR 基因座轉錄產生兩個非編碼 RNA、pre-crRNA 陣列與 tracrRNA。其次，tracrRNA 與 pre-crRNA 之定向重複序列雜交，然後將其處理成為含獨特間隔序列之成熟 crRNA。第三，成熟 crRNA：tracrRNA 複合體，經由 crRNA 之間隔序列區與原型間隔序列 DNA 間非互補雙螺旋之形成，引導 Cas9 至由原型間隔

序列與對應 PAM 構成之 DNA 標靶。最後，Cas9 傳介 PAM 上游標靶 DNA 之切割，以於原型間隔序列內產生 DSB。可進一步增進 CRISPR 系統之數個態樣，以增強 CRISPR 靶向之效率與通用性。最適 Cas9 活性可取決於游離 Mg²⁺ 可利用性之量高於其在哺乳動物細胞核中之存在量(參見例如 Jinek *et al.*, 2012, *Science*, 337:816)，緊接於原型間隔序列下游 NGG 基序之偏好限制人類基因體中平均每 12 個 bp 之靶向能力。

【0156】 前述抑制性核酸策略亦可用以減少 Sialyl-Tn 之量。舉例而言，RNA 干擾、siRNA 分子、反義核酸、及/或 CRISPR 技術可用以調節負責形成 Sialyl-Tn 之酵素之表現量。如本文所述，Sialyl-Tn 係含有連接於 GalNAc α -O-Ser/Thr 之唾液酸 α -2,6 之截短 O-聚糖。涉及 Sialyl-Tn 合成之例示酵素包括唾液酸轉移酶 ST6GalNAc1 與 COSMC (核心 1 β 3-Gal-T-特異性分子伴護蛋白)。涉及 Sialyl-Tn 生產之酵素(例如唾液酸轉移酶 ST6GalNAc1 或 COSMC)之調節(例如，使用抑制性核酸)可被用以降低活體內或活體外之 Sialyl-Tn 量。

【0157】

ii. 拮抗劑抗體

本發明進一步涵蓋包含抑制 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之方法與組成物，從而降低 Siglec 15 之表現及/或活性並促進對抗癌症之免疫反應。

【0158】 於若干具體實例中，Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之拮抗劑抗體或其抗原結合部分，降低 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之表現及/或活性。

【0159】 於若干具體實例中，Siglec 15 之拮抗劑抗體及/或 Siglec 15 配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之拮抗劑抗體或其抗原結合部分，阻斷 Siglec 15 與其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)間之交互作用。於若干具體實例中，Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之拮抗劑抗體或其抗原結合部分結合於 Siglec 15 之 IgV 功能區。於其他具體實例中，Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之拮抗劑抗體或其抗原結合部分結合於 Siglec 15 之殘基 143。於若干具體實例中，Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)之拮抗劑抗體或其抗原結合部分係結合於 Siglec 15 配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)中之區域，其中 Siglec 15 與其配體間發生交互作用。

【0160】 於一具體實例中，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分係結合 Siglec 15 之胞外抗原決定區。舉例而言，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，可於負責 Siglec 15 與 Siglec 15 配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)間交互作用之胞外抗原決定區處結合 Siglec 15。此等抗體可部分或完全阻斷 Siglec 15 與 Siglec 15 配體(例如，MAG、

LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)間之交互作用。於一例示具體實例中，抗 Siglec 15 拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，係於包含殘基 143 之抗原決定區處結合 Siglec 15。於一具體實例中，拮抗劑抗 Siglec 15 抗體不經由 Siglec 15 轉導訊息。於一具體實例中，拮抗劑抗 Siglec 15 抗體誘發 Siglec 15 之胞吞作用。於另一具體實例中，拮抗劑抗 Siglec 15 抗體不誘發 Siglec 15 之胞吞作用。

【0161】 可使用標準方法針對拮抗 Siglec 15 功能之能力篩選抗 Siglec 15 抗體。例示之抗 Siglec 15 拮抗劑抗體包括本文所述之 S15m03 與 S15m02。衍生自 S15m03 或 S15m02 之抗體或其抗原結合片段亦可作為 Siglec 15 拮抗劑用。舉例而言，S15m03 或 S15m02 之衍生物可為 S15m03 或 S15m02 之嵌合、擬人化、或人類變異體。S15m03 或 S15m02 之例示衍生物包含 S15m03 或 S15m02 之一個、兩個、三個、四個、五個、或六個互補決定區(CDR)。舉例而言，S15m03 或 S15m02 之衍生物可含 S15m03 或 S15m02 之重鏈及/或輕鏈 CDR3。於另一實施例中，S15m03 或 S15m02 之衍生物可含 S15m03 或 S15m02 之重鏈及/或輕鏈 CDR2。於另一實施例中，S15m03 或 S15m02 之衍生物可含 S15m03 或 S15m02 之重鏈及/或輕鏈 CDR1。於另一實施例中，S15m03 或 S15m02 之衍生物可含 S15m03 或 S15m02 之重鏈及/或輕鏈 CDR1、CDR2、與 CDR3。於較佳具體實例中，S15m03 或 S15m02 之衍生物維持 S15m03 或 S15m02 對 Siglec 15 之抗原結合特異性。

【0162】 於一具體實例中，抗 Siglec 15 抗體係 2016 年 9 月 21 日提出申請之美國專利臨時申請案 No. 62/397,794 中闡述之抗體，該案之全部內容併入本文以資參考。

【0163】 可作為 Siglec 15 拮抗劑用之其他例示抗 Siglec 15 抗體包括，惟不限於，mAb A9E8 (見述於 US 9,447,192)、mAb DS-1501 (Daiichi Sankyo)、mAb 32A1 (見述於 US 8,575,316)、mAb AB-25E9 (Alethia Biotherapeutics)、mAb 25B8、mAb 25E6、與 mAb 25E9 (見述於 US 9,388,242)。US 9,447,192、US 8,575,316、與 US 9,388,242 之全部內容併入本文以資參考。其他例示抗 Siglec 15 抗體，包括與前述抗 Siglec 15 抗體競爭結合之抗體，及/或結合 Siglec 15 中與前述抗 Siglec 15 抗體相同或重疊抗原決定區之抗體。於一具體實例中，Siglec 15 拮抗劑不為 mAb A9E8 或其抗原結合片段。於另一具體實例中，Siglec 15 拮抗劑不為 mAb DS-1501 或其抗原結合片段。於另一具體實例中，Siglec 15 拮抗劑不為 mAb AB-25E9 或其抗原結合片段。

【0164】 於一具體實例中，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，結合 MAG 之胞外抗原決定區。舉例而言，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，可於負責 MAG 與 Siglec 15 間交互作用之胞外抗原決定區處結合 MAG。此等抗體可部分或完全阻斷 MAG 與 Siglec 15 間之交互作用。於一例示具體實例中，抗 MAG 拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，係於與 Siglec 15 之殘基 143 交互作用之抗原決定區處結合 MAG。於一具體實例中，拮抗劑抗 MAG 抗體不經由 MAG

轉導訊息。

【0165】 於一具體實例中，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，結合 LRRC4C 之胞外抗原決定區。舉例而言，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，可於負責 LRRC4C 與 Siglec 15 間交互作用之胞外抗原決定區處結合 LRRC4C。此等抗體可部分或完全阻斷 LRRC4C 與 Siglec 15 間之交互作用。於一例示具體實例中，抗 LRRC4C 拮抗劑抗體、或其抗原結合部分，係於與 Siglec 15 之殘基 143 交互作用之抗原決定區處結合 LRRC4C。於一具體實例中，拮抗劑抗 LRRC4C 抗體不經由 LRRC4C 轉導訊息。

【0166】 於一具體實例中，拮抗劑抗體、或其抗原結合部分係結合 Sialyl-Tn。此等抗體可部分或完全阻斷 Sialyl-Tn 與 Siglec 15 間之交互作用。於一例示具體實例中，抗 Sialyl-Tn 拮抗劑抗體、或其抗原結合部分係於與 Siglec 15 交互作用之抗原決定區處結合 Sialyl-Tn。於一具體實例中，拮抗劑抗 Sialyl-Tn 抗體不經由含 Sialyl-Tn 之多肽轉導訊息。

【0167】 適用於本發明方法之拮抗劑抗體可利用此項技藝中已知之各種分析法鑑定、篩選(例如，使用噬菌體呈現法)、或將其物理/化學性質及/或生物活性特徵化(參見，例如，Antibodies: A Laboratory Manual, Second edition, Greenfield, ed., 2014)。抗體對其抗原之結合特異性可利用此項技藝中已知之例如 ELISA、西方墨漬法、或表面電漿共振等方法測試。

【0168】 抗體可使用此項技藝中已知之例如見述於美國專利案 No. 4,816,567 中之重組方法與組成物產生，將其併入本文以資參考。使用編碼例如抗 Siglec 15 抗體之單離核酸轉形宿主細胞以供表現。此類核酸可編碼包含抗體 VL 之胺基酸序列及/或包含抗體 VH 之胺基酸序列(例如，抗體之輕鏈及/或重鏈)。於進一步具體實例中，提供一或多個包含此類核酸之載體(例如，表現載體)。於進一步具體實例中，提供包含此類核酸之宿主細胞。於一此類具體實例中，宿主細胞包含(例如，經下述轉形)：包含編碼含抗體 VL 胺基酸序列及含抗體 VH 胺基酸序列之核酸之載體，或包含編碼含抗體 VL 胺基酸序列之核酸之第一載體及包含編碼含抗體 VH 胺基酸序列之核酸之第二載體。於一具體實例中，宿主細胞係真核生物，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或類淋巴細胞(例如，Y0、NS0、Sp20 細胞)。

【0169】 為了重組產生抗 Siglec 15 抗體，乃單離編碼抗體之核酸並嵌入一或多個載體中，以供於宿主細胞中之進一步選殖及/或表現。此類核酸可使用習知程序(例如，使用能特異性結合編碼抗體重鏈與輕鏈基因之寡核苷酸探針)，容易地單離及定序。

【0170】 用於選殖或表現編碼抗體載體之適當宿主細胞包括本文所述之原核生物或真核生物細胞。舉例而言，可於細菌中產生抗體，特別是於不需要醣基化和 Fc 效應子功能時。關於在細菌中表現抗體片段與多肽，參見，例如美國專利案 Nos. 5,648,237、5,789,199、與 5,840,523。

表現後，可從可溶性區分中之細菌細胞糊狀物單離抗體，並可進一步純化。

【0171】 除了原核生物外，真核微生物例如絲狀真菌或酵母均適用於編碼抗體載體之選殖或表現之宿主，包括其醮基化路徑已被"擬人化"，導致產生具部分或完全人類醮基化模式之抗體之真菌與酵母菌株。參見 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), and Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

【0172】 用於表現醮基化抗體之適當宿主細胞亦衍生自多細胞生物(無脊椎動物與脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物與昆蟲細胞。已鑑定出許多可與昆蟲細胞一起使用，特別是用於轉染秋行軍蟲 (*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

【0173】 脊椎動物細胞亦可作為宿主使用。舉例而言，適應於懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可能有用。有用之哺乳動物宿主細胞株之其他實例為由 SV40 轉形之猴子腎臟 CV1 細胞株 (COS-7)；人類胚胎腎臟細胞株 [見述於，例如，Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)之 293 或 293 細胞]；幼倉鼠腎臟細胞 (BHK)；小鼠賽托利 (sertoli) 細胞 [見述於，例如，Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)之 TM4 細胞]；猴子腎臟細胞 (CV1)；非洲綠猴腎臟細胞 (VERO-76)；人類子宮頸癌細胞 (HELA)；犬腎臟細胞 (MDCK)；水牛鼠肝臟細胞 (BRL 3A)；人類肺臟細胞 (W138)；人類肝臟細胞 (Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤 (MMT 060562)；見

述於，例如，Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)之 TR1 細胞；MRC 5 細胞；與 FS4 細胞。其他有用之哺乳動物宿主細胞株包含中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括 DHFR.sup.- CHO 細胞[Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]；與骨髓瘤細胞株例如 YO、NS0 與 Sp2/0。適用於生產抗體之特定哺乳動物宿主細胞株之評論回顧，參見，例如 Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003)。

【0174】

iii. 小分子抑制劑

可用於特異性抑制 Siglec 15 蛋白活性之其他抑制性調節劑為直接抑制 Siglec 15 活性或抑制 Siglec 15 與其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、及/或 Sialyl-Tn)間之交互作用之化合物。此類化合物可為天然產物或組合化學資料庫之成員，且可使用如下文詳述之篩選分析法鑑定。

【0175】 於若干具體實例中，本發明之小分子抑制劑可阻斷 Siglec 15 與其結合配體間之交互作用。舉例而言，該小分子抑制劑係結合於 Siglec 15 之 IgV 功能區。於其他具體實例中，本發明之小分子抑制劑可結合於 MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 中與 Siglec 15 之 IgV 功能區交互作用之區域，從而阻斷 Siglec 15 與其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)間之交互作用。

【0176】 於若干具體實例中，係挑選小分子抑制劑

以結合與 Siglec 15 功能區具同源性之功能區。舉例而言，本發明之小分子可導向與 Siglec 15 之 IgV 功能區至少 50% 相同、至少 60% 相同、至少 70% 相同、至少 80% 相同、至少 90% 相同、或至少 95% 或 99% 相同之功能區。如此之小分子能結合可能在 Siglec 15 中之蛋白功能區，其功能類似例如 Siglec 15 之 IgV 功能區。

【0177】 本發明之小分子抑制劑亦可結合於衍生自 Siglec 15 之 IgV 功能區之特定模體或共識序列，俾使許該小分子抑制劑特異性地結合 Siglec 家族成員間共有之功能區。於另一具體實例中，本發明之小分子結合代表該蛋白質立體結構之蛋白質模體或共識序列。此類模體或共識序列不代表連接之胺基酸串，而係 Siglec 15 三維摺疊產生之非線性胺基酸排列(即，結構模體)。此類模體之實例係根據 Siglec 15 之 IgV 功能區設計之模體。此類模體與共識序列可根據此項技藝中已知之任何方法設計。

【0178】 於若干具體實例中，小分子係結合 Siglec 15 蛋白之特異性序列，例如 Siglec 15 之殘基 143。

【0179】

iv. 融合蛋白或突變體蛋白質

具拮抗劑作用並抑制 Siglec 15 活性之 Siglec 15 蛋白之變異體或 Siglec 15 結合配體(例如 MAG 與 LRRC4C)之變異體可用於本發明方法中。舉例而言，以如抗 Siglec 15 拮抗劑抗體類似方式而具阻斷蛋白質功能之 Siglec 15 之 Fc-融合蛋白可於本發明中作為抑制性調節劑用。於例示具體

實例中，該 Siglec 15-Fc 融合蛋白拮抗劑係可溶性 Siglec 15-Fc 融合蛋白。替代地，對其配體具降低結合活性之 Siglec 15 突變體亦將於本發明方法中作為抑制性調節劑之用。舉例而言，於殘基 143 處具單一置換突變之 Siglec 15 突變體或無 IgV 功能區之 Siglec 15 突變體可於本發明中作為抑制性調節劑使用。

【0180】 於若干具體實例中，Siglec 15 結合配體(例如，MAG 與 LRRC4C)之變異體阻斷 Siglec 15 與其結合配體間之交互作用。於若干具體實例中，以如抗 Siglec 15 拮抗劑抗體類似方式起阻斷蛋白質作用之 MAG 或 LRRC4C 之 Fc-融合蛋白可於本發明中作為抑制性調節劑使用。於另一實施例中，含 Sialyl-Tn 之蛋白質可經由結合與整合 Siglec 15 而具阻斷劑之功能。替代地，對 Siglec 15 具降低結合活性之 MAG 或 LRRC4C 突變體亦將於本發明方法中作為抑制性調節劑使用。舉例而言，具有徹底破壞與 Siglec 15 IgV 功能區交互作用之突變之 MAG 或 LRRC4C 突變體可於本發明中作為抑制性調節劑使用。

【0181】 用於本發明方法中之 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG 或 LRRC4C)之重組融合蛋白可根據此項技藝中已知之方法由重組載體產生。重組載體可包含以適合於宿主細胞中表現之核酸形式編碼 Siglec 15 蛋白之核酸。於若干具體實例中，編碼 IgG 之 Fc 功能區之核酸序列可在表現載體中操作性地連接編碼受關注蛋白質[例如 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG 與 LRRC4C)，或其

功能性區段]之核酸分子。然後所產生之融合蛋白可經由技藝認可之方法，例如使用抗 Fc 抗體，容易地從細胞純化。

【0182】 於若干具體實例中，重組載體可包含根據用於表現之宿主細胞所挑選之一或多個調控序列，其係操作性地連接於欲表現之核酸序列(即，重組表現載體)。於重組表現載體內，"操作性地連接"擬意指受關注核苷酸序列以容許該核苷酸序列表現之方式連接於調控序列(例如，於活體外轉錄/轉譯系統中或將載體引入至宿主細胞時於宿主細胞中)。“調控序列”一詞擬包括啟動子、增強子與其他表現控制元件(例如，多聚腺苷酸化訊息)。此類調控序列見述於，例如，Goeddel, *Methods in Enzymology: Gene Expression Technology* vol.185, Academic Press, San Diego, CA (1991)。調控序列包括於許多類型宿主細胞中指導核苷酸序列構成性表現之序列，及僅於特定宿主細胞中指導核苷酸序列表現之序列(例如，組織特異性調控序列)。熟習此項技藝者應理解，表現載體之設計可取決於例如欲轉形宿主細胞之選擇、期望蛋白質之表現量等因素。本發明之表現載體可被引入宿主細胞中，從而產生由本文所述核酸編碼之蛋白質或胜肽，包括融合蛋白或胜肽。

【0183】 本發明之重組表現載體可經設計以於原核生物(例如，大腸桿菌)或真核生物細胞(例如，使用桿狀病毒表現載體之昆蟲細胞、酵母細胞或哺乳動物細胞)中表現多肽或其功能性片段。適當宿主細胞可包括，惟不限於，大腸桿菌細胞、芽孢桿菌屬細胞、酵母菌屬細胞、畢赤酵

母菌屬 (*Pichia*) 細胞、NS0 細胞、COS 細胞、中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞、骨髓瘤細胞、或如本文所述之細胞。

【0184】 本發明之另一態樣係有關已引入本發明之重組載體之宿主細胞。"宿主細胞"與"重組宿主細胞"等詞於本文中可互換使用。據瞭解，此類術語不僅意指特定個體細胞，且亦指此類細胞之後代或潛在後代。由於突變或環境影響，後繼世代中可能發生某些修飾，所以此類後代事實上可能與母細胞不完全相同，惟仍包括在本文所用術語之範圍內。

【0185】 載體 DNA 可經由習知之轉形或轉染技術引入原核生物或真核生物細胞中。本文所用之"轉形"與"轉染"等詞擬意指用於引入外來核酸至宿主細胞中之各種此項技藝認可之技術，包括磷酸鈣或氯化鈣共沈澱、DEAE-葡聚糖傳介之轉染、脂轉染、或電穿孔。

【0186】

v. Siglec 15 衍生之胜肽

用於本發明方法中之抑制性調節劑係衍生自 Siglec 15 及/或其結合配體之胺基酸序列(例如，本文揭示之 SEQ ID NOs: 2、4 與 6 序列)之胜肽類化合物。詳言之，抑制性化合物包含傳介 Siglec 15 與結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)交互作用之 Siglec 15(或其模擬物)之一部分，俾使 Siglec 15 與此胜肽類化合物之接觸競爭性地抑制 Siglec 15 與其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之交互作用。舉例而言，衍生自包含 IgV 功能區中之胺基

酸序列之 Siglec 15 之胜肽可作為抑制性調節劑。替代地，衍生自包含 Siglec 15 殘基 143 周圍胺基酸序列之 Siglec 15 之胜肽可作為抑制性調節劑。於其他具體實例中，衍生自包含與 Siglec 15 發生交互作用之區域中的胺基酸序列之 MAG 或 LRRC4C 之胜肽可作為抑制性調節劑。

【0187】 本發明之胜肽類化合物可經由將編碼該胜肽之表現載體引入細胞內，於細胞中胞內製造。此類表現載體可利用標準技術製造。該胜肽可呈與其他蛋白質或胜肽之融合物(例如 GST 融合物)於細胞內表現。作為於細胞中重組合成胜肽之替代方案，可使用標準胜肽合成技術經由化學合成製造胜肽。然後可利用此項技藝中已知用於將胜肽引入至細胞中之各種手段(例如微脂體等)，將合成之胜肽引入細胞中。

【0188】

B. 刺激性調節劑劑

於若干具體實例中，用於本發明方法中之調節劑係刺激性調節劑，其增強 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之表現及/或活性，從而降低有其需要之個體之發炎。此類刺激性調節劑之實例包括蛋白質；核酸分子，例如，包含核酸分子之表現載體；及於細胞中刺激 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)表現及/或活性之小分子。

【0189】 本文所用之"核酸分子"一詞擬包括 DNA 分子(例如，cDNA 或基因體 DNA)與 RNA 分子(例如 mRNA)

及使用核苷酸類似物產生之 DNA 或 RNA 類似物。該核酸分子可為單股或雙股，惟較佳為雙股 DNA。本發明方法中所用之核酸分子可使用標準分子生物學技術加以單離。

【0190】 於若干具體實例中，適用於本發明方法之刺激性調節劑係 Siglec 15 蛋白。舉例而言，刺激性調節劑為全長 Siglec 15 蛋白、Siglec 15 之功能性片段、或 Siglec 15 之 IgV 功能區。刺激性調節劑促進 Siglec 15 與其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)間之交互作用。於其他具體實例中，適用於本發明方法之刺激性調節劑係編碼 Siglec 15 蛋白之核酸分子。舉例而言，使用標準分子生物學技術，將 cDNA(全長或部分 cDNA 序列)選殖至重組表現載體中，然後將該載體轉染至細胞中。該 cDNA 可經由，例如，使用聚合酶連鎖反應(PCR)之擴增或經由篩選適當之 cDNA 資料庫獲得。

【0191】 於若干具體實例中，適用於本發明方法之刺激性調節劑係 Siglec 15 蛋白之結合配體，例如 MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn。刺激性調節劑促進 Siglec 15 與其結合配體間之交互作用。於其他具體實例中，適用於本發明方法之刺激性調節劑係編碼 Siglec 15 蛋白結合配體(例如 MAG 與 LRRC4C)之核酸分子。

【0192】 於若干具體實例中，用於本發明方法之刺激性調節劑係扮演特異性活化 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之表現、穩定性、及/或活性之胞內結合分子。本文所用之"胞內結合分子"一詞

擬包括於胞內經由結合於蛋白質或編碼該蛋白質之核酸(例如， mRNA 分子)以增強蛋白質之表現或活性之分子。

【0193】 於其他具體實例中，刺激性調節劑係 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)之促效劑抗體、或其抗原結合片段。此類 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)之促效劑抗體可使用如本文所述之方法鑑定與產生。

【0194】 於一具體實例中，刺激性調節劑係 Siglec 15 融合蛋白。於例示具體實例中，該刺激性 Siglec 15 融合蛋白被固定在例如細胞上或撐體(例如珠粒)上。舉例而言，膜錨定之 Siglec 15-Fc 融合蛋白可增強 Siglec 15 或 Siglec 15 結合配體之活性，並可具 Siglec 15 促效劑之作用。於另一具體實例中，促效劑係於 FcR 結合中含有突變之 Siglec-Fc 融合蛋白。

【0195】 於若干具體實例中，根據本文所述之 CRISPR 技術，刺激性核酸可用以活化 Siglec 15 及/或其結合配體(例如 MAG 或 LRRC4C)之表現及/或活性。

【0196】 可用以特異性活化 Siglec 15 蛋白及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)活性之其他刺激性調節劑為直接活化 Siglec 15 活性或促進 Siglec 15 及/或其結合配體(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)間之交互作用之化合物。此類化合物可如下文所詳述，使用挑選此類化合物之篩選分析法加以鑑定。

【0197】

V. 篩選分析法

影響 Siglec 15 活性之調節劑可為已知(例如,干擾 Siglec 15 活性之抗體、或 Siglec 15 突變體蛋白質)或可使用本文所述方法鑑定。本發明提供用於鑑定其他調節劑,亦即,調節 Siglec 15 表現及/或活性及用於測試或優化其他調節劑活性之候選或測試化合物或調節劑(例如,胜肽、小分子或其他藥物)之方法(於本文中亦稱為"篩選分析法")。

【0198】 於若干具體實例中,可鑑定結合 Siglec 15 及/或其結合配體,例如, MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn, 或對 Siglec 15 或其結合配體例如, MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 之表現及/或活性具刺激或抑制功效之分子。

【0199】 於一具體實例中,使用本發明之篩選分析法,測量化合物直接調節 Siglec 15 或其結合配體,例如, MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn 之表現、轉譯後修飾、或活性之能力作為指標。

【0200】 如本發明方法所鑑定之能抑制 Siglec 15 或其結合配體(例如, MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之表現、穩定性、及/或活性之調節劑係作為用於治療有其需要之個體之癌症以縮減腫瘤大小或延長有其需要之個體之存活期、或於有其需要之個體中作為增強對抗腫瘤之免疫反應之候選化合物使用。

【0201】 如本發明方法所鑑定之能增強 Siglec 15 或其結合配體(例如, MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之表現、穩定性、及/或活性之調節劑係作為用於治療自體免疫疾

病、或用於有其需要之個體作為降低發炎反應之候選化合物。

【0202】 舉例而言，於一態樣中，本發明提供於個體中鑑定用於治療自身免疫疾病或癌症之化合物之方法。該方法包括提供測試化合物(或多種測試化合物)，測定該測試化合物對 Siglec 15 表現及/或活性之影響，及挑選調節 Siglec 15 表現及/或活性之化合物，從而鑑定可用於治療個體自體免疫疾病或癌症之化合物。於若干具體實例中，Siglec 15 之表現及/或活性增強表示該化合物可用於治療自體免疫疾病。於其他具體實例中，Siglec 15 之表現及/或活性降低表示該化合物可用於治療癌症。

【0203】 於另一態樣中，本發明提供於有其需要之個體中鑑定用於增強對抗腫瘤之免疫反應之化合物之方法。該方法包括提供測試化合物(或多種測試化合物)，測定該測試化合物對 Siglec 15 表現及/或活性之影響，及挑選降低 Siglec 15 之表現及/或活性之化合物，從而鑑定可用於增強個體對抗腫瘤之免疫反應之化合物。

【0204】 於又另一態樣中，本發明提供於有其需要之個體中鑑定用於降低腦發炎反應之化合物之方法。該方法包括提供測試化合物(或多種測試化合物)，測定該測試化合物對 Siglec 15 表現及/或活性之影響，及挑選增強 Siglec 15 之表現及/或活性之化合物，從而鑑定可用於降低個體腦發炎反應之化合物。

【0205】 調節劑、候選化合物或測試化合物之實例

包括，惟不限於，核酸(例如，DNA 與 RNA)、碳水化合物、脂質、蛋白質、胜肽、擬肽物、小分子與其他藥物。調節劑可使用此項技藝中已知之組合式資料庫(combinatorial library)方法中許多方法之任一種獲得，包括：生物資料庫；空間上可確定位置(spatially addressable)之平行固相或溶液相資料庫；需要解迴旋(deconvolution)之合成資料庫法；"一珠一化合物(one-bead one-compound)"資料庫法；及使用親和層析挑選之合成資料庫法。生物資料庫方法限制於胜肽資料庫，而其他四種方法適用於胜肽、非胜肽寡聚物或化合物之小分子資料庫[Lam (1997) *Anticancer Drug Des.*12:145；美國專利案 5,738,996；與美國專利案 5,807,683；前述各參考文獻之全部內容均併入本文以資參考]。

【0206】 用於合成分子資料庫的方法之實例可於此項技藝中找到，例如於：DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909；Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422；Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678；Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303；Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059；Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061；與 Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233 中；前述各參考文獻之全部內容均併入本文以資參考。

【0207】 化合物之資料庫可呈現於，例如，呈現於溶液中[例如，Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-421]、或於珠粒[Lam (1991) *Nature* 354:82- 84]、晶片[Fodor (1993)

Nature 364:555-556]、細菌[美國專利案 5,223,409]、孢子(美國專利案 5,571,698; 5,403,484; 與 5,223,409)、質體[Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869]或噬菌體[Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; and Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310]。前述各參考文獻之全部內容均併入本文以資參考。

【0208】 測試化合物可與表現 Siglec 15 蛋白之細胞或與 Siglec 15 直接相互作用之分子(例如, MAG 或 LRRC4C)接觸。舉例而言, 可以利用引入編碼蛋白質之表現載體至細胞中, 使測試化合物與天然表現或經工程化以表現該(等)蛋白質之細胞接觸。

【0209】 替代地, 測試化合物可隸屬於(*be subjected to*)包含蛋白質(例如, 細胞萃取物或包含例如純化之天然或重組蛋白質之組成物)之無細胞組成物。

【0210】 調節 Siglec 15、或 Siglec 15 之結合配體(例如, MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之表現及/或活性之化合物可使用各種"讀出裝置"鑑定。

【0211】 舉例而言, 可以用表現載體轉染細胞, 於測試化合物存在或不存在下進行培育, 即可測定化合物對 Siglec 15 之表現或對由 Siglec 15 調控之生物反應之影響。Siglec 15 之生物活性包括根據標準技術於活體內或活體外測定之活性。活性可為直接活性, 例如與結合配體(例如,

MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn)之結合。或者，活性亦可為間接活性，例如腦發炎反應增強。

【0212】 為了確定測試化合物是否調節 Siglec 15 蛋白表現，可進行活體外轉錄分析法。為了確定測試化合物是否調節 Siglec 15 mRNA 表現，可進行各種方法，例如定量或即時 PCR。

【0213】 多種報導基因為此項技藝中已知，並適用於本發明之篩選分析法。適當報導基因之實例包括編碼氯黴素乙醯轉移酶、 β 半乳糖苷酶、鹼性磷酸酶、綠螢光蛋白、或螢光素酶。用於測量彼等基因產物活性之標準方法為此項技藝中已知。

【0214】 多種細胞類型適合於篩選分析法中作為指標細胞用。較佳為使用表現低量內源性 Siglec 15 之細胞株，然後工程化以表現重組蛋白質。用於此項目(subject)分析法中之細胞包括真核細胞。舉例而言，於一具體實例中，細胞為真菌細胞，例如酵母細胞。於另一具體實例中，細胞為植物細胞。於又另一具體實例中，細胞為脊椎動物細胞，例如，鳥類細胞或哺乳動物細胞(例如，鼠類細胞、或人類細胞)。

【0215】 可用於表現例如 Siglec 15 之重組表現載體為此項技藝中已知。舉例而言，使用標準分子生物學技術，將 cDNA 首先引入重組表現載體中。cDNA 可經由，例如，使用聚合酶鏈反應(PCR)擴增或利用篩選適當 cDNA 資料庫而獲得。於涉及訊息傳遞途徑(例如，人類、鼠類與酵母)

中之 cDNA 之核苷酸序列或分子為此項技藝中已知，可用於設計容許利用標準 PCR 方法擴增 cDNA 之 PCR 引子或用於設計可用於使用標準雜交方法篩選 cDNA 資料庫之雜交探針。

【0216】 於另一具體實例中，測試化合物隸屬於包含蛋白質之無細胞組成物(例如，細胞萃取物或包含例如純化之天然或者重組蛋白質之組成物)。於宿主細胞或培養基中利用重組方法表現之 Siglec 15 可使用用於蛋白質純化之標準方法從宿主細胞或細胞培養基中單離。舉例而言，可使用離子交換層析法、凝膠過濾層析法、超濾、電泳、與使用抗體之免疫親和純化法，以產生可用於無細胞組成物中之純化或半純化蛋白。替代地，可製備表現受關注蛋白質之細胞溶胞產物或萃取物作為無細胞組成物使用。

【0217】 一具體實例中，於涉及 Siglec 15 訊息傳遞途徑中，特異性調節 Siglec 15 活性或結合配體活性之化合物係根據其調節 Siglec 15 與其結合配體相互作用之能力而鑑定。結合配體可為 mRNA 分子或蛋白質分子，例如，MAG 或 LRRC4C。容許檢測蛋白質-蛋白質相互作用(例如，免疫沉澱、雙雜交分析法等)或容許檢測 Siglec 15 與 mRNA 之相互作用(例如，電泳移動性偏移分析法、DNase I 足跡分析法等)之適當分析法為此項技藝中已知。利用測試化合物存在及不存在下進行此類分析法時，彼等分析法可用以鑑定調節(例如，抑制或增強)Siglec 15 與配體結合之活性之化合物。

【0218】 於項目篩選分析法中所鑑定之化合物可於調節由 Siglec 15 調控之一或多個生物反應之方法中使用；可理解的是，於此類化合物與細胞接觸之前，可能需要使其調配為如本文所述之醫藥組成物。

【0219】 一旦測試化合物經由上文中敘述之多種方法之一鑑定為直接或間接調節例如 Siglec 15 之表現或活性，則可進一步評估所挑選測試化合物(或"受關注"化合物)對細胞之影響，例如利用於活體內(例如，給予生物體受關注化合物)或活體外(例如，使細胞與生物體分離並使該分離之細胞與受關注化合物接觸或，替代地，使受關注化合物與細胞株接觸)使受關注化合物與細胞接觸，並測定受關注化合物相較於適當對照組(例如未經處理之細胞或以不調節生物反應之對照化合物或載劑處理之細胞)對細胞之影響。

【0220】 於另一態樣中，本發明係有關本文所述二或多個分析法之組合。舉例而言，可使用基於細胞或無細胞分析法鑑定調節劑，及可證實該調節劑於活體內，例如，於動物中(例如動物模式中)，針對例如神經膠母細胞瘤腫瘤模式，增強或降低 Siglec 15 或與 Siglec 15 相互作用的蛋白質之活性之能力。

【0221】 此外，如本文所述鑑定之 Siglec 15 之調節劑或於傳訊途徑中涉及 Siglec 15 之分子(例如，反義核酸分子、或特異性抗體、或小分子)可於動物模式中使用，以確定使用此類調節劑治療之功效、毒性、或副作用。替代

地，如本文所述鑑定之調節劑可於動物模式中使用以確定此類調節劑之作用機制。

【0222】 於另一具體實例中，要理解的是，類似之篩選分析法可用於鑑定間接調節 Siglec 15 之活性及/或表現之化合物，例如，經由使用與 Siglec 15 相互作用之分子(例如，MAG、LRRC4C、或 Sialyl-Tn、或於該途徑中作用於 Siglec 15 上游或下游之任何分子)進行例如上述篩選分析法。

【0223】 如本文所述，利用本發明篩選分析法所鑑定之化合物被認為是用於治療例如癌症或自體免疫疾病等疾病之候選化合物。因此，本發明亦包括該等篩選分析法中鑑定之化合物，及其於治療、預防、或延緩本文所述疾病之形成或進展之給藥與用途。

【0224】 應理解的是，本發明不受限於所述之特定分析方法、或測試劑與實驗條件，因為此等方法與製劑可變化。亦應理解的是，本文所用之專門用語僅為達到說明特定具體實例之目的而不擬構成侷限。

【0225】 茲以下述實施例進一步說明本發明，其不擬以任何方式構成侷限。本申請案引用之所有參考文獻、專利案與已公告之專利申請案以及附圖之全部內容特此併入本文以資參考。

(實施例)

【0226】

實施例 1. 利用基因體規模 T 細胞活性陣列技術鑑定 Siglec

為了進行免疫療法用標靶之人類全基因體搜尋，乃開發基因體規模 T 細胞活性陣列 (GS-TCAA)。使用凱杰 (Qiagen) 小量製備套組，製備涵蓋 90% 人類膜基因體之 6402 個人類膜 cDNA，定量並稀釋以供 GS-TCAA 建構用。

將含四個 1536 槽培養盤之一組人類受體陣列離心 (600 g, 2 分鐘)，隨後反轉染。簡言之，使用機器人分注器 (Multidrop Combi, Thermo Scientific)，於 1536 槽陣列培養盤之每槽分注 2 μ l 含脂質體 3000 (7 μ l lipo/ml) 之 optiMEM，以超速迴轉式振盪器迅速振盪 1 分鐘。於室溫貯存所有培養盤 20 分鐘，隨後經由 Multidrop 添加 293T.2A.m. 抗 CD3 細胞，以供 T 細胞刺激 (每槽 4 μ l 中 2000 個細胞)。之後，將培養盤進一步離心 (1000 g, 4 分鐘)，於進行 37°C 培育之前，去除各槽內之氣泡。轉染 24 小時後，將 T 細胞報導基因細胞或初代 T 細胞 (4000 個細胞)，例如具有不同 GFP 報導基因之工程化 Jurkat 細胞株，裝填至陣列培養盤中。於共培養 T 細胞與 293T 系 T 細胞刺激物 12 小時後，利用 InCell 影像分析儀 (GE) 進行培養盤成像 (plate imaging)。使用 Cellprofiler 軟體進行最適成像分析後，鑑定具潛在調節功能之候選基因。舉例而言，若分子不具調節 T 細胞活性之效力，GFP 信號將維持相似。若該分子對 T 細胞活性具刺激信號之作用，則將檢測到相對較強之 GFP 信號。替代地，若該分子為抑制性，將觀察到更微弱之 GFP 信號。根據該基因體規模 T 細胞活性陣列，鑑定 Siglec15 為免疫調

節劑，表明 Siglec 15 可能具免疫功能。

【0227】

實施例 2. Siglec 15 之腦與骨髓相關之表現

使用 RT-PCR 連同小鼠 cDNA 資料庫 (Clontech Laboratories) 評估 Siglec 15 於不同小鼠組織中之表現。使用 Siglec 15 質體 (Origene) 作為正對照組。結果示於第 1A 圖。人類組織 (BioGPS.org) 中 Siglec 15 RNA 表現之微陣列分析示於第 1B 圖。此數據指示，正常條件下，Siglec 15 於人類及小鼠二者之腦與骨髓相關細胞中表現。得自 BioGPS 之微陣列數據呈現於第 1C 圖中，證明 Siglec 15 在單核細胞、巨噬細胞、樹突細胞、B 細胞、與蝕骨細胞上表現。因此，Siglec 15 可能於腦相關之疾病及/或免疫反應之調節上具生理功能。

【0228】

實施例 3. Siglec 15 於癌症中之表現

使用 TCGA 癌症微陣列數據庫，進行人類癌症中 Siglec 15 表現之統合分析。將 Siglec 15 mRNA 於許多人類癌症中之表現與正常組織對應物進行比較 (第 2 圖)。使用 UCSC Cancer Genomics Browser 軟體 (<https://genome-cancer.ucsc.edu>) 標準化原始數據組，並使用 R 程式分析。此數據指示，Siglec 15 在許多人類癌症中過度表現，可能於癌症發育與進展中起作用。

亦評估於數種人類癌症細胞株中之 Siglec 15 表現。利用 NCI60 微陣列 (BioGPS) 測定人類癌症細胞株中之 Siglec

15 表現(第 3A 圖，表現值以任意單位表示)。以抗 Siglec 15 抗體 m03 進行數種人類癌症細胞株之染色。抗體 m03 係以小鼠 Siglec15 胞外功能區融合蛋白免疫 NZB/W F1 小鼠，並與人類 Siglec 15 交叉反應所產生。使用 FACS 分析經染色細胞之 Siglec 15 表現(第 3B 圖)。此數據指示，於人類腫瘤細胞株中，Siglec 15 亦被向上調節。

【0229】

實施例 4. 利用受體陣列技術鑑定 MAG 或 LRRC4C 為 Siglec 15 之配體

為了鑑定 Siglec 15 之配體，乃經由融合各分子之胞外功能區與小鼠或人類 Fc 標記產生 Siglec 15-Fc 融合蛋白 [Dong H, *et al.*, *Nat Med.* 1999 ; 5(12): 1365-9]，並於新建立之基因體規模人類受體陣列中進行篩選 [Yao, S *et al.*, *Immunity* 2011, 34(5):729-40]。簡言之，收集、維持及以 OPTI-MEM 培養液稀釋含超過 6,200 個基因之完全人類膜基因庫，並經由機器人系統，以每槽 40 ng，分別置入四個 1,536 槽培養盤中。於各槽添加脂質體 2000 並與質體混合 30 分鐘。接著，於各槽添加 2000 個 HEK293T 細胞以進行短暫性轉染。轉染 8 小時後，於各槽添加 10 ng 人類 Siglec 15-Fc 與抗 Fc FMAT 藍色二次抗體。轉染 24 小時後，使用 Applied Biosystems 8200 細胞檢測系統讀取培養盤，並使用 CDS 8200 軟體分析。以人類 Fc 受體基因作為該分析之內控正對照組。

鑑定兩個陽性中選(positive hit)之 Siglec 15 配體：髓

鞘相關糖蛋白(MAG)與包含 4C 之富含白胺酸重複序列(LRRC4C)(第 4A 圖)。MAG, 亦稱 Siglec 4, 主要於腦中發現並參與神經元髓鞘形成; 其亦存在骨髓細胞中, 尤其是小神經膠質細胞中。MAG 基因剔除(KO)小鼠具胞噬作用之問題。LRRC4C 為與神經元相關生長、樹突形成、及軸突伸展相關之 LRR 家族分子。LRRC4C 主要定位於興奮性突觸之突觸後側, 並與突觸前配體, 軸突生長誘向因子-G1, 相互作用, 以調控興奮性突觸形成。於腦或腦相關腫瘤中, 顯現加強之 MAG 表現(第 5 圖); 於例如腦癌、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌與 Ewing 氏肉瘤數種癌症中, LRRC4C mRNA 量亦向上調節(第 6 圖)。先前已報導, Siglec 15 與 Sialyl-Tn 相互作用。欲證實此觀察, 乃使用 Octet 鏈黴抗生物素蛋白生物感測器(ForteBio)測量 Sialyl-Tn 抗原 Neu5Ac α 2-6GalNAc 與 Siglec 15 融合蛋白(Siglec 15-mIg)之結合。以 NeuAa-2-6 GalNAc-生物素(Glycotech, 50 μ g/ml)預裝載該 Octet 鏈黴抗生物素蛋白生物感測器, 然後測定對 Siglec15-mIg 或對照 mIg(從 100 μ g/ml 開始之 2 倍系列稀釋)反應之經時變化(第 4B 圖)。於許多人類與小鼠癌症中, 已有文件證明 Sialyl-Tn 表現。因此, Sialyl-Tn 可能作為 Siglec15 配體/受體額外之結合夥伴。

經由流式細胞測量術分析進一步證實 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間相互作用之特異性。用於流式細胞測量術染色之所有抗體係購自 BD Bioscience(San Jose, CA)或 eBioscience(San Diego, CA)。Siglec 15 融合蛋白牢固地結合

於以 MAG 或 LRRC4C 轉染之 HEK293T 細胞，惟不與對照細胞結合，且納入抗 Siglec15 mAb 完全阻斷此相互作用。事實上，Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間之相互作用於小鼠與人類間相當保留。如第 4A 圖中所顯示，人類 Siglec 15 能結合人類與小鼠二者之 MAG，且小鼠 Siglec 15 亦能識別小鼠與人類二者之 LRRC4，表明其係跨種相互作用。

【0230】

實施例 5. MAG 與 LRRC4C 之 Siglec 15 結合功能區之鑑定

為了確定 MAG 或 LRRC4C 之 Siglec 15 結合功能區，乃建構及純化具功能區缺失之 Siglec 15 突變體。Siglec 15 係含胞內功能區、跨膜功能區、IgC 功能區與 IgV 功能區。經由類似先前敘述之 PCR 方法製造人類或小鼠 Siglec 15 [Sedy JR, *et al.*, *Nat Immunol.* 2005 ; 6(1): 90-8]。Siglec 15 點突變係根據先前之發表刊物挑選及使用 PCR 產生 [Cheung TC, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 ; 102(37): 13218-23 ; Compaan DM, *et al.*, *J Biol Chem.* 2005 ; 280(47): 39553-61]。如第 7 圖所示，Siglec 15 IgV 功能區之缺失完全廢止其與 MAG 及 LRRC4C 間之相互作用。此外，IgV 功能區殘基 143 處之點突變(R143A 突變)能消除 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間之相互作用，表明 Siglec 15 之 IgV 功能區為與 MAG 或 LRRC4C 之相互作用所必需，更具體而言，該相互作用涉及 IgV 功能區中之 R143 殘基。

【0231】

實施例 6. Siglec 15 直接抑制 T 細胞之活性

為了測定 Siglec 15 對人類 T 細胞活性之影響，乃以固定化抗 CD3 抗體 ($0.03 \mu\text{g/ml}$ 至 $1 \mu\text{g/ml}$ 不等) 及固定化人類 Siglec15-mIgG 融合蛋白 (S15-mIg) 或對照小鼠 IgG(mIg) ($5 \mu\text{g/ml}$) 刺激人類 PBMC 達 72 小時。16 小時後，分析增殖 T 細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入 (第 8A 圖)。暴露於 S15-mIg 之細胞具有顯著降低之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量，表示與作為配體之 Siglec 15 接觸降低 T 細胞之增殖。

經由融合編碼抗人類 CD3 抗體 OKT3 之 scFv 片段之核酸與編碼 CD14 之核酸，以產生膜關聯之 OKT3 表現建構體。將此建構體轉染至 293T 細胞中，以產生 293T.m.OKT3 細胞，其於細胞表面表現 OKT3 scFv。使 JurkatNF-AT 螢光素酶報導基因細胞、與過度表現模擬 (Mock) 質體、全長 FASLG (Fas 配體)、LRRC4C、Siglec 15、或具 B7-H6 跨膜功能區之 Siglec15 胞外功能區之編碼基因 (Siglec15-ATM) 之諸 293T.m.OKT3 細胞共培養 12 小時；經該共培養後 4 小時，監測螢光素酶活性 (第 8B 圖)。此系統中，相較於模擬質體，FASLG 之過度表現幾乎消除 NF-AT 信號。此外，吾人等觀察到 Siglec15 全長或 Siglec15 ATM 表現可同樣顯著抑制 NF-AT 螢光素酶信號。

【0232】 前述實驗顯示，具配體作用之人類 Siglec 15 可抑制 T 細胞活性。

【0233】 為了證實鼠類 Siglec 15 同樣抑制鼠類 T 細胞之活性，乃於暴露於鼠類 Siglec 15 後，分析小鼠脾臟細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷之併入。以固定化抗 CD3 ($0 \mu\text{g/ml}$

至 $2 \mu\text{g/ml}$ 不等)刺激小鼠脾臟細胞，並暴露於固定化或可溶性小鼠 Siglec15-mIgG 融合蛋白(S15-mIg)或對照小鼠 IgG (mIg)($5\mu\text{g/ml}$)達 72 小時。16 小時後分析增殖 T 細胞中之胸腺嘧啶核苷之併入。暴露於固定化 Siglec15-mIgG 細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷之併入示於第 9A 圖。暴露於可溶性 Siglec15-mIgG 細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷之併入示於第 9B 圖。暴露於鼠類 S15-mIg 之細胞具減少之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量，表示與 Siglec 15 配體接觸減少小鼠脾臟細胞之增殖。

【0234】 以編碼融合 OVA 胜肽(SIINFEKL)之 H2-Kb 之質體轉染 293T 細胞，使產生 293T-Kb-OVA 細胞。然後，以編碼全長 Siglec 15 之慢病毒載體感染該細胞，使產生 293T-Kb-OVA-S15 細胞。經由 FACS 篩選，單離可變異 Siglec 15 表現之數種細胞株。用於識別 H-2kb OVA SIINFEKL 胜肽之 OVA 特異性 TCR 之基因轉殖 OT-1 小鼠係得自傑克遜實驗室(Jackson Laboratory)。得自 OT-1 基因轉殖小鼠之脾臟細胞以 SIINFEKL 胜肽加上 IL-2 預活化 3 天。然後，使活化細胞與過度表現全長小鼠 Siglec 15 (KbOVA-S15)或模擬質體轉染對照(KbOVA-對照)之 293T-KbOVA 細胞共培養 3 天。16 小時後，分析增殖 T 細胞中之 ^3H 胸腺嘧啶核苷之併入(第 9C 圖)。293T-KbOVA 細胞之情況下，暴露於 Siglec 15 之脾臟細胞具減少之 ^3H 胸腺嘧啶核苷併入量，表示與細胞系 Siglec 15 接觸減少小鼠脾臟細胞之增殖。

【0235】 以抗 Siglec15 抗體 m03 染色後如 FACS 分析

所示，於 3 個過度表現小鼠 Siglec15 之 293T-KbOVA 細胞株鑑定出不同之小鼠 Siglec15 表現量(第 9D 圖)。如上所述，得自 OT-1 基因轉殖小鼠之脾臟細胞係以 SIINFEKL 胜肽和 IL-2 預活化。然後，使活化之脾臟細胞與如第 9D 圖中所示具增強 Siglec15 表現量之 293T-KbOVA 細胞株共培養 3 天。利用流式細胞儀珠粒陣列(CBA) (BD Pharmingen) 測量上清液中之 IFN- γ 量(第 9E 圖)與 TNF- α 量(第 9F 圖)。IFN- γ 與 TNF- α 之產量隨 Siglec 15 表現量增加而減少，表示 Siglec 15 以劑量依賴方式抑制 T 細胞功能。

【0236】

實施例 7. 細胞關聯之 Siglec 15 降低 T 細胞之細胞毒性

使用基於黏附性之細胞毒性分析，檢測 Siglec15 對 T 細胞之細胞毒性之影響及與殺死腫瘤之相關性。

以 10^4 個細胞/槽之密度，將 293T-KbOVA 標靶細胞置於 384 E-培養盤(ACEA Biosciences)中生長過夜。黏附於培養盤之細胞產生增強之電信號。若未受干擾，該電信號將經時增強，然後由於細胞過度生長而下降。為了測試此系統中抗原特異性 T 細胞之效應，乃使該等 293T-KbOVA 標靶細胞與不同比率之預活化 OT-1 T 細胞(0:1 至 2:1 不等)共培養。標靶細胞經時生長之黏附性信號示於第 10A 圖。觀察到關於 293T-KbOVA 標靶細胞殺死 OT-1 T 細胞之量呈劑量反應關係。分析中出現 OT-1 T 細胞: 293T-KbOVA 標靶細胞之比率越高，則檢測到之信號越小，表示隨著 OT-1 T 細胞量增加，檢測到之活 293T-KbOVA 標靶細胞越少。

此系統中，於不同 OT-1 T 細胞比率存在下，對過度表現 Siglec15 標靶細胞(293T-KbOVA-S15)之殺死 T 細胞與 Siglec 15 陰性標靶細胞(293T-KbOVA-對照)之殺死 T 細胞進行比較。T 細胞不存在(比率 0:1)下，過度表現 Siglec15 之 293T-KbOVA 細胞之信號比對照細胞弱。然而，於 T 細胞存在(比率 1:1 或 2:1)下，過度表現 Siglec15 之細胞產生較強之信號，表示對殺死 T 細胞之抗性(第 10B 圖)。此數據表示細胞關聯之 Siglec 15 (例如，表現 Siglec 15 之腫瘤細胞)可能使細胞對 T 細胞之細胞毒性具抗性。

【0237】

實施例 8. 缺乏 Siglec 15 引起增強之 T 細胞反應

根據第 11A 圖之計畫表，使野生型(WT)或 Siglec15 全身性基因剔除(KO)小鼠從靜脈注射(i.v.)接受得自 OT-1/RagKO 小鼠之脾臟細胞。簡言之，小鼠於第-1 天接受 2×10^6 個脾臟細胞，並於第 0 天以 $100 \mu\text{g}$ OVA 胜肽加上 $100 \mu\text{g}$ 聚肌胞苷酸(poly i:c)從腹膜內注射加強。評估第 4 天之血液與第 5 天之脾臟中 OT-1 細胞相對於總 CD8 T 細胞族群之百分比(第 11B 圖)。使用 OT-1 四聚體，利用 FACS 染色測定 OT-1 細胞之百分比。

相較於 WT 小鼠，Siglec 15 KO 小鼠血液與脾臟中之抗原特異性 CD8 T 細胞百分比增加。此結果表明，移除 Siglec 15 之抑制性效應容許 T 細胞更強烈地反應抗原啟動。

如第 11A 圖所示，第 -1 天將 OT-1 T 細胞注射至 WT 或 S15KO 小鼠中，隨後於第 0 天進行胜肽刺激。第 0 天開

始，以含 5-乙炔基-2'-脫氧尿苷 (EdU) (0.8 mg/ml) 之飲水飼養小鼠，每兩天更換一次。第 5 天利用抗 EdU 染色分析血液 OT-1 細胞之增殖，並計算為 EdU 陽性 OT-1 細胞/總 OT-1 陽性細胞之百分比 (第 11C 圖)。亦於無刺激下單離脾臟細胞，培養過夜，及對膜聯蛋白 V 染色。以膜聯蛋白 V-陽性 OT-1 細胞/總 OT-1 陽性細胞計算細胞凋亡 (第 11D 圖)。

【0238】

實施例 9. 骨髓衍生之 Siglec 15 主要負責 Siglec 15 之活體內功能

為了確認負責 Siglec15 反應之細胞族群，乃開發巨噬細胞特異性 Siglec15 基因剔除小鼠 (LysM-Cre KO)，其係可用以分析表現 Siglec15 並抑制 T 細胞之細胞。使購自 MMRRC (突變小鼠資源及研究中心) (品系 B6.Cg-Siglec15^{tm1.1Cfgr}/Mmucd；參考文獻編號 MMRRC:032723-UCD) 之 Siglec 15 條件式基因剔除小鼠與 LysM-Cre 小鼠 (Jax Labs) 回交，以產生 LysM-Cre Siglec 15 基因剔除小鼠。此等小鼠隨後與 C57BL6 小鼠回交超過 6 代，然後進行實驗。

使用實施例 8 中敘述之 OT-1 T 細胞轉移系統，比較 Siglec 15 全身性基因剔除小鼠 (KO) 與巨噬細胞特異性 Siglec 15 基因剔除小鼠 (LysM-Cre KO) 中 OT-1 T 細胞之擴增。於不同時間點收集血液，測定總 CD8 T 細胞族群中 OT-1 細胞之百分比 (第 12A 圖)。OT-1 T 細胞之擴增，WT 於第 3 天達到高峰，兩種類型 KO 小鼠則稍後。縮減期，T 細胞於其初始擴增後之收縮時期，於兩種 KO 模式中皆維持較

高值，表明缺少 Siglec15 抑制下，T 細胞維持於較高數量。Siglec15 全身性 KO 與 LysM-Cre KO 表現雷同，表明巨噬細胞可能主要負責 Siglec 15 分子之抑制效應。於 OT-1 T 細胞反應期間，亦評估全身性 KO 與 LysM-Cre KO 小鼠血漿中之 IL-10 量，並與野生型(第 12B 圖)相比較。相對於野生型，確認於全身性 KO 與 LysM-Cre KO 小鼠血漿中，IL-10 量較低。

【0239】

實施例 10. 缺乏 Siglec 15 對內源性免疫細胞池影響不大

為了確定基因剔除小鼠中之 Siglec 15 缺乏是否影響內源性免疫細胞池之組成，乃測定 11 月齡之野生型(WT)與 Siglec 15 基因剔除(S15KO)小鼠血液中之骨髓、CD8、或 CD4 族群之百分比(第 13 圖)。

此等數據顯示，於 Siglec 15 KO 小鼠中，儘管抗原特异性 T 細胞反應顯著增強，惟正常條件下，此類小鼠無明顯之遺傳性免疫表現型(骨髓免疫細胞或 T 細胞)。此發現表示 Siglec15 可能以表現及/或功能性之誘發模式進行運作。

【0240】

實施例 11. 細胞系 Siglec 15 抑制巨噬細胞反應

於不同劑量 LPS 存在下，使小鼠腹膜巨噬細胞與過度表現模擬質體(對照)、全長 LRRC4C、或 Siglec 15 之 293T 細胞共培養 24 小時。利用流式細胞儀珠粒陣列(CBA) (BD Pharmingen)測量上清液中之細胞介素量。當巨噬細胞與過度表現 Siglec 15 之細胞共培養時，該細胞之 IL-6、TNF- α 、

與 TGF- β 1 產量下降(第 14 圖)。此數據表示細胞系 Siglec 15 直接抑制骨髓細胞反應。因此，作為配體之 Siglec 15，可經由骨髓細胞與 T 細胞二者作用，對免疫系統強加抑制活性。

【0241】

實施例 12. EAE 小鼠中阻斷 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間相互作用之效應

為了確定 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間之相互作用於調控腦發炎性疾病中之角色，乃使用實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)之小鼠模式。EAE 為腦炎與髓鞘脫失之發炎模式，其影響脊髓與腦導致麻痺。該 EAE 模式被廣泛用作人類發炎性髓鞘脫失病、多發性硬化症(MS)之模式。麻痺程度可經由 EAE 評分定量。

簡言之，C57BL/6 母小鼠(6 至 10 週齡)係購自美國國家癌症研究院，NIH (Frederick, MD)。第 0 天，以於佛氏完全佐劑(CFA)(Difco)中乳化之 100 μ g MOG 胜肽(35 至 55)進行 8 至 12 週齡 C57BL/6 小鼠之皮下免疫注射，以誘發 EAE。第 0 天與第 2 天，注射兩次於 200 μ l PBS 中之 400 ng 百日咳毒素(Sigma)。第 7 天與第 10 天，以 200 μ g Siglec 15 mAb (S15m02、S15m03)或對照抗體或所示之融合蛋白，進行各小鼠之腹膜內注射。經由以小鼠 Siglec 15-Ig 融合蛋白免疫 NZB/W F1 小鼠，產生小鼠抗小鼠 Siglec 15 mAb。所有融合蛋白係經由融合各個分子之胞外功能區與小鼠或人類 Fc 標記而產生 [Dong H, *et al.*, *Nat Med.* 1999; 5(12):

1365-9]。

疾病嚴重程度係如先前所述 [Stromnes IM, *et al.*, *Nature protocols*. 2006; 1(4): 1810-9]，依下述標準評分：0，無疾病；1，尾部麻痺；2，後軀輕癱；3，截癱；4，前肢虛弱或麻痺之截癱；5，瀕死或死亡。第 15 圖說明 Siglec 15 抗體選殖體 S15m02 充當破壞 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 結合之阻斷抗體。結果，接受 S15m02 抗體之小鼠較以對照 mAb 注射或接受 S15m03 抗體之對應組，形成更嚴重之疾病症狀(第 16 圖)，表明 Siglec 15 與 MAG 或 LRRC4C 間之相互作用，於調控腦中之發炎反應上關係重大。該等結果可經由以 Siglec 15-Fc 融合蛋白 Siglec 15-mIg 處理 EAE 小鼠進一步證實。小鼠接受 Siglec 15-Fc 融合蛋白後，加速 EAE (第 17 圖)。

【0242】

實施例 13. Siglec 15 於抑制腦發炎反應中之角色

為了證實 Siglec 15 扮演調控腦發炎之角色，乃自 MMRRC(UC Davis)購買 Siglec 15 基因剔除(KO)小鼠模式 [Tao *et al. J Immunol*. 2008; 180(10): 6649-55]。野生型(WT)與 Siglec15 基因剔除小鼠二者均以 MOG(33-35)胜肽免疫處理，以誘發實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)，接著測量 EAE 疾病之臨床評分。如第 18 圖所顯示，Siglec 15 KO 小鼠比 WT 小鼠展現更嚴重之 EAE 疾病症狀，表示 Siglec 15 於調控腦發炎反應上之抑制性角色。

【0243】

實施例 14. 缺乏 Siglec 15 會增強自體免疫

野生型(WT)與 Siglec15 基因剔除(Siglec15 KO)小鼠以 MOG 胜肽免疫處理，以誘發 EAE。於第 0 天與第 1 天，所有小鼠以百日咳毒素增強。測定 WT 與 Siglec15 KO 小鼠之 EAE 臨床評分，證實 Siglec 15 KO 小鼠顯現比 WT 小鼠更嚴重之 EAE 疾病症狀。

不同群組之野生型(WT)小鼠以 MOG 胜肽免疫處理，並於第 0 天與第 1 天以百日咳毒素增強，隨後從第 6 天開始，每週兩次，以 Siglec 15-mIg 融合蛋白(Siglec15-mIg)或對照 mIg、或 Siglec 15-hIg 融合蛋白(Siglec15-hIg)或對照 hIg(100 μ g)處理，總共 4 個劑量。經時評估 EAE 臨床評分(第 19A 圖)。第 12 天，於 5 μ g/ml Siglec15-mIg (S15-mIg)或對照 mIg (mIg)存在下，以 MOG 胜肽(60 μ g/ml)再刺激得自對照 mIg 處理小鼠之脾臟細胞 3 天。進一步培育 16 小時後，測量兩組中之 3 H-胸腺嘧啶核苷之併入(第 19B 圖)。此數據表示，可溶性 Siglec15-mIg 於活體內可作為拮抗劑，刺激抗原特異性之 T 細胞反應。此機轉研究促進對 Siglec15 融合蛋白於腦發炎模式(EAE)中之功能作用之理解。

【0244】

實施例 15. Siglec 15 於腦癌中壓制免疫反應之角色

為了測試 Siglec 15 於癌症中調控免疫反應之效應，乃使用腦腫瘤模式。以含有用於定量腫瘤大小之螢光素酶報導基因之 GL261 腫瘤細胞，從顱內注射至 C57BL/6 小鼠中。腫瘤注射後第 4 天，使小鼠接受低劑量全腦輻射療法，

然後於第 5 天及第 10 天，以 Siglec 15-Fc 或對照 Ig 處理。密集監測兩組之腫瘤大小。如第 20 與 21 圖所顯示，經由 Siglec 15-Fc 處理之 Siglec 15 之阻斷，顯著縮減腫瘤大小(第 20 圖)並延長小鼠之存活期(第 21 圖)。以抗 PD-L1 抗體處理時，Siglec15-Fc 處理之小鼠亦顯示加乘效應，顯著促進抗 PD-L1 於腫瘤縮減與存活效益中之功效(第 22 圖)。此等結果表明，阻斷或以其他方式抑制 Siglec 15 活性可增強對癌症之免疫反應。

【0245】

實施例 16. 腫瘤關聯 CD8 T 細胞在荷瘤小鼠中之顯著浸潤

如上所顯示，Siglec 15 於腦中表現。檢測野生型(WT)與 Siglec 15 基因剔除(Siglec15 KO)腦瘤模式中之 T 細胞數與活性。於第 0 天，以 GL261 神經膠母細胞瘤細胞顱內接種 WT 或 Siglec15 KO 小鼠。不同時間點下，經由測量螢光素酶活性，監測腦中之腫瘤負荷(第 23A 圖)。接種 GL261 細胞後第 13 天與第 18 天，使 WT 與 KO 小鼠腦中螢光素酶活性成像(第 23B 圖)。接種 GL261 之 WT 與 KO 小鼠之存活曲線顯示 Siglec 15 KO 小鼠比 WT 存活更久(第 23C 圖)。第 14 天，二組均犧牲若干小鼠。監測腦或脾臟中 CD8 T 細胞(第 24A 圖)、CD4 T 細胞(第 24B 圖)、或骨髓細胞族群(第 24C 圖)之數量與百分比。此外，以 GL-261 腫瘤細胞再刺激荷瘤 WT 或 KO 小鼠之腦淋巴細胞過夜，然後測定 IFN- γ 陽性 CD8 或 CD4 T 細胞之百分比與總數(第 24D 圖)。

Siglec15 KO 小鼠之腫瘤部位確認功能性 CD8 T 細胞之顯著浸潤，而於 WT 小鼠之腫瘤部位則無；由於在脾臟中無差異，因此此效應與腫瘤相關聯。此外，觀察到腦樹突細胞/巨噬細胞族群中之顯著差異。此數據表示 Siglec15 可影響腫瘤部位之免疫細胞反應。詳言之，Siglec 15 於腫瘤/腦微環境處之表現可抑制 T 細胞及/或骨髓細胞，並關閉對抗腫瘤之免疫反應。

【0246】

實施例 17. 表現 Siglec 15 之腫瘤細胞生長

以編碼 Siglec 15(S15+)或對照(S15-)之慢病毒表現建構體感染 MC38 結腸腺癌細胞。經慢病毒感染後，使用 FACS 分選 MC38-S15-與 MC38-S15+細胞族群。利用以單株抗體之 FACS 染色證實於 MC38-S15-與 MC38-S15+細胞上之 Siglec 15 表現(第 25A 圖)。以 MC38-S15-與 MC38-S15+細胞皮下注射接種於 B6 小鼠(0.4M 個細胞/小鼠)，監測腫瘤生長(第 25B 圖)。衍生自表現 Siglec 15 之 MC38 細胞之腫瘤大於衍生自缺乏 Siglec 15 表現之 MC38 細胞之腫瘤。

【0247】

實施例 18. Siglec 15 拮抗劑抑制表現 Siglec 15 腫瘤細胞之生長

將 MC38-S15+穩定細胞株皮下注射接種於 B6 小鼠中(0.4M 個細胞/小鼠)。第 6 天及隨後之每四天，以對照抗體、抗 Siglec 15 抗體 m01、或 S15-mIg 處理小鼠(腹膜內注射，200 μ g/小鼠)，總共 4 次劑量。各組之平均腫瘤大小示於

第 26 圖；以 Siglec 15 拮抗劑 m01 或 S15-mIg 處理小鼠之腫瘤大小顯著縮小。

【0248】

等效物

熟習此項技藝者使用不多之常規實驗將認知或能確定本文敘述之本發明特定具體實例之許多等效物；此等等效物意欲為下述申請專利範圍所涵蓋。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 耶魯大學

<120> 用於治療癌症之組成物及方法

<130> 117886-01120

<150> US 62/253,437

<151> 2015-11-10

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1523

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> 智人之結合唾液酸之類 Ig 凝集素 15(SIGLEC15), mRNA

<400> 1

| | |
|---|-----|
| tccggctccc gcagagccca cagggacctg cagatctgag tgcctgccc acccccgccc | 60 |
| gccttccttc ccccaccacg cctgggaggg cctcactgg ggaggtggcc gagagcgggt | 120 |
| ctggcctggg gtgttcagat gctcacagca tggaaaagtc catctggctg ctggcctgct | 180 |
| tggcgtgggt tctcccgaca ggctcattg tgagaactaa aatagatact acggagaact | 240 |
| tgctcaacac agaggtgcac agctcgccag cgcagcgtg gtccatgcag gtgccacccg | 300 |
| aggtgagcgc ggaggcaggc gacgcggcag tgctgccctg caccttcacg caccgcacc | 360 |
| gccactacga cgggcccgtg acggccatct ggcgcgcggg cgagccctat gcgggcccgc | 420 |
| aggtgttccg ctgcgtgcg gcgcggggca gcgagctctg ccagacggcg ctgagcctgc | 480 |
| acggccgctt cgggctgctg ggcaaccgc gccgcaacga cctctcgtg cgcgtcgagc | 540 |
| gcctcgccct ggctgacgac cggcgctact tctgccgctg cgagttgcc ggcgacgtcc | 600 |
| atgaccgcta cgagagccgc cacggcgtcc ggctgcacgt gacagccgcg ccgcggatcg | 660 |
| tcaacatctc ggtgtgccc agtccggctc acgccttccg cgcgctctgc actgccgaag | 720 |
| gggagccgcc gcccgccctc gcctgggtccg gcccgccct gggcaacagc ttggcagccg | 780 |
| tgcggagccc gcgtgagggt cacggccacc tagtgaccgc cgaactgccc gcaactgacc | 840 |
| atgacggccg ctacacgtgt acggccgcca acagcctggg ccgctccgag gccagcgtct | 900 |

```

acctgttccg cttccatggc gccagcgggg cctcgcggt cgccctcctg ctcggcgtc      960
tcggcttcaa ggcgctgctg ctgctcgggg tctggccgc ccgcgctgcc cgccgccgcc      1020
cagagcatct ggacaccccg gacacccac cacggtccca ggcccaggag tccaattatg      1080
aaaatttgag ccagatgaac ccccggagcc caccagccac catgtgctca ccgtgaggag      1140
tccctcagcc accaacaatcc atttcagcac tgtaaagaac aaaggccagt gcgaggcttg      1200
gttggcacag ccagtctctg ttctcgggca ccttggcagc ccccagctgg gtggctcctc      1260
ccctgctcaa ggtcaagacc ctgctcaagg aggctcatct ggctcctat gtggacaacc      1320
atttcggagc tccctgatat tttgccagc atttcgtaa tgtgcatag tctgtgtg      1380
tgtgtgtgtg tgagagagag agagagagag tacacgcatt agcttgagcg tgaacttcc      1440
agaaatgttc ccttgccctt tcttacctag aacacctgct atagtaaagc agacaggaaa      1500
ctgttaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                             1523

```

<210> 2
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 結合唾液酸之類 Ig 凝集素 15 前驅物

<400> 2

Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
 1 5 10 15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
 20 25 30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35 40 45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50 55 60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65 70 75 80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
 85 90 95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220

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

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
 245 250 255

Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
 260 265 270

Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
 275 280 285

Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
 290 295 300

Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro

<210> 3
 <211> 2458
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 智人之髓鞘相關糖蛋白(MAG)，轉錄本變異體 1，mRNA

<400> 3
 aggcggcccc tggcaccag ggggagggga ggggctggca agtgggggcc tagaccctgg 60
 aaggcagggg actgcgagct gggctggcgg agcagagggtg cagaagcaac tgagtccaag 120
 ttgtctggcg gcttcagggtg gaccagaag acgtcccaaa ctcagggaga ttcagcgatc 180
 actcactcgc tgtacagaat gatattcctc acggcactgc ctctgttctg gattatgatt 240
 tcagcctccc gagggggtca ctgggggtgcc tggatgccct cgtccatctc ggccttcgaa 300
 ggcacgtgcg tctccatccc ctgccgcttt gacttcccgg atgagctgcg gcccgtgtg 360
 gtgcatgggtg tctgggtactt caatagcccc tacccaaga actaccccc ggtggtcttc 420
 aagtcgcgca cccaagtagt ccacgagagc ttccagggcc gcagccgcct cctggggggac 480
 ctgggcctgc gaaactgcac cctcctgctc agcaacgtca gccccgagct gggcggggaag 540
 tactacttcc gtggggacct gggcggctac aaccagtaca cttctcaga gcacagcgtc 600
 ctggatatcg tcaacacccc caacatcgtg gtgccccag aggtggtggc aggcacggag 660
 gtggagggtca gctgcatggt gccggacaac tgcccagagc tgcgccctga gctgagctgg 720
 ctgggccacg aggggctggg ggagcccgt gtgctgggcc ggctgcggga ggacgagggc 780
 acctgggtgc aggtgtcact gctgcacttc gtgcccacga gggaggccaa cggccacagg 840
 ctgggctgcc aggcctcctt cccaacacc acctgcagt tcgagggcta cggcagcatg 900
 gacgtcaagt accccccgtt gattgtggag atgaactct cggtggaggc catcgagggc 960
 tcccacgtga gcctgctctg tggggctgac agcaaccccc cgccgtgct gacctggatg 1020
 cgggacggga cagtctccg ggaggcgggtg gccgagagcc tgctcctgga gctggaggag 1080
 gtgacccccg ccgaagacgg cgtctatgcc tgccctggccg agaatgcta tggccaggac 1140
 aaccgcaccg tggggctcag tgtcatgtat gcaccctgga agccaacagt gaacgggaca 1200
 atggtggccg tagaggggga gacggctctt atctgtgct ccacacagag caaccggac 1260
 cctattctca ccatcttcaa ggagaagcag atcctgtcca cggatccta cgagagcag 1320

```

ctgcagctgg agctgccggc cgtgtcaccg gaggatgatg gagagtactg gtgtgtggct      1380
gagaaccagt atggccagag ggccaccgcc ttcaacctgt ctgtggagtt cgcccctgtg      1440
ctctctctgg agtcccactg cgcggcagcc cgagacacgg tgcagtgcct gtgcgtgggtg      1500
aagtccaacc cggagccgtc cgtggccttt gagctgccat cgcgcaatgt gaccgtgaac      1560
gagagcagag gggagttcgt gtactcggag cgcagcggcc tctgtctcac cagcctctc      1620
acgctgcggg ggcaggccca ggccccgccc cgcgtcatct gcaccgcgag gaacctctat      1680
ggcgccaaga gcctggagct gcccttcag ggagcccatc gactgatgtg ggccaagatc      1740
gggcctgtgg gcgccgtggt cgcctttgcc atctgatgtg ccatcgtctg ctacattacc      1800
cagacacgca ggaaaaagaa cgtgacagag agccccagct tctcggcagg ggacaacctt      1860
cccgtctgtt tcagcagcga ctccgcctc tctggggcac cagagaagta cgagagcgag      1920
aggcgcctgg gatctgagag gaggctgctg ggccttcggg gtgagcccc agagctggac      1980
ctgagctatt ctactcggg cctggggaaa cggcccacca aggacagcta cacgctgacg      2040
gaggagctag ctgagtatgc tgaatatccg gtcaagtgaa ggagctgggg gcagcctgag      2100
tggctgacct cctcaggac cctcgtggtc cccactggc tgtgggctcc ctctctccca      2160
aaagtatcgg gggctggggc aggaggggag tgaggcaggt gacagtgagg tcttgggggc      2220
ctgacctccc ctctctccc agctgcccct cctgcccagc acccccacgc cctcattacg      2280
gctctctct aacctcttt acctcatct gtctggaggg gagctctgtc tgtccgtgtt      2340
atatttgcct acttctgcc tggctctct cccccacacc tggccctggg gcctgtataa      2400
aagggacatg aaataaatgc cccaaagcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      2458

```

```

<210> 4
<211> 626
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> 髓鞘相關糖蛋白同功型前驅物

```

```

<400> 4

```

```

Met Ile Phe Leu Thr Ala Leu Pro Leu Phe Trp Ile Met Ile Ser Ala
1           5           10           15

```

```

Ser Arg Gly Gly His Trp Gly Ala Trp Met Pro Ser Ser Ile Ser Ala
          20           25           30

```

Phe Glu Gly Thr Cys Val Ser Ile Pro Cys Arg Phe Asp Phe Pro Asp
 35 40 45

Glu Leu Arg Pro Ala Val Val His Gly Val Trp Tyr Phe Asn Ser Pro
 50 55 60

Tyr Pro Lys Asn Tyr Pro Pro Val Val Phe Lys Ser Arg Thr Gln Val
 65 70 75 80

Val His Glu Ser Phe Gln Gly Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Leu Gly
 85 90 95

Leu Arg Asn Cys Thr Leu Leu Leu Ser Asn Val Ser Pro Glu Leu Gly
 100 105 110

Gly Lys Tyr Tyr Phe Arg Gly Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Gln Tyr Thr
 115 120 125

Phe Ser Glu His Ser Val Leu Asp Ile Val Asn Thr Pro Asn Ile Val
 130 135 140

Val Pro Pro Glu Val Val Ala Gly Thr Glu Val Glu Val Ser Cys Met
 145 150 155 160

Val Pro Asp Asn Cys Pro Glu Leu Arg Pro Glu Leu Ser Trp Leu Gly
 165 170 175

His Glu Gly Leu Gly Glu Pro Ala Val Leu Gly Arg Leu Arg Glu Asp
 180 185 190

Glu Gly Thr Trp Val Gln Val Ser Leu Leu His Phe Val Pro Thr Arg
 195 200 205

Glu Ala Asn Gly His Arg Leu Gly Cys Gln Ala Ser Phe Pro Asn Thr
 210 215 220

Thr Leu Gln Phe Glu Gly Tyr Ala Ser Met Asp Val Lys Tyr Pro Pro
 225 230 235 240

Val Ile Val Glu Met Asn Ser Ser Val Glu Ala Ile Glu Gly Ser His
 245 250 255

Val Ser Leu Leu Cys Gly Ala Asp Ser Asn Pro Pro Pro Leu Leu Thr
 260 265 270

Trp Met Arg Asp Gly Thr Val Leu Arg Glu Ala Val Ala Glu Ser Leu
 275 280 285

Leu Leu Glu Leu Glu Glu Val Thr Pro Ala Glu Asp Gly Val Tyr Ala
 290 295 300

Cys Leu Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Asp Asn Arg Thr Val Gly Leu
 305 310 315 320

Ser Val Met Tyr Ala Pro Trp Lys Pro Thr Val Asn Gly Thr Met Val
 325 330 335

Ala Val Glu Gly Glu Thr Val Ser Ile Leu Cys Ser Thr Gln Ser Asn
 340 345 350

Pro Asp Pro Ile Leu Thr Ile Phe Lys Glu Lys Gln Ile Leu Ser Thr
 355 360 365

Val Ile Tyr Glu Ser Glu Leu Gln Leu Glu Leu Pro Ala Val Ser Pro
 370 375 380

Glu Asp Asp Gly Glu Tyr Trp Cys Val Ala Glu Asn Gln Tyr Gly Gln
 385 390 395 400

Arg Ala Thr Ala Phe Asn Leu Ser Val Glu Phe Ala Pro Val Leu Leu
 405 410 415

Leu Glu Ser His Cys Ala Ala Ala Arg Asp Thr Val Gln Cys Leu Cys
 420 425 430

Val Val Lys Ser Asn Pro Glu Pro Ser Val Ala Phe Glu Leu Pro Ser
 435 440 445

Arg Asn Val Thr Val Asn Glu Ser Glu Arg Glu Phe Val Tyr Ser Glu
 450 455 460

Arg Ser Gly Leu Val Leu Thr Ser Ile Leu Thr Leu Arg Gly Gln Ala
 465 470 475 480

Gln Ala Pro Pro Arg Val Ile Cys Thr Ala Arg Asn Leu Tyr Gly Ala
 485 490 495

Lys Ser Leu Glu Leu Pro Phe Gln Gly Ala His Arg Leu Met Trp Ala
 500 505 510

Lys Ile Gly Pro Val Gly Ala Val Val Ala Phe Ala Ile Leu Ile Ala
 515 520 525

Ile Val Cys Tyr Ile Thr Gln Thr Arg Arg Lys Lys Asn Val Thr Glu
 530 535 540

Ser Pro Ser Phe Ser Ala Gly Asp Asn Pro Pro Val Leu Phe Ser Ser
 545 550 555 560

Asp Phe Arg Ile Ser Gly Ala Pro Glu Lys Tyr Glu Ser Glu Arg Arg
 565 570 575

Leu Gly Ser Glu Arg Arg Leu Leu Gly Leu Arg Gly Glu Pro Pro Glu
 580 585 590

Leu Asp Leu Ser Tyr Ser His Ser Asp Leu Gly Lys Arg Pro Thr Lys
 595 600 605

Asp Ser Tyr Thr Leu Thr Glu Glu Leu Ala Glu Tyr Ala Glu Ile Arg
 610 615 620

Val Lys
 625

<210> 5
 <211> 2626
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 智人之包含 4C 之富含白胺酸重複序列(LRRC4C),
 轉錄本變異體 1, mRNA

<400> 5
 agtttttggc ttactttttg gcgagtcctc ttggacacgt ttttgctggt gctggaagat 60
 cagatacatg gaacctttga aaactgatta ttttctccg atatgactta aaaaaaata 120
 aaaagaagaa aagaaaatag agtagtgcac ggcaagctag aggattgtaa atttccttg 180
 gtgaactttg aggatccata aagaaggagt tactggaaaa gcaagaataa cttatgcgga 240

| | |
|--|------|
| ttaacaatat ggaaacatcc tgagactact ttggaatcgc cataaattaa gtgggttcca | 300 |
| gttttgcaaa cagagaaacg ggtccatgaa caatttgcta caggataaaa gaagtatctg | 360 |
| cagaaatcca gagcacttat taaacttctt tgagttttct caggaagatc aatacctgtt | 420 |
| ggagaaattt tactaagatt ggcaaacgca ctgcctactt acagcataga gacccccagt | 480 |
| ggagagctag actgtttgaa ttccagaagg accaacacca gataaattat gaatgttgaa | 540 |
| caagatgacc ttacatccac agcagataat gataggtcct aggtttaaca gggccctatt | 600 |
| tgacccccctg cttgtgggtgc tgctggctct tcaacttctt gtggtggctg gtctgggtgcg | 660 |
| ggctcagacc tgcccttctg tgtgctcctg cagcaaccag ttcagcaagg tgatttgtgt | 720 |
| tcggaaaaac ctgcgtgagg ttccggatgg catctccacc aacacacggc tgctgaacct | 780 |
| ccatgagaac caaatccaga tcatcaaagt gaacagcttc aagcacttga gacacttga | 840 |
| aatcctacag ttgagtagga accatatcag aaccattgaa attggggctt tcaatggctt | 900 |
| ggcgaacctc aacactctgg aactcttga caatcgtctt actaccatcc cgaatggagc | 960 |
| ttttgtatac ttgtctaaac tgaaggagct ctggttgca aacaacccca ttgaaagcat | 1020 |
| cccttcttat gcttttaaca gaattccttc tttgcgccga ctgacttag gggaattgaa | 1080 |
| aagactttca tacatctcag aagggtgcctt tgaaggctg tccaacttga ggtatttga | 1140 |
| ccttgccatg tgcaaccttc gggaaatccc taacctcaca ccgctcataa aactagatga | 1200 |
| gctggatctt tctgggaatc atttatctgc catcaggcct ggctctttcc agggtttgat | 1260 |
| gcacctcaa aaactgtgga tgatacagtc ccagattcaa gtgattgaac ggaatgcctt | 1320 |
| tgacaacctt cagtcactag tggagatcaa cctggcacac aataatctaa cattactgcc | 1380 |
| tcatgacctc ttactcctt tgcacatct agagcggata catttacatc acaaccttg | 1440 |
| gaactgtaac tgtgacatac tgtggctcag ctggtggata aaagacatgg cccctcga | 1500 |
| cacagcttgt tgtgcccggt gtaacactcc tccaatcta aaggggaggt acattggaga | 1560 |
| gctcgaccag aattacttca catgctatgc tccggtgatt gtggagcccc ctgcagacct | 1620 |
| caatgtcact gaaggcatgg cagctgagct gaaatgtcgg gcctccacat ccctgacatc | 1680 |
| tgtatcttgg attactccaa atggaacagt catgacacat ggggcgtaca aagtgcggat | 1740 |
| agctgtgctc agtgatggta cgttaaattt cacaaatgta actgtgcaag atacaggcat | 1800 |
| gtacacatgt atgggtgagta attccgttgg gaatactact gcttcagcca ccctgaatgt | 1860 |
| tactgcagca accactactc ctttcttta ctttcaacc gtcacagtag agactatgga | 1920 |
| accgtctcag gatgaggcac ggaccacaga taacaatgtg ggtcccactc cagtggtcga | 1980 |

```

ctgggagacc accaatgtga ccacctctct cacaccacag agcacaaggt cgacagagaa      2040
aaccttcacc atcccagtga ctgatataaa cagtgggatc ccaggaattg atgaggtcat      2100
gaagactacc aaaatcatca ttgggtgttt tgtggccatc aactcatgg ctgcagtgat      2160
gctggtcatt ttctacaaga tgaggaagca gcaccatcgg caaaaccatc acgccccaac      2220
aaggactgtt gaaattatta atgtggatga tgagattacg ggagacacac ccatggaaag      2280
ccacctgccc atgcctgcta tcgagcatga gcacctaaat cactataact catacaaac      2340
tcccttcaac cacacaacaa cagttaacac aataaattca atacacagtt cagtgcattga      2400
accgttattg atccgaatga actctaaaga caatgtacaa gagactcaaa tctaaaacat      2460
ttacagagtt acaaaaaaca aacaatcaaa aaaaaagaca gtttattaa aatgacacaa      2520
atgactgggc taaatctact gtttcaaaaa agtgtcttta caaaaaaca aaaaagaaaa      2580
gaaatttatt tattaanaat tctattgtga tctaaagcag acaaaa      2626

```

```

<210> 6
<211> 640
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> 包含富含白胺酸重複序列之蛋白質 4C 前驅物

```

```

<400> 6

```

```

Met Leu Asn Lys Met Thr Leu His Pro Gln Gln Ile Met Ile Gly Pro
1           5           10          15

Arg Phe Asn Arg Ala Leu Phe Asp Pro Leu Leu Val Val Leu Leu Ala
          20           25           30

Leu Gln Leu Leu Val Val Ala Gly Leu Val Arg Ala Gln Thr Cys Pro
          35           40           45

Ser Val Cys Ser Cys Ser Asn Gln Phe Ser Lys Val Ile Cys Val Arg
          50           55           60

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

Leu Asn Leu His Glu Asn Gln Ile Gln Ile Ile Lys Val Asn Ser Phe
          85           90           95

```

Lys His Leu Arg His Leu Glu Ile Leu Gln Leu Ser Arg Asn His Ile
 100 105 110

Arg Thr Ile Glu Ile Gly Ala Phe Asn Gly Leu Ala Asn Leu Asn Thr
 115 120 125

Leu Glu Leu Phe Asp Asn Arg Leu Thr Thr Ile Pro Asn Gly Ala Phe
 130 135 140

Val Tyr Leu Ser Lys Leu Lys Glu Leu Trp Leu Arg Asn Asn Pro Ile
 145 150 155 160

Glu Ser Ile Pro Ser Tyr Ala Phe Asn Arg Ile Pro Ser Leu Arg Arg
 165 170 175

Leu Asp Leu Gly Glu Leu Lys Arg Leu Ser Tyr Ile Ser Glu Gly Ala
 180 185 190

Phe Glu Gly Leu Ser Asn Leu Arg Tyr Leu Asn Leu Ala Met Cys Asn
 195 200 205

Leu Arg Glu Ile Pro Asn Leu Thr Pro Leu Ile Lys Leu Asp Glu Leu
 210 215 220

Asp Leu Ser Gly Asn His Leu Ser Ala Ile Arg Pro Gly Ser Phe Gln
 225 230 235 240

Gly Leu Met His Leu Gln Lys Leu Trp Met Ile Gln Ser Gln Ile Gln
 245 250 255

Val Ile Glu Arg Asn Ala Phe Asp Asn Leu Gln Ser Leu Val Glu Ile
 260 265 270

Asn Leu Ala His Asn Asn Leu Thr Leu Leu Pro His Asp Leu Phe Thr
 275 280 285

Pro Leu His His Leu Glu Arg Ile His Leu His His Asn Pro Trp Asn
 290 295 300

Cys Asn Cys Asp Ile Leu Trp Leu Ser Trp Trp Ile Lys Asp Met Ala
 305 310 315 320

Pro Ser Asn Thr Ala Cys Cys Ala Arg Cys Asn Thr Pro Pro Asn Leu

Ala Pro Thr Arg Thr Val Glu Ile Ile Asn Val Asp Asp Glu Ile Thr
565 570 575

Gly Asp Thr Pro Met Glu Ser His Leu Pro Met Pro Ala Ile Glu His
580 585 590

Glu His Leu Asn His Tyr Asn Ser Tyr Lys Ser Pro Phe Asn His Thr
595 600 605

Thr Thr Val Asn Thr Ile Asn Ser Ile His Ser Ser Val His Glu Pro
610 615 620

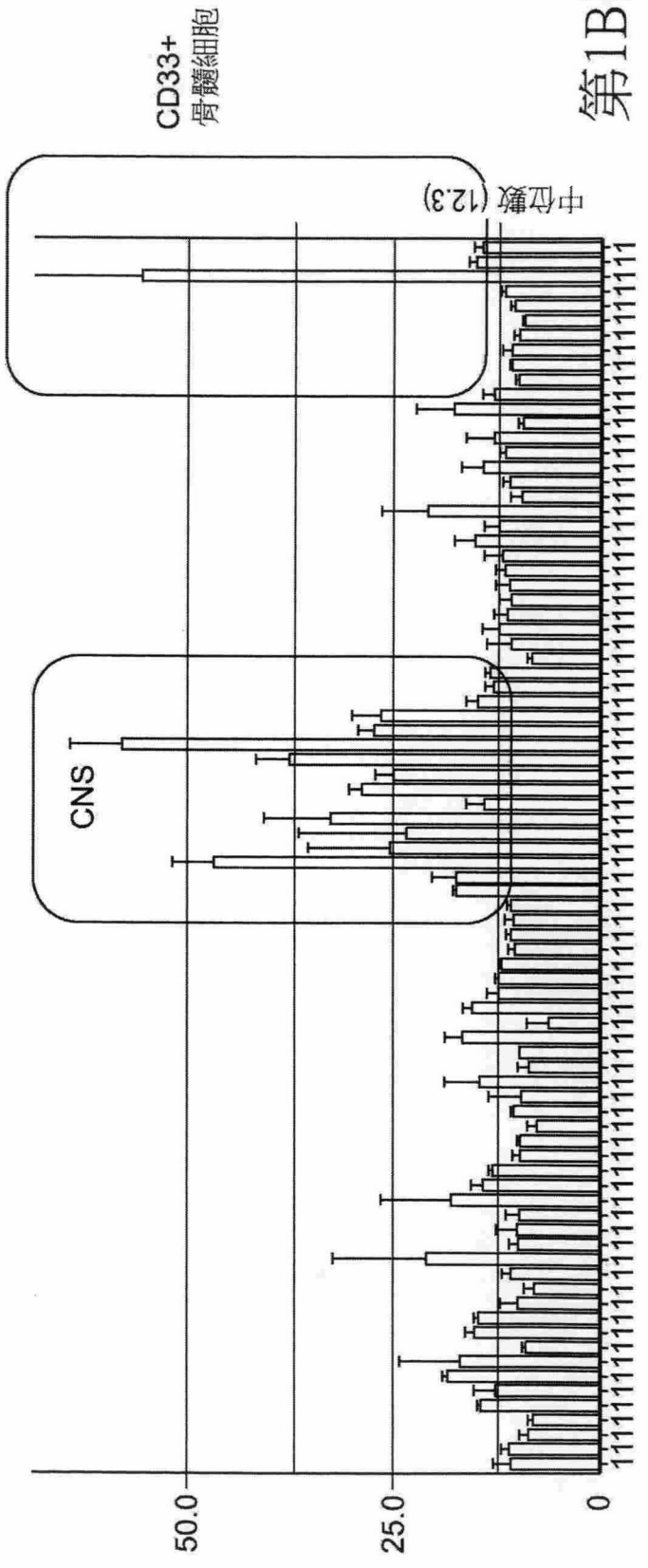
Leu Leu Ile Arg Met Asn Ser Lys Asp Asn Val Gln Glu Thr Gln Ile
625 630 635 640

申請專利範圍

1. 一種 Siglec 15 之調節劑之用途，其用於製備針對有其需要之個體治療癌症之藥物，其中該調節劑係降低該個體之 Siglec 15 之表現及/或活性，其中該調節劑包含 Siglec 15 之拮抗劑抗體或其抗原結合片段，其中該調節劑係阻斷 Siglec 15 與結合配體間之相互作用，以及其中該結合配體係選自由 MAG、LRRC4C 及 Sialyl-Tn 所組成之群組。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該調節劑縮減該個體中腫瘤大小。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該調節劑延長該個體存活期。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該調節劑增強該個體中對抗腫瘤之免疫反應。
5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之用途，其中該調節劑係降低 MAG、LRRC4C 或 Sialyl-Tn 之活性。
6. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之用途，其中該腫瘤或癌症係選自由腦癌、肺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、腎細胞癌、直腸腺癌、肝細胞癌、與 Ewing 氏肉瘤所成之組群。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該腦癌係神經膠母細胞瘤。
8. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之用途，其中該個體未罹患進行中之自體免疫疾病。

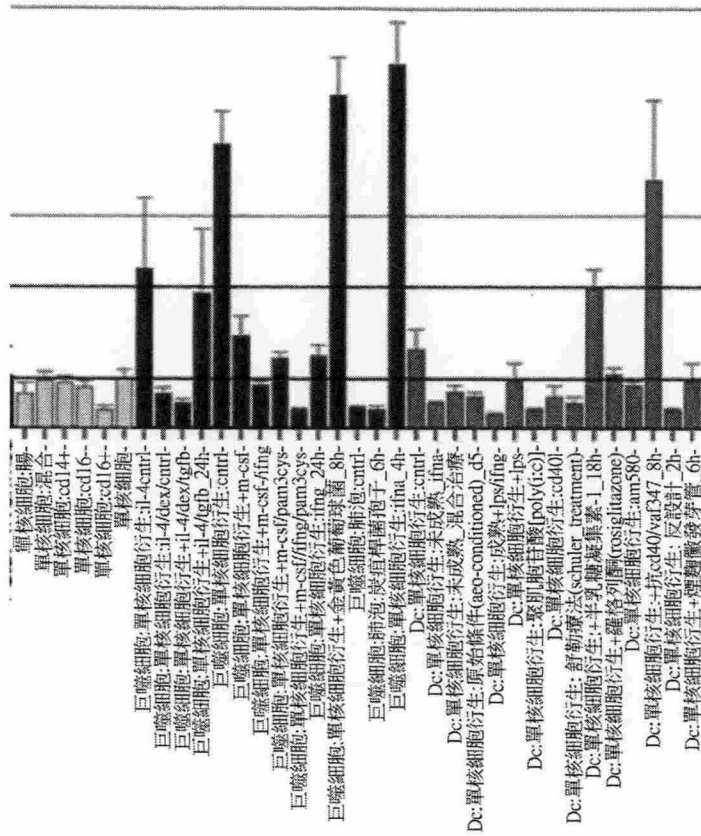
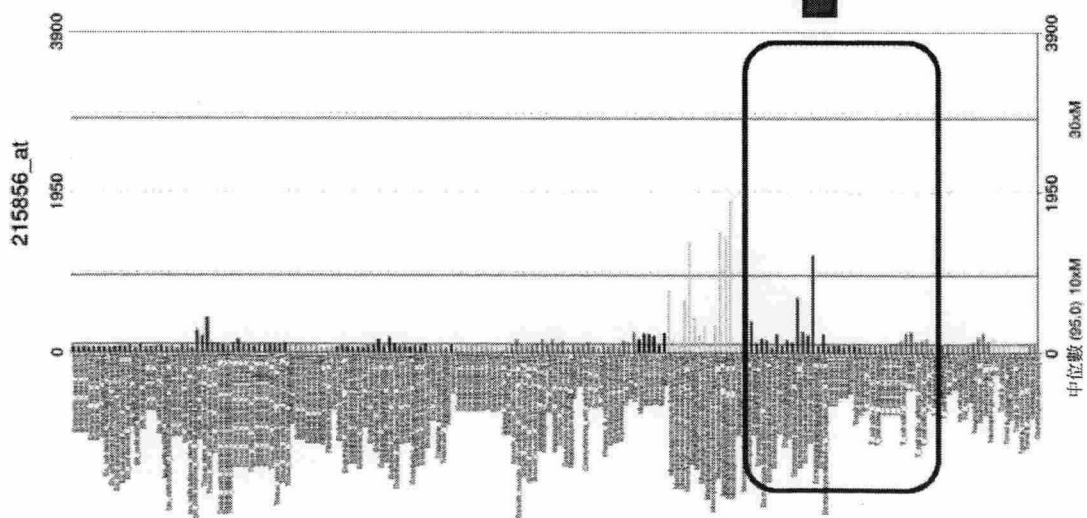


第1A圖

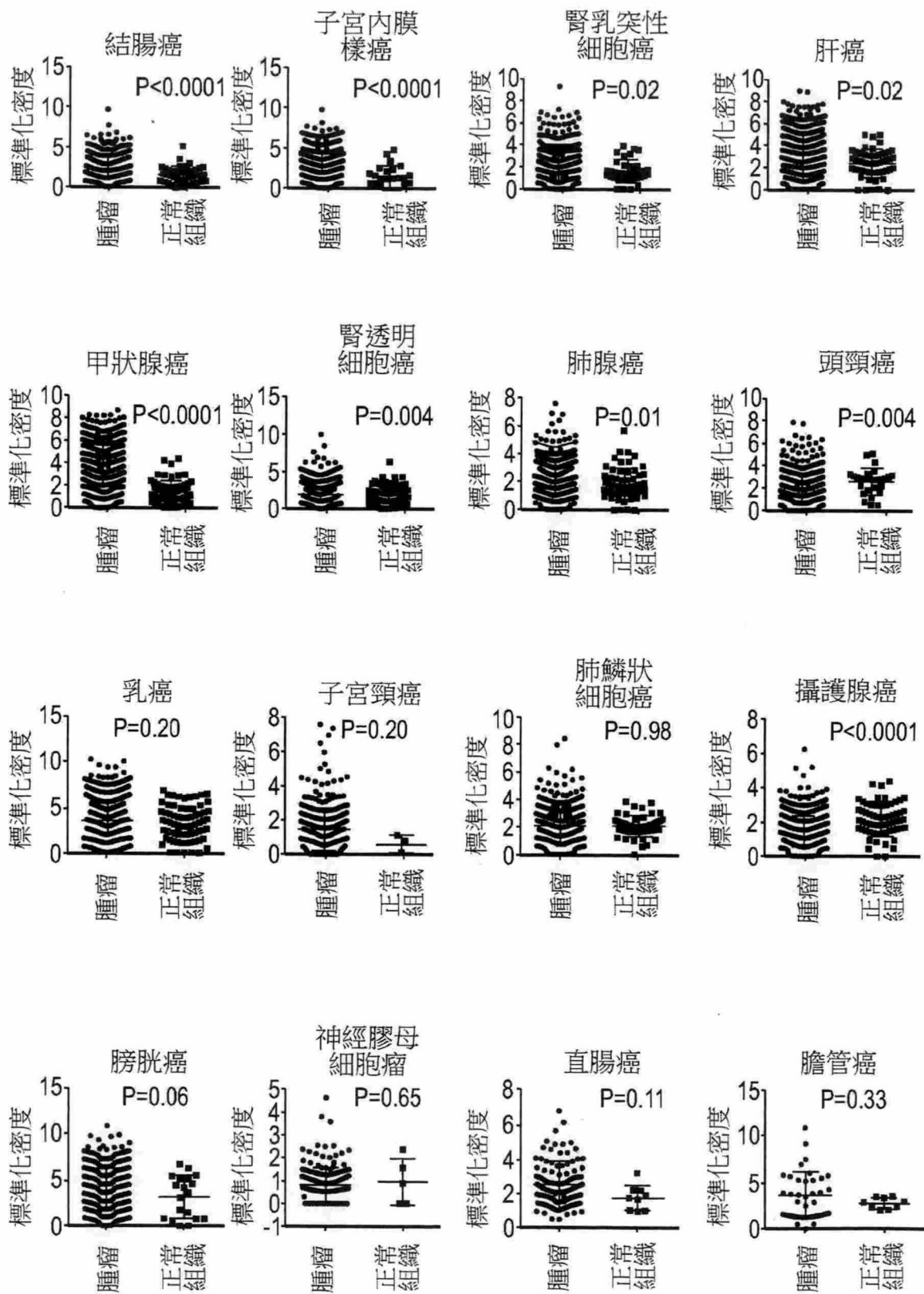


第1B圖

圖式



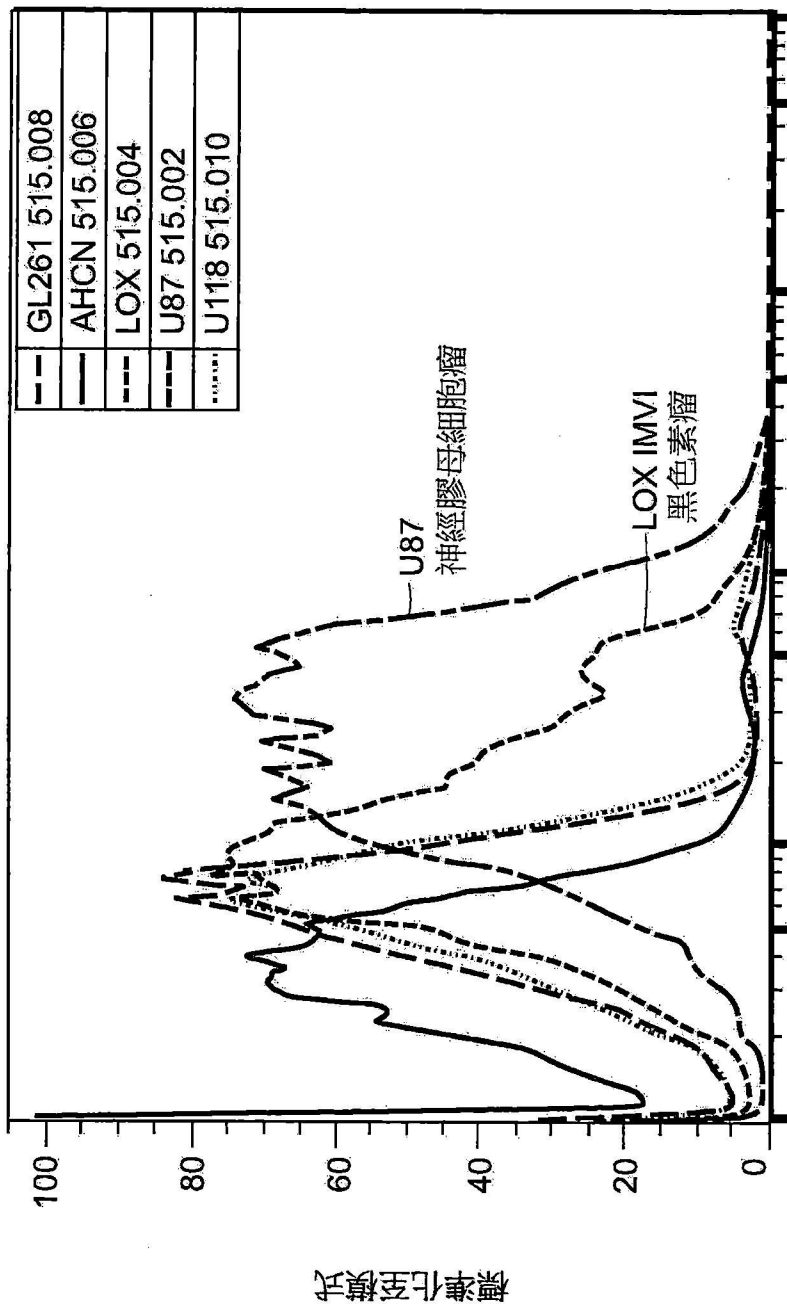
第1C圖



第2圖

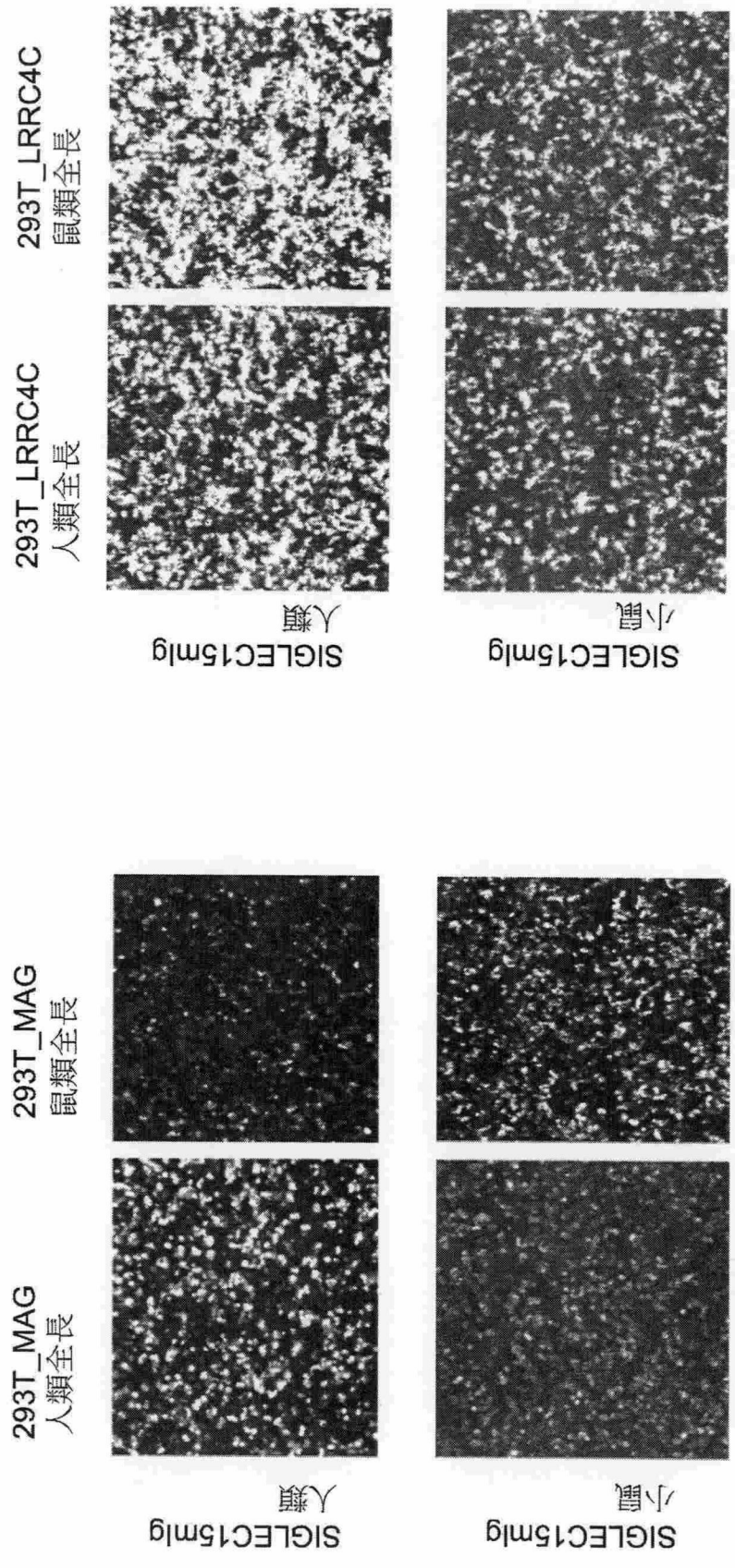
| 試樣 | SIGLEC15 | |
|-----------|----------|------------|
| LOX IMVI. | 1344.642 | 黑色素瘤 |
| U87.2 | 1116.777 | 原發性神經膠母細胞瘤 |
| U87.1 | 1087.439 | 原發性神經膠母細胞瘤 |
| GM1600.1 | 837.396 | 神經膠母細胞瘤 |
| ACHN.1 | 506.5 | 腎臟癌 |
| U118.1 | 369.835 | 神經膠質瘤 |
| U118.2 | 293.586 | 神經膠質瘤 |
| GM2493.1 | 180.846 | 神經膠母細胞瘤 |
| GM133.1 | 107.416 | 神經膠母細胞瘤 |
| UO31.1 | 53.705 | 腎臟癌 |
| TK10.1 | 27.825 | 腎臟癌 |
| HCT116.2 | 22.151 | 結腸癌 |
| CCRT CEM | 17.688 | T細胞淋巴瘤 |
| T24.1 | 16.655 | 膀胱癌 |
| SF295.1 | 15.581 | 膀胱癌 |
| GM97.1 | 15.372 | 神經膠母細胞瘤 |
| COLO205. | 15.022 | 結腸癌 |
| ALVA31.1 | 11.255 | 攝護腺癌 |
| HT29.1 | 11.176 | 結腸癌 |
| GM2345.1 | 11.121 | 類淋巴母細胞 |
| MCF7.1 | 10.009 | |
| ACC3.1 | 9.758 | |
| MOLT4.1 | 9.728 | |
| OVCAR3.1 | 9.669 | |
| SF539.1 | 9.275 | |
| CAKI1.1 | 9.27 | |
| HEK 293T. | 9.113 | |

第3A圖

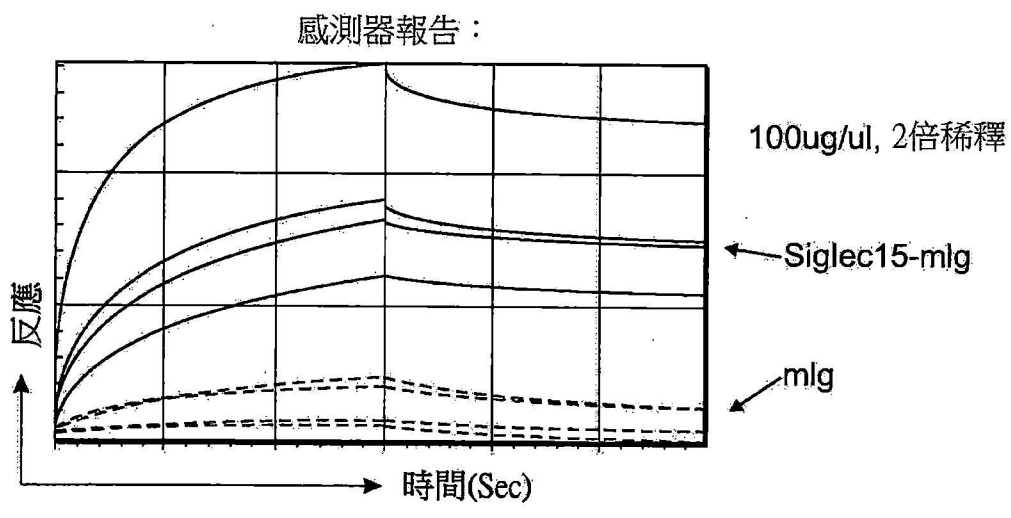


抗Siglec 15 (m03)

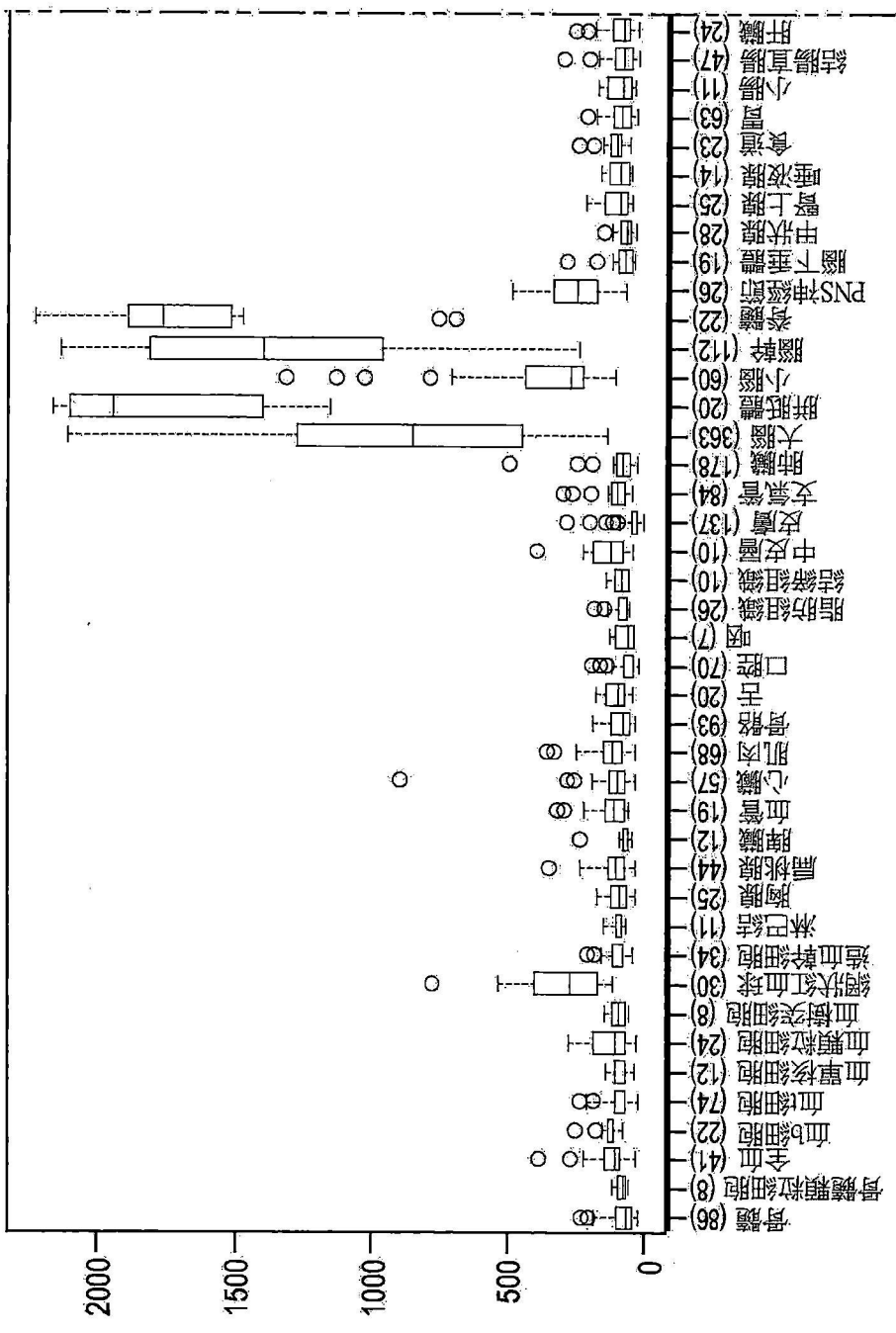
第3B圖



第4A圖

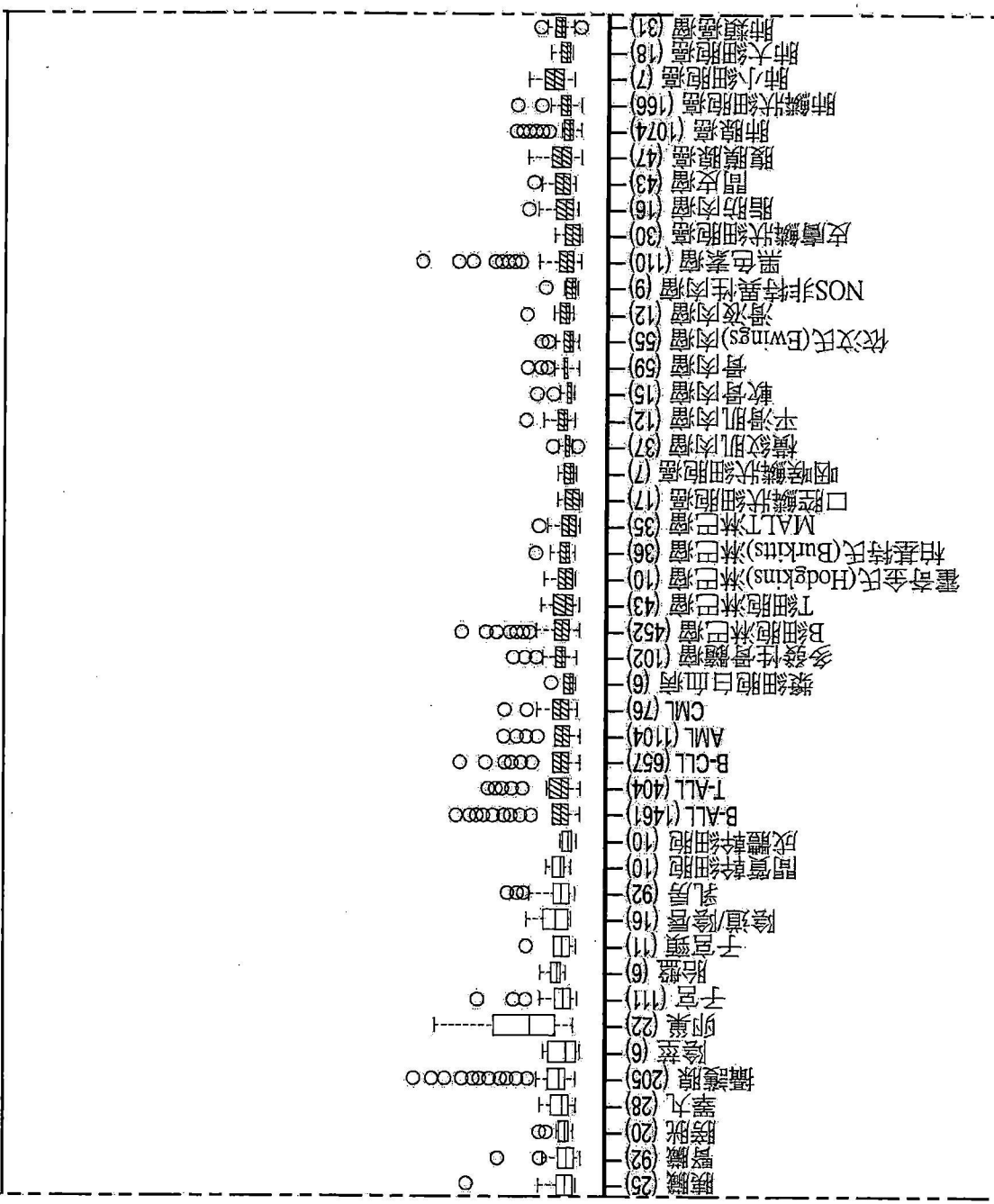


第4B圖

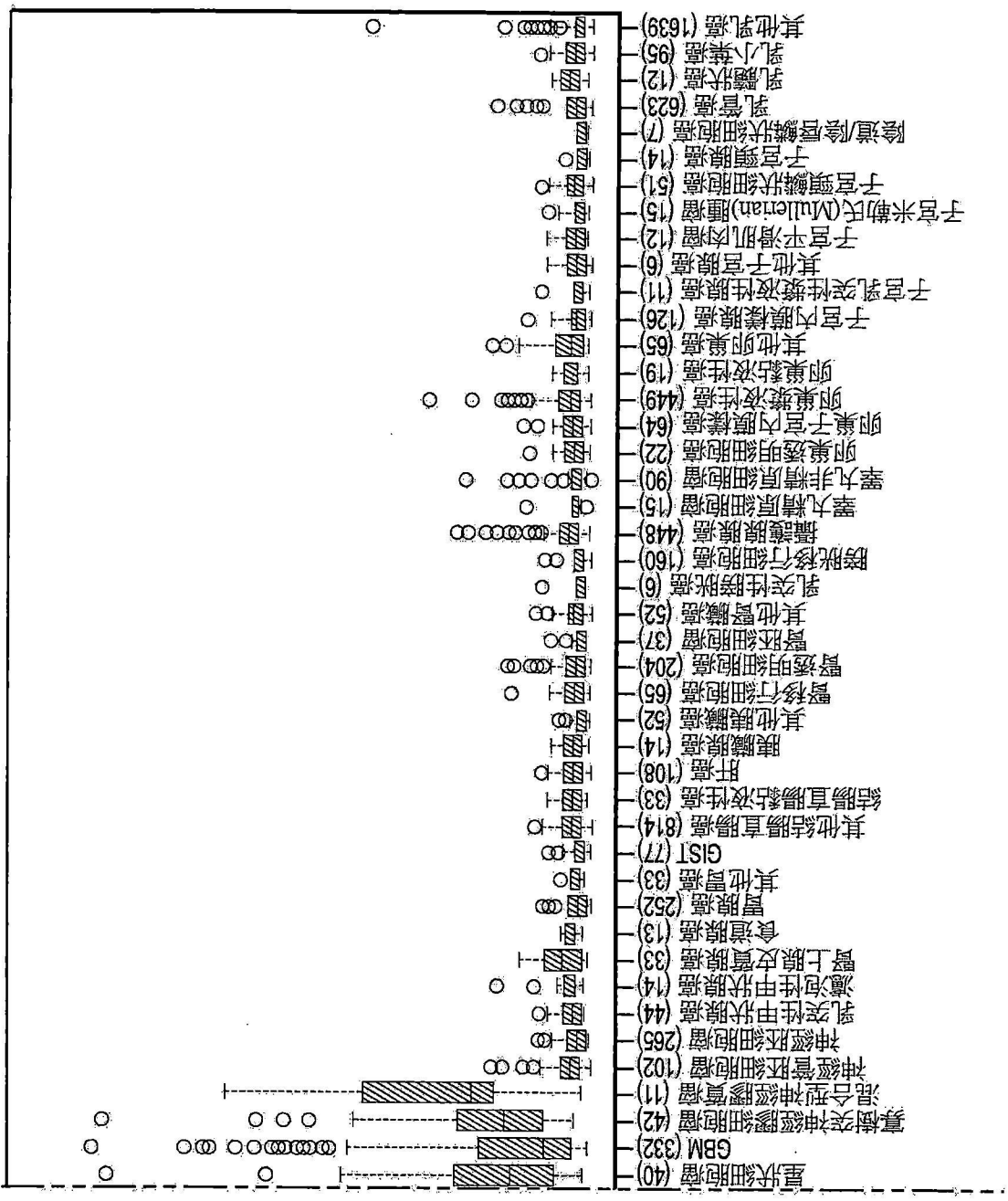


第5圖

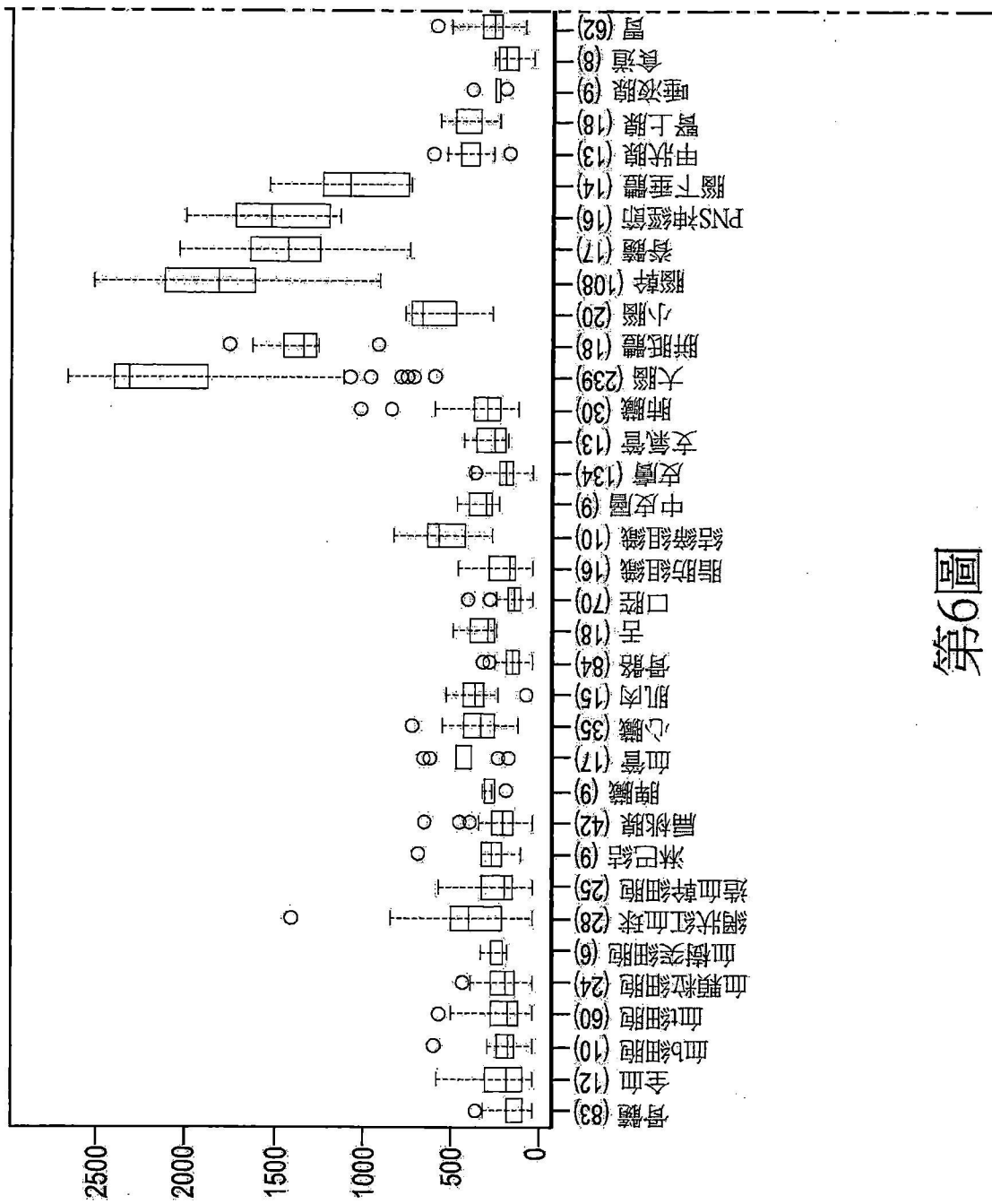
正常組織與癌症中之MAG mRNA MAG ENSG00000105695



第5圖(續)

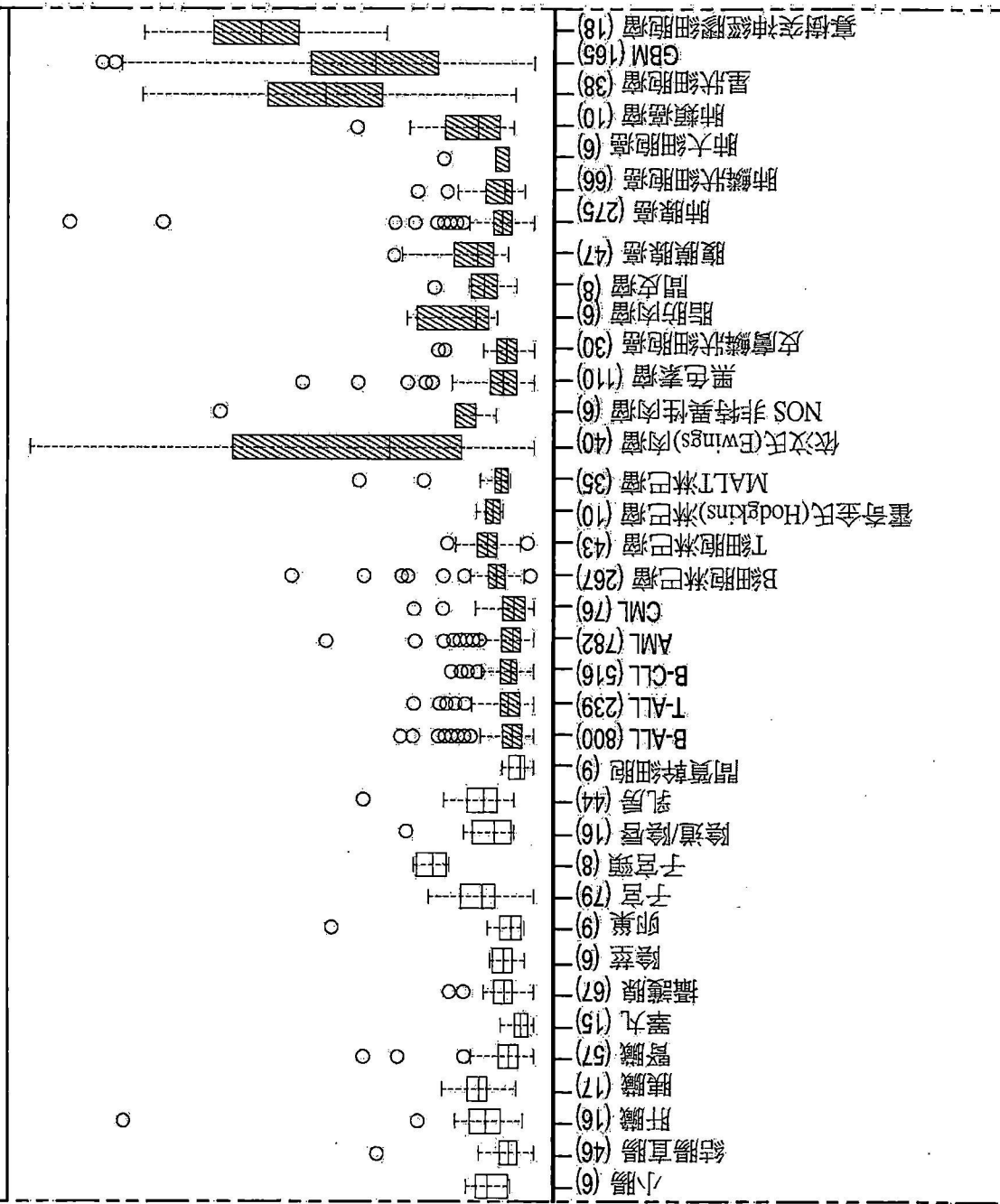


第5圖(續)

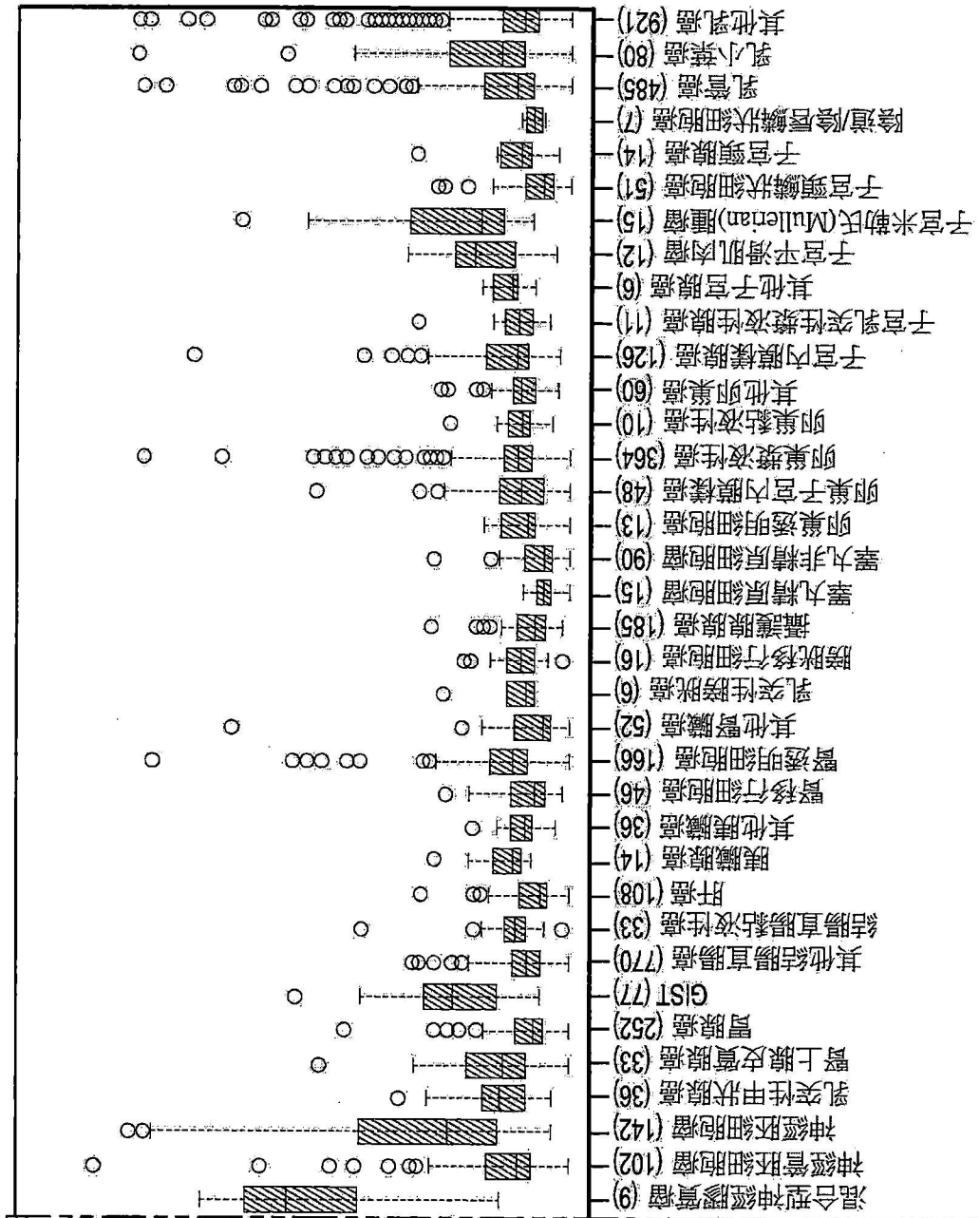


第6圖

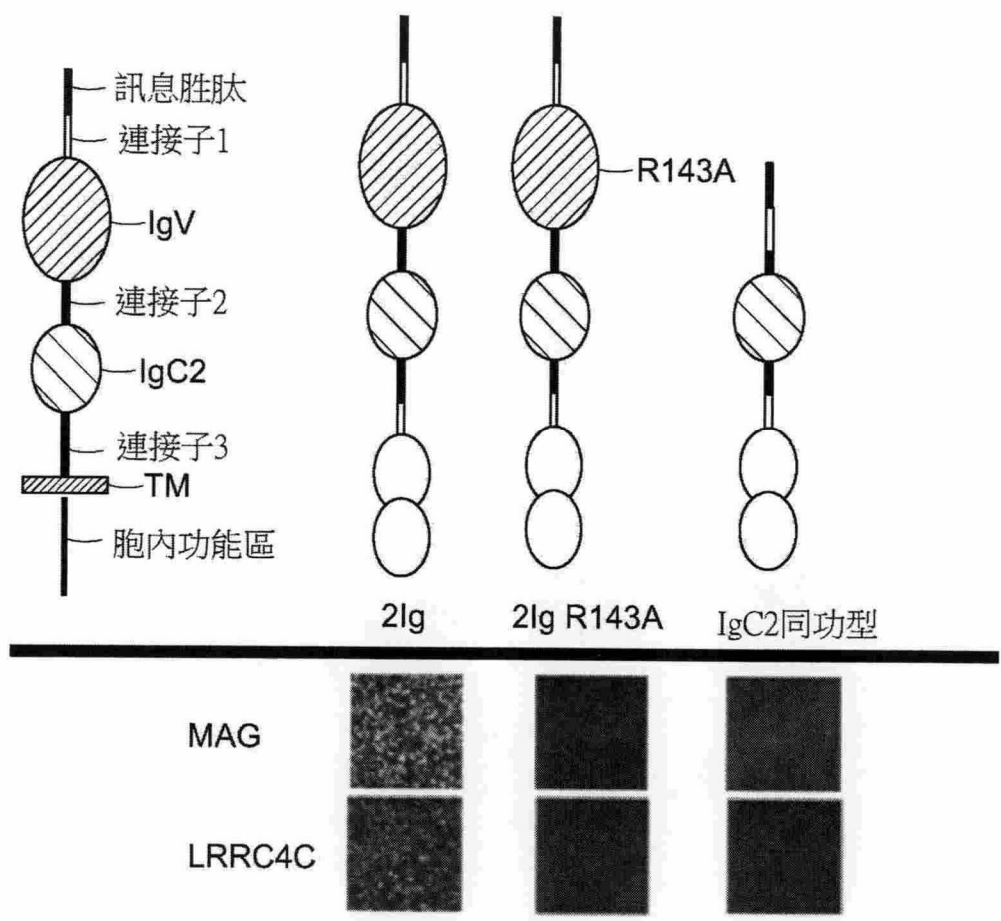
正常組織與癌症中之LRRC4C mRNA LRRC4C ENSG00000148948



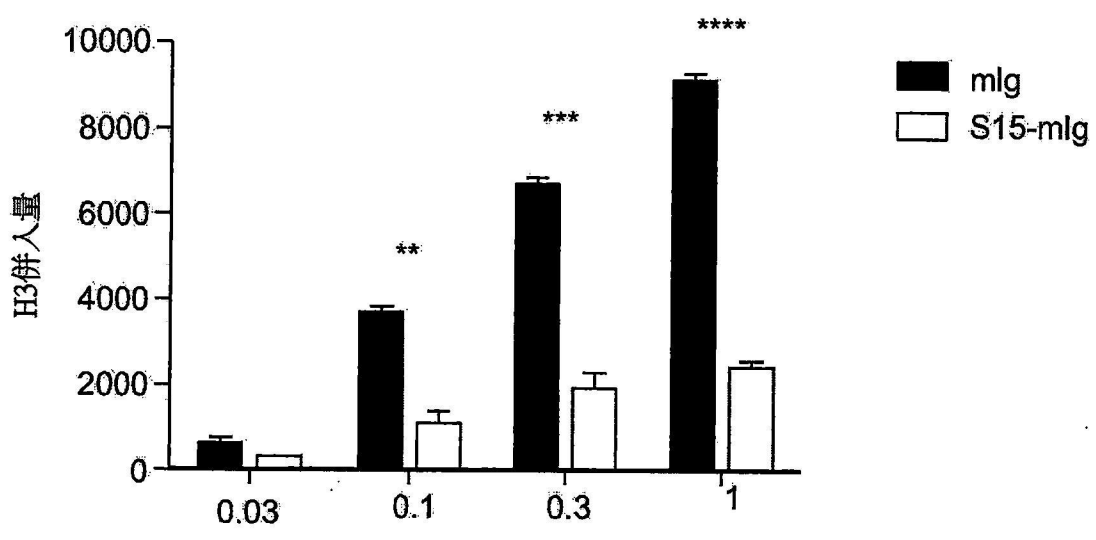
第6圖(續)



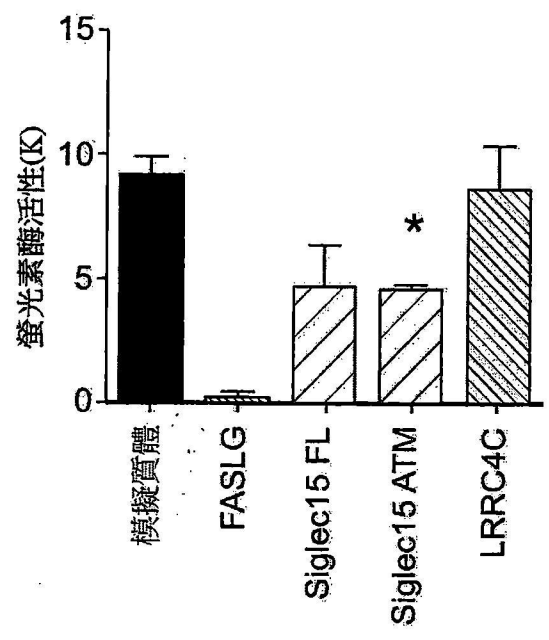
第9圖(續)



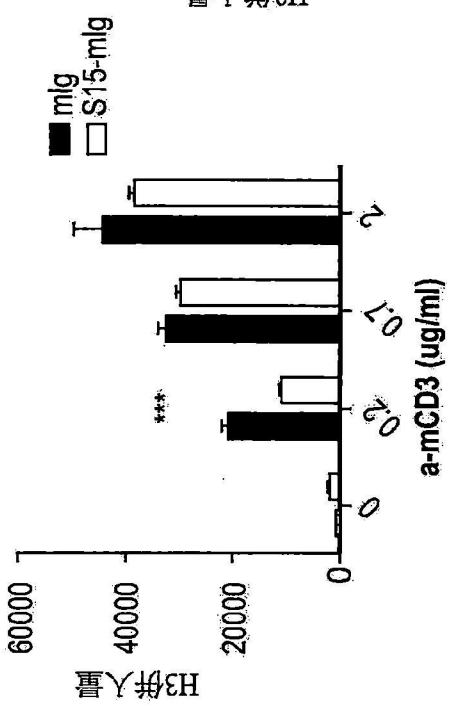
第7圖



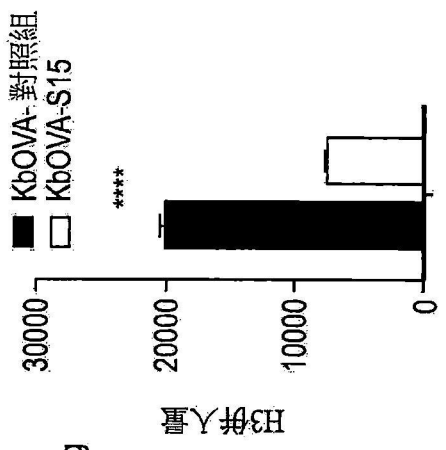
第8A圖



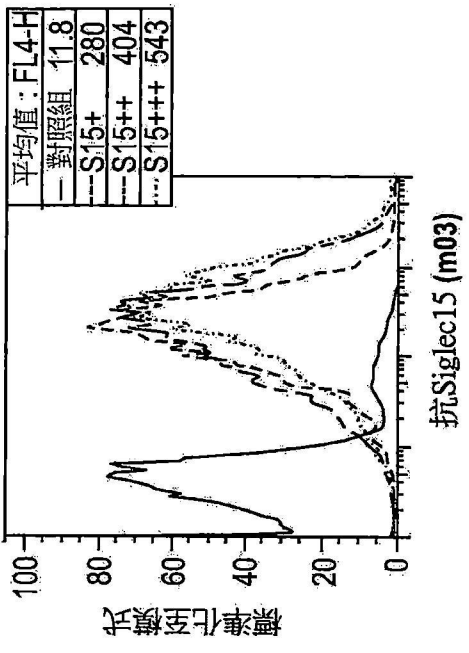
第8B圖



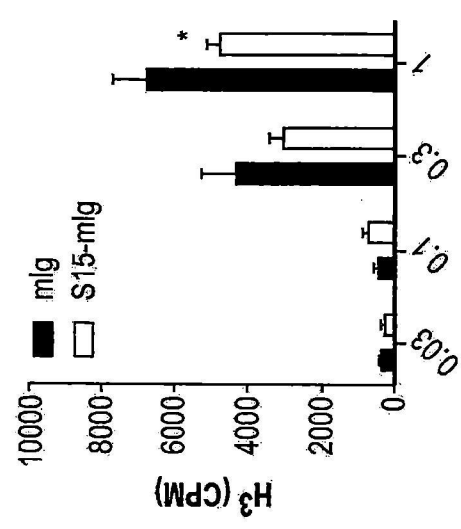
第9A圖



第9C圖

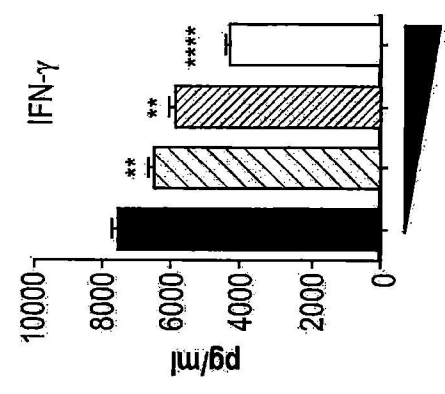


第9D圖

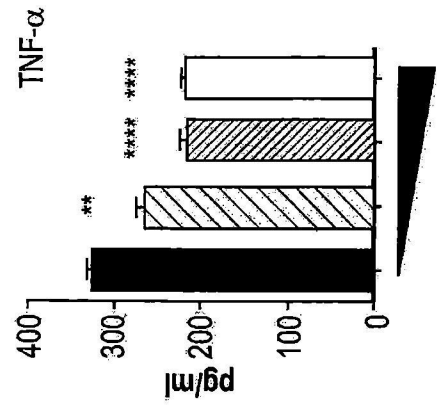


被覆之抗CD3 (ug/ml)

第9B圖

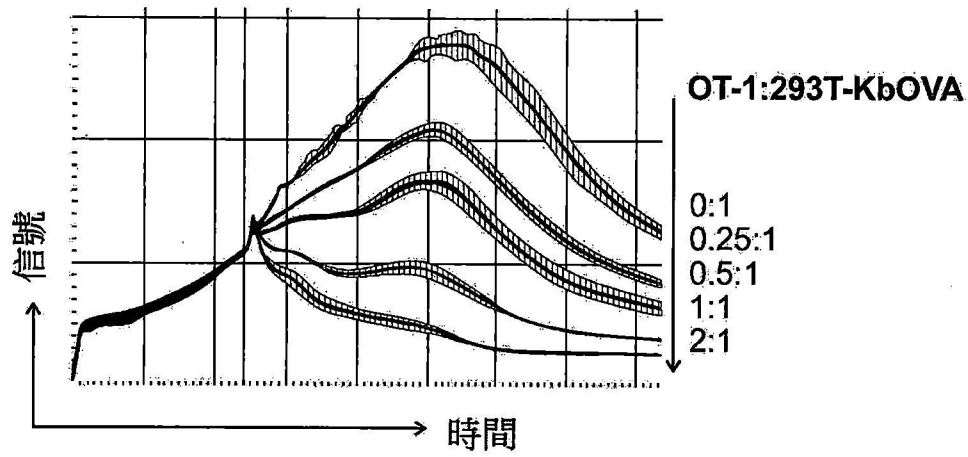


第9E圖

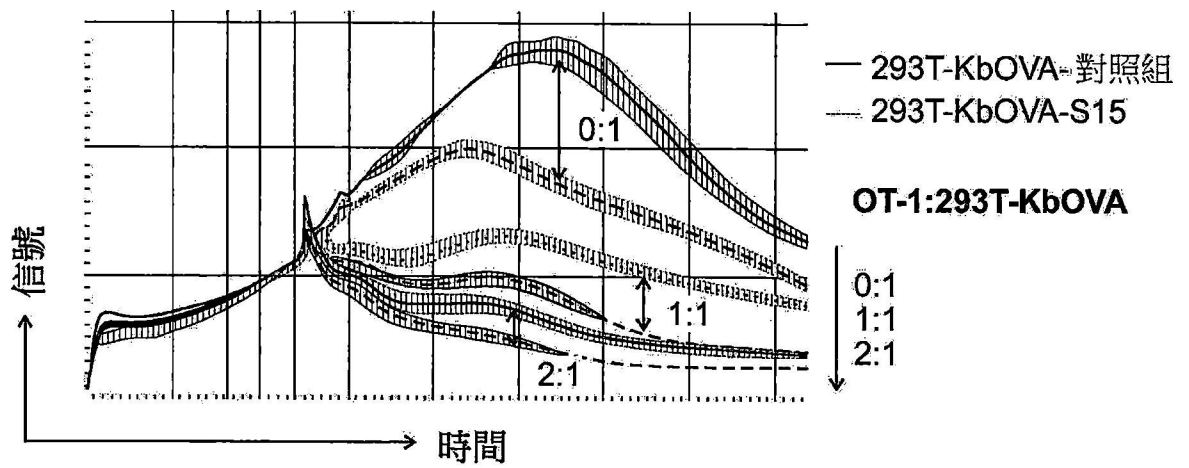


Siglec15 表現

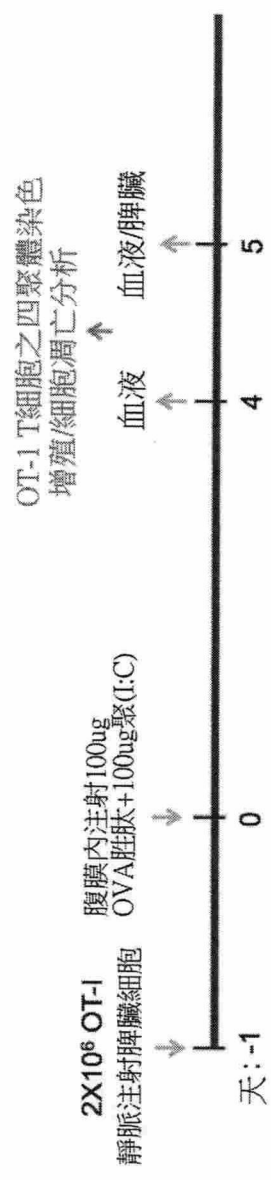
第9F圖



第10A圖

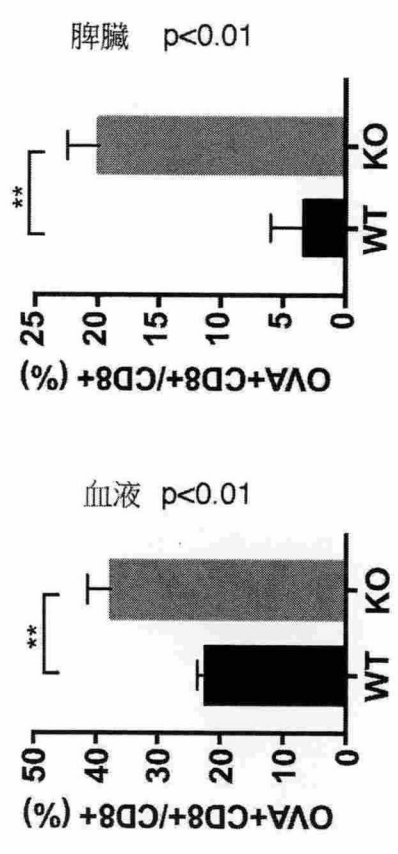


第10B圖

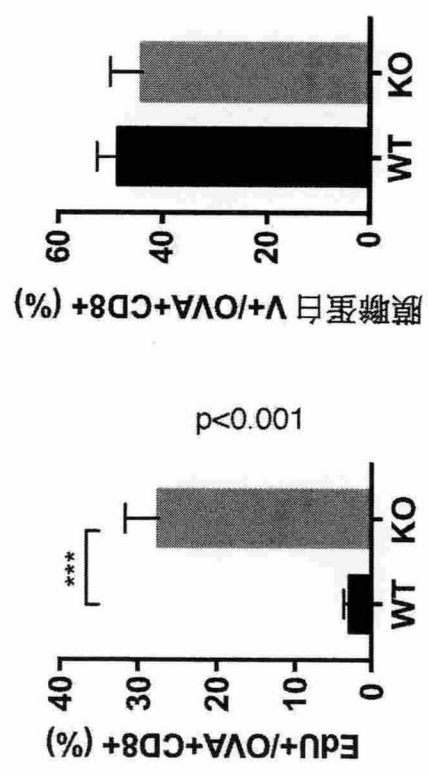


第11A圖

第11B圖

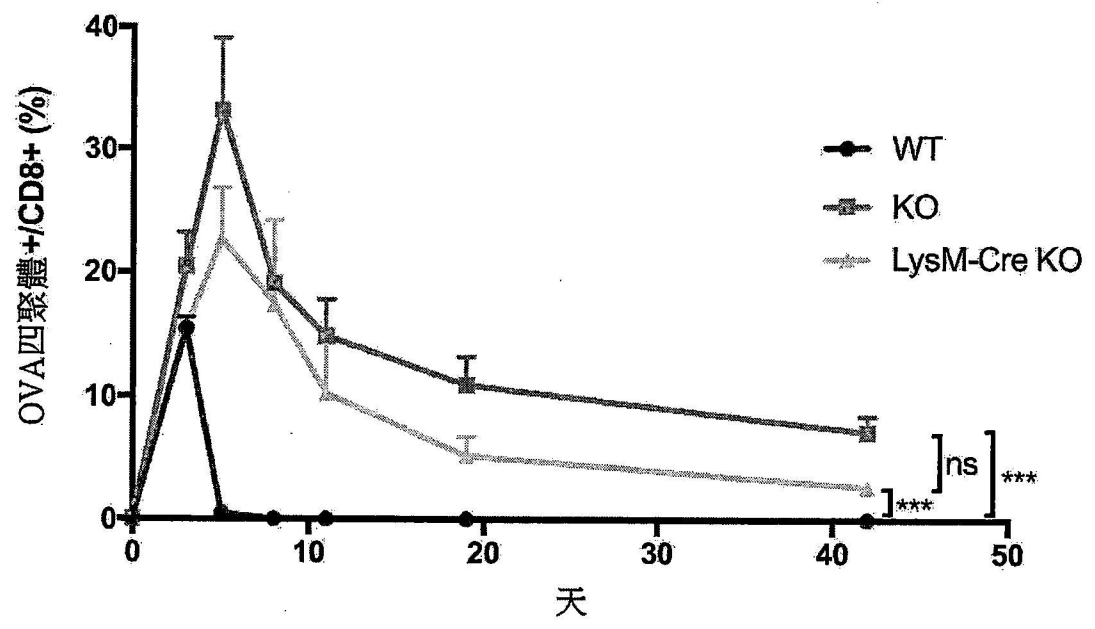


第11D圖

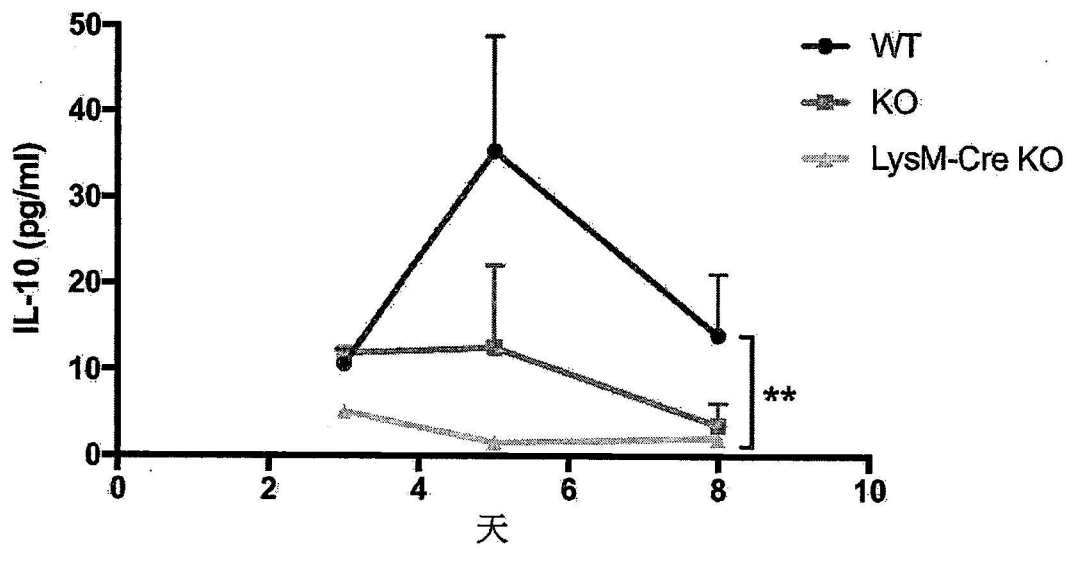


第11C圖

血液中之OT-I T細胞

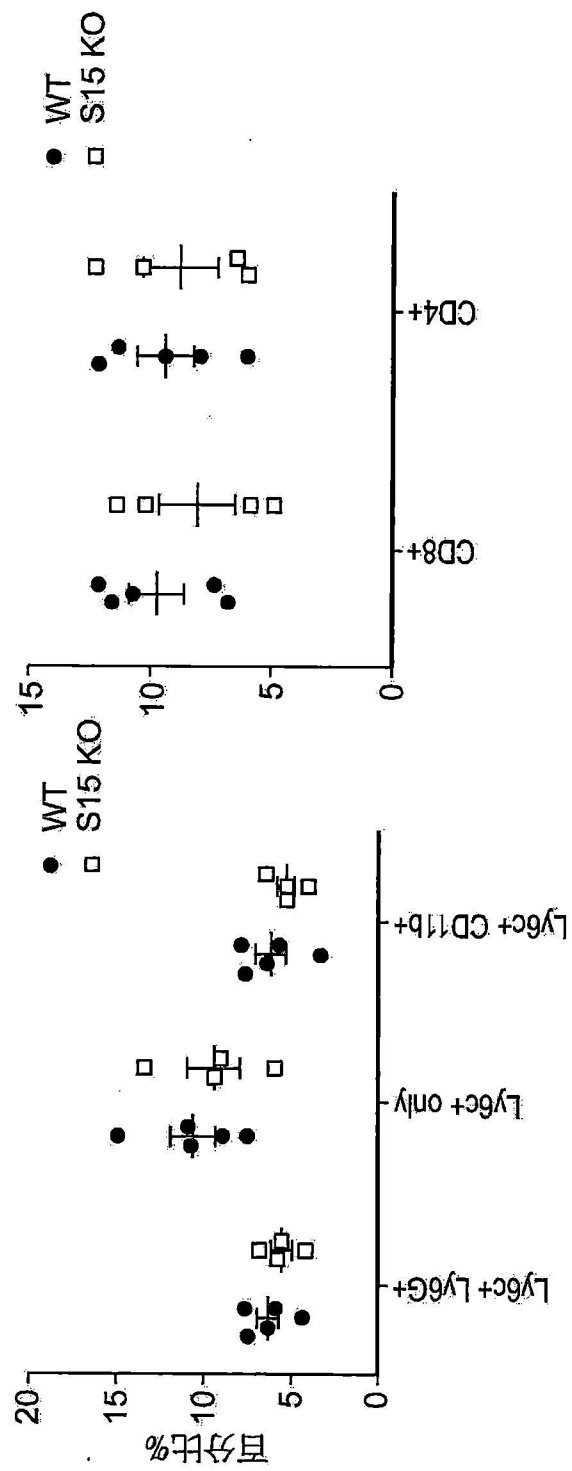


第12A圖

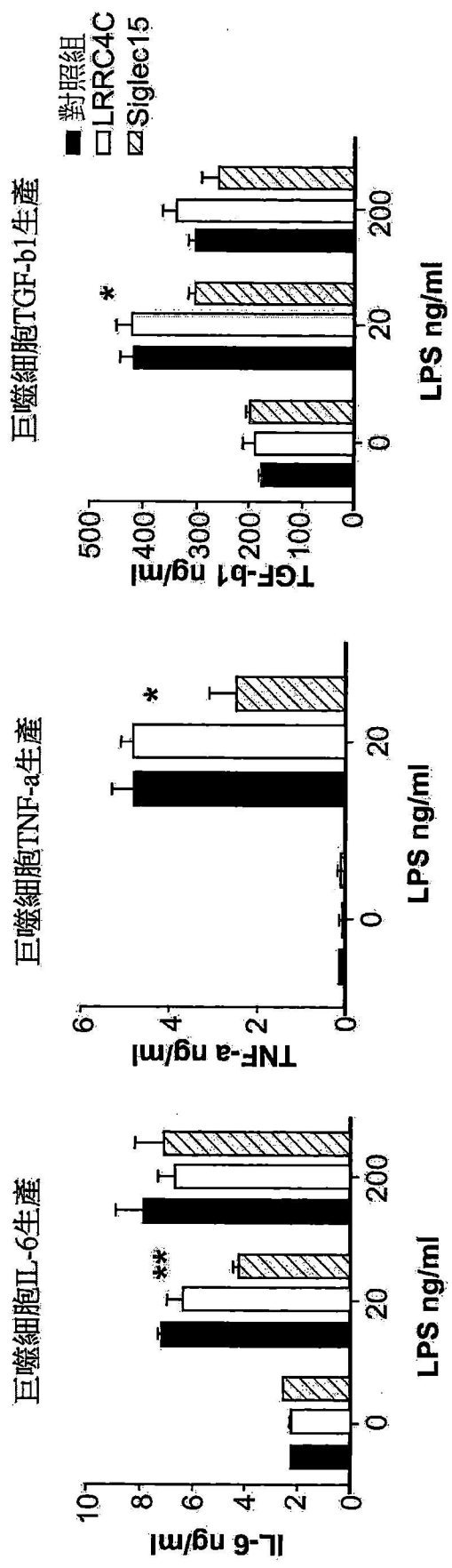


WT: 野生型之同窩出生者
KO: 全身性Siglec15 KO
LysM-Cre KO: 骨髓細胞特異性Siglec15 KO

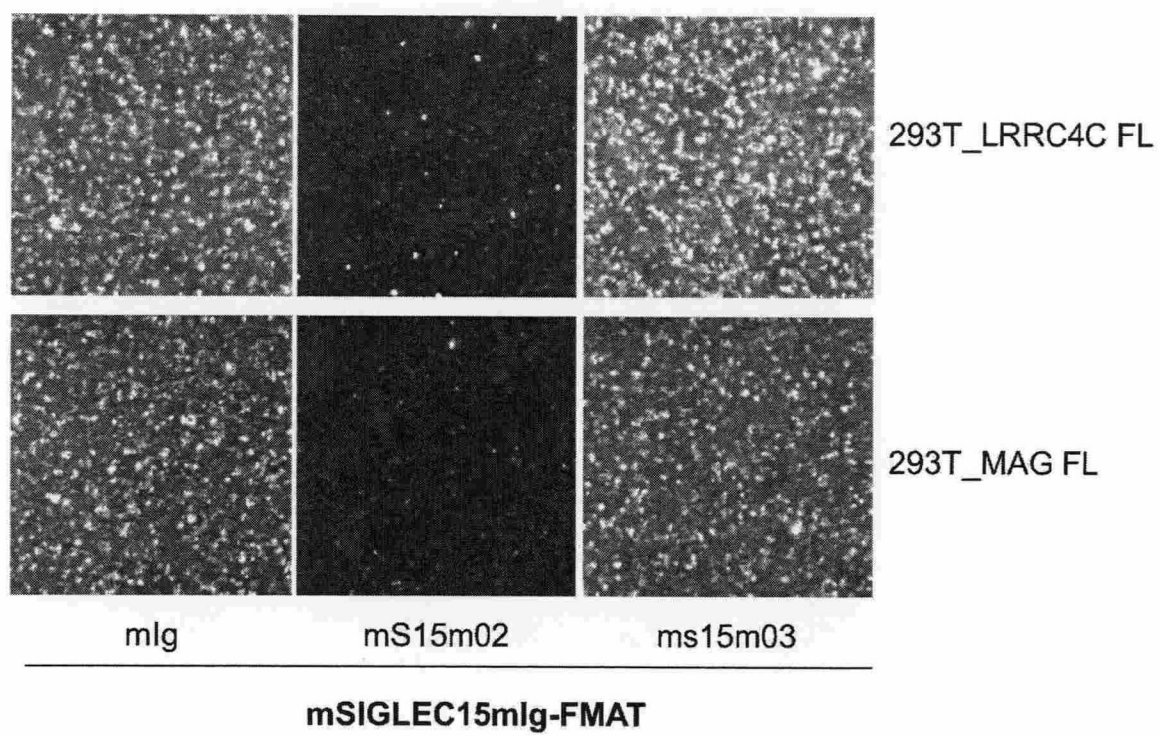
第12B圖



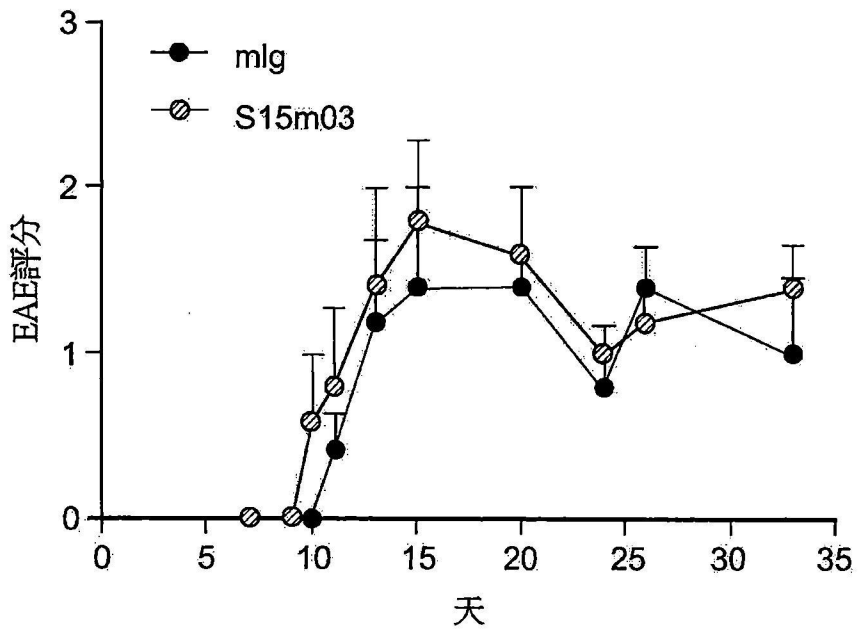
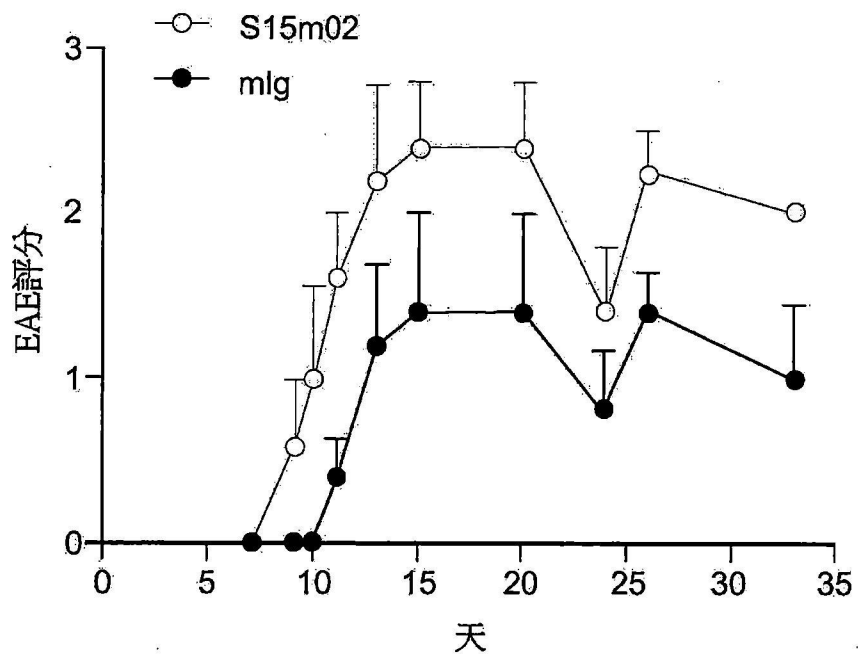
第13圖



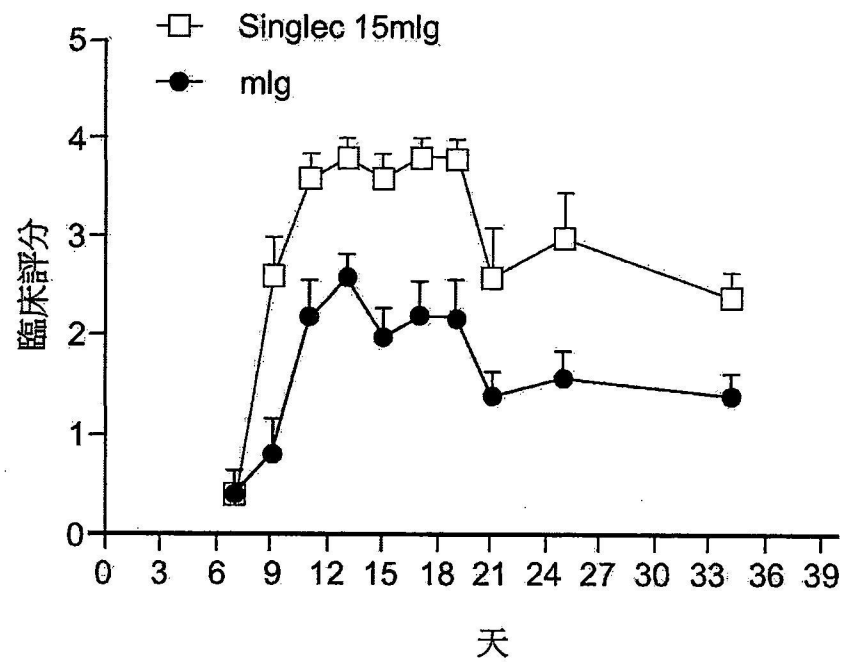
第14圖



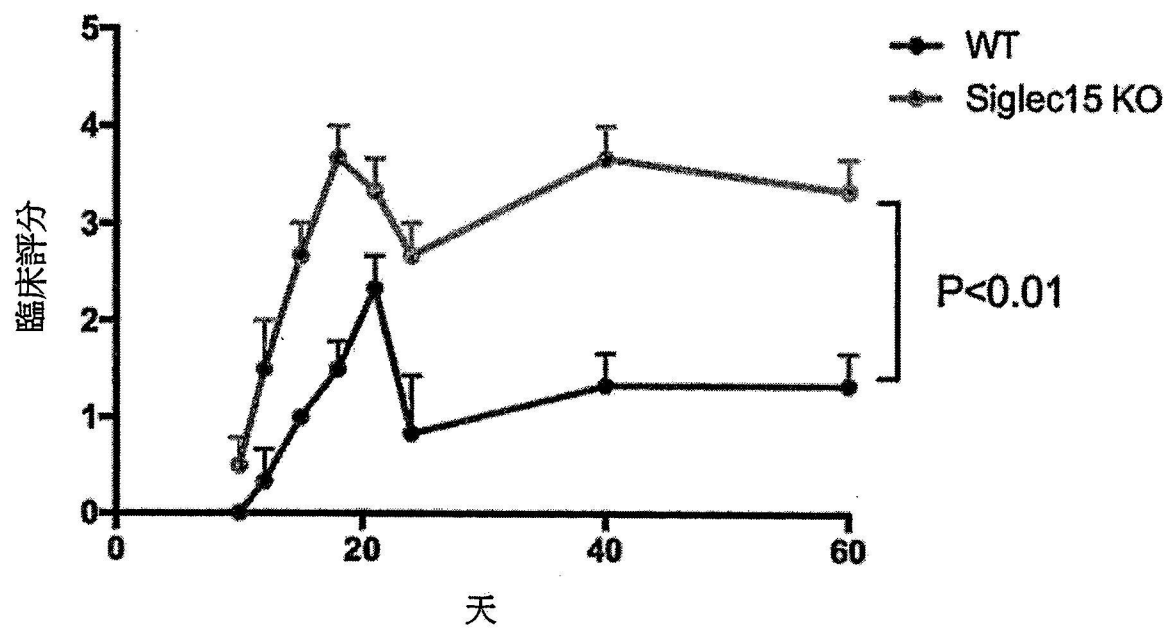
第15圖



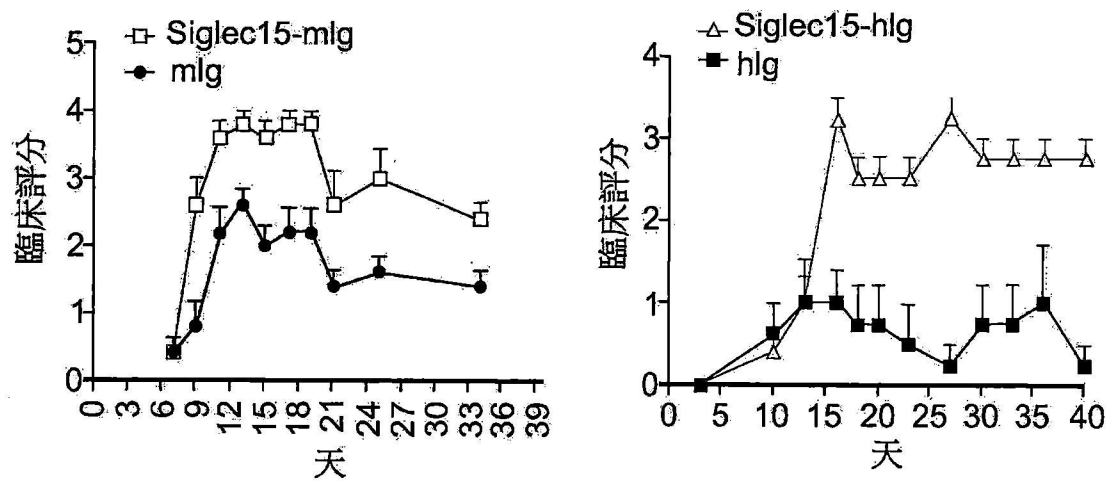
第16圖



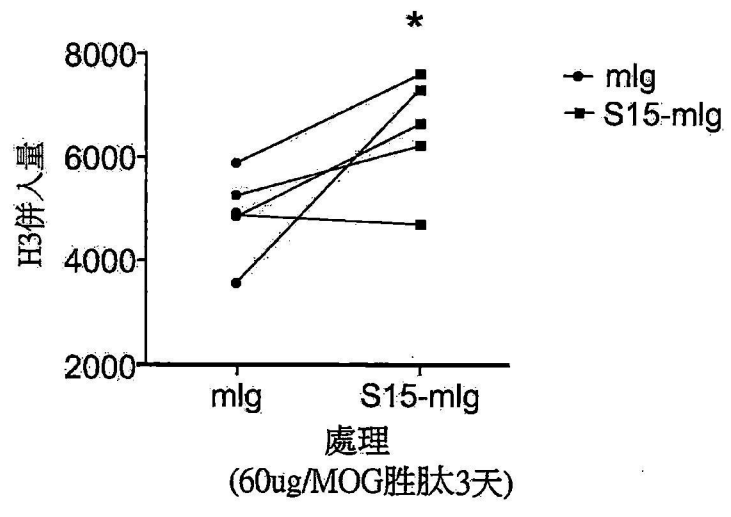
第17圖



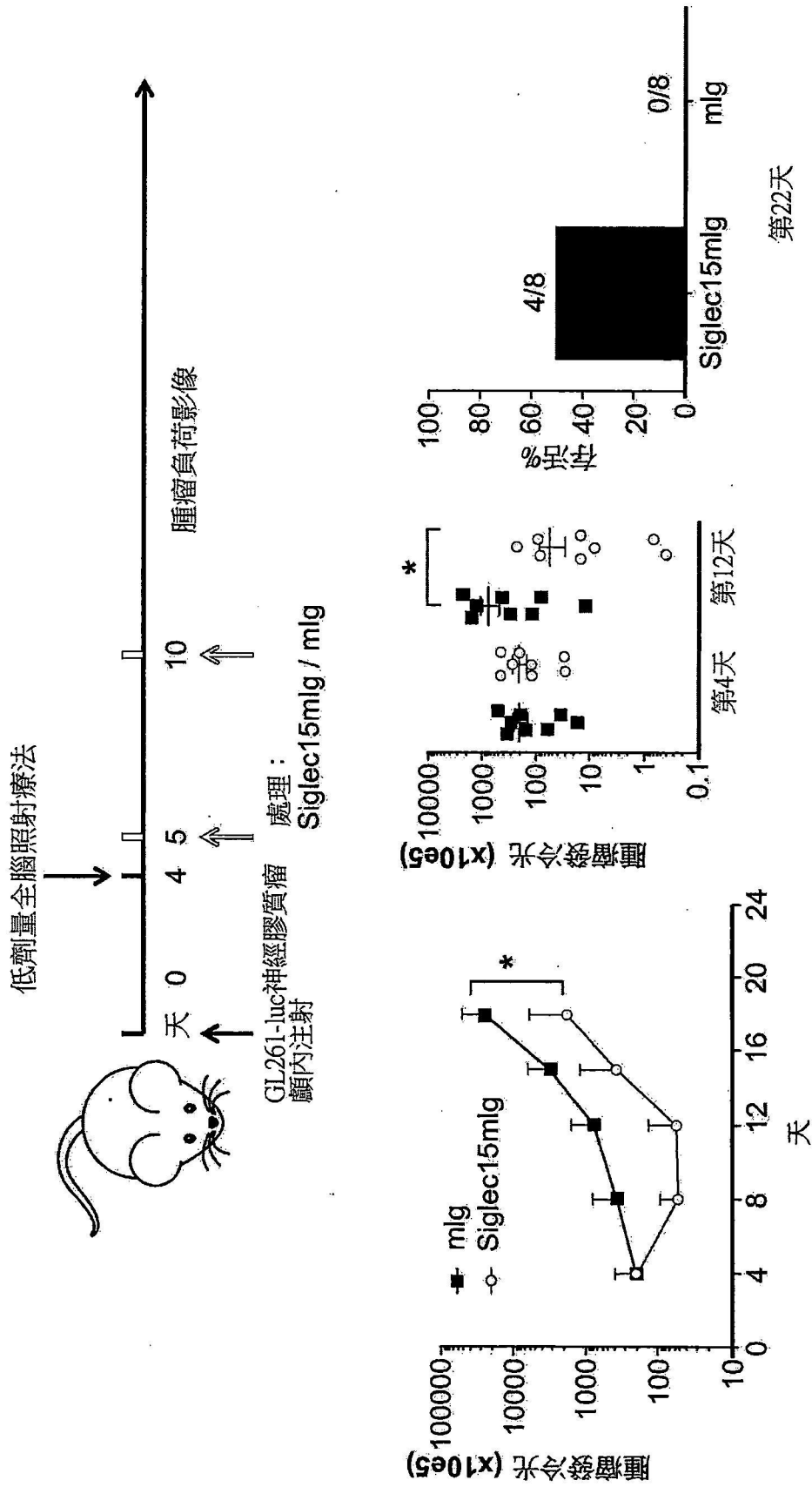
第18圖



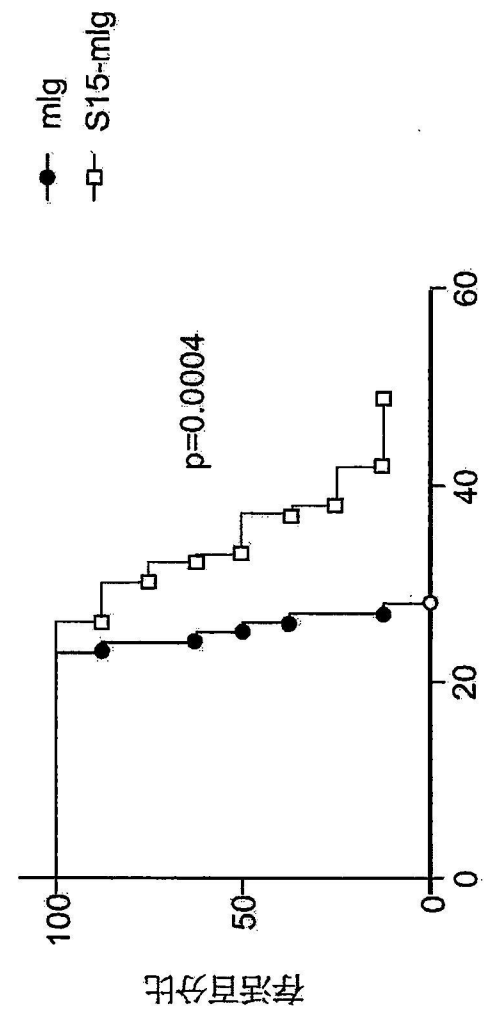
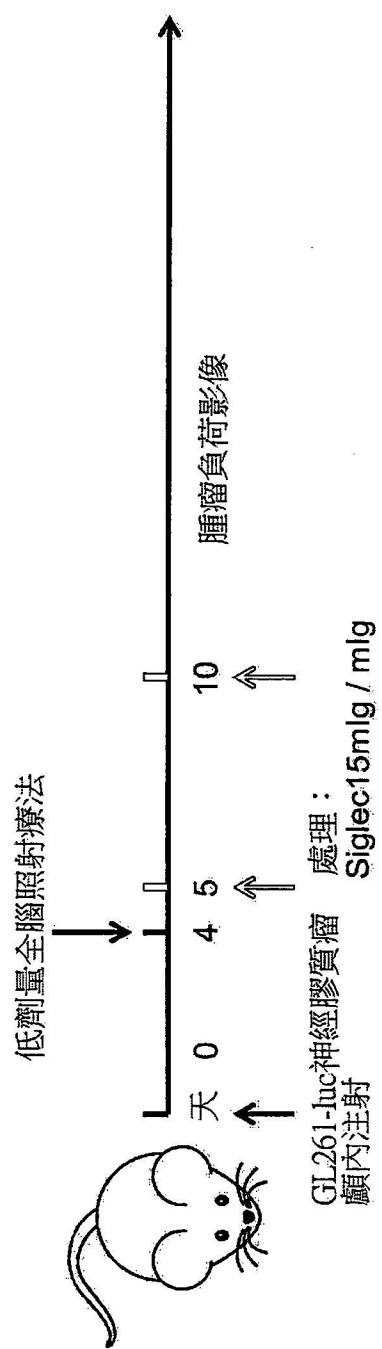
第19A圖



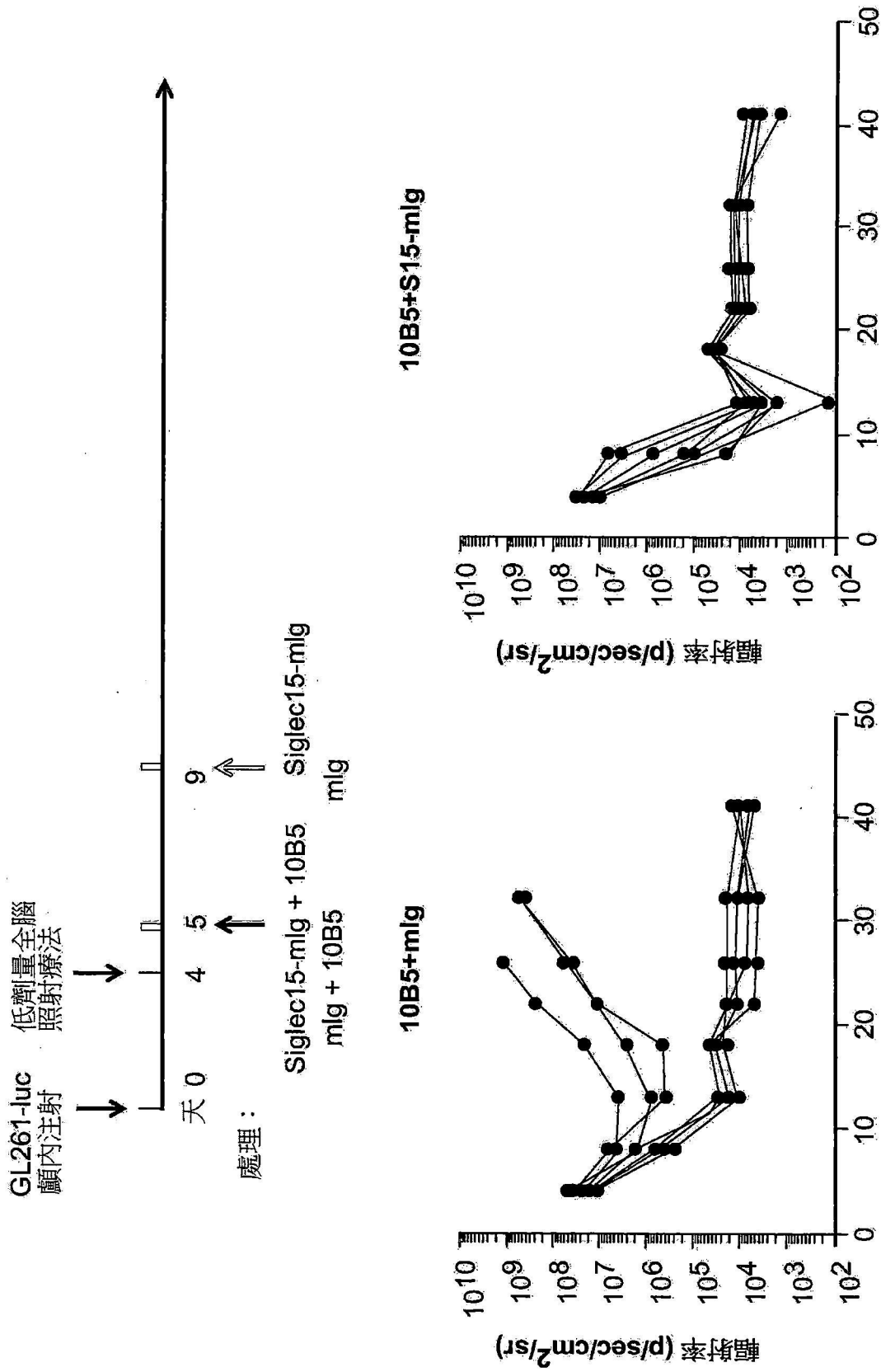
第19B圖



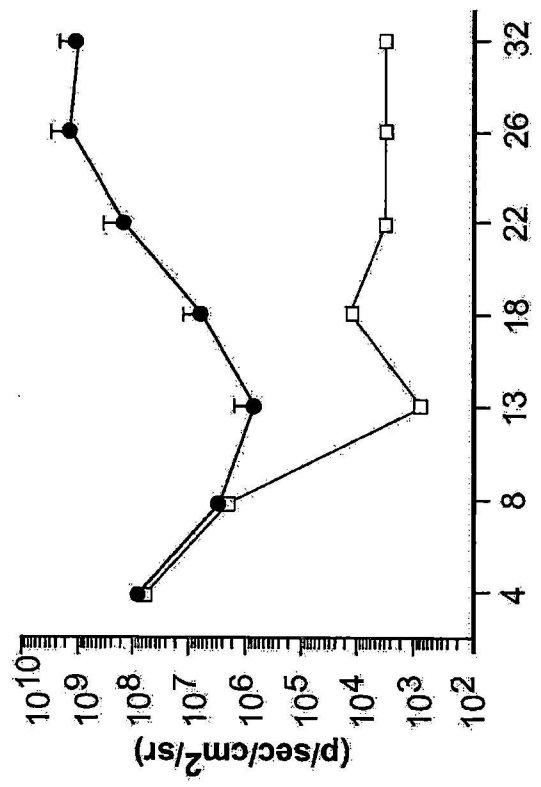
第20圖



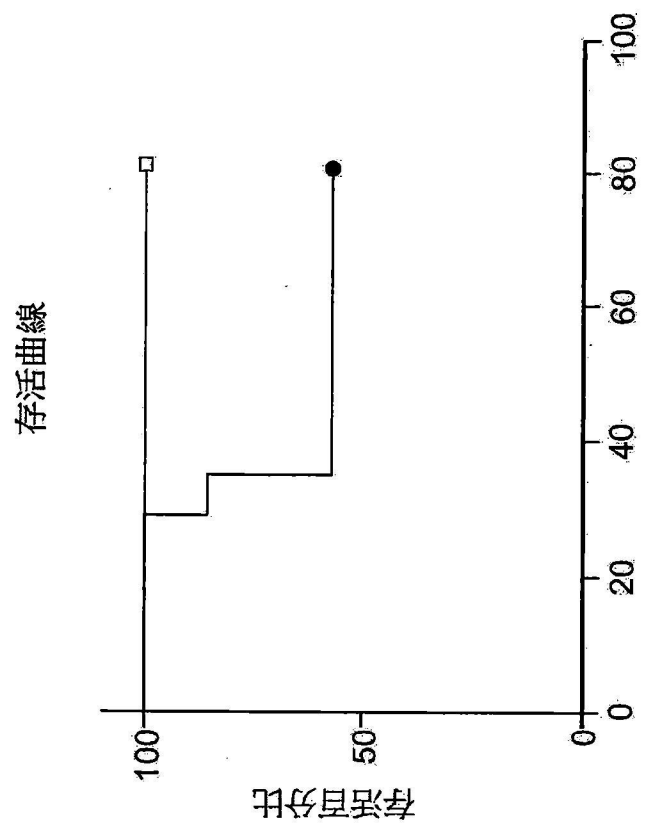
第21圖



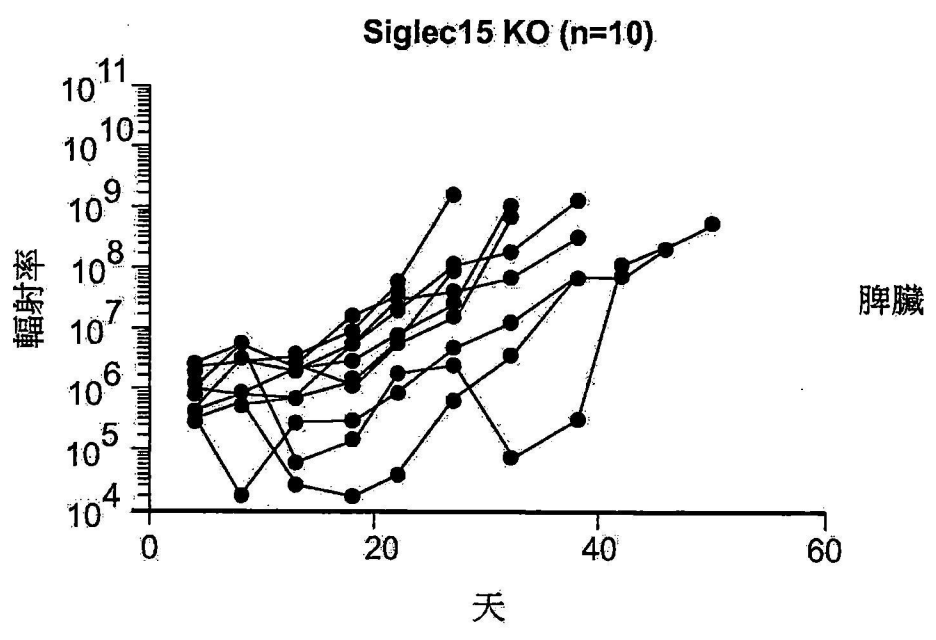
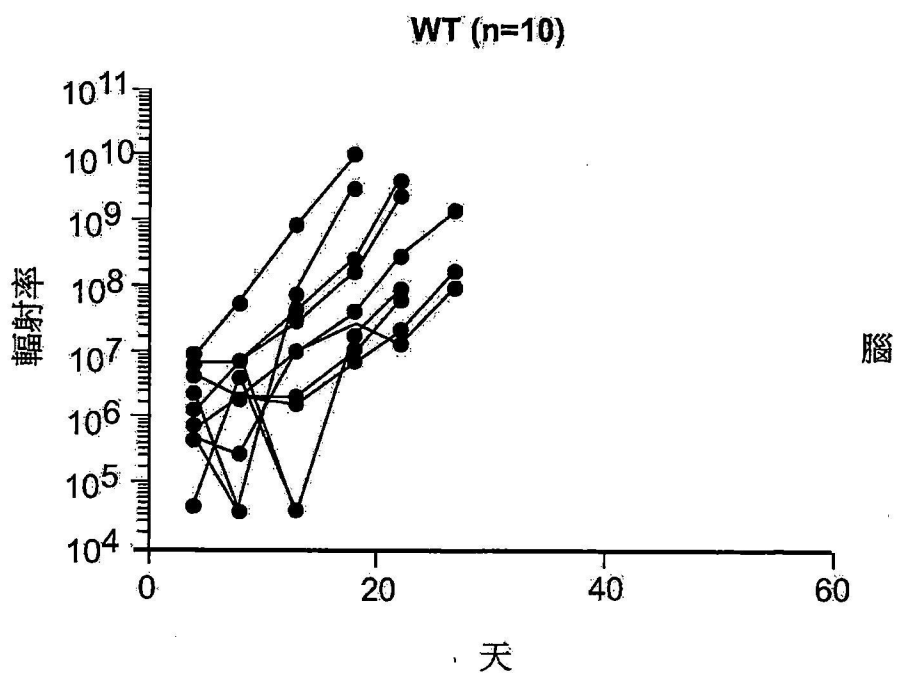
第22圖



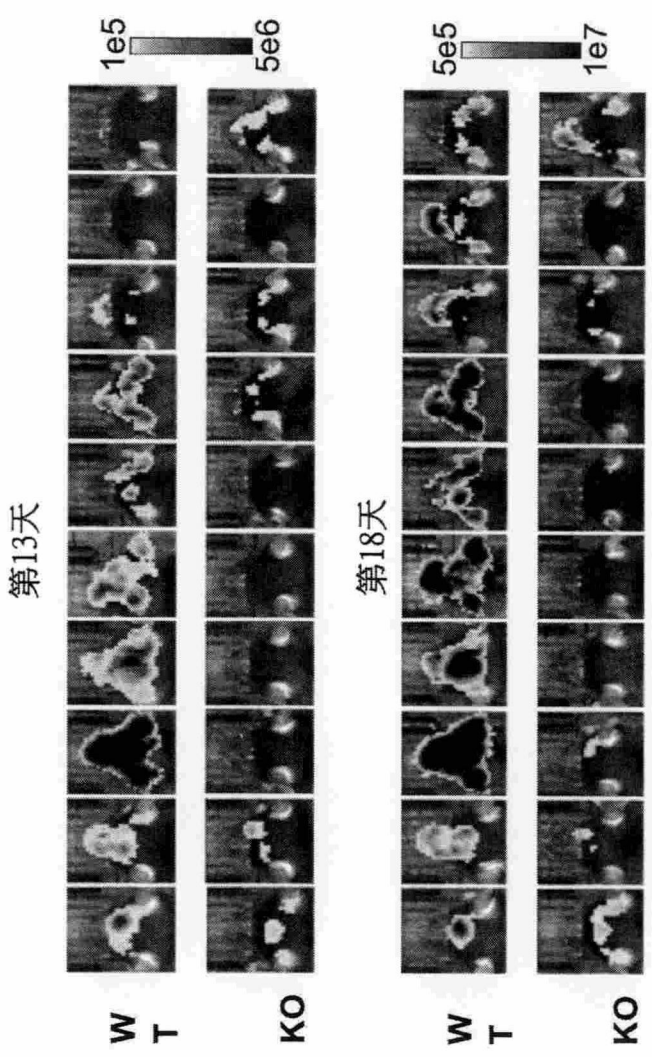
●- 10B5 + mlg
 □- 10B5 + S15-mlg



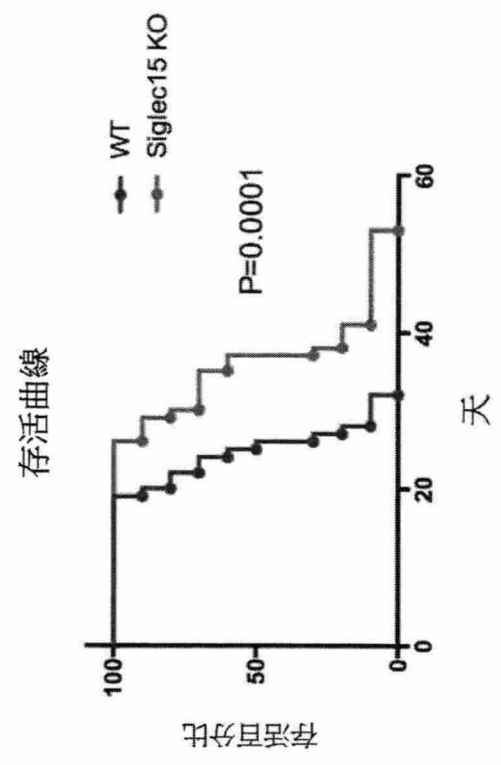
第22圖(續)



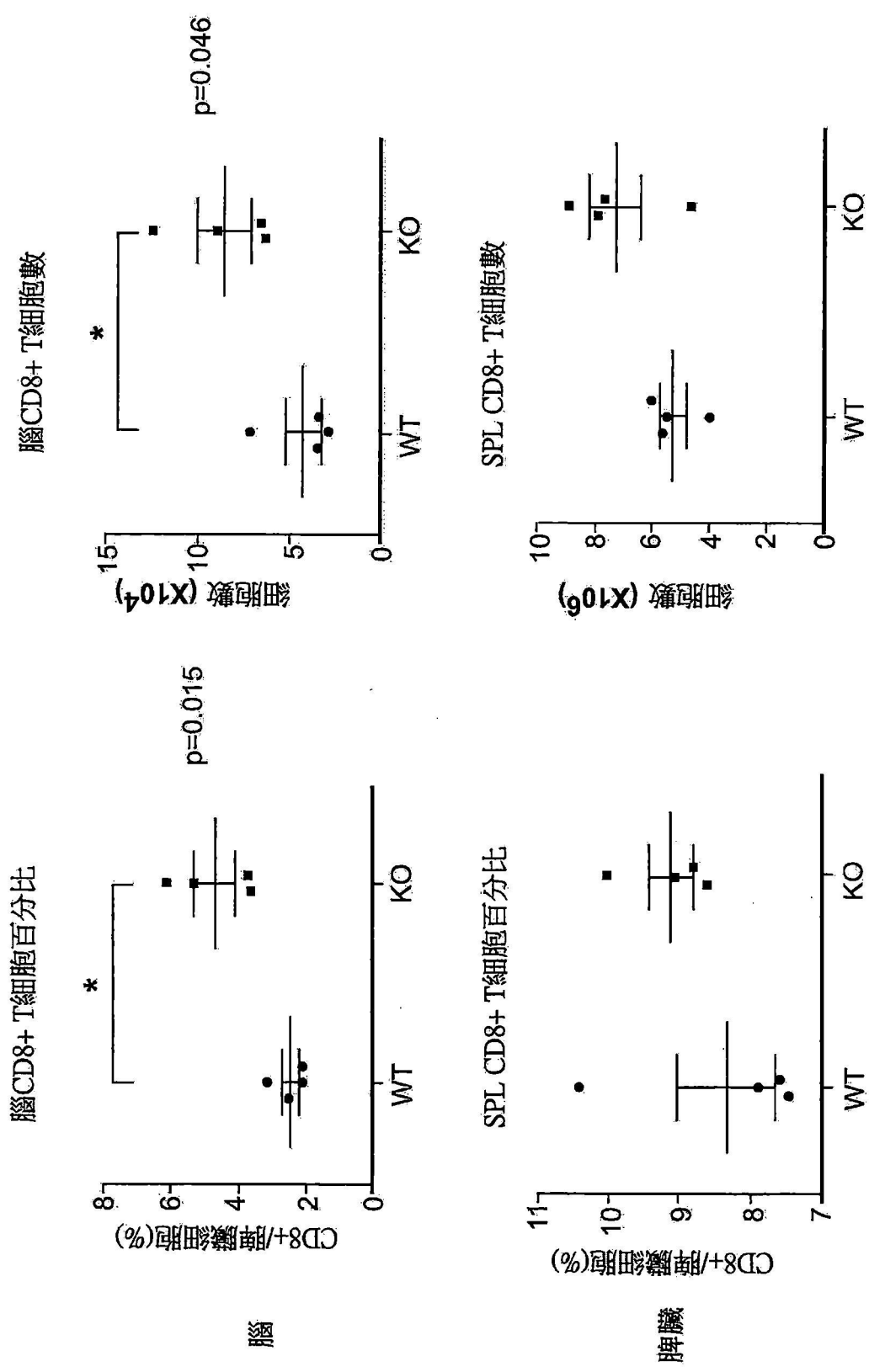
第23A圖



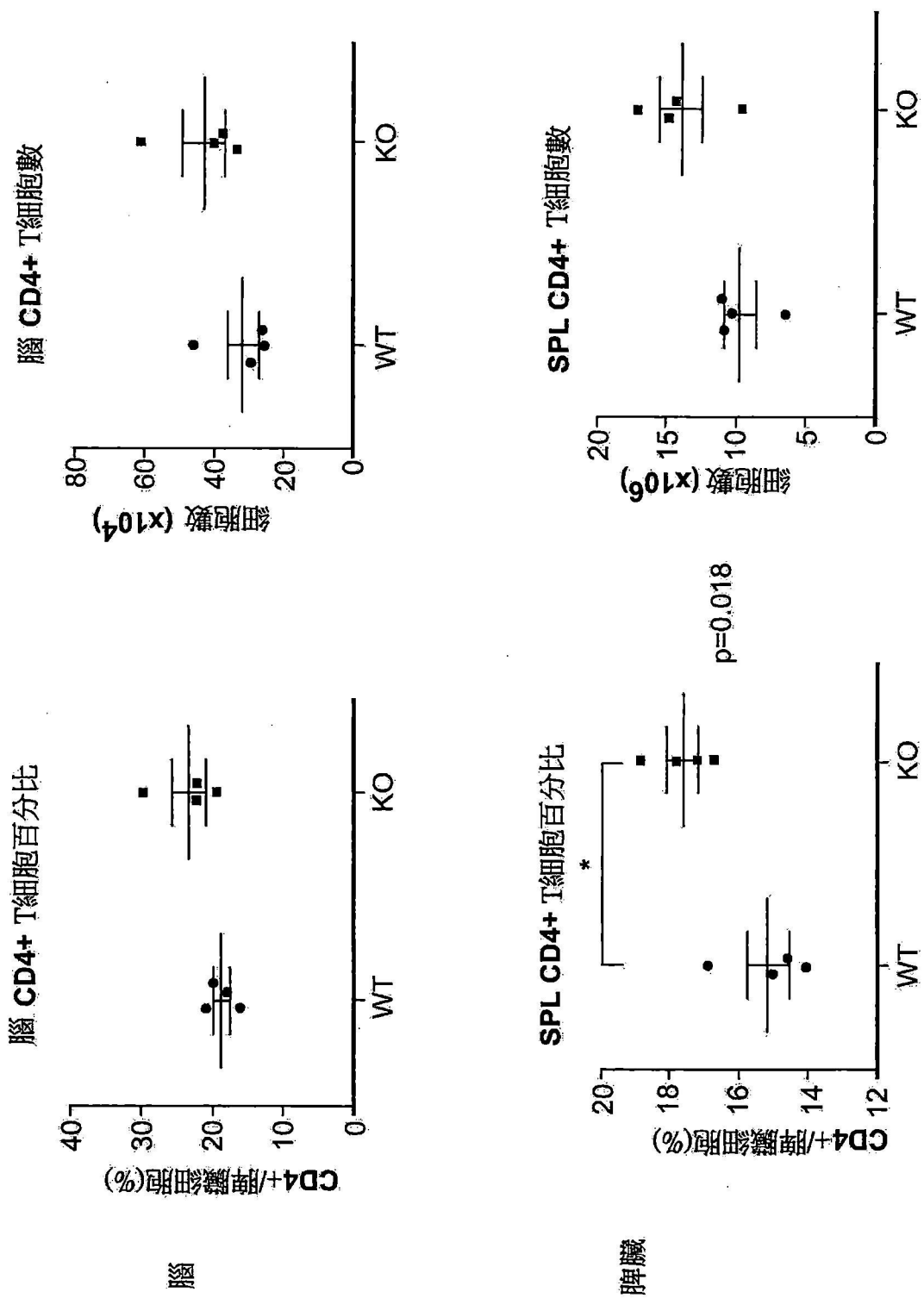
第23B圖



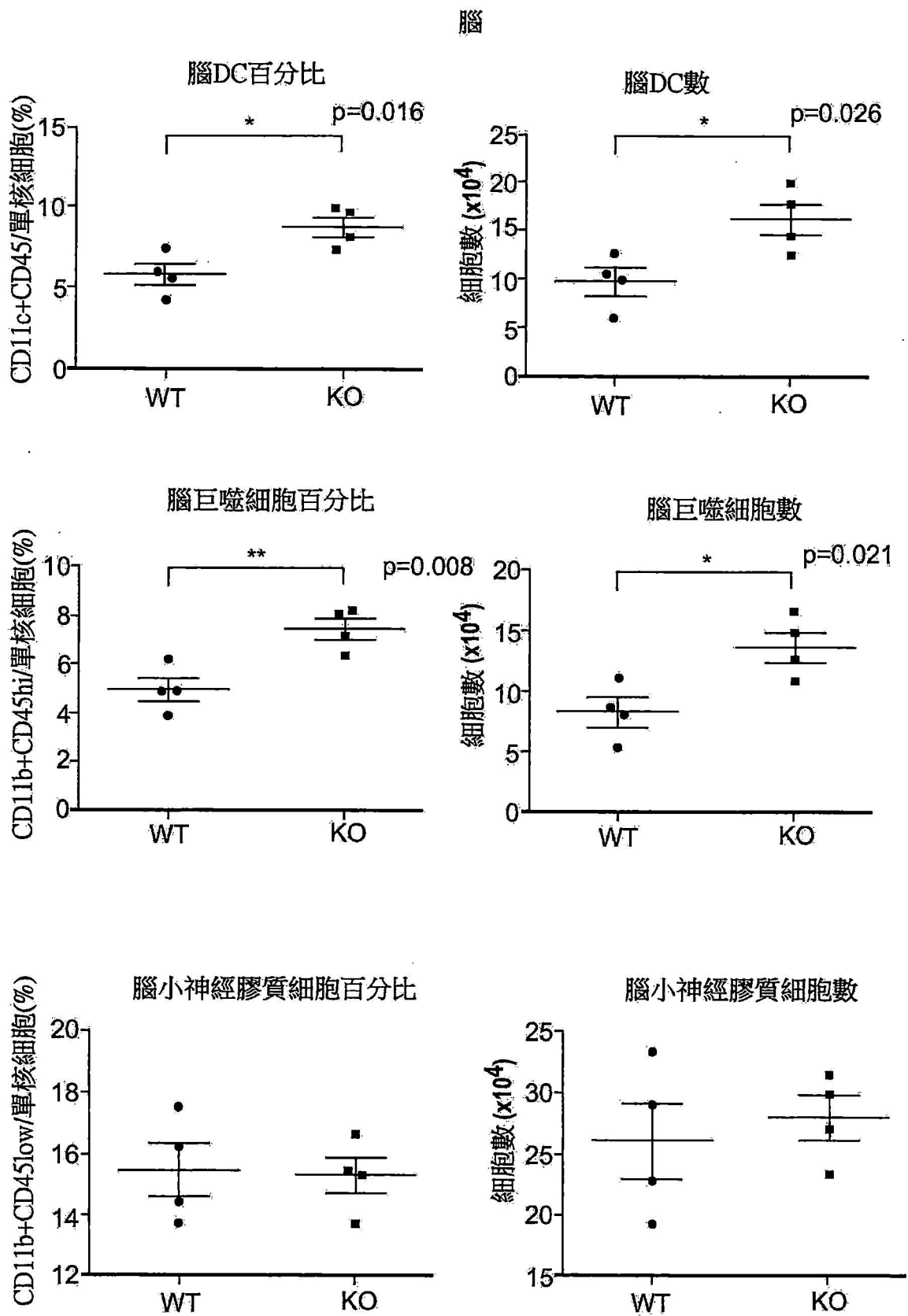
第23C圖



第24A圖

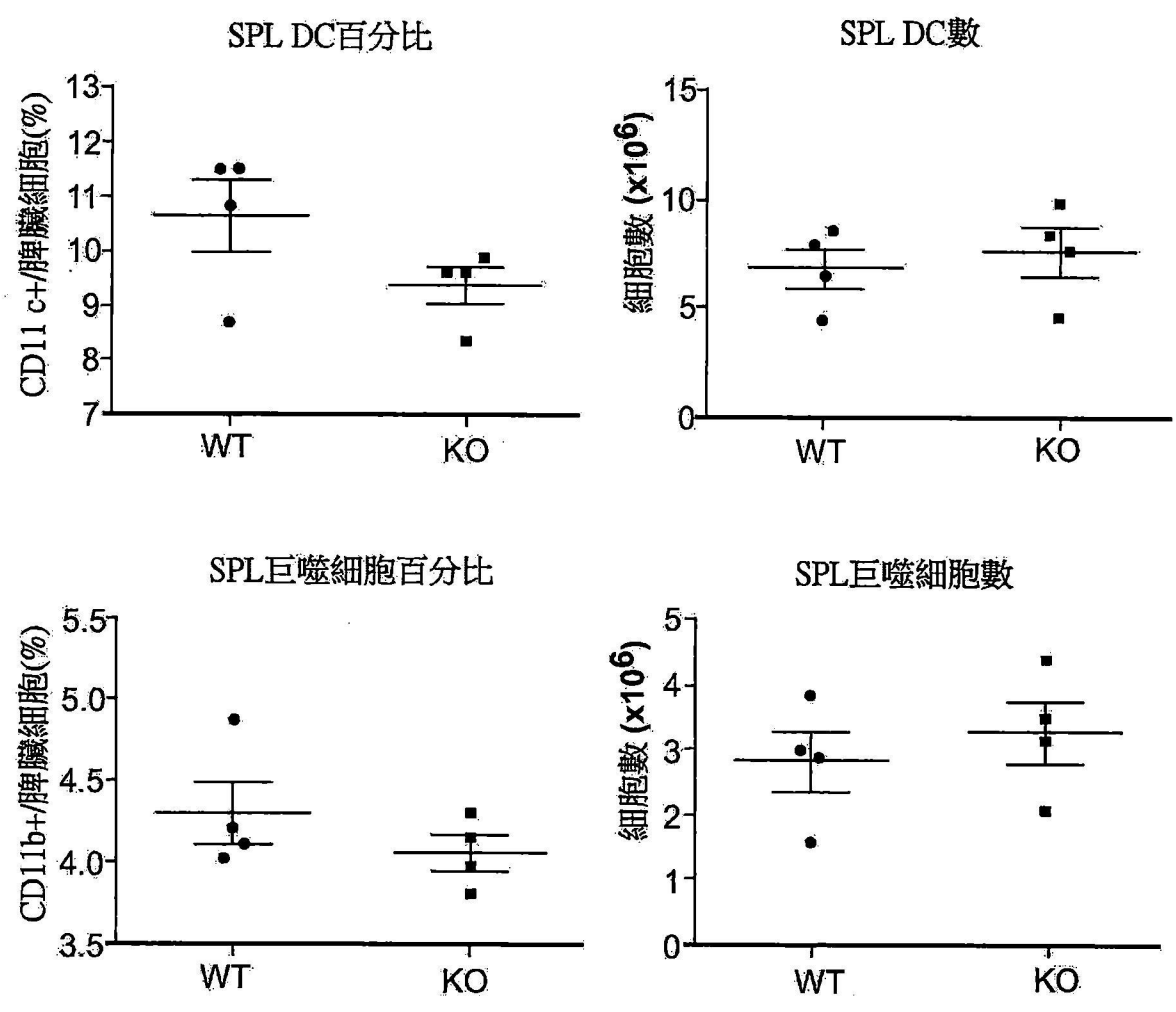


第24B圖



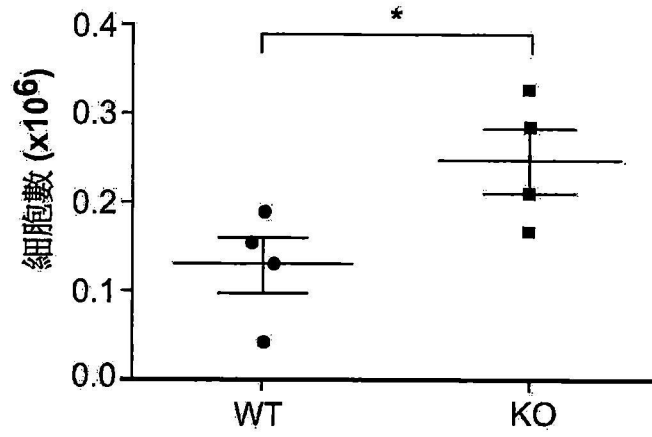
第24C圖

脾臟

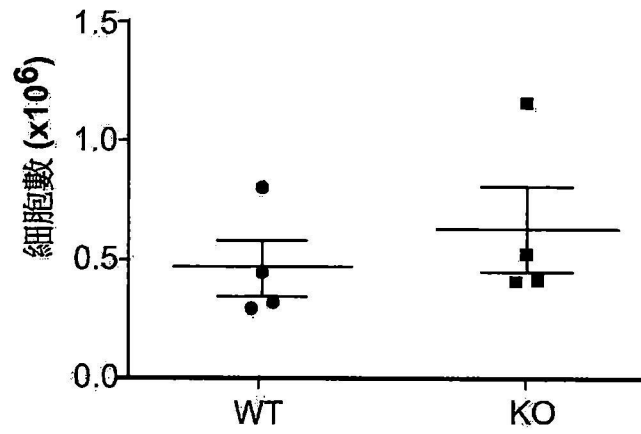


第24C圖(續)

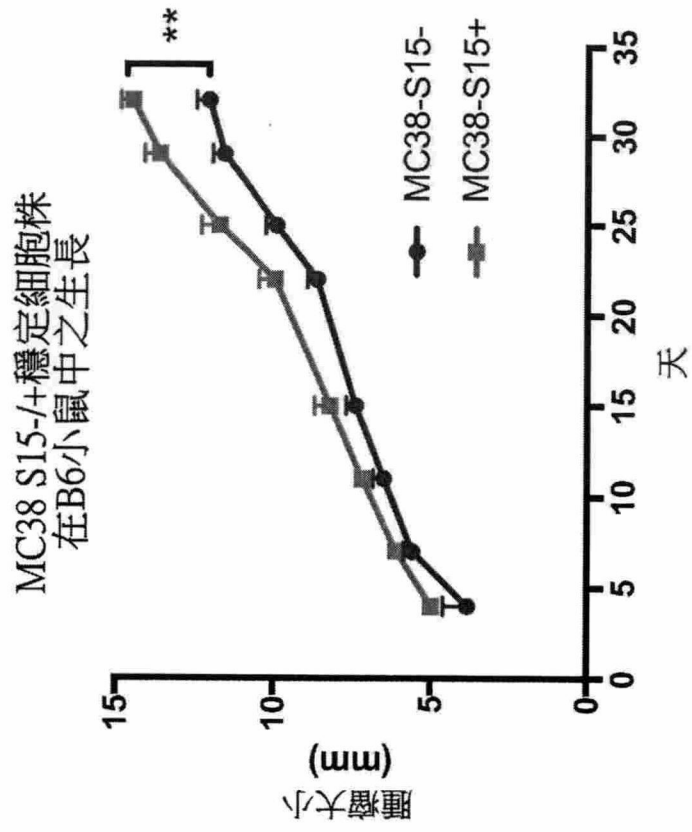
腦中IFN- γ +CD8+細胞數



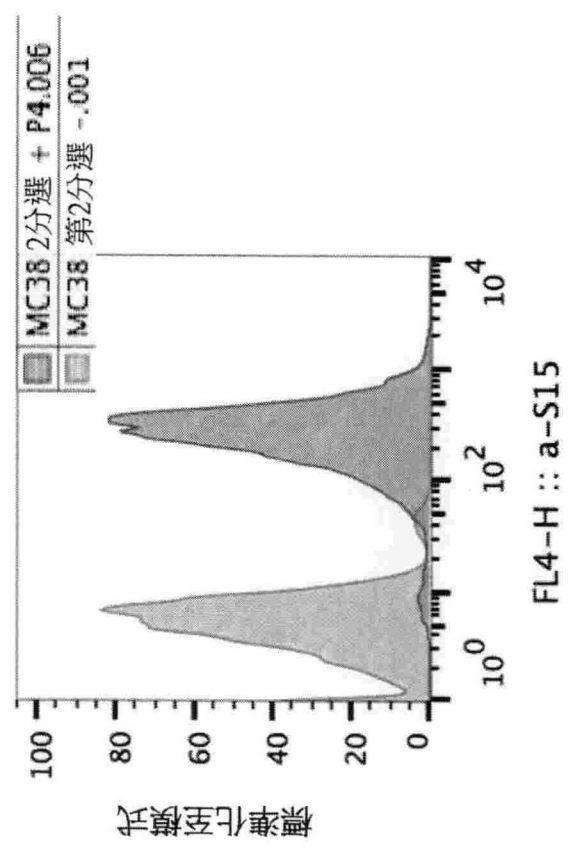
腦中IFN- γ +CD4+細胞數



第24D圖

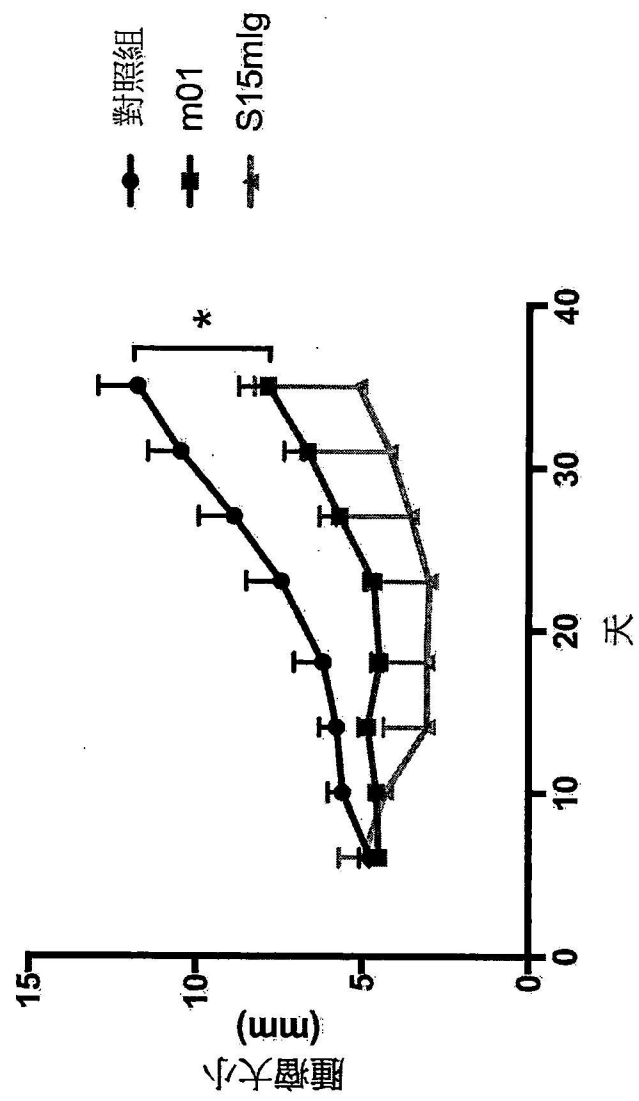


第25B圖

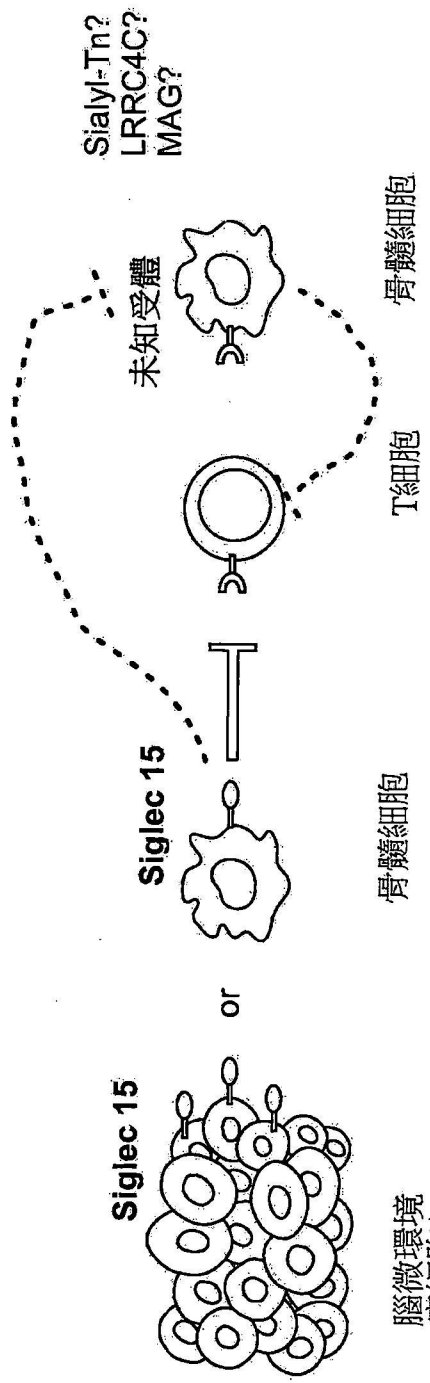


第25A圖

MC38-S15+於活體內生長



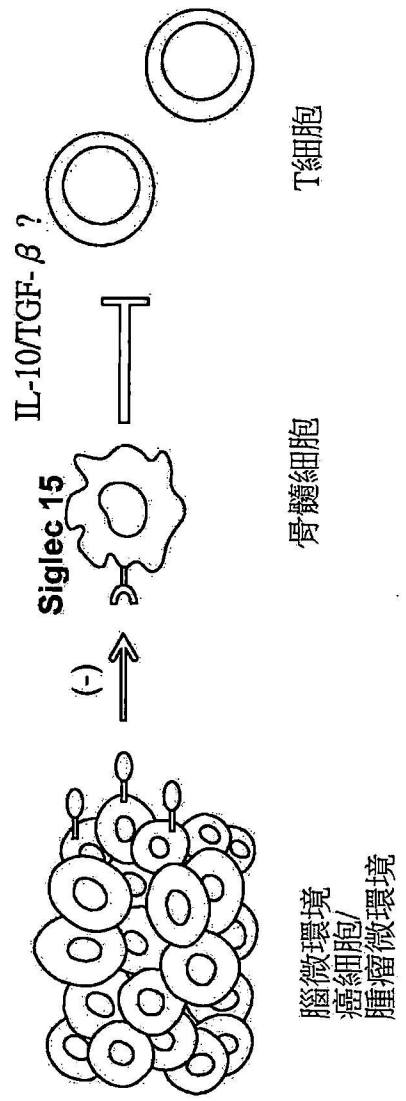
第26圖



第27A圖

腦微環境
癌細胞/
腫瘤微環境

Sialyl-Tn?
LRRC4C?
MAG?
其他配體?



第27B圖

腦微環境
癌細胞/
腫瘤微環境