



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202108606 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：109114711

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 01 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/715 (2006.01)**C07K16/24 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**A61K38/20 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P3/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/05/03 英國

1906291.8

2019/05/10 英國

1906597.8

2020/01/24 英國

2001013.8

2020/02/12 英國

2001896.6

2020/02/14 英國

2002030.1

(71)申請人：新加坡商新加坡保健服務私人有限公司 (新加坡) SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE. LTD. (SG)

新加坡

新加坡國立大學 (新加坡) NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (SG)

新加坡

(72)發明人：庫克 史圖華 A COOK, STUART ALEXANDER (GB)；夏佛 塞巴斯汀

SCHAEFER, SEBASTIAN (DE)；辛格 布列傑許 K SINGH, BRIJESH KUMAR

(IN)；威德傑傑 阿尼莎 A WIDJAJA, ANISSA ANINDYA (ID)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：50 共 372 頁

(54)名稱

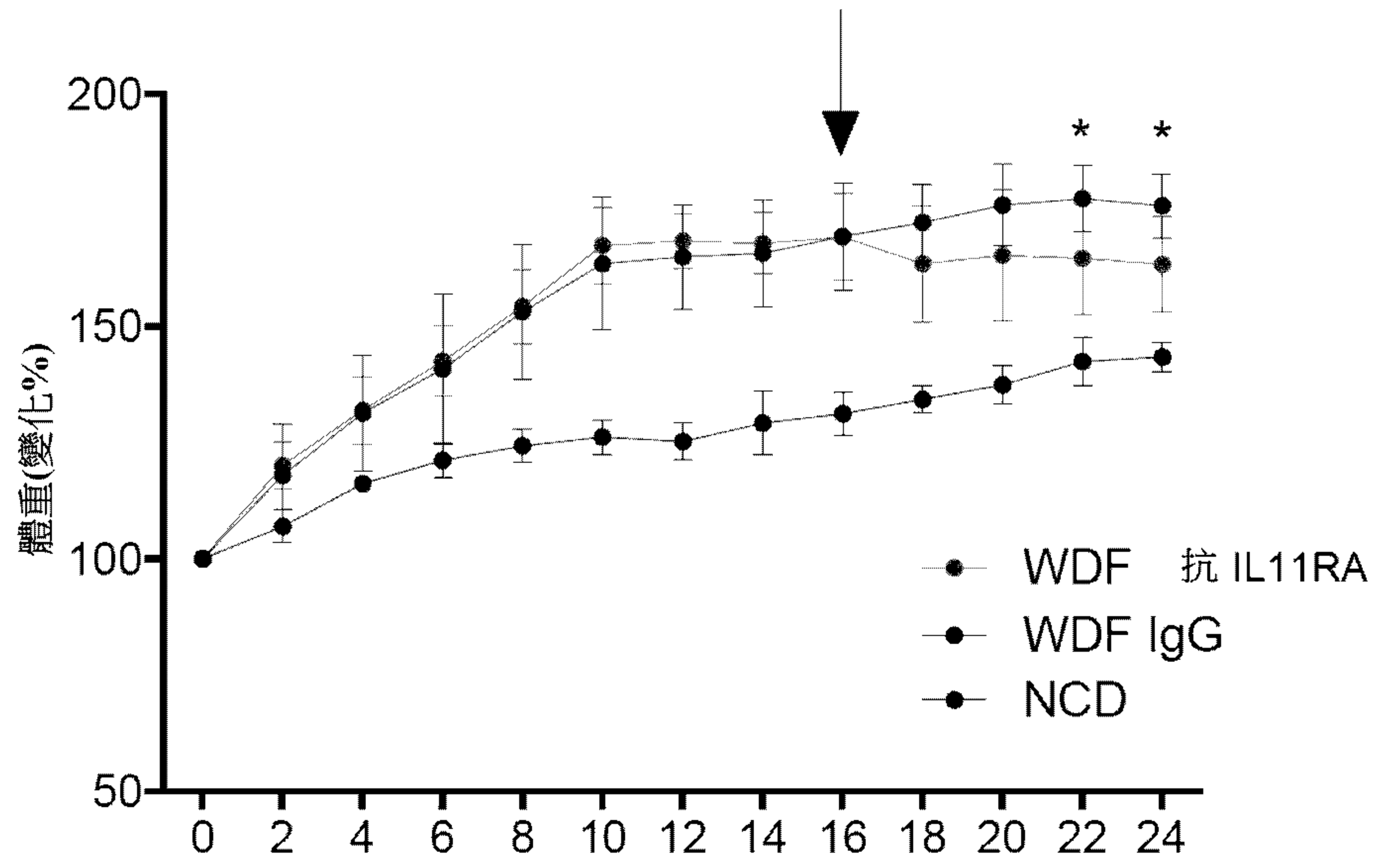
代謝性疾病之治療及預防

(57)摘要

揭露通過抑制介白素 11(IL-11)媒介的訊息傳導來治療及預防代謝性疾病的方法，以及供用於此等方法的製劑。

Methods of treating and preventing metabolic disease through inhibiting interleukin 11 (IL-11)-mediated signalling are disclosed, as well as agents for use in such methods.

指定代表圖：



【圖6A】



202108606

【發明摘要】

【中文發明名稱】

代謝性疾病之治療及預防

【英文發明名稱】

TREATMENT AND PREVENTION OF METABOLIC DISEASES

【中文】

揭露通過抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導來治療及預防代謝性疾病的方法，以及供用於此等方法的製劑。

【英文】

Methods of treating and preventing metabolic disease through inhibiting interleukin 11 (IL-11)-mediated signalling are disclosed, as well as agents for use in such methods.

【指定代表圖】 圖6A

【代表圖之符號簡單說明】
(無)

【特徵化學式】
(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

代謝性疾病之治療及預防

【英文發明名稱】

TREATMENT AND PREVENTION OF METABOLIC DISEASES

【技術領域】

發明領域

【0001】 本發明係有關於代謝性疾病的診斷、治療及預防(prophylaxis)。

【先前技術】

發明背景

肥胖、糖尿病及相關的病況

【0002】 肥胖係由WHO定義為可能損害健康的過度脂肪蓄積，且以BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ 來診斷。肥胖實質增加代謝性疾病(包括第二型糖尿病(T2D)及脂肪肝病)、心血管疾病(包括高血壓、心肌梗塞及中風)、肌肉骨骼疾病(例如骨關節炎)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、抑鬱及一些類型的癌症(乳房、卵巢、前列腺、肝、腎和結腸)的風險-參見例如Blucher，等人，Nat Rev Endocrinol. (2019) 15:288-298及Prospective Studies Collaboration, Lancet. (2009) 373(9669):1083-96。此外，肥胖可能導致生活品質降低、失業、生產力降低及社會劣勢Berrington de Gonzalez等人，N Engl J Med (2010) 363:2211-2219。肥胖亦與預期壽命減少有關連且估計會失去5-20年，取決於病況的嚴重性及共生障礙Fontaine等人，JAMA (2003) 289: 187-193。

【0003】 過去50年，肥胖盛行率已經增加到大流行的位準。全世界的肥胖盛行率於1975至2016之間亦已經以驚人的速度在兒童和青少年中增高—男孩自0.7%增加至5.6%以及女孩自0.9%增加至7.8%(NCD-RisC, Lancet (2017)

390(10113):26227-2642)。「西化」的生活方式及高熱量食物已經證實為肥胖的首要原因。

【0004】 另外一個對全球人類的健康最重要的威脅是有肥胖的第二型糖尿病之發病率增加。Menke等人，JAMA (2015) 314: 1021-1029乙文按BMI範疇檢查趨勢，以及糖尿病僅在肥胖個體中增加(18.0%至20.1%)，其暗示糖尿病盛行率大部分的增加是由於肥胖的盛行率增加。特別值得關注的是亞洲人之中很高的糖尿病盛行率，儘管其等有較低的BMI但還是為30%–50%—比其等的白種人相對人更傾向於發展糖尿病(Lee等人，Diabetes Care (2011) 34, 353-357)。

【0005】 二甲雙胍的治療潛力已經證實，且已經連同採用健康的生活方式一起用作為糖尿病的一線治療，健康的生活方式亦包括規律運動以得到其之抗肥胖益處(Yerevanian等人，Curr Obes Rep (2019))。近來，亦已經證明介白素-1是糖尿病的治療標靶以調節T2D之低度發炎(Kataria等人，Semin Immunopathol. (2010))。

非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)

【0006】 全球的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)盛行率估計是25%(Friedman等人，Nat Med. (2018) 24(7): 908-922)且雖然NAFLD是可逆的，但其仍會進展成非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)。NASH係特徵為脂肪變性驅動的發炎、肝細胞死亡及肝纖維化，最終導致肝衰竭。肝臟星形細胞(HSCs)於NASH的致病機轉是很關鍵的且引發高達95%的肝肌纖維母細胞(Mederacke等人之Nat Commun (2013) 4:2823)，其驅動NASH許多重要的病理，亦即肝纖維化、發炎及實質官能不良(Friedman, Physiol Rev (2008) 88:125-172; Friedman, J Biol Chem (2000) 275:2247-2250; Higashi等人，Adv Drug Deliv Rev (2017) 121:27-42)。

【0007】 一些因子涉及HSC活化及轉化，包括典型的促纖維化因子轉形生長因子- β 1(TGF β 1)及血小板衍生的生長因子(PDGF; Hellerbrand J Hepatol

(1999) 30:77–87; Tsuchida and Friedman Nat Rev Gastroenterol Hepatol (2017) 14:397-411)還有促炎性因子例如CCL2、TNF α 及CCL5(Friedman, J Biol Chem (2000) 275:2247-2250; Tsuchida and Friedman Nat Rev Gastroenterol Hepatol (2017) 14:397-411; Kim等人, Sci Rep (2018) 8:7499)。也許反映了這種複雜性且隱含的冗餘性，沒有一個上游起始因子已經於NASH成功地靶向及沒有許可的NASH藥物。目前，有一些藥物於NASH的臨床試驗，但是此等試驗中的許多係靶定代謝且目前尚不清楚其等是否會改良肝纖維化，其預測臨床的結果(Friedman等人, Nat Med. (2018) 24(7): 908-922; Banini等人, Curr Opin Gastroenterol (2017) 33:134-141)。

【0008】靜止的HSCs為維他命A儲存細胞且與纖維母細胞截然不同。然而，共同的因子活化二種細胞類型及刺激其等轉化成有共享特徵之肌纖維母細胞(Mederacke友等人之Nat Commun (2013) 4:2823; Iwaisako等人, Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:E3297–305)。IL-11最近已鑑定為心血管及肺纖維母細胞向肌纖維母細胞轉化的關鍵因子(Schafer等人, Nature 2017;552:110–115; Cook等人, (2018) <https://doi.org/10.1101/336537>)。對於IL-11於肝臟的深刻見解非常有限但已有向嚙齒動物注射非常高劑量的重組人類IL-11時具有保護效應的報導(Zhu等人, PLoS One (2015) 10:e0126296; Yu等人, Clin Res Hepatol Gastroenterol (2016) 40:562–570)及於人類中試驗試圖降低晚期肝炎的發炎(Lawitz等人, Am J Gastroenterol 2004;99:2359–2364)。

消耗病

【0009】消耗可定義為肌肉減輕伴有或不伴有脂肪質量減輕，其可顯現為體重減輕。多種急性與慢性疾病以及老化，經常與消耗有關連。消耗可導致營養狀態惡化、肌肉質量及功能損失、生活品質受損以及發病率及死亡率風險增加。肌肉消耗係消耗最常見的共同特性，雖然脂肪組織消耗也可能單獨或組合

肌肉消耗發生。消耗障礙之實例包括惡病質、肌肉減少症(sarcopenia) (例如老化相關或缺乏使用之骨骼肌質量及力量減輕)、厭食(對食物的食慾缺少或喪失)、肌少症(myopenia) (建議用於總體描述肌肉消耗的術語)、脂質失養症(特定脂肪沉積物之消耗)及脂肪萎縮。普遍接受的惡病質定義為：「一種多因子的症候群特徵在於進行中的骨骼肌質量減輕(伴有或不伴有脂肪質量減輕)其無法由習知的營養支持完全逆轉且導致進行性功能損害」(Evans等人之Clin Nutr. 2008 (6):793-9)。

【0010】 消耗於有晚期慢性病的患者中高度流行。根據肌肉減少症、惡病質及消耗障礙學會(SCWS)，大概5-15%有慢性心臟衰竭或慢性阻塞性肺病的患者顯現消耗障礙，而60-80%有晚期癌症的患者經歷了消耗障礙。20%的癌症死亡直接歸因於惡病質(Skipworth等人，Clin Nutr. 2007; 26:667–76)。有感染疾病，例如HIV/AIDS、瘧疾及結核病，以及慢性病況例如囊性纖維化、肝硬化、腎衰竭、克隆氏病、類風濕性關節炎、中風及神經退化性疾病的患者已經注意到消耗。創傷性損傷、手術後、失重、慢性酒精中毒及敗血症亦與消耗發作有關連(Farkas等人之J Cachexia Sarcopenia Muscle (2013) 4:173–178)。

【0011】 消耗及消耗障礙通常對基礎的疾病之治療有負面的影響：其等能損害患者對基礎的疾病治療之反應、傷害免疫系統及導致基礎的疾病症狀之惡化。因而，改良消耗的治療可增加對基礎的疾病/病況之治療的功效以及改良患者的預後。

【0012】 舉例而言，晚期癌症關連之惡病質通常導致關於抗癌治療之不良預後。當相較於體重穩定的患者，在化療之前及期間經歷了體重減輕的癌症患者接受較低的起始劑量及經歷更頻繁且嚴重的劑量限制性毒性，且因而接受顯著較少的治療或確實可能從一開始就被治療攝生法排除在外(Vaughan等人之J Cachexia Sarcopenia Muscle (2013) 4:95-109)。有效的消耗治療將對此等患者導致

更積極的結果。

【0013】目前，消耗治療包括的食慾刺激及運動來增加肌肉質量。然而，僅只營養補充或藥理的操作食慾通常無法逆轉消耗過程，特別是當嚴重時或在晚期。已經測試二十碳五烯酸(EPA；來自魚油的脂肪酸 ω -3)其於癌症的情況下改良惡病質之效應，但從試驗的結果一直是矛盾的(Jatoi等人，J Clin Oncol. 2004; 22:2469-76)。業已試驗抗氧化劑及非類固醇抗發炎劑且此等治療與例如EPA、氧化壓力抑制劑及/或的食慾刺激物的組合被認為於治療消耗上是具有潛力的。抑制泛速蛋白水解途徑(UPP)是特別感興趣的。抑制肌肉抑制物質例如肌肉生長抑制素於臨床試驗中尚未成功。

【0014】消耗之多因子本質組合以基礎的疾病意味著沒有全面有效或接受的消耗治療或甚至是任何許可的藥物療法。實際上，一般接受治療疾病關連的消耗唯一的方法是治癒基礎的疾病(Vaughan等人之J Cachexia Sarcopenia Muscle (2013) 4:95-109)。因此，需要新的消耗療法。

【發明內容】

發明概要

【0015】本發明提供一種能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑供用於一治療或預防一代謝性疾病的方法。

【0016】亦提供一種能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑於製造一藥劑之用途，該藥劑係供用於一治療或預防一代謝性疾病的方法。

【0017】亦提供一種治療或預防一代謝性疾病的方法，其包含投予一治療或預防有效量的一能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑給一個體。

【0018】在一些具體例中，代謝性疾病為或包含肥胖、第二型糖尿病(T2D)、第一型糖尿病(T1D)、糖尿病前期、超重、代謝症候群、懷孕相關高血糖症、膽汁鬱積性肝病、高血糖症、高脂質血症、高三酸甘油脂血症、高膽固

醇血症、消耗、惡病質、化療關連的體重減輕、胰臟功能不全、胰臟炎、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、脂肪變性、脂肪毒性(lipotoxicity)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)、脂質失養症、脂肥大、脂肪萎縮、胰島素抗性或高升糖素血症。

【0019】 在一些具體例中，該製劑為一種能預防或降低介白素11(IL-11)與介白素11之一受體(IL-11R)的結合之製劑。

【0020】 在一些具體例中，該製劑能結合介白素11(IL-11)或介白素11之一受體(IL-11R)。

【0021】 在一些具體例中，該製劑係選自於下列所組成的群組：一抗體或其之一抗原結合片段、一多肽、一胜肽、一核酸、一寡核苷酸、一適配體或一小分子。

【0022】 在一些具體例中，該製劑係一抗體或其之一抗原結合片段。

【0023】 在一些具體例中，該製劑係一誘餌受體。

【0024】 在一些具體例中，該製劑係IL-11媒介的訊息傳導之一抗IL-11抗體拮抗劑，或其之一抗原結合片段。在一些具體例中，該製劑係IL-11媒介的訊息傳導之一抗IL-11R α 抗體拮抗劑，或其之一抗原結合片段。

【0025】 在一些具體例中，該製劑係IL-11之一誘餌受體。在一些具體例中，該IL-11之誘餌受體包含：(i)一對應於gp130的該細胞介素結合模組之胺基酸序列及(ii)一對應於IL-11R α 的該細胞介素結合模組之胺基酸序列。

【0026】 在一些具體例中，該製劑係一IL-11突變蛋白。在一些具體例中，該IL-11突變蛋白係W147A。

【0027】 在一些具體例中，該製劑能預防或降低介白素11(IL-11)或介白素11之一受體(IL-11R)的表現。

【0028】 在一些具體例中，該製劑係一種寡核苷酸或一種小分子。

【0029】 在一些具體例中，該製劑係一能預防或降低IL-11的表現之反義寡核苷酸。在一些具體例中，該能預防或降低IL-11的表現之反義寡核苷酸係靶向*IL11*的siRNA，其包含SEQ ID NO:12、13、14或15的序列。在一些具體例中，該製劑係能預防或降低IL-11R α 的表現之反義寡核苷酸。在一些具體例中，該能預防或降低IL-11R α 的表現之反義寡核苷酸係靶向*IL11RA*的siRNA，其包含SEQ ID NO:16、17、18或19的序列。

【0030】 在一些具體例中，該介白素11受體為或包含IL-11R α 。

【0031】 在一些具體例中，該方法包含投予該製劑給介白素11(IL-11)或IL-11之一受體(IL-11R)表現向上調節的一個體。

【0032】 在一些具體例中，該方法包含投予該製劑給介白素11(IL-11)或介白素11之一受體(IL-11R)表現已經判定為向上調節的一個體。

【0033】 在一些具體例中，該方法包含判定該個體的介白素11(IL-11)或IL-11之一受體(IL-11R)表現是否是向上調節的且投予該製劑給介白素11(IL-11)或IL-11之一受體(IL-11R)表現向上調節的一個體。

說明

介白素11及IL-11之受體

【0034】 介白素11(IL-11)，亦稱為脂肪生成抑制因子，為多效性細胞介素及細胞介素之IL-6家族之一成員，細胞介素之IL-6家族包括IL-6、IL-11、IL-27、IL-31、抑瘤素、白血病抑制因子(LIF)、心營養素-1(CT-1)、心營養素樣細胞介素(CLC)、睫狀神經營養因子(CNTF)及促神經生長素(NP-1)。

【0035】 介白素11(IL-11)表現於多種間質細胞類型中。IL-11基因組序列已定位至染色體19上及染色體7之著絲粒區上，且以典型訊息勝肽轉錄以確保有效率地從細胞分泌出來。位於其啟動子序列內的IL-11之活化劑蛋白錯合物(complex)，cJun/AP-1，對於IL-11之基礎轉錄調節為關鍵的(Du and Williams.,

Blood 1997, Vol 89: 3897–3908)。人類IL-11的不成熟形式係一種199個胺基酸的多肽，而IL-11的成熟形式編碼一種具178個胺基酸殘基的蛋白(Garbers and Scheller., Biol. Chem. 2013 ; 394(9):1145-1161)。可以 UniProt 登錄序號 P20809(P20809.1 GI:124294 ; SEQ ID NO:1)取得人類IL-11胺基酸序列。亦可商購取得重組人類IL-11(奧普瑞白介素(oprelvekin))。亦已進行來自其他物種的IL-11之選殖與定序，包括來自小鼠、大鼠、豬、牛、數種硬骨魚物種及靈長類動物者。

【0036】 在本說明書中，「IL-11」係指來自任何物種的IL-11及包括來自任何物種之IL-11的同功型、片段、變異體或同源物。在較佳具體例中，物種為人類(智人(Homo sapiens))。IL-11的同功型、片段、變異體或同源物可選擇性地特徵在於其與來自一特定物種如人類之不成熟或成熟IL-11的胺基酸序列有至少為70%，較佳為80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中之一者的胺基酸序列同一性。IL-11的同功型、片段、變異體或同源物可選擇性地特徵在於與IL-11R α (較佳來自同一物種)結合及在表現IL-11R α 與gp130的細胞中刺激訊息傳導之能力(如Curtis等人之Blood, 1997, 90(11);或Karpovich等人之Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80乙文中所述)。IL-11片段可具有任何長度(以胺基酸數目計)，雖然可選擇性地為成熟IL-11長度之至少25%及其最大長度可為成熟IL-11長度之50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中之一者。IL-11片段可具有10個胺基酸的最小長度，及可為15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或195個胺基酸中之一者的最大長度。

【0037】 IL-11係經由普遍表現的醣蛋白130(gp130；亦稱作醣蛋白130、IL-6ST、IL-6- β 或CD130)的同質二聚體訊息傳導。Gp130係一種跨膜蛋白，其

形成第I型細胞介素受體與IL-6受體家族的一個次單元。特異性係經由一個別的介白素11受體次單元 α (IL-11R α)獲得，其並未直接參與訊息傳導，但起初細胞介素與 α -受體的結合事件導致最終與gp130的錯合物形成。

【0038】 人類gp130(包括22個胺基酸之訊息胜肽)為918個胺基酸的蛋白，且成熟形式為866個胺基酸，其包含597個胺基酸的細胞外域、22個胺基酸的跨膜域及277個胺基酸的細胞內域。該蛋白之細胞外域包含gp130之細胞介素結合模組(CBM)。gp130之CBM包含gp130之Ig樣域D1及纖維接合素(fibronectin)-III型域D2及D3。人類gp130之胺基酸序列可以UniProt登錄序號P40189-1(SEQ ID NO:2)獲得。

【0039】 人類IL-11R α 係一種422個胺基酸的多肽(UniProt Q14626; SEQ ID NO:3)及與鼠類IL-11R α 共有約85%核苷酸及胺基酸序列同一性。已報導有二種IL-11R α 同功型，其等不同之處在於細胞質域(Du and Williams, 同前)。IL-11受體 α 鏈(IL-11R α)與IL-6受體 α 鏈(IL-6R α)共有許多結構與功能相似性。細胞外域所顯示的胺基酸同一性為24%，其包括特徵性的保留型Trp-Ser-X-Trp-Ser(WSXWS)模體(motif)在內。短的細胞質域(34個胺基酸)缺少JAK/STAT訊息傳導途徑活化作用所需的盒1及2區。

【0040】 已定位出鼠類IL-11受體結合位址及鑑定出三個位址-位址I、II及III。藉由在位址II區的取代作用及藉由在位址III區的取代作用而減少與gp130的結合作用。位址III的突變體顯示並無可偵測出的促效劑活性及具有IL-11R α 拮抗劑活性(Cytokine Inhibitors 第八章; Gennaro Ciliberto及Rocco Savino編輯, Marcel Dekker, Inc. 2001)。

【0041】 在本說明書中，IL-11之受體(IL-11R)係指能與IL-11結合的一種多肽或多肽錯合物。在一些具體例中，IL-11受體能與IL-11結合及在表現該受體的細胞中誘導訊息傳導。

【0042】 IL-11受體可來自任何物種及包括來自任何物種的IL-11受體之同功型、片段、變異體或同源物。於較佳具體例中，該物種係人類(智人)。

【0043】 在一些具體例中，IL-11受體可為IL-11R α 。在一些具體例中，IL-11之受體可為包含IL-11R α 之多肽錯合物。在一些具體例中，IL-11受體可為包含IL-11R α 及gp130之多肽錯合物。在一些具體例中，IL-11受體可為IL-11結合的gp130或包含IL-11結合的gp130之錯合物。

【0044】 IL-11R α 的同功型、片段、變異體或同源物可選擇性地特徵在於其與來自一特定物種如人類之IL-11R α 的胺基酸序列有至少為70%，較佳為80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中之一者的胺基酸序列同一性。IL-11R α 的同功型、片段、變異體或同源物可選擇性地特徵在於與IL-11(較佳來自同一物種)結合及在表現IL-11R α 與gp130的細胞中刺激訊息傳導之能力(如於Curtis等人之Blood, 1997, 90(11)或Karpovich等人之Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80乙文中所述)。IL-11受體片段可具有任何長度(以胺基酸數目計)，雖然可選擇性地為成熟IL-11R α 長度之至少25%及其最大長度可為成熟IL-11R α 長度之50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中之一者。IL-11受體片段的片段可具有10個胺基酸的最小長度，及可為15、20、25、30、40、50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400或415個胺基酸中之一者的最大長度。

IL-11訊息傳導

【0045】 IL-11係以低親和力(K_d約10 nmol/L)結合IL-11R α ，且此等結合伙伴之間的交互作用單獨不足以傳導生物訊息。產生能夠訊息傳導之高親和力受體(K_d約400至800 pmol/L)需要共表現IL-11R α 及gp130(Curtis等人之Blood 1997；90 (11):4403-12；Hilton等人，EMBO J 13:4765, 1994；Nandurkar等人，Oncogene

12:585, 1996)。IL-11與細胞表面IL-11R α 之結合誘導異質二聚合、酪胺酸磷酸化、gp130之活化及下游訊息傳導，其主要經由有絲分裂促進劑活化蛋白激酶(MAPK)級聯及Janus激酶/訊息傳導子及轉錄(Jak/STAT)路徑活化子(Garbers and Scheller，同前)。

【0046】原則上，一種可溶性IL-11R α 亦可與IL-11形成具生物活性的可溶性錯合物(Pflanz等人，1999 FEBS Lett, 450, 117-122)而導致IL-11可能在一些情況下類似於IL-6，具有在與細胞表面gp130結合之前，先與可溶性IL-11R α 結合之可能性(Garbers and Scheller，同前)。Curtis等人(Blood 1997 Dec 1; 90 (11):4403-12)述及一種可溶性鼠類IL-11受體 α 鏈(sIL-11R)之表現及檢視了在表現gp130的細胞中之訊息傳導。於存在gp130而非跨膜IL-11R時，sIL-11R媒介M1白血病細胞的IL-11依賴性分化作用與Ba/F3細胞的增殖作用以及包括gp130、STAT3及SHP2的磷酸化在內之早期細胞內事件，與通過跨膜IL-11R的訊息傳導作用類似。最近已證實，經由細胞膜結合型gp130之訊息傳導活化作用係藉由IL-11與可溶性IL-11R α 結合(Lokau等人，2016 Cell Reports 14, 1761–1773)。這種所謂的IL-11反式訊息傳導可能對疾病的致病機轉非常重要，但尚未研究其於人類疾病的作用。

【0047】如本文所用，「IL-11反式訊息傳導」用於指由結合至IL-11R α 之IL-11與gp130之結合所觸發的訊息傳導。IL-11可能與IL-11R α 結合為一種非共價錯合物。在IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130結合之後發生訊息傳導的細胞中，gp130係膜結合型及為該細胞所表現。在一些具體例中，IL-11R α 可為一種可溶性IL-11R α 。在一些具體例中，該可溶性IL-11R α 係IL-11R α 的一種可溶性(分泌性)同功型(如缺少一跨膜域)。在一些具體例中，該可溶性IL-11R α 係細胞膜結合型IL-11R α 的細胞外域之蛋白水解裂解所釋出的產物。在一些具體例中，IL-11R α 可為細胞膜結合型，而經由gp130的訊息傳導可藉由與細胞膜結合型

IL-11R α 結合之IL-11的結合作用而引發，稱為「IL-11順式訊息傳導」。在較佳具體例中，抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由干擾IL-11媒介的順式訊息傳導來實現。

【0048】 業已證明IL-11媒介的訊息傳導刺激造血及血小板生成、刺激破骨細胞活性、刺激神經生成、抑制脂肪生成、降低促發炎細胞介素表現、調節胞外基質(ECM)代謝且媒介胃腸上皮細胞之正常生長控制(Du and Williams, 同前)。

【0049】 仍不清楚介白素11(IL-11)之生理作用。IL-11與造血細胞之活化及血小板產生密切相關。業已證明IL-11對移植體抗宿主病、發炎性關節炎及發炎性腸道疾病起保護作用，導致IL-11被認為是抗發炎性細胞介素(Putoczki and Ernst, J Leukoc Biol 2010, 88(6):1109-1117)。然而，據建議IL-11為促炎性以及抗炎性、促血管生成且對於贅瘤形成為重要的。最近的研究業已表明於小鼠關節炎模式及癌症內的病毒誘發發炎期間容易偵測到IL-11，暗示病理的刺激物能誘導IL-11的表現。IL-11也與贅瘤性胃腸上皮內腫瘤促進標靶基因之Stat3依賴性活化有關聯(Putoczki and Ernst, 同前)。

【0050】 如本文所用，「IL-11訊息傳導」及「IL-11媒介的訊息傳導」係指由IL-11或其具有成熟IL-11分子功能之片段與IL-11之受體的結合所媒介的訊息傳導。將會明瞭「IL-11訊息傳導」及「IL-11媒介的訊息傳導」係指由IL-11/其功能片段，例如通過與IL-11之受體結合所起始的訊息傳導。「訊息傳導(signalling)」也指訊息傳導(signal transduction)及其他掌管細胞活性之細胞過程。

代謝性疾病

【0051】 本發明係有關於代謝性疾病之治療及/或預防。

【0052】 如本文所用，「代謝性疾病」係指由異常代謝導致或特徵為異常代謝之任何疾病或病況。「代謝」在此情形下係指身體將能量來源，例如經攝取提供營養之物質轉化/加工為能量及/或用於儲存。

【0053】 「正常代謝」可為不具有疾病，例如不具有代謝性疾病或不具有代謝性疾病之症狀/關聯值之健康個體的代謝。

【0054】 具有代謝性疾病之個體可展現異常代謝。具有代謝性疾病之個體可具有異常代謝之症狀/關聯值。具有代謝性疾病之個體可已診斷為具有代謝性疾病。個體可滿足代謝性疾病診斷之診斷準則。

【0055】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含(例如特徵為)肥胖、第二型糖尿病(T2D)、第一型糖尿病(T1D)、糖尿病前期、超重、代謝症候群、懷孕相關高血糖症(亦即妊娠期糖尿病)、膽汁鬱積性肝病、高血糖症、高脂質血症、高三酸甘油脂血症、高膽固醇血症、消耗、惡病質、化療關連的體重減輕、胰臟功能不全、胰臟炎、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、脂肪變性、脂肪毒性、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)、脂質失養症、脂肥大、脂肪萎縮、胰島素抗性、及高升糖素血症。

【0056】 本發明之態樣係關於治療及/或預防在代謝中有一定作用之細胞/組織/器官/器官系統的異常及/或不足功能。特別地，本文涵蓋治療及/或預防胰細胞/胰組織/胰臟之異常功能及/或不足功能，亦涵蓋治療及/或預防肝細胞/肝組織/肝臟之異常功能及/或不足功能。

【0057】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含肥胖。肥胖係特徵為體脂過量。肥胖的診斷於例如Orzano and Scott, J Am Board Fam Pract (2004) 17(5): 359-369乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。肥胖個體的身體質量指數(BMI；以一個人的體重除以其等之身高的平方來計算)超過30 kg/m²。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含超重。超重係特徵為BMI大於25 kg/m²且小於30 kg/m²(Fact sheet N°311", WHO (2015))。肥胖及超重一般由過度的食物攝入、缺少身體活動及遺傳的感受性之組合導致。

【0058】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含糖尿病(diabetes mellitus)

(通常也簡單稱為「糖尿病(diabetes)」)。糖尿病係指特徵為持續長期的期間之高血糖位準的一組代謝性疾病(Diabetes Fact sheet N°312". WHO, (2013))。糖尿病的診斷根據美國糖尿病協會(ADA)要求偵測到 $\geq 6.5\%$ 的血色素A1c位準、 $\geq 126 \text{ mg/dl}$ (7.0 mmol/l)的空腹血漿葡萄糖(FPG)位準(定義為無熱量攝入至少8小時)、攝入75 g口服的葡萄糖負荷後的2-h血漿葡萄糖 $\geq 200 \text{ mg/dl}$ (11.1 mmol/l)，或於有經典的高血糖或高血糖危機症狀的患者偵測到隨機血漿葡萄糖 $\geq 200 \text{ mg/dl}$ (11.1 mmol/l) (美國糖尿病協會，Diabetes Care (2010) 33(Suppl 1): S62–S69)。糖尿病症狀包括頻尿、增加的口渴及飢餓增加。糖尿病的基礎原因常常是胰臟的胰島素生產不足或身體的細胞對生產的胰島素沒有正確回應。

【0059】 糖尿病有三種主要的類型，其等係於例如Diabetes Fact sheet N°312". WHO, (2013)中有描述。第一型糖尿病(T1D)是胰臟沒有生產足夠的胰島素造成，其係由於胰島的胰島素生產 β 細胞數目不足。T1D及其之診斷係於例如Kahanovitz等人之Point Care. (2017) 16(1): 37-40乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。第二型糖尿病(T2D)是對個體的細胞對胰島素沒有正確回應造成，且可進展為亦包括胰島素生產不足在內。T2D係最常見係由體重過重及運動不足導致。T2D係於例如DeFronzo, Nature Reviews Disease Primers (2015) 1:15019乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。妊娠期糖尿病(亦稱為懷孕相關高血糖症)發生在懷孕婦女發展高血糖位準時。妊娠期糖尿病係由在懷孕期間中所需的額外的胰島素生產不足導致，此在胰島素抗性的情況中係與懷孕有關連。妊娠期糖尿病係於例如Kampmann等人，World J Diabetes. (2015) 6(8):1065–1072乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。

【0060】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含胰島素缺乏。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含胰島素抗性。在一些具體例中，代謝性疾病為或包

含高血糖症。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含第二型糖尿病(T2D)。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含第一型糖尿病(T1D)。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含懷孕相關高血糖症。

【0061】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含糖尿病前期。糖尿病前期係指高血糖的狀態，其中血糖的位準提升長期的期間，但是低於糖尿病診斷要求的位準。糖尿病前期及其之診斷係於例如Bansal World J Diabetes. (2015) 6(2):296–303乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。WHO定義糖尿病前期為中等程度的高血糖狀態，其係通過判定6.1-6.9 mmol/L(110至125 mg/dL)的FPG位準，及攝入75 g口服的葡萄糖負荷後7.8-11.0 mmol/L(140-200 mg/dL)的2 h血漿葡萄糖位準來診斷。糖尿病前期的診斷根據ADA要求攝入75 g口服的葡萄糖負荷後7.8-11.0 mmol/L (140-200 mg/dL)的2 h血漿葡萄糖位準、100-125 mg/dL的FPG位準，及5.7%至6.4%的血色素A1c位準。

【0062】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含代謝性症候群。代謝性症候群係於例如Rochlani等人，Cardiovascular Disease (2017) 215–225乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。WHO定義代謝性症候群為除了出現肥胖、高脂血症(高三酸甘油脂血症或低高密度脂蛋白(HDL)膽固醇)、高血壓或微白蛋白尿中的二者之外，還有出現胰島素抗性(損害的空腹葡萄糖、損害的葡萄糖耐受性或T2D)。存在數種其他的代謝性症候群定義，且總結於同前的Rochlani等人之表1中。

【0063】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含膽汁鬱積。膽汁鬱積係指自肝臟至十二指腸之膽汁流減少。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含膽汁鬱積性肝病。膽汁鬱積性肝病導致膽汁合成、分泌及/或流通過膽道的不足，以及於例如Jansen 等人，Hepatology (2017) 65(2):722-738及Pollock and Minuk, J Gastroenterol Hepatol (2017) 32(7):1303-1309文中有評論，其等二者係以其等之全

體藉此併入以作為參考資料。膽汁鬱積性肝病包括原發性膽道膽管炎(PBC)及原發性硬化性膽管炎(PSC)。

【0064】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含高脂質血症。高脂質血症係指血液中脂質或脂蛋白位準的提升。高脂質血症包括高三酸甘油脂血症、高膽固醇血症及合併的高脂質血症(高三酸甘油脂血症及高膽固醇血症之組合)。高脂質血症係與例如動脈粥樣硬化及心血管疾病有關連。

【0065】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含高三酸甘油脂血症。高三酸甘油脂血症係於例如 Berglund 等人，J. Clin. Endocrinol. Metab. (2012) 97(9):2969-89 乙文中有描述，且定義為血液三酸甘油脂位準 ≥ 150 mg/dL(≥ 1.7 mmol/L)。

【0066】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含高膽固醇血症。高膽固醇血症係於例如 Bhatnagar 等人，BMJ (2008) 337:a993 乙文中有描述。UK NHS 定義高膽固醇血症為血液膽固醇位準 ≥ 5 mmol/L 或血液低密度脂蛋白(LDL)位準 ≥ 3 mmol/L。US NIH 定義高膽固醇血症為血液總膽固醇位準 ≥ 240 mg/dL。

【0067】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含胰臟功能不全。胰臟功能不全可為內分泌或外分泌的。內分泌胰臟功能不全可特徵為胰島素、澱粉素、升糖素、體抑素、飢餓肽及胰多肽(PP)中的一者或多者生產不足。外分泌胰臟功能不全可特徵為胰液、消化酵素、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、彈性蛋白酶、羧肽酶、胰脂酶、核酸酶及澱粉酶中的一者或多者生產不足，且結果無法正確消化食物。胰臟功能不全一般而言係由損失生產相關因子的胰臟細胞導致，例如在內分泌功能的情況下為胰島細胞，以及在外分泌功能的情況下為腺泡細胞。外分泌胰臟功能不全係於例如 Struyvenberg 等人，BMC Med (2017) 15:29 乙文中有描述，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。胰臟功能不全最常見的原因係胰臟炎，但其亦能由囊性纖維化、手術、腹瀉疾病及糖尿病導致。

【0068】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含胰損傷。於此，「損傷」係指損壞相關的器官及/或該器官的組織或細胞。損壞細胞/組織/器官可能由於傷害細胞/組織/器官導致，例如化學或物理治療/經歷導致。在一些具體例中損傷可由化學傷害引起，例如在藥物誘發的損傷的情況下。在一些具體例中損傷可由物理傷害引起，例如損傷為手術損壞之結果，其可於例如治療疾病及/或移植之手術期間出現(例如損傷可具有醫原性原因)。在一些具體例中損傷可能由例如由於局部缺血之低氧引起，或可由再灌注造成。在一些具體例中損傷可能由感染、對感染之免疫反應、癌症及/或自體免疫引起。損壞可能為可逆或不可逆的。損壞細胞/組織/器官可能特徵為細胞/組織/器官的結構及/或功能改變。舉例而言，損壞細胞/組織/器官可能特徵為細胞/組織/器官正常功能的關聯值位準降低，及/或細胞/組織/器官損害的功能關聯值增加。損壞細胞/組織/器官可能特徵為細胞死亡，例如損壞的器官/組織的細胞死亡。細胞死亡可由細胞凋亡(即計畫性細胞死亡)或壞死(由於損壞引起的過早細胞死亡)造成。

【0069】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含胰臟炎。胰臟炎係特徵為胰臟發炎。胰臟炎可為急性或慢性。急性胰臟炎係於例如Shah等人，J Inflamm Res (2018) 11:77-85乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。急性胰臟炎最常見的係由膽石導致，但亦能由酒精及代謝性疾病等等導致。慢性胰臟炎係於例如Pham等人之第1版. F1000Res (2018) 7: F1000 Faculty Rev-607中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。慢性胰臟炎係涉及慢性發炎、纖維化及損失腺泡及胰島細胞的症候群，其可顯現於外分泌及內分泌不足。

【0070】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含脂肪變性。脂肪變性係指異常的脂質滯留於細胞/組織/器官內。脂肪變性可以是太泡性或太泡性。

【0071】 在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為含脂質部分(或其衍生物)的分子蓄積於非脂肪組織內。在一些具體例中，代謝性疾病為、包含、特徵為

脂肪毒性或與脂肪毒性有關連。

【0072】 如本文所用，「脂肪毒性」係指由含脂質部分(或其衍生物)的分子蓄積於非脂肪組織內所造成的細胞/組織損壞、官能不良及/或死亡。在依據本揭露內容的一些具體例中，脂肪毒性係屬肝臟、腎臟、心臟及/或骨骼肌的細胞。在一些具體例中，脂肪毒性係屬肝臟的細胞(如肝細胞)。

【0073】 特徵為脂肪毒性/與脂肪毒性有關連之代謝性疾病包括例如非酒精性脂肪肝病(NAFLD)及NASH。肝細胞內之脂質蓄積及其與NAFLD且特別是NASH之關聯性係於Friedman等人，Nat. Med. (2018) 24(7):908-922及Farrell等人，Adv. Exp. Med. Biol. (2018) 1061: 19-44文中有描述(其等二者均以其等之全體藉此併入以作為參考資料)。

【0074】 NAFLD例如NASH一般認為係由於對肝細胞的脂肪毒性而產生。一般認為脂肪毒性因子包括游離(非酯化)膽固醇、飽和游離脂肪酸(例如棕櫚酸)、二酸甘油脂、溶血磷脂醯膽鹼、神經脂質及神經醯胺。肝細胞無法隔絕此化學反應性脂質分子，導致粒線體損傷、內質網(ER)壓力及自噬作用。脂肪毒性導致肝細胞細胞凋亡，還有壞死、細胞壞死性凋亡及細胞焦亡此等活化先天性免疫系統且觸發促炎性因子之表現。促炎性細胞介素及趨化介素接而募集發炎細胞例如巨噬細胞及嗜中性白血球。

【0075】 在本實施例中(尤其實施例5)，本發明人證實自泌IL-11媒介的訊息傳導是(例如於肝細胞的)脂肪毒性之訊息傳導很重要的組分，以及脂肪毒性(及其下游後果)能藉由拮抗IL-11媒介的訊息傳導予以抑制。因此，本揭露內容的態樣提供通過拮抗IL-11媒介的訊息傳導來治療/預防脂肪毒性或特徵為脂肪毒性或與脂肪毒性有關連之疾病。

【0076】 重要地是，本發明人於本文實施例5.3.5證實IL-11媒介的訊息傳導是脂肪毒性很重要的組分在與NAFL有關連的肝細胞上，以及導致在IL-11媒介的

活化HSCs成肌纖維母細胞的上游及與其有分別的NASH。因此，本揭露內容的態樣提供治療/預防NAFLD(例如NASH)，其包含通過拮抗IL-11媒介的訊息傳導來抑制肝細胞的脂肪毒性。

【0077】 在一些具體例中，代謝性疾病非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。NAFLD係於例如Benedict and Zhang, World J Hepatol. (2017) 9(16): 715–732及Albhaisi等人，Version 1. F1000Res. (2018) 7: F1000 Faculty Rev-720文中有評論，其等二者均以其等之全體藉此併入以作為參考資料。NAFLD係特徵為肝臟及特別是肝細胞的脂肪變性。NAFLD包括非酒精性脂肪肝(NAFL)及非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)。NAFL係特徵為涉及大於5%實質的肝臟的脂肪變性，且沒有肝細胞損傷的證據。NAFL可進展成NASH，其係脂肪變性合併發炎及/或纖維化(脂肪變性肝炎)。

【0078】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含脂質失養症。脂質失養症係於例如Fiorenza等人，Nature Reviews Endocrinology (2011) 7: 137–150乙文中有評論，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。脂質失養症係指無法生產及/或維持健康的脂肪組織，且包含脂肪組織全部或部分損失(脂肪萎縮)，其能與病理性脂肪組織蓄積(脂肥大)一起發生。脂質失養症可為遺傳性或後天性，雖然遺傳性脂質失養症症候群很罕見。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含脂肪萎縮。在一些具體例中，代謝性疾病為或包含脂肥大。

【0079】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含高升糖素血症。高升糖素血症係於例如Wewer Albrechtsen等人，Biomark Med. (2016) (11):1141-1151乙文中有描述，其係以其之全體藉此併入以作為參考資料。

【0080】 在一些具體例中，代謝性疾病為或包含消耗。如本文所用，術語「消耗」係指非自主體重減輕，其可為進行性及/或退化性。消耗可定義為肌肉減輕伴有或不伴有脂肪質量減輕，且典型地涉及身體質量(包括骨骼肌肉)之顯

著、通常非自主減輕，且可或可不包括脂肪組織減輕。在一些情況下，脂肪組織消耗可孤立地出現，如脂質失養疾病中所見。消耗可特徵為由食物攝入減少及異常代謝之可變組合驅動的負蛋白質及能量平衡(Fearon等人之Lancet Oncol. (2011) 12(5):489-95)。消耗會導致進行性功能受損、生活品質受損、發病率及死亡率風險增加。在一些情況下，消耗導致無力(異常生理虛弱或缺乏能量)及/或貧血(血液中紅血球或血紅素缺乏)。在一些情況下，消耗無法由習知營養支持或由迄今為止已試驗之治療性介入完全逆轉。死亡通常在體重減輕已達患者歷史穩定體重的30%時發生(Tisdale, Nature Reviews Cancer, 2, 862-871 (2002))。

【0081】 特徵為消耗之疾病/病況包括惡病質(肌肉質量之非年齡相關性減輕)、肌肉減少症(肌肉質量之減輕：例如年齡相關性、不用性、太空旅行性或去神經性)、厭食障礙(anorexic disorder)(蛋白質-能量營養不良)、肌肉失養症、脂質失養症(例如脂肪組織之異常或退化性病況)、脂肪萎縮(面部及其他組織的皮下脂肪之年齡相關性減輕)及肌少症(任何慢性病之肌肉消耗；由Fearon等人之J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2011; 2:1-3提出)。在本文中，特徵為消耗之疾病/病況亦稱為「消耗障礙」。在一些具體例中，根據本揭露內容之消耗障礙為惡病質、惡病質前期、頑抗性惡病質、肌肉減少症、厭食症、脂質失養症、脂肪萎縮及/或肌少症。在根據本文所描述之各種態樣的一些具體例中，消耗障礙為惡病質、惡病質前期及/或頑抗性惡病質。

【0082】 由於慢性病出現之消耗障礙可包括「輕度肌肉消耗病」(伴有或不伴有虛弱)、「中度肌肉消耗病」(伴有或不伴有虛弱；有時稱為「惡病質前期」)或「嚴重肌肉消耗病」(有時稱為「惡病質」，通常存在虛弱)。

【0083】 惡病質為一種與基礎的病痛(其可為急性或慢性病痛)有關連且特徵為消耗之複合性發炎/代謝症候群。惡病質主要的臨床特徵是成人的體重減輕(已水腫改正的)或兒童的生長不足(不包括內分泌障礙)。厭食症、發炎、胰島素

抗性、增加的肌肉蛋白分解及增加的基礎代謝率經常與惡病質有關連。惡病質患者脂低脂質位準及脂肪肝暗示著肝臟的代謝於惡病質致病機轉的作用。因此，靶向肝及預防脂肪肝、肝損壞或肝的療法代謝的療法可能與惡病質有直接的關聯性。惡病質與飢餓、肌肉質量之年齡相關性減輕、原發性抑鬱、吸收不良及甲狀腺高能症不同且與發病率增加有關(Evans等人之 Clin Nutr. 2008 (6):793-9)。

【0084】 惡病質可定義為相比於歷史穩定體重>5%之非自主體重減輕，<20 kg/m²(小於65歲之人)或<22 kg/m²(大於或等於65歲之人)之身體質量指數(BMI)與>2%之任何體重減輕程度，或與肌肉減少症一致之骨骼肌肉指數與>2%之任何體重減輕程度。個體亦可展現<10%體脂及/或<35 g/l之低血液白蛋白位準。此等準則亦可幫助鑑定「有風險」發展消耗障礙之族群(Fearon等人之Lancet Oncol. 2011; 12(5):489-95)。

【0085】 已提出惡病質之三步分類，嚴重程度根據能量儲存及身體蛋白質之耗乏程度(BMI)與進行中體重減輕之程度的組合來分類。

- 1.惡病質前期-患者體重減輕<5%但尚未發展嚴重併發症之時。
2. 惡病質-症候群係進行性，體重減輕超過上文所提及之參數但仍可能能夠進行治療之時。
3. 頑抗性惡病質-疾病不再對治療有反應之時或負擔及風險超過治療益處之時(Fearon等人，同前文獻)。通常，頑抗期由下文描述之基礎的病痛之總體階段及患者之病況規定。

【0086】 代謝性疾病可存在於急性或慢性疾病設定中。本發明之態樣提供治療/預防與代謝性疾病有關連之疾病/病況。與代謝性疾病有關連之疾病/病況包括與代謝性疾病之發作正相關的疾病/病況。在一些具體例中，與代謝性疾病有關連之疾病/病況為可導致/導致/已導致(亦即可引起、引起或已引起)代謝性疾病

之疾病/病況。

【0087】 與代謝性疾病有關連之疾病/病況亦包括由代謝性疾病導致及/或加劇(變更糟、進行及/或併發)之疾病/病況。在一些具體例中，與代謝性疾病有關連之疾病/病況可與代謝性疾病之發作正相關且亦可由代謝性疾病加劇。「關連之」疾病/病況可為包含代謝性疾病相關病理學之疾病/病況。

【0088】 在本發明之具體例中，代謝性疾病或與代謝性疾病有關連之疾病/病況可存在於或影響任何器官/組織，諸如心臟、肝臟、腎臟、腦、皮膚、肌肉系統、胃、小腸、大腸、胰臟、口腔、唾液腺、咽、食道、膽囊、氣管、喉、膀胱、卵巢、子宮、睪丸、內分泌系統例如腦下垂體或甲狀腺之腺、淋巴系統例如脾臟。

【0089】 在本發明之具體例中，與代謝性疾病有關連之疾病/病況可為癌症、心臟病、腎病、肺病、肝病、慢性感染、神經退化性疾病、急性損傷、創傷性損傷/創傷、手術後病況或老化/衰老中之一或多者。

【0090】 在一些具體例中，代謝性疾病可為使用該代謝性疾病的一種或多種生物標誌或關聯值予以識別/鑑定/診斷的。

能抑制IL-11作用之製劑

【0091】 本發明之態樣涉及IL-11媒介的訊息傳導之抑制。

【0092】 於本文中，「抑制」係指相對於對照條件之降低、減少或減輕。舉例而言，一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑對IL-11作用的抑制係指降低、減少或減輕在該製劑不存在下及/或在適當的對照製劑存在下IL-11媒介的訊息傳導之範圍/程度。

【0093】 抑制在本文中亦可指中和作用或拮抗作用。亦即，一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導(例如由IL-11或包含IL-11之錯合物媒介的交互作用、訊息傳導或其他活性)之製劑可稱為關於相關功能或過程之「中和」或「拮抗」製劑。

舉例而言，能夠抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑可稱為能夠中和IL-11媒介的訊息傳導的製劑，或可稱為IL-11媒介的訊息傳導之拮抗劑。

【0094】 IL-11的訊息傳導途徑提供多種抑制IL-11訊息傳導之途徑。一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑可能是因為例如透過抑制一或多種因子的作用，該一或多種因子的作用涉及通過IL-11之受體的訊息傳導或為通過IL-11之受體的訊息傳導必須的。

【0095】 舉例而言，抑制IL-11的訊息傳導可藉由干擾IL-11(或包含IL-11之錯合物，例如IL-11及IL-11R α 之錯合物)及IL-11之受體(如IL-11R α 、包含IL-11R α 之受體錯合物、gp130或包含IL-11R α 及gp130之受體錯合物)之間的交互作用來實現。在一些具體例中，抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由抑制例如IL-11、IL-11R α 及gp130中的一或多者之基因或蛋白表現來實現。

【0096】 於具體例中，抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由干擾IL-11媒介的順式訊息傳導但不干擾IL-11媒介的反式訊息傳導來實現，例如抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由抑制涉及膜結合型IL-11R α 之gp130媒介的順式錯合物來實現。於具體例中，抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由干擾IL-11媒介的反式訊息傳導但不干擾IL-11媒介的順式訊息傳導來實現，即抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由抑制gp130媒介的反式訊息傳導錯合物，如結合可溶性IL-11R α 的IL-11或結合可溶性IL-6R的IL-6來實現。於具體例中，抑制IL-11媒介的訊息傳導係藉由干擾IL-11媒介的順式訊息傳導及IL-11媒介的反式訊息傳導來實現。可使用如本文所描述的任何製劑來抑制IL-11媒介的順式及/或反式訊息傳導。

【0097】 在其他的實例中，抑制IL-11的訊息傳導可藉由干擾IL-11/IL-11R α /gp130下游的訊息傳導途徑來實現。亦即，在一些具體例中，抑制/拮抗IL-11媒介的訊息傳導包含抑制通過IL-11/IL-11受體錯合物訊息傳導的下游之訊息傳導途徑/過程/因子。

【0098】 在一些具體例中，抑制/拮抗IL-11媒介的訊息傳導包含抑制通過由IL-11/IL-11受體錯合物所活化的細胞內訊息傳導途徑之訊息傳導。在一些具體例中，抑制/拮抗IL-11媒介的訊息傳導包含抑制由於通過IL-11/IL-11受體錯合物的訊息傳導而表現/活性向上調節的一或多種因子。

【0099】 在一些具體例中，本發明的方法使用能抑制JAK/STAT訊息傳導之製劑。在一些具體例中，能抑制JAK/STAT訊息傳導之製劑為能抑制JAK1、JAK2、JAK3、TYK2、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B及/或STAT6的作用之製劑。舉例而言，製劑可為能抑制JAK/STAT蛋白之活化、抑制JAK或STAT蛋白與細胞表面受體如IL-11R α 或gp130之交互作用、抑制JAK蛋白之磷酸化、抑制JAK及STAT蛋白之間的交互作用、抑制STAT蛋白之磷酸化、抑制STAT蛋白之二聚合、抑制STAT蛋白轉位至細胞核、抑制STAT蛋白與DNA之結合，及/或促進JAK及/或STAT蛋白之降解。在一些具體例中，JAK/STAT抑制劑係選自於索利替尼(Ruxolitinib)(捷可衛/捷可衛(Jakafi/Jakavi)；Incyte)、托法替尼(Tofacitinib) (捷抑炎/捷抑炎(Xeljanz/Jakvinus)；NIH/Pfizer)、奧拉替尼(Oclacitinib) (安癢快(Apoquel))、巴瑞替尼(Baricitinib) (愛滅炎(Olumiant)；Incyte/Eli Lilly)、非可替尼(Filgotinib) (G-146034/GLPG-0634；Galapagos NV)、鹽酸巴多昔芬(Gandotinib) (LY-2784544；Eli Lilly)、來他替尼(Lestaurtinib) (CEP-701；Teva)、莫美洛替尼(Momelotinib) (GS-0387/CYT-387；Gilead Sciences)、帕克替尼(Pacritinib) (SB1518；CTI)、PF-04965842(Pfizer)、烏帕替尼(Upadacitinib) (ABT-494；AbbVie)、吡西替尼(Peficitinib) (ASP015K/JNJ-54781532；Astellas)、菲達替尼(Fedratinib) (SAR302503；Celgene)、葫蘆素I(Cucurbitacin I) (JSI-124)及CHZ868。

【0100】 在一些具體例中，本發明的方法使用能抑制MAPK/ERK的訊息傳導之製劑。在一些具體例中，能抑制MAPK/ERK的訊息傳導之製劑能抑制GRB2

的作用、抑制 RAF 激酶的作用、抑制 MEK 蛋白之作用、抑制 MAP3K/MAP2K/MAPK 及/或Myc之活化，及/或抑制STAT蛋白之磷酸化。在一些具體例中，能抑制ERK的訊息傳導之製劑能抑制ERK p42/44。在一些具體例中，ERK抑制劑係選自於SCH772984、SC1、VX-11e、DEL-22379、索拉非尼(Sorafenib)(蕾莎瓦(Nexavar)；Bayer/Onyx)、SB590885、PLX4720、XL281、RAF265(Novartis)、恩考芬尼(encorafenib)(LGX818/Braftovi；Array BioPharma)、達拉菲尼(dabrafenib)(泰伏樂(Tafinlar)；GSK)、威羅菲尼(vemurafenib)(日沛樂(Zelboraf)；Roche)、考比替尼(cobimetinib)(可泰利(Cotellic)；Roche)、CI-1040、PD0325901、比米替尼(Binimetinib)(MEK162/MEKTOVI；Array BioPharma)、司美替尼(selumetinib)(AZD6244；Array/AstraZeneca)及曲美替尼(Trametinib)(GSK1120212/麥欣霓(Mekinist)；Novartis)。在一些具體例中，本發明的方法使用能抑制c-Jun N末端激酶(JNK)的訊息傳導/活性之製劑。在一些具體例中，能抑制JNK的訊息傳導/活性之製劑係能抑制JNK(如JNK1、JNK2)之作用及/或磷酸化。在一些具體例中，JNK抑制劑係選自於SP600125、CEP 1347、TCS JNK 6o、c-JUN肽、SU3327、AEG 3482、TCS JNK 5a、BI78D3、IQ3、SR3576、IQ1S、JIP-1 (153-163)及CC401二鹽酸鹽。

【0101】在本實施例中，本發明人證實NOX4表現及活性係藉由通過IL-11/IL-11R α /gp130的訊息傳導而向上調節。NOX4為NADPH氧化酶，及活性含氧物(ROS)的來源。於有肝細胞特異性Il11表現之基因轉殖小鼠內的*Nox4*表現是向上調節的，且以IL11刺激的初級人類肝細胞會向上調節NOX4表現。

【0102】在一些具體例中，本發明使用能抑制NOX4表現(基因或蛋白表現)或功能之製劑。在一些具體例中，本發明使用能抑制IL-11媒介的NOX4表現/功能之向上調節之製劑。能抑制NOX4表現或功能之製劑於本文中可稱為NOX4抑制劑。舉例而言，NOX4抑制劑可以能夠降低NOX4表現(如基因及/或蛋白表現)、

降低編碼NOX4之RNA位準、降低NOX4蛋白之位準、及/或降低NOX4活性之位準(如降低NOX4媒介的NADPH氧化酶活性及/或NOX4媒介的ROS生產)。

【0103】 NOX4抑制劑包括NOX4結合分子及能降低NOX4表現的分子。NOX4結合抑制劑包括表現為NOX4功能拮抗劑之NOX4的交互作用伙伴之胜肽/核酸適配體、抗體(及抗體片段)及片段，以及NOX4之小分子抑制劑。能降低NOX4表現的分子包括NOX4之反義RNA(例如siRNA、shRNA)。在一些具體例中，NOX4抑制劑係選自於Altenhofer等人，Antioxid Redox Signal. (2015) 23(5): 406–427或Augsburder等人，Redox Biol. (2019) 26: 101272內所述之NOX4抑制劑，例如GKT137831。

結合製劑

【0104】 在一些具體例中，能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑可結合IL-11。在一些具體例中，能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑可結合IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)。此等製劑之結合可藉由降低/預防IL-11結合IL-11之受體的能力來抑制IL-11媒介的訊息傳導，藉此抑制下游之訊息傳導。此等製劑之結合可藉由降低/預防IL-11結合IL-11之受體，例如IL-11R α 及/或gp130的能力來抑制IL-11媒介的順式及/或反式訊息傳導，藉此抑制下游之訊息傳導。製劑可結合反式訊息傳導錯合物如IL-11及可溶性IL-11R α 且抑制gp130媒介的訊息傳導。

【0105】 能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體之製劑可為任何一種，但在一些具體例中該製劑可為一抗體、其之一抗原結合片段、一多肽、一胜肽、一核酸、一寡核苷酸、一適配體或一小分子。該製劑可提供呈單離或純化的形式，或可以調配成一藥學組成物或藥劑。

抗體及抗原結合片段

【0106】 在一些具體例中，能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體

的製劑為一抗體或其之抗原結合片段。在一些具體例中，能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的製劑為一多肽，例如一誘餌受體分子。在一些具體例中，能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的製劑可為一適配體。

【0107】 在一些具體例中，能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體之製劑為一抗體或其之抗原結合片段。「抗體」係按其廣義來使用於本文中且包含單株抗體、多株抗體、單特異性及多特異性抗體(如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其等展現與相關的標靶分子之結合。

【0108】 鑑於當今單株抗體科技的相關技術，已可針對大部分的抗原製備抗體。抗原結合部分可為一抗體的一部分(例如一種Fab片段)或為一合成抗體片段(例如一單鏈Fv片段[ScFv])。可藉由已知技術製備所選抗原的單株抗體，例如在"Monoclonal Antibodies: A manual of techniques ", H Zola (CRC Press, 1988)及在"Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications ", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)中所揭露者。Neuberger 等人 (1988, 8th International Biotechnology Symposium第2部，792-799)曾論及嵌合抗體。單株抗體(mAbs)特別適合在本發明的方法中使用，且係特異地靶向一抗原上的單一表位之抗體的同質族群。

【0109】 多株抗體亦可在本發明的方法中使用。單特異性多株抗體係較佳的。適合的多株抗體可使用本技藝熟知的方法來製備。

【0110】 亦可使用/提供抗體的抗原結合片段，諸如Fab與Fab2片段，正如可使用/提供基因工程處理的抗體與抗體片段。抗體的可變異重(VH)與可變異輕(VL)域係涉及抗原之辨識，這項事實最初由早期的蛋白酶消化實驗所發現。進一步的確認係來自嚙齒動物抗體的「人化」。可將嚙齒動物來源的可變異域與人類來源的恆定域融合，而使得所產生的抗體保有嚙齒動物親本抗體的抗原特異性(Morrison等人之(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855)。

【0111】 如本揭露內容之抗體及抗原結合片段包含能與相關的標靶分子(即IL-11/包含IL-11之錯合物/IL-11之受體)結合之抗體的互補決定區(CDRs)。

【0112】 能結合IL-11之抗體包括譬如例如於Bockhorn等人之*Nat. Commun.* (2013) 4(0):1393內所用的單株小鼠抗人類IL-11抗體殖株#22626;目錄號MAB218 (R&D Systems, MN, USA)、殖株6D9A(Abbiotec)、殖株KT8(Abbiotec)、殖株M3103F11(BioLegend)、殖株1F1(Abnova Corporation)、殖株3C6(Abnova Corporation)、殖株GF1(LifeSpan Biosciences)、殖株13455(Source BioScience)、11h3/19.6.1(Hermann 等人, *Arthritis Rheum.* (1998) 41(8):1388-97)、AB-218-NA(R&D Systems)、X203(Ng等人, *Sci Transl Med.* (2019) 11(511) pii: eaaw1237,)及US 2009/0202533 A1、WO 99/59608 A2、WO 2018/109174 A2及WO 2019/238882 A1內揭露的抗IL-11抗體。

【0113】 特別地，抗IL-11抗體殖株22626(亦稱為MAB218)業已例如於Schaefer等人, *Nature* (2017) 552(7683):110–115內證明為IL-11媒介的訊息傳導之拮抗劑。單株抗體11h3/19.6.1於Hermann等人, *Arthritis Rheum.* (1998) 41(8):1388-97內係揭露為中和性抗IL-11 IgG1。來自R&D Systems的AB-218-NA，例如於McCoy等人, *BMC Cancer* (2013) 13:16所用的，為中和性抗IL-11抗體的另一個實例。WO 2018/109174 A2及WO 2019/238882 A1揭露IL-11媒介的訊息傳導之還另外的例示性抗IL-11抗體拮抗劑。於Ng等人, “IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis.” *bioRxiv* 336537; doi: <https://doi.org/10.1101/336537> 及WO 2019/238882 A1內揭露的X203(亦稱為Enx203)為IL-11媒介的訊息傳導之抗IL-11抗體拮抗劑，且包含如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:92的VH區域(本揭露內容之SEQ ID NO:22)及如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:94的VL區域(本揭露內容之SEQ ID NO:23)。WO 2019/238882 A1內揭露X203的人化版本，其包括hEnx203，其包含如WO

2019/238882 A1之SEQ ID NO:117的VH區域(本揭露內容之SEQ ID NO:30)及如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:122的VL區域(本揭露內容之SEQ ID NO:31)。
Enx108A為IL-11媒介的訊息傳導之抗IL-11抗體拮抗劑的另一個實例，且包含如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:8的VH區域(本揭露內容之SEQ ID NO:26)及如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:20的VL區域(本揭露內容之SEQ ID NO:27)。

【0114】能結合IL-11R α 之抗體包括譬如單株抗體殖株025(Sino Biological)、殖株EPR5446(Abcam)、殖株473143(R & D Systems)、殖株8E2、8D10及8E4以及US 2014/0219919 A1內所述的8E2之親和力成熟的變異體、Blanc等人(*J. Immunol Methods*. 2000 Jul 31 ; 241(1-2) ; 43-59)內所述的單株抗體、X209(Widjaja等人, *Gastroenterology* (2019) 157(3):777-792, 其也被發佈為Widjaja等人, “IL-11 neutralising therapies target hepatic stellate cell-induced liver inflammation and fibrosis in NASH.” bioRxiv 470062; doi: <https://doi.org/10.1101/470062>) WO 2014121325 A1及US 2013/0302277 A1內揭露的抗體，以及US 2009/0202533 A1、WO 99/59608 A2、WO 2018/109170 A2及WO 2019/238884 A1內揭露的抗IL-11R α 抗體。

【0115】特別地，抗IL-11R α 抗體殖株473143(亦稱為MAB1977)業已例如於Schaefer等人, *Nature* (2017) 552(7683):110–115內證明為IL-11媒介的訊息傳導之拮抗劑。US 2014/0219919 A1提供抗人類IL-11R α 抗體殖株8E2、8D10及8E4的序列，以及揭露其等拮抗IL-11媒介的訊息傳導之能力—參見例如US 2014/0219919 A1之[0489]至[0490]。而且US 2014/0219919 A1還提供殖株8E2額外的62種親和力成熟的變異體之序列資訊，揭露其等中的61種會拮抗IL-11媒介的訊息傳導—參見US 2014/0219919 A1之表3。WO 2018/109170 A2及WO 2019/238884 A1揭露IL-11媒介的訊息傳導之還另外的例示性抗IL-11R α 抗體拮抗劑。於Widjaja等人, “IL-11 neutralising therapies target hepatic stellate cell-induced

liver inflammation and fibrosis in NASH.” bioRxiv 470062; doi: <https://doi.org/10.1101/470062> 及 WO 2019/238884 A1 內揭露的 X209(亦稱為 Enx209)為 IL-11 媒介的訊息傳導之抗 IL-11R α 抗體拮抗劑，且包含如 WO 2019/238884 A1 之 SEQ ID NO:7 的 VH 區域(本揭露內容之 SEQ ID NO:24)及如 WO 2019/238884 A1 之 SEQ ID NO:14 的 VL 區域(本揭露內容之 SEQ ID NO:25)。WO 2019/238884 A1 內揭露 X209 的人化版本，其包括 hEnx209，其包含如 WO 2019/238884 A1 之 SEQ ID NO:11 的 VH 區域(本揭露內容之 SEQ ID NO:32)及如 WO 2019/238884 A1 之 SEQ ID NO:17 的 VL 區域(本揭露內容之 SEQ ID NO:33)。

【0116】熟悉此藝者很清楚用於生產適合於一特定物種/個體內治療用途的抗體之技術。舉例而言，用於生產適合於人類內治療用途的抗體之程序係描述於 Park and Smolen *Advances in Protein Chemistry* (2001) 56: 369-421 內(該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料)。

【0117】對一特定標靶蛋白(如 IL-11 或 IL-11R α)的抗體可以在模式物種(如嚙齒動物、兔類動物)內產生，以及後續經工程處理俾以改良其等於一特定物種/個體內治療用途的適合性。舉例而言，藉由免疫模式物種而產生的單株抗體之一或多個胺基酸能予以取代以達成更相似於人類生殖系列免疫球蛋白序列的抗體序列(藉此降低用該抗體治療的人類個體內之抗異種基因的抗體免疫反應的可能)。抗體可變異域的修飾可集中在框架區域俾以保留抗體互補位(paratope)。抗體人化為抗體技術技藝例行的實施，以及於例如 Almagro and Fransson, *Frontiers in Bioscience* (2008) 13:1619-1633，Safdari 等人，*Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (2013) 29(2): 175-186 及 Lo 等人，*Microbiology Spectrum* (2014) 2(1) 內有評論，其等全體係以其等之全體藉此併入以作為參考資料。可以藉由在表現人類免疫球蛋白基因之基因轉殖模式物種內產生一特定標靶蛋白(如 IL-11 或 IL-11R α)的抗體，以使得此等動物內產生的抗體為全人類的來規避人化

的需求(描述於例如Brüggemann等人，Arch Immunol Ther Exp (Warsz) (2015) 63(2):101-108內，該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料)。

【0118】 亦可使用噬菌體展示技術來鑑定對一特定標靶蛋白(如IL-11或IL-11R α)的抗體，且為熟悉此藝者熟知的。噬菌體展示於鑑定對人類標靶蛋白之全人類抗體的用途於例如Hoogenboom, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1105-1116及Chan等人，International Immunology (2014) 26(12): 649-657內有評論，其等係以其等之全體藉此併入以作為參考資料。

【0119】 該抗體/片段可為抑制或降低IL-11生物活性之拮抗劑抗體/片段。該抗體/片段可為中和IL-11生物效應之中和性抗體，例如其經由IL-11受體而刺激生產性訊息傳導之能力。中和活性可藉由中和T11小鼠漿細胞瘤細胞株內IL-11誘發的增殖之能力來測量(Nordan, R. P.等人之(1987) *J. Immunol.* 139:813)。

【0120】 IL-11-或IL-11R α 結合抗體能例如使用US 2014/0219919 A1或Blanc等人(*J. Immunol Methods.* 2000 Jul 31 ; 241(1-2) ; 43-59內所述的分析來評估拮抗IL-11媒介的訊息傳導之能力。簡言之，能於活體外評估IL-11-及IL-11R α 結合抗體回應來自合適物種之IL-11的刺激而抑制來自合適物種之表現IL-11R α 及gp130的Ba/F3細胞的增殖能力。任擇地，在用TGF β 1刺激纖維母細胞之後能藉由評估 α SMA表現，於活體外分析IL-11-及IL-11R α 結合抗體抑制纖維母細胞向肌纖維母細胞轉化之能力(如例如於WO 2018/109174 A2(實施例6)及WO 2018/109170 A2(實施例6)，Ng等人，Sci Transl Med. (2019) 11(511) pii: eaaw1237及Widjaja等人，Gastroenterology (2019) 157(3):777-792內所述)。

【0121】 抗體通常包含六個CDRs；三者於輕鏈可變異區域(VL)：LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3，以及三者於重鏈可變異區域(VH)：HC-CDR1、HC-CDR2及HC-CDR3。六個CDRs一起定義抗體之互補位，其為抗體與標靶分子結合的一部分。VH區域和VL區域包含框架區域(FRs)於各CDR的任一方，其

提供 CDRs 之架構。從 N 端至 C 端，VH 區域包含下列結構：N term-[HC-FR1]-[HC-CDR1]-[HC-FR2]-[HC-CDR2]-[HC-FR3]-[HC-CDR3]-[HC-FR4]-C term；且 VL 區域包含下列結構：N term-[LC-FR1]-[LC-CDR1]-[LC-FR2]-[LC-CDR2]-[LC-FR3]-[LC-CDR3]-[LC-FR4]-C term。

【0122】有幾種不同的定義抗體CDRs及FRs之規範，諸如於Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Chothia等人，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)中所述的該等，以及VBASE2，如Retter等人，*Nucl. Acids Res.* (2005) 33 (suppl 1): D671-D674中所述。本文所述之抗體的VH區域及VL區域之CDRs及FRs係依據Kabat系統來定義。

【0123】在一些具體例中，如本揭露內容之抗體或其抗原結合片段係衍生自特異性結合IL-11的抗體(例如Enx108A、Enx203或hEnx203)。在一些具體例中，如本揭露內容之抗體或其抗原結合片段係衍生自特異性結合IL-11R α 的抗體(例如Enx209或hEnx209)。

【0124】如本揭露內容之抗體或其抗原結合片段較佳抑制IL-11媒介的訊息傳導。此抗體/抗原結合片段可描述為IL-11媒介的訊息傳導之拮抗劑，及/或可描述為具有中和IL-11媒介的訊息傳導之能力。

【0125】在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一結合IL-11之抗體的CDRs。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含本文所述之IL-11-結合抗體之CDRs，之CDRs或所衍生的CDRs(例如Enx108A、Enx203或hEnx203)。

【0126】在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入下列CDRs之VH區域：

(1)

具有SEQ ID NO:34的胺基酸序列之HC-CDR1

具有SEQ ID NO:35的胺基酸序列之HC-CDR2

具有SEQ ID NO:36的胺基酸序列之HC-CDR3，

或其之一變異體，其中HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3之一者或多者的一或二或三個胺基酸係以另一個胺基酸取代。

【0127】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入下列CDRs之VL區域：

(2)

具有SEQ ID NO:37的胺基酸序列之LC-CDR1

具有SEQ ID NO:38的胺基酸序列之LC-CDR2

具有SEQ ID NO:39的胺基酸序列之LC-CDR3，

或其之一變異體，其中LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3之一者或多者的一或二或三個胺基酸係以另一個胺基酸取代。

【0128】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入下列CDRs之VH區域：

(3)

具有SEQ ID NO:40的胺基酸序列之HC-CDR1

具有SEQ ID NO:41的胺基酸序列之HC-CDR2

具有SEQ ID NO:42的胺基酸序列之HC-CDR3，

或其之一變異體，其中HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3之一者或多者的一或二或三個胺基酸係以另一個胺基酸取代。

【0129】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入下列CDRs之VL區域：

(4)

具有SEQ ID NO:43的胺基酸序列之LC-CDR1

具有SEQ ID NO:44的胺基酸序列之LC-CDR2

具有SEQ ID NO:45的胺基酸序列之LC-CDR3，

或其之一變異體，其中LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3之一者或多者的一或二或三個胺基酸係以另一個胺基酸取代。

【0130】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入如(1)之CDRs的VH區域及一納入如(2)之CDRs的VL區域。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入如(3)之CDRs的VH區域及一納入如(4)之CDRs的VL區域。

【0131】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一結合IL-11之抗體的VH區域及VL區域。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含本文所述之IL-11-結合抗體之VH區域及VL區域，之VH區域及VL區域或所衍生的VH區域及VL區域(例如Enx108A、Enx203或hEnx203)。

【0132】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VH區域，其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:26的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VL區域，其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:27的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VH區域及一VL區域，該VH區域包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:26的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性，以及該VL區

域包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:27的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0133】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VH區域，其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:22的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VL區域，其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:23的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VH區域及一VL區域，該VH區域包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:22的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性，以及該VL包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:23的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0134】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VH區域，其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:30的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VL區域，其包含一胺基酸序列，

該胺基酸序列與SEQ ID NO:31的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一VH區域及一VL區域，該VH區域包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:30的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性，以及該VL區域包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:31的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0135】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一結合IL-11R α 之抗體的CDRs。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含本文所述之IL-11R α -結合抗體之CDRs，之CDRs或所衍生的CDRs(例如Enx209或hEnx209)。

【0136】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入下列CDRs之VH區域：

(5)

具有SEQ ID NO:46的胺基酸序列之HC-CDR1

具有SEQ ID NO:47的胺基酸序列之HC-CDR2

具有SEQ ID NO:48的胺基酸序列之HC-CDR3，

或其之一變異體，其中HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3之一者或多者之一或二或三個胺基酸係以另一個胺基酸取代。

【0137】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入下列CDRs之VL區域：

(6)

具有SEQ ID NO:49的胺基酸序列之LC-CDR1

具有SEQ ID NO:50的胺基酸序列之LC-CDR2

具有SEQ ID NO:51的胺基酸序列之LC-CDR3，

或其之一變異體，其中LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3之一者或多者的一或二或三個胺基酸係以另一個胺基酸取代。

【0138】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一納入如(5)之CDRs的VH區域及一納入如(6)之CDRs的VL區域。

【0139】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一結合IL-11R α 之抗體的VH區域及VL區域。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含本文所述之IL-11R α -結合抗體之VH區域及VL區域，之VH區域及VL區域或所衍生的VH區域及VL區域(例如Enx209或hEnx209)。

【0140】 在如本發明之一參考胺基酸序列的一或更多個胺基酸(例如本文所述之一CDR序列、VH區域序列或VL區域序列)係由另一個胺基酸取代的具體例中，該等取代可以為舉例而言如下表之保留式取代。在一些具體例中，中間欄位同一塊內的胺基酸為經取代的。在一些具體例中，最右邊的欄位同一行的胺基酸為經取代的：

脂肪族的	非極性	G A P
		I L V
	極性-不帶電的	C S T M
		N Q
	極性-帶電的	D E
		K R
芳香族的		H F W Y

【0141】 在一些具體例中，取代可以為功能上保留型。亦即，在一些具體例中包含該取代的抗體/片段的一或更多種功能性質(如標靶結合)相對於等效未

經取代的分子，可不受該取代影響(或可不實質影響)。

【0142】 在一些具體例中，相對於參考VH區域或VL區域序列之取代可集中於VH區域或VL區域序列之一特定區域或多個區域。舉例而言，相比於參考VH區域或VL區域序列之變異可集中於一或多個框架區域(FR1、FR2、FR3及/或FR4)。

【0143】 如本揭露內容之抗體及抗原結合片段可經設計且使用能與相關的標靶分子結合之單株抗體(mAbs)的序列來製備。亦可使用/提供抗體之抗原結合區域，諸如單鏈可變異片段(scFv)、Fab及Fab2片段。「抗原結合區域」或「抗原結合片段」是抗體的任何片段，其能與該特定抗體特異的標靶結合。

【0144】 在一些具體例中，該抗體/片段包含一種能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的抗體之VL及VH區域。一種抗體之抗原結合區域的VL及VH區域一起構成Fv區域。在一些具體例中，該抗體/片段包含一種能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的抗體之Fv區域或其所組成。該Fv區域可表現為，例如由撓性寡肽共價鍵聯的VH及VL區域之一單鏈。因此，抗體/片段可包含一scFv或其所組成，該scFv包含一種能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的抗體之VL及VH區域。

【0145】 一種抗體之抗原結合區域的VL及輕鏈恆定(CL)區域以及VH區域及重鏈恆定1(CH1)區域一起構成Fab區域。在一些具體例中，該抗體/片段包含一種能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的抗體之Fab區域或其所組成。

【0146】 在一些具體例中，抗體/片段包含能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的整個抗體或其所組成。「整個抗體」係指一種抗體其具有與一免疫球蛋白(Ig)實質相似的結構之結構。不同種類的免疫球蛋白及其等之結構係描述於舉例而言 Schroeder and Cavacini J Allergy Clin Immunol. (2010)

125(202): S41-S52內，該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料。G類型的免疫球蛋白(即IgG)為約150 kDa醣蛋白，其包含二重鏈及二輕鏈。從N-至C-端，重鏈包含一VH接著為包含三個恆定域(CH1、CH2及CH3)之重鏈恆定區域，以及同樣地輕鏈包含一VL接著一CL。免疫球蛋白取決於重鏈而可以分類為IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(例如IgA1、IgA2)、IgD、IgE或IgM。輕鏈可以為卡帕(kappa) (κ)或拉目達(lambda) (λ)。

【0147】 在一些具體例中，本揭露內容之抗體/抗原結合片段包含一種免疫球蛋白重鏈恆定序列。在一些具體例中，一種免疫球蛋白重鏈恆定序列可以是一種人類免疫球蛋白重鏈恆定序列。在一些具體例中，該免疫球蛋白重鏈恆定序列為，或衍生自IgG(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(如IgA1、IgA2)、IgD、IgE或IgM之重鏈恆定序列，例如人類IgG(如hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4)、hIgA(如hIgA1、hIgA2)、hIgD、hIgE或hIgM之重鏈恆定序列。在一些該免疫球蛋白重鏈恆定序列為或衍生自人類IgG1異型(如G1m1、G1m2、G1m3或G1m17)之重鏈恆定序列。

【0148】 在一些具體例中，該免疫球蛋白重鏈恆定序列為或衍生自人類免疫球蛋白G 1恆定(IGHG1; UniProt: P01857-1, v1)之恆定區域序列。在一些具體例中，該免疫球蛋白重鏈恆定序列為，或衍生自人類免疫球蛋白G 1恆定(IGHG1; UniProt: P01857-1, v1)之恆定區域序列，其包含取代K214R、D356E及L358M(即G1m3異型)。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:52的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0149】 在一些具體例中，該免疫球蛋白重鏈恆定序列為或衍生自人類免疫球蛋白G 4恆定(IGHG4; UniProt: P01861, v1)之恆定區域序列。在一些具體例

中，該免疫球蛋白重鏈恆定序列為，或衍生自人類免疫球蛋白G 4恆定(IGHG4; UniProt: P01861, v1)之恆定區域序列，其包含取代S241P及/或L248E。S241P突變為鉸鏈穩定化而L248E突變進一步降低IgG4之已經很低的ADCC效應子功能(Davies and Sutton, Immunol Rev. 2015 Nov; 268(1):139–159；Angal等人之Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8)。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:53的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0150】 在一些具體例中，本揭露內容之抗體/抗原結合片段包含免疫球蛋白輕鏈恆定序列。在一些具體例中，一免疫球蛋白輕鏈恆定序列可以為人類免疫球蛋白輕鏈恆定序列。在一些具體例中，該免疫球蛋白輕鏈恆定序列為或衍生自卡帕(κ)或拉目達(λ)輕鏈，例如人類免疫球蛋白卡帕恆定(IGKC; C κ ; UniProt: P01834-1, v2)，或人類免疫球蛋白拉目達恆定(IGLC; C λ)，例如IGLC1(UniProt: P0CG04-1, v1)、IGLC2(UniProt: P0DOY2-1, v1)、IGLC3(UniProt: P0DOY3-1, v1)、IGLC6(UniProt: P0CF74-1, v1)或IGLC7(UniProt: A0M8Q6-1, v3)。

【0151】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一免疫球蛋白輕鏈恆定序列。在一些具體例中，該免疫球蛋白輕鏈恆定序列為或衍生自人類免疫球蛋白卡帕恆定(IGKC; C κ ; UniProt: P01834-1, v2; SEQ ID NO:90)。在一些具體例中，該免疫球蛋白輕鏈恆定序列為人類免疫球蛋白拉目達恆定(IGLC; C λ)，例如IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6或IGLC7。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一胺基酸序列，該胺基酸序列與SEQ ID NO:54的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含一胺基酸序列，該胺基酸序

列與SEQ ID NO:55的胺基酸序列有至少70%的序列同一性，更佳為至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0152】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含：(i)一包含一胺基酸序列或由一胺基酸序列所組成之多肽，該胺基酸序列與SEQ ID NO:28的胺基酸序列有至少70%，較佳為75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性，以及(ii)一包含一胺基酸序列或由一胺基酸序列所組成之多肽，該胺基酸序列與SEQ ID NO:29的胺基酸序列有至少70%，較佳為75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0153】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含：(i)一包含一胺基酸序列或由一胺基酸序列所組成之多肽，該胺基酸序列與SEQ ID NO:56的胺基酸序列有至少70%，較佳為75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性，以及(ii)一包含一胺基酸序列或由一胺基酸序列所組成之多肽，該胺基酸序列與SEQ ID NO:57的胺基酸序列有至少70%，較佳為75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0154】 在一些具體例中，該抗體/抗原結合片段包含：(i)一包含一胺基酸序列或由一胺基酸序列所組成之多肽，該胺基酸序列與SEQ ID NO:58的胺基酸序列有至少70%，較佳為75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性，以及(ii)一包含一胺基酸序列或由一胺基酸序列所組成之多肽，該胺基酸序列與SEQ ID NO:59的胺基酸序列有至少70%，較佳為75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一者的序列同一性。

【0155】 Fab、Fv、ScFv及dAb抗體片段全部都能在大腸桿菌內表現並從大腸桿菌分泌出，因而方便生產大量的該片段。

【0156】 整個抗體與F(ab')₂片段係「二價」。吾等藉由「二價」一詞來指該抗體與F(ab')₂片段具有二個抗原結合位址。相比之下，Fab、Fv、ScFv及dAb片段係單價，僅具有一個抗原結合位址。能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的合成抗體亦可使用本技藝熟知的噬菌體展示技術來製造。

【0157】 可藉由一種親和力成熟方法來生產抗體，其中所產生的經修飾的抗體與未經修飾的親本抗體相比，抗體對於抗原的親和力有改良。可藉由本技藝已知的程序生產親和力成熟的抗體，如Marks等人，*Rio/Technology* 10:779-783 (1992)；Barbas等人之*Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人之*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人之*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-3319 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

【0158】 抗體/片段包括例如由二個不同的抗體之二個不同片段組成之雙特異性抗體，使得該雙特異性抗體結合二類的抗原。該雙特異性抗體包含如本文所述之一種能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的抗體/片段。該抗體可含對第二抗原有親和力的不同片段，第二抗原可為任何所欲的抗原。製備雙特異性抗體的技術為本技藝熟知的，例如參見Mueller, D等人(2010 *Biodrugs* 24 (2): 89–98)，Wozniak-Knopp G等人(2010 *Protein Eng Des* 23 (4): 289–297)，及Baeuerle, PA等人(2009 *Cancer Res* 69 (12): 4941–4944)。雙特異性抗體及雙特異性抗原結合片段可按任何適宜的形式提供，諸如於Kontermann *MAbs* 2012, 4(2): 182-197內所述的該等格式，該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料。舉例而言，雙特異性抗體或雙特異性抗原結合片段可為一種雙特異性抗體複合物(conjugate) (例如IgG₂、F(ab')₂或CovX-Body)、雙特異性IgG或似IgG分子(例如

IgG、scFv4-Ig、IgG-scFv、scFv-IgG、DVD-Ig、IgG-sVD、sVD-IgG、二合一-IgG、mAb2、或Tandemab共同輕鏈(common LC))、不對稱雙特異性IgG或似IgG分子(例如kih IgG、kih IgG共同輕鏈、CrossMab、kih IgG-scFab、mAb-Fv、電荷對或種子小體(SEED-body))、小型雙特異性抗體分子(例如雙價抗體(Diabody) (Db)、dsDb、DART、scDb、tandAbs、串連(tandem)scFv (taFv)、串連dAb/VHH、三鏈(triple body)、三頭(triple head)、Fab-scFv或F(ab')₂-scFv₂)、雙特異性Fc及CH₃融合蛋白(例如taFv-Fc、二(雙價抗體) (Di-diabody)、scDb-CH₃、scFv-Fc-scFv、HCAb-VHH、scFv-kih-Fc或scFv-kih-CH₃)、或雙特異性融合蛋白(例如scFv₂-白蛋白、scDb-白蛋白、taFv-毒素、DNL-Fab3、DNL-Fab4-IgG、DNL-Fab4-IgG-細胞介素2)。尤其參見Kontermann MAbs 2012, 4(2): 182-19中之圖2。

【0159】 生產雙特異性抗體的方法包括例如，用可還原的雙硫或非可還原的硫醚鍵進行抗體或抗體片段之化學交聯作用，舉例而言如Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1–2.13.16內所述，該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料。舉例而言，可以使用N-琥珀醯亞胺-3-(-2-吡啶二硫代)-丙酸酯(SPDP)、經由鉸鏈區域SH-基團予以化學交聯諸如Fab片段，以創造雙硫鍵聯的雙特異性F(ab)₂異二聚體。

【0160】 其他生產雙特異性抗體的方法包括諸如用聚乙二醇融合生產抗體的融合瘤，來生產能分泌雙特異性抗體的四源雜交瘤細胞，舉例而言如D. M. and Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1–2.13.16內所述。

【0161】 亦可以從諸如一種編碼抗原結合分子的多肽之核酸建構物予以表現而重組地生產雙特異性抗體與雙特異性抗原結合片段，舉例而言如Antibody Engineering: Methods and Protocols，第二版(Humana Press, 2012)，於第40章：

Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Färber-Schwarz), 或French, How to make bispecific antibodies, Methods Mol. Med. 2000 ; 40:333-339之內所述。

【0162】 舉例而言，可藉由分子選殖技術來製備一種編碼二種抗原結合域之輕及重鏈可變異域(即，能結合IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體的抗原結合域之輕及重鏈可變異域，以及能結合另一種標靶蛋白的抗原結合域之輕及重鏈可變異域)，且於抗原結合域之間包括編碼一合適的鏈接子或二聚合域之序列的DNA建構物。重組雙特異性抗體之後能藉由於一合適的宿主細胞(諸如一種哺乳動物宿主細胞)內(諸如於活體外)表現建構物來生產，以及表現的重組雙特異性抗體繼而能選擇性地予以純化。

誘餌受體

【0163】 能結合IL-11或包含IL-11之錯合物的胜肽或多肽為基的製劑可以以IL-11受體，例如IL-11受體之IL-11結合片段為基。

【0164】 在一些具體例中，該結合製劑可包含IL-11R α 鏈的IL-11結合片段，且較佳可為可溶性及/或排除跨膜域之一或多者或全體。在一些具體例中，該結合製劑可包含gp130的IL-11結合片段，且較佳可為可溶性及/或排除跨膜域之一或多者或全體。此等分子可描述為誘餌受體。此等製劑之結合可藉由降低/預防IL-11結合IL-11之受體例如IL-11R α 或gp130的能力來抑制IL-11媒介的順式及/或反式訊息傳導，藉此抑制下游之訊息傳導。

【0165】 Curtis等人(*Blood* 1997 Dec 1 ; 90 (11):4403-12)報導當於表現跨膜IL-11R及gp130的細胞上測試時，一種可溶性鼠類IL-11受體 α 鏈(sIL-11R)能拮抗IL-11活性。其等提議所觀察到的sIL-11R之IL-11拮抗作用係取決於已表現跨膜IL-11R的細胞上的gp130分子極限數量。

【0166】 關於其他訊息傳導分子：受體對，例如VEGF及VEGF受體，使用

可溶性誘餌受體作為抑制訊息傳導及治療性介入的基礎亦已有報導(De-Chao Yu 等人, Molecular Therapy (2012); 20 5, 938-947; Konner and Dupont Clin Colorectal Cancer 2004 Oct; 4 Suppl 2:S81-5)。

【0167】 因此，在一些具體例中，一種結合製劑可為誘餌受體，例如IL-11及/或包含IL-11之錯合物的可溶性受體。據報導誘餌受體所提供之IL-11及/或包含IL-11之錯合物的競爭導致IL-11拮抗劑作用(Curtis 等人，同前)。WO 2017/103108 A1及WO 2018/109168 A1中亦描述誘餌IL-11受體，其等係以其等之全體藉此併入以作為參考資料。

【0168】 誘餌IL-11受體較佳與IL-11及/或包含IL-11之錯合物結合，以及藉此使得此等物種不能用於結合gp130、IL-11R α 及/或gp130:IL-11R α 受體。因此，其等幾乎以依那西普(etanercept)作用為TNF α 的誘餌受體同樣的方式，作用為IL-11及包含IL-11之錯合物的「誘餌」受體。IL-11媒介的訊息傳導與缺少誘餌受體的情況下的訊息傳導位準相比是降低的。

【0169】 誘餌IL-11受體較佳通過一或多種細胞介素結合模組(CBM)s而與IL-11結合。CBM)s為或衍生自或同源於IL-11之天然存在的受體分子之CBM)s。舉例而言，誘餌IL-11受體可包含一或多種CBM)s或由其所組成，該一或多種CBM)s係來自或衍生自或同源於gp130及/或IL-11R α 的CBM)。

【0170】 在一些具體例中，一誘餌IL-11受體可包含一對應於gp130的細胞介素結合模組之胺基酸序列或由其所組成。在一些具體例中，一誘餌IL-11受體可包含一對應於IL-11R α 的細胞介素結合模組之胺基酸序列。於本文中，一種「對應於」一特定的胜肽/多肽的序列之參考區域或序列的胺基酸序列與該參考區域/序列的胺基酸序列，有至少60%，例如至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之一者的序列同一性。

【0171】 在一些具體例中，一誘餌受體可以能夠夠以例如至少100 μ M或更

小，選擇性地為10 μ M或更小、1 μ M或更小、100nM或更小或大約1至100nM之一者的結合親和力與IL-11結合。在一些具體例中，一誘餌受體可包含IL-11結合域的全部或部分且可選擇性地缺少跨膜域的全部或部分。該誘餌受體可選擇性地融合一免疫球蛋白恆定域，例如IgG Fc區域。

抑制劑

【0172】 本發明預期能結合IL-11、包含IL-11之錯合物、IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物之一者或多者，及抑制IL-11媒介的訊息傳導的抑制劑分子之用途。

【0173】 在一些具體例中，該製劑為以IL-11為基的胜肽或多肽為基的結合製劑，例如IL-11的突變體、變異體或結合片段。合適的胜肽或多肽為基的製劑能以不會導致訊息傳導起始方式結合IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)，或其產生次最佳化的訊息傳導。此種IL-11突變體可作用為內生的IL-11之競爭性抑制劑。

【0174】 舉例而言，W147A為IL-11拮抗劑，其中胺基酸147從色胺酸突變成丙胺酸破壞了所謂的IL-11之「位址III」。此突變體能結合IL-11R α ，但gp130同質二聚體之銜接失敗，造成有效的阻斷IL-11訊息傳導(Underhill-Day等人，2003；*Endocrinology* 2003 Aug；144(8):3406-14)。Lee等人(*Am J respire Cell Mol Biol.* 2008 Dec；39(6):739-746)也報導一種能特異地抑制IL-11與IL-11R α 結合之IL-11拮抗劑突變體(「突變蛋白」)的產生。WO 2009/052588 A1內亦描述IL-11突變蛋白。

【0175】 Menkhorst等人(*Biology of Reproduction*，2009年五月1日vol.80 no.5 920-927)描述一種聚乙二醇化IL-11拮抗劑PEGIL11A(CSL Limited, Parkvill, Victoria, Australia)，其於雌性小鼠內有效的抑制IL-11的作用。

【0176】 Pasqualini等人之*Cancer* (2015) 121(14):2411-2421乙文描述一種能

結合IL-11R α 之配體定向、擬肽藥物，骨轉移-靶向擬肽-11(BMTP-11)。

【0177】 在一些具體例中，一種能結合IL-11之受體的結合製劑可以IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物之一者的小分子抑制劑的形式提供。在一些具體例中，一種結合製劑可以IL-11或包含IL-11之錯合物的小分子抑制劑的形式提供，例如於Lay等人，*Int. J. Oncol.* (2012)；41(2): 759-764乙文內所述之IL-11抑制劑，該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料。

適配體

【0178】 在一些具體例中，能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)的製劑為適配體。適配體，亦稱為核酸/胜肽配體，係特徵為以高特異性及高親和力結合標靶分子的能力之核酸或胜肽分子。迄今鑑定的每種適配體幾乎都是非天然存在的分子。

【0179】 對一特定標靶(如IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體)的適配體可藉由配體指數增強系統進化技術 (SELEXTM) 方法或藉由發展SOMAmers(慢解離速率之經修飾的適配體) (Gold L等人之(2010) *PLoS ONE* 5(12):e15004)方法來鑑定及/或生產。適配體及SELEX係描述於Tuerk and Gold, *Science* (1990) 249(4968):505-10，及WO 91/19813內。應用SELEX及SOMAmer技術包括譬如添加模擬胺基酸側鏈的官能基以擴增適配體的化學多樣性。因此可增強及鑑定針對一標靶高親和力的適配體。

【0180】 適配體可以為DNA或RNA分子且可以為單股或雙股。適配體可以包含經化學修飾的核酸，舉例而言其中糖及/或磷酸及/或鹼基為經化學修飾的。此修飾可以改良適配體的穩定性或使適配體更耐降解且可以包括於核糖的2'位置處之修飾。

【0181】 適配體可以熟悉此藝者熟知的方法來合成。舉例而言，適配體可以，例如於固態撐體上化學合成。固相合成可以使用亞磷醯胺化學。簡言之，

固態支撐的核苷酸係予以去三苯甲基化(detritylated)，接著用適當活化的核苷亞磷醯胺予以偶合來形成亞磷酸三酯鍵聯。然後可發生封蓋，接著用氧化劑，典型為碘來氧化亞磷酸三酯。繼而可重複該循環以總成適配體(例如，參見Sinha, N. D. ; Biernat, J. ; McManus, J. ; Köster, H. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 4539 ; 及 Beaucage, S. L. ; Lyer, R. P. (1992). *Tetrahedron* 48 (12): 2223)。

【0182】 合適的核酸適配體可選擇性地具有10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40個核苷酸中之一者的最小長度。合適的核酸適配體可選擇性地具有20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80個核苷酸中之一者的最大長度。合適的核酸適配體可選擇性地具有10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80個核苷酸中之一者的長度。

【0183】 適配體可以為挑選或經工程處理以結合特異性標靶分子的胜肽。胜肽適配體及其等之生產與鑑定方法於Reverdatto等人，*Curr Top Med Chem.* (2015) 15(12):1082-101內有評論，該文係以其之全體藉此併入以作為參考資料。胜肽適配體可選擇性地具有2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸中之一者的最小長度。胜肽適配體可選擇性地具有15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、

41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個胺基酸中之一者的最大長度。合適的胜肽適配體可選擇性地具有2-30、2-25、2-20、5-30、5-25或5-20個胺基酸中之一者的長度。

【0184】 適配體可具有落在nM或pM範圍內的 K_D 's，例如小於500nM、100nM、50nM、10nM、1nM、500pM、100pM中之一者。

IL-11結合製劑之性質

【0185】 如本發明之能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體之製劑可展現下列性質之一者或多者：

- 特異性結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體；
- 以10 μ M或更小，較佳為 $\leq 5\mu\text{M}$ 、 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 500\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 100\text{pM}$ 中之一者的 K_D 結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體；
- 抑制IL-11與IL-11R α 之間的交互作用；
- 抑制IL-11與gp130之間的交互作用；
- 抑制IL-11與IL-11R α :gp130受體錯合物之間的交互作用；
- 抑制IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之間的交互作用。

【0186】 此等性質可藉由以合適的分析法內分析相關製劑來判定，其可能涉及該製劑與合適的對照製劑的性質比較。熟悉此藝者能識別用於特定分析之適當的對照條件。

【0187】 舉例而言，關於測試抗體/抗原結合片段與IL-11/包含IL-11之錯合物/IL-11之受體結合的能力之分析合適的陰性對照，可以是針對一非標靶蛋白的抗體/抗原結合片段(即對IL-11/包含IL-11之錯合物/IL-11之受體不是特異性的抗體/抗原結合片段)。合適的陽性對照可以是已知的、已驗證的(例如商購取得的)IL-11-或IL-11受體結合抗體。對照可屬於要分析的假定存在的IL-11/包含IL-11之錯合物/IL-11受體-結合抗體/抗原結合片段同樣的同型，且可例如具有相

同的恆定域。

【0188】 在一些具體例中，該製劑可以能夠特異地結合IL-11或包含IL-11之錯合物或IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)。一種特異地結合一特定標靶分子之製劑較佳以其與其他非標靶分子結合更大的親和力，及/或更長的持續時間與標靶結合。

【0189】 在一些具體例中，該製劑與IL-11或包含IL-11之錯合物結合的親和力，可高於與IL-6細胞介素家族之一或多個其他成員(如IL-6、白血病抑制因子(LIF)、抑瘤素M(OSM)、心營養素-1(CT-1)、睫狀神經營養因子(CNTF)及心營養素樣細胞介素(CLC))結合的親和力。在一些具體例中，該製劑與IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)結合的親和力，可高於與IL-6受體家族之一或多個其他成員結合的親和力。在一些具體例中，該製劑與IL-11R α 結合的親和力，可高於與IL-6R α 、白血病抑制因子受體(LIFR)、抑瘤素M受體(OSMR)、睫狀神經營養因子受體 α (CNTFR α)及似細胞介素受體因子1(CRLF1)中之一或多者結合的親和力。

【0190】 在一些具體例中，一結合製劑與一非標靶之結合程度係低於該製劑與標靶結合作用之約10%，如藉由ELISA、SPR、生物薄膜干涉技術(BLI)、微量熱泳技術(MST)或藉由放射性免疫分析(RIA)所測得。任擇地，結合特異性可反映在結合親和力上，其中該結合製劑係以比對另一非標靶分子的K_D更大至少0.1數量級數(即0.1 x 10ⁿ，n為表示數量級數的整數)之K_D與IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體結合。此選擇性地可為至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5或2.0中之一者。

【0191】 通常藉由一特定結合製劑的解離常數(K_D)來說明其對其標靶之結合親和力。可藉由本技藝所知的方法測量結合親和力，諸如藉由ELISA、表面電漿共振(SPR；參見例如Hearty等人，*Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442；或Rich

等人，*Anal Biochem.* 2008 Feb 1；373(1):112-20)、生物薄膜干涉技術(參見例如 Lad等人，(2015) *J Biomol Screen* 20(4): 498-507；或Concepcion等人，*Comb Chem High Throughput Screen.* 2009 Sep；12(8):791-800)、微量熱泳(MST)分析(參見例如Jerabek-Willemsen等人，*Assay Drug Dev Technol.* 2011 Aug；9(4): 342–353)，或藉由放射性標記抗原結合分析(RIA)。

【0192】 在一些具體例中，該製劑係以50 μM 或更小，較佳為 $\leq 10 \mu\text{M}$ 、 $\leq 5 \mu\text{M}$ 、 $\leq 4 \mu\text{M}$ 、 $\leq 3 \mu\text{M}$ 、 $\leq 2 \mu\text{M}$ 、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 500 \text{ nM}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 75 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、 $\leq 40 \text{ nM}$ 、 $\leq 30 \text{ nM}$ 、 $\leq 20 \text{ nM}$ 、 $\leq 15 \text{ nM}$ 、 $\leq 12.5 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 9 \text{ nM}$ 、 $\leq 8 \text{ nM}$ 、 $\leq 7 \text{ nM}$ 、 $\leq 6 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 4 \text{ nM}$ 、 $\leq 3 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 500 \text{ pM}$ 、 $\leq 400 \text{ pM}$ 、 $\leq 300 \text{ pM}$ 、 $\leq 200 \text{ pM}$ 或 $\leq 100 \text{ pM}$ 中的一者之 K_D ，與IL-11或包含IL-11之錯合物或IL-11之受體結合。

【0193】 在一些具體例中，該製劑係以 $\text{EC}_{50}=10,000 \text{ ng/ml}$ 或更小(如藉由ELISA所測定)，較佳係下列各者中之一者的結合親和力與IL-11、包含IL-11之錯合物或IL-11之受體結合： $\leq 5,000 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 1000 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 900 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 800 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 700 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 600 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 500 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 400 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 300 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 200 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 100 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 90 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 80 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 70 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 60 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 50 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 40 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 30 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 20 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 15 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 10 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 7.5 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 5 \text{ ng/ml}$ 、 $\leq 2.5 \text{ ng/ml}$ 或 $\leq 1 \text{ ng/ml}$ 。此等ELISAs可以例如於Antibody Engineering, vol. 1 (2nd Edn), Springer Protocols, Springer (2010)，第V部，pp657-665中所述予以執行。

【0194】 在一些具體例中，該製劑係於一區域內與IL-11或包含IL-11之錯合物結合，該區域對結合IL-11或包含IL-11之錯合物的一受體，例如gp130或IL-11R α 是重要的，且藉此抑制IL-11或包含IL-11之錯合物與IL-11之受體之間的交互作用及/或通過該受體的訊息傳導。在一些具體例中，該製劑係於一區域內與IL-11之受體結合，該區域對結合IL-11或包含IL-11之錯合物是重要的，且藉此

抑制IL-11或包含IL-11之錯合物與IL-11之受體之間的交互作用及/或通過該受體的訊息傳導。

【0195】 一特定結合製劑(如能結合IL-11/包含IL-11之錯合物或IL-11之受體之製劑)抑制二種蛋白之間交互作用的能力可以舉例而言藉由分析於該結合製劑存在下，或交互作用伙伴的一或二者與該結合製劑一起孵育之後的交互作用來判定。判定一特定結合製劑是否能抑制二種交互作用伙伴之間交互作用的適宜分析的一實例係競爭ELISA。

【0196】 一種能抑制一特定交互作用(如IL-11與IL-11R α 之間或IL-11與gp130之間或IL-11與IL-11R α :gp130之間或IL-11:IL-11R α 與gp130之間的交互作用)之結合製劑係藉由在該結合製劑存在下，或交互作用伙伴的一或二者與該結合製劑一起孵育之後，觀察交互作用伙伴之間的交互作用位準之降低/減少而鑑定出，其係相較於在該結合製劑不存在下(或在一適當的對照結合製劑存在下)的交互作用位準而言。可在活體外進行適宜的分析，如使用重組型交互作用伙伴或使用表現該等交互作用伙伴之細胞。細胞可能因為內生性之故，或可能因為將核酸導入該細胞中而表現交互作用伙伴。就此等分析的目的而言，為偵測及/或測量交互作用之位準，交互作用伙伴中的一或二者及/或該結合製劑可用可偵測的一實體予以標記或與其一起使用。舉例而言，該製劑可用一放射性原子或一有色分子或一螢光分子或者即可藉由其他任何方式偵測之一分子予以標記。適宜的可偵測分子包括螢光蛋白、螢光素酶、酵素受質及放射性標記。該結合製劑可用一種可偵測的標記直接標記或可間接標記。舉例而言，該結合製劑可為未經標記的，且藉由自身經標記的另一結合製劑來偵測。任擇地，第二結合製劑可能已經結合其生物素且經標記的鏈黴抗生物素蛋白與生物素之結合可用來間接標記第一結合製劑。

【0197】 亦可藉由分析此交互作用的下游功能性結果，如IL-11媒介的訊息

傳導，而判定一結合製劑對於二種結合作伙伴之間的交互作用之抑制能力。舉例而言，IL-11及IL-11R α :gp130之間或IL-11:IL-11R α 及gp130之間的交互作用之下游功能性結果可包括例如IL-11媒介的過程，或是例如膠原蛋白或IL-11之基因/蛋白表現。

【0198】 IL-11或包含IL-11之錯合物與IL-11之受體之間的交互作用之抑制可使用³H-胸苷嵌入及/或Ba/F3細胞增殖分析來分析，諸如例如於Curtis等人之*Blood*, 1997, 90(11)及Karpovich等人之*Mol. Hum. Reprod.* 2003 9(2): 75-80中所述之該等。Ba/F3細胞共表現IL-11R α 及gp130。

【0199】 在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11與IL-11R α 之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11與IL-11R α 之間的交互作用位準的100%，例如99%或更小、95%或更小、90%或更小、85%或更小、75%或更小、70%或更小、65%或更小、60%或更小、55%或更小、50%或更小、45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小、5%或更小、或1%或更小之一者。在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11與IL-11R α 之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11與IL-11R α 之間的交互作用位準的1倍，例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍之一者。

【0200】 在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11與gp130之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11與gp130之間的交互作用位準的100%，例如99%或更小、95%或更小、90%或更小、85%或更小、75%或更小、70%或更小、65%或更小、60%或更小、55%或更小、50%或更小、45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%

或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小、5%或更小、或1%或更小之一者。在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11與gp130之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11與gp130之間的交互作用位準的1倍，例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍之一者。

【0201】 在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11與IL-11R α :gp130之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11與IL-11R α :gp130之間的交互作用位準的100%，例如99%或更小、95%或更小、90%或更小、85%或更小、75%或更小、70%或更小、65%或更小、60%或更小、55%或更小、50%或更小、45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小、5%或更小、或1%或更小之一者。在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11與IL-11R α :gp130之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11與IL-11R α :gp130之間的交互作用位準的1倍，例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍之一者。

【0202】 在一些具體例中，該結合製劑可以能夠抑制IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下(或在適當對照結合製劑存在下)的IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之間的交互作用位準的100%，例如99%或更小、95%或更小、90%或更小、85%或更小、75%或更小、70%或更小、65%或更小、60%或更小、55%或更小、50%或更小、45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小、5%

或更小、或1%或更小之一者。在一些具體例中，該結合製劑能抑制IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之間的交互作用到小於在該結合製劑不存在下的IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之間的交互作用位準的1倍，例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍之一者。

能降低IL-11或IL-11受體之表現的製劑

【0203】 於本發明的態樣中，能抑制IL-11媒介的訊息傳導之該製劑可以能夠預防或降低IL-11、IL-11R α 或gp130中之一或多者的表現。

【0204】 表現可為基因或蛋白表現，且可如本文所述或藉由熟悉此藝者熟知的本技藝方法來判定。可通過一個體的細胞/組織/器官/器官系統予以表現。

【0205】 適宜的製劑可為任何一種，但在一些具體例中，一種能預防或降低IL-11、IL-11R α 或gp130中之一或多者的表現之製劑可以為小分子或寡核苷酸。

【0206】 一種製劑能預防或降低IL-11、IL-11R α 或gp130中之一或多者的表現可能是因為例如透過抑制編碼IL-11、IL-11R α 或gp130的基因之轉錄、抑制編碼IL-11、IL-11R α 或gp130的RNA之轉錄後加工、降低編碼IL-11、IL-11R α 或gp130的RNA之穩定性、促進編碼IL-11、IL-11R α 或gp130的RNA之降解、抑制IL-11、IL-11R α 或gp130多肽的轉錄後加工、降低IL-11、IL-11R α 或gp130多肽的穩定性或促進IL-11、IL-11R α 或gp130多肽的降解。

【0207】 Taki等人之*Clin Exp Immunol* (1998) Apr ; 112(1): 133-138報告在用吲哚美辛(indomethacin)、地塞米松(Dexamethasone)或干擾素 γ (IFN γ)治療後的類風濕性滑膜細胞內IL-11的表現有降低。

【0208】 本發明預期反義核酸預防/降低IL-11、IL-11R α 或gp130的表現之用途。在一些具體例中，一種能預防或降低IL-11、IL-11R α 或gp130的表現之製劑可由RNA干擾(RNAi)導致表現降低。

【0209】 在一些具體例中，該製劑可以為抑制性核酸，例如反義或小干擾RNA，其包括但不限於shRNA或siRNA。

【0210】 在一些具體例中，該抑制性核酸係以載體來提供。舉例而言，在一些具體例中，該製劑可以為編碼IL-11、IL-11R α 或gp130中之一或多者的shRNA之慢病毒載體。

【0211】 寡核苷酸分子，特別是RNA可用於調節基因表現。此等包括反義寡核苷酸、藉由小干擾RNA(siRNAs)之靶向的mRNAs降解、轉錄後基因靜默(PTGs)、藉由微小RNAs(micro-RNAs) (miRNAs)之發育調節的序列特異性mRNA轉譯壓制及靶向轉錄後基因靜默。

【0212】 一種反義寡核苷酸為一寡核苷酸，較佳為單股，其係由互補序列結合而靶向並結合一標靶寡核苷酸，例如mRNA。在標靶寡核苷酸為mRNA的情況下，反義與mRNA結合阻斷了mRNA之轉譯及基因產物表現。反義寡核苷酸可設計成結合意義基因組核酸並抑制標靶核苷酸序列之轉錄。

【0213】 鑒於已知的IL-11、IL-11R α 及gp130的核酸序列(例如可以下列GenBank登錄序號獲得的已知mRNA序列：BC012506.1 GI:15341754(人類IL-11)、BC134354.1 GI:126632002(小鼠IL-11)、AF347935.1 GI:13549072(大鼠IL-11)、NM_001142784.2 GI:391353394(人類IL-11R α)、NM_001163401.1 GI:254281268(小鼠IL-11R α)、NM_139116.1 GI:20806172(大鼠IL-11R α)、NM_001190981.1 GI:300244534(人類gp130)、NM_010560.3 GI:225007624(小鼠gp130)、NM_001008725.3 GI:300244570(大鼠gp130))寡核苷酸可設計成要壓制或靜默IL-11、IL-11R α 或gp130的表現。

【0214】 此等寡核苷酸可具有任何長度，但較佳為短的，例如小於100個核苷酸，例如10-40個核苷酸或20-50個核苷酸，且可包含與對應長度的標靶寡核苷酸，例如IL-11、IL-11R α 或gp130的mRNA，之核苷酸序列有完全或幾乎互補(如

80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互補)的一核苷酸序列。該核苷酸序列之互補區域可具有任何長度，但較佳為至少5個，且可選擇性地不超過50個核苷酸長，例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個核苷酸中之一者。

【0215】 壓制IL-11、IL-11R α 或gp130的表現較佳會導致一細胞/組織/器官/器官系統/個體表現的IL-11、IL-11R α 或gp130數量的減少。舉例而言，於一特定細胞內藉由投予合適的核酸來壓制IL-11、IL-11R α 或gp130會導致該細胞相對於未治療的細胞所表現的IL-11、IL-11R α 或gp130數量的減少。壓制可能是部分的。較佳的壓制程度為至少50%，更佳為至少60%、70%、80%、85%或90%中之一者。壓制位準介於90%及100%之間認為是表現或功能的「靜默」。

【0216】 已經證明了RNAi機制(RNAi machinery)及小RNAs於靶向異染色質錯合物及在特定染色體位點的表觀遺傳基因靜默之角色。雙股RNA(dsRNA)依賴性轉錄後靜默，亦稱為RNA干擾(RNAi)，為dsRNA錯合物在短時間內能為了靜默而靶向特定同源基因的現象。其作用為促進有序列同一性的mRNA之降解的訊息。20-nt siRNA通常對於誘發基因特異性靜默夠長，但對於要逃避宿主反應夠短。一些siRNA分子誘發的靜默可廣達90%靶向基因產物表現的減少。RNAi為基的治療已經進展至一些適應症之第I、II及III期臨床試驗(*Nature* 2009 Jan 22; 457(7228):426-433)。

【0217】 於本技藝中，此等RNA序列取決於其等之來源而稱為「短或小干擾RNAs」(siRNAs)或「微小(microRNAs)」(miRNAs)。二類序列都可藉由結合互補RNAs而用於向下調節基因表現且觸發mRNA消去(RNAi)或阻止mRNA轉譯成蛋白。siRNA係通過長的雙股RNAs加工所衍生的且當在自然界發現時典型為

外生性起源的。微小干擾RNAs(Micro-interfering RNAs) (miRNA)為內生地編碼小的非編碼RNAs，其係通過加工短髮夾所衍生。siRNA及miRNA二者都能在不須RNA裂解下抑制帶有部分互補標靶序列之mRNAs轉譯及降解帶有完全互補序列的mRNAs。

【0218】 siRNA配體典型為雙股且，為了使RNA媒介的標靶基因功能的向下調節之效用最佳化，較佳要挑選siRNA分子的長度以確保媒介辨識mRNA標靶之siRNA的RISC錯合物能正確辨識siRNA並使得siRNA夠短以降低宿主反應。

【0219】 miRNA配體典型為單股且具有部分互補的區域使該配體能形成髮夾。miRNAs為由DNA轉錄的RNA基因，但不轉譯成蛋白。編碼miRNA基因之DNA序列比miRNA更長。此DNA序列包括miRNA序列且接近反向互補物。當此DNA序列轉錄成單股RNA分子時，miRNA序列及其反向互補鹼基對形成部分雙股的RNA節段。John等人，*PLoS Biology*, 11(2), 1862-1879, 2004乙文內有討論微小RNA序列之設計。

【0220】 典型地，打算要模擬siRNA或miRNA效應之RNA配體具有10與40個之間的核糖核苷酸(或其合成類似物)，更佳為17與30個之間的核糖核苷酸，更佳為19與25個之間的核糖核苷酸且最佳為21與23個之間的核糖核苷酸。在本發明使用雙股siRNA的一些具體例中，該分子可具有對稱的3'突出物，例如一或二個(核糖)核苷酸，典型地為dTdT 3'-UU突出物。根據本文提供的揭露內容，熟悉此藝者能很容易地設計合適的siRNA及miRNA序列，舉例而言使用Ambion siRNA尋檢器這樣的資源。siRNA及miRNA序列能以合成方式生產且外源添加以造成使用表現系統(如載體)的基因向下調節或生產。在較佳具體例中，以合成方式合成siRNA。

【0221】 較長的雙股RNAs可於細胞內加工以生產siRNAs(參見舉例而言 Myers (2003) *Nature Biotechnology* 21:324-328)。較長的dsRNA分子可具有對稱的

3'或5'突出物，例如一或二個(核糖)核苷酸，或可具有鈍端。較長的dsRNA分子可為25個核苷酸或更長。較佳地，較長的dsRNA分子為25與30個之間的核苷酸長。更佳地，較長的dsRNA分子為25與27個之間的核苷酸長。最佳地，較長的dsRNA分子的長度為27個核苷酸。30個核苷酸或長度更長的dsRNAs可使用載體pDECAP來表現(Shinagawa等人，Genes and Dev., 17, 1340-5, 2003)。

【0222】 另一種替代方案係於細胞內表現短髮夾RNA分子(shRNA)。shRNAs比合成的siRNAs更穩定。shRNA係由小的環序列所分隔之短的反向重複所組成。一種反向重複係互補於基因標靶。shRNA於細胞內係藉由DICER加工成siRNA，其會降解標靶基因mRNA且抑止表現。在較佳具體例中，shRNA係藉由從載體轉錄而內生地(於細胞內)生產。shRNAs可以於RNA聚合酶III啟動子例如人類H1或7SK啟動子或RNA聚合酶II啟動子的控制下，藉由用編碼shRNA序列的載體轉染細胞而於細胞內生產。任擇地，shRNA可藉由從載體轉錄而外生性地(活體外)合成。shRNA接而可以直接導入該細胞內。較佳地，shRNA分子包含IL-11、IL-11R α 或gp130的部分序列。較佳地，shRNA序列長度係於40與100個鹼基對之間，更佳為於40與70個鹼基對之間。髮夾的莖長度較佳為19與30個鹼基對之間。莖可以包含G-U配對以穩定髮夾結構。

【0223】 siRNA分子、較長的dsRNA分子或miRNA分子可以藉由較佳包含於載體內的核酸序列之轉錄予以重組地製造。較佳地，siRNA分子、較長的dsRNA分子或miRNA分子包含IL-11、IL-11R α 或gp130的部分序列。

【0224】 在一具體例中，siRNA、較長的dsRNA或miRNA係藉由從載體轉錄而內生地(於細胞內)生產。載體可以本技藝所知的任何方法導入至細胞內。選擇性地，可使用組織特異性(例如心臟、肝臟或腎臟特異性)啟動子來調節RNA序列之表現。在另外的具體例中，siRNA、較長的dsRNA或miRNA係藉由從載體轉錄而外生性地(活體外)生產。

【0225】合適的載體可以為寡核苷酸載體其配置成要表現能IL-11、IL-11R α 或gp130壓制的寡核苷酸製劑。此等載體可為病毒載體或質體載體。治療性寡核苷酸可以嵌入病毒載體的基因體內並可操縱地鏈接一種調節序列，例如驅動其之表現的啟動子。術語「可操縱地鏈接」可以包括一選擇的核苷酸序列及調節性核苷酸序列共價鍵聯的情況，以這樣的方式以使核苷酸序列表現處於調節序列的影響或控制之下。因此設若一種形成所選的核苷酸序列之部分或全部的核苷酸序列之轉錄能夠受一調節序列影響，則該調節序列係可操縱地鏈接至所選的核苷酸序列。

【0226】編碼啟動子表現的siRNA序列之病毒載體為本技藝已知的且有益於治療性寡核苷酸的長期表現。實例包括慢病毒(*Nature* 2009 Jan 22 ; 457(7228):426-433)、腺病毒(Shen等人, *FEBS Lett* 2003 Mar 27 ; 539(1-3)111-4)及反轉錄病毒(Barton and Medzhitov *PNAS* , 2002年十一月12日, vol.99, no.23 14943-14945)。

【0227】在其他的具體例中，一載體可配置成要協助遞送治療性寡核苷酸至需要壓制IL-11、IL-11R α 或gp130表現的位址。此載體典型涉及到錯合該寡核苷酸與帶正電的載體(例如陽離子細胞穿透肽、陽離子聚合物及樹枝狀聚合物，以及陽離子脂質)；複合該寡核苷酸與小分子(例如膽固醇、膽酸及脂質)、聚合物、抗體及RNAs；或包封該寡核苷酸於奈米微粒調配物內(Wang等人, *AAPS J.* 2010 Dec ; 12(4): 492-503)。

【0228】在一具體例中，一載體可包含呈意義與反義定向二者的核酸序列，使得當表現為RNA時，意義與反義部分會締合而形成雙股RNA。

【0229】任擇地，siRNA分子可以使用本技藝已知的標準固相或液相合成技術來合成。核苷酸之間的鍵聯可為磷酸二酯鍵或替代方案，舉例而言，下式的鍵聯基團：P(O)S, (硫代酸鹽(thioate))；P(S)S, (二硫代酸鹽(dithioate))；

$P(O)NR'_2$ ； $P(O)R'$ ； $P(O)OR_6$ ；CO；或 $CONR'_2$ ，其中R為H(或鹽)或烷基(1-12C)及 R_6 為烷基(1-9C)，係通過-O-或-S-與鄰接的核苷酸連結。

【0230】除了天然存在的鹼基外還可使用經修飾的核苷酸鹼基，且可賦予包含其等之siRNA分子有利的性質。

【0231】舉例而言，經修飾的鹼基可增加siRNA分子的穩定性，藉此降低靜默所需的量。提供經修飾的鹼基亦可提供比未經修飾的siRNA更加或更不穩定的siRNA分子。

【0232】術語「經修飾的核苷酸鹼基」涵蓋帶有共價修飾的鹼基及/或糖之核苷酸。舉例而言，經修飾的核苷酸包括具有糖的核苷酸，其於3'位置處與經基以外的低分子量有機基團共價附接及於5'位置處與磷酸基以外的低分子量有機基團共價附接。經修飾的核苷酸因而亦可包括2'取代的糖例如2'-O-甲基-；2'-O-烷基；2'-O-烯丙基；2'-S-烷基；2'-S-烯丙基；2'-氟-；2'-鹵素或疊氮基-核糖、碳環糖類似物、 α -變旋異構糖；表異構物(epimeric)糖類例如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖、吡喃糖、呋喃糖及景天庚酮糖。

【0233】經修飾的核苷酸為本技藝已知的且包括烷基化嘌呤及嘧啶、醯化嘌呤及嘧啶，以及其他雜環。此等種類的嘧啶及嘌呤為本技藝已知的且包括假異胞嘧啶、N4,N4-乙醯基胞嘧啶(N4,N4-ethanocytosine)、8-羥基-N6-甲基腺嘌呤、4-乙醯基胞嘧啶、5-(羧基羥基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基胺基甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、肌苷、N6-異戊基-腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鳥糞嘌呤、2,2-二甲基鳥糞嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥糞嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鳥糞嘌呤、5-甲基胺基甲基尿嘧啶、5-甲氧基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、-D-甘露糖Q核苷(-D-mannosylqueosine)、5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-異戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧醋酸甲酯、異尿嘧

啶、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2 硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5 甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧醋酸甲酯、尿嘧啶 5-氧醋酸、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-丙基胞嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5 乙基胞嘧啶、5-丁基尿嘧啶、5-戊基尿嘧啶、5-戊基胞嘧啶及2,6,二胺基嘌呤、甲基異尿嘧啶、1-甲基鳥糞嘌呤、1-甲基胞嘧啶。

【0234】 有關使用RNAi於秀麗隱桿線蟲(*C. elegans*)、果蠅、植物及哺乳動物內靜默基因之方法為本技藝已知的(Fire A,等人, 1998 *Nature* 391:806-811; Fire, A. *Trends Genet.* 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. *RNA interference* 2001. *Genes Dev.* 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M.,等人, *Nature Rev. Genet.* 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. *Chem. Biochem.* 2, 239-245 (2001); Hamilton, A.等人, *Science* 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M.,等人, *Nature* 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., 等人, *Cell* 101, 25-33 (2000); Bernstein, E.,等人, *Nature* 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M.,等人, *Genes Dev.* 15, 188-200 (2001); WO0129058; WO9932619 及Elbashir S M,等人, 2001 *Nature* 411:494-498)。

【0235】 因此，本發明提供的核酸當其適宜地導入以另外的方式表現 IL-11、IL-11R α 或gp130的哺乳動物如人類細胞之內或表現於其內時，能通過 RNAi而抑止IL-11、IL-11R α 或gp130的表現。

【0236】 針對IL-11、IL-11R α 及gp130的核酸序列(例如可以下列GenBank登錄序號獲得的已知 mRNA 序列：BC012506.1 GI:15341754(人類 IL-11)、BC134354.1 GI:126632002(小鼠IL-11)、AF347935.1 GI:13549072(大鼠IL-11)、NM_001142784.2 GI:391353394(人類 IL-11R α)、NM_001163401.1 GI:254281268(小鼠 IL-11R α)、NM_139116.1 GI:20806172(大鼠 IL-11R α)、NM_001190981.1 GI:300244534(人類gp130)、NM_010560.3 GI:225007624(小鼠 gp130)、NM_001008725.3 GI:300244570(大鼠gp130))寡核苷酸可設計成要壓制或靜默IL-11、IL-11R α 或gp130的表現。

【0237】該核酸可與IL-11、IL-11R α 及gp130的mRNA的一部分，例如如GenBank 登錄序號 NM_000641.3 GI:391353405(IL-11)、NM_001142784.2 GI:391353394(IL-11R α)、NM_001190981.1 GI:300244534(gp130)或該mRNA之互補序列所定義者，具有實質的序列同一性。

該核酸可為雙股siRNA。(如熟悉此藝者很清楚且如以下進一步解釋者，siRNA分子亦可包括短的3'DNA序列。)

【0238】任擇地，該核酸可為DNA(通常為雙股DNA)，當於哺乳動物細胞內轉錄時，其產出具有經由一間隙子連結的二種互補部分之RNA，使得該RNA當互補部分彼此雜交時採取髮夾的形式。於哺乳動物細胞內，髮夾結構可藉由酵素DICER而從分子裂解，以產出二種不同、但雜交的RNA分子。

【0239】在一些較佳具體例中，該核酸一般係靶向SEQ ID NOs 4至7(IL-11)中之一者或SEQ ID NOs 8至11(IL-11R α)中之一者的序列。

【0240】預期僅有mRNA轉錄本的單股(即非自雜交的)區域為合適的RNAi標靶。因而提議IL-11或IL-11R α mRNA轉錄本中與SEQ ID Nos 4至7或8至11中之一者表示的序列之其他非常接近的序列亦可能為合適的RNAi標靶。此標靶序列長度較佳為17-23個核苷酸且較佳與SEQ ID Nos 4至7或8至11中之一者重疊至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或全部的19個核苷酸(於SEQ ID Nos 4至7或8至11中之一者的任何一端)。

【0241】因此，本發明提供的核酸當其適宜地導入以另外的方式表現IL-11或IL-11R α 的哺乳動物細胞內或表現於其內時，能通過RNAi而抑止IL-11或IL-11R α 表現，其中該核酸大體上靶向SEQ ID Nos 4至7或8至11中之一者的序列。

【0242】按「大體上靶向」該核酸可靶向與SEQ ID Nos 4至7或8至11重疊的一序列。特別地，該核酸可靶向人類IL-11或IL-11R α 的mRNA內的一序列，其比SEQ ID Nos 4至7或8至11中之一者稍長或稍短(較佳長度為17-23個核苷酸)，但

不是與SEQ ID Nos 4至7或8至11中之一者同一的。

【0243】 一般預料本發明的核酸與標靶序列之間完美的同一性/互補性，雖然是較佳的，但不是必須的。因此，本發明的核酸相較於IL-11或IL-11R α 的mRNA而言可包括一單一失配。然而，一般預料甚至是存在一單一失配都很可能導致效率降低，所以沒有失配是較佳的。當存在時，3'突出物可排除在考慮失配數目範圍之外。

【0244】 術語「互補性」不限於由天然存在的核糖-及/或去氧核糖核苷酸所組成的核酸之間傳統的鹼基對，而且包括非天然核苷酸之本發明的mRNA及核酸之間的鹼基對也包括在內。

【0245】 在一具體例中，該核酸(於此稱為雙股siRNA)包括顯示於SEQ ID NOs 12至15內的雙股RNA序列。在另一具體例中，該核酸(於此稱為雙股siRNA)包括顯示於SEQ ID NOs 16至19內的雙股RNA序列。

【0246】 然而，一般亦預料針對IL-11或IL-11R α mRNA的相同區域之稍短或稍長的序列也是有效的。特別地，一般預料長度介於17與23 bp之間的雙股序列也會是有效的。

【0247】 來自雙股RNA的股可能具有短的3'二核苷酸突出物，其可能是DNA或RNA。相較於3' RNA突出物而言，使用3' DNA突出物對於siRNA活性沒有效應但是會降低該核酸股的化學合成成本(Elbashir等人，2001c)。為此，DNA二核苷酸可能是較佳的。

【0248】 當二核苷酸突出物存在時，其可能是彼此對稱的，雖然這不是必需的。實際上，意義(上)股的3'突出物與RNAi活性不相關，因其不參與mRNA辨識及降解(Elbashir等人，2001a, 2001b, 2001c)。

【0249】 雖然果蠅之RNAi實驗顯示反義3'突出物可能參與mRNA辨識及靶向(Elbashir等人之2001c)，但3'突出物對於哺乳動物細胞內的siRNA之RNAi活性

似乎不是必需的。因而一般認為3'突出物不正確的黏著於哺乳動物細胞內的效應不大(Elbashir等人之2001c；Czauderna等人之2003)。

【0250】 因而siRNA的反義股可以使用任何二核苷酸突出物。儘管如此，二核苷酸較佳為-UU或-UG(或-TT或-TG，設若突出物為DNA)，更佳為-UU(或-TT)。該-UU(或-TT)二核苷酸突出物是最有效的且與轉錄訊息之RNA聚合酶III末端(終止子訊息為TTTTT)是一致的(即能形成其之一部分)。因此，此二核苷酸是最佳的。亦可使用二核苷酸AA、CC及GG，但是較不有效且因而較不佳。

【0251】 再者，3'突出物可從siRNA中完全省略。

【0252】 本發明亦提供單股核酸(於此稱為單股siRNAs)其分別由前述雙股核酸中之一者的組分股所組成，較佳有3'-突出物，但是可選擇性地沒有。本發明亦提供包含成對的此單股核酸之套組，其能於活體外彼此雜交以形成前述雙股siRNAs，其接而可以導入細胞內。

【0253】 本發明亦提供DNA，其當於哺乳動物細胞內轉錄時產出具有二個互補部分之RNA(於此亦稱為shRNA)，其能自雜交來生產一雙股模體，該雙股模體例如包括選自於SEQ ID NOs:12至15或16至19所組成的群組之一序列或是由於一單一鹼基對取代而與前述序列中之任一者有所不同的一序列。

【0254】 互補部分一般將由一間隙子連結，間隙子具有合適的長度及允許二個互補部分彼此雜交的序列。該二個互補(即意義與反義)部分可以任何順序5'-3'連結。間隙子典型地會是一種具有大概4-12個核苷酸，較佳地為4-9個核苷酸，更佳為6-9個核苷酸的短序列。

【0255】 間隙子的5'端(緊接上游的互補部分之3')較佳係由核苷酸-UU-或-UG-所組成，-UU-再次為較佳的(雖然再次地，使用此等特定的二核苷酸不是必須的)。OligoEngine(Seattle, Washington, USA)之pSuper系統推薦使用的合適間

隙子為UUCAAGAGA。在這種及其他情況下，間隙子的末端可在超越SEQ ID NOs12至15或16至19確切的序列以外之少量的(如1或2)鹼基對彼此雜交，例如延長該雙股模體。

【0256】 同樣地，該轉錄的RNA較佳包括來自互補部分下游的3'突出物。再次地，此較佳為-UU或-UG，更佳為-UU。

【0257】 此shRNA分子繼而可於哺乳動物細胞內藉由酵素DICER裂解以產出如上所述的雙股siRNA，其中雜交的dsRNA之一股或各股包括一3'突出物。

【0258】 合成本發明核酸的技術當然為本技藝熟知的。

【0259】 熟悉此藝者有能力使用熟知的技術及商購取得的材料來建構供用於本發明DNA之合適的轉錄載體。特別地，DNA會與對照序列，包括啟動子及轉錄終止序列締合。

【0260】 特別適合的是商購取得的OligoEngine(Seattle, Washington, USA)之pSuper及pSuperior系統。此等使用聚合酶-III啟動子(H1)及T5轉錄終止子序列，其於轉錄本之3'端貢獻二個U殘基(其於DICER加工後，提供siRNA的一股之3' UU突出物)。

【0261】 Shin等人(RNA, 2009年五月；15(5): 898-910)乙文內描述另一合適的系統，其使用另一種聚合酶-III啟動子(U6)。

【0262】 本發明的雙股siRNAs可使用如下文所述之已知的技術，於活體外或活體內導入哺乳動物細胞內，以抑止IL-11或IL-11之受體的表現。

【0263】 同樣地，包含本發明的DNAs之轉錄載體可使用如下文所述之已知的技術，於活體外或活體內導入腫瘤細胞內，用於暫時或穩定表現RNA，再次抑止IL-11或IL-11之受體的表現。

【0264】 因此，本發明亦提供一種抑止一哺乳動物如人類，細胞內的IL-11或IL-11之受體表現的方法，該方法包含投予本發明的一雙股siRNA或本發明的

一轉錄載體給該細胞。

【0265】 同樣地，本發明進一步提供一種治療一代謝性疾病的方法，該方法包含投予本發明的一雙股siRNA或本發明的一轉錄載體給該個體。

【0266】 本發明進一步提供本發明的雙股siRNAs及本發明的轉錄載體供用於一種治療方法，較佳為一種治療一代謝性疾病的方法。

【0267】 本發明進一步提供本發明的雙股siRNAs及本發明的轉錄載體於製備用於治療一代謝性疾病的一藥劑之用途。

【0268】 本發明進一步提供一種組成物，其包含本發明的一雙股siRNA或本發明的一轉錄載體摻合一或更多藥學上可接受的載劑。合適的載劑包括親脂性載體或液胞，其可協助穿透細胞膜。

【0269】 適合投予本發明的siRNA雙螺旋及DNA載體的材料及方法為本技藝熟知的且鑒於RNAi技術的潛力，改進的方法正在開發中。

【0270】 一般而言，有許多技術可用於導入核酸至哺乳動物細胞內。技術的選擇會取決於核酸是於活體外轉移至培養的細胞內或是於活體內轉移至患者的細胞內。合適於活體外轉移核酸至哺乳動物細胞內的技術包括使用脂質體、電穿孔、顯微注射、細胞融合、DEAE、聚葡萄糖及磷酸鈣沉澱。活體內基因轉移技術包括以病毒(典型為反轉錄病毒)載體轉染及病毒外殼蛋白-脂質體媒介的轉染(Dzau等人之(2003) *Trends in Biotechnology* 11, 205-210)。

特別地，適合用於活體外及活體內二者細胞投予本發明的核酸之技術係揭示於下列文章中：

【0271】 General reviews: Borkhardt, A. 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? *Cancer Cell*. 2:167-8. Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*. 418:244-51. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small

interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 3:737-47. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003b. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem.* 10:245-56. Shuey, D.J., D.E. McCallus, and T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today.* 7:1040-6.

【0272】 Systemic delivery using liposomes: Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff, and H. Herweijer. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet.* 32:107-8. Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol.* 20:505-8. Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 9:347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal, and M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol.* 327:761-6.

【0273】 Virus mediated transfer: Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong, and P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther.* 13:2197-201. Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14943-5. Devroe, E., and P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol.* 2:15. Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisziewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. *Am J Pharmacogenomics.* 2:245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh, and P.M. Chaudhary. 2003. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol Ther.* 2:206-10. Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 100:183-8. Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser, and M. Eder. 2003a. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. Cell Cycle. 2:251-7. Shen, C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler, and S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. FEBS Lett. 539:111-4.

【0274】 Peptide delivery: Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. Curr Opin Biotechnol. 11:461-6. Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. 2003. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. Nucleic Acids Res. 31:2717-24. 其他可能合適於遞送siRNA至標靶細胞的技術係以奈米粒子或奈米膠囊為基礎，例如於US專利號6,649,192B及5,843,509B內所述之該等。

抑制IL-11媒介的訊息傳導

【0275】 在本發明的具體例中，能抑制IL-11作用之製劑可擁有下列功能性質之一者或多者：

- 抑制IL-11媒介的訊息傳導；
- 抑制IL-11與IL-11R α :gp130受體錯合物之結合所媒介的訊息傳導；
- 抑制IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之結合所媒介的訊息傳導(即IL-11反式訊息傳導)；
- 抑制IL-11所媒介的過程；
- 抑制IL-11及/或IL-11R α 之基因/蛋白表現。

【0276】 此等性質可藉由以合適的分析法分析相關的製劑來判定，該分析法可能涉及該製劑對合適的對照製劑的性質之比較。熟悉此藝者能識別用於特定分析的適當對照條件。

【0277】 IL-11媒介的訊息傳導及/或IL-11媒介的過程包括IL-11的片段及包

含IL-11之多肽錯合物或其片段所媒介的訊息傳導。IL-11媒介的訊息傳導可為人類IL-11及/或小鼠IL-11所媒介的訊息傳導。IL-11所媒介的訊息傳導可在IL-11或包含IL-11之錯合物與IL-11或該錯合物要結合的受體結合後發生。

【0278】 在一些具體例中，一種製劑可以能夠抑制IL-11或包含IL-11之錯合物的生物活性。

【0279】 在一些具體例中，該製劑為通過包含IL-11R α 及/或gp130例如IL-11R α :gp130，之受體的訊息傳導所活化的一或多種訊息傳導途徑之拮抗劑。在一些具體例中，該製劑能抑制通過包含IL-11R α 及/或gp130例如IL-11R α :gp130，之一或多種免疫受體錯合物的訊息傳導。於本發明的各種態樣中，本文提供的製劑能抑制IL-11媒介的順式及/或反式訊息傳導。在依據本發明的各種態樣之一些具體例中，本文提供的製劑能抑制IL-11媒介的順式訊息傳導。

【0280】 在一些具體例中，該製劑可以能夠抑制IL-11媒介的訊息傳導到小於在該製劑不存在下(或在適當對照製劑存在下)的訊息傳導位準的100%，例如99%或更小、95%或更小、90%或更小、85%或更小、80%或更小、75%或更小、70%或更小、65%或更小、60%或更小、55%或更小、50%或更小、45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小、5%或更小、或1%或更小之一者。在一些具體例中，該製劑能降低IL-11媒介的訊息傳導到小於在該製劑不存在下(或在適當對照製劑存在下)的訊息傳導位準的1倍，例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍之一者。

【0281】 在一些具體例中，IL-11媒介的訊息傳導可為藉由IL-11與IL-11R α :gp130受體結合所媒介的訊息傳導。此訊息傳導可例如藉由用IL-11來治療表現IL-11R α 及gp130的細胞來分析，或藉由刺激表現IL-11R α 及gp130的細胞

生產IL-11來分析。

【0282】 一種抑制IL-11媒介的訊息傳導的製劑之 IC_{50} 可例如藉由以下方式來測定：在人類IL-11及該製劑存在下培養表現IL-11R α 及gp130之Ba/F3細胞，及測量嵌入DNA內的³H胸苷。在一些具體例中，該製劑在此一分析法中可展現10 μ g/ml或更小，較佳 $\leq 5 \mu$ g/ml、 $\leq 4 \mu$ g/ml、 $\leq 3.5 \mu$ g/ml、 $\leq 3 \mu$ g/ml、 $\leq 2 \mu$ g/ml、 $\leq 1 \mu$ g/ml、 $\leq 0.9 \mu$ g/ml、 $\leq 0.8 \mu$ g/ml、 $\leq 0.7 \mu$ g/ml、 $\leq 0.6 \mu$ g/ml或 $\leq 0.5 \mu$ g/ml之一者的 IC_{50} 。

【0283】 在一些具體例中，IL-11媒介的訊息傳導可為由IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之結合所媒介的訊息傳導。在一些具體例中，IL-11:IL-11R α 錯合物可能為可溶的，例如IL-11R α 及IL-11之細胞外域之錯合物或可溶性IL-11R α 同功型/片段及IL-11之錯合物。在一些具體例中，該可溶性IL-11R α 係IL-11R α 的一種可溶性(分泌性)同功型或為細胞膜結合型IL-11R α 的細胞外域之蛋白水解裂解所釋出的產物。

【0284】 在一些具體例中，IL-11:IL-11R α 錯合物可為細胞結合的，例如細胞膜結合的IL-11R α 及IL-11之錯合物。由IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之結合媒介的訊息傳導可藉由用IL-11:IL-11R α 錯合物，例如包含IL-11由胜肽鏈接子連結至IL-11R α 之細胞外域的重組融合蛋白，如超IL-11來治療表現gp130之細胞來分析。超IL-11係使用IL-11R α (由域1至3所組成之胺基酸殘基1至317；UniProtKB: Q14626)及IL-11(UniProtKB: P20809之胺基酸殘基22至199)片段連同20胺基酸長的鏈接子(SEQ ID NO: 20)來建構。超IL-11之胺基酸序列係顯示於SEQ ID NO: 21內。

【0285】 在一些具體例中，該製劑可以能夠抑制由IL-11:IL-11R α 錯合物與gp130之結合所媒介的訊息傳導，且亦能抑制由IL-11與IL-11R α :gp130受體之結合所媒介的訊息傳導。

【0286】 在一些具體例中，該製劑可以能夠抑制IL-11所媒介的過程。

【0287】 在一些具體例中，該製劑可以能夠抑制IL-11及/或IL-11R α 之基因/蛋白表現。基因及/或蛋白表現可如本文所述或藉由熟悉此藝者熟知的本技藝方法來測量。

【0288】 在一些具體例中，該製劑可以能夠抑制IL-11及/或IL-11R α 之基因/蛋白表現到小於在該製劑不存在下(或在適當對照製劑存在下)的表現位準的100%，例如99%或更小、95%或更小、90%或更小、85%或更小、80%或更小、75%或更小、70%或更小、65%或更小、60%或更小、55%或更小、50%或更小、45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小、5%或更小、或1%或更小之一者。在一些具體例中，該製劑能抑制IL-11及/或IL-11R α 之基因/蛋白表現到小於在該製劑不存在下(或在適當對照製劑存在下)的表現位準的1倍，例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍之一者。

代謝性疾病之治療/預防

【0289】 本發明提供用於治療及/或預防代謝性疾病，例如如本文所述者之代謝性疾病的方法及物件(製劑及組成物)。

【0290】 治療係藉由抑制IL-11媒介的訊息傳導(即拮抗IL-11媒介的訊息傳導)來達成。亦即，本發明提供通過抑制例如一細胞、組織/器官/器官系統/個體內IL-11媒介的訊息傳導，來治療/預防代謝性疾病。在一些具體例中，依據本揭露內容之抑制IL-11媒介的訊息傳導包含抑制肝的細胞(如肝細胞)之IL-11媒介的訊息傳導。

【0291】 因而，本發明提供一種能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑供用於一治療或預防一代謝性疾病的方法。

【0292】 亦提供一種能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑的用途，供用於製造一藥劑用於一治療或預防一代謝性疾病的方法。

【0293】 進一步提供一種治療或預防一代謝性疾病的方法，該方法包含投予一治療有效量的一能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑給需要治療的一個體。

【0294】 本發明之用途延伸至任何代謝性疾病之治療/預防。本發明亦提供由一代謝性疾病導致或加劇之疾病/病況的治療/預防。在一些具體例中，本發明提供一個體的疾病/病況之治療/預防，其中一代謝性疾病於該個體提供了不良預後。

【0295】 在一些具體例中，要治療/預防的一代謝性疾病於受該代謝性疾病影響的器官/組織/個體內，例如與正常的器官/組織/個體(即沒有該代謝性疾病)相比，可以特徵為IL-11及/或IL-11R α 的表現(即基因及/或蛋白表現)增加。

【0296】 如本發明之一代謝性疾病的治療/預防可以屬於與IL-11向上調節有關連之一代謝性疾病，例如於顯現或可能發生該疾病的症狀之細胞或組織中的IL-11向上調節，或細胞外IL-11或IL-11R α 的向上調節。

【0297】 該代謝性疾病可影響任何組織或器官或器官系統。在一些具體例中，該代謝性疾病可影響若干組織/器官/器官系統。

【0298】 在一些具體例中，該代謝性疾病影響下列之一或多者：肝臟、胰臟、心血管系統、消化系統、排泄系統、呼吸系統、腎臟系統、生殖系統、循環系統、肌肉系統、內分泌系統、外分泌系統、淋巴系統、免疫系統、神經系統及/或骨骼系統。

【0299】 依據本文所揭示的各種態樣，在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝功能降低或肝臟的細胞(如肝細胞)功能降低，相對於在代謝性疾病不存在下的功能。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為(例如血清的)增加的ALT及/

或AST的位準及/或降低的GSH的位準，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。

【0300】 在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟發炎及/或纖維化。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞(如肝細胞)的促炎性及/或促纖維化因子(例如IL-11、IL-6、CCL2及/或CCL5)之基因/蛋白表現增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞之膠原蛋白基因/蛋白表現增加及/或肝臟的膠原蛋白含量增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。

【0301】 在一些具體例中，代謝性疾病的特徵為增加的肝臟肌纖維母細胞之數目/比例，其是相對於在代謝性疾病不存在下的肝臟肌纖維母細胞之數目/比例而言。

【0302】 在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞(如肝細胞)之細胞凋亡及/或壞死增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為細胞凋亡及/或壞死的肝細胞的數目/比例增加，相對於在代謝性疾病不存在下的數目/比例。

【0303】 在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞(如肝細胞)之脂肪酸合成酶(FASN)的基因/蛋白表現增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞(如肝細胞)之活性含氧物(ROS)的位準增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞(如肝細胞)之NOX4基因/蛋白表現增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟的細胞(如肝細胞)之ERK及/或JNK活化位準增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。

【0304】 在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟或肝臟的細胞(如肝細胞)之三酸甘油酯位準增加，相對於在代謝性疾病不存在下的位準。在一些具體

例中，代謝性疾病係特徵為高血糖症。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為高三酸甘油脂血症。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為高膽固醇血症。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為體重增加，相對於在代謝性疾病不存在下的體重。在一些具體例中，代謝性疾病係特徵為肝臟重量增加，相對於在代謝性疾病不存在下的肝臟重量。

【0305】 治療可能對降低/延遲/預防一代謝性疾病的發展或進展是有效的。治療可能對降低/延遲/預防一代謝性疾病的一或多個症狀之惡化是有效的。治療可能對改良一代謝性疾病的一或多個症狀是有效的。治療可能對一代謝性疾病的一或多個症狀之嚴重性降低及/或逆轉是有效的。治療可能對一代謝性疾病的效應之逆轉是有效的。

【0306】 預防可指預防一代謝性疾病的發展，及/或預防一代謝性疾病的惡化，例如預防一代謝性疾病進展，例如至晚期/慢性期。

【0307】 依據本發明的各種態樣，如本發明之治療及/或預防一代謝性疾病的方法可包含以下中之一或多者：

降低血脂位準；

降低血糖位準；

增加(例如葡萄糖不耐個體之)葡萄糖耐受性；

增加(例如胰島素抗性個體之)胰島素耐受性；

增加胰臟功能

降低(例如超重/肥胖個體之)體重；

減少體脂肪質量；

增加瘦體質量；

降低空腹血糖位準；

降低血清三酸甘油酯位準；

降低血清膽固醇位準；

增加葡萄糖耐受性；

增加胰臟功能(例如外分泌及/或內分泌功能)；

增加胰臟組織生長；

使胰臟組織再生；

增加胰臟重量；

抑制PSC的PSC向肌纖維母細胞之轉化；

降低胰臟內肌纖維母細胞的數目/比例；

降低胰臟羥基脯胺酸位準；

降低胰臟膠原蛋白位準；

降低胰損壞；

減少胰島細胞增生；

降低升糖素表現；

增加胰島素表現；

增加(例如具有消耗病，例如惡病質之個體之)體重；

降低肝臟中IL-11蛋白之表現；

減少肝臟內的Erk活化；

降低肝臟內的JNK活化；

降低肝臟內的凋亡蛋白酶-3裂解；

降低肝臟內的ROS位準；

降低肝臟內的NOX4表現；

降低例如肝臟之脂肪變性；

降低肝臟三酸甘油酯位準；

降低脂肪酸合成酶表現；

降低血清ALT及/或AST位準；

降低促炎性因子(例如TNFa、CCL2、CCL5、IL-6、CXCL5及/或CXCL1)之表現；

降低促纖維化因子(例如IL-11、TIMP1、ACTA2、TGFβ1、MMP2、TIMP2、MMP9、COL1A2、COL1A1及/或COL3A1)之表現；

降低血清TGFβ1位準；

降低HSCs之IL-11、ACTA2、MMP2、TGFβ1、PDGF、ANG II、bFGF、CCL2及/或H₂O₂的表現/產生；

抑制HSC的HSC向肌纖維母細胞之轉化；

降低肝臟中肌纖維母細胞之數目/比例；

降低肝臟羥基脯氨酸位準；

降低肝臟膠原蛋白位準；

增加肝功能；

增加血清GSH位準；

增加受代謝性疾病影響之器官/組織的功能；

降低肝損壞；

降低肝細胞死亡；

降低由於脂肪毒性之細胞死亡；

降低肝細胞內IL-11媒介的訊息傳導；及

降低肝臟中CD45+細胞之數目/比例。

【0308】 依據本文所述之各種態樣及具體例，一種代謝性疾病的治療/預防具體包含抑制、降低或預防，例如一特定器官系統/器官/組織/細胞類型內的脂肪毒性。在一些具體例中，一種代謝性疾病的治療/預防包含抑制/降低/預防肝臟，例如肝細胞內的脂肪毒性。

投予

【0309】 一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑較佳係以「治療有效」或「預防有效」量投予，此量足以顯示對個體之益處。

【0310】 投予的實際量及投予的速率及時間過程會取決於疾病的本質及嚴重性及該製劑的本質。治療的處方，例如決定劑量等等，係在普通科醫生及其他醫生的責任範圍內，並且典型地要考慮要治療的疾病/障礙、個別個體的狀況、遞送的位置、投予的方法以及開業醫生已知的其他因素。以上提及的技術與程序之實例可以於Remington's Pharmaceutical Sciences，第20版，2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins內找到。

【0311】 可以提供多重劑量的製劑。一或多劑量或是各劑量可以伴隨著另一種治療製劑之同時或相繼投予。

【0312】 多重的劑量可以相隔預定的時間間隔，時間間隔可以選自於下列中之一者：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天，或是1、2、3、4、5或6個月。作為舉例，可以每7、14、21或28天(加或減3、2或1天)給予劑量一次。

【0313】 於治療應用方面，能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑較佳與熟習此項技術者熟知的一或多種其他藥學上可接受的成分一起調配為藥劑或藥品，該等藥學上可接受的成分，包括但不限於：藥學上可接受的載劑、佐劑、賦形劑、稀釋劑、填充劑、緩衝劑、防腐劑、抗氧化劑、潤滑劑、穩定劑、增溶劑、界面活性劑(例如潤濕劑)、掩蔽劑、著色劑、調味劑及甜味劑。

【0314】 如本文所用，術語「藥學上可接受的」係關於化合物、成分、材料、組成物、劑量形式等，其在合理的醫療判斷之範疇內，適用於與所討論之個體(例如人類)的組織接觸而無過度毒性、刺激、過敏性反應或其他問題或併發

症，與合理的益處/風險比相匹配。各載劑、佐劑、賦形劑等必須在與調配物之其他成分相容的意義上亦為「可接受的」。

【0315】合適的載劑、佐劑、賦形劑等可見於標準醫藥教材，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990；及 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第2版, 1994。

【0316】調配物可藉由藥劑學技藝中熟知之任何方法來製備。此類方法包括使活性化合物與構成一或多種附屬成分之載劑締合的步驟。一般而言，調配物藉由均一地且緊密地使活性化合物與載劑(例如液體載劑、細粉狀固體載劑等)締合，且隨後必要時使產物進行成形來製備。

【0317】該組成物可以予以製備供局部、非經腸、全身性、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內、眼內、結膜內、皮下的、口服或經皮之投予途徑，經皮之投予途徑可包括注射。可注射的調配物可包含所選製劑配於無菌或等滲透壓性介質中。可根據製劑及要治療的疾病來選擇調配物及投予模式。

IL-11及IL-11之受體的偵測

【0318】本發明的一些態樣及具體例係關於偵測從一個體獲得的樣本內之 IL-11或IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)的表現。

【0319】在一些態樣及具體例中，本發明係關於IL-11或IL-11之受體(如編碼各別的IL-11或IL-11之受體的蛋白或寡核苷酸)的向上調節表現(過度表現)且偵測此向上調節作為用能抑制IL-11作用之製劑或用能預防或降低IL-11或IL-11之受體的表現之製劑來治療的適合性之指示劑。

【0320】向上調節表現包含比一特定類型的細胞或組織通常預料的位準更大位準的表現。向上調節可藉由測量一細胞或組織內相關因子的表現位準來判定。從個體獲得的一細胞或組織樣本的表現位準與相關因子的表現參考位準，

例如代表相同或對應的細胞或組織類型之相關因子的正常表現位準之值或值域，之間可以進行比較。在一些具體例中，參考位準可藉由偵測對照樣本內例如從健康個體或從同一個體的健康組織的對應的細胞或組織內，的IL-11或IL-11之受體的表現來判定。在一些具體例中，可從標準曲線或資料集獲得參考位準。

【0321】 表現位準可定量用於絕對比較，或可以進行相對比較。

【0322】 在一些具體例中，當測試樣本的表現位準為參考位準的表現位準之至少1.1倍時，IL-11或IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)之向上調節可認為是存在的。更佳地，表現位準可選自於參考位準的表現位準之至少1.2、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少1.6、至少1.7、至少1.8、至少1.9、至少2.0、至少2.1、至少2.2、至少2.3、至少2.4至少2.5、至少2.6、至少2.7、至少2.8、至少2.9、至少3.0、至少3.5、至少4.0、至少5.0、至少6.0、至少7.0、至少8.0、至少9.0、或至少10.0倍中之一者。

【0323】 可藉由一些已知的活體外分析技術中之一者來判定表現位準，例如PCR為基的分析法、原位雜交分析、流動式細胞測量術分析、免疫學或免疫細胞化學分析。

【0324】 作為舉例，合適的技術涉及一種偵測一樣本內之IL-11或IL-11之受體位準的方法，其係藉由使該樣本與一種能結合IL-11或IL-11之受體之製劑接觸且偵測該製劑與IL-11或IL-11之受體形成的錯合物。該製劑可能為任何合適的結合分子，例如一抗體、多肽、胜肽、寡核苷酸、適配體或小分子，且可選擇性地標記以允許偵測，例如視覺化形成的錯合物。合適的標記及其等之偵測手段為熟悉此藝者熟知的且包括螢光標記(例如螢光素、玫瑰紅、曙紅及NDB、綠螢光蛋白(GFP)、稀土族如鎔(Eu)、鉕(Tb)及釷(Sm)之螯合物、四甲基玫瑰紅、紅色螢光染劑(Texas Red)、4-甲基繖形酮、7-胺基-4-甲基香豆素、Cy3、Cy5)、同位素標識、放射性同位素(例如 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S)、化學發光標記(例如吡啶酯

(acridinium ester)、發光胺(luminol)、異發光胺)、酵素(例如過氧化物酶、鹼性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶)、抗體、配體及受體。偵測技術為熟悉此藝者熟知的且可挑選以與標記製劑相對應。合適的技術包括寡核苷酸標籤之PCR擴增、質譜法、於例如藉由報告基因蛋白之受質的酵素轉化後偵測螢光或顏色，或偵測放射性。

【0325】 分析可予以配置成要定量一樣本內之IL-11或IL-11之受體的量。從一測試樣本內之IL-11或IL-11之受體的定量的量可與參考值相比，且該比較用來判定該測試樣本是否含有比參考值的IL-11或IL-11之受體的量更高或更低的IL-11或IL-11之受體的量達一定程度的統計顯著性。

【0326】 偵測的IL-11或IL-11之受體的定量可用於判定編碼IL-11或IL-11之受體的基因之向上或向下調節或擴增。在測試樣本含纖維化細胞的情況下，此種向上調節、向下調節或擴增可與參考值相比以判定是否存在任何統計上顯著的差異。

【0327】 從個體獲得的樣本可為任何一種。一生物樣本可以取自於任何組織或身體的流體，例如一血液樣本、血液衍生的樣本、血清樣本、淋巴樣本、精液樣本、唾液樣本、滑液樣本。血液衍生的樣本可選自於患者血液選出的部分，例如包含挑選的細胞的部分或血漿或血清部分。一樣本可以包含一組織樣本或活體組織切片；或自個體單離的細胞。樣本可以藉由已知的技術來採集，例如活體組織切片或針抽吸。樣本可以儲存及/或加工用於後續IL-11表現位準之判定。

【0328】 樣本可以用於判定取得樣本的個體內之IL-11或IL-11之受體的向上調節。

【0329】 在一些較佳具體例中，樣本可以為取自於受代謝性疾病影響之組織/器官的一組織樣本例如活體組織切片。一樣本可以包含細胞。

【0330】可根據該個體有IL-11或IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)表現的向上調節位準之判定來選擇一個體用於如本發明之療法/預防。IL-11或IL-11之受體的向上調節表現可作為合適用一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑的治療之一代謝性疾病的標識。

【0331】向上調節可能是在一特定的組織內或於一特定的組織所挑選的細胞內。較佳的組織可以為肝組織或胰組織。亦可判定循環流體，例如血液或血液衍生的樣本之IL-11或IL-11之受體的向上調節表現。向上調節可能是細胞外IL-11或IL-11R α 。在一些具體例中，表現可能是局部或全身性地向上調節。

【0332】於選擇後，一個體可投予一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑。

診斷及預後

【0333】IL-11或IL-11之受體(如IL-11R α 、gp130、或包含IL-11R α 及/或gp130之錯合物)的向上調節表現之偵測亦可用於一種診斷一代謝性疾病，鑑定處於發展一代謝性疾病的風險之一個體的方法中，及預後或預測一個體對用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療的反應的方法中。

【0334】「發展(Developing)」、「發展(development)」及其他形式的「發展(develop)」可指一障礙/疾病的開始或一障礙/疾病的延續或進展。

【0335】在一些具體例中，一個體可以例如根據個體身體內或個體身體挑選的細胞/組織內存在指示一代謝性疾病的其他症狀，而為疑似有或患有一代謝性疾病，或例如因為遺傳素因或暴露於已知為一代謝性疾病的風險因子的環境條件，而認為處於發展一代謝性疾病的風險。判定IL-11或IL-11之受體的向上調節表現可證實一種診斷或疑似診斷，或可證實該個體係處於發展一代謝性疾病的風險。該判定亦可診斷一代謝性疾病或作為適合用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療的素因。

【0336】 因此，可提供一種針對有或疑似有一代謝性疾病之一個體提供一預後的方法，該方法包含判定從該個體獲得的一樣本內的IL-11或IL-11之受體表現是否是向上調節的，以及根據該判定，提供用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑的治療之該個體的預後。

【0337】 在一些態樣中，診斷的方法或預後或預測個體對用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療反應的方法可不需要判定IL-11或IL-11之受體的表現，而可能是以判定該個體內可預測表現或活性向上調節之遺傳因子為根據。此等遺傳因子可包括判定IL-11、IL-11R α 及/或gp130之基因突變、單核苷酸多型性(SNPs)或基因擴增，其等係相關於及/或可預測表現或活性及/或IL-11媒介的訊息傳導之向上調節。使用遺傳因子來預測疾病狀態的素因或對治療的反應為本技藝已知的，例如參見Peter Stärkel Gut 2008；57:440-442；Wright等人，Mol. Cell. Biol. March 2010 vol. 30 no. 6 1411-1420。

【0338】 遺傳因子可藉由熟悉此藝者已知的方法來分析，包括PCR為基的分析法，例如定量PCR、競爭性PCR。藉由判定例如從一個體獲得的樣本內遺傳因子的存在，可證實一診斷，及/或一個體可分類為處於發展一代謝性疾病的風險，及/或一個體可鑑定為適用於一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療。

【0339】 一些方法可能包含判定與IL-11分泌或與一代謝性疾病發展的感受性有關聯之一或多種SNPs存在。SNPs通常為雙對偶基因且因而能很容易地使用熟悉此藝者已知的一些慣用分析法中之一者來判定(例如參見Anthony J. Brookes. The essence of SNPs. Gene 第234卷，第2期，1999年七月8日，177-186；Fan等人，Highly Parallel SNP Genotyping. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2003. 68: 69-78；Matsuzaki等人，Parallel Genotyping of Over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. Genome Res. 2004. 14: 414-425)。

【0340】 該方法可包含判定從一個體獲得的樣本內存在SNP對偶基因。在一些具體例中，判定存在次要對偶基因可能與增高的IL-11分泌或與一代謝性疾病發展的感受性有關聯。

【0341】 因此，於本發明的一個態樣中提供一種篩選一個體的方法，該方法包含：

從該個體獲得一核酸樣本；

判定該樣本於WO 2017/103108 A1(併入於此以作為參考資料)的圖33、圖34或圖35內列出的一或多種SNPs之多型核苷酸位置處存在哪個對偶基因，或與列出的SNPs中之一者有 $r^2 \geq 0.8$ 之連鎖不平衡的一SNP。

【0342】 該判定步驟可包含判定該樣本內次要對偶基因是否存在於挑選的多型核苷酸位置處。其可包含判定0、1或2個次要對偶基因是否存在。

【0343】 該篩選方法可以為一種判定該個體發展一代謝性疾病之感受性的方法或一種如本文所述之診斷或預後的方法，或形成其之一部分。

【0344】 該方法可進一步包含鑑定該個體為有發展一代謝性疾病之感受性、或增高的風險之步驟，例如設若該個體經判定於多型核苷酸位置具有一次要對偶基因。該方法可進一步包含下列步驟：挑選用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療的個體及/或投予一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑給該個體俾以於該個體內提供一種用於一代謝性疾病的治療或俾以於該個體內預防一代謝性疾病的發展或進展。

【0345】 在一些具體例中，一種診斷一代謝性疾病，鑑定處於發展一代謝性疾病的風險之個體的方法，及預後或預測一個體對用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療的反應的方法，使用不是偵測IL-11或IL-11之受體或遺傳因子的向上調節表現之指示劑。

【0346】 在一些具體例中，一種診斷一代謝性疾病，鑑定處於發展一代謝

性疾病的風險之個體的方法，及預後或預測一個體對用一能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑之治療的反應的方法，係根據偵測、測量及/或鑑定代謝功能的一或多種指示劑。

【0347】 診斷或預後方法可於活體外對獲自個體之樣本執行，或在獲自個體之樣本加工之後執行。一旦採集樣本，活體外診斷或預後方法執行時並不需要患者在場且因而該方法可以為一種不於人類或動物體實施的方法。從個體獲得的樣本可如上文所描述為任何一種。

【0348】 其他的診斷或預後測試可與本文所述的該等聯合使用以提升診斷或預後的準確度或用於證實使用本文所述之測試所獲得的結果。

個體

【0349】 個體可以為動物或人類。個體較佳為哺乳動物，更佳為人類。個體可為非人類哺乳動物，但更佳為人類。個體可為雄性或雌性。個體可為患者。

【0350】 患者可能有如本文所述的代謝性疾病。個體可能已診斷為有需要治療之代謝性疾病，可能疑似有此類代謝性疾病，或可能處於發展代謝性疾病的風險。

【0351】 於如本發明之具體例中，個體較佳為人類個體。於如本發明之具體例中，可以根據代謝性疾病的某些標誌的特徵化來挑選依據該方法治療的個體。

提供的其他方法及用途

【0352】 本發明亦提供一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑供用於下列的一方法中，或一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑於下列的一方法中的用途：降低血脂位準、降低血糖位準、增加(例如葡萄糖不耐個體之)葡萄糖耐受性、增加(例如胰島素抗性個體之)胰島素耐受性、增加胰臟功能降低(例如超重/肥胖個體之)體重、減少體脂肪質量、增加瘦體質量、降低空腹血糖位準、降低

血清三酸甘油酯位準、降低血清膽固醇位準、增加葡萄糖耐受性、增加胰臟功能(例如外分泌及/或內分泌功能)、增加胰臟組織生長、使胰臟組織再生、增加胰臟重量、抑制PSC的PSC向肌纖維母細胞之轉化、降低胰臟內肌纖維母細胞的數目/比例、降低胰臟羥基脯胺酸位準、降低胰臟膠原蛋白位準、降低胰損壞、減少胰島細胞增生、降低升糖素表現、增加胰島素表現、增加(例如具有消耗病，例如惡病質之個體之)體重、降低肝臟中IL-11蛋白之表現、減少肝臟內的Erk活化、降低肝臟內的JNK活化；降低肝臟內的凋亡蛋白酶-3裂解；降低肝臟內的ROS位準；降低肝臟內的NOX4表現降低例如肝臟之脂肪變性、降低肝臟三酸甘油酯位準、降低脂肪酸合成酶表現、降低血清ALT及/或AST位準、降低促炎性因子(例如TNF α 、CCL2、CCL5、IL-6、CXCL5及/或CXCL1)之表現、降低促纖維化因子(例如IL-11、TIMP1、ACTA2、TGF β 1、MMP2、TIMP2、MMP9、COL1A2、COL1A1及/或COL3A1)之表現、降低血清TGF β 1位準、降低HSCs之IL-11、ACTA2、MMP2、TGF β 1、PDGF、ANG II、bFGF、CCL2及/或H₂O₂的表現/產生、抑制HSC的HSC向肌纖維母細胞之轉化、降低肝臟中肌纖維母細胞之數目/比例、降低肝臟羥基脯胺酸位準、降低肝臟膠原蛋白位準、增加肝功能、增加血清GSH位準、增加受代謝性疾病影響之器官/組織的功能、降低肝損壞、降低肝細胞死亡；降低由於脂肪毒性之細胞死亡(例如肝細胞)；降低肝細胞內IL-11媒介的訊息傳導或降低肝臟中CD45+細胞之數目/比例。

【0353】 本發明亦提供一種能抑制IL-11媒介的訊息傳導之製劑供用於製造用於下列的一方法中的一組成物之用途：降低血脂位準、降低血糖位準、增加(例如葡萄糖不耐個體之)葡萄糖耐受性、增加(例如胰島素抗性個體之)胰島素耐受性、增加胰臟功能降低(例如超重/肥胖個體之)體重、減少體脂肪質量、增加瘦體質量、降低空腹血糖位準、降低血清三酸甘油酯位準、降低血清膽固醇位準、增加葡萄糖耐受性、增加胰臟功能(例如外分泌及/或內分泌功能)、增加

胰臟組織生長、使胰臟組織再生、增加胰臟重量、減少胰島細胞增生、降低升糖素表現、增加胰島素表現、增加(例如具有消耗病，例如惡病質之個體之)體重、降低肝臟中IL-11蛋白之表現、減少肝臟內的Erk活化、降低肝臟內的JNK活化；降低肝臟內的凋亡蛋白酶-3裂解；降低肝臟內的ROS位準；降低肝臟內的NOX4表現降低例如肝臟之脂肪變性、降低肝臟三酸甘油酯位準、降低脂肪酸合成酶表現、降低血清ALT及/或AST位準、降低促炎性因子(例如TNFa、CCL2、CCL5、IL-6、CXCL5及/或CXCL1)之表現、降低促纖維化因子(例如IL-11、TIMP1、ACTA2、TGFβ1、MMP2、TIMP2、MMP9、COL1A2、COL1A1及/或COL3A1)之表現、降低血清TGFβ1位準、降低HSCs之IL-11、ACTA2、MMP2、TGFβ1、PDGF、ANG II、bFGF、CCL2及/或H₂O₂的表現/產生、抑制HSC的HSC向肌纖維母細胞之轉化、降低肝臟中肌纖維母細胞之數目/比例、降低肝臟羥基脯胺酸位準、降低肝臟膠原蛋白位準、增加肝功能、增加血清GSH位準、增加受代謝性疾病影響之器官/組織的功能、降低肝損壞、降低肝細胞死亡；降低由於脂肪毒性之細胞死亡(例如肝細胞)；降低肝細胞內IL-11媒介的訊息傳導或降低肝臟中CD45+細胞之數目/比例。

【0354】 本發明亦提供下列的方法：降低血脂位準、降低血糖位準、增加(例如葡萄糖不耐個體之)葡萄糖耐受性、增加(例如胰島素抗性個體之)胰島素耐受性、增加胰臟功能降低(例如超重/肥胖個體之)體重、減少體脂肪質量、增加瘦體質量、降低空腹血糖位準、降低血清三酸甘油酯位準、降低血清膽固醇位準、增加葡萄糖耐受性、增加胰臟功能(例如外分泌及/或內分泌功能)、增加胰臟組織生長、使胰臟組織再生、增加胰臟重量、減少胰島細胞增生、降低升糖素表現、增加胰島素表現、增加(例如具有消耗病，例如惡病質之個體之)體重、降低肝臟中IL-11蛋白之表現、減少肝臟內的Erk活化、降低肝臟內的JNK活化；降低肝臟內的凋亡蛋白酶-3裂解；降低肝臟內的ROS位準；降低肝臟內的NOX4表現

降低例如肝臟之脂肪變性、降低肝臟三酸甘油酯位準、降低脂肪酸合成酶表現、降低血清ALT及/或AST位準、降低促炎性因子(例如TNFa、CCL2、CCL5、IL-6、CXCL5及/或CXCL1)之表現、降低促纖維化因子(例如IL-11、TIMP1、ACTA2、TGFβ1、MMP2、TIMP2、MMP9、COL1A2、COL1A1及/或COL3A1)之表現、降低血清TGFβ1位準、降低HSCs之IL-11、ACTA2、MMP2、TGFβ1、PDGF、ANG II、bFGF、CCL2及/或H₂O₂的表現/產生、抑制HSC的HSC向肌纖維母細胞之轉化、降低肝臟中肌纖維母細胞之數目/比例、降低肝臟羥基脯胺酸位準、降低肝臟膠原蛋白位準、增加肝功能、增加血清GSH位準、增加受代謝性疾病影響之器官/組織的功能、降低肝損壞、降低肝細胞死亡；降低由於脂肪毒性之細胞死亡(例如肝細胞)；降低肝細胞內IL-11媒介的訊息傳導或降低肝臟中CD45+細胞之數目/比例。

序列同一性

【0355】 可按熟悉此藝者已知的各種方法來完成用於判定二或多個胺基酸或核酸序列之間的同一性百分比之成對與多重序列排列比對，舉例而言使用可公開取得的電腦軟體諸如 ClustalOmega(Söding, J. 2005, *Bioinformatics* 21, 951-960)、T-coffee(Notredame等人之2000, *J. Mol. Biol.* (2000) 302, 205-217)、Kalign(Lassmann and Sonnhammer 2005, *BMC Bioinformatics*, 6(298)) 及 MAFFT(Katoh and Standley 2013, *Molecular Biology and Evolution*, 30(4) 772–780 軟體。當使用此軟體時，較佳採用，例如空格罰分或擴展罰分之預設參數。

序列

SEQ ID NO:	說明	序列
1	人 類 IL-11 (UniProt P20809)	MNCVCRLVLVLSLWPDTAVAPGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLLADTRQLA AQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLR RAGGSSLKTLEPELGTLQARLDRLRLQLLMSRLALPQPPDPAPPLAPPSSAWGG IRAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLKTRL
2	人 類 gp130 (UniProt P40189-1)	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDP CGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDY FHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVY GITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCK AKRDTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDVPYKVKPNPPHNS VINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDL KPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFYKIDPSHTQGYRT

		VQLVWKTLPPEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTV RNLVGKSDDAAVLTIACDFQATHPVMDLKAFPKNMLWVEWTTPRESVKKYILEW CVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYL KQAPPSKGPTVVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNVDSSTHEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEA IVVPVCLAFLLTTLLGVLCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRH NFNSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIG GSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSEST QPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSEQHESSPDISHFERSKQVSS VNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMCMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETV GMEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYM PQ
3	人類 IL11RA (UniProt Q14626)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQAWGPPGVQYGQPGRSVKLCCPGVTAGDP VSWFRDGEPKLLQGPDSGLGHEL VLAQADSTDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYP PARPVVSCQAADYENFSCTWSPSQISGLPTRYLT SYRKKT TVLGADSQRRSPSTGPWP CPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQ SILRPDPPQGLRV ESVPGYPRRLRASWTYPASWPCQPHFLLK FRLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEE VITDA VAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQPEVEPQ VDSPAPPRPSLQPHPRLLDHRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGALALGLWLRRLRG GKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL
4	siRNA標靶IL-11	CCTTCCAAAGCCAGATCTT
5	siRNA標靶IL-11	GCCTGGGCAGGAACATATA
6	siRNA標靶IL-11	CCTGGGCAGGAACATATAT
7	siRNA標靶IL-11	GGTTCATTATGGCTGTGTT
8	siRNA標靶IL-11Rα	GGACCATACCAAAGGAGAT
9	siRNA標靶IL-11Rα	GCGTCTTTGGGAATCCTTT
10	siRNA標靶IL-11Rα	GCAGGACAGTAGATCCCT
11	siRNA標靶IL-11Rα	GCTCAAGGAACGTGTGTAA
12	向IL-11(NM_000641.3)的siRNA	CCUUCCAAAGCCAGAUUUdTdT-AAGAUUCUGGCUUUGGAAGGdTdT
13	向IL-11(NM_000641.3)的siRNA	GCCUGGGCAGGAACAUAUAAdTdT-UAUUAUGUCCUGCCCAGGCdTdT
14	向IL-11(NM_000641.3)的siRNA	CCUGGGCAGGAACAUAUAUdTdT-AUAUAUGUCCUGCCCAGGdTdT
15	向IL-11(NM_000641.3)的siRNA	GGUUCAUUAUGGCUGUGUUdTdT-AACACAGCCAUAAUGAACCdTdT
16	向 IL-11Rα(U32324.1)的siRNA	GGACCAUACCAAAGGAGAUdTdT-AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT
17	向 IL-11Rα(U32324.1)的siRNA	GCGUCUUUGGGAAUCCUUdTdT-AAAGGAUUCCCAAAGACGCdTdT
18	向 IL-11Rα(U32324.1)的siRNA	GCAGGACAGUAGAUCCCUAdTdT-UAGGGAUCUACUGUCCUGCdTdT
19	向 IL-11Rα(U32324.1)的siRNA	GCUCAAGGAACGUGUGUAAdTdT-UUACACACGUUCCUUGAGCdTdT
20	20胺基酸鏈接子	GPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV
21	超 IL-11 (IL-11RA:IL-11融合)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQAWGPPGVQYGQPGRSVKLCCPGVTAGDP VSWFRDGEPKLLQGPDSGLGHEL VLAQADSTDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYP PARPVVSCQAADYENFSCTWSPSQISGLPTRYLT SYRKKT TVLGADSQRRSPSTGPWP CPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQ SILRPDPPQGLRV ESVPGYPRRLRASWTYPASWPCQPHFLLK FRLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEE VITDA VAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV PGPPP GPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSL LADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDSLPTLA MSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSS LKTLEPELGT LQARLDR LLRRLQLLMSRLALPQPPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGL LLKTRL
22	Enx203 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPHNG GPIYNQKFTGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWGT GTTVTVSS
23	Enx203 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL DSGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRDLPTFGGGTKLEIK
24	Enx209 VH	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTNYWMHWLKQRPVQGLEWIGNIGPSDS KTHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARGDYVLFTYWGQGT LVTVSA
25	Enx209 VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHEAPRLLIKYASQSSIGIP ARFSGSGSGTDFTLSFSSLETEDFAVYFCQQSYSWPLTFGQGTKLEIK
26	Enx108A VH	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG

		SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQ GTLVTVSS
27	Enx108A VL	QSALTQPRSVSGSPGQS VTL SCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNER SSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
28	Enx108A hIgG4 (L248E, S241P) HC	QVQLVQSGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
29	Enx108A λ LC	QSALTQPRSVSGSPGQS VTL SCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNER SSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGTKVTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
30	hEnx203 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQAPGQRLEWIGDINPHN GGPIYNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWG QGTTVTVSS
31	hEnx203 VL	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQAPRLLIYLASNL DSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEEEDFATYYCQHSRDLPPTFGQGGTKLEIK
32	hEnx209 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMHWLRQRPGQGLEWIGNIGPSD SKTHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYVLFTYWGQG TLVTVSS
33	hEnx209 VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQISISNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSYSWPLTFGQGGTKLEIK
34	Enx108A VH CDR1	SYGMH
35	Enx108A VH CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
36	Enx108A VH CDR3	IGATDPLDY
37	Enx108A VL CDR1	TGTSSDVGGYNYVS
38	Enx108A VL CDR2	DVNERSS
39	Enx108A VL CDR3	ASYAGRYTWM
40	Enx203, hEnx203 VH CDR1	DYNMD
41	Enx203, hEnx203 VH CDR2	DINPHNGGPIYNQKFTG
42	Enx203, hEnx203 VH CDR3	GELGHWYFDV
43	Enx203, hEnx203 VL CDR1	RASKSVSTSGYSYIH
44	Enx203, hEnx203 VL CDR2	LASNLD
45	Enx203, hEnx203 VL CDR3	QHSRDLPPT
46	Enx209, hEnx209 VH CDR1	NYWMH
47	Enx209, hEnx209 VH CDR2	NIGPSDSKTHYNQKFKD
48	Enx209, hEnx209 VH CDR3	GDYVLFTY
49	Enx209, hEnx209 VL CDR1	RASQISISNNLH
50	Enx209, hEnx209 VL CDR2	YASQSIG
51	Enx209, hEnx209 VL CDR3	QQSYSWPLT
52	人 類 IGHG1 恆 定 (K214R, D356E, L358M)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	人 類 IGHG4 恆 定 (L248E, S241P)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

54	人類IGKC恆定	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	人類IGLC2恆定	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
56	hEnx203 hIgG1 HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQAPGQRLEWIGDINPHN GGPIYNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	hEnx203k LC	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQAPRLLIYLASNL DSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEEDFATYYCQHSRDLPTFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	hEnx209 hIgG4 (L248E, S241P) HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWLRQRPGQGLEWIGNIGPSD SKTHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYVLFTYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TTPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
59	hEnx209k LC	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSYSWPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0356】 本發明包括所述之態樣與較佳特徵之組合，當此組合顯然不允許或明確表示需避免者時除外。

【0357】 前述說明或隨後的申請專利範圍或附圖內所揭示的特徵，視情況而定以其等之特定形式，或一種執行所揭示的功能之構件，或一種用於獲得所揭示的結果之方法(method)或方法(process)來表示，可能分開地或以這些特徵的任何組合，用於實現多種形式之本發明。

【0358】 為了避免任何疑問，本文提供的任何理論性解釋係提供用於增進讀者之理解。本發明人不希望受此等理論性解釋任一者之束縛。

【0359】 本文中使用之節標題僅僅係為了編制的目的以及不被解釋為限制所說明的主題。

【0360】 貫穿本說明書，包括隨後的申請專利範圍，除非上下文另外要求，否則應理解用字「包含(comprise)」及「包括(include)」，以及變體例如「包含(comprises)」、「包含(comprising)」及「包括(including)」是暗示含括所述的整

數或步驟或是整數或步驟組，但是不排除任何其他的整數或步驟或是整數或步驟組。

【0361】 必須注意到，當使用於本說明書及隨附的申請專利範圍中，除非上下文另外明確指定，否則單數形式「一(a)」、「一(an)」以及「該」包括複數的指示對象。範圍於本文中可表達為由「大約」一特定的數值及/或至「大約」另一特定的數值。當表達此一範圍時，另一具體例會包括由該一特定的數值及/或至另一特定的數值。同樣地，當用先行詞「大約」、以近似值表達數值時，會瞭解到該特定的數值構成另一具體例。術語「大約」關於一數值係可選擇的且意思是舉例而言 $\pm 10\%$ 。

【0362】 本文所述之方法可執行於，或產物可存在於活體外、擬體內(*ex vivo*)或活體內。術語「活體外」打算包含以實驗室條件或於培養物內的材料、生物物質、細胞及/或組織進行的實驗，而術語「活體內」打算包含以完整的多細胞生物進行的實驗及程序。在一些具體例中，於活體內進行的方法可能於非人類動物上進行。「擬體內」係指某事物在生物之外，例如於人類或動物體外存在或發生，其可能於取自於該生物的組織(例如整個器官)或細胞上。

【0363】 亦明確預期本文所揭示之核酸序列的反向互補物。

【0364】 關於標準的分子生物學技術，參見Sambrook, J., Russel, D.W. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press。

【0365】 現在將參照附圖討論本發明的態樣及具體例。進一步的態樣與具體例對於熟悉此藝者會是明顯的。本文中提及的全部文件係以其等之全體藉此併入以作為參考資料。雖然本發明已結合如下所述的例示性具體例予以說明，但是當給出本揭露內容時許多等效修飾及變異對於熟悉此藝者會是明顯的。因此，如上所述之本發明例示性具體例一般認為是說明性的而不是限制性的。所

述的具體例可以進行各種更改而不背離本發明的精神與範疇。

【圖式簡單說明】

【0366】 現在將參照所附圖式來論述用於說明本發明的原理之具體例與實驗。

【0367】 圖1A及1B.圖顯示餵食(1A)正常食品飲食(NCD)或(1B)西方飲食加果糖(Western diet along with fructose, WDF)之IL-11RA剔除(I11ra1^{-/-})或野生型、IL-11RA表現(I11ra1^{+/+})小鼠之體重隨時間推移之變化百分率。

【0368】 圖2A及2B.長條圖顯示餵食(2A)正常食品飲食(NCD)或(2B)西方飲食加果糖(WDF)之IL-11RA剔除(I11ra1^{KO})或野生型、IL-11RA表現(I11ra^{WT})小鼠之總體脂肪質量之變化百分率。

【0369】 圖3.圖顯示餵食正常食品飲食(NC)或西方飲食加果糖(WDF)之IL-11RA剔除(KO)或野生型、IL-11RA表現(WT)小鼠之空腹血糖位準(mM)。

【0370】 圖4.圖顯示餵食正常食品飲食(NC)或西方飲食加果糖(WDF)之IL-11RA剔除(KO)或野生型、IL-11RA表現(WT)小鼠之血清三酸甘油酯位準(mg/g)。

【0371】 圖5A及5B.圖顯示餵食(5A)正常食品飲食(NC)或(5B)西方飲食加果糖(WDF)之IL-11RA剔除(KO)或野生型、IL-11RA表現(WT)小鼠之血清膽固醇位準(mg/dl)。

【0372】 圖6A及6B.圖及盒形圖顯示餵食正常食品(NC)或西方飲食加果糖(WDF)且用抗IL-11RA抗體或IgG對照治療之小鼠的體重變化。(6A)顯示體重隨時間(週)推移之變化百分率。(6B)顯示總體脂肪質量與瘦體質量之間的差異百分率。*P<0.05。

【0373】 圖7A及7B.圖、示意圖及長條圖顯示餵食西方飲食加果糖(WDF)且用抗IL-11RA抗體或IgG對照治療之小鼠如藉由腹膜內葡萄糖耐受性測試

(ipGTT)所測定的葡萄糖耐受性。(7A)顯示與1分鐘時間點相比之葡萄糖位準(mM)變化。(7B)顯示曲線下面積。 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ 。

【0374】圖8.盒形圖顯示餵食正常食品(NCD)或西方飲食加果糖(WDF)且自不同時間點用抗IL-11RA抗體或IgG對照治療之小鼠的胰臟重量。 $****P<0.0001$ 。

【0375】圖9A至9C.盒形圖顯示餵食正常食品(NCD)或西方飲食加果糖(WDF)且在所示時間點用抗IL-11RA抗體或IgG對照治療之小鼠的(9A)血清膽固醇位準(mg/dl)、(9B)血清三酸甘油酯位準(mg/g)及(9C)空腹血糖位準(mM)。

【0376】圖10A及10B.影像顯示在第24週自餵食正常食品(NCD)之小鼠或餵食西方飲食加果糖(WDF)且自16週用抗IL-11RA抗體或IgG對照治療之小鼠獲得之胰臟組織切片的(10A)升糖素含量及(10B)胰島素含量之免疫組織化學分析之結果的影像。

【0377】圖11A及11B.圖及影像顯示抗IL-11/抗IL-11R α 抗體治療對於惡病質相關的體重減輕之效應。(11A)餵食惡病質誘發的高脂肪甲硫胺酸-膽鹼缺乏(HFMCD)飲食之小鼠在用抗IL-11或抗IL-11R α 抗體治療2x/週時返回至正常或接近正常體重。向對照小鼠餵食正常食品(NC)或餵食HFMCD飲食且用IgG同型對照治療。(11B)餵食HFMCD飲食且用IgG或抗IL-11抗體或抗IL-11R α 抗體治療之小鼠的體型大小示例比較。

【0378】圖12A至12C.圖顯示在惡病質相關體重減輕模式中抗IL-11/抗IL-11R α 抗體治療對於體重之效應。餵食HFMCD飲食之小鼠係用0.5、1、5或10 mg/kg抗IL-11R α 抗體(12A)或二種抗IL-11抗體(12B及12C)中的一種予以治療2x/週。向對照小鼠餵食正常食品(NC)或餵食HFMCD飲食且用IgG同型對照治療。

【0379】圖13A至13C.圖顯示在惡病質相關體重減輕模式中抗IL-11/抗IL-11R α 抗體治療對於攝食量之效應。餵食HFMCD飲食之小鼠係用0.5、1、5或

10 mg/kg抗IL-11R α 抗體(**13A**)或二種抗IL-11抗體(**13B**及**13C**)中的一種予以治療2x/週。向對照小鼠餵食正常食品(NC)或餵食HFMCD飲食且用IgG同型對照治療。

【0380】 圖**14A**及**14B**.圖顯示於葉酸誘發的急性腎損傷後、抗IL-11/抗IL-11R α 抗體治療對於惡病質關連之體重減輕的體重之效應。(14A)有葉酸誘發的腎損傷之小鼠自損傷前1小時至損傷後28天用抗IL-11R α 抗體、抗IL-11抗體或IgG對照來治療。‘對照’小鼠僅投予媒劑。(14B)有葉酸誘發的腎損傷之小鼠自損傷後21天用抗IL-11抗體或IgG對照來治療。FA=葉酸。

【0381】 圖**15**.圖顯示於單側性輸尿管阻塞(UUO)誘發的急性腎損傷後、抗IL-11抗體治療對於惡病質關連之體重減輕的體重之效應。有UUO誘發的腎損傷之小鼠自損傷後10天用抗IL-11抗體或IgG對照來治療。

【0382】 圖**16A**及**16B**.圖顯示IL-11過度表現對於體重增加之效應。(16A)投予重組小鼠IL-11(rmIL11)減慢正常小鼠體重增加之進展。(16B)於小鼠誘發IL-11轉殖基因(IL-11 Tg)導致體重隨時間(週)推移而減輕。

【0383】 圖**17A**至**17N**.IL-11誘發HSC活化及肝纖維化。(A)以TGF β 1刺激之HSCs內之IL-11 RNA是向上調節的。(B)從TGF β 1刺激之HSCs分泌出IL-11蛋白。(C)以TGF β 1刺激人類精確切削肝臟切片且測定上清液內的IL-11蛋白。(D)HSCs及活化的THP-1細胞內的IL6R及IL11RA表現之免疫螢光影像(比例尺, 100 μ m)。HSCs在無刺激物(-), 用TGF β 1、PDGF或IL-11孵育後之ACTA2的(E)免疫螢光影像(比例尺, 100 μ m)及(F)西方墨點法。用TGF β 1、PDGF或IL-11刺激之(G)HSCs之膠原蛋白I染色的免疫螢光影像(比例尺, 100 μ m)及(H)HSC之上清液內的膠原蛋白分泌。(I)由IL-11誘發的HSCs之劑量依賴性基質膠侵襲。(J)超IL-11誘發IL-11蛋白自HSCs分泌(ELISA)。(A-C,E-H,J)TGF β 1(5 ng/ml), 超IL-11(0.2 ng/ml), PDGF(20 ng/ml), IL-11(5 ng/ml); 24 h; (I) 48 h。(K)每日接受生理食鹽水(對照)

或rmIl11(100 μ g/kg)注射的小鼠之示意圖。(L-N)如1K中所示的rmIl-11注射實驗之資料，(n $\geq$ 7/組)。(L)相對肝臟羥基脯胺酸含量，(M)肝臟促纖維化及促炎性標識之mRNA表現，及(N)血清ALT位準。(A-B,H-J,L,N)資料表示為平均 $\pm$ s.d；(C,M)盒鬚圖顯示中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(A-C,J,L-N)雙尾司徒頓*t*檢定(Two-tailed Student's *t*-test)；(H-I)雙尾唐奈特氏(Dunnett's)檢定。FC：倍數變化；I/A：強度/面積。

【0384】圖18A至18N.刪失*Il11ra1*的小鼠受保護免受NASH肝病理學、高脂質血症及高血糖症。(A)處於HFMCD飲食歷時1、4、6及10週的小鼠之肝Il-11、Gapdh、p-Erk及Erk的西方墨點法。*Il11ra*^{+/+}(WT)及 *Il11ra*^{-/-}(KO)小鼠在HFMCD飲食10週後的肝臟內之(B)肝臟的代表性梅森氏三色(Masson's trichrome)影像(比例尺，100 μ m)，(C)肝臟三酸甘油酯、(D)血清ALT，及(E)促炎性mRNA表現之位準(n $\geq$ 5/組)。(F-N)處於WDF歷時16週的WT及KO小鼠的資料。(F)肝Il-11及Gapdh的西方墨點法。(G)肝臟促炎性標識之相對mRNA表現位準，(H)血清ALT位準，(I)相對肝臟羥基脯胺酸含量(n $\geq$ 4/組)。(J)肝臟之代表性梅森氏三色影像(比例尺，100 μ m)。(K)肝Erk活化狀態之西方墨點法、(L)空腹血糖、(M)血清三酸甘油酯及(N)血清膽固醇之位準(n $\geq$ 3/組)。(C-E,G-I)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)；(L-N)資料表示為平均 $\pm$ s.d，虛線代表處於NC之WT的平均值；希達克校正(Sidak-corrected)司徒頓*t*檢定。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏；WDF：西方飲食+15%(w/v)果糖。

【0385】圖19A至19J.抗IL-11療法以劑量依賴性方式抑制HSC向肌纖維母細胞轉化且具有有利的代謝安全性剖析。(A) X203及X209 (61 pg/ml至4 μ g/ml；4倍稀釋)在抑制經TGF β 1刺激的HSCs之MMP2分泌之劑量-反應曲線及IC₅₀值。(B)自以各種NASH因子刺激的HSCs之IL-11分泌的ELISA(n $\geq$ 5/組)。(C)於IgG、X203

或X209存在下、自以TGFβ1及其他NASH因子治療的HSCs之ACTA2⁺細胞之代表性螢光影像及定量(比例尺，100 μm及虛線代表基線的中位數值)。(D)X203及X209對PDGF-或CCL2誘發的HSC侵襲的效應。(E)IL-11(上組)或於IgG或X209存在下以各種NASH因子(下組)刺激的HSC溶解產物內之p-ERK及ERK的西方墨點法。(F)在ERK/MEK抑制劑U0126或PD98059存在下、以IL-11及重要的NASH因子治療的HSCs內的ACTA2⁺細胞之代表性螢光影像及定量(比例尺，100 μm及虛線代表基線的中位數值)。(A-F)TGFβ1(5 ng/ml)，IL-11(5 ng/ml)，PDGF(20 ng/ml)，AngII(100 nM)，bFGF(10 ng/ml)，CCL2(5 ng/ml)，H₂O₂(0.2 mM)，IgG，X203及X209(2 μg/ml)，U0126或PD98059(10 μM)；(A,C,E-F) 24 h；(B,D)48 h。來自兩週一次注射10 mg/kg的X203及X209歷時5個月的小鼠之(G)周邊的血小板計數，(H)血清ALT位準，(I)血清三酸甘油酯位準及(J)血清膽固醇位準(n≥5/組)。(B,D)資料顯示為平均± s.d；(C,F,G-J)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(B,D,G-J)雙尾唐奈特氏檢定；(C,F)雙尾杜凱氏校正司徒頓t檢定(Tukey-corrected Student's *t*-test)。FC：倍數變化。

【0386】圖20A至20N.治療性靶向IL-11抑制且逆轉臨床前模式內的NASH病理學。(A)顯示於(B-E)中所示的實驗中X203及X209(10 mg/kg，兩週一次)於HFMCD餵食的小鼠之治療用途之示意圖。自HFMCD飲食第6至10週投予X203、X209或IgG同型對照。(B)代表性肝臟組織學影像(梅森氏三色染色；比例尺，100 μm)，(C)相對肝臟羥基脯胺酸含量，(D)相對肝臟促炎性mRNA表現位準(n≥6/組)及(E)血清ALT位準。(F)肝Erk活化狀態之西方墨點法。(G)針對H-N中所示的實驗中X203或IgG投予給MCD餵食的db/db小鼠之示意圖。肝臟(H)Il-11及Gapdh，(I)p-Erk及Erk的西方墨點法。(J)自X203或IgG治療的MCD餵食的db/db小鼠的肝臟之代表性梅森氏三色影像(比例尺，100 μm)。(K)肝臟三酸甘油酯、(L)相對肝

臟羥基脯胺酸、(M)血清ALT及(N)肝臟促炎性標識mRNA表現之位準($n \geq 5$ /組)。(C-E,K-N)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)；雙尾杜凱氏校正司徒頓 t 檢定。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏；MCD：甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0387】圖21A至21L.抑制IL-11訊息傳導逆轉臨床前模式內的NASH病理學及HSC向肌纖維母細胞轉化。(A)顯示關於(B-G)中所示的資料之NASH逆轉實驗之治療性用劑攝生法的示意圖。向小鼠餵食WDF歷時16週以誘發NASH且隨後用(10 mg/kg)X209或IgG治療8週同時使其處於持續WDF餵食。處於NC以及IgG及X209治療的WDF之小鼠($n \geq 5$ /組)中的(B)總肝臟羥基脯胺酸含量，(C)肝臟三酸甘油酯、(D)血清ALT、(E)空腹血糖、(F)血清三酸甘油酯及(G)血清膽固醇之位準。(H)顯示藉由向小鼠餵食HFMCD歷時10週來建立纖維化且隨後將此置換為NC且起始抗體(X203及X209)療法的逆轉實驗之示意圖。在指定時間點使小鼠安樂死。於同時代謝介入(飲食交換)及X203、X209或IgG治療之後1、3或6週的(I)總肝臟羥基脯胺酸含量(虛線代表NC的平均值=0.93)及(J) *Mmp2* /*Timp1*之相對mRNA表現($n \geq 3$ /組)。於添加X203、X209或IgG之前或之後，與(K)用TGF β 1或(L)PDGF一起孵育後之ACTA2⁺免疫染色的定量(比例尺，200 μ m) ($n=5$ /組)。(K-L)TGF β 1(5 ng/ml)，PDGF(20 ng/ml)，IgG，X203及X209(2 μ g/ml)。(B-G,K-L)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)；(I)資料顯示為平均 $\pm$ s.d；(J)資料表示為線圖(平均)及透影(transparencies)表示s.d。(B)雙尾司徒頓 t 檢定；(C-G,K-L)雙尾杜凱氏校正司徒頓 t 檢定；(I-J)二因子ANOVA。FC：倍數變化；NC：正常食品；WDF：西方飲食+15%(w/v)果糖；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0388】圖22A至22K.中和IL-11訊息傳導逆轉早期NASH的肝損壞。(A)自餵食NC或HFMCD飲食所示的時間點之小鼠的纖維化及發炎標識之相對肝臟

mRNA表現。(B)於HFMCD飲食NASH模式中很早開始抗IL-11療法實驗之示意圖。於開始NASH飲食之後1週開始抗體治療於該時腹膜內投予X209、X203或IgG(10 mg/kg，兩週一次)歷時5週。(C-G)如圖21B中所示的實驗之資料。於IgG或X209治療5週後的(C)代表性大體肝臟影像及(D)肝臟的梅森氏三色染色影像(比例尺，100 μ m)。(E)肝臟三酸甘油酯位準($n \geq 5$ /組)、(F)X209及IgG治療的小鼠之肝臟羥基脯胺酸含量($n \geq 5$ /組)、(G)血清ALT位準($n \geq 5$ /組)。(H)肝細胞內的IL6R及IL11RA表現之免疫螢光影像(比例尺，100 μ m)。(I) IL-11對於肝細胞上清液內的ALT及(J)肝細胞內的應力纖維形成(玫瑰紅-鬼筆環肽(rhodamine-phalloidin)染色)(比例尺，200 μ m)之劑量依賴性效應。(K)自以TGF β 1(5 ng/ml)刺激的初級人類肝細胞分泌的IL-11蛋白；24 h。(E)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)；(F-G,I,K)資料顯示為平均 $\pm$ s.d。(E)杜凱氏校正司徒頓*t*檢定；(F,G)二因子ANOVA；(I,K)雙尾唐奈特氏檢定。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0389】圖23A至23G.抗IL11RA療法逆轉NASH的分子標籤朝向正常肝剖析同時抑制免疫細胞活化。(A-G)如圖22B中所示的實驗之資料。(A)處於NC或HFMCD之小鼠、於IgG、X203或X209抗體存在下歷時6B中所示的時間之肝臟基因表現的主成分分析(PCA)圖。箭頭描繪自正常的基因表現(NC)轉化成NASH(HFMCD+IgG)內之最困擾的基因表現，轉化成中等程度回復的基因表現(HFMCD+Abs (3w))，轉化成正規化的基因表現(HFMCD+Abs(6w))。(B)促纖維化及促炎性基因表現熱圖(成比例的每百萬轉錄本，TPM)。(C)依qPCR之*Tnf α* 、*Ccl2*及*Ccl5* mRNA表現($n \geq 5$ /組)。(D)肝臟CD45⁺免疫細胞數目，(E)CD45⁺族群之Ly6C⁺TGF β 1⁺細胞，(F)代表性假色圖其說明用來偵測Ly6C⁺TGF β 1⁺細胞之圈選策略($n \geq 4$ /組)。(G)血清TGF β 位準($n \geq 5$ /組)。(C-E,G)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(C,G)雙尾杜凱

氏校正司徒頓 t 檢定；(D-E)雙尾司徒頓 t 檢定。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0390】圖24A至24K.HSCs分泌及回應IL-11以及向小鼠注射IL-11導致肝纖維化。(A)HSCs於TGF β 1刺激後之全基因體RNA表現的變化(n=3, RNAseq)。(B)人類HSCs內之堅硬度誘發的RNA向上調節(RNA-seq¹⁴)，基因係根據片段/千基百萬(fragments per kilobase million，FPKM)來分級，*IL-11*向上調節是全基因體向上調節最高的基因。(C)人類心臟纖維母細胞(HCF)、人類肺臟纖維母細胞(HLF)及人類HSC內的*IL11RA*轉錄本。健康個體及罹患酒精性肝病(ALD)、原發性硬化性膽管炎(PSC)、原發性膽汁性肝硬化(PBC)及非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)之患者之人類肝臟樣本內的IL-11及GAPDH之(D)西方墨點法及(E)密度測定法。在沒有刺激(-)、用TGF β 1、PDGF或IL-11孵育後的(F)ACTA2⁺細胞及(G)膠原蛋白I免疫染色之自動化螢光定量。(H)沒有刺激物(-)、用TGF β 1或IL-11刺激之HSC上清液內、藉由ELISA之MMP-2濃度。(A,F-H)TGF β 1及IL-11(5 ng/ml)，PDGF(20 ng/ml)；24 h刺激。自注射生理食鹽水或rmIL-11的小鼠之肝臟切片的梅森氏三色染色影像之(I)代表圖(比例尺，100 μ m)及(J)定量。每日注射rmIL-11或生理食鹽水的*Colla1-GFP*小鼠之(K)示意圖及代表性螢光影像GFP⁺細胞。切片係針對Acta2予以免疫染色且以DAPI對比染色(比例尺，200 μ m)。(C,F-G)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)；(E,H,J)資料表示為平均 $\pm$ s.d。(F-H)雙尾唐奈特氏檢定；(J)雙尾司徒頓 t 檢定。FC：倍數變化；TPM：每百萬轉錄本。

【0391】圖25A至25I.遺傳抑制IL-11訊息傳導保護小鼠免受HFMCD誘發的NASH病理學。16週的HFMCD飲食相較於NC飲食而言，對於肝臟(A) *Il-11* mRNA及(B)IL-11蛋白位準的效應。(A-B)RNA及蛋白質係萃取自相同的小鼠(n=5/組)。來自餵食NC或HFMCD飲食歷時1、4、6及10週的小鼠之(C)相對肝臟羥基脯胺酸

含量及(D)血清ALT位準($n \geq 5$ /組)。於HFMCD飲食10週後的(E-I)*Il11ra*^{+/+}(WT)及*Il11ra*^{-/-}(KO)小鼠之資料。(E)相對肝臟羥基脯胺酸含量、(F)肝臟梅森氏三色染色影像之代表圖(比例尺, 100 μ m)及(G)定量。(H)*Acta2*、*Colla1*、*Colla2*及*Col3a1*之相對肝臟mRNA表現位準($n \geq 5$ /組)。(I)NC及HFMCD飲食10週後的磷酸化及總Erk之西方墨點法。(A, E, H)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線), 25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚); (C-D, G)資料表示為平均 $\pm$ s.d。(A, G)雙尾司徒頓 t 檢定; (C-D)二因子ANOVA; (E, H), 希達克校正司徒頓 t 檢定。(C)NC及HFMCD 6週的數值與圖20C中使用的該等相同; NC及HFMCD 1週的數值與圖22F中使用的該等相同。(D)HFMCD 6週的數值與圖20D中使用的該等相同; NC及HFMCD 1週的數值與圖22G中使用的該等相同。FC: 倍數變化; NC: 正常食品; HFMCD: 高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0392】 圖26A至26E. 遺傳抑制IL-11訊息傳導保護小鼠免受WDF誘發的NASH病理學。16週的WDF對於*Il11ra*^{+/+}(WT)及*Il11ra*^{-/-}(KO)小鼠(A)體重($n \geq 6$ /組)之效應。NC及WDF16週後的WT及KO小鼠之(B)肝臟三酸甘油酯位準、(C)肝臟的梅森氏三色染色影像之代表圖(比例尺, 100 μ m)及(D)定量, (E)促纖維化基因的相對肝臟mRNA表現位準($n \geq 5$ /組)。(A, D)資料顯示為平均 $\pm$ s.d, 雙尾司徒頓 t 檢定; (B, E)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線), 25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚), 希達克校正司徒頓 t 檢定。FC: 倍數變化; NC: 正常食品; WDF: 西方飲食+15%(w/v)果糖。

【0393】 圖27A至27F. 中和性抗IL-11RA單株抗體之發展。(A)用純化的小鼠單株抗IL11RA候選物(6 μ g ml⁻¹)抑制TGF β 1-(上面)、超IL-11-(中間)刺激的人類心房纖維母細胞及TGF β 1-(底部)刺激的小鼠心房纖維母細胞之ACTA2^{ve}細胞轉化。(B)X209與IL11RA之交互作用係依SPR(1:1朗繆)來判定。(C)小鼠之¹²⁵I-X209的血液藥物動力學($n=5$)。結果係與雙相指數衰變模式擬合($R^2=0.92$)。(D)眼眶後

注射後，肝臟在所示時間點的¹²⁵I-X209攝入百分率 (n=5)。(E-F)於(E)IgG對照、X203或X209存在下或於(F)MEK/ERK抑制劑(U0126或PD98059)存在下，以各種NASH因子治療的HSCs之膠原蛋白I免疫染色之代表性螢光影像(比例尺，100 μm)及定量。(A,E-F)TGFβ1(5 ng/ml)、IL-11(5 ng/ml)、PDGF(20 ng/ml)、AngII(100 nM)、bFGF(10 ng/ml)、CCL2(5 ng/ml)、H₂O₂(0.2 mM)、IgG、X203及X209(2 μg/ml)、U0126或PD98059(10 μM)；24 h刺激。(C-D)資料表示為平均+s.d；(E-F)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)，虛線代表基線數值的平均，杜凱氏校正司徒頓t檢定。FC：倍數變化；I/A：強度/面積。

【0394】 圖28A至28F.中和性抗IL-11及抗IL11RA抗體抑制HFMCD及WDF誘發的NASH病理學。(A-D)X203及X209於如圖20A中所示的HFMCD餵食的小鼠之治療用途的資料。(A)肝臟切片的梅森氏三色染色定量(虛線代表平均NC數值)。(B)纖維化基因的相對肝臟mRNA表現位準及(C)肝臟三酸甘油酯含量(n≥5/組)。(D)來自處於HFMCD飲食之NC、IgG-及X203治療的小鼠(10 mg/kg，兩週一次)之肝臟ERK活化之西方墨點法。如示意圖中所示注射IgG或X203的脂肪變性及MCD餵食的db/db小鼠(圖20G, n≥5/組)之(E)肝臟切片的梅森氏三色染色之定量，虛線代表來自12週大的db/db之脂肪變性肝(steatotic livers)的平均值(參見圖20G)及(F)肝臟的相對促纖維化mRNA表現位準。(A,E)資料表示為平均 +s.d；(B-C, F)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(A-C,E-F)雙尾杜凱氏校正司徒頓t檢定。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏；MCD：甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0395】 圖29A至29E.中和性抗IL11RA療法逆轉WDF誘發的NASH病理學。(A-E)抗IL-11RA治療性介入研究於如示意圖中所示處於WDF飲食的小鼠之資料(圖21A)。處於WDF的小鼠自第16週開始兩週一次接受IgG或X209(10 mg/kg)

治療歷時8週直到犧牲之時(第24週)。(A)來自處於NC或WDF歷時24週的小鼠肝臟之p-Erk及Erk的西方墨點法。(B)體重兩月測量一次($n \geq 4$ /組)。來自處於WDF歷時16週(左)，歷時24週加上自第16-24週之IgG注射(中間)，及歷時24週加上自第16-24週之X209治療(右)的小鼠之肝臟梅森氏三色染色影像的(C)代表圖(比例尺，100 μm)及(D)定量，虛線代表NC的平均值。(E)促炎性基因的相對肝臟mRNA表現位準($n \geq 5$ /組)。(B, D)資料顯示為平均 $\pm$ s.d；(E)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(D, E)雙尾杜凱氏校正司徒頓 t 檢定。

【0396】 圖30A至30G.中和性抗IL-11或抗IL11RA抗體逆轉HFMCD誘發的肝纖維化及HSC向肌纖維母細胞轉化。(A-D)來自如5G中所示用IgG、X203或X209治療歷時1、3或6週的小鼠之資料(HFMCD逆轉實驗)(A)肝ERK活化狀態之西方墨點法。來自用IgG、X203或X209治療歷時6週的小鼠之肝臟的梅森氏三色染色之(B)代表圖(比例尺，100 μm)及(C)定量。(D-G)來自如圖21K-21L中所示的HSC轉化之逆轉實驗的資料；TGF β 1(5 ng/ml)、PDGF(20 ng/ml)、IgG、X203及X209(2 $\mu\text{g/ml}$)。(D)於添加X203、X209或IgG之前或之後、與TGF β 1或PDGF一起孵育後的ACTA2⁺免疫染色之代表性螢光影像(比例尺，200 μm)。於添加IgG、X203或X209之前或之後、以(E)TGF β 1或(F)PDGF刺激HSCs所分泌的膠原蛋白的量($n=5$ /組)。(G)TGF β 1治療的HSC在X203及X209治療之後的ERK活化狀態之西方墨點法。(C)資料顯示為平均 $\pm$ s.d；(E-F)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(C, E-F)雙尾杜凱氏校正司徒頓 t 檢定。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0397】 圖31A至31H.中和性抗IL-11或抗IL11RA抗體保護HFMCD餵食的小鼠免受肝纖維化及發炎。(A)於IgG、X203或X209存在下、在無刺激物(-)，有IL-11或有TGF β 1的HSCs上清液內、藉由ELISA之CCL2($n=4$ /組)；IL-11(5 ng

ml⁻¹)、TGFβ1(5 ng ml⁻¹)、IgG、X203及X209(2 μg ml⁻¹)。(B-I)如圖22B中所示的治療性用劑實驗的資料。與早期的X203及X209治療5週後的(B)代表性大體肝臟的影像，(C)肝ERK活化狀態之西方墨點法，(D)肝臟之梅森氏三色染色影像的代表圖(比例尺，100 μm)及(E)定量。(F)肝臟羥基脯胺酸含量(NC及HFMCD 1週飲食的數值與圖25C中使用的該等相同，IgG 3及6週的數值與圖22F中使用的該等相同，n≥5/組)，(G)於X203及X209治療5週之後、藉由qPCR之肝臟內纖維化標識的相對RNA表現位準，其確認來自RNA-seq的資料(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*及*Acta2*之NC 6週的數值與圖28D中使用的該等相同，n≥5/組)，及(H)血清ALT位準(NC及HFMCD 1週的數值與圖25D中使用的該等相同，IgG 3及6週的數值(分別為2週及5週治療)與圖22G中使用的該等相同，n≥5/組)。(A,E-F,H)資料表示為平均±s.d；(G)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max百分位數(鬚)。(A,E,G)雙尾杜凱氏校正司徒頓t檢定；(F,H)二因子ANOVA。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0398】圖32A至32D.中和性抗IL-11或抗IL11RA抗體逆轉NASH的分子標簽朝向正常肝剖析。(A-D)如圖22A中所示的早期治療性用劑實驗之RNA-seq及基因集富集分析的資料(n=3/組)。(A-B)熱圖其顯示IgG及(A)X209或(B)X203治療之間有表現統計差異的所有基因之跨樣本的基因表現位準(成比例的轉錄本/百萬定位的序列標簽(scaled Transcripts Per Million mapped reads)，TPM)。抗IL-11治療之表現剖析與NC之剖析聚在一起，暗示建議幾乎完全逆轉HFMCD飲食的轉錄效應。(C)脂質生成及β-氧化基因表現熱圖顯示相較於IgG而言X209，比X203更多地，改良肝臟脂質代謝。(D)氣泡圖顯示於NC或HFMCD飲食及抗體療法6週之後表現有差異的基因之基因集富集分析(GSEA)的結果。各點代表基因集之正規化的富集分數(NES)及其之FDR-校正的顯著位準，分別按顏色和尺寸來總

結。自MSigDB的“H - Hallmark”系列挑選富集試驗的基因集。FC：倍數變化；NC：正常食品；HFMCD：高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏。

【0399】 圖33A至33K.散布圖、盒形圖、直方圖及影像其係有關初級人類肝細胞的IL-11及IL-6之受體表現以及IL-11及IL-6訊息傳導的效應。(A)肝細胞之IL11RA、IL6R及gp130染色的代表性流動式細胞測量術前散射(FSC)及螢光強度圖。(B)肝細胞內根據RNA-seq(左)及Ribo-seq(右)的基礎之*IL11RA1*及*IL6R*序列標籤豐度(每百萬轉錄本，TPM)。(C及D)根據人類肝細胞之RNA-seq及Ribo-seq的(C)*IL11RA1*及(D)*IL6R*轉錄本之序列標籤覆蓋域(read coverage)(n=3)。(E及F)在劑量範圍內之超IL11或超IL6的刺激後(E)顯示ERK、JNK及STAT3活化狀態之西方墨點法以及(F)肝細胞之ALT分泌。(G)以超IL11單獨或在漸增量的可溶性gp130(sgp130)存在下刺激的肝細胞之上清液內的ALT位準。(H及I)肝細胞溶解產物之西方墨點法其顯示(H)回應超IL11單獨或伴隨sgp130刺激之磷酸化的ERK及JNK及其等之個別總表現以及(I)回應有及沒有sgp130之超IL6刺激之磷酸化的STAT3及總STAT3。(J)在sgp130或可溶性IL11RA(sIL11RA)存在下之IL11刺激的肝細胞之碘化丙啶(PI)染色的代表性FSC圖。(K)西方墨點法其顯示肝細胞回應IL11單獨或在sgp130或sIL11RA存在下刺激的p-ERK、p-JNK及其等之個別總表現。(A-K)初級人類肝細胞；(E-K)24 h刺激；(E-K)超IL11、超IL6、IL11(20 ng/ml)、sgp130、sIL11RA(1 µg/ml)。(B, F-G)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)。

【0400】 圖34A至34K.圖、散布圖及影像其顯示含有脂質的肝細胞分泌IL11，其通過自泌IL11順式訊息傳導驅動多種脂肪毒性的表現型。(A-K)初級人類肝細胞在IgG(2 µg/ml)、抗IL11RA(X209, 2 µg/ml)或sgp130(1 µg/ml)存在下之棕櫚酸裝載實驗的資料。依ELISA所測得的上清液之(A)IL11、(B)IL6、(C)CCL2及(D)CCL5蛋白分泌位準。(E及F) (E)棕櫚酸刺激的PI+ve肝細胞之代表性FSC圖

及(F)定量。(G)上清液內的ALT位準。(H)肝細胞麩胱甘肽(GSH)位準。(I)DCFDA染色的代表性螢光影像(ROS偵測；比例尺，100 μ m)。(J)pERK、ERK、pJNK、JNK、裂解的凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶3、NOX4、FASN及GAPDH之西方墨點法(K)油紅O染色的代表性影像(比例尺，100 μ m)。(A-D, F-H)平均 $\pm$ SD；杜凱氏校正司徒頓 t 檢定。

【0401】 圖35A至35P.示意圖、影像及盒形圖其顯示抑制IL6家族細胞介素反式訊息傳導對於處於西方飲食補充果糖的小鼠之NASH或代謝表現型沒有效應。(A) (B-P)中所示的資料之有肝細胞特異性表現sgp130之小鼠的WDF餵食之示意圖。AAV8-Alb-零(Null)或AAV8-Alb-sgp130病毒注射三週後，向小鼠餵食WDF歷時16週。(B)西方墨點法顯示sgp130、IL11、IL6及作為內部對照之GAPDH的肝位準。(C)血清IL11位準。(D)血清IL6位準。(E)肝臟的代表性大體解剖學及H&E染色的影像。(F)肝臟重量。(G)肝臟三酸甘油酯含量。(H)血清ALT位準。(I)血清AST位準。(J)肝臟膠原蛋白位準。(K)空腹血糖位準。(L)血清三酸甘油酯位準。(M)血清膽固醇位準。(N)肝臟GSH含量。(O)肝臟促炎性及纖維化基因表現熱圖(數值顯示於圖41D及41E內)。(P)肝p-ERK、ERK、p-JNK、JNK、p-STAT3及STAT3的西方墨點法。(C-N)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，杜凱氏校正司徒頓 t 檢定；從左至右，所示的條件為：NC 零、WDF 零、WDF sgp130。

【0402】 圖36A至36K.示意圖、影像、圖及盒形圖其顯示肝細胞特異性抑制IL11 順式訊息傳導防止了處於HFMCD飲食的小鼠之惡病質及NASH。(A)(B-K)中所示的實驗之AAV8-Alb-Cre注射的*Il11ra1*_{loxP/loxP}(條件式剔除；CKO)小鼠之HFMCD餵食攝生法的示意圖。開始HFMCD飲食三週之前，向*Il11ra1*_{loxP/loxP}小鼠靜脈內注射AAV8-Alb-零或AAV8-Alb-Cre以於肝細胞內特異性地刪失*Il11ra1*。(B)肝臟IL11RA及GAPDH的西方墨點法。(C)體重(顯示為起始

體重的百分率(%))。(D)肝臟的代表性大體解剖學及H&E染色的影像。(E)肝臟三酸甘油酯含量。(F)血清ALT位準。(G)血清AST位準。(H)肝臟GSH含量。(I)肝臟膠原蛋白位準。(J)顯示促炎性標識(*Tnfα* , *Ccl2* , *Ccl5*)及纖維化標識(*Colla1* , *Colla2* , *Col3a1* , *Acta2*)之肝臟mRNA表現的熱圖。數值顯示於圖43A及43B內。(K)西方墨點法顯示肝臟ERK及JNK活化狀態。(C)資料顯示為平均±SEM, 2因子ANOVA加上杜凱氏多重比較檢定, 統計顯著性顯示為HFMCD WT及CKO之間的P值; (E-I)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線), 25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚), 希達克校正司徒頓*t*檢定; 從左至右, 所示的條件為: NC WT、NC CKO、HFMCD WT、HFMCD CKO。

【0403】圖37A至37M.示意圖、影像、圖及盒形圖其顯示有肝細胞特異性抑制IL11順式訊息傳導的小鼠防止了WDF誘發的肥胖及NASH。(A) (B-M)中所示的資料之WDF餵食的對照及CKO小鼠之示意圖。AAV8-Alb-零或AAV8-Alb-Cre病毒注射三週後, 向CKO小鼠餵食WDF歷時16週。(B)西方墨點法顯示IL11RA及GAPDH的肝位準。(C)體重(顯示為起始體重的百分率(%))。(D)脂肪質量。(E)肝臟的代表性大體解剖學及H&E染色的影像。(F)肝臟三酸甘油酯含量。(G)肝臟重量。(H)血清ALT位準。(I)血清AST位準。(J)肝臟GSH含量。(K)肝臟膠原蛋白位準。(L)於熱圖上的肝臟促炎性及纖維化基因表現(數值顯示於圖44A及44B內)。(M)西方墨點法顯示肝臟ERK及JNK活化狀態。(C及D)資料顯示為平均±SEM, 2因子ANOVA加上杜凱氏多重比較檢定, 統計顯著性顯示為WDF WT及CKO之間的P值; (F-K)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線), 25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚), 希達克校正司徒頓*t*檢定; 從左至右, 所示的條件為: NC WT、NC CKO、WDF WT、WDF CKO。

【0404】圖38A至38N.示意圖、影像及盒形圖其顯示肝細胞特異性IL11順式訊息傳導而不是IL11反式訊息傳導驅動了處於WDF的小鼠之脂肪變性肝炎。

(A)顯示(B-N)中所示的實驗之*Il11ra1*^{+/+}(WT)及*Il11ra1*^{-/-}(KO)小鼠之WDF餵食攝生法的示意圖。病毒投予三週後，向AAV8-Alb-零、AAV8-Alb-mb*Il11ra1*(全長膜結合型*Il11ra1*)及AAV8-Alb-s*Il11ra1*(*Il11ra1*的可溶性形式)注射的KO小鼠給予WDF餵食16週。(B)西方墨點法顯示IL11RA及GAPDH的肝位準。(C)肝臟的代表性大體解剖學及H&E染色的影像。(D)肝臟重量。(E)肝臟三酸甘油酯含量。(F)血清ALT位準。(G)血清AST位準。(H)肝臟GSH含量。(I)肝臟膠原蛋白位準。(J)肝臟促炎性及纖維化基因表現熱圖(數值顯示於圖45C及45D內)。(K)西方墨點法顯示肝臟ERK及JNK活化狀態。(L)空腹血糖位準。(M)血清三酸甘油酯位準。(N)血清膽固醇位準。(D-I, L-N)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，杜凱氏校正司徒頓*t*檢定；從左至右，所示的條件為：NC 零 WT、WDF 零 WT、WDF 零 KO、WDF *mbIl11ra1* KO、WDF *sIl11ra1* KO。

【0405】 圖39.IL11訊息傳導於NASH中提議的機制之示意圖。過量的脂質蓄積於肝細胞內造成脂肪毒性而導致生產活性含氧物，其觸發IL11蛋白轉譯及分泌。IL11與肝細胞上的IL11RA及gp130結合以起始自泌ERK、JNK及凋亡蛋白酶3活化而導致脂質凋亡(lipoapoptosis)。IL11亦以旁泌方式作用以驅動靜止的肝臟星形細胞(HSCs)轉化變成活化的肌纖維母細胞。自脂肪毒性的肝細胞及HSCs釋放的細胞介素及趨化介素活化且募集免疫細胞而造成發炎。因此，肝細胞內的自泌IL11順式訊息傳導對於所有的NASH病理學是很重要的起始事件。

【0406】 圖40A至40I.散布圖、盒形圖直方圖、影像及圖其係有關初級人類肝細胞的IL-11及IL-6之受體表現以及IL-11及IL-6訊息傳導的效應。(A)活化的THP-1細胞上之IL11RA、IL6R及gp130染色的代表性FSC圖。(B)初級人類肝細胞內根據RNA-seq及Ribo-seq(每百萬轉錄本，TPM)之*gp130*轉錄本。(C)根據初級人類肝細胞之RNA-seq及Ribo-seq(n=3)的*gp130*轉錄本之序列標籤覆蓋域。(D)初

級人類肝細胞及活化的THP-1細胞的IL11RA、IL6R、gp130及白蛋白表現之免疫螢光影像(比例尺，100 μm)。(E)肝細胞培養基內可溶性IL6R之基礎位準。(F)在sgp130或sIL11RA存在下、IL11刺激的初級人類肝細胞(PI+ve細胞)之PI染色的定量。(G)在1 $\mu\text{g/ml}$ 的sgp130或sIL11RA存在下、漸增濃度的IL11對於初級人類肝細胞分泌的ALT位準之劑量依賴性效應。(H)漸增濃度的sgp130或sIL11RA對於IL11誘發的ALT分泌之劑量依賴性效應。(I)在IgG(2 $\mu\text{g/ml}$)、抗IL11RA(X209, 2 $\mu\text{g/ml}$)或sgp130(1 $\mu\text{g/ml}$)存在下、棕櫚酸刺激後的肝細胞三酸甘油酯位準。(B, G-H)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)；(E-F, I)資料顯示為平均 $\pm$ SEM；(F-I)杜凱氏校正司徒頓 t 檢定。(G)針對各種IL11濃度，從左至右，所示的條件為：BL、sgp130、sIL11RA。(H)針對各種IL11 + sgp130/IL11RA濃度，從左至右，所示的條件為：sgp130、sIL11RA。

【0407】圖41A至41E.示意圖、盒形圖及圖其顯示sgp130表現不會保護小鼠免於WDF誘發的肝臟及肥胖表現型。(A)此研究中gp130蛋白域結構及其胺基酸位置(左)及用來建構sgp130的該等域(右)之示意圖。(B-E)於如圖35A中所示的活體內實驗之WDF-sgp130資料。(B)NC餵食的對照及WDF餵食的AAV8-Alb-零及AAV8-Alb-sgp130注射的小鼠之血清gp130位準。(C)16週的WDF對於AAV8-Alb-零及AAV8-Alb-sgp130注射的小鼠體重的效應。資料顯示為平均 $\pm$ SEM。(D及E)如圖35O中所示的(D)促炎性標識(*Tnfa*、*Ccl2*、*Ccl5*)及(E)纖維化標識(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Acta2*)之肝臟mRNA表現。(B, D-E)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，杜凱氏校正司徒頓 t 檢定；從左至右，所示的條件為：NC 零、WDF 零、WDF *sgp130*。

【0408】圖42A至42N.示意圖、影像及盒形圖其顯示抑制IL6家族成員假定存在的反式訊息傳導對於處於HFMCD飲食的小鼠之NASH表現型沒有效應。(A)(B-N)中所示的資料之有肝細胞特異性表現sgp130之小鼠的處於HFMCD飲食的

小鼠之示意圖。小鼠予以靜脈內注射AAV8-Alb-零或AAV8-Alb-sgp130且餵食HFMCD歷時4週。(B)西方墨點法顯示sgp130、IL11及IL6加上顯示作為內部對照之GAPDH的肝位準。(C)血清gp130位準。(D)血清IL11位準。(E)血清IL6位準。(F)肝臟的代表性大體解剖學及H&E染色的影像。(G)肝臟三酸甘油酯含量。(H)血清ALT位準。(I)血清AST位準。(J)肝臟GSH含量。(K)肝臟膠原蛋白位準(L及M) (L)促炎性標識(*Tnfα*、*Ccl2*、*Ccl5*)及(M)纖維化標識(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Acta2*)之肝臟mRNA表現。(N)肝臟p-ERK、ERK、p-JNK、JNK、p-STAT3、STAT3之西方墨點法。(C-E, G-M)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，杜凱氏校正司徒頓*t*檢定；從左至右，所示的條件為：NC 零、HFMCD 零、HFMCD *sgp130*。

【0409】 圖43A及43B.盒形圖其顯示有肝細胞特異性刪失*Il11ra1*的小鼠受保護免於HFMCD誘發的基因失調。(A及B)來自如36J圖中所示處於NC及HFMCD飲食之對照及CKO小鼠中的(A)促炎性標識(*Tnfα*、*Ccl2*、*Ccl5*)及(B)纖維化標識(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Acta2*)之肝臟mRNA表現。(A-B)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，希達克校正司徒頓*t*檢定；針對各種基因，從左至右，所示的條件為：NC WT、NC CKO、HFMCD WT、HFMCD CKO。

【0410】 圖44A至44E.盒形圖其係顯示有肝細胞特異性刪失*Il11ra1*的小鼠受保護免於WDF誘發的NASH表現型。(A-E)如圖37A中所示處於NC及WDF飲食之對照及CKO小鼠的資料。(A及B)如37L圖中所示的(A)促炎性標識(*Tnfα*、*Ccl2*、*Ccl5*)及(B)纖維化標識(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Acta2*)之肝臟mRNA表現。(C)空腹血糖位準。(D)血清三酸甘油酯位準。(E)血清膽固醇位準。(A-E)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，希達克校正司徒頓*t*檢定。(A及B)針對各種基因，從左至右，所示的條件為：NC WT、

NC CKO、WDF WT、WDF CKO。(C-E)從左至右，所示的條件為：NC WT、NC CKO、WDF WT、WDF CKO。

【0411】圖45A至45D.示意圖及盒形圖其顯示肝細胞特異性IL11順式訊息傳導而不是IL11反式訊息傳導驅動小鼠內WDF誘發的脂肪變性肝炎。(A)全長膜結合型IL11RA蛋白域結構及其胺基酸位置(左)及用來建構可溶性IL11RA的該等域(右)之示意圖。(B-D)對於如圖38A中所說明的*Il11ra1*^{+/+}(WT)小鼠及已經注射AAV8-Alb-零、AAV8-Alb-mb*Il11ra1*(全長膜結合型*Il11ra1*)或AAV8-Alb-s*Il11ra1*(*Il11ra1*的可溶性形式)之全面刪失*Il11ra1*的小鼠(*Il11ra1*^{-/-}; KO小鼠)之WDF餵食攝生法的資料。(B)處於WDF的AAV8-Alb-零及AAV8-Alb-s*Il11ra1*-注射的KO小鼠之血清IL11RA位準。(C及D)(C)促炎性標識(*Tnfα*、*Ccl2*、*Ccl5*)及(D)纖維化標識(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Acta2*)之肝臟mRNA表現。(B-D)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，杜凱氏校正司徒頓*t*檢定。(C及D)針對各種基因，從左至右，所示的條件為：NC 零 WT、WDF 零 WT、WDF 零 KO、WDF *mbIl11ra1* KO、WDF *sIl11ra1* KO。

【0412】圖46A至46L.示意圖、影像及盒形圖其顯示肝細胞特異性IL11順式訊息傳導而不是IL11反式訊息傳導驅動了處於HFMCD的小鼠之脂肪變性肝炎。(A)(B-L)中所示的實驗之HFMCD餵食的WT及KO小鼠之示意圖。KO小鼠予以靜脈內注射AAV8-Alb-零、AAV8-Alb-mb*Il11ra1*或AAV8-ALB-s*Il11ra1*；WT小鼠接受AAV8-Alb-零作為對照。病毒投予三週後，小鼠開始HFMCD餵食4週。(B)西方墨點法顯示IL11RA及GAPDH的肝位準。(C)血清IL11RA位準。(D)肝臟的代表性大體解剖學及H&E染色的影像。(E)肝臟三酸甘油酯含量。(F)血清ALT位準。(G)血清AST位準。(H)肝臟GSH位準。(I)肝臟膠原蛋白含量。(J及K)(J)促炎性標識(*Tnfα*、*Ccl2*、*Ccl5*)及(K)纖維化標識(*Colla1*、*Colla2*、*Col3a1*、*Acta2*)

之肝臟mRNA表現。(L)西方墨點法顯示肝臟ERK及JNK活化狀態。(C, E-K)資料顯示為盒鬚圖加上中位數(中線)，25th-75th百分位數(盒)及min-max數值(鬚)，杜凱氏校正司徒頓t檢定。(E-I)從左至右，所示的條件為：NC 零 WT、HFMCD 零 WT、HFMCD 零 KO、HFMCD *mbll11ral* KO、HFMCD *sll11ral* KO。(J及K)針對各種基因，從左至右，所示的條件為：NC 零 WT、HFMCD 零 WT、HFMCD 零 KO、HFMCD *mbll11ral* KO、HFMCD *sll11ral* KO。

【0413】圖47A及47B.圖及影像其顯示胰臟星形細胞(PSCs)表現IL-11R α 及gp130，但不表現IL-6R α 。(A)小鼠PSC及管細胞之*Il6st*(編碼gp130)、*Il11ral*及*Il6ra*的表現之單一細胞RNA定序分析。(B)人類PSCs之gp130、IL11RA及IL6RA蛋白的免疫螢光分析表現。

【0414】圖48A及48B.盒形圖及影像其顯示胰臟星形細胞(PSCs)活化成 α SMA陽性、膠原蛋白表現纖維發生的表現型。(A)在中和性抗IL-11RA抗體或IgG同型對照抗體存在或不存在下、用所示因子於活體外刺激PSCs歷時24小時後，ACTA2陽性細胞的百分率及膠原蛋白I強度/面積之高內涵成像分析之定量。(B)在中和性抗IL-11RA抗體或IgG同型對照抗體存在下、用所示因子於活體外刺激PSCs歷時24小時後，膠原蛋白I的強度/面積之高內涵成像分析的代表性影像。

【0415】圖49A至49C.有關於具有可誘發的、纖維母細胞特異性IL-11表現的基因轉殖小鼠內之活體內誘發胰臟纖維化之示意圖、盒形圖及影像。(A)實驗示意圖，其中基因轉殖*Colla2-CreER Rosa26Il11/+*(IL11 Tg)小鼠係藉由太莫西芬(tamoxifen)治療來誘發以表現IL-11於纖維母細胞內。(B)24天後的對照小鼠及IL11 Tg小鼠之胰臟組織的羥基脯胺酸含量。(C)自24天後的對照及IL11 Tg小鼠之胰臟組織的梅森氏三色染色的代表性影像。

【0416】圖50A至50C.有關於拮抗IL-11媒介的訊息傳導於胰損傷之胰管結紮(PDL)模式內之效應。(A)實驗示意圖，其中胰損傷係藉由PDL來誘發，且其中

小鼠繼而用中和性抗IL-11RA抗體或IgG同型對照抗體治療。(B)在14天時用中和性抗IL-11RA抗體或IgG同型對照抗體治療的小鼠之經結紮大葉的重量。(C)在14天時用中和性抗IL-11RA抗體或IgG同型對照抗體治療的胰臟組織之梅森氏三色染色的代表性影像。

【實施方式】

【0417】 較佳實施例之詳細說明

實施例

在下列實施例中，本發明人證實抑制IL-11媒介的訊息傳導能使一系列代謝性疾病之嚴重性降低及症狀逆轉。

實施例1：實施例1至4之一般方法

IL-11-RA-剔除小鼠

【0418】 缺乏Il11ra的功能性對偶基因(Il11ra^{-/-})之小鼠係具C57Bl/6J遺傳背景(B6.129S1-Il11ratm1Wehi/J, Jackson’s Laboratory)。

以抗IL-11或抗IL-11Rα抗體之治療

【0419】 小鼠予以腹膜內注射10 mg/kg的拮抗劑抗IL-11抗體、拮抗劑抗IL-11Rα抗體、或相同數量同型匹配的IgG對照抗體。抗IL-11及抗IL-11Rα抗體分別結合小鼠IL-11及小鼠IL-11Rα，且抑制IL-11媒介的訊息傳導。

【0420】 具體地，本實施例中使用的抗IL-11抗體為小鼠抗小鼠IL-11 IgG X203，其係揭露於例如Ng等人，Sci Transl Med. (2019) 11(511) pii: eaaw1237(也被發佈為Ng等人，“IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis.” bioRxiv 336537; doi: <https://doi.org/10.1101/336537>)內。X203亦稱為“Enx203”，且包含如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:92的VH區域(本揭露內容之SEQ ID NO:22)，以及如WO 2019/238882 A1之SEQ ID NO:94的VL區域(本揭露內容之SEQ ID NO:23)。

【0421】 本實施例中使用的抗IL-11R α 抗體為小鼠抗小鼠IL-11R α IgG X209，其係揭露於例如Widjaja等人，Gastroenterology (2019) 157(3):777-792(也被發佈為Widjaja等人，“IL-11 neutralising therapies target hepatic stellate cell-induced liver inflammation and fibrosis in NASH.” bioRxiv 470062; doi: <https://doi.org/10.1101/470062>) 內。X209亦稱為“Enx209”，且包含如WO 2019/238884 A1之SEQ ID NO:7的VH區域(本揭露內容之SEQ ID NO:24)，以及如WO 2019/238884 A1之SEQ ID NO:14的VL區域(本揭露內容之SEQ ID NO:25)。

飲食

【0422】 西方飲食加果糖(WDF)用於建立極其類似於肥胖、T2D及NAFLD期間中人類之該等的代謝障礙(Baena等人, Sci Rep (2016) 6: 26149, Machado等人, PLoS One (2015) 10:e0127991)。

【0423】 為了建立像是肥胖及T2D的代謝性疾病，自12週齡起向小鼠餵食西方飲食(D12079B，Research Diets)補充含15%重量/體積果糖之飲用水(WDF)歷時16週。

【0424】 高脂肪甲硫胺酸膽鹼缺乏飲食(HFMCD)用於建立類惡病質的代謝障礙。為了建立惡病質體重減輕及瘦體質量減輕，向C57BL/6N小鼠餵食補充有60 kcal%脂肪的甲硫胺酸及膽鹼缺乏(HFMCD)飲食(A06071301B, Research Diets)。

【0425】 對照個體餵食正常食品(NC, Specialty Feeds)及飲用水。

身體組成之回音MRI分析

【0426】 每二週藉由EchoMRI分析、使用4in1 Body Composition Analyzer for Live Small Animals來進行總體脂肪與瘦體質量測量。

空腹血糖量測

【0427】 針對空腹血糖量測，使小鼠空腹6小時然後(經由尾剪斷)採血，以

及使用Accu-Chek血糖機來獲得空腹葡萄糖量測。

腹膜內葡萄糖耐受性測試(ipGTT)

【0428】 針對腹膜內葡萄糖耐受性測試，使小鼠空腹6小時然後經受ipGTT。基礎空腹葡萄糖係藉由尾剪斷、使用Accu-Chek血糖機來量測。腹膜內注射2g/kg瘦體質量的葡萄糖，以及每15 min進行葡萄糖量測歷時2小時。計算曲線下面積(AUC)，且繪製成長條圖。

胰臟蘭氏小島、升糖素及胰島素之組織學

【0429】 針對組織學分析，切下胰臟樣本且在RT下於4%中性緩衝之福馬林(NBF)中固定24小時，且儲存於30%蔗糖中。5μm冷凍切片用升糖素或胰島素抗體染色過夜，且用ImmPRESS HRP IgG聚合物偵測套組(Vector Laboratories)加上ImmPACT DAB過氧化酶受質(Vector Laboratories)、根據標準程序予以視覺化，且藉由光學顯微術檢查。

實施例2：於肥胖相關的障礙中拮抗IL-11媒介的訊息傳導

【0430】 為了探究拮抗IL-11媒介的訊息傳導對肥胖及相關的障礙像是T2D之效應，使用利用IL-11受體 α 剔除(IL11-RA^{-/-})小鼠之此等代謝性疾病的飲食誘發的小鼠模式，或用拮抗劑抗小鼠IL-11抗體或拮抗劑抗小鼠IL-11RA抗體治療之小鼠來進行活體內實驗。

【0431】 餵食正常食品飲食(NCD)或WDF的IL11RA剔除小鼠相較於野生型IL-11RA表現同胎仔畜而言，展現出改良的代謝表現型。

【0432】 圖1A及1B顯示野生型小鼠比IL11RA剔除小鼠的體重增加更多。圖2A及2B顯示IL11RA剔除小鼠相較於野生型小鼠而言具有顯著更低的總體脂肪質量。圖3顯示IL11RA剔除小鼠相較於野生型小鼠而言具有顯著更低的空腹血糖位準。圖4顯示IL11RA剔除小鼠相較於野生型小鼠而言具有顯著更低的血清三酸甘油酯位準。圖5A及5B顯示IL11RA剔除小鼠相較於野生型小鼠而言具有顯著

更低的血清膽固醇位準。

【0433】 該等結果暗示降低IL-11媒介的訊息傳導於代謝方面具有有益的效應。

【0434】 本發明人接下來探究拮抗劑抗IL-11RA抗體或對照IgG抗體對於餵食WDF之小鼠的效應。

【0435】 驚人地，餵食WDF的抗IL-11RA抗體治療之小鼠當相較於餵食WDF的對照IgG抗體治療之小鼠而言，顯示出顯著降低的體重(圖6A)。相似於IL11RA KO小鼠(圖3)，此等抗IL-11RA抗體治療之小鼠亦顯示出顯著降低的脂肪質量(圖6B)。

【0436】 有趣的是，抗IL-11RA抗體治療之小鼠相較於IgG對照治療之小鼠而言，亦觀察到瘦體質量的增加，暗示在WDF誘發的代謝致病機轉期間抑制IL-11訊息傳導恢復肌肉質量。此外，腹膜內葡萄糖耐受性測試(ipGTT)結果與空腹葡萄糖一起顯示了用抗IL-11RA抗體治療之小鼠的葡萄糖耐受性之顯著改良(圖7A及7B)。

【0437】 將分析延伸至對胰臟之作用。意外地發現當相較IgG對照治療之小鼠而言，餵食WDF的抗IL-11RA抗體治療之小鼠無論自8至16週治療(用於防止與代謝性疾病有關連之效應)抑或自16至24週治療(用於逆轉與代謝性疾病有關連之效應)均展現顯著防止WDF誘發之胰臟損失(圖8)。

【0438】 圖9A顯示餵食WDF的抗IL-11RA抗體治療之小鼠相較於餵食WDF的對照IgG抗體治療之小鼠而言具有顯著更低的血清膽固醇位準，以及圖9B顯示餵食WDF的抗IL-11RA抗體治療之小鼠相較於餵食WDF的對照IgG抗體治療之小鼠而言具有顯著更低的血清三酸甘油酯位準。圖9C顯示餵食WDF的抗IL-11RA抗體治療之小鼠相較於餵食WDF的對照IgG抗體治療之小鼠而言具有顯著更低的空腹血糖位準。

【0439】再者，胰臟之免疫組織學亦揭露IgG治療的餵食WDF之小鼠中的胰島中之升糖素及胰島素染色增加以及胰島增生(圖10A及10B)，其為T2D之經典特徵(Bonner-Weir and O'Brien Diabetes (2008) 57:2899-2904)。餵食WDF之小鼠中自16至24週的抗IL-11RA抗體治療顯著降低胰島增生及升糖素染色以及改良餵食WDF之小鼠之胰島中的胰島素表現(圖10A及10B)，暗示著拮抗IL-11媒介的訊息傳導適用於改良及逆轉由西方型飲食所導致之代謝性疾病。

實施例3：拮抗IL-11媒介的訊息傳導及惡病質

【0440】評估抗IL-11療法其等對於惡病質之小鼠模式的效應。

【0441】餵食小鼠甲硫胺酸-膽鹼缺乏(MCD)飲食導致嚴重的非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)、肝發炎及纖維化，以及導致嚴重且持續的體重減輕(於3週MCD飲食後高達30%的體重)。儘管處於MCD飲食的小鼠具有比處於正常食品飲食(NCD)的該等更高36%的代謝率且具有強大的食慾刺激的環境(低瘦素、低葡萄糖、低TGs/膽固醇、低胰島素)，但是其等沒有增加其等之攝食量(Rizki等人之 J. Lipid Res. (2006) 47:2280-2290)。因此，MCD飲食是公認的惡病質模式且具有和癌症關連之惡病質一樣的特徵。脂肪變性肝炎在實驗及人類癌症惡病質中經常有記錄且於消耗症候群方面起的作用很重要但知之甚少。

【0442】向五週大雄性小鼠餵食有60 kcal%脂肪的甲硫胺酸及膽鹼缺乏(MCD)飲食(A06071301B, Research Diets)，命名為高脂肪MCD(HFMCD)飲食，其導致比單單MCD飲食更嚴重的NASH。向對照小鼠餵食正常食品(NC, Specialty Feeds)。在小鼠已經接受HFMCD相同的治療持續時間之後一週，每週二次向小鼠腹膜內注射10 mg/kg抗IL-11抗體或抗IL-11RA抗體，或相同濃度的IgG同型對照。每週量測體重。

【0443】結果顯示於圖11A及11B中。發現抗IL-11療法對於體重有深刻的積極影響，表示抑制IL-11媒介的訊息傳導能改良惡病質關連之體重減輕。雖然全

部的HFMCD治療組($n \geq 5$ 隻小鼠/組)在第一週餵食脂肪變性肝炎誘發的HFMCD飲食之後損失約15%體重，但是接受抗IL-11或抗IL-11RA療法的該等很快地恢復體重且5週後返回至正常或接近正常體重(圖11A)。餵食NC飲食之小鼠穩定增加體重，而餵食HFMCD飲食且用IgG對照治療之小鼠在治療過程中減輕約30%體重。小鼠體型大小示例比較顯示於圖11B中。因而發現抑制IL-11媒介的訊息傳導逆轉厭食症/惡病質小鼠模式內之活體內惡病質。

【0444】 為了進一步探究抑制IL-11媒介的訊息傳導關於惡病質之效應，所以以MCD模式來研究一系列劑量的抗IL-11RA療法。如前所述向五週大雄性小鼠餵食HFMCD或NC飲食一週以誘發惡病質，導致MCD小鼠之約15%體重減輕。在最初一週之後，每週二次向小鼠腹膜內注射0.5、1、5或10 mg/kg的抗IL-11或抗IL-11RA抗體。研究三種抗體：二種抗IL-11((1)及(2))及一種抗IL-11RA。10 mg/kg的IgG同型抗體用作對照。

【0445】 每週量測體重及攝食量。對於攝食量，量測籠子($n=3$ 隻小鼠/籠)之食物料斗中的平均攝食量(g/小鼠/週)。

【0446】 體重結果顯示於圖12A至12C中。發現全部的三種抗IL-11療法提供體重之劑量依賴性增加，指示惡病質逆轉。最高劑量顯示最大惡病質逆轉效應。餵食NC飲食之小鼠穩定增加體重，而餵食HFMCD飲食且用IgG對照治療之小鼠在治療過程中減輕約30%體重。

【0447】 攝食量結果顯示於圖13A至13C中。發現全部的三種抗IL-11療法提供攝食量之劑量依賴性增加。最高劑量對於攝食量有最大效應，而用IgG對照治療之小鼠顯示攝食量之輕微減少。

【0448】 發現抗IL-11RA抗體療法在逆轉體重減輕上是最有效的，且與攝食量的最大增加有關連。

【0449】 急性疾病，例如創傷或敗血症亦可與厭食症及惡病質有關連，是

以本發明人接下來探究在急性腎損傷小鼠模式中拮抗IL-11媒介的訊息傳導對於厭食症及惡病質之效應。

【0450】 腎損傷係藉由向10週大雄性小鼠IP注射配於媒劑(vehicle) (0.3M NaHCO₃)之葉酸(180 mg/kg)來誘發；向對照小鼠僅投予媒劑。注射後28天犧牲動物。自葉酸投予之前1小時開始每3天向小鼠腹膜內注射20 mg/kg抗IL-11抗體、抗IL-11RA抗體，或相同濃度的IgG同型對照直至犧牲小鼠。

【0451】 結果顯示於圖14A中。葉酸誘發之腎損傷導致與嚴重及雙側腎損傷之急性期有關連之快速厭食症/惡病質相關之體重減輕。在損傷時及持續損傷持續時間接受抗IL-11R α 或抗IL-11療法之小鼠(n=7/組)相較於IgG對照而言更快恢復體重，且3週後返回至正常或接近正常體重。

【0452】 於第二個實驗中，如前藉由IP注射葉酸來誘發腎損傷。自腎損傷之後21天僅用抗IL-11抗體或IgG對照治療小鼠。在抗體治療之前及之後評估動物體重。沒有接受葉酸之健康小鼠用作對照。

【0453】 結果顯示於圖14B中。用抗IL-11抗體治療之動物在起始治療後開始恢復體重，其顯示消耗關連之體重減輕可在晚期疾病中改良。

【0454】 在另外的實驗中，小鼠經受單側性輸尿管阻塞(UUO)誘發的急性腎損傷。UUO手術係於12週大雄性小鼠上進行。簡言之，藉由IP注射愷他命(100 mg/kg)/甲苯噻嗪(10 mg/kg)來麻醉小鼠且用底反射來查詢完全深度麻醉。繼而剃光小鼠腹部左側。用手術刀穿過皮膚做出一垂直切口，做出第二個切口穿過腹膜以露出腎臟。使用鑷子，將腎臟帶至表面且用手術絲線綁住腎臟下方的輸尿管二次。輕輕將結紮的腎臟放回正確的解剖體位並添加無菌生理食鹽水以補充液體流失。接著縫合切口。術後用抗生素恩氟奎林羧酸(15 mg/kg, SC)及止痛劑丁基原啡因(0.1 mg/kg, SC)來治療動物連續三天。結紮後10天犧牲小鼠。自手術後第4天向小鼠腹膜內注射20 mg/kg(2x/週)抗IL-11抗體或相同濃度的IgG同型對

照直至犧牲小鼠。

【0455】 結果顯示於圖15中。二組動物起始由於手術創傷關連之厭食症都減輕了相似量的體重(~6%)。接受抗IL-11療法之動物(自UVO後第4天2x/週20 mg/kg直至犧牲小鼠)比接受IgG對照的該等更快恢復體重，且於4天內返回正常體重。

【0456】 因此拮抗IL-11媒介的訊息傳導係與急性疾病模式之治療性恢復體重有關連。

【0457】 本發明人接下來經由注射重組小鼠IL-11或誘發IL-11轉殖基因表現來探究IL-11過度表現對於小鼠體重之效應。

【0458】 重組小鼠IL-11(rmIL11)復原成濃度 $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ 配於生理食鹽水。十週大雄性野生型C57BL/6J小鼠每日接受皮下注射 $100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ 的rmIL11配於生理食鹽水(n=19)或相同體積的生理食鹽水(n=15)歷時21日。

【0459】 結果顯示於圖16A中。發現投予rmIL11減慢正常體重增加之進展。接受每日注射rmIL11歷時21日的小鼠當相較於僅接受生理食鹽水的該等而言，在治療過程期間中體重增加較小。

【0460】 創造IL-11基因轉殖(IL-11-Tg)小鼠。異型組合Rosa26-IL11小鼠與Colla2-CreER小鼠雜交以創造雙重異型組合Colla2-CreER:Rosa26-IL11後代(IL-11-Tg小鼠)且IL-11轉殖基因表現於纖維母細胞內。關於Cre媒介的IL-11轉殖基因誘發，IL-11-Tg小鼠於6週大時予以腹膜內注射 50 mg kg^{-1} 太莫西芬(Sigma-Aldrich)連續10天且於第21天犧牲動物(n=14)。Rosa26:Il11小鼠(沒有Colla2-CreER對偶基因)予以注射等效劑量的太莫西芬連續10天作為對照(n=10)。

【0461】 結果顯示於圖16B中。IL-11-Tg小鼠顯現惡病質之早期徵象、停止增加體重且經歷體重隨時間推移而減輕。因而，發現IL-11媒介的訊息傳導促成

消耗關連之體重減輕。

實施例4：於非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)小鼠模式中拮抗IL-11媒介的訊息傳導

【0462】 本發明人探究IL-11訊息傳導於非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)之致病機轉的作用。

4.1 方法

【0463】 用IL-11刺激肝臟星形細胞(HSCs)或肝細胞且使用細胞及高內涵成像、免疫墨點法、ELISA及侵襲分析法來評估效應。遺傳及或藥理的IL-11功能獲得或喪失實驗係於活體外及活體內執行。IL-11訊息傳導係使用ERK抑制劑來研究。抗IL-11或抗IL11RA療法的效應係於三種臨床前NASH模式中使用甲硫胺酸/膽鹼缺乏飲食或西方飲食加液態果糖來評估。表現型分型係使用羥基脯胺酸分析法、qPCR、RNA-seq、西方墨點法、組織學、CyTOF、脂質及代謝生物標誌來執行。

動物實驗

【0464】 所有的動物程序係經SingHealth機構動物護理和使用委員會(IACUC)批准並按照其來進行。所有的小鼠都提供了自由採食和飲水。

NASH之小鼠模式

高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏(HFMCD)飲食餵食的野生型小鼠

【0465】 向五週大雄性C57BL/6N小鼠餵食補充有60 kcal%脂肪的甲硫胺酸及膽鹼缺乏飲食(A06071301B16, Research Diets)；向對照小鼠餵食正常食品(NC, Specialty Feeds)。說明飲食持續期間及抗體療法。

甲硫胺酸及膽鹼缺乏(MCD)飲食餵食的db/db小鼠

【0466】 C57BL/6J遺傳背景的雄性BKS.Cg-Dock7m+/+LeprdbJ (db/db)小鼠為12週大且處於肝臟脂肪變性期，當餵食其等甲硫胺酸及膽鹼缺乏飲食(MCD,

A02082002BRi, Research Diets)8週時；對照小鼠屬相同的基因型。說明飲食持續期間及抗體療法。

西方飲食補充果糖(WDF)餵食的野生型小鼠

【0467】 向十週大雄性C57Bl/6J小鼠餵食西方飲食(D12079B, Research Diets)補充有15%重量/體積果糖之飲用水，以模擬NAFLD/NASH樣的人類17,18，而對照小鼠接受正常食品及自來水。說明飲食持續期間及抗體療法。

Il11ra-缺失小鼠

【0468】 缺乏Il11ra的功能性對偶基因之小鼠(Il11ra-/-)係具C57Bl/6J遺傳背景(B6.129S1-Il11ratm1Wehi/J, Jackson's Laboratory)。Il11ra-/-小鼠及其等的野生型同胎仔畜(Il11ra+/+)二者均(1)自5週大起餵食HFMCD歷時10週以及(2)自12週大起餵食WDF歷時16週以發展NASH；對照小鼠餵食NC歷時相同的持續期間。

Il-11之活體內投予

【0469】 十週大雄性Colla1-GFP報告小鼠19及野生型C57BL/6J小鼠每日接受皮下注射100 µg/kg的重組小鼠Il-11(rmIl-11)或相同體積的生理食鹽水21日。

抗IL-11或抗IL11RA單株抗體之活體內投予

【0470】 小鼠予以腹膜內注射拮抗劑抗IL-11抗體、拮抗劑抗IL-11RA抗體、或相同數量的IgG同型對照歷時圖示中概述的治療持續時間。

空腹血糖量測

【0471】 使小鼠空腹6 h然後(經由尾剪斷)採血以及使用Accu-Chek血糖機來進行空腹葡萄糖量測。

細胞培養

【0472】 細胞(心房纖維母細胞、HSCs及肝細胞)於37°C及5% CO2下生長及維持。每2-3天更新生長培養基以及細胞於80-90%融合時使用標準的胰蛋白酶處理技術予以傳代。所有的實驗都以低細胞傳代(P1-P2)來進行。使細胞血清饑餓

16 h然後予以刺激。刺激的細胞係與已經於相同的條件(無血清培養基)下生長相同的持續時間但是沒有刺激物之未刺激的細胞作比較。

初級人類心房纖維母細胞

【0473】 人類心房纖維母細胞係如先前所描述予以製備及培養11。

初級人類肝臟星形細胞(HSCs)

【0474】 HSCs(5300, ScienCell)係培養於多-L-離胺酸塗覆的平盤(2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 0403, ScienCell)上、星形細胞完全培養基(5301, ScienCell)內。

初級人類肝細胞

【0475】 人類肝細胞(5200, ScienCell)係生長及維持於增補2%胎牛血清(FBS)及1%青黴素-鏈黴素之肝細胞培養基(5201, ScienCell)內。

THP-1

【0476】 THP-1(ATCC)係培養於增補10% FBS及0.05mM β -巰乙醇的RPMI 1640(A1049101, Thermo Fisher)內。THP-1細胞係用配於RPMI 1640之10 ng/ml的佛波醇 12-十四烷酸酯 13-乙酸酯(PMA, P1585, Sigma)予以分化歷時48 h。

Operetta高通量表現型分型分析法

【0477】 Operetta分析法基本上如先前所述11加上於此所述的小修改來執行：HSCs或肝細胞係以每孔 5×10^3 個細胞的密度播種於96孔黑色CellCarrier平盤(PerkinElmer)。實驗條件後，細胞於4%聚甲醛(PFA, 28908, Thermo Fisher)內固定，以0.1%曲拉通X-100(TritonX-100) (Sigma)予以透化且用配於PBS之0.5% BSA及0.1%吐溫20(Tween-20)予以阻斷非特異性位址。細胞用初級抗體(1:500)孵育過夜(4°C)，接著用合適的AlexaFluor488二級抗體(1:1000)孵育。進行玫瑰紅-鬼筆環肽染色(1:1000, R415, Thermo Fisher)孵育過夜(4°C)。細胞用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI(D1306, Thermo Fisher)在阻斷溶液中予以對比染色。使用Operetta高內涵成像系統1483(PerkinElmer)來使各條件自重複孔及最少7個場/孔予以成像。使用Harmony

v3.5.2(PerkinElmer)來定量表現ACTA2的細胞以及判定每個場之活化的纖維母細胞/總細胞數目(ACTA2+ve)之百分率。用Columbus 2.7.1(PerkinElmer)來執行膠原蛋白I之每面積螢光強度(正規化為細胞數目)的量測。

免疫螢光

【0478】 人類HSCs及肝細胞播種於8孔腔室載玻片(1.5×10^4 個細胞/孔)上24 h然後染色。細胞以4% PFA固定20 min、用PBS清洗，以及用5% BSA配於PBS予以阻斷非特異性位址2 h。用抗IL11RA或抗IL6R抗體孵育細胞過夜(4°C)，接著用合適的Alexa Fluor 488二級抗體孵育1 h。腔室載玻片於黑暗中乾燥且添加5滴具有DAPI之封固劑至載玻片 15 min然後以螢光顯微鏡(Leica)成像。

飛行時間質量細胞量測術(CyTOF)

【0479】 免疫細胞係如先前所描述自肝臟單離20。將肝臟組織絞碎且在37°C下用100 µg/ml膠原蛋白酶IV及20 U/ml DNase I消化1 h。在消化之後，使細胞通過濾過器以獲得單一細胞懸浮液且經受percoll梯度離心以單離免疫細胞。CyTOF染色係如先前所描述來執行21。將細胞解凍且用順鉑(Fluidigm)染色以鑑定活細胞，隨後用金屬共軛之CD45抗體染色用於編條形碼目的。在編條形碼之後，將細胞用金屬共軛之細胞表面抗體(Ly6C)染色。隨後細胞用1.6% PFA固定，用100%甲醇予以透化，且使其經受細胞內抗體染色(TGFβ1)。細胞用DNA嵌入劑標記然後於Helios質量細胞計數器(Fluidigm)上進行擷取。針對分析，首先鑑定活單一細胞，隨後去條形碼以鑑定個別樣品。使用Flowjo軟體(Flowjo, LLC, USA)執行手動圈選。

統計分析

【0480】 統計分析係使用GraphPad Prism軟體(版本6.07)來執行。根據唐奈特氏(當比較一個條件之數個實驗組時)、杜凱氏(當一個實驗內的數個條件彼此比較時)、希達克(當來自2種不同基因型的數個條件彼此比較時)來校正多重檢定

之P值。二種不同組別比較二種參數(跨時間抗體功效)之分析係用二因子ANOVA來執行。統計顯著性之準則為 $P < 0.05$ 。

資料可用性

【0481】 此研究產生的高通量定序資料可自GSE128940下載。所有其他的資料係於手稿或補充方法中。

4.2結果

概述

【0482】 HSCs以NASH因子刺激時分泌IL-11，其驅動HSC向肌纖維母細胞轉化所需的自泌、ERK依賴性訊息傳導環。IL-11於人類及鼠類NASH中是向上調節的，IL-11注射於小鼠導致肝損壞、發炎及纖維化且Il11ra1刪失小鼠於二種臨床前模式中受保護免於NASH。對抗IL11RA或IL-11之治療抗體於三種鼠類NASH模式內一致地抑制且逆轉纖維化及脂肪變性。意想不到地，IL-11導致肝細胞損壞及促進基質媒介的發炎以及抗IL-11療法逆轉與NASH有關連之肝毒性及肝炎。遺傳及藥理的抑制NASH中的IL-11訊息傳導係與較低的血清三酸甘油酯、膽固醇及葡萄糖有關連。

IL-11活化HSCs及驅動肝纖維化

【0483】 全基因體RNA-seq分析揭露TGFβ1強有力地向上調節HSCs中的IL-11(14.9倍， $P = 3.40 \times 10^{-145}$)，其係藉由qPCR來證實，於蛋白位準確認且於實驗中使用精確切削人類肝臟切片來重複(圖17A-17C，圖24A)。獨立產生的RNA-seq資料²²顯示HSCs當生長於堅硬的基質上以仿照肝硬化的肝臟時，向上調節最多的基因是IL-11(圖24B)。HSCs比對IL-11有反應之心臟或肺纖維母細胞，表現更高的IL-11受體次單元α (IL11RA)位準(圖24B)。免疫細胞化學分析確認HSCs中的高IL11RA表現且偵測不到的IL6R表現(圖17D)。人類肝臟樣本的西方墨點法顯示有纖維化肝病包括NASH之患者內IL-11增加(圖24D-24E)。此等資料

顯示HSCs於人類肝臟中是IL-11的來源及標靶二者且IL-11於人類肝病中是提高的。

【0484】 為了探究IL-11對HSCs之效應，所以用IL-11、TGFβ1或PDGF刺激細胞。IL-11活化HSCs達到如TGFβ1或PDGF相似的程度，將靜止HSCs轉化為分泌膠原蛋白及基質修飾酵素之ACTA2⁺肌纖維母細胞(圖17E-17H，圖24F-24H)。IL-11亦促進HSCs之劑量依賴性基質侵襲，其為NASH中的HSC病理生物學之重要態樣²³(圖17I)。用超IL-11¹¹刺激的HSCs亦分泌IL-11，確認IL11訊息傳導之自泌前饋環(圖17J)。

【0485】 用重組小鼠Il-11(rmIl-11)治療的*Colla1-GFP*報告基因小鼠¹⁹於肝內蓄積GFP表現*Colla1*⁺肌纖維母細胞，進一步確認Il-11對於活體內HSC向肌纖維母細胞轉化的效應。向小鼠皮下投予rmIl-11歷時21天亦增加肝臟膠原蛋白含量、關鍵促纖維化及促炎性基因的表現以及血清丙胺酸轉胺酶(ALT) (圖17K-17N，圖24I-24K)。此暗示rmIl-11除了纖維化之外還導致肝細胞損壞及發炎。*Il11ra1*刪失保護小鼠免於NASH關連之發炎、肝毒性及纖維化且降低血清脂質及葡萄糖

【0486】 研究係於一種嚴重的NASH臨床前模式中、使用高脂肪甲硫胺酸及膽鹼缺乏(HFMCDD)飲食進行來執行¹⁶。於此模式中，*Il-11* mRNA溫和地提高而蛋白位準高度地向上調節，暗示肝臟內之轉錄後調節Il-11表現(圖25A-25B)。於NASH之致病機轉可能是很重要的Erk活化²⁴、增加的膠原蛋白及提高的血清ALT位準鏡像反映了NASH期間中的進行性Il-11蛋白誘發(圖18A，圖25C-25D)。

【0487】 為了評估NASH中增加的Il-11位準之病理生理關聯性，本發明人使用一遺傳的功能喪失模式：Il-11受體次單元α 刪失的小鼠(*Il11ra1*^{-/-})²⁵。處於HFMCDD飲食的*Il11ra1*^{-/-}小鼠當相較於對照而言，受強有力的保護免於纖維化以及脂肪變性及肝損壞較小(圖18B-18D，圖25E-25H)。此外，於*Il11ra1*^{-/-}小鼠觀察

到明顯較小的肝發炎(圖18E)，暗示IL-11在多個NASH的病理學扮演重要角色。

【0488】 HFMCD模式具有早期發作脂肪變性肝炎隨後纖維化。然而，此模式並不為肥胖或胰島素抗性的。另一個NASH模式係使用西方飲食補充液態果糖(WDF)來建立²⁶，其為肥胖、胰島素抗性及高血糖，鏡像反映人類NASH¹⁸。於WDF餵食16週之後，NASH建立且肝臟中的IL-11蛋白為向上調節的(圖18F)。處於WDF的*Il11ral*^{-/-}小鼠相較於對照小鼠而言有相似的體重增加，但受保護免於肝脂肪變性、發炎、肝細胞損壞及纖維化(圖18G-18J，圖26)。*Il11ral*^{-/-}小鼠的Erk活化於HFMCD及WDF二種模式中均減弱，暗示IL-11驅動的Erk活化對於NASH很重要(圖18K，圖25I)。

【0489】 NASH死亡率的主因是心血管：心肌梗塞、腎衰竭及中風^{27,28}。心血管風險的生物標誌係於*Il11ral*^{-/-}小鼠處於WDF飲食16週之後測量。當相較於同胎仔畜對照而言，處於WDF的*Il11ral*^{-/-}小鼠具有較低的空腹血糖、血清膽固醇及三酸甘油酯位準(圖18L-18N)。

中和性抗IL-11或抗IL11RA抗體阻斷HSC活化

【0490】 小鼠係以IL11RA予以遺傳免疫以產生中和性抗IL11RA抗體。鑑定出阻斷纖維母細胞轉化的殖株¹¹且殖株X209(IgG1 κ , K_D = 6nM)為優先。X209係以5.8pM之IC₅₀阻斷MMP2自HSCs分泌且具有大約18天的活體內半生期加上良好的肝臟攝入(圖19A，圖27A-27D)。為了確保針對IL-11訊息傳導之治療特異性，發展中和性抗IL-11抗體X203¹²(IgG1 κ ，HSC活化之IC₅₀= 40.1pM)且於實驗中使用。

【0491】 本發明人發現，除了TGF β 1之外(圖17A-17C)，其他的重要的NASH刺激物例如PDGF、CCL2、血管收縮素II、bFGF或氧化壓力誘發IL-11自HSCs分泌(圖19B)。此暗示IL-11於多個因子下游的HSC活化起作用。為測試此事，HSCs以各種NASH因子刺激且發現所有的刺激物取決於完整的IL-11訊息傳導來誘發

ACTA2或膠原蛋白表現(圖19C，圖27E)。於單獨的分析中，PDGF或CCL2對於HSCs之促侵襲性(pro-invasive)效應亦顯示為IL-11-依賴性的(圖19D)。

【0492】 於*Il11ra1*^{-/-}小鼠方面，對於HFMCD或WDF飲食之肝保護與降低的Erk活化有關。本發明人發現IL-11直接活化HSCs中的ERK且所有誘發IL-11自HSCs分泌的刺激物亦誘發ERK活化。X209消除ERK磷酸化及所有因子，包括IL-11自身下游的HSC轉化。ERK抑制劑阻斷IL-11效應及HSC活化下游所有的NASH觸發子，暗示IL-11驅動的ERK磷酸化對於HSC轉化有極為重要的重要性(圖19E-19F，圖27F)。

【0493】 關於肝臟中的IL-11之出版文獻很有限但注射高劑量的重組人類IL-11至嚙齒動物內已經與保護效應有關^{13,14}，且關於IL-11於血小板生物學的作用有混亂²⁵。為了排除安全問題，本發明人進行X209及X203之長期(5個月)高劑量(10mg/kg x 2/週)的臨床前毒物學研究以及觀察到於血清ALT位準或血小板沒有效應(圖19G-19H)。與*Il11ra1*^{-/-}小鼠的資料一致，抗IL-11療法在此治療過程期間中降低或趨於降低血清脂質位準(圖19I-19J)。

治療性靶向IL-11或IL11RA於三種NASH臨床前模式中是有效的

【0494】 本發明人繼而於活體內測試X209及X203療法且在HFMCD飲食六週之後、當IL-11強力地向上調節、膠原蛋白已蓄積及建立脂肪變性肝炎之時，開始抗體投予(圖18A、20A，及圖25C-25D)。於療法四週之後，二種抗體均已抑制或逆轉肝纖維化、發炎及損壞，而脂肪變性無變化(圖20B-20E，圖28A-28C)。此外，二種抗體均消除Erk活化而此表示標靶銜接及覆蓋(圖20F，圖28D)。

【0495】 本發明人亦以20週大的*db/db*小鼠(圖20G)來測試抗IL-11療法，其等在提供NASH誘發的甲硫胺酸-膽鹼缺乏(MCD)飲食八週時為肥胖、糖尿病且有脂肪變性肝的²⁹⁻³¹。與吾人其他的模式一致，MCD餵食的*db/db*小鼠之肝臟中的IL-11表現及Erk活化增加以及Erk活化受療法抑制(圖20H-20I)。於此模式中，

抗IL-11療法降低肝臟脂肪變性、纖維化及發炎同時降低ALT位準(圖20J-20N，圖28E-28F)。

【0496】 第三種WDF誘發的NASH模式用於測試抗IL-11R療法在肥胖、胰島素抗性及糖尿病情形下之效應¹⁸。向小鼠餵食WDF歷時16週，此時其等為肥胖且胰島素抗性的，伴有肝脂肪變性、發炎及纖維化。隨後用抗IL11RA(X209)療法開始治療(圖21A)。當靶向IL-11訊息傳導時，抑制NASH肝臟中的肝臟Erk活化(圖29A)。儘管有類似的體重增加，但在進行抗IL11RA療法之小鼠中觀測到肝纖維化、脂肪變性、發炎之逆轉及血清ALT位準之降低。此伴隨著血清葡萄糖、三酸甘油酯及膽固醇位準之降低(圖21B-21G及圖29B-29E)。

組合代謝及抗IL-11介入對於肝纖維化之效應

【0497】 吾人的資料顯示抗IL-11療法逆轉纖維化，但沒有評估此效應為持久或進行性的。此外，組合療法對於逆轉NASH中之纖維化可為有益的¹。為解決此等問題，使用HFMCD歷時10週來建立嚴重肝纖維化，隨後使小鼠轉至正常食品，模擬強大的代謝介入，且平行地起始抗IL-11治療(圖21H)。

【0498】 在移除代謝刺激物後，Erk活化緩慢消退，其因X203或X209治療而加速(圖30A)。IgG治療之動物於實驗持續期間之纖維化無變化，暗示僅僅完全代謝校正不會逆轉纖維化或非常緩慢地逆轉纖維化。相比之下，肝臟膠原蛋白含量在三週抗體治療之後顯著逆轉(逆轉：18%，X203；24%，X209)，在六週時進一步逆轉((逆轉：37%，X203；46%，X209)，顯示出進行性且持久的效應(圖21I，圖30B-30C)。

【0499】 纖維化之消退與更低TIMP及更高MMP位準有關連，其促進有利的基質重塑^{3,32}。與此一致，具有嚴重纖維化的X203或X209治療之小鼠迅速向上調節Mmp2及向下調節Timp1(圖21J)。當轉化之HSCs經歷細胞凋亡³³、衰老^{34,35}及/或恢復至非活性ACTA2^{-ve}狀態³⁶時，逆轉肝纖維化為有利的。為檢查是否需要

IL-11維持HSCs處於轉化狀態，用TGFβ1或PDGF刺激HSCs隨後抑制IL-11訊息傳導。在IL-11抑制24小時之內，ACTA2⁺細胞之百分率及分泌膠原蛋白之量逆轉至接近基線位準，且儘管有持續的TGFβ1/PDGF刺激，ERK活性還是大幅減弱(圖21K-21L，圖30D-30G)。

抗IL-11療法對於早期NASH之急性壞死性發炎期間的肝臟健康之效應

【0500】自NAFLD轉化成NASH係特徵在於發展脂肪變性肝炎、發炎及細胞死亡(壞死性發炎)。HSCs於此過程中通過分泌促炎性因子而起重要的作用^{3,8,37,38}。三位發明人探究IL-11是否影響HSC驅動的發炎途徑，且發現IL-11刺激的HSC生產CCL2而IL-11抑制阻斷了CCL2分泌(圖31A)。此顯現出IL-11於基質免疫方面的一種未被認識的促炎性作用，與整個NASH飲食中、自*Il11ral*^{-/-}、X203-或X209-治療之小鼠的肝臟內觀察到的一貫低的發炎位準相符。

【0501】於NASH之HFMCD模式中，早期的發炎接著是纖維化期(圖22A)。在很早的脂肪變性肝炎期間治療性靶向IL-11驚人地降低肝脂肪變性，其伴隨著較小的Erk活化(圖22B-22E，圖31B-31C)。接受X203-及X209的小鼠肝臟內沒有看見脂質小滴，此等小鼠也沒有發展纖維化(圖22D、22F及圖31D-31G)。HFMCD飲食亦誘發急性及嚴重的壞死性發炎(於1週前ALT增加>20倍)，用抗IL-11療法意想不到地在三週的期間中觀察到肝損壞實質的逆轉(圖22G，圖31H)。此等快速的治療益處領先疾病的纖維化階段，以及與先前的臨床前模式中*Il11ral*^{-/-}、X203或X209-治療之小鼠一貫較低的ALT位準一起，暗示了IL-11直接對肝細胞的損壞效應。

【0502】發現初級人類肝細胞表現IL11RA但不表現IL6R(圖22H)。當以生理位準的IL-11刺激肝細胞時，有劑量依賴性的ALT釋放。此與肝細胞內應力纖維表現的進行性增加一致(圖22I-22J)。有趣的是，當以TGFβ1刺激肝細胞時亦強有力的分泌IL-11，暗示肝細胞內適應不良的IL-11自泌活性(圖22K)。因而IL-11

訊息傳導直接損害肝細胞功能。

【0503】 執行RNA-seq分析以剖析IL-11療法在HFMCD-誘發的NASH之急性發炎期的期間內之效應。非監督式分析顯示抗體治療幾乎完全逆轉由HFMCD飲食所誘發的病理學RNA表現標籤(圖23A，圖32A-32B)。消除了促纖維化及促炎性基因之向上調節以及重新建立脂質代謝基因表現(圖23B-23C，圖32C)。不偏基因集富集研究確認回復接近正常的脂肪酸、膽酸、氧化壓力、纖維化及發炎轉錄標籤(圖32D)。

【0504】 滯留巨噬細胞及浸潤單核球對於NASH致病機轉為重要的且為TGFβ1之主要來源³⁹。檢查脂肪變性肝炎期間肝臟內發炎細胞族群及觀察到於X209治療的肝臟內普遍更少的免疫細胞及Ly6C⁺TGFβ1⁺細胞之特異性降低(圖23D-23F)。循環的TGFβ1位準由HFMCD飲食所提升但是由X209療法所降低，其顯現出抗IL11RA療法為疾病修飾的(圖23G)。

4.3 討論

【0505】 HSCs是肝臟內的促炎性肌纖維母細胞之主要來源²以及抑制且逆轉其等之轉化是NASH療法的目標。非冗餘的、ERK依賴性IL-11訊息傳導證明為HSC轉化所需的，類似的於心臟、腎臟及肺臟內針對纖維母細胞活化的作用^{11,12}。因此，當相較於對其他的免疫、代謝或纖維化因子的療法—該等療法通常展現一些冗餘的位準—而言，靶向IL-11以逆轉肝纖維化可能有好處。有趣的是，僅只有力的代謝介入於吾人的實驗中對於纖維化沒有效應且代謝性療法對於逆轉NASH的纖維化之效應可能有限。

【0506】 本發明人發現IL-11於肝臟內意想不到的促炎性作用並且證實HSCs表現高位準的IL11RA而免疫細胞反而是表現IL6R。該資料暗示IL-11經由基質所媒介而對免疫細胞之間接效應。不論是用遺傳或藥理的功能喪失方法，抑制IL-11媒介的訊息傳導是一致的且強有力的證實在多個NASH模式中會預防/

逆轉發炎。雖然更早的出版物暗示IL-11可能於肝臟內有保護的作用，但此等的研究於嚙齒動物內使用非常高劑量的外來重組人類IL-11的^{13,14}，其不會刺激鼠類Il11ra1¹¹。生理位準的IL-11之真實的生物效應證實為促炎性及基質驅動的。

【0507】肝細胞亦表現IL11RA且於TGFβ1刺激時強有力的地分泌IL-11以及IL-11訊息傳導於肝細胞內誘發的應力纖維形成及細胞毒性。IL-11對於NASH在急性壞死性發炎的期間中之肝細胞的效應是深刻的及治療性靶向IL-11訊息傳導於三週內使ALT位準自大概700 U/L逆轉成正常。在NASH更晚的時間點，遺傳或治療性抑制IL-11亦預防或逆轉的肝細胞損壞，其需要進一步研究。

【0508】剔除*IL11RA*之人類⁴⁰及小鼠²⁵會有輕度的頭骨骼變形且顯現出關節鬆弛但其他方面都很健康以及IL-11在成年哺乳動物似乎很冗餘。這提供IL-11作為藥物標靶之令人注目的遺傳安全數據。除了此標靶安全數據之外，本研究證實當使用高劑量的治療抗體來中和IL-11訊息傳導延長的時間期間時，沒有不良效應。此外，遺傳及藥理的抑制係與較低的血清三酸甘油酯、膽固醇及空腹葡萄糖有關連。此IL-11抑制態樣係潛在的NASH療法所欲的特徵，因有NASH的患者通常罹患心血管疾病。

【0509】本發明人已鑑定出IL-11在肝臟病理學中未被認識且主要的作用。用中和性抗體靶向IL-11訊息傳導在整個NASH範圍中逆轉纖維化、脂肪變性、肝細胞死亡及發炎。此新穎的治療方法係與有利的心臟代謝剖析有關連。

4.4 實施例4之參考資料

【0510】 1. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. Nat Med 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.

【0511】 2. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its

aetiology. Nat Commun 2013;4:2823.

【0512】 3. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiol Rev 2008;88:125–172.

【0513】 4. Friedman SL. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. J Biol Chem 2000;275:2247–2250.

【0514】 5. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Adv Drug Deliv Rev 2017;121:27–42.

【0515】 6. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, et al. The role of TGFβ1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. J Hepatol 1999;30:77–87.

【0516】 7. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2017;14:397–411.

【0517】 8. Kim B-M, Abdelfattah AM, Vasan R, et al. Hepatic stellate cells secrete Ccl5 to induce hepatocyte steatosis. Sci Rep 2018;8:7499.

【0518】 9. Banini BA, Sanyal AJ. Current and future pharmacologic treatment of nonalcoholic steatohepatitis. Curr Opin Gastroenterol 2017;33:134–141.

【0519】 10. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:E3297–305.

【0520】 11. Schafer S, Viswanathan S, Widjaja AA, et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. Nature 2017;552:110–115.

【0521】 12. Cook S, Ng B, Dong J, et al. IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis. 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/336537>.

【0522】 13. Zhu M, Lu B, Cao Q, et al. IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signalling Pathway in Mice. PLoS One 2015;10:e0126296.

【0523】 14. Yu J, Feng Z, Tan L, et al. Interleukin-11 protects mouse liver from warm ischemia/reperfusion (WI/Rp) injury. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2016;40:562–570.

【0524】 15. Lawitz EJ, Hepburn MJ, Casey TJ. A pilot study of interleukin-11 in subjects with chronic hepatitis C and advanced liver disease nonresponsive to antiviral therapy. Am J Gastroenterol 2004;99:2359–2364.

【0525】 16. Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. Cancer Cell 2016;30:161–175.

【0526】 17. Baena M, Sangüesa G, Hutter N, et al. Liquid fructose in Western-diet-fed mice impairs liver insulin signalling and causes cholesterol and triglyceride loading without changing calorie intake and body weight. J Nutr Biochem 2017;40:105–115.

【0527】 18. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. PLoS One 2015;10:e0127991.

【0528】 19. Yata Y. DNase I–hypersensitive sites enhance $\alpha 1(I)$ collagen gene expression in hepatic stellate cells. Hepatology 2003;37:267–276.

【0529】 20. Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. Immunity 2015;43:382–393.

【0530】 21. Chew V, Lai L, Pan L, et al. Delineation of an immunosuppressive gradient in hepatocellular carcinoma using high-dimensional proteomic and transcriptomic analyses. Proc Natl Acad Sci U S A 2017;114:E5900–E5909.

【0531】 22. Dou C, Liu Z, Tu K, et al. P300 Acetyltransferase Mediates Stiffness-Induced Activation of Hepatic Stellate Cells Into Tumor-Promoting Myofibroblasts. *Gastroenterology* 2018;154:2209–2221.e14.

【0532】 23. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003;124:147–159.

【0533】 24. Lawan A, Bennett AM. Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation in Hepatic Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:868–878.

【0534】 25. Nandurkar HH, Robb L, Tarlinton D, et al. Adult mice with targeted mutation of the interleukin-11 receptor (IL11Ra) display normal hematopoiesis. *Blood* 1997;90:2148–2159.

【0535】 26. Stephenson K, Kennedy L, Hargrove L, et al. Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expr* 2018;18:5–17.

【0536】 27. Simon TG, Bamira DG, Chung RT, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis is Associated with Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Obesity* 2017;25:1313–1316.

【0537】 28. Yasui K, Sumida Y, Mori Y, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism* 2011;60:735–739.

【0538】 29. Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol* 2017;241:36–44.

【0539】 30. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008;49:1068–1076.

【0540】 31. Wortham M, He L, Gyamfi M, et al. The Transition from Fatty Liver to NASH Associates with SAME Depletion in db/db Mice Fed a Methionine Choline-Deficient Diet. *Dig Dis Sci* 2008;53:2761–2774.

【0541】 32. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007;46:955–975.

【0542】 33. Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005;10:927–939.

【0543】 34. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008;134:657–667.

【0544】 35. Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, et al. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology* 2003;37:653–664.

【0545】 36. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:9448–9453.

【0546】 37. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- β signalling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;13:1324–1332.

【0547】 38. Marra F, Valente AJ, Pinzani M, et al. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1993;92:1674–1680.

【0548】 39. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* 2017;127:55–64.

【0549】 40. Brischoux-Boucher E, Trimouille A, Baujat G, et al.

IL11RA-related Crouzon-like autosomal recessive craniosynostosis in ten new patients: resemblances and differences. Clin Genet 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/cge.13409>.

4.5 補充材料

抗體

【0550】 ACTA2(ab7817, Abcam; IF) 、 ACTA2(19245, CST; WB) 、 CD45(103102, Biolegend) 、 膠原蛋白I(ab34710, Abcam) 、 p-ERK1/2(4370, CST) 、 ERK1/2 (4695, CST) 、 GAPDH(2118, CST) 、 IgG(Aldevron) 、 中和性抗IL11(X203, Aldevron) 、 中和性抗IL11RA(X209, Aldevron ; 活體內研究) 、 IL11RA(ab1250515, Abcam; IF) 、 Ly6C(128039, Biolegend) 、 TGF β 1(141402, Biolegend) 、 抗兔HRP(7074, CST) 、 抗小鼠HRP(7076, CST) 、 抗兔Alexa Fluor 488(ab150077, Abcam) 、 抗小鼠Alexa Fluor 488(ab150113, Abcam) 。

重組蛋白

【0551】 商業的重組蛋白：人類血管收縮素II(A9525, Sigma-Aldrich) 、 人類 CCL2(279-MC-050/CF, R&D Systems) 、 人類bFGF(233-FB-025, R&D Systems) 、 人類 IL-11(PHC0115, Life Technologies) 、 人類 PDGF(220-BB-010, R&D Systems) 、 人類 TGF β 1(PHP143B, Bio-Rad) 及小鼠 TGF β 1(7666-MB-005, R&D Systems) 。

【0552】 定制的重組蛋白：合成沒有訊息胜肽的小鼠Il-11(UniProtKB: P47873) 。 超IL-11(IL11RA:IL-11融合蛋白)，其模擬反式訊息傳導錯合物，係使用IL11RA的片段(胺基酸殘基1–317；UniProtKB: Q14626)及IL11(胺基酸殘基22–199, UniProtKB: P20809) 加上 20 胺基酸鏈接子 (GPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV)¹ 來建構。全部定制的重組蛋白係藉由 GenScript 、 使用哺乳動物表現系統來合成。

化學品

【0553】 過氧化氫(H_2O_2 , 31642, Sigma) · PD98059(9900, CST) · U0126(9930, CST)。

產生抗IL11RA之小鼠單株抗體

針對特異性結合之遺傳免疫及篩選

【0554】 將編碼人類IL11RA的胺基酸23-422之cDNA選殖至表現質體(Aldevron)中。藉由使用用於顆粒轟擊之手持裝置皮內施用DNA塗佈之金顆粒使小鼠免疫。暫時轉染的HEK細胞上之細胞表面表現係用識別添加至IL11RA蛋白之N端之標籤的抗標籤抗體來確認。在24天及一系列免疫之後收集血清，以及以流動式細胞測量術來測試暫時轉染前述表現質體的HEK293細胞。二級抗體為 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ 終濃度之山羊抗小鼠IgG R-藻紅素複合的抗體(Southern Biotech, #1030-09)。血清稀釋於含3% FBS的PBS內。血清之交互作用係與轉染不相關的cDNA之HEK293細胞相比。以2隻動物確認特異性反應性以及自此等動物單離抗體生產細胞且根據標準程序與小鼠骨髓瘤細胞(Ag8)融合。融合瘤培養物的上清液係與表現IL11RA-標籤建構物的HEK細胞一起孵育以及用流動式細胞測量術來鑑定生產對IL11RA特異性的抗體之融合瘤。

中和性抗IL11RA抗體之鑑定

【0555】 結合IL11RA-標籤細胞但不結合陰性對照的抗體視為特異性結合物且隨後如Schafer等人²乙文中所述來測試對於人類及小鼠心房纖維母細胞之抗纖維化活性。簡言之，於抗體候選物($6 \mu\text{g ml}^{-1}$)存在下，分別以人類或小鼠TGF β 1(5 ng ml^{-1} ; 24 h)刺激初級人類或小鼠纖維母細胞。TGF β 1刺激導致內生IL-11的向上調節，其設若中和，會阻斷TGF β 1之促纖維化效應。活化的肌纖維母細胞部分(ACTA2⁺細胞)係如上文所述於Operetta平台上測量以估計抗體候選物之中和潛力。為了阻斷可能的反式訊息傳導效應，亦在超IL-11刺激的人類纖

維母細胞(200 pg ml^{-1})的情況下篩選抗體。偵測到三種特異性及中和性抗IL11RA抗體，其中取X209向前供用於活體內研究。執行相同的程序以獲得結合配體IL-11之中和性抗體³。

X209與IL11RA之結合動力學

【0556】 X209與人類IL11RA之結合係於Biacore T200(GE Healthcare)上測量。X209固定於抗小鼠捕捉晶片上。交互作用分析係用含0.005% P20及0.5% BSA之HEPES緩衝之生理食鹽水pH 7.4來進行。以 $40\text{ }\mu\text{l min}^{-1}$ 的流速注射一系列濃度(1.56 nM 至 100 nM)的分析物(人類IL11RA)於X209及參考表面上。與小鼠Il11ra1之結合係用相似的策略於Octet系統(ForteBio)上予以確認。全部的感應圖予以排列比對且雙重參考⁴。藉由用1:1朗繆模型之擬合校正的感應圖來判定親和力及動力學常數。平衡結合常數 K_D 係藉由 k_d/k_a 之比率來判定。

X209 IC₅₀測量.

【0557】 在存在IgG($4\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$)及變化濃度之X209($4\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ 至 61 pg ml^{-1} ；4倍稀釋)下、用TGF β 1(5 ng ml^{-1} , 24 h)刺激HSCs。收集上清液且分析分泌的MMP2之量。藉由使用最小平方(普通)擬合繪製X209測試濃度(pM)之對數相對於相應抑制百分比值來產生劑量反應曲線。使用log(抑制劑)相對於正規化反應可變斜率方程來計算IC₅₀值。

血液藥物動力學及生物分佈

【0558】 C57BL/6J小鼠(10-12週大)係以配於PBS之 $100\text{ }\mu\text{l}$ 新鮮放射性標記的¹²⁵I-X209($5\mu\text{Ci}$, $2.5\text{ }\mu\text{g}$)予以眼眶後注射(左眼)。用2%異氟烷麻醉小鼠且在注射後數個時間點(2、5、10、15、30 m、1、2、4、6、8 h、1、2、3、7、14及21天)經由頷下出血收集血液。在生物分佈研究中，經由心臟穿刺收集血液且在以下時間點收穫組織：注射後1、4 h、1、3、7、14、21天。使用伽瑪計數器(gamma counter) (2480 Wizard2, Perkin Elmer)在衰變校正($100\text{ }\mu\text{l}$ 劑量之100倍稀釋)下量測

放射性含量。測得之放射性予以正規化為注射劑量%/g組織。

RNA-seq

RNA-seq庫之產生

【0559】 總RNA係使用Qubit RNA高敏感性分析套組(Thermo Fisher Scientific)來定量以及RNA完整性值(RIN)係使用LabChip GX RNA分析試劑套組(Perkin Elmer)來評估。使用TruSeq標準mRNA庫製備套組(Illumina)、遵照製造商的程序來製備轉錄本庫。所有最終的庫係使用KAPA庫定量套組(KAPA Biosystems)來定量。使用LabChip GX DNA高敏感性試劑套組(Perkin Elmer)來判定最終庫的品質及平均片段大小。將庫合併以及於NextSeq 500平台式定序儀(Illumina)上、使用NextSeq 500 High Output v2套組及雙端75-bp定序化學予以定序。

RNA-seq分析

【0560】 肝臟星形細胞內堅硬度誘發的RNA調節：正規化的基因表現值係自Dou等人⁵乙文下載。自該分析移去低表現的基因(基線之FPKM ≥ 2)以及倍數變化計算為堅硬的表面上的HSCs之平均FPKM除以軟表面上的HSCs之平均FPKM。繪製向上調節的基因之RNA表現的倍數變化(f.c. >1)且基因根據其等之平均FPKM值予以分級。

【0561】 於HFMCD之人類肝臟星形細胞的TGFB1刺激及抗體治療：定序庫係使用bcl2fastq v2.19.0.316及--no-lane-splitting選項予以解多工。轉接子(Adapter)序列繼而使用雙端模式之trimmomatic⁶ v0.36及選項MAXINFO:35:0.5 MINLEN:35予以修整。修整的序列標籤(trimmed reads)與智人GRCh38排列比對，其係使用雙端、單次通過模式之STAR⁷ v. 2.2.1及選項--outFilterType BySJout --outFilterMultimapNmax 20 --alignSJoverhangMin 8 --alignSJDBoverhangMin 1 --outFilterMismatchNmax 999 --alignIntronMin 20 --alignIntronMax 1000000

--alignMatesGapMax 1000000。只保留唯一排列比對用於計數。基因位準的計數係使用來自subread⁸ v. 1.5.1之FeatureCounts module，及選項-O -s 2 -J -T 8 -p -R -G來計算。使用Ensembl釋出版本86 hg38 GTF作為註釋以製備STAR指數及供用於FeatureCounts。

【0562】關於小鼠的抗體治療實驗，庫係如同人類樣本予以治療，只是使用mm10 Ensembl釋出版本86基因體及註釋。

【0563】差異表現分析係以R 3.4.1來執行其係使用Bioconductor套裝軟體DESeq2⁹ 1.18.1，使用Wald測試用於比較及包括變異數收縮步驟設定0.05的顯著性門檻。

【0564】以R 3.4.1來執行基因集富集分析(GSEA)其係使用fgsea套裝軟體及MSigDB Hallmark基因集^{10,11}，執行100000疊代。DESeq2結果輸出的“stat”欄位係用來作為各富集的分級輸入，只取有一對一人類異種同源物的小鼠基因。

酶聯免疫吸附分析法(ELISA)及比色分析

【0565】等體積的細胞培養基內的IL-11及MMP-2位準係分別使用人類IL-11定量ELISA套組(D1100, R&D Systems)及總MMP-2 Quantikine ELISA套組(MMP200, R&D Systems)來定量。細胞培養基上清液中之總分泌膠原蛋白係使用天狼星紅膠原蛋白偵測套組(9062, Chondrex)來定量。肝內的總羥基脯胺酸含量係使用Quickzyme總膠原蛋白分析套組(Quickzyme Biosciences)來測量。小鼠血清的丙胺酸轉胺酶(ALT)、膽固醇及三酸甘油脂位準係分別使用丙胺酸轉胺酶活性分析套組(ab105134, abcam)、膽固醇分析套組(ab65390, abcam)及三酸甘油脂分析套組(ab65336, abcam)來測量。肝的三酸甘油脂(TG)測量係使用三酸甘油脂比色分析套組(10010303, Cayman)來執行。所有的ELISA及比色分析係依據製造商的程序來執行。

基質膠侵襲分析法

【0566】 使用24孔Boyden腔室侵襲分析法(Cell Biolabs Inc.)評估人類HSCs之侵襲性特性。將無血清HSC培養基中的相等數目之HSCs一式三份播種於經ECM塗覆之基質膠上且使其朝含有0.2% FBS之HSC培養基侵襲。在與刺激物一起孵育48 h之後，抽吸培養基且使用棉拭移除非侵襲性細胞。朝底部腔室侵襲之細胞用細胞染色溶液(Cell Biolabs Inc.)染色，且使來自5個非重疊場/膜的侵襲性細胞成像且在40×放大率下計數。針對抗體抑制實驗，在添加刺激物前先以X203、X209或IgG對照抗體預治療HSCs歷時15 m。

NASH患者肝臟的精確切削肝臟切片(PCLS)及西方墨點法

【0567】 簡言之，切下人類PCLS且與TGFβ1一起孵育24 h。自上清液之ELISA係使用人類IL-11 DuoSet(DY218, R&D Systems)來執行。此CRO亦自為了癌症進行肝切除術之患者採集肝臟活體組織切片，採集該處鄰近的非癌組織用於分子研究。患者有沒有記錄的內在肝病(對照)或先前記錄的酒精性肝病、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎或NASH。出於保密原因，未提供此等樣本的更多資訊。

定量聚合酶連鎖反應(qPCR)

【0568】 使用Trizol(Invitrogen)隨後RNeasy管柱(Qiagen)純化以自急凍肝組織或HSCs溶解產物萃取總RNA。cDNAs係用iScript™ cDNA合成套組(Bio-Rad)、依據製造商的使用說明來合成。用TaqMan(Applied Biosystems)或快速SYBR綠色(Qiagen)技術、使用StepOnePlus™ (Applied Biosystem)經40個循環、對二複本樣本執行基因表現分析。將表現資料針對GAPDH mRNA表現予以正規化且使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法來計算倍數變化。可根據要求提供特異性TaqMan探針及SYBR綠色引子的序列。

免疫墨點法

【0569】 西方墨點法係於來自HSCs及肝組織之總蛋白萃取物來進行。細胞

及冷凍的組織二者均以含蛋白酶及磷酸酶抑制劑(Thermo Scientific)之放射免疫沉澱分析法(RIPA)緩衝液予以均質化，接著離心以使溶解產物澄清。藉由布拉德福分析法(Bio-Rad)來判定蛋白濃度。等量的蛋白溶解產物係藉由SDS-PAGE來分離、轉移至PVDF膜，以及接受所示的初級抗體之免疫墨點法分析。蛋白係使用具有合適的二級抗體之ECL偵測系統(Pierce)予以視覺化。

組織學

【0570】 肝組織在RT下於10%中性緩衝之福馬林(NBF)中固定48 h、脫水、包埋於石蠟塊中且切片為7 μm 。以梅森氏三色染色之切片係藉由光學顯微術檢查。自n=3/組獨立地重複各組織學實驗且結果相似。擷取切片之影像且用ImageJ軟體(color deconvolution-Masson Trichrome)半定量地判定4片切片/肝之藍色染色的纖維化面積。治療及基因型未對執行組織學及產生半定量讀出的調查者揭露。

補充材料之參考資料

【0571】 1. Dams-Kozłowska H, Gryśka K, Kwiatkowska-Borowczyk E, et al. A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine. BMC Biotechnol 2012;12:8.

【0572】 2. Schafer S, Viswanathan S, Widjaja AA, et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. Nature 2017;552:110–115.

【0573】 3. Cook S, Ng B, Dong J, et al. IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis. 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/336537>.

【0574】 4. Myszka DG. Improving biosensor analysis. J Mol Recognit 1999;12:279–284.

【0575】 5. Dou C, Liu Z, Tu K, et al. P300 Acetyltransferase Mediates Stiffness-Induced Activation of Hepatic Stellate Cells Into Tumor-Promoting Myofibroblasts. Gastroenterology 2018;154:2209–2221.e14.

【0576】 6. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–2120.

【0577】 7. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29:15–21.

【0578】 8. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* 2013;41:e108.

【0579】 9. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.

【0580】 10. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, et al. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 2011;27:1739–1740.

【0581】 11. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15545–15550.

實施例5：肝細胞的自泌IL11順式訊息傳導係脂肪毒性與非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)之間起始的聯繫

5.1 概述

【0582】 IL11訊息傳導於非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)是很重要的。在本實施例中，本發明人證實含有脂質的肝細胞分泌IL11，其作用通過泌反式訊息傳導導致脂質凋亡。雖然IL6保護肝細胞，但IL11通過活化非典型的訊息傳導途徑且向上調節NOX4及活性含氧物而導致肝細胞死亡。於二種臨床前模式中，肝細胞特異性刪失Il11ra1保護小鼠免於全部的NASH態樣。此外，於全面Il11ra1剔除小鼠內僅僅回復肝細胞的IL11順式訊息傳導重建了脂肪變性及發炎。發現沒有證據支持IL6或IL11反式訊息傳導存在。本發明人得出的結論是肝細胞脂肪毒性刺激IL11分泌而導致肝細胞死亡接著是纖維化及發炎。此等資料概述一種新

穎的肝細胞特異性機轉用於自非酒精性脂肪肝病轉化為NASH。

5.2 介紹

【0583】 介白素11(IL11)為關鍵的纖維發生因子(Ng等人，2019; Schafer等人，2017)，其於跨越物種的纖維化精確切削肝臟切片內是提升的(Bigaeva等人，2019)。IL11已顯示於毒性肝臟傷害後對肝細胞功能有負面的效應(Widjaja等人)，以及直接或間接促成非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)的病理(Widjaja等人，2019)。另一方面來說，一些更早的出版物暗示IL11於局部缺血、感染性或毒素誘發的肝損壞小鼠模式內是保護性的(Bozza等人，1999; Maeshima等人，2004; Nishina 等人，2012; Trepicchio等人，2001; Yu等人，2016; Zhu等人，2015)。然而現在很明顯地，更早的研究中所用的重組人類IL11(rhIL11)試劑於小鼠是無效的(Widjaja等人)。

【0584】 IL11為介白素6(IL6)細胞介素家族之一成員，並且就像IL6，與其之膜結合型 α 受體(IL11RA)及醣蛋白130(gp130)結合以用順式方式訊息傳導。IL6其自身已被聯接至肝功能且出版物建議為整體有益的效應(Klein等人，2005; Kroy等人，2010; Matthews等人，2010; Schmidt-Arras and Rose-John, 2016; Wuestefeld等人，2003)。然而，一般亦認為IL6能與可溶性IL6受體(sIL6R)結合且以反式方式訊息傳導，其被認為是適應不良的(Schmidt-Arras and Rose-John, 2016)。就像IL6，IL11很可能是以反式方式訊息傳導呈致病的模式，但是迄今的實驗已經發現於腫瘤或生殖組織沒有證據表明此事(Agthe等人，2017; Balic等人，2017)。

【0585】 自非酒精性脂肪肝病(NAFLD)轉化為NASH之基礎的因子為多因子的，但是肝細胞之脂質裝載是至關重要的(Friedman等人，2018)。某些脂質物種對肝細胞有毒且此脂肪毒性刺激細胞介素釋放而導致肝細胞死亡及旁泌活化肝臟星形細胞(HSCs)及免疫細胞(Farrell等人，2018; Friedman等人，2018)。脂肪

毒性，例如由於棕櫚酸(Kakisaka等人，2012)的脂肪毒性，是NASH早期的事件且代表飲食，NAFLD及NASH之間的聯繫。雖然遺傳及藥理的抑制IL6/順式訊息傳導使脂肪變性表現型惡化(Kroy等人，2010; Matthews等人，2010; Yamaguchi等人，2010)，但是IL11於肝的脂肪毒性之角色尚未有描述。

【0586】 在本實例中，使用一系列的活體外及活體內方法來解決關於IL11於肝細胞生物學，NAFLD及NASH的關鍵問題：(1)定義IL11/順式及反式訊息傳導於人類肝細胞內真正的作用，(2)檢查脂肪毒性是否與肝細胞內的IL11活性有關，(3)確立IL11或IL6反式訊息傳導是否促成NASH，(4)剖析肝細胞內的IL-11/順式訊息傳導以及發展脂肪變性、肝細胞死亡、發炎及纖維化之間的相互關係。此等研究揭露意想不到的IL6及IL11生物學態樣且證實肝細胞內脂肪毒性活化的、自泌IL-11/順式訊息傳導明確的致病的效應，其起始了自NAFLD轉化為NASH。

5.3 結果

5.3.1 合成的IL11反式訊息傳導建構物導致肝細胞死亡

【0587】 本發明人首先藉由流動式細胞測量術來評估IL6R、IL11RA及gp130於初級人類肝細胞的表現位準。絕大多數的細胞觀察到IL11RA及gp130強有力的表現(分別為92.6%及91.9%)，但是只有少數肝細胞(3.0%)表現IL6R，且位準很低(圖33A及40A)。依據此結果，RNA-seq及Ribo-seq研究發現IL11RA及gp130轉錄本於肝細胞高度表現以及活動性地轉譯。相比之下，觀察到少數的IL6R轉錄本，且幾乎沒有可偵測的IL6R轉譯(圖33B-33D、40B及40C)。肝細胞之免疫螢光染色證實Ribo-seq資料的結果：高的IL11RA表現但沒有可偵測的IL6R表現(圖40D)。本發明人於培養基內亦沒有偵測到顯著的IL6R位準(位準剛剛好在偵測下限之上)，並使得其等排除IL6R為脫落之可能性(圖40E)。此等資料合起來看證實初級人類肝細胞表現非常低位準的IL6R，暗示IL6/順式訊息傳導於此等細胞有限

的角色。然而，此等細胞展現強的IL11RA及gp130二者之共表現。

【0588】考慮到人類肝細胞缺少IL6R表現，本發明人使用合成的IL6反式訊息傳導建構物(超IL6)來活化此等細胞的IL6訊息傳導以及將此與合成的IL11反式訊息傳導錯合物(超IL11)作比較。超IL11，就像IL11其自身(Widjaja等人)，係以劑量依賴性方式活化ERK及JNK(2.5 ng/ml至20 ng/ml)。相比之下，IL6反式訊息傳導沒有活化非典型的訊息傳導途徑反而劑量依賴性誘發STAT3活化(圖33E)。因而，IL11或IL6呈與其等之同源受體之預成形的合成錯合物在結合肝細胞上的gp130時會活化不同的細胞內途徑，其為新穎且吸引人的發現。

【0589】發現超IL11導致初級人類肝細胞細胞培養的培養基內的丙胺酸轉胺酶(ALT)之劑量依賴性增加，但是發現超IL6(20 ng/ml)有顯著的、儘管為有限的細胞保護效應(倍數變化(FC)=0.9；P=0.0468) (圖33F)。可溶性gp130(sgp130)為通過gp130作用的反式訊息傳導錯合物之抑制劑(Schmidt-Arras and Rose-John, 2016)。與其之報告的誘餌效應是一致的，sgp130阻斷了超IL11(p-ERK/p-JNK)及超IL6(p-STAT3)二者下游的訊息傳導途徑之活化並且還抑制超IL11的肝毒性效應(圖33G-33I)。

【0590】本發明人繼而進行實驗俾以偵測在人工蛋白錯合物超IL6或超IL11不存在下之IL11反式訊息傳導。IL11係在可溶性gp130(sgp130，以抑制假定的反式訊息傳導)或可溶性IL11RA(sIL11RA，以加強假定存在的反式訊息傳導)存在下刺激細胞。IL11誘發的肝細胞死亡及訊息傳導未受sgp130或sIL11RA影響(圖33J-33K及40F)。此外，IL11劑量依賴性地(0.625 ng/ml至20 ng/ml)導致肝細胞的細胞死亡，肝細胞的細胞死亡未受添加sgp130(1 µg/ml)或sIL11RA(1 µg/ml)影響(圖40G)。相互地，漸增劑量的sgp130或sIL11RA對於ALT自IL11刺激的肝細胞之釋放沒有效應(圖40H)。此等資料建議IL11反式訊息傳導於合成的建構物不存在下可能不存在。

5.3.2 IL11順式訊息傳導為肝細胞的脂肪毒性之基礎

【0591】 為了處理IL11於脂肪肝病中的角色，本發明人模型化肝細胞脂肪毒性，其被視為NASH之發起病理學以及與來自損壞的肝細胞之細胞介素釋放有關(Friedman等人，2018)。肝細胞裝載6:1的比率之棕櫚酸：BSA混合物，其係使用NAFLD患者血清所見的飽和脂肪酸(sFSs)濃度(Kleinfeld等人，1996)。相較於對照而言，sFA裝載的細胞分泌大量的IL11(FC=28, $P<0.0001$)還有IL6、CCL2及CCL5(圖34A-34D)。通過FACS、脂質裝載的肝細胞經歷了細胞凋亡性細胞死亡還有ALT之壞死性釋放(圖34E-34G)。

【0592】 為了測試自脂質裝載的肝細胞之IL11分泌是否係以順式或反式訊息傳導的方式與脂肪毒性功能上相關，所以使細胞與抗IL11RA抗體(X209)或sgp130一起孵育。X209使所有的細胞介素，包括IL11自身之分泌都降低，而sgp130沒有效應(圖34A-34G)。此提示了肝細胞脂肪毒性方面的IL11順式訊息傳導的自泌環。自損壞的粒線體生產活性含氧物(ROS)對於脂肪毒性是很重要的(Farrell等人，2018)以及來自NOX4的ROS於NASH中亦是相關的(Bettaieb等人，2015)。發現X209預防sFA裝載的肝細胞生產ROS，以及此伴隨著麩胱甘肽(GSH)位準之部份回復(圖34H及34I)。

【0593】 本發明人接著檢查訊息傳導事件。脂肪毒性與JNK活化密切相關，JNK活化驅動凋亡蛋白酶-3活化及脂質凋亡。因此，棕櫚酸裝載的肝細胞展現出JNK活化及凋亡蛋白酶-3裂解，以及ERK磷酸化(圖34J)。此樣式明顯地類似於IL11刺激所見的效應(圖33E)。儘管肝細胞攝入相似的sFA，但X209大幅地抑制棕櫚酸誘發的訊息傳導事件以及脂肪酸合成酶(FASN)向上調節、凋亡蛋白酶3活化及三酸甘油酯蓄積(圖34J、34K及40I)。NOX4係通過棕櫚酸向上調節且亦受X209抑制(圖34J)。雖然STAT3通過sFA裝載而活化，但發現此效應獨立於IL11RA媒介的訊息傳導且與脂質凋亡無關(圖34J)。sgp130於此等的實驗中始終沒有效

應。合起來看，此等資料證實棕櫚酸誘發的IL11分泌及自泌、前饋IL11/順式訊息傳導對肝細胞脂肪毒性是很重要的。

5.3.3 於二種NASH模式中沒有證據表明IL11或IL6反式訊息傳導

【0594】 本發明人繼而探究反式訊息傳導是否為活體內NASH之基礎，其係使用二種臨床前小鼠NASH臨床前模式：西方飲食補充果糖(WDF)模式及甲硫胺酸及膽鹼缺乏高脂肪飲食(HFMCD)模式。WDF模式與肥胖、高脂血症及胰島素抗性有關連以及被視為可轉移成人類NASH的常見形式，如同於糖尿病的患者。HFMCD模式刺激快速發作NASH，由肝細胞脂肪毒性所特異性驅動，其在胰島素抗性不存在下與體重減輕有關連。脂肪毒性對二種模式是共同的而肥胖及胰島素抗性不是。

【0595】 在開始WDF及HFMCD飲食之前三週，向小鼠注射AAV8病毒，其編碼含有小鼠gp130蛋白之整個細胞外域(胺基酸1至617)之白蛋白啟動子驅動的sgp130(AAV8-Alb-sgp130)，或僅有白蛋白啟動子(AAV8-Alb-零) (圖35A、41A及42A)。AAV8-Alb-sgp130投予於肝臟內誘發高位準的sgp130，其亦可於周邊循環中偵測到，合適供用於假定存在的IL6或IL11反式訊息傳導之局部及全身性抑制二者(圖35B、41B、42B-42C)。

【0596】 於WDF16週後，肝臟內及周邊中的IL11位準強有力地向上調節但IL6表現沒有影響(圖35B及35C)。處於WDF的小鼠變得肥胖(圖41C)，肝臟質量增加大概2倍且發展出嚴重的脂肪變性、藉由大體解剖學、組織學及肝臟三酸甘油酯定量分析(圖35E-35G)。此等表現型未受高位準的sgp130表現影響(圖35B-35G)。相似地，處於WDF的小鼠的ALT、AST、膠原蛋白及周邊心血管風險因子(空腹血糖、血清三酸甘油酯及血清膽固醇)的位準有提升、伴隨耗乏的GSH位準，但此等參數中無一者受sgp130影響(圖35H-35N)。來自處於WDF飲食歷時16週的小鼠之肝臟顯示出促炎性及纖維化基因的表現增加且sgp130媒介的

抑制假定存在的反式訊息傳導未影響此標籤(圖35O及41D-41E)。

【0597】於第二組的實驗中使用HFMCD飲食來誘發NASH(圖42A)。HFMCD飲食增加肝臟及血清內的IL11位準，而IL6位準於肝臟內稍微降低及於周邊溫和地增加(圖42B及42D-42E)。處於HFMCD飲食的小鼠發展快速及極重度的脂肪變性、藉由大體解剖學、組織學及分子分析，其未被sgp130表現改變(圖42F及42G)。藉由HFMCD飲食提升了肝細胞損標識(ALT及AST)及GSH耗乏，與sgp130表現無關(圖42H-42J)。相似地，sgp130表現沒有改變HFMCD誘發的肝纖維化(圖42K)。於RNA位準上，HFMCD飲食與發炎及纖維化基因失調的表現有關及此等分子表現型的未受sgp130表現影響(圖42L及42M)。

【0598】於訊息傳導位準上，WDF及HFMCD飲食二者都刺激ERK及JNK活化，與提升的IL11順式訊息傳導是一致的(圖35P及42N)。相比之下，肝臟的pSTAT3位準未被WDF提升(圖35P)以及於HFMCD飲食的小鼠呈現溫和地提升(圖42N)。在所有情況下，sgp130對於飲食誘發的訊息傳導事件沒有效應。總的來說，此等資料建議IL6或IL11反式訊息傳導於NASH都沒有起作用，此與其他的研究是一致的，其他的研究中尚未探測到IL6家族反式訊息傳導(Agthe等人，2017; Balic等人，2017; Kammoun等人，2017; Kraakman等人，2015)。

5.3.4 肝細胞特異性IL11順式訊息傳導係起始NASH所需的

【0599】雖然沒有發現證據支持NASH模式中的IL11反式訊息傳導，但該等資料總的來說建議肝細胞中的IL11之效應增加的，推定為順式的。為測試此假定，本發明人向*Il11ra1^{loxP/loxP}*小鼠投予AAV8-Alb-Cre以僅刪失肝細胞的*Il11ra1*(CKO小鼠)。繼而餵食CKO小鼠正常食品(NC)、HFMCD飲食或WDF(圖36A及37A)。CKOs接著AAV8-Alb-Cre之肝臟的IL11RA蛋白大幅減弱，顯示該模式有效且暗示肝細胞為*Il11ra1*最大的肝臟儲積所(圖36B及37B)。

【0600】除了快速刺激的脂肪毒性驅動的NASH(Stephenson等人，2018)之

外，HFMCD飲食還導致體重減輕(Stephenson等人，2018)。令人驚異地，處於HFMCD飲食的小鼠之體重減輕最初是有限的且後來於CKO小鼠有逆轉(圖36C)。處於WDF的小鼠正如所料在實驗的期間內從頭到尾的體重及脂肪質量都增加。然而，且同樣令人驚異地，此等肥胖表現型於CKO小鼠是減輕的(圖37C及37D)。此等資料建議抑制IL11訊息傳導對於體重恆定，及情境特異性抗惡病質或抗肥胖的效應是允許的。

【0601】藉由大體解剖學、組織學及三酸甘油酯定量分析，處於HFMCD或WDF飲食的CKO小鼠受強有力的保護免於脂肪變性(圖36D及36E、37E及37F)及處於WDF的該等肝腫大較小(圖37G)。餵食HFMCD飲食(降低：ALT，99%；AST，97%；二者P都<0.0001)或WDF(降低：ALT，98%；AST，98%；二者P都P<0.0001)的CKO小鼠之肝損壞標識明顯降低，且發現可比得上NC對照位準(圖36F及36G、37H及37I)。於二種模式中，處於NASH飲食的對照小鼠之GSH位準都減弱但是於CKOs是正規化的(圖36H及37J)。

【0602】處於NASH飲食的CKO小鼠相較於對照而言，肝纖維化大幅降低(降低：HFMCD，87%；WDF，64%；二者P都<0.001)(圖36I及36K)。處於HFMCD或WDF飲食的小鼠之促炎性及纖維化基因之向上調節於CKOs亦減弱(圖36J、37L、43A及43B、44A及44B)。此暗示HSCs向肌纖維母細胞轉化及免疫細胞的活化在某種程度上，係繼發於肝細胞之上游的、IL11驅動的事件。

【0603】處於WDF的小鼠亦發展出高血糖症、高三酸甘油脂血症及高膽固醇血症，其等全部於CKOs都有改善，暗示肝細胞特異性IL11訊息傳導針對NASH表現型更廣泛重要的作用(圖44C-44E)。於訊息傳導位準，HFMCD飲食及WDF二者都導致ERK及JNK磷酸化提升。CKO小鼠很大幅地避免了這種情況，與抑制肝細胞的IL11訊息傳導於是一致的(圖36K及37M)。

5.3.5 於*IL11ra1* 零小鼠重建肝細胞特異性IL11順式訊息傳導回復脂肪變性肝炎

但沒有回復肝纖維化

【0604】 使用活體內功能獲得實驗以補足使用CKO小鼠之功能喪失實驗。本發明人探究於具有全面的*Il11ra1*刪失的(*Il11ra1*^{-/-}剔除(KOs))小鼠之肝細胞中特異性回復IL11順式或反式訊息傳導是否會導致疾病。向KO小鼠注射編碼全長、膜結合型*Il11ra1*(*mbIl11ra1*；以重建順式訊息傳導)或分泌/可溶性形式的*Il11ra1*(*sIl11ra1*，其構成*Il11ra1*之細胞外部分；以啟用反式訊息傳導)之AAV8或對照建構物，以及動物繼而餵食NC、HFMCD飲食或WDF(圖38A、45A及46A)。

【0605】 注射AAV8-Alb-*mbIl11ra1*的KO小鼠於肝細胞上再表現IL11RA1及注射AAV8-Alb-*sIl11ra1*的KO小鼠於肝臟及循環二者都展現出sIL11RA1表現的增加(圖38B、45B、46B及46C)。正如所料，接受對照AAV8對照建構物(AAV8-Alb-零)、處於NC的野生型小鼠具有正常的肝臟且，當處於HFMCD飲食或WDF時，發展脂肪變性、發炎及肝損壞(圖38C-38J、45C及45D、46D-46K)。注射對照病毒且餵食HFMCD或WDF飲食的KO小鼠受保護免於NASH表現型，雖然KO *Il11ra1*之生殖系列刪失之保護不如CKOs中所見的強。

【0606】 使用*mbIl11ra1*來回復KO小鼠之IL11順式訊息傳導重演了肝脂肪變性及發炎，其從大體解剖學至基因表現及訊息傳導之分子樣式可以明顯看出(圖38C-38J、45C-45D及46D-46L)。明顯地，肝臟膠原蛋白含量及纖維化基因表現沒有回復(圖38I及38J、45D、46I及46K)，因對於HSC向肌纖維母細胞轉化是很重要的(Widjaja等人，2019)HSCs之IL11訊息傳導，未受白蛋白-驅動的*Il11ra1*表現影響(即於此等模式中HSCs仍然是*Il11ra1*刪失的)。形成鮮明的對比，KOs的肝細胞內之sIL11RA表現，其理論上會活化反式訊息傳導，儘管IL11位準很高但還是沒有效應(圖35B)以及小鼠仍然受保護免於全部的NASH肝病理學(圖38C-38J、45C-45D及46D-46K)。訊息傳導變化是一致的因mIL11RA表現使處於任一飲食的KOs之ERK及JNK活化回復，而sIL11RA1沒有(圖38K及46L)。於WDF

模式中，回復KO小鼠之肝細胞特異性IL11順式訊息傳導導致高血糖症、高三酸甘油脂血症及高膽固醇血症，但sIl11ra1之表現沒有(圖38L-38N)。

5.4 討論

【0607】 代謝性肝病經常發生在肥胖及第二型糖尿病的情況中並且最初顯現為NAFLD其能進展成NASH(Friedman等人，2018; Sanyal, 2019)。進展成NASH之關鍵基礎的病理學是“受質超載”，從而大量的代謝物超過肝細胞加工脂肪的能力，導致脂肪毒性。細胞介素是自脂肪毒性的肝細胞分泌的關鍵NASH因子(Friedman等人，2018)且本發明人於此確立IL11為脂肪毒性的環境很重要的組分及NAFLD至NASH轉化之驅動子。

【0608】 大量的證據支持肝臟內的IL6訊息傳導是有益的這想法(Kroy等人，2010; Schmidt-Arras and Rose-John, 2016; Yamaguchi等人，2010)。然而，針對IL6反式訊息傳導於肝脂肪變性之致病的作用已經有提議(Kammoun等人，2017; Wieckowska等人，2008)。本發明人發現使用合成建構物，超IL11起始IL11反式訊息傳導，係細胞毒性的，而超IL6於肝細胞是保護性的。然而，沒有證據表明關於在活體外或活體內的生物相關情況下，使用功能獲得或喪失二者之反式訊息傳導。此暗示IL6家族成員反式訊息傳導於NASH沒有起作用，其與先前肝臟外的研究一致(Agthe等人，2017; Balic等人，2017)。此等發現關於其他疾病的關聯性仍不清楚且靶向潰瘍性結腸炎之反式訊息傳導的臨床試驗正在進行中(Kang等人，2019)。先前的研究已經暗示IL6R表現於肝細胞(Schmidt-Arras and Rose-John, 2016)因此令人驚訝的是發現初級人類肝細胞表現很少/沒有IL6R。此可能反映出更早的研究中強烈的依賴轉化的肝細胞樣細胞(如HepG2)。

【0609】 於此本發明人證實IL11順式訊息傳導於NASH之肝細胞中是至關重要的。使用於野生型遺傳背景之肝細胞特異性功能喪失還有於Il11ra1零背景之肝細胞特異性功能獲得二者都確立此效應。此顛覆了文獻中IL11對於肝細胞

是保護性的建議，該建議係根據使用rhIL11、於小鼠、於鼠類肝病模式中無效而來的(Maeshima等人，2004; Nishina等人，2012; Trepicchio等人，2001; Zhu等人，2015)。重要地是，雖然回復肝細胞特異性IL11順式訊息傳導於KO小鼠導致脂肪變性肝炎但纖維化沒有回復，反之預防了CKO之纖維化。此證實於HSCs中IL11順式訊息傳導對於肝纖維化是必須的以及將肝細胞官能不良放置於HSC活化上游。

【0610】 本發明人提議脂質裝載的肝細胞分泌IL11導致自泌細胞死亡、旁泌活化HSCs及續發性發炎細胞活化及浸潤之NASH機制性模式(圖39)。抑制IL11訊息傳導靶向一種飲食誘發的脂肪變性肝炎之起始的聯繫，此影響了後續的肝纖維化及發炎，此提出了一種新的NASH治療方法。

5.5 實施例5的材料及方法

5.5.1 AAV8載體

【0611】 所有的腺相關病毒病毒血清型8(AAV8)載體係由Vector Biolabs予以合成。攜帶由白蛋白(*Alb*)啟動子驅動的小鼠膜結合型*Il11ra1* cDNA(NCBI登錄序號：BC069984)、小鼠可溶性*Il11ra1* cDNA及小鼠可溶性*gp130* cDNA之AAV8載體分別稱為AAV8-*Alb-mbIl11ra1*、AAV8-*Alb-sIl11ra1*及AAV8-*Alb-sgp130*。AAV8-*Alb-sgp130*及AAV8-*Alb-sIl11ra1*係藉由分別移去小鼠*gp130*序列(NCBI登錄序號：BC058679)及小鼠*Il11ra1*序列之跨膜及細胞質區域來建構。AAV8-零載體用作為載體對照。為了於白蛋白表現細胞中特異地刪失*Il11ra1*，所以注射AAV8-*Alb-iCre*載體至LoxP側位的*Il11ra1*對偶基因同型組合的小鼠(*Il11ra1*_{loxP/loxP}小鼠)。

5.5.2 抗體

【0612】 白蛋白(ab207327, Abcam)、Alexa Fluor 488二級抗體(ab150077, Abcam)、裂解的凋亡蛋白酶-3(9664, CST)、凋亡蛋白酶3(9662, CST)

p-ERK1/2(4370, CST) 、 ERK1/2(4695, CST) 、 GAPDH(2118, CST) 、 gp130(PA5-28932, Thermo Fisher) 、 IL6(AF506, R&D systems) 、 IL6R(流動式細胞測量術, ab222101, Abcam) 、 IL6R(針對免疫螢光染色, MA1-80456, Thermo Fisher) 、 IL11(Aldevron) 、 IL11RA(流動式細胞測量術及免疫螢光染色, ab125015, Abcam) 、 IL11RA(西方墨點法, 130920, Santa Cruz) 、 p-JNK(4668, CST) 、 JNK(9258, CST) 、 p-STAT3(4113, CST) 、 STAT3(4904, CST) 、 小鼠HRP(7076, CST) 、 兔HRP(7074, CST) 、 大鼠HRP(31470, Santa Cruz) 。

5.5.3 重組蛋白

【0613】 商業的重組蛋白：人類超IL6(IL6R:IL6融合蛋白, 8954-SR, R&D systems) 、 人類可溶性 gp130 Fc(671-GP-100, R&D systems) 、 人類 IL11RA(8895-MR-050, R&D systems) 。

【0614】 定制的重組蛋白：人類IL11(UniProtKB:P20809, Genscript) 。人類超IL11(IL11RA:IL11融合蛋白)，其模擬反式訊息傳導錯合物，係使用IL11RA的片段(胺基酸殘基1-317；UniProtKB: Q14626)及IL11(胺基酸殘基22-199, UniProtKB: P20809)加上20胺基酸鏈接子(SEQ ID NO:20) (Schafer等人，2017)來建構。

5.5.4 化學品

【0615】 棕櫚酸(P5585, Sigma) 、 聚甲醛(PFA, 28908；Thermo Fisher) 、 佛波醇 12-十四烷酸酯 13-乙酸酯(PMA, P1585, Sigma) 、 曲拉通X-100(T8787, Sigma) ， 及4',6-二脒基-2-苯基吡啶(D1306；Thermo Fisher) 。

5.5.5 初級人類肝細胞培養

【0616】 初級人類肝細胞(5200, ScienCell)係於37°C及5% CO2下維持於增補2%胎牛血清、1%青黴素-鏈黴素之肝細胞培養基(520, ScienCell)內。在如所述之不同劑量的各種重組蛋白刺激之前24小時，使肝細胞(P2-P3)血清饑餓隔夜，

除非於方法內另有規定。

5.5.6 THP-1培養

【0617】 以增補 10% FBS 及 0.05mM β -巰乙醇的 RPMI 1640(A1049101, Thermo Fisher)來培養THP-1(ATCC)。THP-1細胞係用配於RPMI 1640之10 ng/ml 的PMA予以分化歷時48小時。

5.5.7 活體外棕櫚酸(飽和脂肪酸)治療

【0618】 如前所述來製備6:1的比率之棕櫚酸：BSA複合的溶液(Alsabeeh等人，2018)。複合無脂肪酸的BSA之棕櫚酸(0.5 mM)係如圖例所述用來治療細胞；使用0.5% BSA溶液作為對照。

5.5.8 流動式細胞測量術

【0619】 針對表面IL11RA、IL6R及gp130分析，初級人類肝細胞及THP-1細胞係用IL11RA、IL6R或gp130抗體及相應的Alexa Fluor 488二級抗體來染色。藉由用死細胞細胞凋亡套組及Annexin V FITC及PI(V13242, Thermo Fisher)來染色初級人類肝細胞以執行細胞死亡分析。PI+ve細胞繼而用流式細胞儀(Fortessa, BD Biosciences)定量並用FlowJo版本X軟體(TreeStar)來分析。

5.5.9 免疫螢光

【0620】 初級人類肝細胞播種於8孔腔室載玻片(1.5×10^4 個細胞/孔)上24小時然後染色。細胞以4% PFA固定20分鐘、用PBS清洗，以及用5% BSA配於PBS阻斷非特異性位置2小時。用IL11RA、IL6R、gp130或白蛋白抗體孵育細胞過夜(4°C)，接著用合適的Alexa Fluor 488二級抗體孵育1小時。腔室載玻片於黑暗中乾燥且添加5滴具有DAPI之封固劑至載玻片15分鐘然後以螢光顯微鏡(Leica)成像。

5.5.10 油紅O染色

【0621】 初級人類肝細胞播種於8孔腔室載玻片(1×10^4 個細胞/孔)24小時棕

櫚酸治療後，細胞以10% PFA固定30分鐘、用蒸餾水清洗，以及以60%(v/v)異丙醇孵育5分鐘。接著用油紅O溶液染色細胞30分鐘且用蒸餾水清洗，然後以亮視野顯微鏡(BX53, Olympus)成像。脂質小滴係藉由其等之紅色染色來鑑定。

5.5.11 活性含氧物(ROS)偵測

【0622】 初級人類肝細胞播種於8孔腔室載玻片(1X10⁴個細胞/孔)。針對此實驗，在棕櫚酸治療之前，細胞先予以血清饑餓。棕櫚酸刺激後24小時，清洗細胞，以25 μ M的DCFDA溶液(ab113851, Abcam)於黑暗中在37°C下孵育45分鐘，以及依據製造商的程序用稀釋緩衝液來沖洗。陽性DCF染色的活細胞係使用有合適螢光素(FITC)的濾鏡組之螢光顯微鏡(Leica)成像。

5.5.12 動物模式

【0623】 動物實驗係在SingHealth機構動物護理和使用委員會(IACUC)的準則下進行。小鼠維持在SPF環境中且提供自由採食和飲水。

代謝性肝病小鼠模式

HFMCD

【0624】 向6-8週大C57BL/6N, *Il11ra1*^{-/-}小鼠，及*Il11ra1*_{loxP/loxP}及其等個別的對照餵食補充有60 kcal%脂肪的甲硫胺酸及膽鹼缺乏飲食(HFMCD, A06071301B16, Research Diets)歷時4週。對照小鼠接受正常食品(NC, Specialty Feeds)。

WDF

【0625】 向6-8週大C57BL/6N, *Il11ra1*^{-/-}小鼠，及*Il11ra1*_{loxP/loxP}及其等個別的對照餵食西方飲食(D12079B, Research Diets)補充有15%重量/體積果糖之飲用水(WDF)歷時16週。對照小鼠接受NC及自來水。

Il11ra1-刪失小鼠(KO)

【0626】 向6-8週大雄性*Il11ra1*^{-/-}小鼠(B6.129S1-*Il11ratm1Wehi*/J, Jackson's

Laboratory)靜脈內注射 4×10^{11} 個基因組複本(gc)的 AAV8-*Alb-mbIl11ra1* 或 AAV8-*Alb-sIl11ra1*病毒以分別誘發小鼠*Il11ra1*或可溶性*Il11ra1*之肝細胞特異性表現。*Il11ra1*^{-/-}小鼠及其等的野生型同胎仔畜(*Il11ra1*^{+/+})二者均以靜脈內注射 4×10^{11} gc AAV8-*Alb*-零病毒作為對照。病毒注射3週後，小鼠餵食HFMCD、WDF或NC。說明飲食持續期間。

可溶性gp130之活體內投予

【0627】向6-8週大雄性C57BL/6N小鼠(InVivos)注射 4×10^{11} gc AAV8-*Alb-sgp130*病毒以誘發可溶性gp130之肝細胞特異性表現；對照小鼠注射 4×10^{11} gc AAV8-*Alb*-零病毒。病毒投予3週後，小鼠餵食HFMCD、WDF或NC歷時所說明的持續期間。

Il11ra-floxed小鼠(CKO)

【0628】*Il11ra*-floxed小鼠，其中*Il11ra1*基因的外顯子4至7側面與loxP位址相接，係如先前所述利用CRISPR/Cas9系統來創造(Ng等人)。為了於肝細胞誘發*Il11ra1*特異性刪失，向6-8週大雄性同型組合的*Il11ra1*-floxed小鼠靜脈內注射 AAV8-*Alb*-Cre病毒(4×10^{11} gc)；類似量的AAV8-*Alb*-零病毒注射至同型組合的*Il11ra1*-floxed小鼠內作為對照。於HFMCD、WDF或NC餵食之前讓AAV8注射的小鼠恢復三週。剔除的效率係藉由肝的IL11RA之西方墨點法來判定。

5.5.13 RNA-定序(RNA-seq)及核糖體剖繪(Ribo-seq)

【0629】RNA-seq及Ribo-Seq庫製備係如前所述來進行(Chothani等人，2019)。

RNA-seq庫之產生

【0630】使用RNeasy管柱(Qiagen)以從人類肝細胞萃取總RNA。RNA係使用Qubit RNA高敏感性分析套組(Life Technologies)來定量以及其之品質係使用LabChip GX RNA分析試劑套組(Perkin Elmer)、基於其等之RNA完整性值來評

估。使用TruSeq Stranded mRNA庫製備套組(Illumina)、遵照製造商的標準使用說明來測量轉錄本之豐度。

Ribo-seq庫之產生

【0631】 肝細胞於10cm培養皿內生長至90%融合且以1 mL增補0.1 mg/mL環己醯亞胺之冷溶解緩衝液(調配為TruSeq® Ribo剖析哺乳動物套組，RPHMR12126, Illumina)來溶解。均質化且澄清的溶解產物繼而用Truseq核酸酶(Illumina)、依據製造商的使用說明予以足跡分析。使用Illustra Sephacryl S400管柱(GE Healthcare)來純化核糖體，以及保護的RNA片段係用標準的酚：氯仿：異戊醇技術萃取。核糖體RNA移除(Mammalian RiboZero Magnetic Gold, Illumina)之後，繼而藉由使用TruSeq® Ribo剖析哺乳動物套組、依據製造商的程序以從足跡分析的RNA製備定序庫。

【0632】 最終的RNA-seq及核糖體剖繪庫係使用KAPA庫定量套組(KAPA Biosystems)、於StepOnePlus即時PCR系統(Applied Biosystems)上、依據製造商的程序來定量。使用LabChip GX DNA高敏感性試劑套組(Perkin Elmer)來判定最終庫的品質及平均片段大小。合併有唯一索引的庫以及於NextSeq 500平台式定序儀(Illumina)上、使用NextSeq 500 High Output v2套組及雙端75-bp定序化學予以定序。

RNA定序及核糖體剖繪之資料處理及分析

【0633】 原始定序資料係用bcl2fastq V2.19.0.316予以解多工以及使用Trimmomatic (Bolger等人，2014) V0.36來修整轉接子，使序列標籤(reads)於剪截後保持超過20 nt。使用bowtie(Langmead等人，2009)來排列比對Ribo-seq序列標籤與已知的mtRNA、rRNA及tRNA序列(RNACentral(The RNACentral Consortium, 2017)，釋出版本5.0)以及只保留未對準的序列標籤為核糖體保護的片段(RPFs)。與人類基因組(hg38)之排列比對係使用STAR(Dobin等人，2012)來進行。定量

Ribo-seq之CDS(編碼序列)區域及RNA-seq之外顯子區域上的基因表現、使用唯一定位序列標籤(Ensembl資料庫釋出版本GRCh38 v86)及特徵計數(Liao等人, 2014)。計算TPM以及使用盒形圖予以視覺化以比較IL11RA(ENSG00000137070)、IL6R(ENSG00000160712)及gp130(ENSG00000134352)的基線表現。使用IL11RA、IL6R及gp130之Ribo-seq及RNA-seq序列標籤的序列標籤覆蓋域係使用Gviz R套裝軟體(Hahne and Ivanek, 2016)及股特異性排列比對檔案予以視覺化。

5.5.14 比色分析

【0634】細胞培養上清液及小鼠血清內的丙胺酸轉胺酶(ALT)活性係使用ALT活性分析套組(ab105134, Abcam)來測量。肝麩胱甘肽巯基(GSH)位準係使用麩胱甘肽比色偵測套組(EIAGSHC, Thermo Fisher)來測量。小鼠肝內的總羥基脯胺酸含量係使用Quickzyme總膠原蛋白分析套組(QZBtotco15, Quickzyme Biosciences)來測量。血清及肝的三酸甘油脂位準係使用三酸甘油脂分析套組(ab65336, Abcam)來測量。小鼠血清的天門冬胺酸轉胺酶(AST)及膽固醇位準係分別使用AST分析套組(ab105135, Abcam)及膽固醇分析套組(ab65390; Abcam)來測量。所有的比色分析係依據製造商的程序來執行。

5.5.15 酶聯免疫吸附分析法(ELISA)

【0635】小鼠血清的gp130位準係使用小鼠gp130 DuoSet ELISA (DY468, R&D systems)、依據製造商的程序來定量。

5.5.16 RT-qPCR

【0636】使用Trizol(Invitrogen)及RNeasy迷你套組(Qiagen)以自急凍肝組織萃取總RNA。使用iScript cDNA合成套組(Biorad)來進行PCR擴增。用TaqMan(Applied Biosystems)或SYBR綠色(Qiagen)技術、使用StepOnePlus(Applied Biosystem)經40個循環、以二複本來分析基因表現。將表現

資料針對*GAPDH* mRNA表現予以正規化且使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法來計算倍數變化。特異性TaqMan探針及SYBR綠色引子的序列可根據要求提供。

5.5.17 免疫墨點法

【0637】 西方墨點法係於來自肝細胞及肝組織之總蛋白萃取物來進行。以含蛋白酶及磷酸酶抑制劑(Roche)之RIPA溶解及萃取緩衝液(89901, Thermo Scientific)來均質化肝細胞及肝組織溶解產物。蛋白溶解產物係藉由SDS-PAGE來分離且轉移至PVDF膜。蛋白帶係使用具有合適的二級抗體：抗兔HRP或抗小鼠HRP之ECL偵測系統(Pierce)予以視覺化。

5.5.18 肝組織加工及組織學分析

【0638】 肝樣本於10%中性緩衝之福馬林中固定、石蠟化、切成5- μ m切片、用蘇木精與伊紅(H&E)根據標準程序來染色，且藉由光學顯微術檢查。

5.5.19 統計分析

【0639】 統計分析係使用GraphPad Prism軟體(版本6.07)來執行。根據唐奈特氏(當比較一個條件之數個實驗組時)、杜凱氏(當一個實驗內的數個條件彼此比較時)、希達克(當時來自2種不同基因型的數個條件彼此比較時)來校正多重檢定之P值。二種不同組別比較二種參數之分析係用二因子ANOVA來執行。統計顯著性之準則為 $P < 0.05$ 。

5.6 實施例5之參考資料

【0640】 Agthe, M., Garbers, Y., Putoczki, T., and Garbers, C. (2017). Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice. *Placenta* 57, 13–16.

【0641】 Alsabeeh, N., Chausse, B., Kakimoto, P.A., Kowaltowski, A.J., and Shiriha, O. (2018). Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1863, 143–151.

【0642】 Balic, J.J., Garbers, C., Rose-John, S., Yu, L., and Jenkins, B.J. (2017). Interleukin-11-driven gastric tumorigenesis is independent of trans-signalling. *Cytokine* 92, 118–123.

【0643】 Bettaieb, A., Jiang, J.X., Sasaki, Y., Chao, T.-I., Kiss, Z., Chen, X., Tian, J., Katsuyama, M., Yabe-Nishimura, C., Xi, Y., et al. (2015). Hepatocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 4 Regulates Stress Signaling, Fibrosis, and Insulin Sensitivity During Development of Steatohepatitis in Mice. *Gastroenterology* 149, 468–480.e10.

【0644】 Bigaeva, E., Gore, E., Simon, E., Zwick, M., Oldenburger, A., de Jong, K.P., Hofker, H.S., Schlepütz, M., Nicklin, P., Boersema, M., et al. (2019). Transcriptomic characterization of culture-associated changes in murine and human precision-cut tissue slices. *Arch. Toxicol.*

【0645】 Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.

【0646】 Bozza, M., Bliss, J.L., Maylor, R., Erickson, J., Donnelly, L., Bouchard, P., Dorner, A.J., and Trepicchio, W.L. (1999). Interleukin-11 reduces T-cell-dependent experimental liver injury in mice. *Hepatology* 30, 1441–1447.

【0647】 Chothani, S., Schäfer, S., Adami, E., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Langley, S.R., Tan, J., Wang, M., Quaife, N.M., Jian Pua, C., et al. (2019). Widespread Translational Control of Fibrosis in the Human Heart by RNA-Binding Proteins. *Circulation* 140, 937–951.

【0648】 Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

【0649】 Farrell, G.C., Haczeyni, F., and Chitturi, S. (2018). Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1061*, 19–44.

【0650】 Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.*

【0651】 Hahne, F., and Ivanek, R. (2016). Visualizing Genomic Data Using Gviz and Bioconductor. In *Statistical Genomics*, (Humana Press, New York, NY), pp. 335–351.

【0652】 Kakisaka, K., Cazanave, S.C., Fingas, C.D., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2012). Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G77–G84.

【0653】 Kammoun, H.L., Allen, T.L., Henstridge, D.C., Kraakman, M.J., Peijs, L., Rose-John, S., and Febbraio, M.A. (2017). Over-expressing the soluble gp130-Fc does not ameliorate methionine and choline deficient diet-induced non alcoholic steatohepatitis in mice. *PLoS One* *12*, e0179099.

【0654】 Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity* *50*, 1007–1023.

【0655】 Klein, C., Wüstefeld, T., Assmus, U., Roskams, T., Rose-John, S., Müller, M., Manns, M.P., Ernst, M., and Trautwein, C. (2005). The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J. Clin. Invest.* *115*, 860–869.

【0656】 Kleinfeld, A.M., Prothro, D., Brown, D.L., Davis, R.C., Richieri, G.V.,

and DeMaria, A. (1996). Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am. J. Cardiol.* 78, 1350–1354.

【0657】 Kleinfeld, A.M., Prothro, D., Brown, D.L., Davis, R.C., Richieri, G.V., and DeMaria, A. (1996). Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am. J. Cardiol.* 78, 1350–1354.

【0658】 Kraakman, M.J., Kammoun, H.L., Allen, T.L., Deswaerte, V., Henstridge, D.C., Estevez, E., Matthews, V.B., Neill, B., White, D.A., Murphy, A.J., et al. (2015). Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell Metab.* 21, 403–416.

【0659】 Kroy, D.C., Beraza, N., Tschaharganeh, D.F., Sander, L.E., Erschfeld, S., Giebeler, A., Liedtke, C., Wasmuth, H.E., Trautwein, C., and Streetz, K.L. (2010). Lack of interleukin-6/glycoprotein 130/signal transducers and activators of transcription-3 signaling in hepatocytes predisposes to liver steatosis and injury in mice. *Hepatology* 51, 463–473.

【0660】 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10, R25.

【0661】 Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.

【0662】 Maeshima, K., Takahashi, T., Nakahira, K., Shimizu, H., Fujii, H., Katayama, H., Yokoyama, M., Morita, K., Akagi, R., and Sassa, S. (2004). A protective role of interleukin 11 on hepatic injury in acute endotoxemia. *Shock* 21,

134–138.

【0663】 Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H.S., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., et al. (2010). Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53, 2431–2441.

【0664】 Ng, B., Dong, J., D’Agostino, G., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.-W., Ko, N.S.J., Tan, J., Chothani, S.P., Huang, B., et al. (2019). Interleukin-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 11.

【0665】 Ng, B., Dong, J., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Paleja, B.S., Adami, E., Ko, N.S.J., Wang, M., Lim, S., Tan, J., et al. Fibroblast-specific IL11 signaling is required for lung fibrosis and inflammation.

【0666】 Nishina, T., Komazawa-Sakon, S., Yanaka, S., Piao, X., Zheng, D.-M., Piao, J.-H., Kojima, Y., Yamashina, S., Sano, E., Putoczki, T., et al. (2012). Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci. Signal.* 5, ra5.

【0667】 Sanyal, A.J. (2019). Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 377–386.

【0668】 Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.-W., Moreno-Moral, A., DeLaughter, D.M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., et al. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552, 110–115.

【0669】 Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.-W., Moreno-Moral, A., DeLaughter, D.M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., et al. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552, 110–115.

【0670】 Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 64, 1403–1415.

【0671】 Stephenson, K., Kennedy, L., Hargrove, L., Demieville, J., Thomson, J., Alpini, G., and Francis, H. (2018). Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expr.* 18, 5–17.

【0672】 The RNAcentral Consortium (2017). RNAcentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 45, D128–D134.

【0673】 Trepicchio, W.L., Bozza, M., Bouchard, P., and Dorner, A.J. (2001). Protective effect of rhIL-11 in a murine model of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 242–249.

【0674】 Widjaja, A.A., Dong, J., Adami, E., Viswanathan, S., Ng, B., Singh, B.K., Lim, W.W., Zhou, J., Pakkiri, L.S., Shekeran, S.G., et al. Redefining Interleukin 11 as a regeneration-limiting hepatotoxin.

【0675】 Widjaja, A.A., Singh, B.K., Adami, E., Viswanathan, S., Dong, J., D’Agostino, G.A., Ng, B., Lim, W.W., Tan, J., Paleja, B.S., et al. (2019). Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*.

【0676】 Wieckowska, A., Papouchado, B.G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N.N., and Feldstein, A.E. (2008). Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1372–1379.

【0677】 Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K.L., Betz, U., Lauber, J., Buer, J., Manns, M.P., Müller, W., and Trautwein, C. (2003). Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 11281–11288.

【0678】 Yamaguchi, K., Itoh, Y., Yokomizo, C., Nishimura, T., Niimi, T., Fujii, H., Okanoue, T., and Yoshikawa, T. (2010). Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Lab. Invest.* 90, 1169–1178.

【0679】 Yu, J., Feng, Z., Tan, L., Pu, L., and Kong, L. (2016). Interleukin-11 protects mouse liver from warm ischemia/reperfusion (WI/Rp) injury. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 40, 562–570.

【0680】 Zhu, M., Lu, B., Cao, Q., Wu, Z., Xu, Z., Li, W., Yao, X., and Liu, F. (2015). IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. *PLoS One* 10, e0126296.

實施例6：剖析胰臟炎之纖維-發炎機轉

【0681】 慢性胰臟炎係一種病因異質性纖維-發炎症候群，其導致外分泌及內分泌胰臟功能不全。

【0682】 胰臟星形細胞(PSC)以兩態存在且為涉及胰損傷之主要的纖維發生細胞類型。PSCs為身體中更廣大的維他命A酸儲存細胞網路的一部分，包括肝實質的細胞(HSC)。IL-11最近已證實於NASH定義的病理學，HSC轉化上起重要的作用(Widjaja等人，*Gastroenterology* (2019) 157(3): 777–792)。

【0683】 來自家鼯鼠(*Mus musculus*) (來自 *Tabula muris Consortium* 資料–Schaum等人，*Nature* (2018) 562: 367–372)之胰臟組織的單一細胞RNA定序(scRNA-seq)分析揭露PSCs(及管細胞)展現高的*Il11ra1*表現但*Il6ra*沒有–參見圖47A。此結果於蛋白位準係藉由人類PSCs之免疫螢光分析而確認(圖47B)。

【0684】 PSC活化經證實於活體外係藉由IL-11治療來觸發，及藉由IL-11媒介的訊息傳導之抗IL-11RA抗體拮抗劑的治療而抑制，PSC活化的刺激物(即TGFβ1、IL-11、bFGF、CTGF、PDGF或ET-1)無關–參見圖48A及48B。

【0685】 具有可誘發的、纖維母細胞特異性IL-11表現的基因轉殖小鼠發展出胰纖維化-參見圖49A至49C。

【0686】 於胰損傷之胰管結紮(PDL)模式中，IL-11媒介的訊息傳導之抗IL-11RA抗體拮抗劑的治療降低胰纖維化且抑制與PDL有關連之胰臟組織的降低-參見圖50A至50C。

序列表

<110> 新加坡商新加坡保健服務私人有限公司 (SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE. LTD.)
新加坡國立大學 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE)

<120> 代謝性疾病之治療及預防

<140> 109114711
<141> 2020-05-01

<150> GB 1906291.8
<151> 2019-05-03

<150> GB 1906597.8
<151> 2019-05-10

<150> GB 2001013.8
<151> 2020-01-24

<150> GB 2001896.6
<151> 2020-02-12

<150> GB 2002030.1
<151> 2020-02-14

<160> 59

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 199
<212> PRT
<213> 智人IL-11 (UniProt P20809)

<400> 1

Met Asn Cys Val Cys Arg Leu Val Leu Val Val Leu Ser Leu Trp Pro
1 5 10 15

Asp Thr Ala Val Ala Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser
20 25 30

Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser
35 40 45

Leu Leu Ala Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe

50					55					60					
Pro	Ala	Asp	Gly	Asp	His	Asn	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Met
65					70					75					80
Ser	Ala	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Arg
				85					90					95	
Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Leu	Ser	Tyr	Leu	Arg	His	Val	Gln	Trp	Leu	Arg
			100					105					110		
Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gly	Thr
		115					120					125			
Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Leu	Met
	130					135					140				
Ser	Arg	Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro
145					150					155				160	
Leu	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Trp	Gly	Gly	Ile	Arg	Ala	Ala	His	Ala
				165					170					175	
Ile	Leu	Gly	Gly	Leu	His	Leu	Thr	Leu	Asp	Trp	Ala	Val	Arg	Gly	Leu
		180						185					190		
Leu	Leu	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu									
		195													

<210> 2
<211> 918
<212> PRT
<213> 智人gp130 (UniProt P40189-1)

<400> 2

Met	Leu	Thr	Leu	Gln	Thr	Trp	Leu	Val	Gln	Ala	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu
1			5						10				15		

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
325 330 335

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val
355 360 365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala
370 375 380

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu
385 390 395 400

Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile
405 410 415

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala
420 425 430

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu
435 440 445

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala
450 455 460

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr
465 470 475 480

Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val
485 490 495

Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala
500 505 510

Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys
515 520 525

Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
530 535 540

Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
545 550 555 560

Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
565 570 575

Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
580 585 590

Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
595 600 605

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
610 615 620

Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
660 665 670

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
725 730 735

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
755 760 765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
770 775 780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
785 790 795 800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
820 825 830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly
865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala
885 890 895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln
900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915

<210> 3
<211> 422
<212> PRT
<213> 智人IL11RA (UniProt Q14626)

<400> 3

Met Ser Ser Ser Cys Ser Gly Leu Ser Arg Val Leu Val Ala Val Ala
1 5 10 15

Thr Ala Leu Val Ser Ala Ser Ser Pro Cys Pro Gln Ala Trp Gly Pro
20 25 30

Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln Pro Gly Arg Ser Val Lys Leu Cys Cys
35 40 45

Pro Gly Val Thr Ala Gly Asp Pro Val Ser Trp Phe Arg Asp Gly Glu
50 55 60

Pro	Lys	Leu	Leu	Gln	Gly	Pro	Asp	Ser	Gly	Leu	Gly	His	Glu	Leu	Val
65					70					75					80
Leu	Ala	Gln	Ala	Asp	Ser	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Ile	Cys	Gln	Thr
				85					90					95	
Leu	Asp	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Gln	Leu	Gly	Tyr	Pro
			100					105					110		
Pro	Ala	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Tyr	Glu	Asn	Phe
		115					120					125			
Ser	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Gln	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Thr	Arg	Tyr
	130					135					140				
Leu	Thr	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Ser	Gln	Arg
145					150					155					160
Arg	Ser	Pro	Ser	Thr	Gly	Pro	Trp	Pro	Cys	Pro	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly
				165					170					175	
Ala	Ala	Arg	Cys	Val	Val	His	Gly	Ala	Glu	Phe	Trp	Ser	Gln	Tyr	Arg
			180					185					190		
Ile	Asn	Val	Thr	Glu	Val	Asn	Pro	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Leu	Leu
	195						200					205			
Asp	Val	Ser	Leu	Gln	Ser	Ile	Leu	Arg	Pro	Asp	Pro	Pro	Gln	Gly	Leu
	210					215					220				
Arg	Val	Glu	Ser	Val	Pro	Gly	Tyr	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Ala	Ser	Trp
225					230					235					240
Thr	Tyr	Pro	Ala	Ser	Trp	Pro	Cys	Gln	Pro	His	Phe	Leu	Leu	Lys	Phe
				245				250						255	
Arg	Leu	Gln	Tyr	Arg	Pro	Ala	Gln	His	Pro	Ala	Trp	Ser	Thr	Val	Glu

202108606

270

Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro
275 280 285

His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp
290 295 300

Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Thr Ile
305 310 315 320

Pro Lys Glu Ile Pro Ala Trp Gly Gln Leu His Thr Gln Pro Glu Val
325 330 335

Glu Pro Gln Val Asp Ser Pro Ala Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Pro
340 345 350

His Pro Arg Leu Leu Asp His Arg Asp Ser Val Glu Gln Val Ala Val
355 360 365

Leu Ala Ser Leu Gly Ile Leu Ser Phe Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala
370 375 380

Leu Ala Leu Gly Leu Trp Leu Arg Leu Arg Arg Gly Gly Lys Asp Gly
385 390 395 400

Ser Pro Lys Pro Gly Phe Leu Ala Ser Val Ile Pro Val Asp Arg Arg
405 410 415

Pro Gly Ala Pro Asn Leu
420

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> siRNA標靶IL-11

<div><400> 4</div> <div>ccttccaaag ccagatcctt</div>		19
<div><210> 5</div> <div><211> 19</div> <div><212> DNA</div> <div><213> 人工序列</div>		
<div><220></div> <div><223> siRNA標靶IL-11</div>		
<div><400> 5</div> <div>gcctgggcag gaacatata</div>		19
<div><210> 6</div> <div><211> 19</div> <div><212> DNA</div> <div><213> 人工序列</div>		
<div><220></div> <div><223> siRNA標靶IL-11</div>		
<div><400> 6</div> <div>cctgggcagg aacatatat</div>		19
<div><210> 7</div> <div><211> 19</div> <div><212> DNA</div> <div><213> 人工序列</div>		
<div><220></div> <div><223> siRNA標靶IL-11</div>		
<div><400> 7</div> <div>ggttcattat ggctgtgtt</div>		19
<div><210> 8</div> <div><211> 19</div> <div><212> DNA</div> <div><213> 人工序列</div>		
<div><220></div> <div><223> siRNA標靶IL-11Ralpha</div>		
<div><400> 8</div>		

ggaccatacc aaaggagat		19
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA標靶IL-11Ralpha	
<400>	9	
gcgtcttttg gaatccttt		19
<210>	10	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA標靶IL-11Ralpha	
<400>	10	
gcaggacagt agatccct		18
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA標靶IL-11Ralpha	
<400>	11	
gctcaaggaa cgtgtgtaa		19
<210>	12	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	向IL-11(NM_000641.3)的siRNA	
<220>		
<221>	Misc_feature	

<222> (20)..(21)
<223> n = 去氧胸苷

<220>
<221> Misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n = 去氧胸苷

<400> 12
ccuuccaaag ccagaucuun naagaucugg cuuuggaagg nn 42

<210> 13
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 向IL-11(NM_000641.3)的siRNA

<220>
<221> Misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = 去氧胸苷

<220>
<221> Misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n = 去氧胸苷

<400> 13
gccugggcag gaacauauan nuauauguuc cugcccaggc nn 42

<210> 14
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 向IL-11(NM_000641.3)的siRNA

<220>
<221> Misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = 去氧胸苷

<220>

<221> Misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n = 去氧胸苷

<400> 14
ccugggcagg aacauauaun nauauauguu ccugcccagg nn 42

<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 向IL-11(NM_000641.3)的siRNA

<220>
<221> Misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = 去氧胸苷

<220>
<221> Misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n = 去氧胸苷

<400> 15
gguucauuau ggcuguguun naacacagcc auaaugaacc nn 42

<210> 16
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 向IL-11R α (U32324.1)的siRNA

<220>
<221> Misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = 去氧胸苷

<220>
<221> Misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n = 去氧胸苷

<400> 16

ggaccauacc aaaggagaun naucuccuuu gguauggucc nn

42

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 向IL-11R α (U32324.1)的siRNA

<220>

<221> Misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n = 去氧胸苷

<220>

<221> Misc_feature

<222> (41)..(42)

<223> n = 去氧胸苷

<400> 17

gcgucuuugg gaauccuun naaaggauuc ccaaagacgc nn

42

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 向IL-11R α (U32324.1)的siRNA

<220>

<221> Misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n = 去氧胸苷

<220>

<221> Misc_feature

<222> (41)..(42)

<223> n = 去氧胸苷

<400> 18

gcaggacagu agaucccuan nuagggaucu acuguccugc nn

42

<210> 19
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 向IL-11R α (U32324.1)的siRNA

<220>
<221> Misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = 去氧胸苷

<220>
<221> Misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n = 去氧胸苷

<400> 19
gcucaaggaa cguguguaan nuuacacacg uuccuugagc nn 42

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20胺基酸鏈接子

<400> 20

Gly Pro Ala Gly Gln Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Val
20

<210> 21
<211> 516
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 超IL-11 (IL-11RA:IL-11融合)

<400> 21

Met	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Val	Ala	Val	Ala	
1				5					10					15		
Thr	Ala	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Pro	Gln	Ala	Trp	Gly	Pro	
			20					25					30			
Pro	Gly	Val	Gln	Tyr	Gly	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Val	Lys	Leu	Cys	Cys	
		35					40					45				
Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Gly	Asp	Pro	Val	Ser	Trp	Phe	Arg	Asp	Gly	Glu	
	50					55				60						
Pro	Lys	Leu	Leu	Gln	Gly	Pro	Asp	Ser	Gly	Leu	Gly	His	Glu	Leu	Val	
65				70					75						80	
Leu	Ala	Gln	Ala	Asp	Ser	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Ile	Cys	Gln	Thr	
			85					90						95		
Leu	Asp	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Gln	Leu	Gly	Tyr	Pro	
		100						105					110			
Pro	Ala	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Tyr	Glu	Asn	Phe	
		115					120					125				
Ser	Cys	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Gln	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Thr	Arg	Tyr	
	130					135					140					
Leu	Thr	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Ser	Gln	Arg	
145				150						155					160	
Arg	Ser	Pro	Ser	Thr	Gly	Pro	Trp	Pro	Cys	Pro	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	
				165					170					175		
Ala	Ala	Arg	Cys	Val	Val	His	Gly	Ala	Glu	Phe	Trp	Ser	Gln	Tyr	Arg	
		180					185						190			
Ile	Asn	Val	Thr	Glu	Val	Asn	Pro	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Leu	Leu	

195

200

205

Asp Val Ser Leu Gln Ser Ile Leu Arg Pro Asp Pro Pro Gln Gly Leu
210 215 220

Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu Arg Ala Ser Trp
225 230 235 240

Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Pro Cys Gln Pro His Phe Leu Leu Lys Phe
245 250 255

Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp Ser Thr Val Glu
260 265 270

Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro
275 280 285

His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp
290 295 300

Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Pro Ala
305 310 315 320

Gly Gln Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
325 330 335

Ser Val Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro
340 345 350

Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala
355 360 365

Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp
370 375 380

Gly Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly
385 390 395 400

Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala
405 410 415

Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly
420 425 430

Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala
435 440 445

Arg Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu
450 455 460

Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro
465 470 475 480

Pro Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly
485 490 495

Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu
500 505 510

Lys Thr Arg Leu
515

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx203 VH

<400> 22

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Pro Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Leu Gly His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx203 VL

<400> 23

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

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

Gly Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 24
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx209 VH

<400> 24

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

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

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Leu Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx209 VL

<400> 25

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A VH

<400> 26

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ile Gly Ala Thr Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx108A VL

<400> 27

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

Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

202108606

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln His Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

40 45

Met Ile Phe Asp Val Asn Glu Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Arg
85 90 95

Tyr Thr Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210>	28
<211>	445
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> Enx108A hIgG4 (L248E, S241P) HC

<400> 28

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

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

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

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

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

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

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

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

<210> 29
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A λ LC

<400> 29

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

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

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

Met Ile Phe Asp Val Asn Glu Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Arg
85 90 95

Tyr Thr Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180185190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195200205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210215

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx203 VH

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
202530

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
354045

Gly Asp Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Pro Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
505560

Thr Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65707580

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg Gly Glu Leu Gly His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100105110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx203 VL

<400> 31

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

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Glu Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

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

<210> 32
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx209 VH

<400> 32

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Leu Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx209 VL

<400> 33

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A VH CDR1

<400> 34

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A VH CDR2

<400> 35

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A VH CDR3

<400> 36

Ile Gly Ala Thr Asp Pro Leu Asp Tyr
1 5

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A VL CDR1

<400> 37

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx108A VL CDR2

<400> 38

Asp Val Asn Glu Arg Ser Ser
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> Enx108A VL CDR3

<400> 39

Ala Ser Tyr Ala Gly Arg Tyr Thr Trp Met
1 5 10

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx203, hEnx203 VH CDR1

<400> 40

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx203, hEnx203 VH CDR2

<400> 41

Asp Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Pro Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx203, hEnx203 VH CDR3

<400> 42

Gly Glu Leu Gly His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx203, hEnx203 VL CDR1

<400> 43

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

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx203, hEnx203 VL CDR2

<400> 44

Leu Ala Ser Asn Leu Asp Ser
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Enx203, hEnx203 VL CDR3

<400> 45

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 46
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx209, hEnx209 VH CDR1

<400> 46

Asn Tyr Trp Met His
1 5

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx209, hEnx209 VH CDR2

<400> 47

Asn Ile Gly Pro Ser Asp Ser Lys Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx209, hEnx209 VH CDR3

<400> 48

Gly Asp Tyr Val Leu Phe Thr Tyr
1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx209, hEnx209 VL CDR1

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx209, hEnx209 VL CDR2

<400> 50

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Enx209, hEnx209 VL CDR3

<400> 51

Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 52

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人IGHG1恆定(K214R, D356E, L358M)

<400> 52

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 53
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人IGHG4恒定(L248E, S241P)

<400> 53

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 54
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人IGKC恒定

<400> 54

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人IGLC2恒定

<400> 55

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 56
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx203 hIgG1 HC

<400> 56

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

Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	
			20					25						30		
Asn	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	His	Asn	Gly	Gly	Pro	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Thr	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Glu	Leu	Gly	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		115					120					125				
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
	130					135					140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
			165					170						175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
			180					185					190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	

210				215				220							
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225				230				235				240			
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245				250				255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260				265				270			
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
275								280				285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
290								295				300			
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305				310				315				320			
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325				330				335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				340				345				350			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
355								360				365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
370								375				380			
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385				390				395				400			
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				405				410				415			

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

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

Lys

<210> 57
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx203 κ LC

<400> 57

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

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Glu Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

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

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

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

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

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

<210> 58
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx209 hIgG4 (L248E, S241P) HC

<400> 58

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

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

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

Gly	Asn	Ile	Gly	Pro	Ser	Asp	Ser	Lys	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50						55					60				
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Val	Leu	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100						105					110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
		115						120					125		
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
	130						135				140				
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180						185				190		
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn
		195					200					205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro
	210					215					220				
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
225					230					235					240
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val

245250255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260265270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275280285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290295300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305310315320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325330335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340345350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355360365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370375380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385390395400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405410415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420425430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435440

<210> 59
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hEnx209 κ LC

<400> 59

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑，其係供用於一治療或預防一代謝性疾病的方法。

【請求項2】 一種能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑於製造一藥劑的用途，該藥劑係供用於一治療或預防一代謝性疾病的方法。

【請求項3】 一種治療或預防一代謝性疾病的方法，其包含投予一治療或預防有效量的一能抑制介白素11(IL-11)媒介的訊息傳導之製劑給一個體。

【請求項4】 如請求項1之供用的製劑、如請求項2之用途、或如請求項3之方法，其中該代謝性疾病為或包含肥胖、第二型糖尿病(T2D)、第一型糖尿病(T1D)、糖尿病前期(pre-diabetes)、超重、代謝症候群、懷孕相關高血糖症、膽汁鬱積性肝病、高血糖症、高脂質血症、高三酸甘油脂血症、高膽固醇血症、消耗(wasting)、惡病質、化療關連的體重減輕、胰臟功能不全、胰臟炎、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、脂肪變性、脂肪毒性(lipotoxicity)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪變性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、脂質失養症、脂肥大、脂肪萎縮、胰島素抗性或高升糖素血症。

【請求項5】 如請求項1或請求項4之供用的製劑、如請求項2或請求項4之用途、或如請求項3或請求項4之方法，其中該製劑為一能預防或降低介白素11(IL-11)與介白素11之一受體(IL-11R)的結合之製劑。

【請求項6】 如請求項1、4或5中任一項之供用的製劑、如請求項2、4或5中任一項之用途、或如請求項3至5中任一項之方法，其中該製劑能結合介白素11(IL-11)或介白素11之一受體(IL-11R)。

【請求項7】 如請求項1或4至6中任一項之供用的製劑、如請求項2、或4至6中任一項之用途、或如請求項3至6中任一項之方法，其中該製劑係選自於下列

所組成的群組：一抗體或其之一抗原結合片段、一多肽、一胜肽、一核酸、一寡核苷酸、一適配體或一小分子。

【請求項8】 如請求項6或請求項7之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係一抗體或其之一抗原結合片段。

【請求項9】 如請求項8之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係IL-11媒介的訊息傳導之一抗IL-11抗體拮抗劑、或其之一抗原結合片段。

【請求項10】 如請求項8之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係IL-11媒介的訊息傳導之一抗IL-11R α 抗體拮抗劑、或其之一抗原結合片段。

【請求項11】 如請求項6或請求項7之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係一誘餌受體。

【請求項12】 如請求項11之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係IL-11之一誘餌受體。

【請求項13】 如請求項12之供用的製劑、用途或方法，其中該IL-11之誘餌受體包含：(i)一對應於gp130的細胞介素結合模組之胺基酸序列及(ii)一對應於IL-11R α 的細胞介素結合模組之胺基酸序列。

【請求項14】 如請求項6或請求項7之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係一IL-11突變蛋白(mutein)。

【請求項15】 如請求項14之供用的製劑、用途或方法，其中該IL-11突變蛋白係W147A。

【請求項16】 如請求項1或請求項4之供用的製劑、如請求項2或請求項4之用途、或如請求項3或請求項4之方法，其中該製劑能預防或降低介白素11(IL-11)或介白素11之一受體(IL-11R)的表現。

【請求項17】 如請求項16之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係一寡核苷酸或一小分子。

【請求項18】如請求項17之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係一能預防或降低IL-11的表現之反義寡核苷酸。

【請求項19】如請求項18之供用的製劑、用途或方法，其中該能預防或降低IL-11的表現之反義寡核苷酸係靶向IL11的siRNA，其包含SEQ ID NO:12、13、14或15的序列。

【請求項20】如請求項17之供用的製劑、用途或方法，其中該製劑係一能預防或降低IL-11R α 的表現之反義寡核苷酸。

【請求項21】如請求項20之供用的製劑、用途或方法，其中該能預防或降低IL-11R α 的表現之反義寡核苷酸係靶向*IL11RA*的siRNA，其包含SEQ ID NO:16、17、18或19的序列。

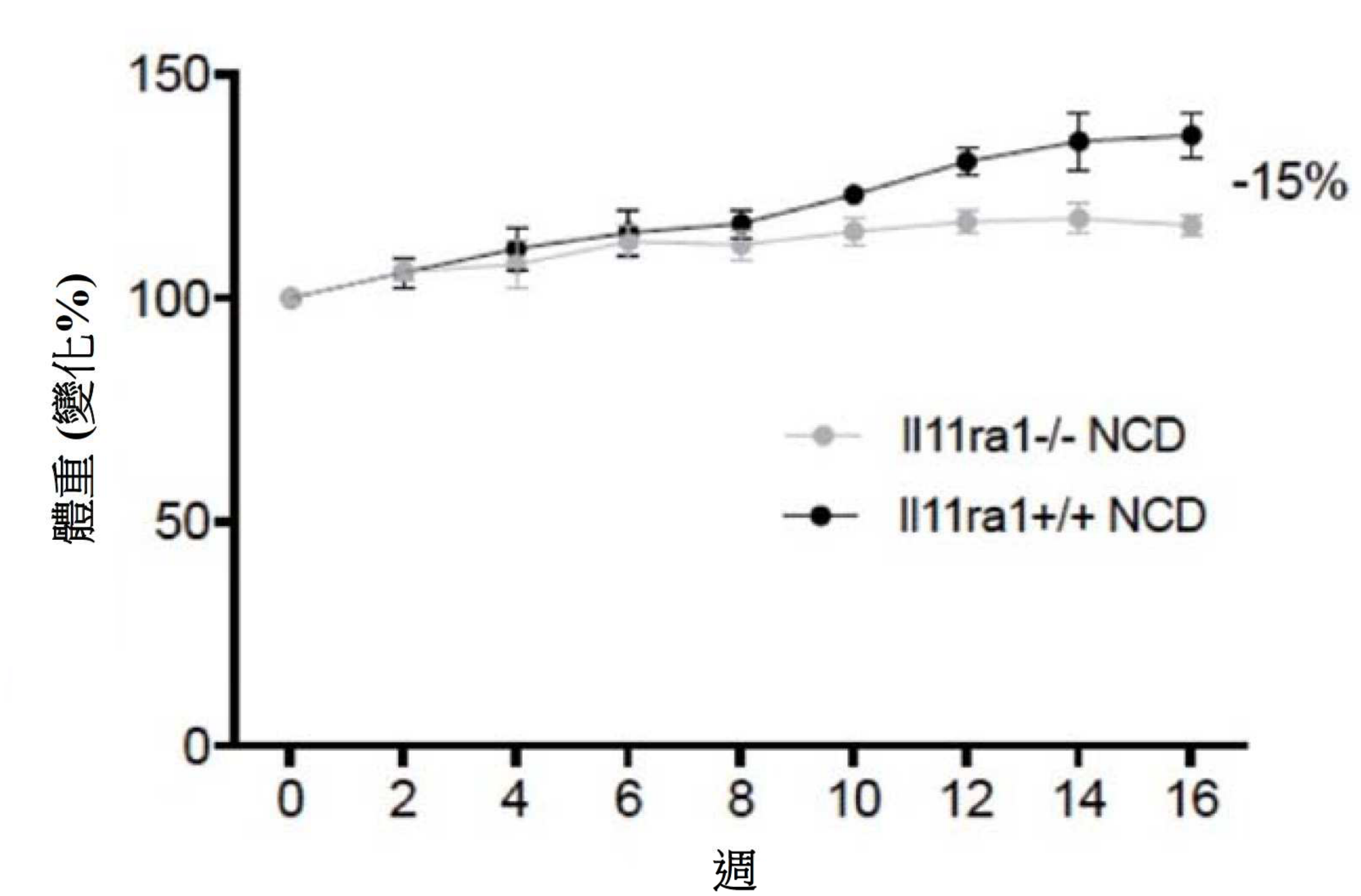
【請求項22】如請求項5至21中任一項之供用的製劑、用途或方法，其中該介白素11受體係或包含IL-11R α 。

【請求項23】如請求項1或4至22中任一項之供用的製劑、如請求項2或4至22中任一項之用途、或如請求項3至22中任一項之方法，其中該方法包含投予該製劑給介白素11(IL-11)或IL-11之一受體(IL-11R)的表現向上調節的一個體。

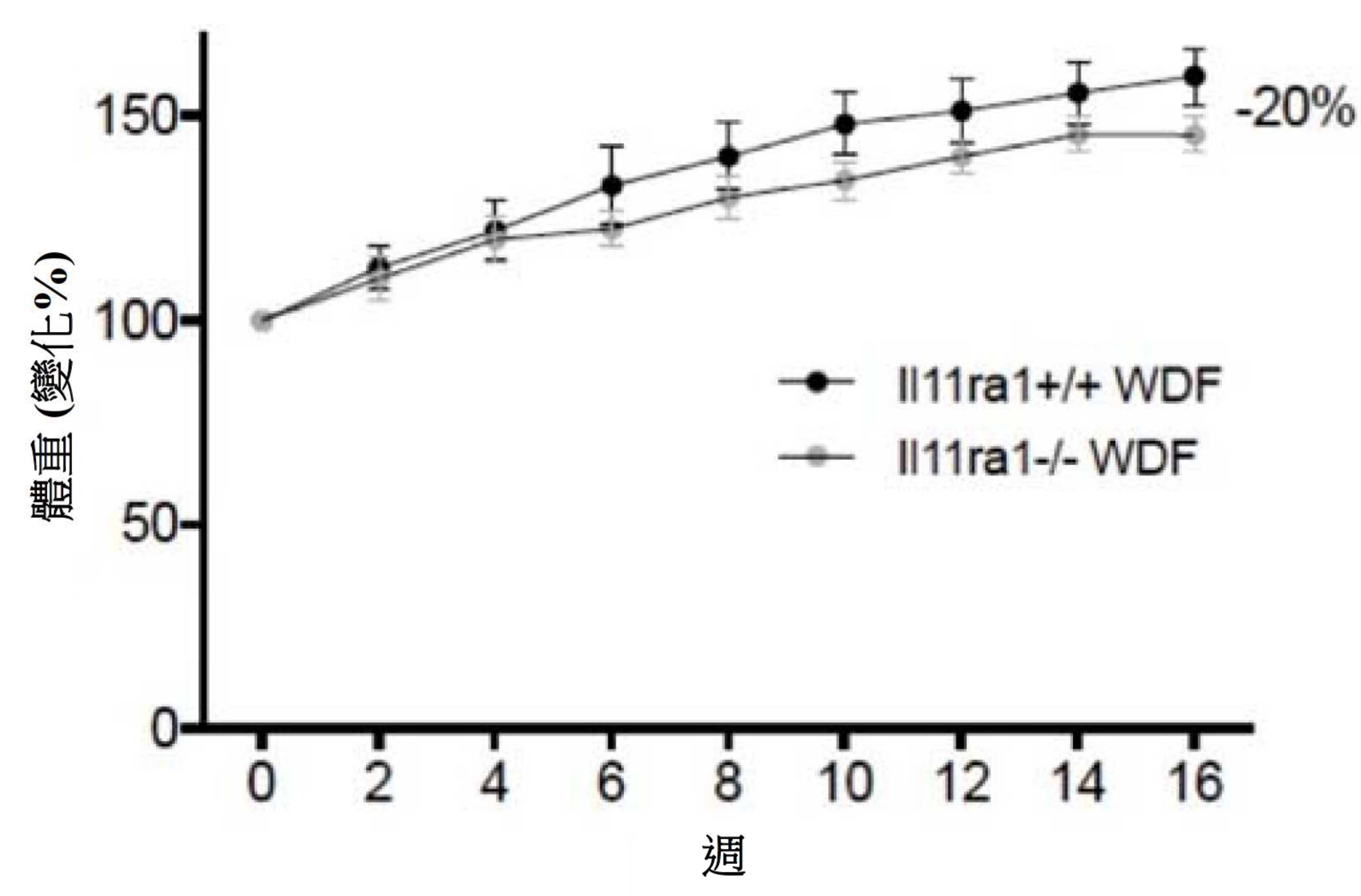
【請求項24】如請求項1或4至23中任一項之供用的製劑、如請求項2或4至23中任一項之用途、或如請求項3至23中任一項之方法，其中該方法包含投予該製劑給介白素11(IL-11)或介白素11之一受體(IL-11R)的表現已經判定為向上調節的一個體。

【請求項25】如請求項1或4至24中任一項之供用的製劑、如請求項2或4至24中任一項之用途、或如請求項3至24中任一項之方法，其中該方法包含判定個體中的介白素11(IL-11)或IL-11之一受體(IL-11R)的表現是否是向上調節的且投予該製劑給介白素11(IL-11)或IL-11之一受體(IL-11R)的表現是向上調節的一個體。

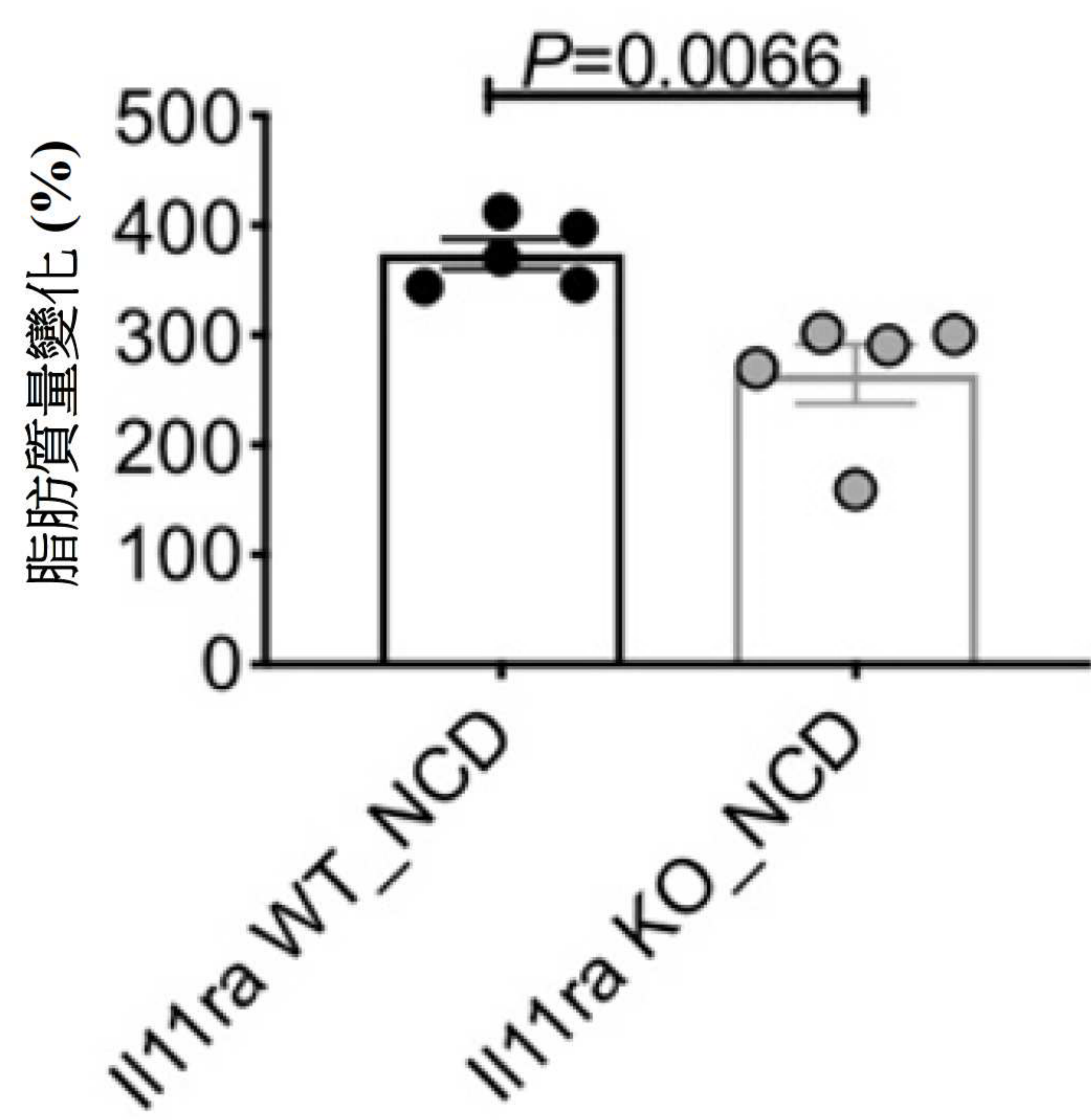
【發明圖式】



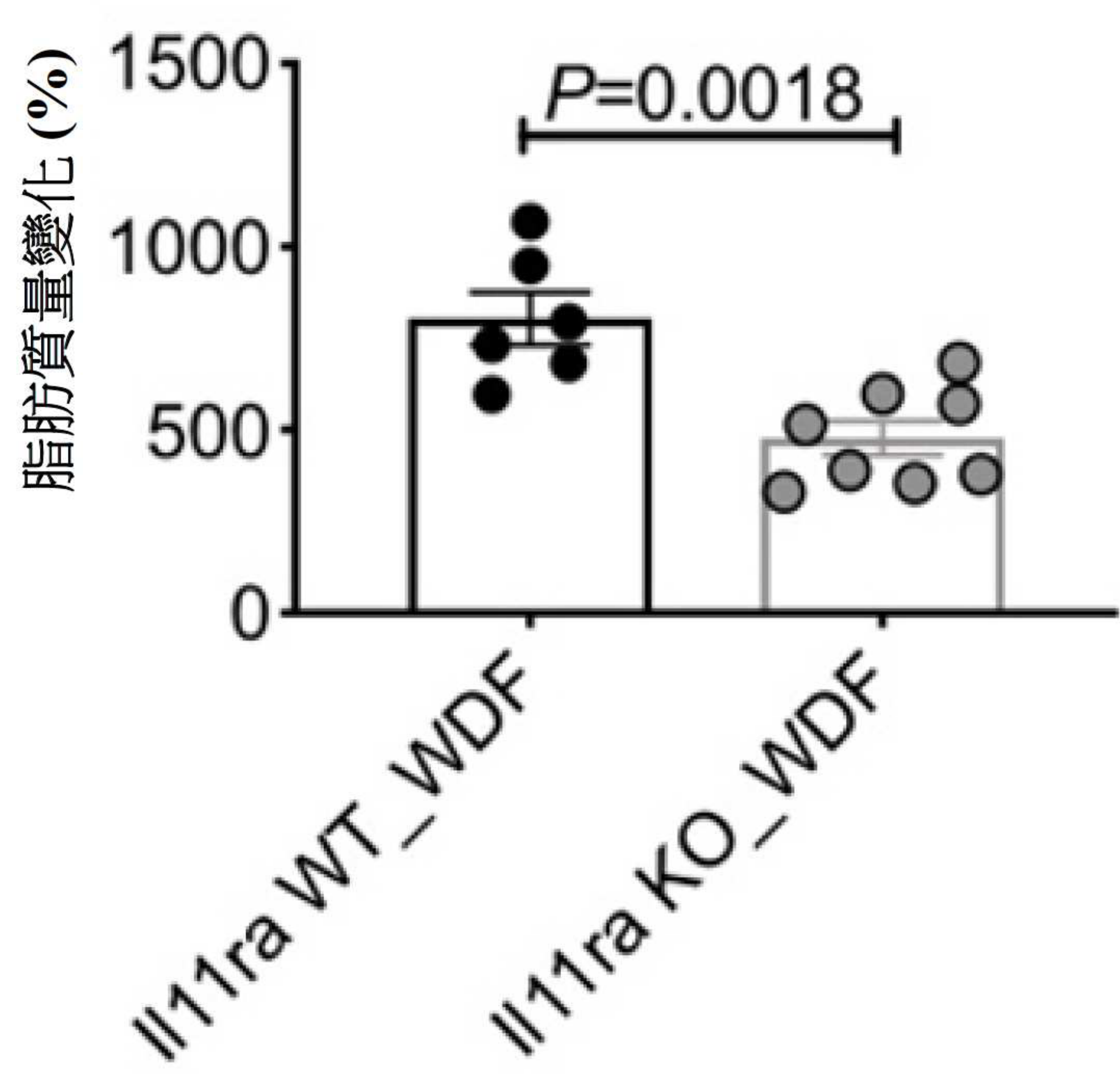
【圖1A】



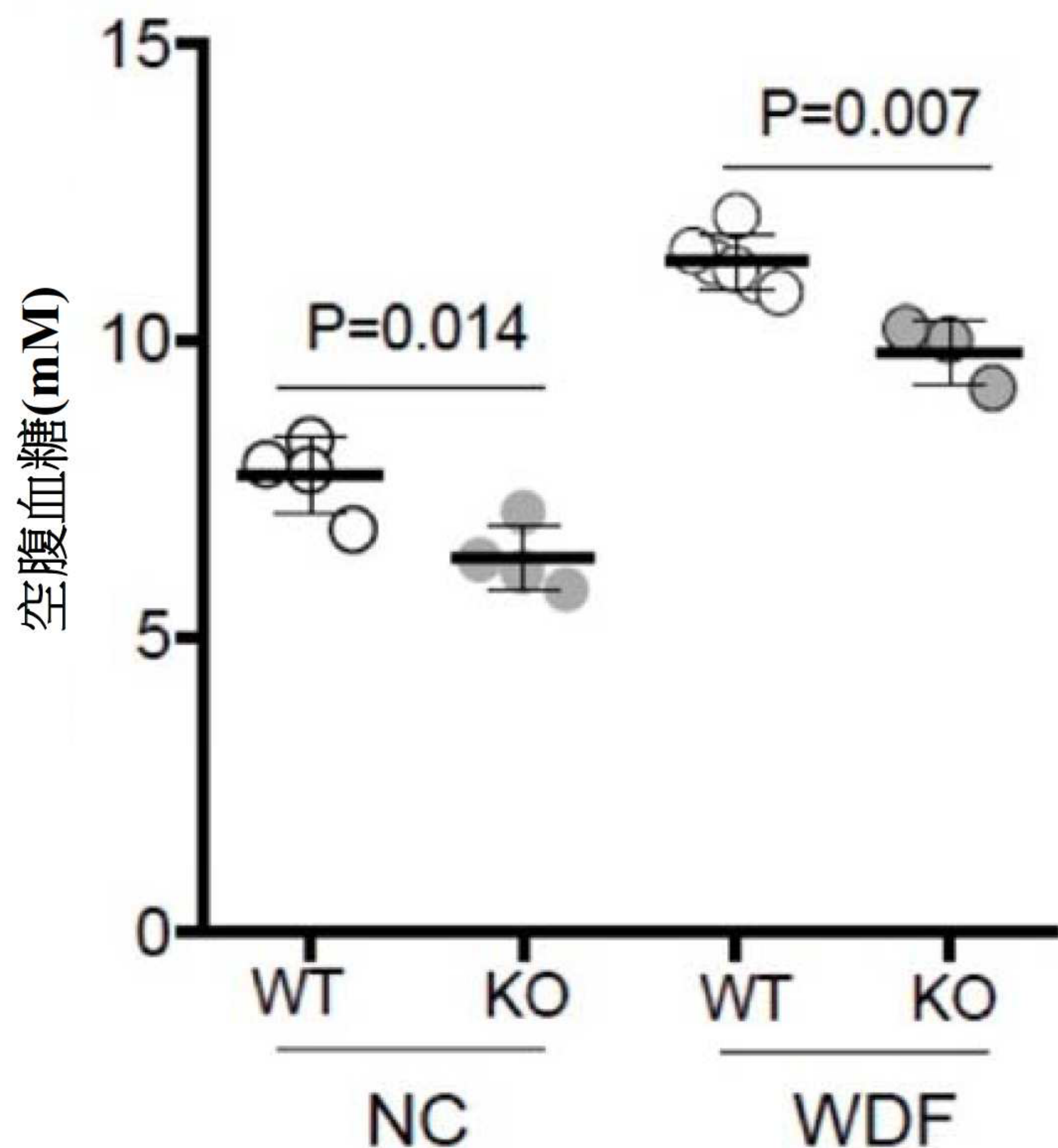
【圖1B】



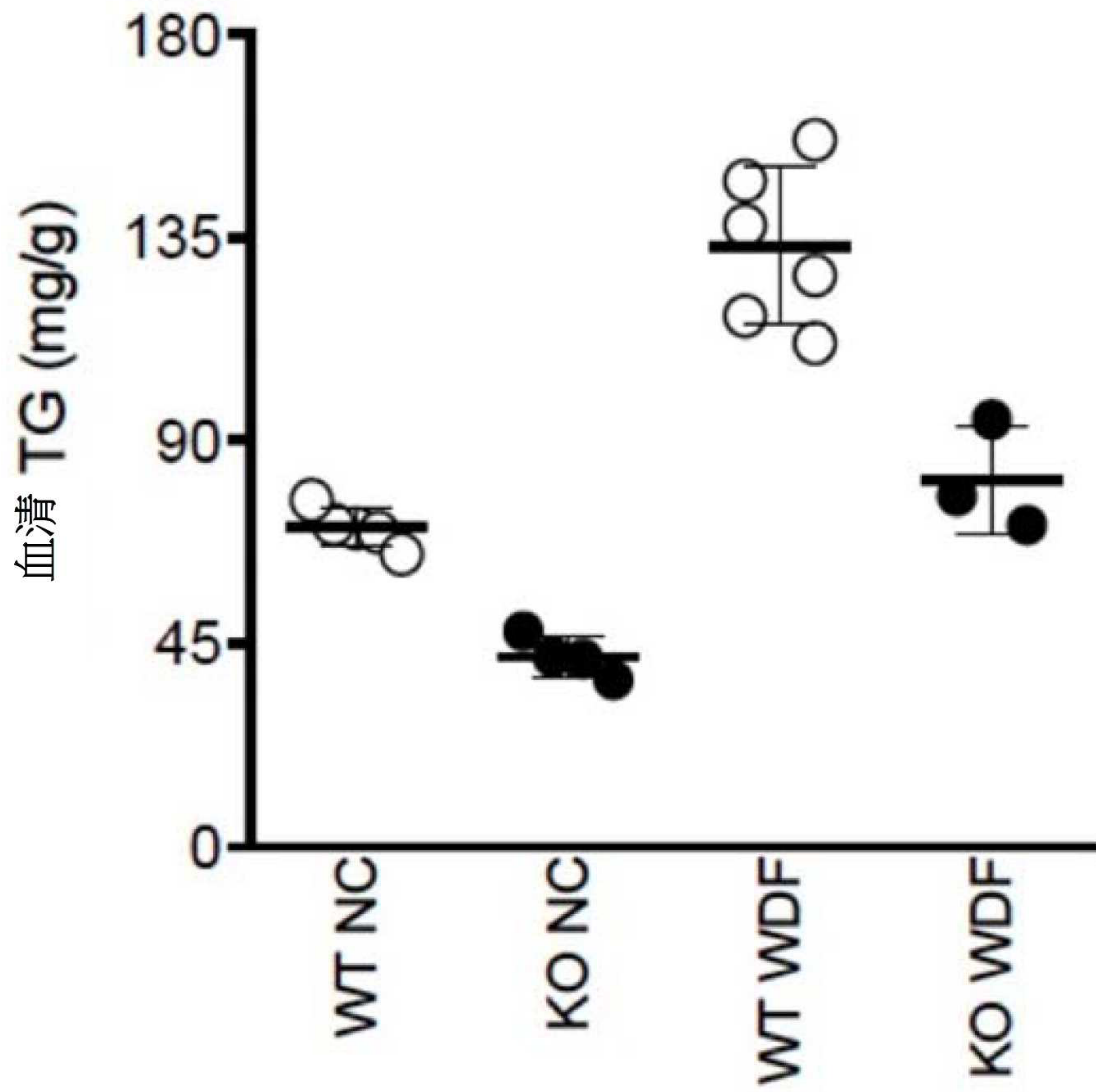
【圖2A】



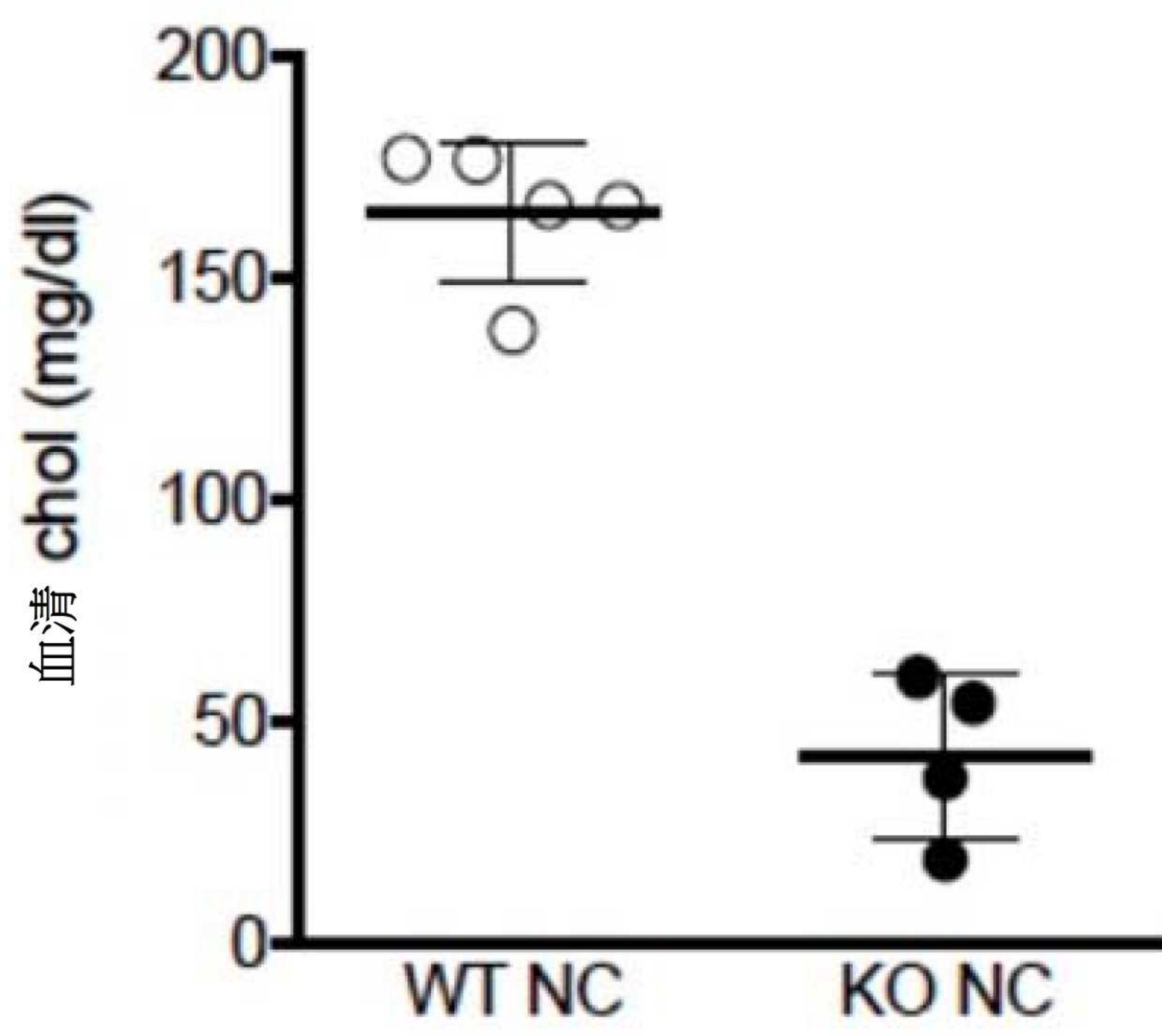
【圖2B】



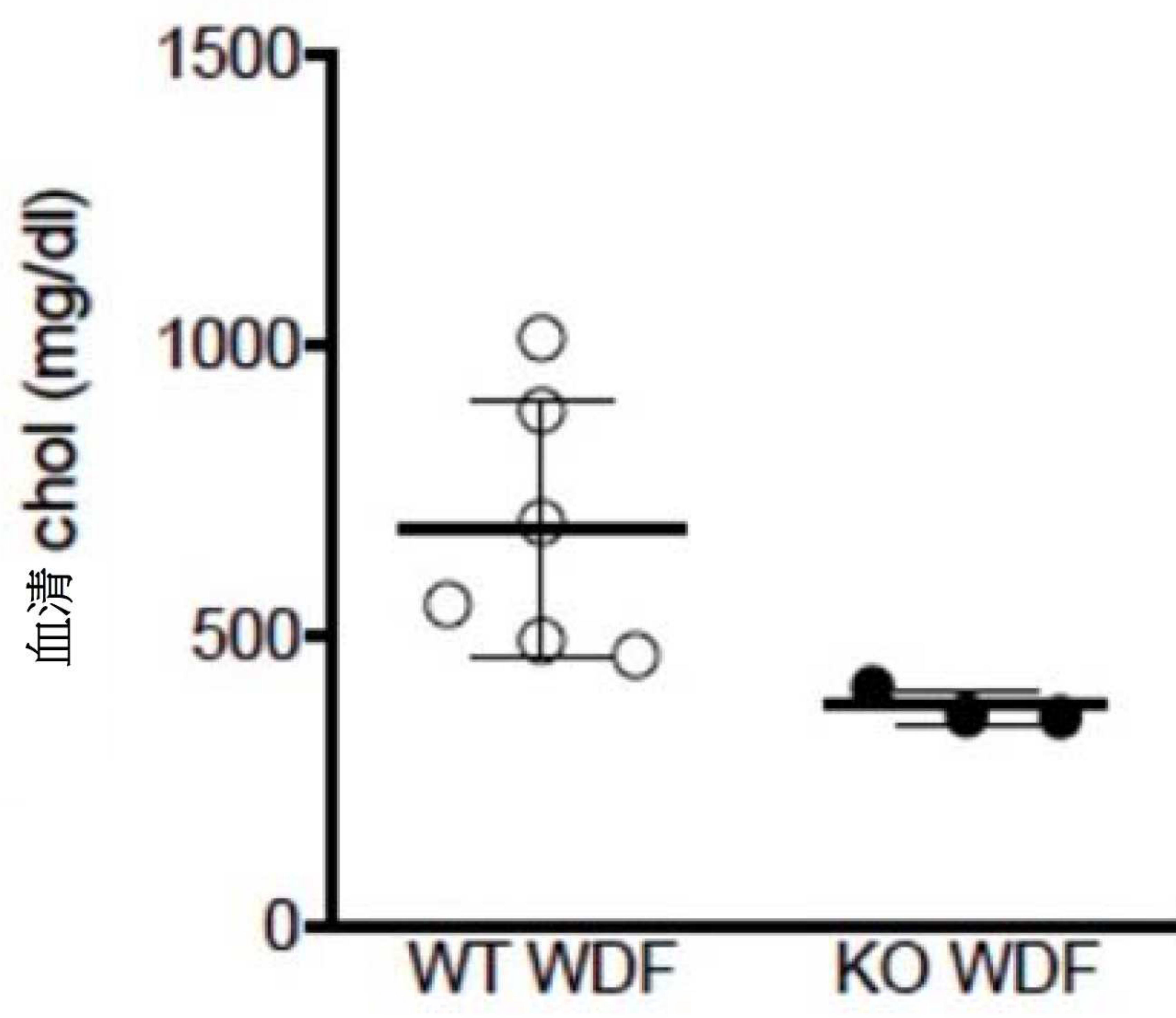
【圖3】



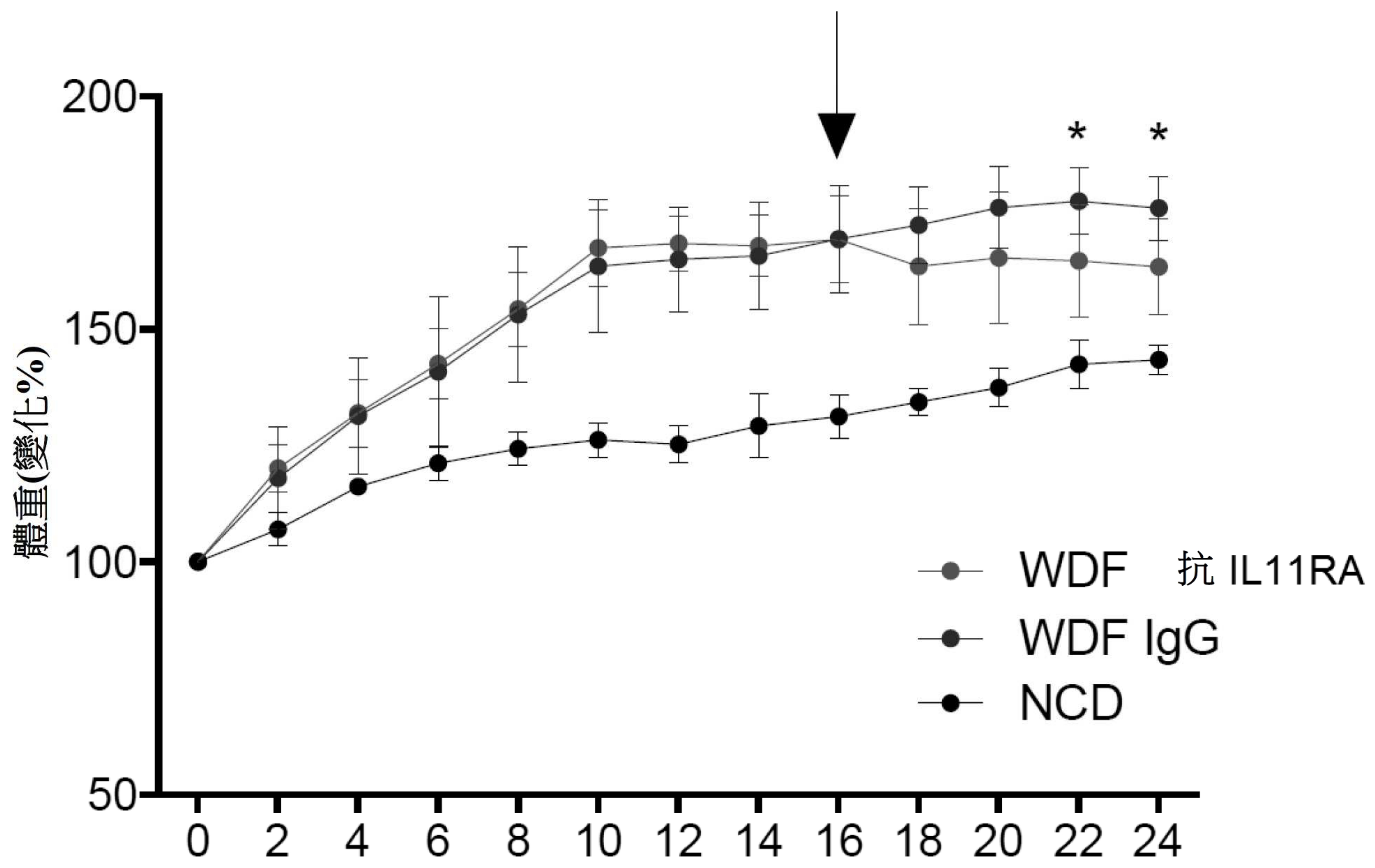
【圖4】



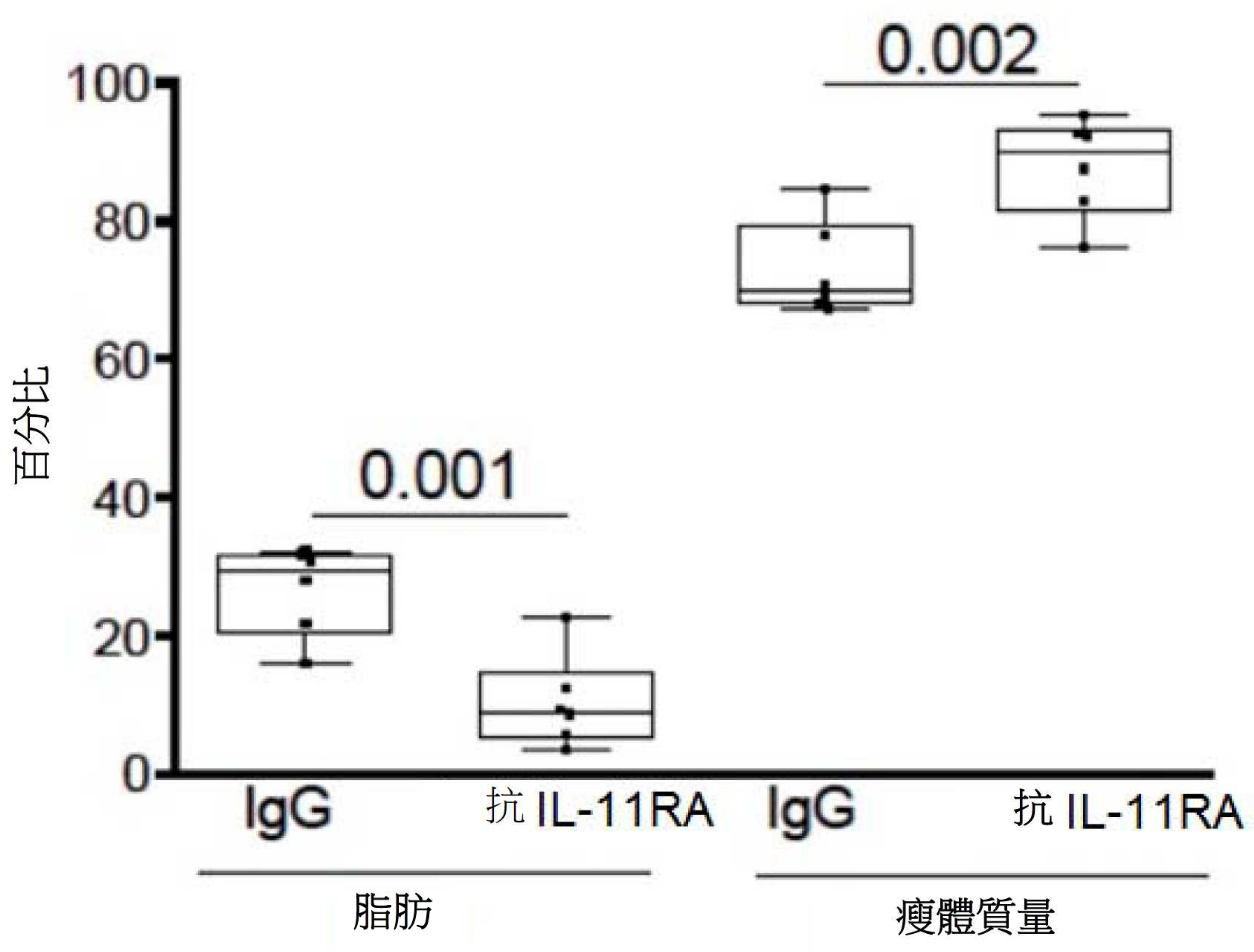
【圖5A】



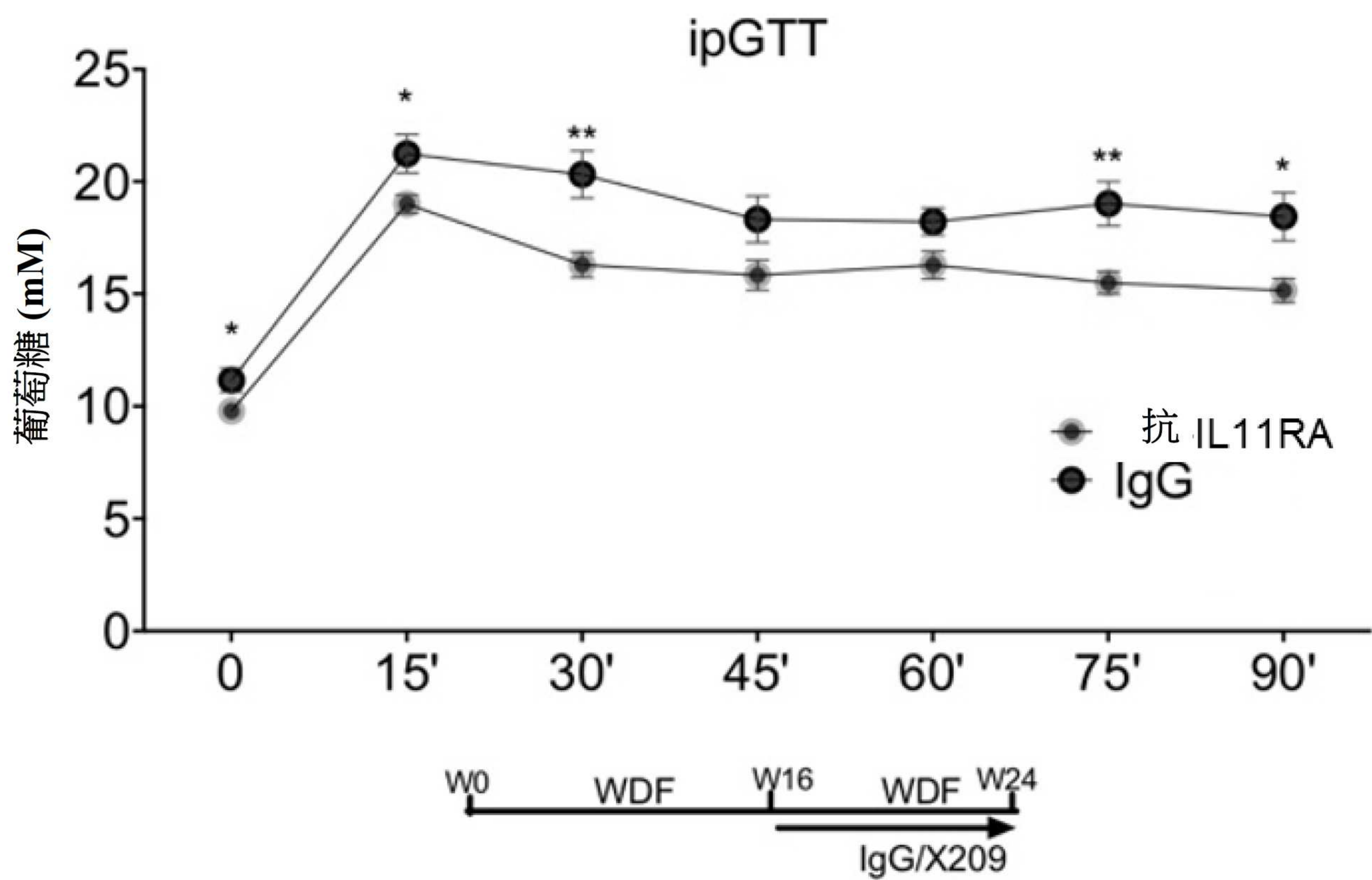
【圖5B】



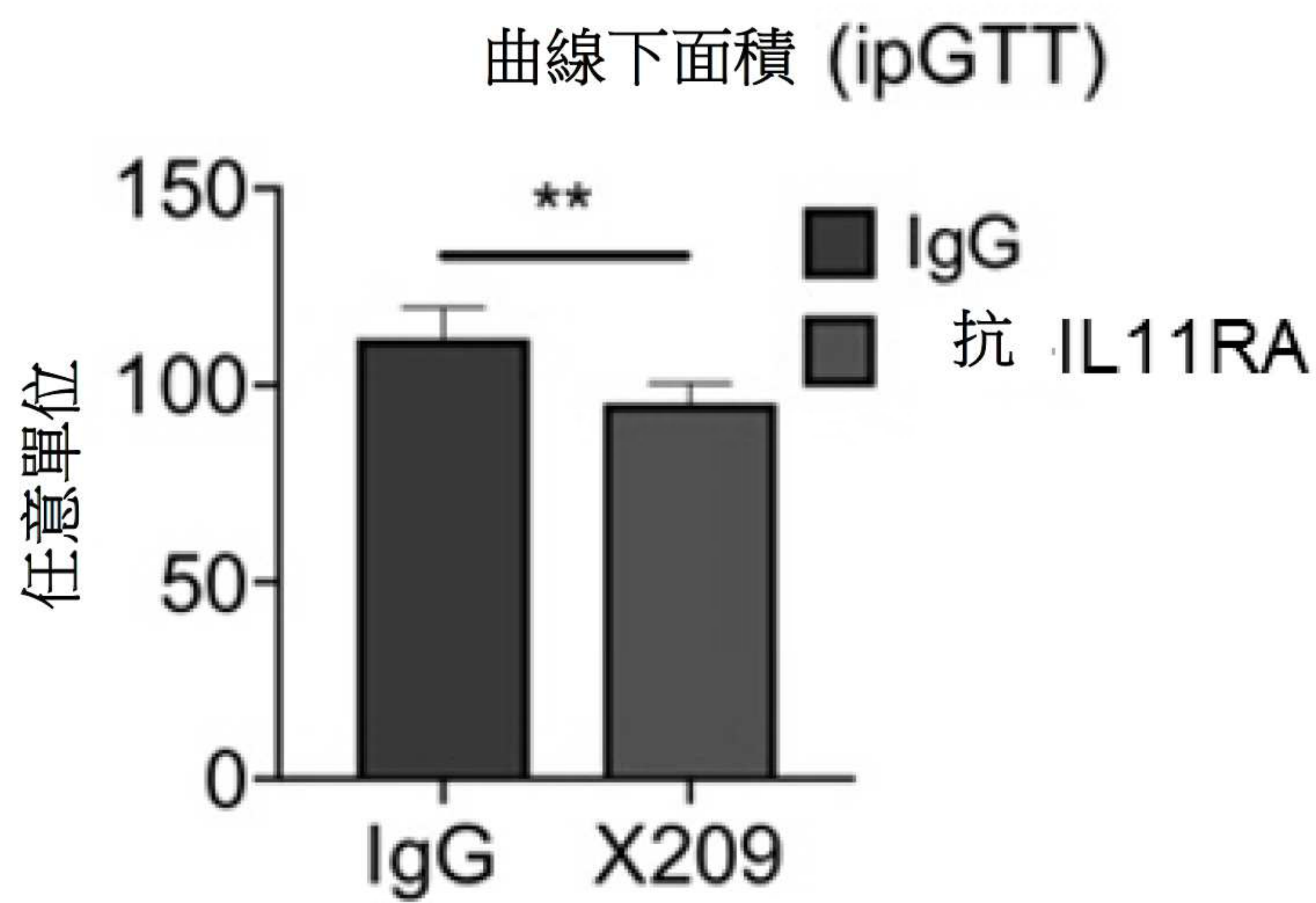
【圖6A】



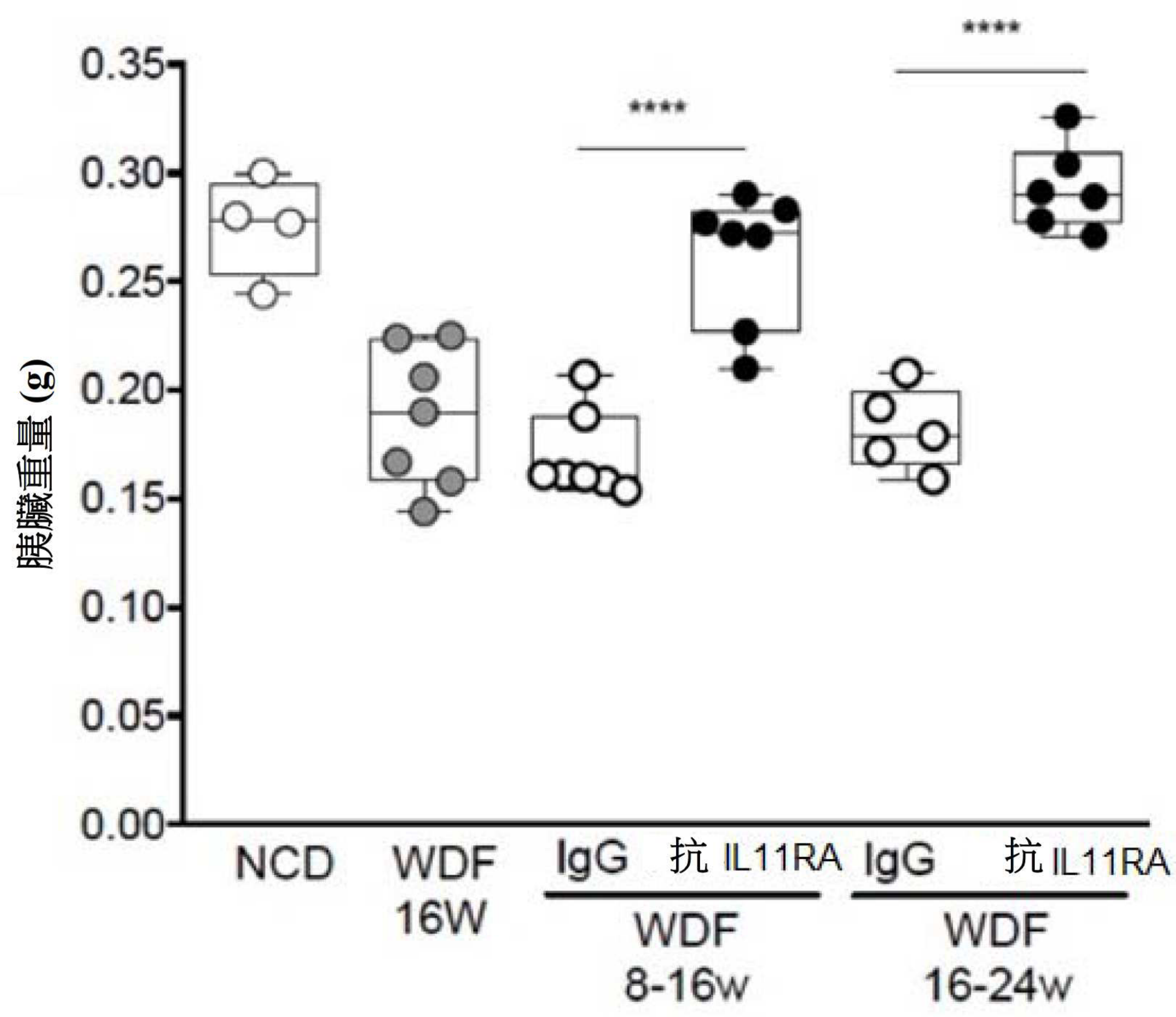
【圖6B】



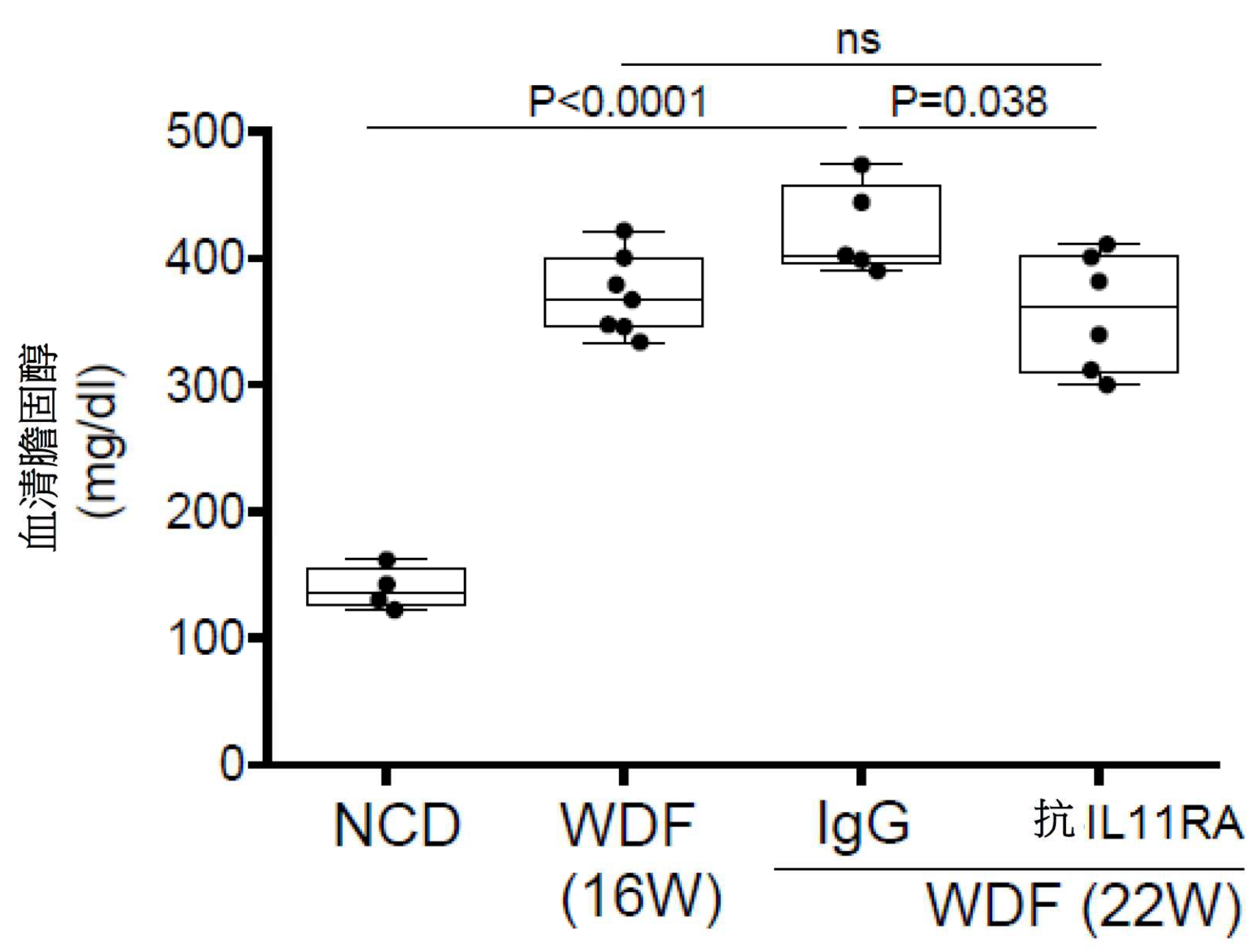
【圖7A】



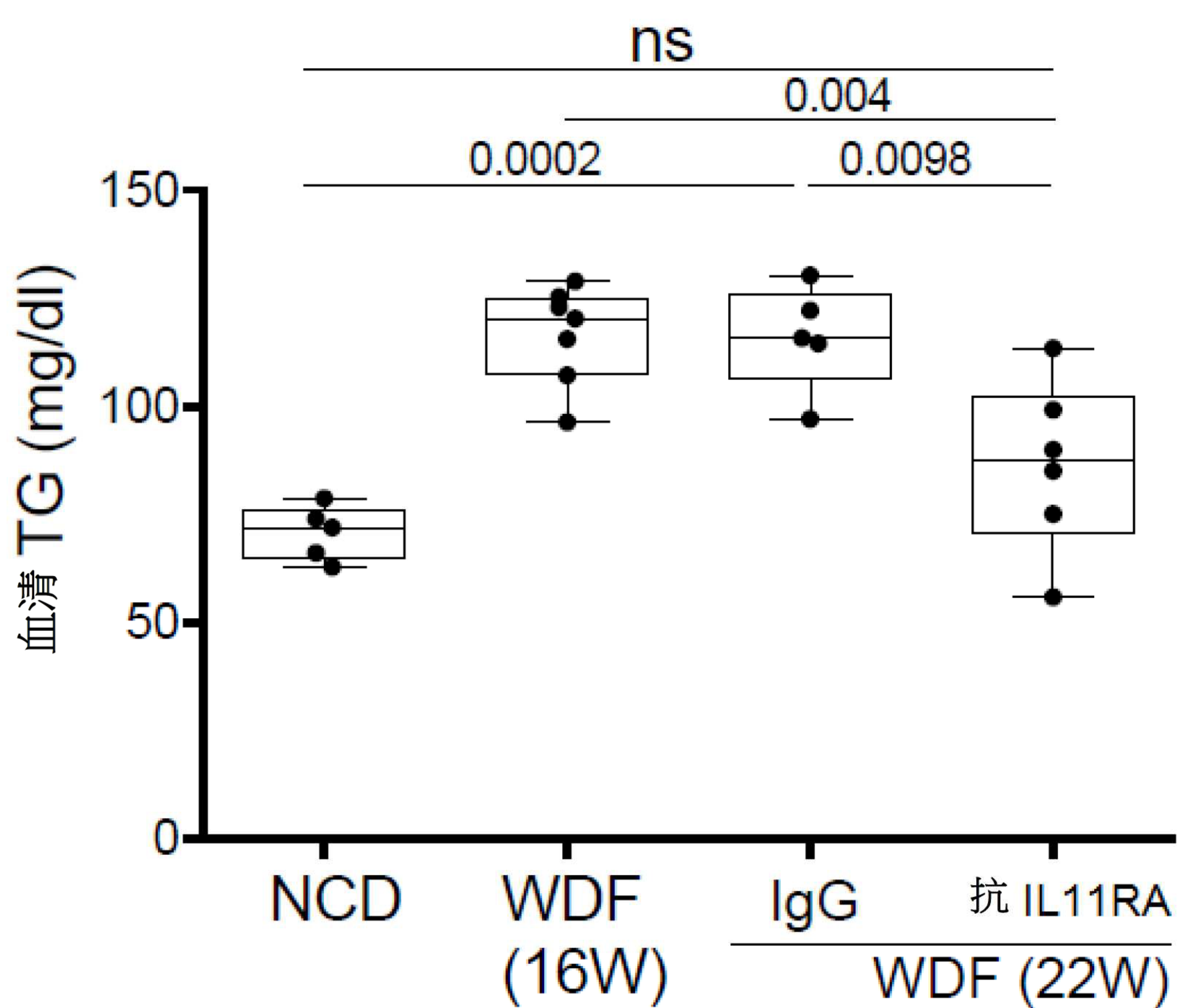
【圖7B】



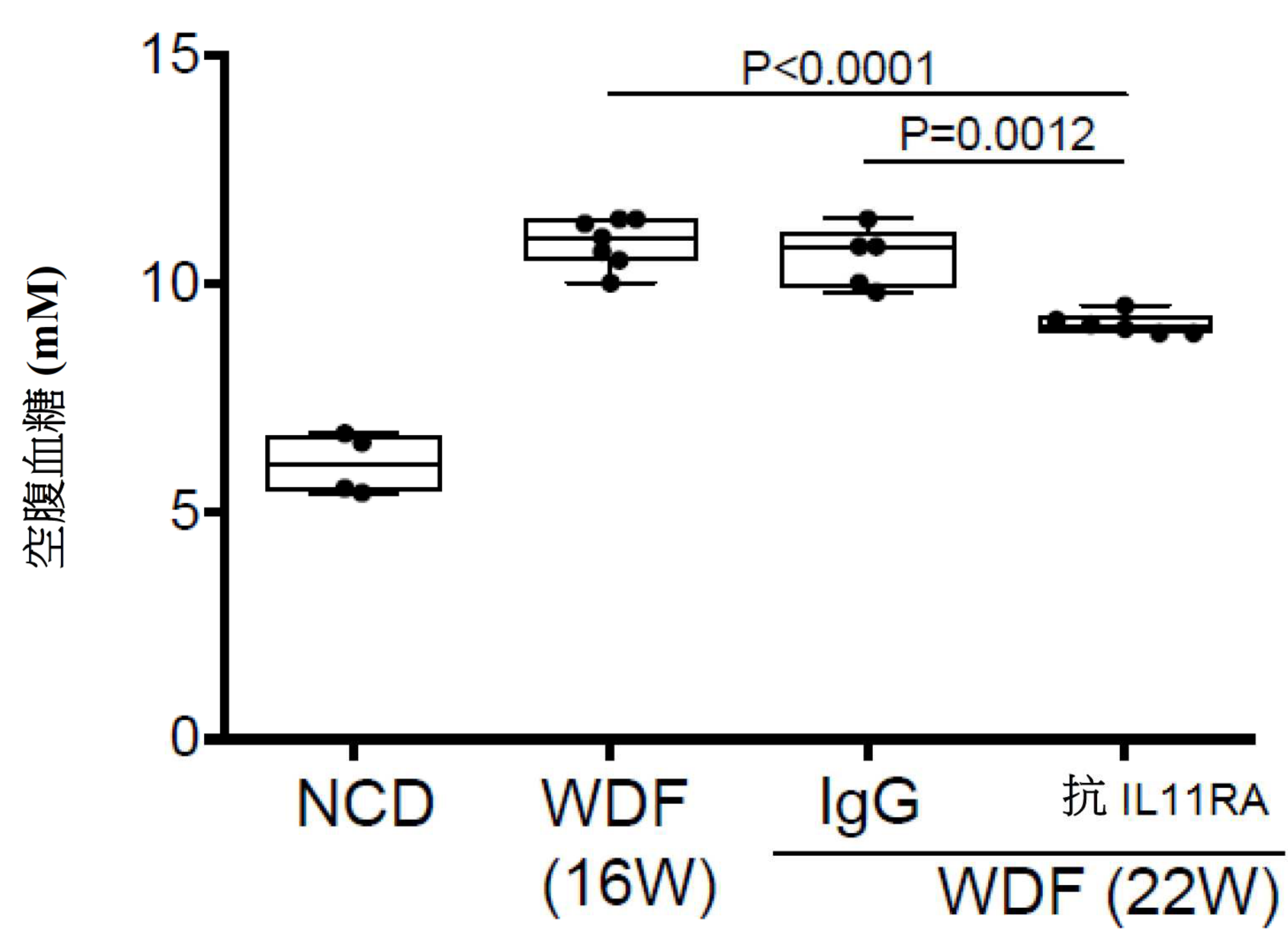
【圖8】



【圖9A】

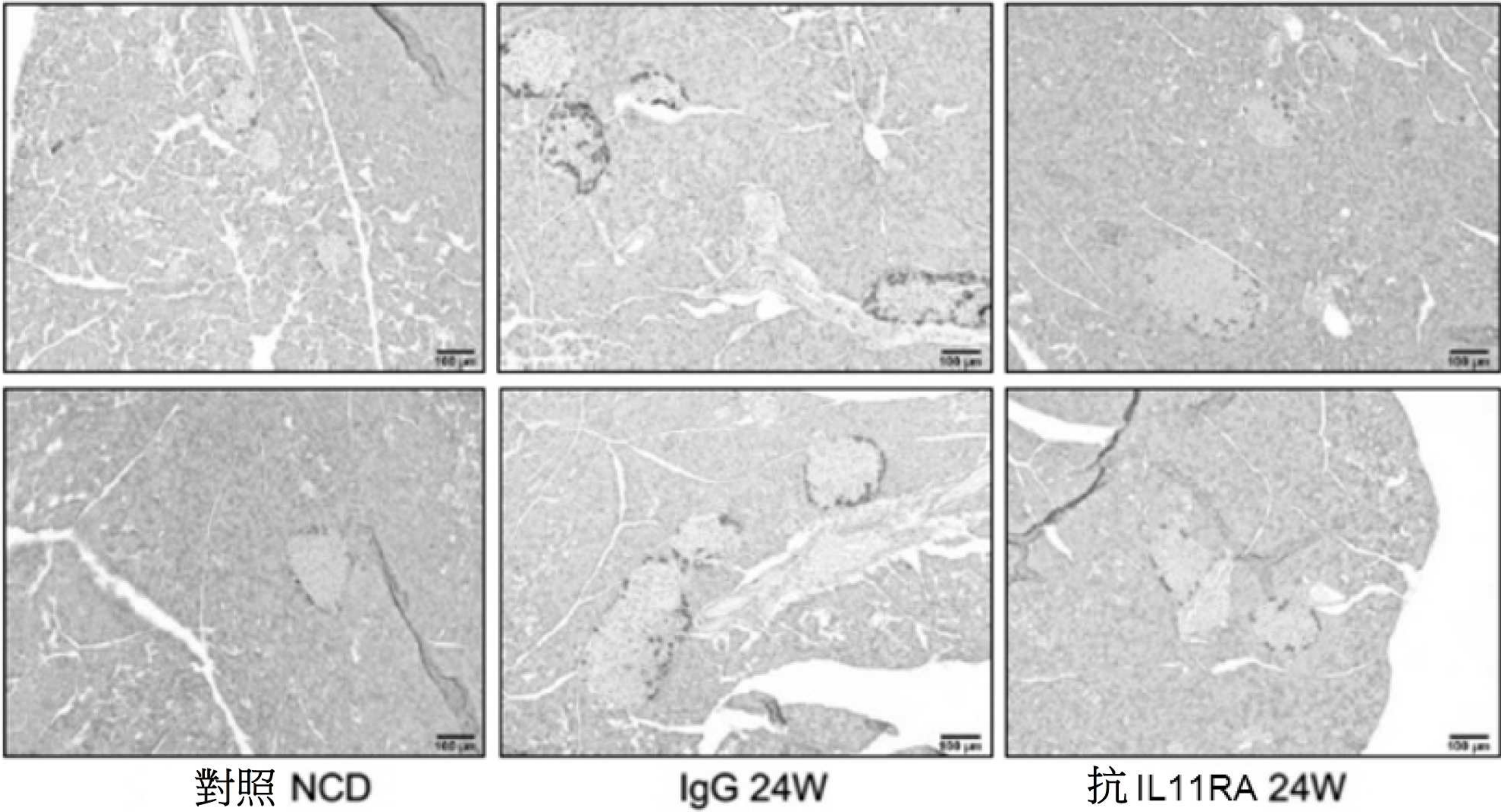


【圖9B】



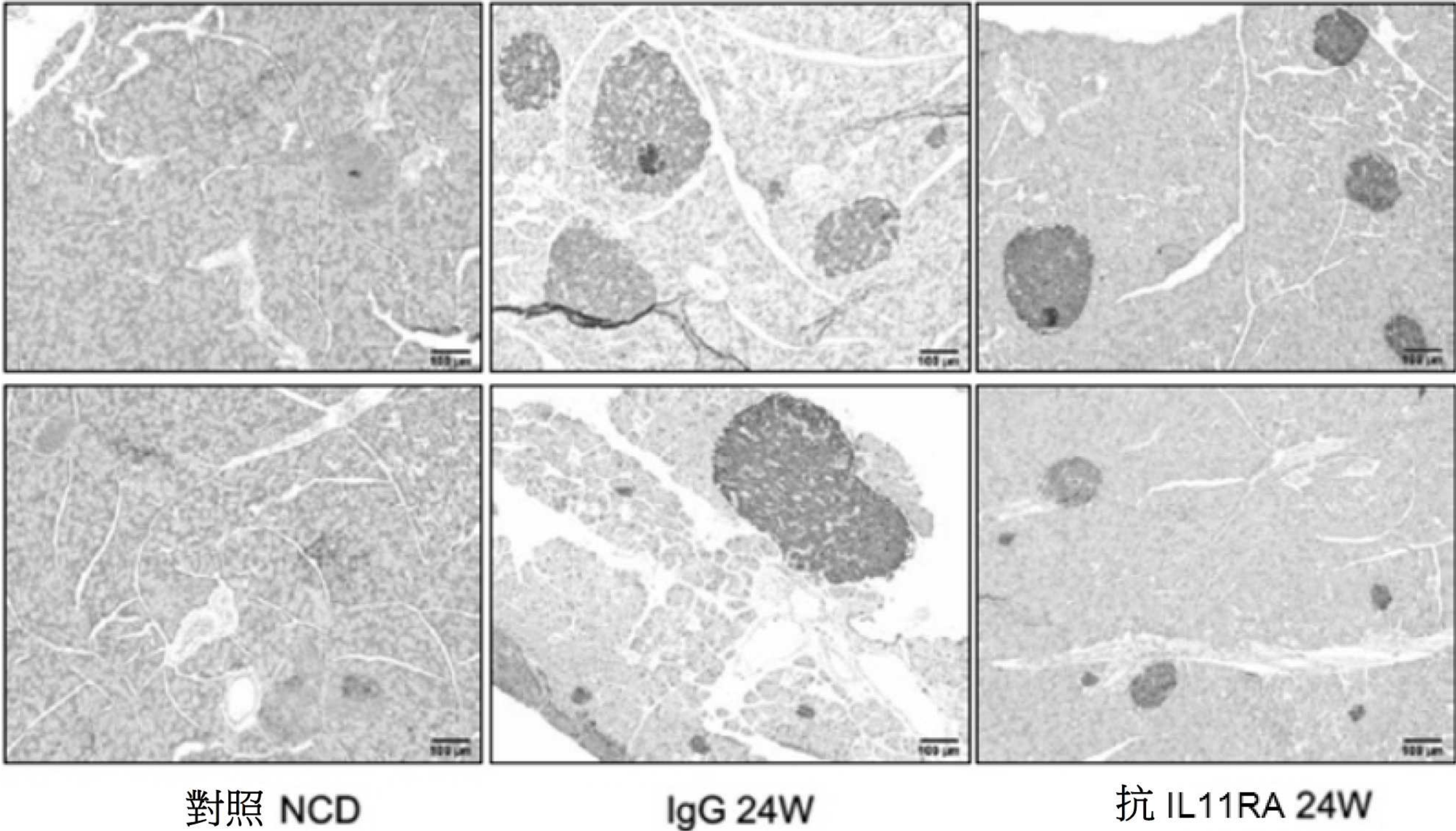
【圖9C】

升糖素

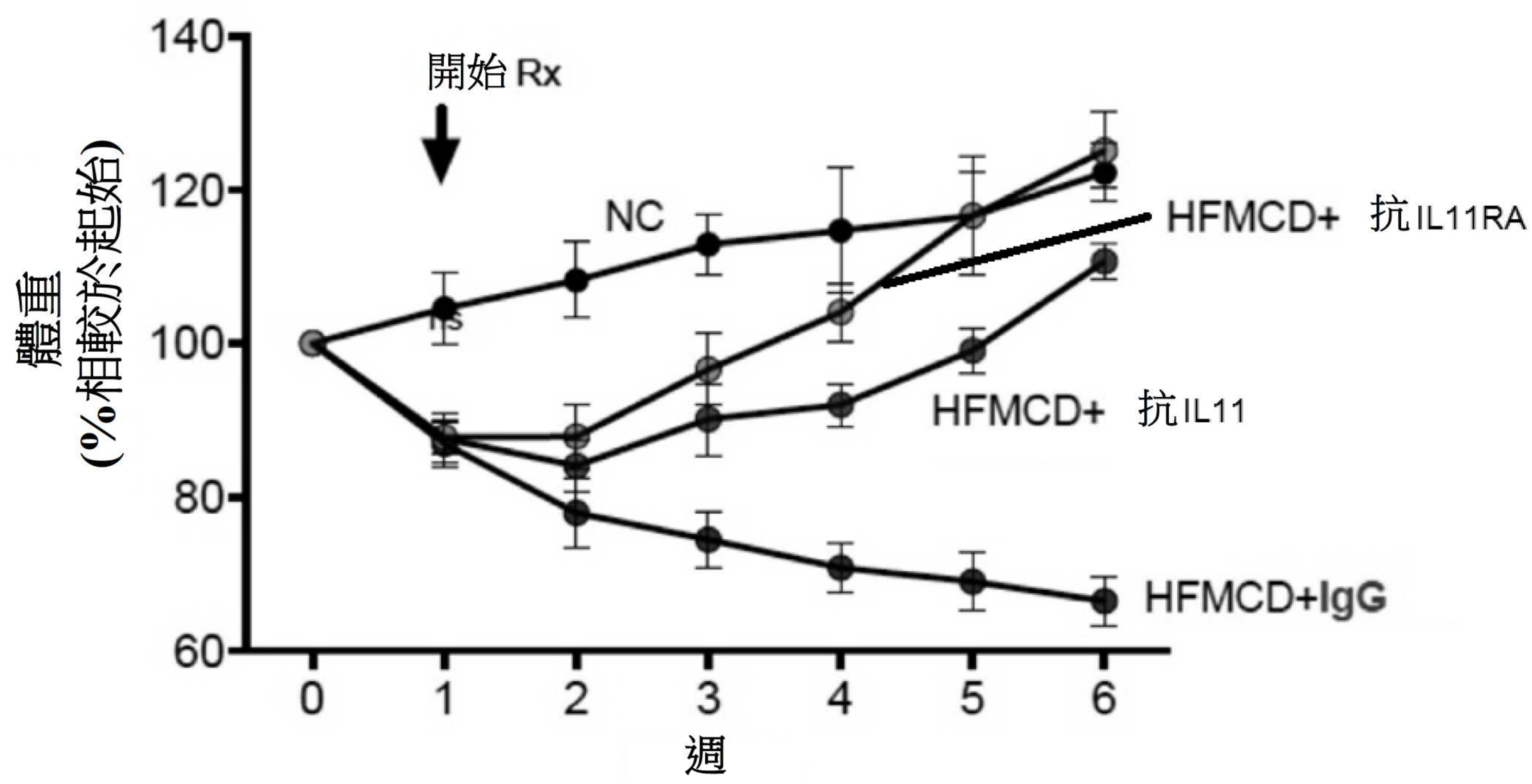


【圖10A】

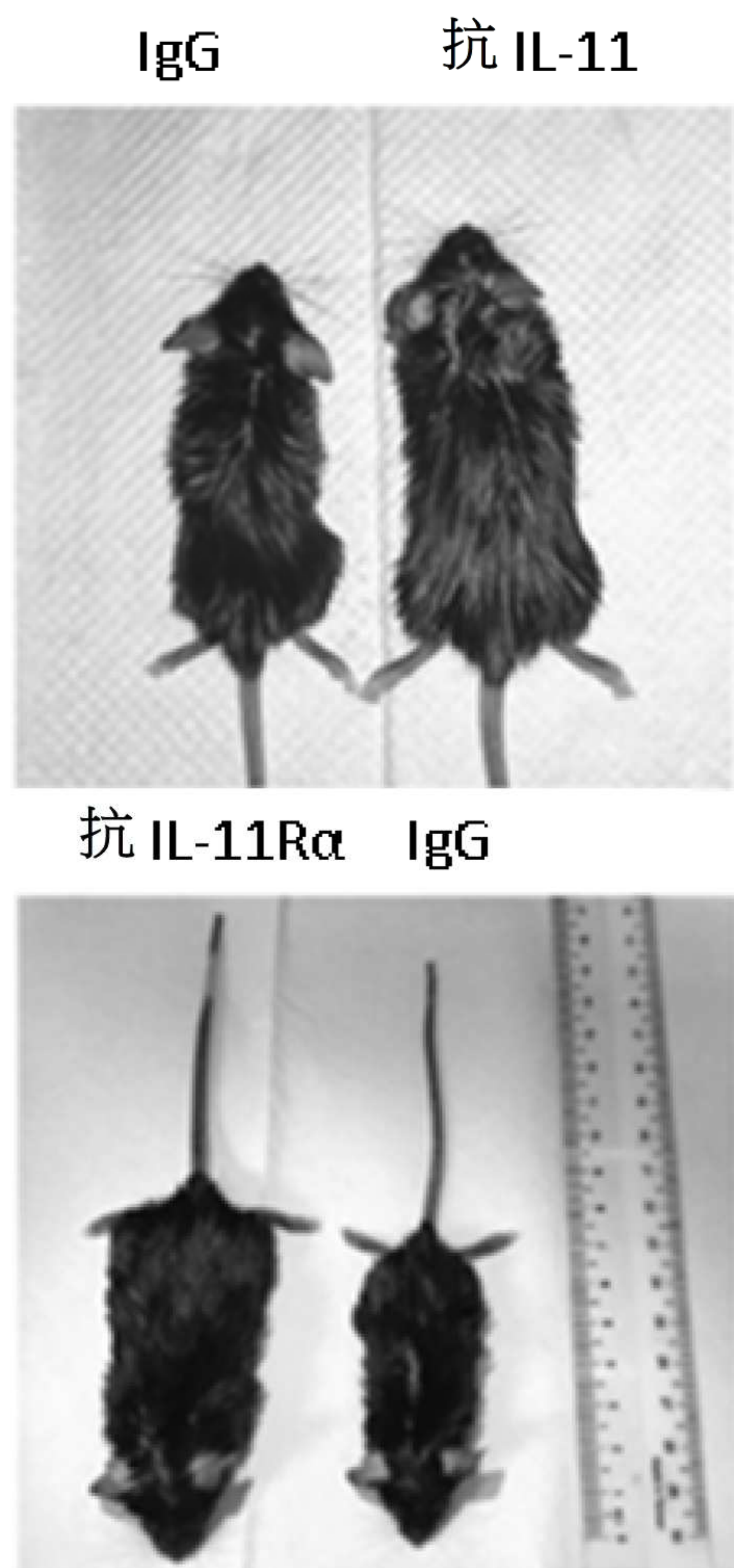
胰島素



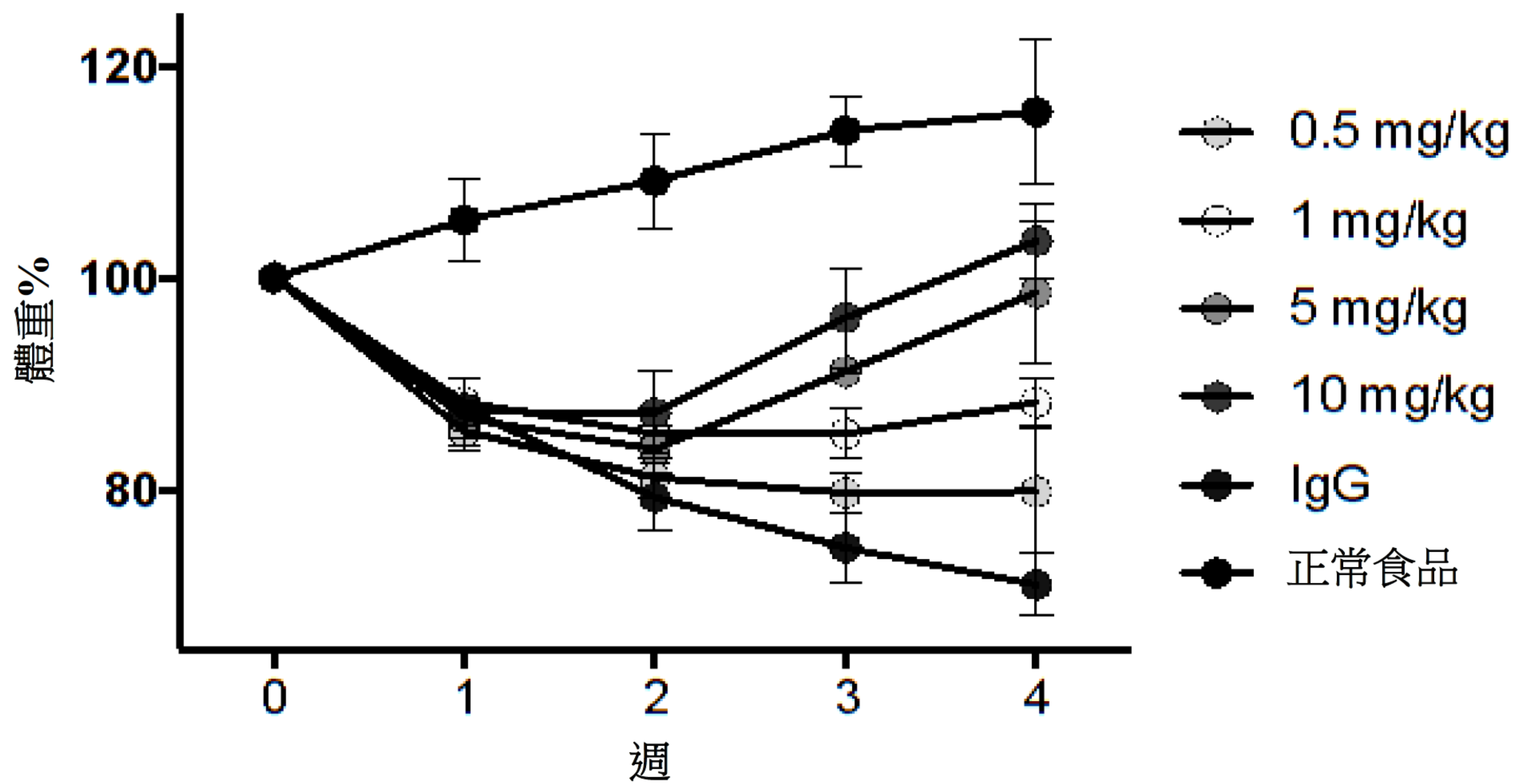
【圖10B】



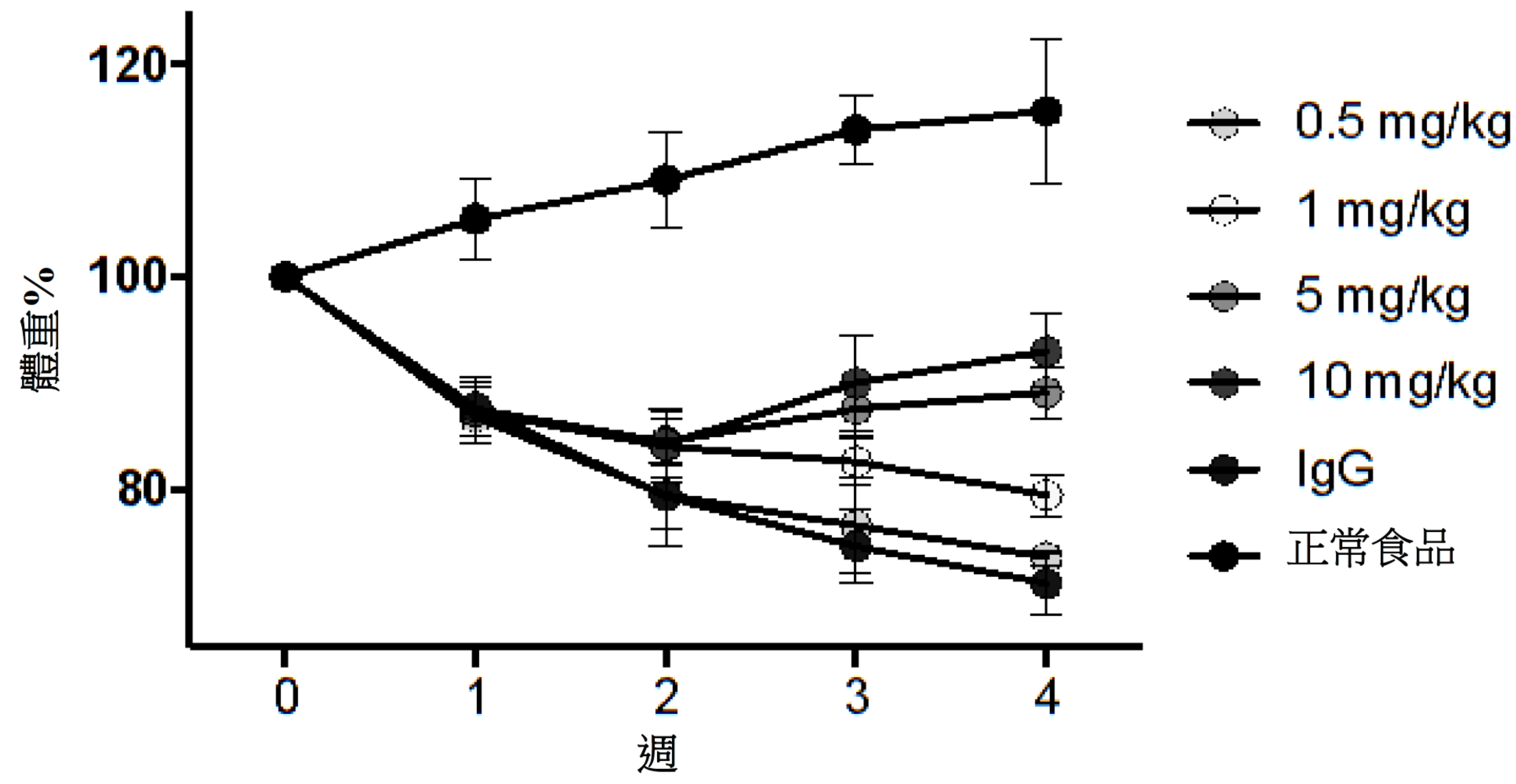
【圖11A】



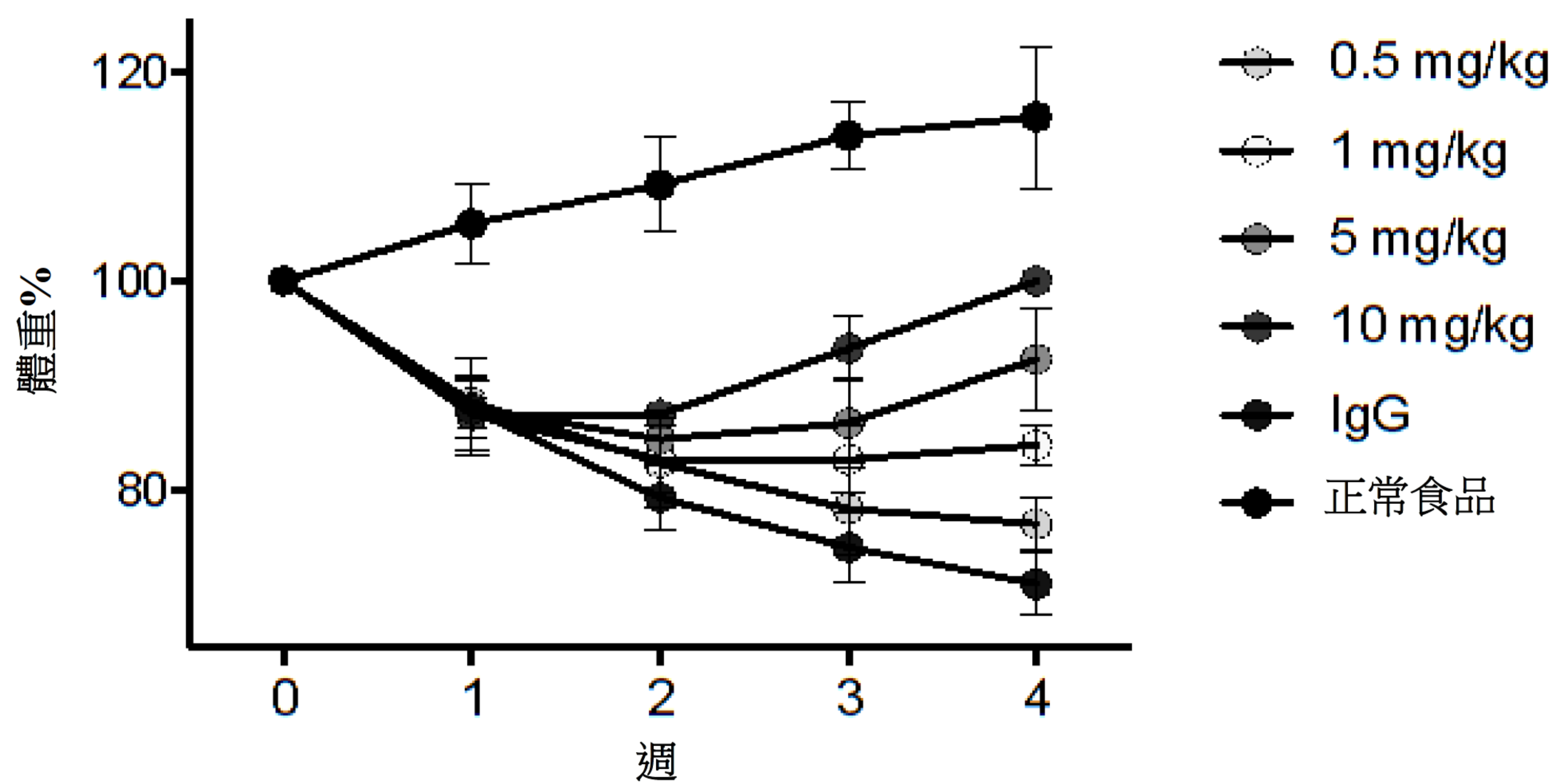
【圖11B】



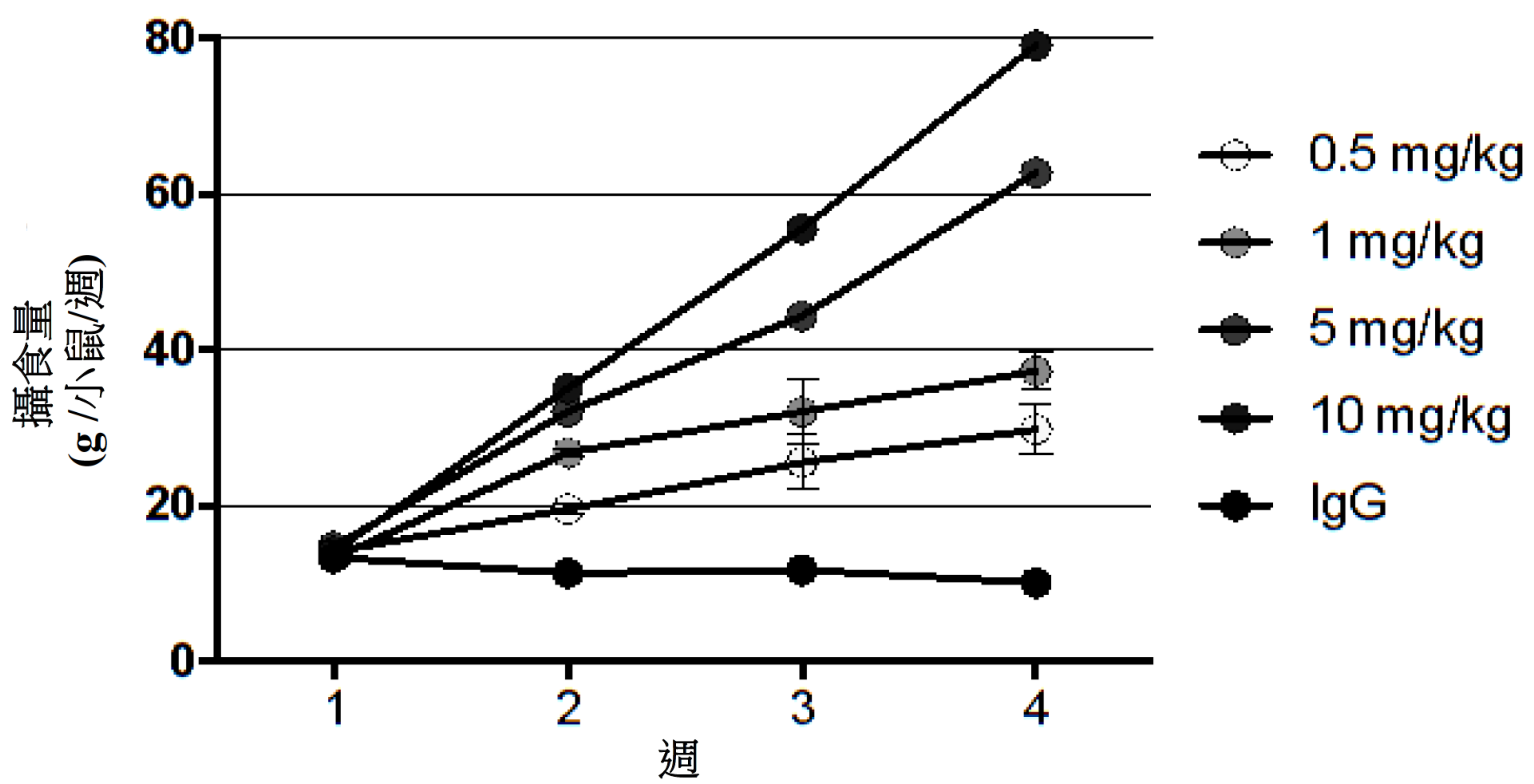
【圖12A】



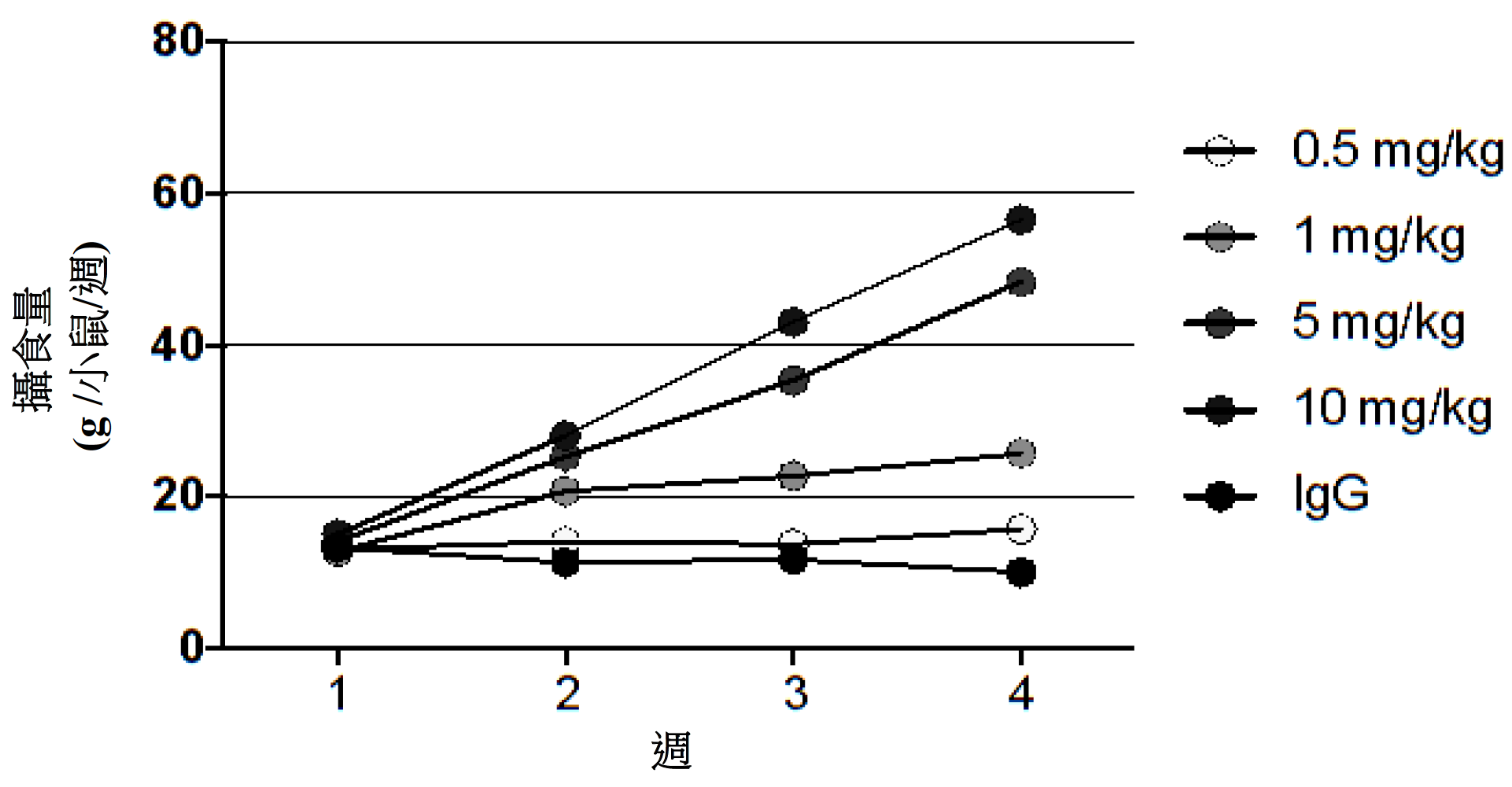
【圖12B】



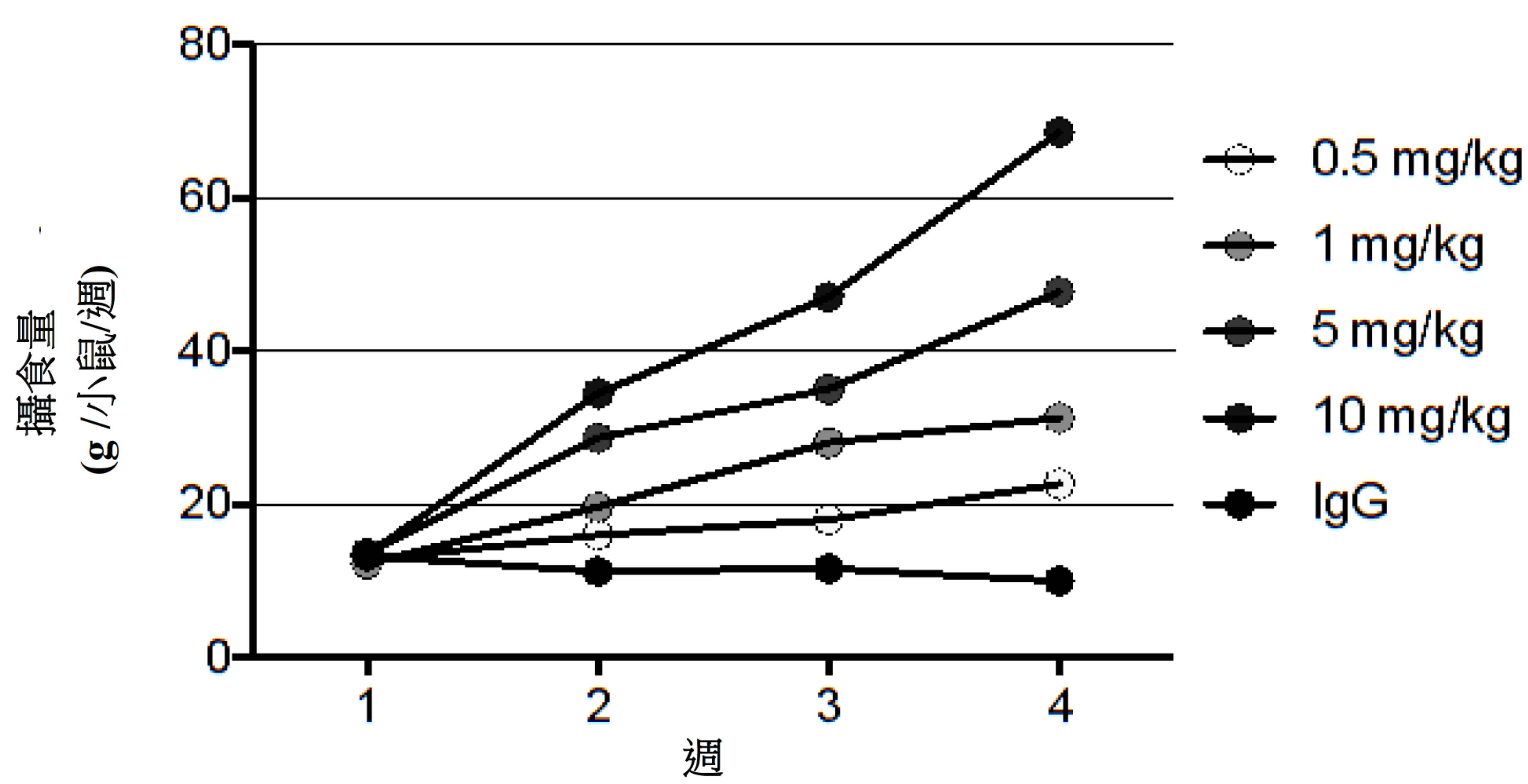
【圖12C】



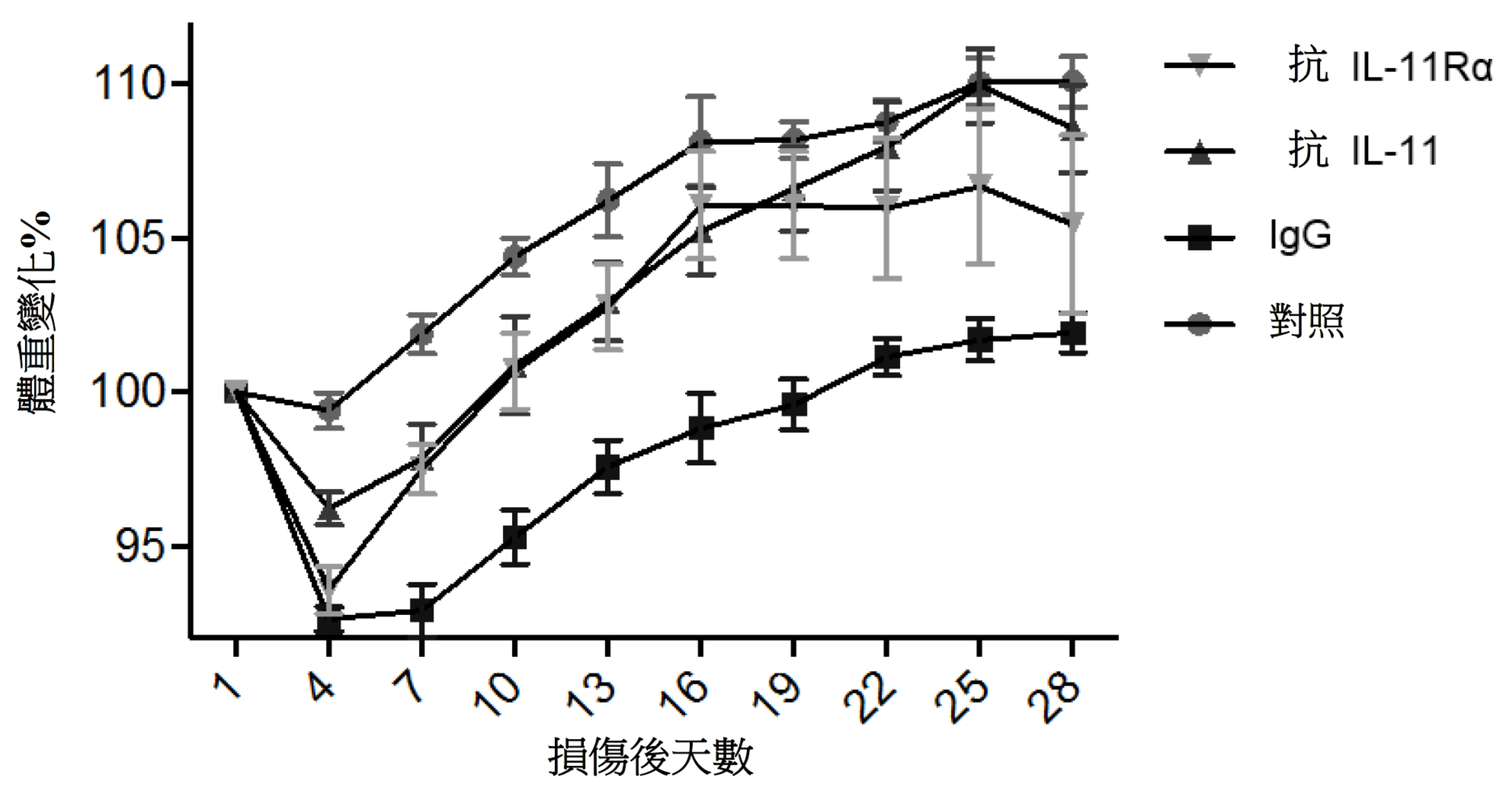
【圖13A】



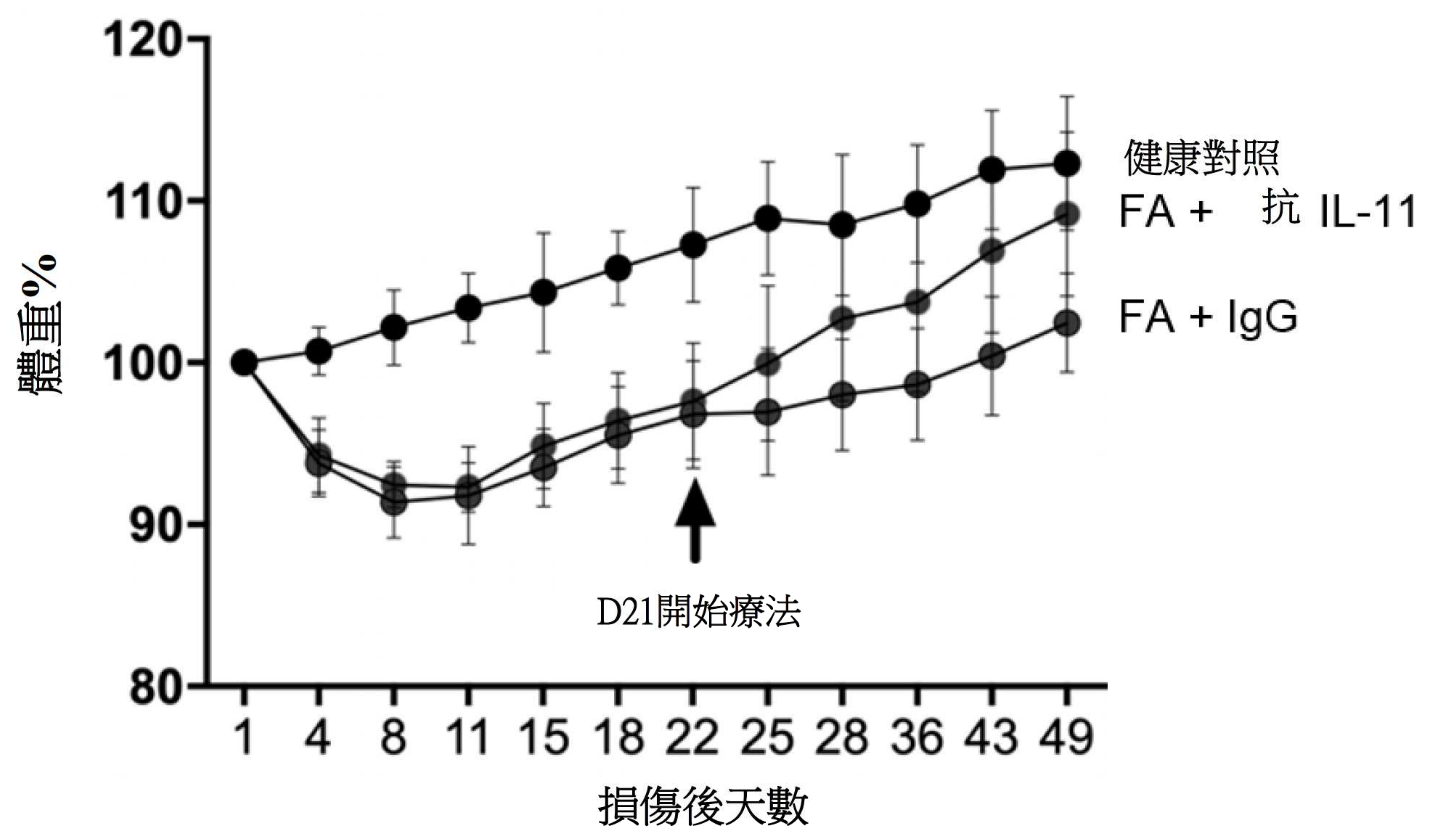
【圖13B】



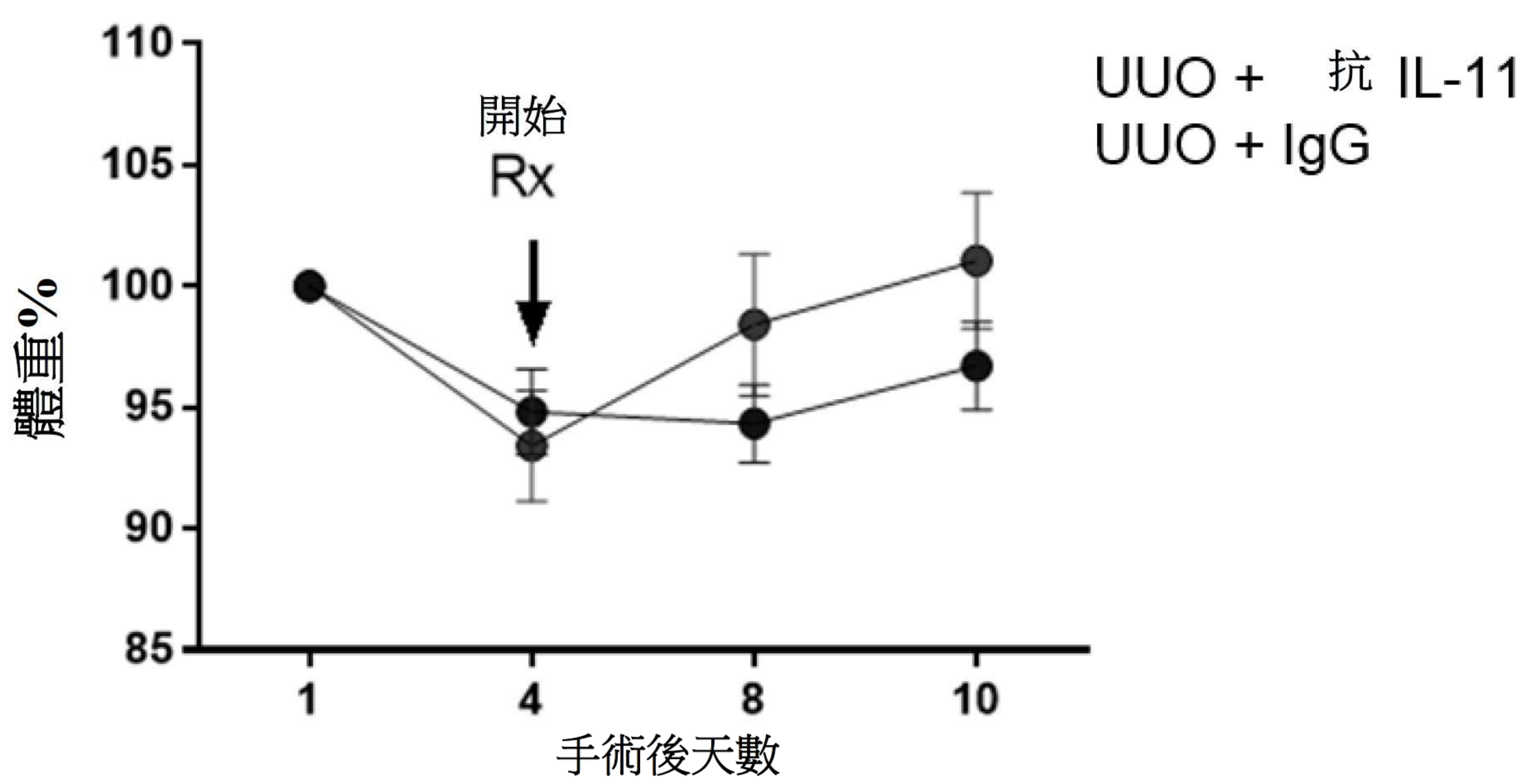
【圖13C】



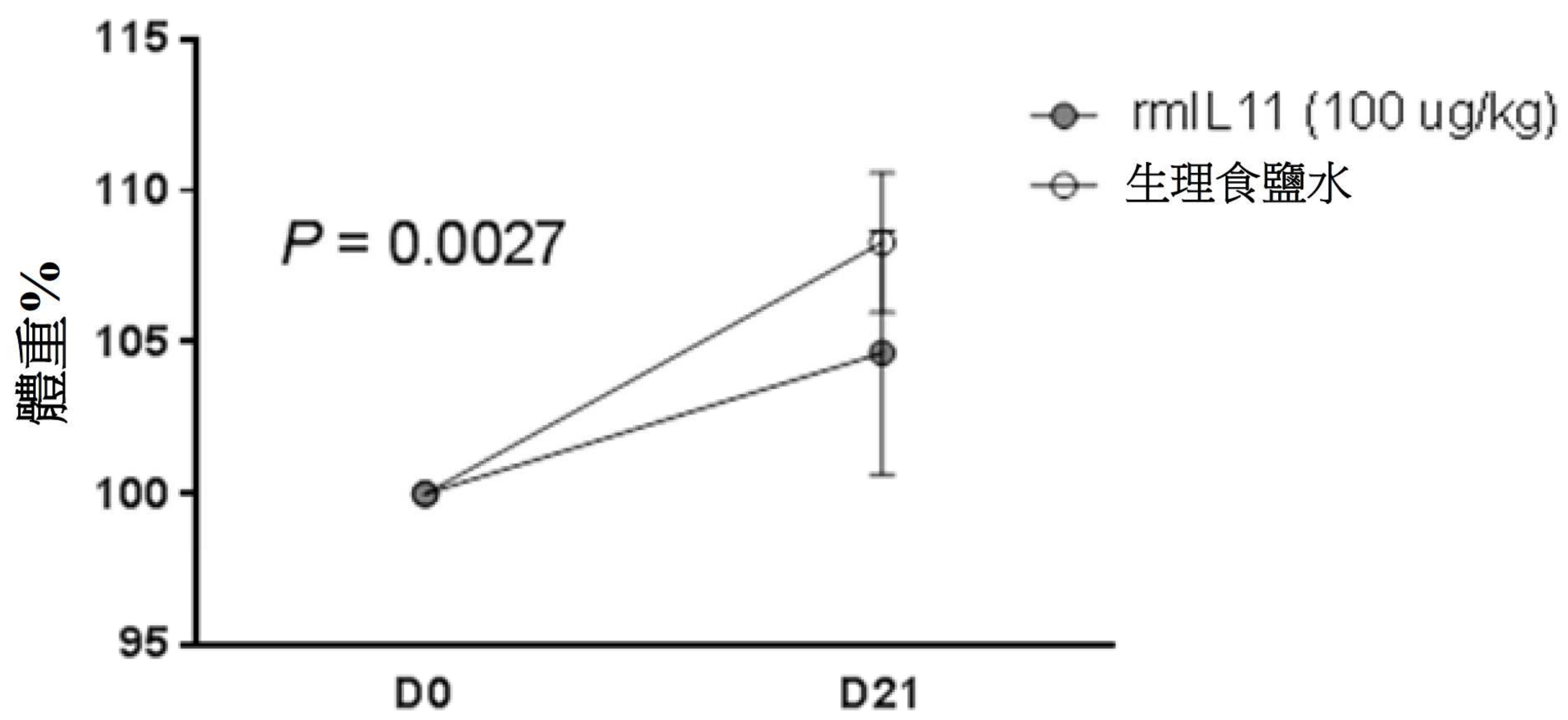
【圖14A】



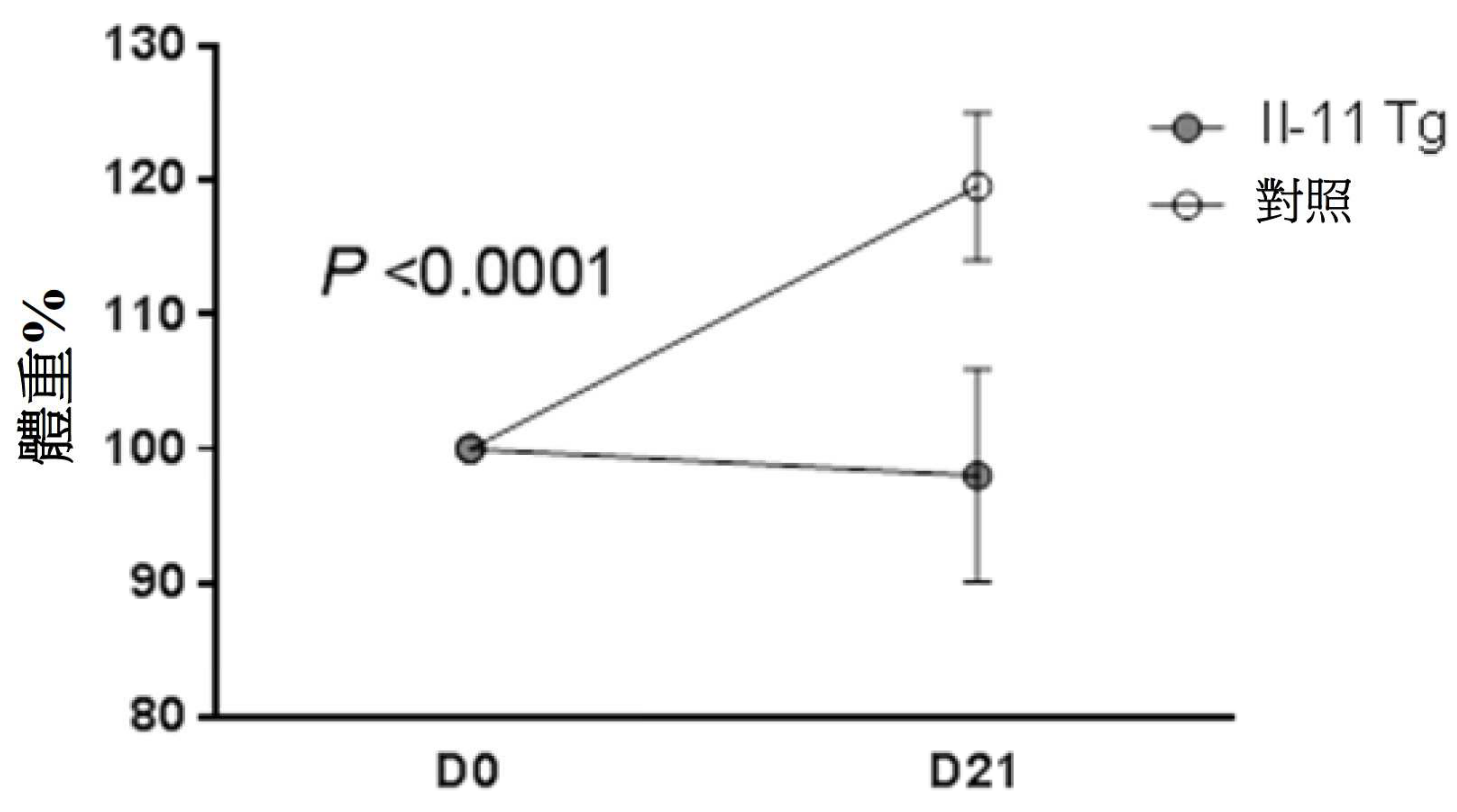
【圖14B】



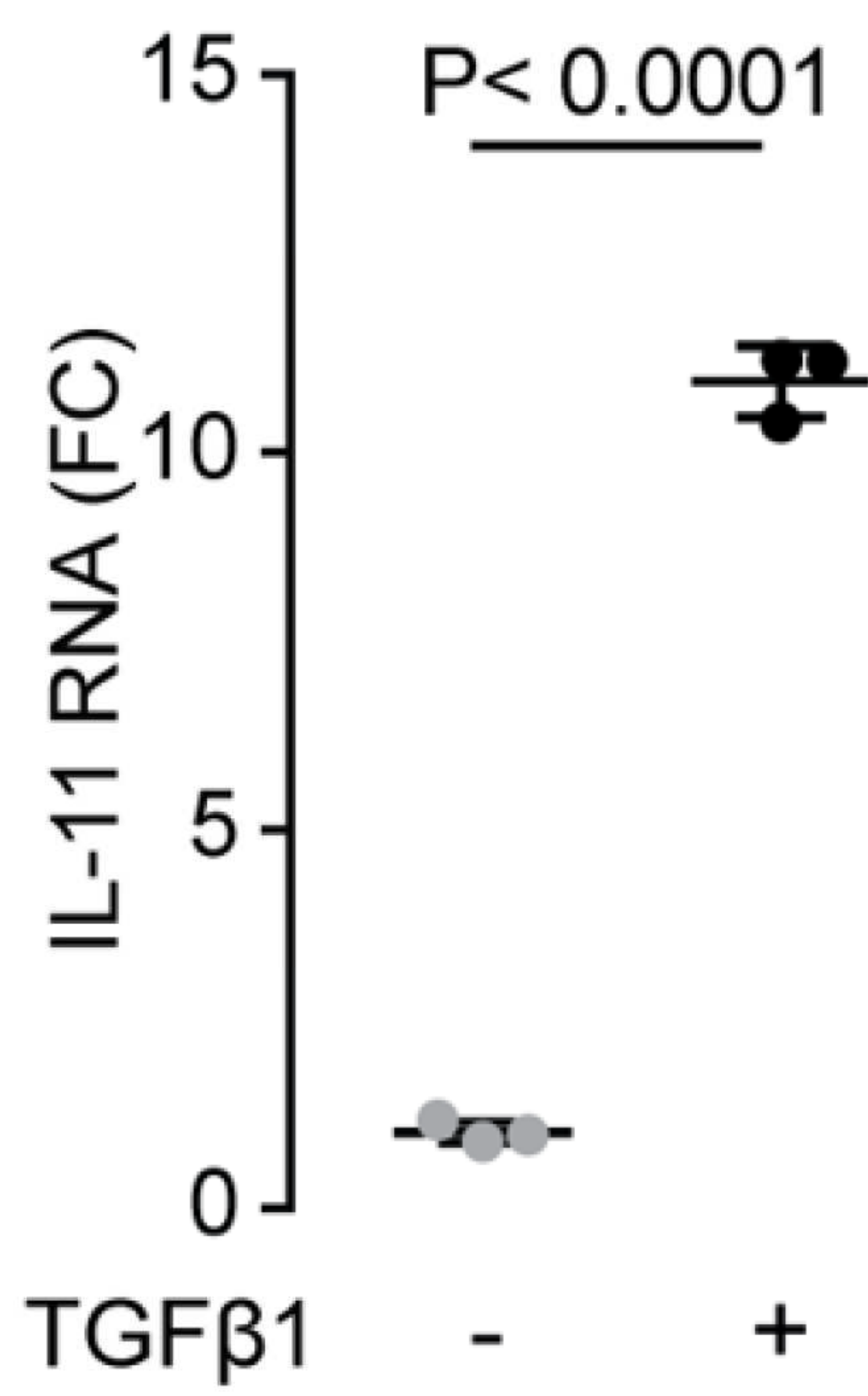
【圖15】



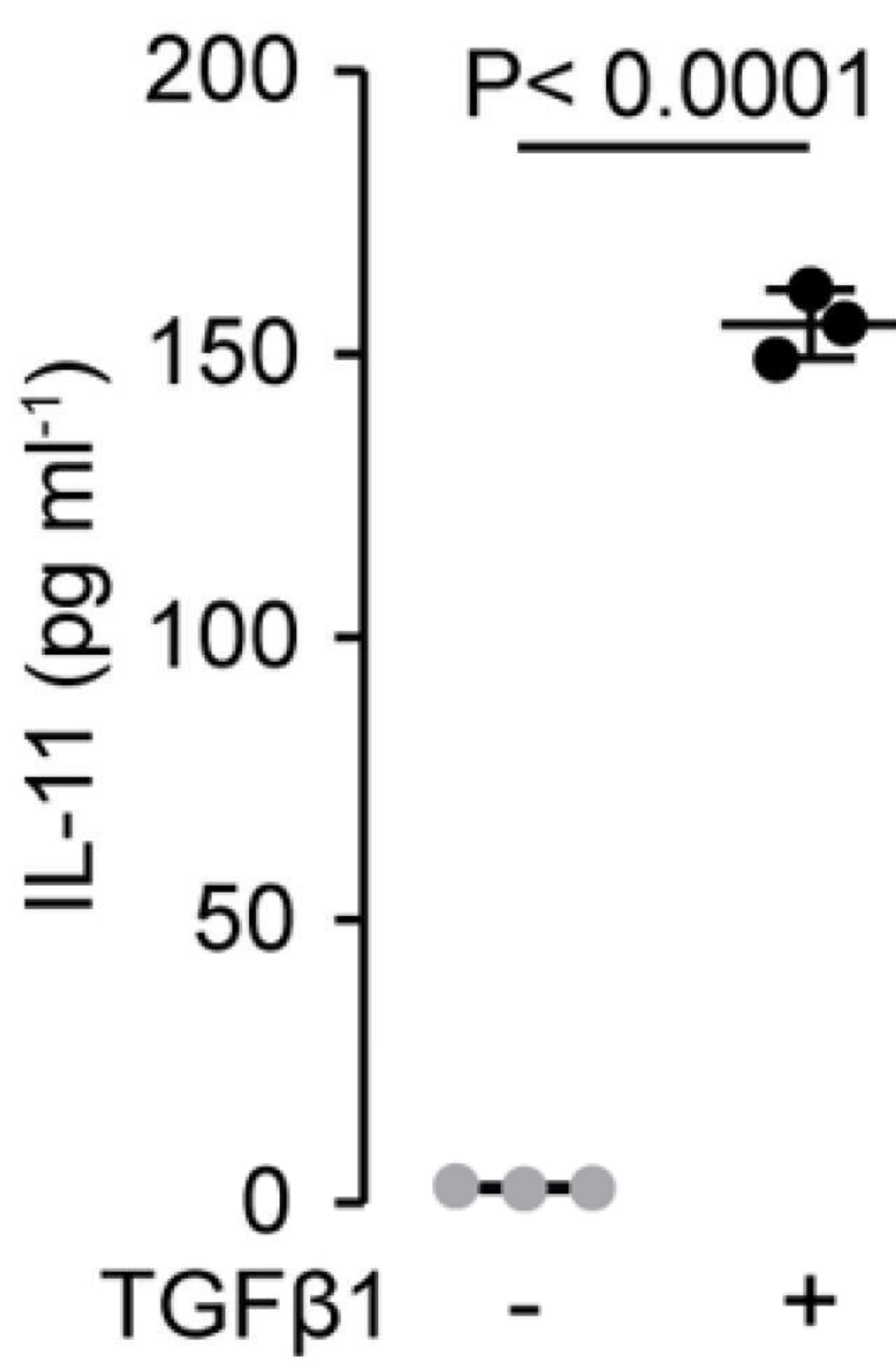
【圖16A】



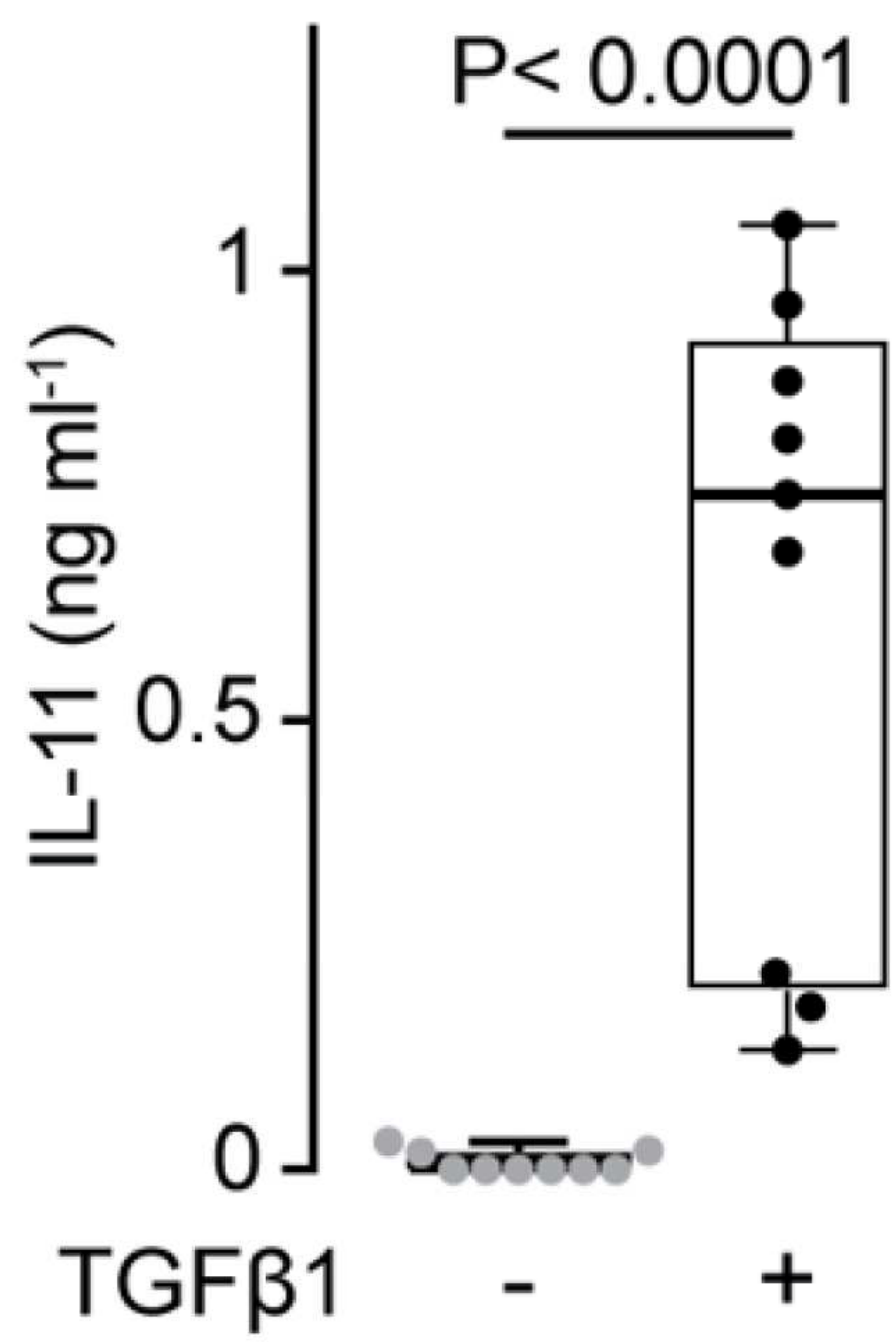
【圖16B】



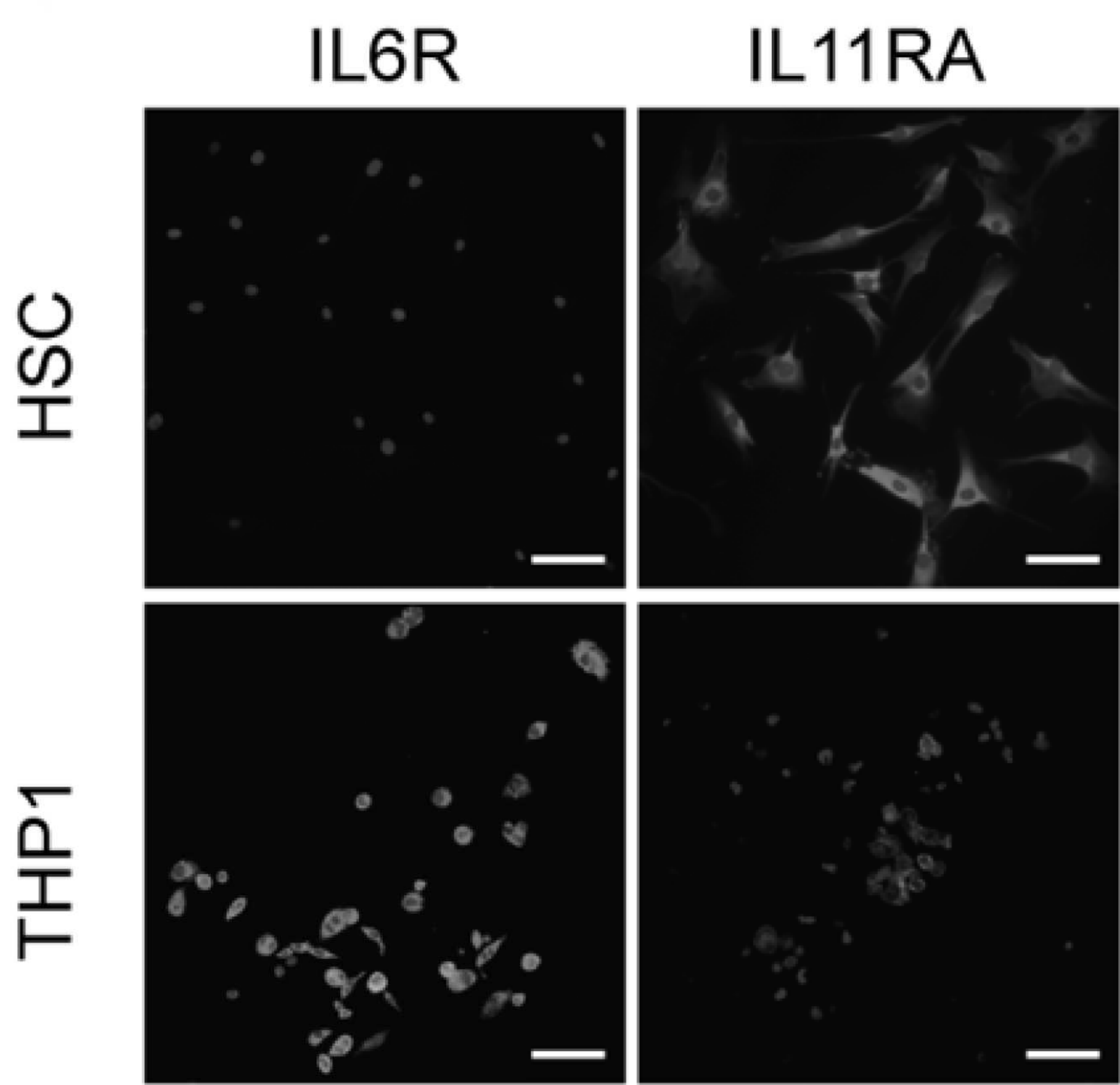
【圖17A】



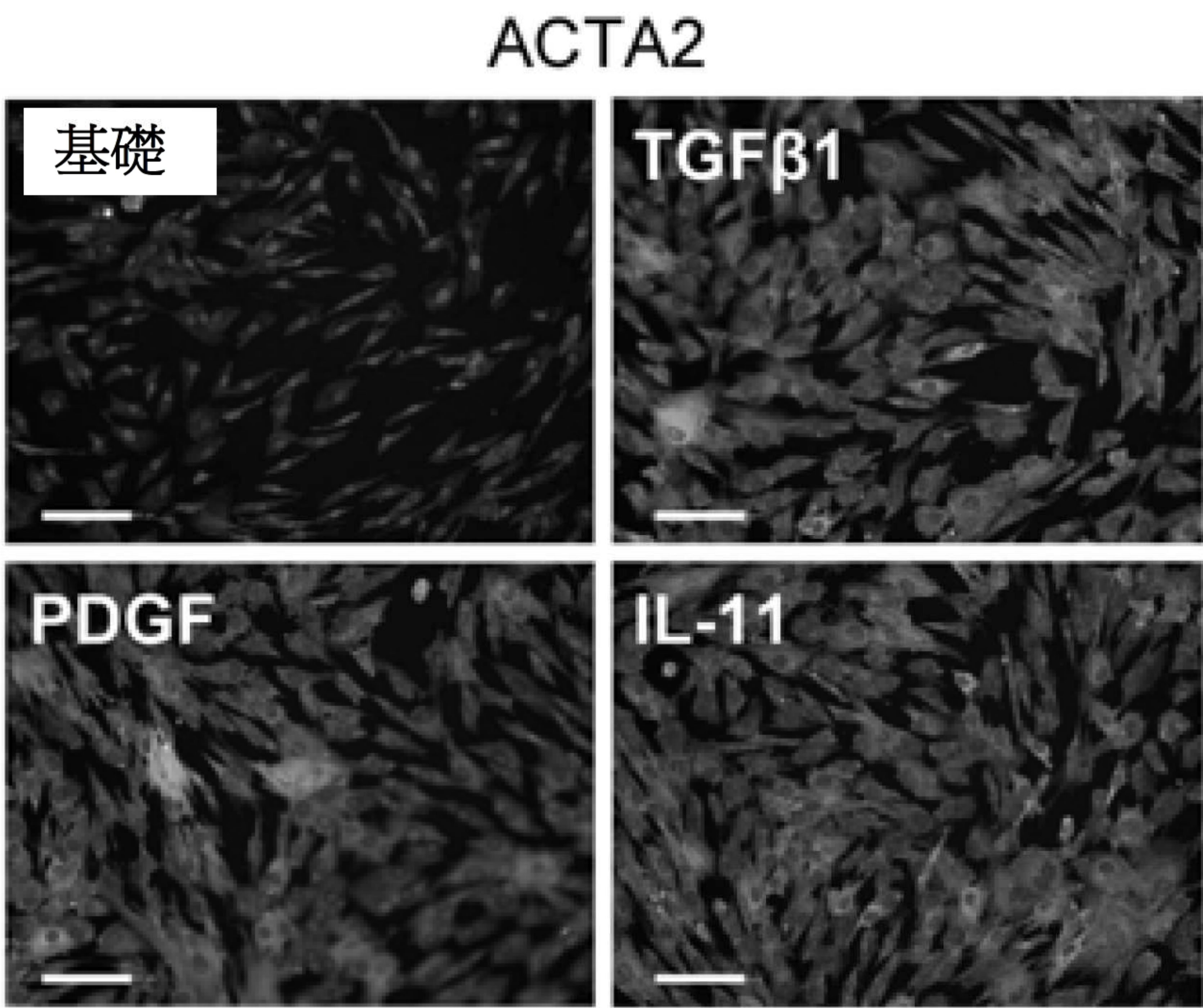
【圖17B】



【圖17C】



【圖17D】

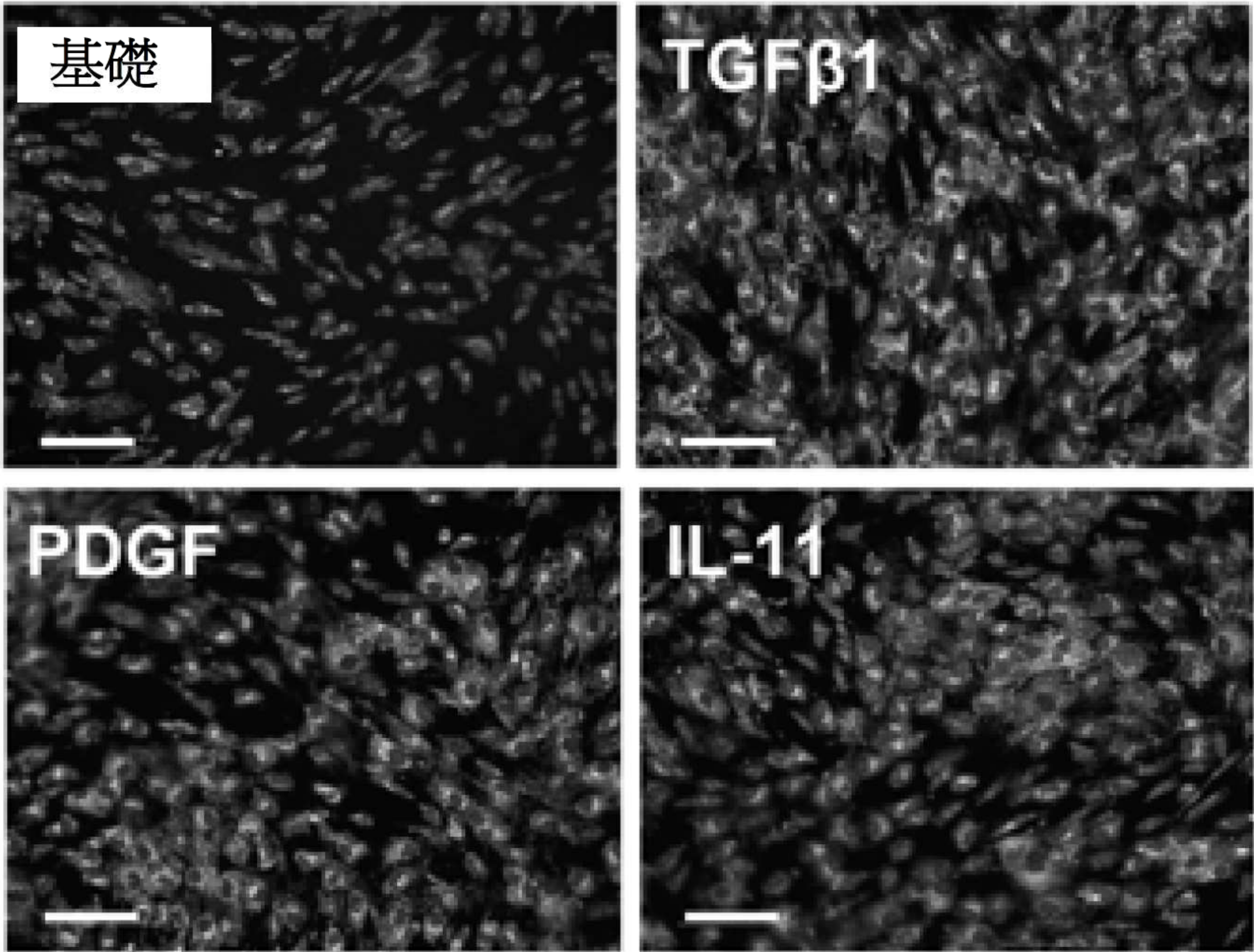


【圖17E】

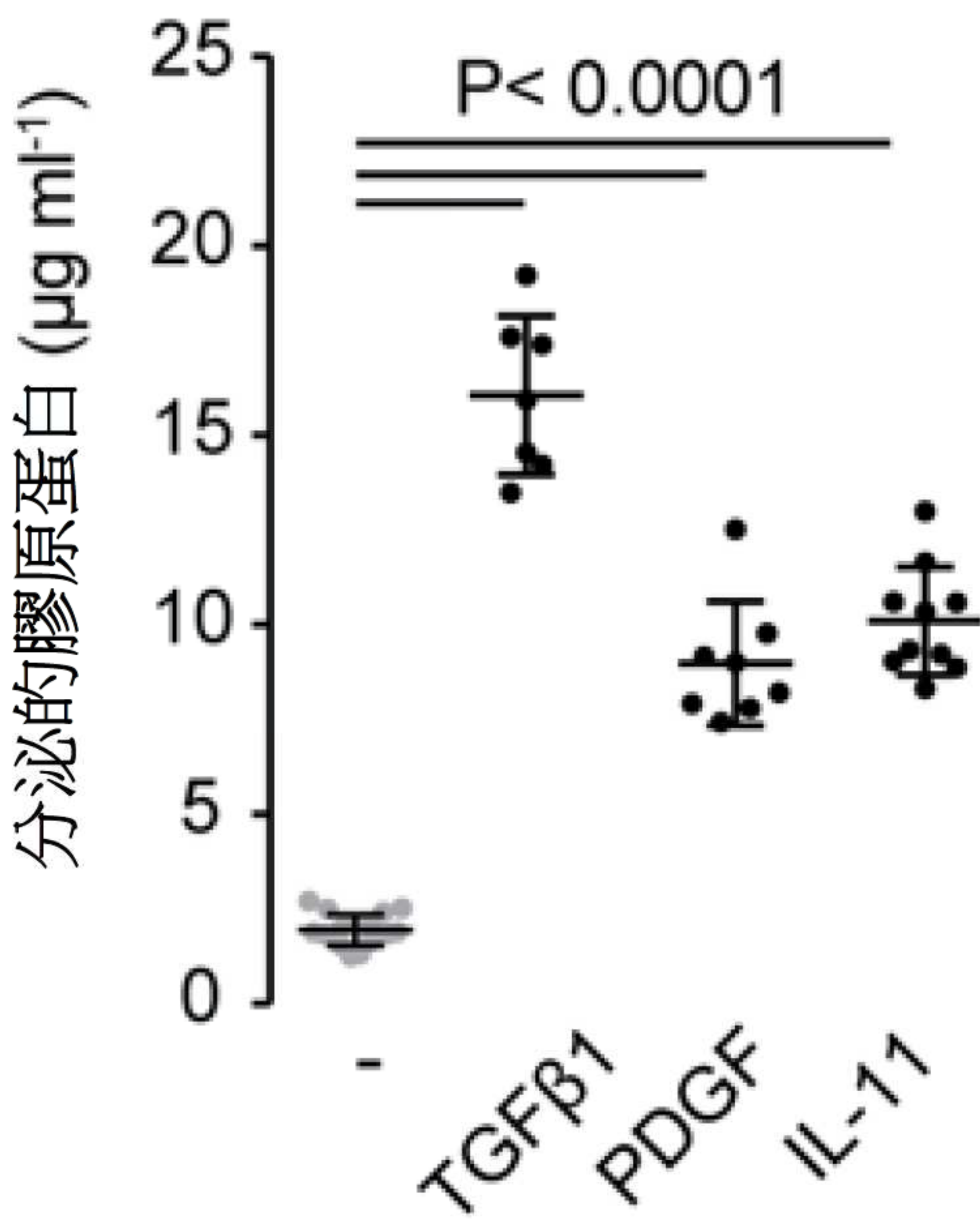


【圖17F】

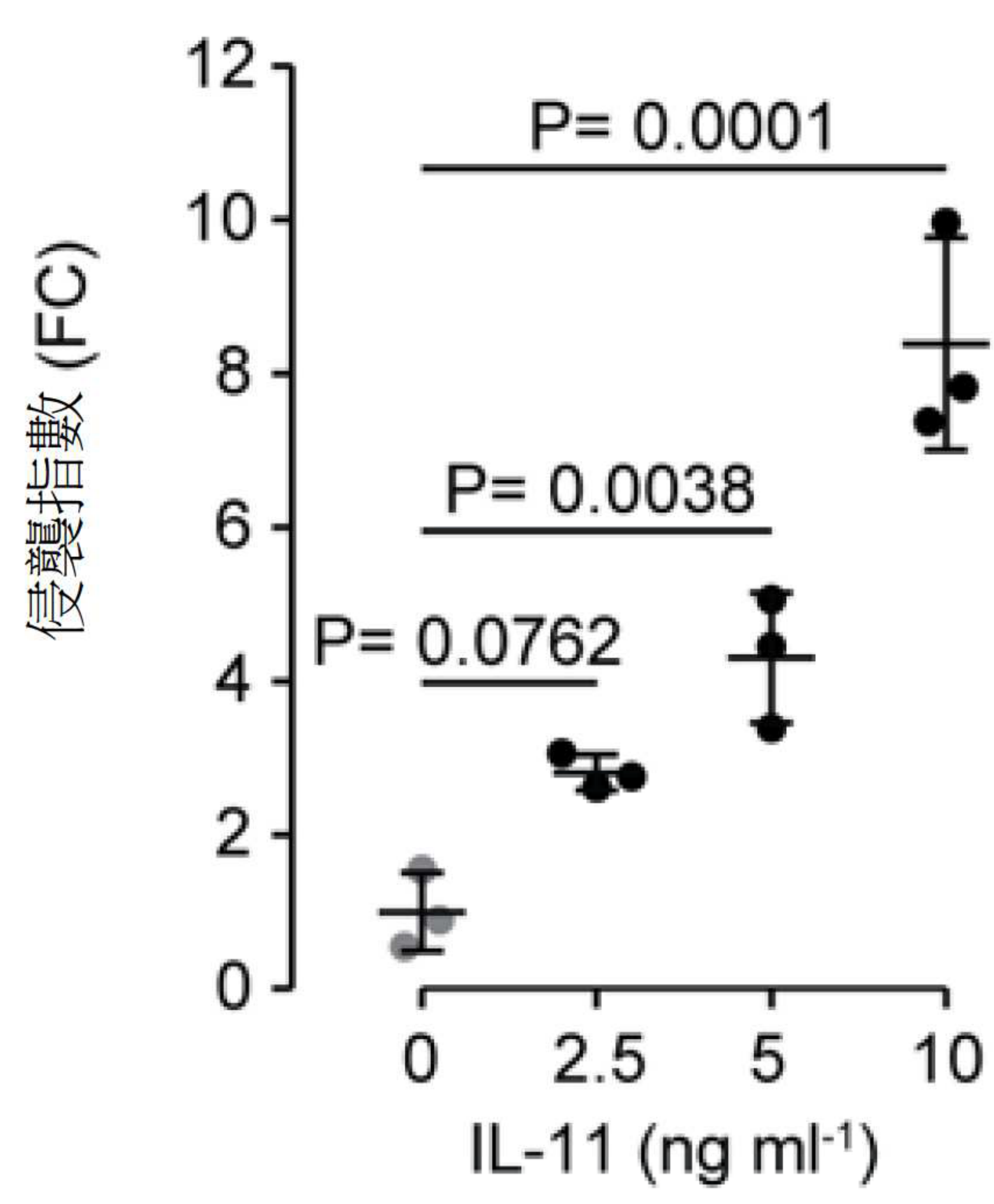
膠原蛋白 1



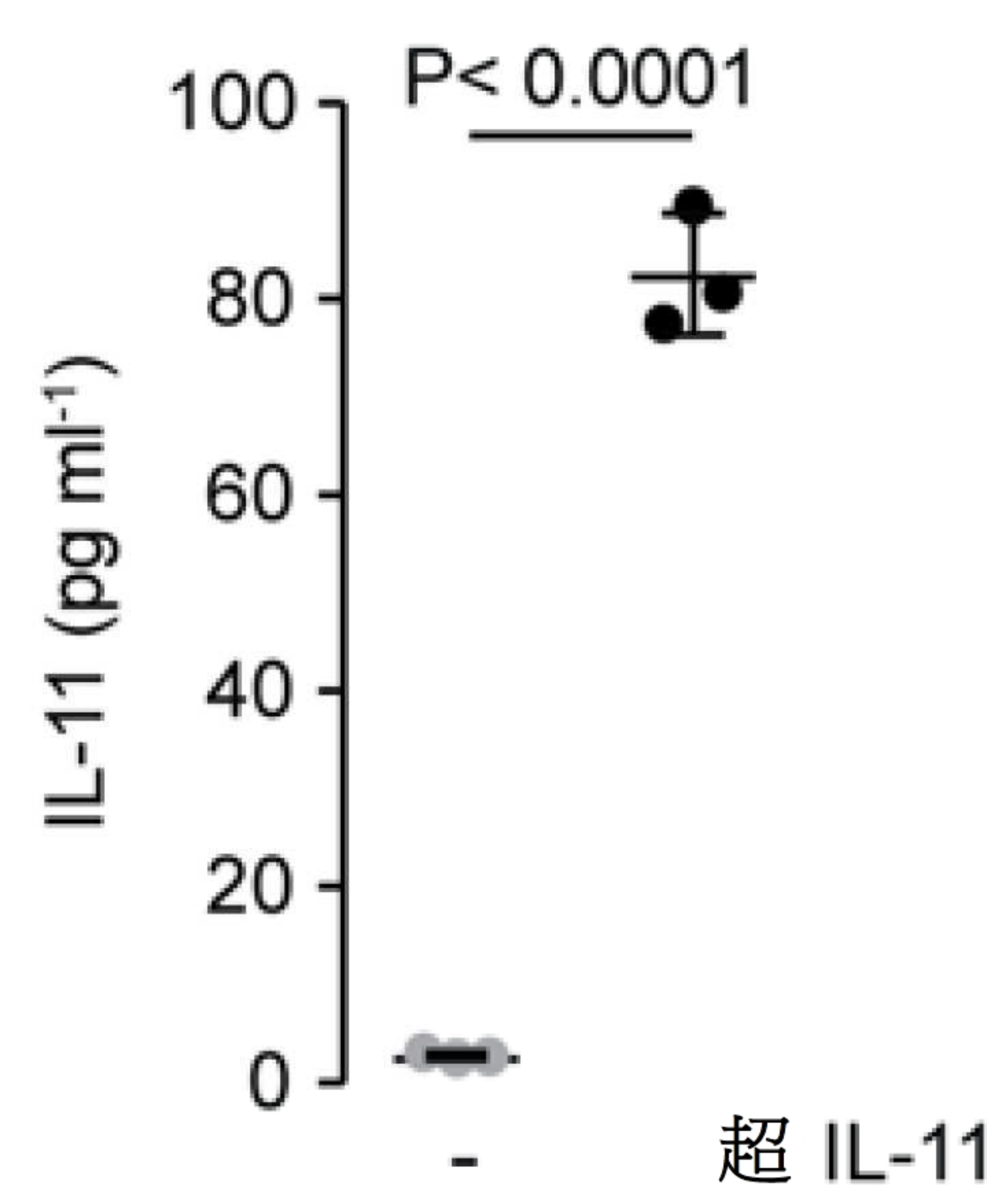
【圖17G】



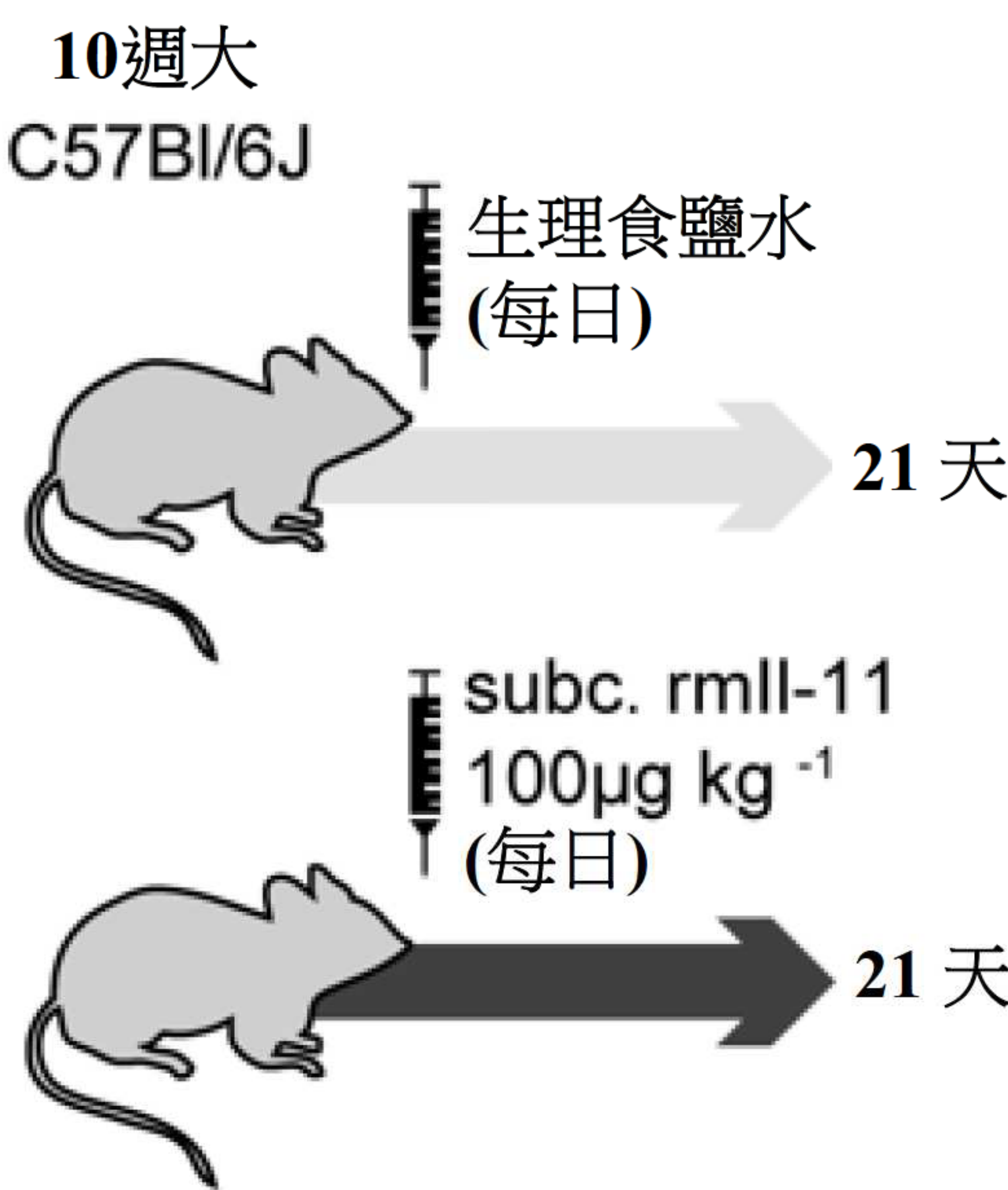
【圖17H】



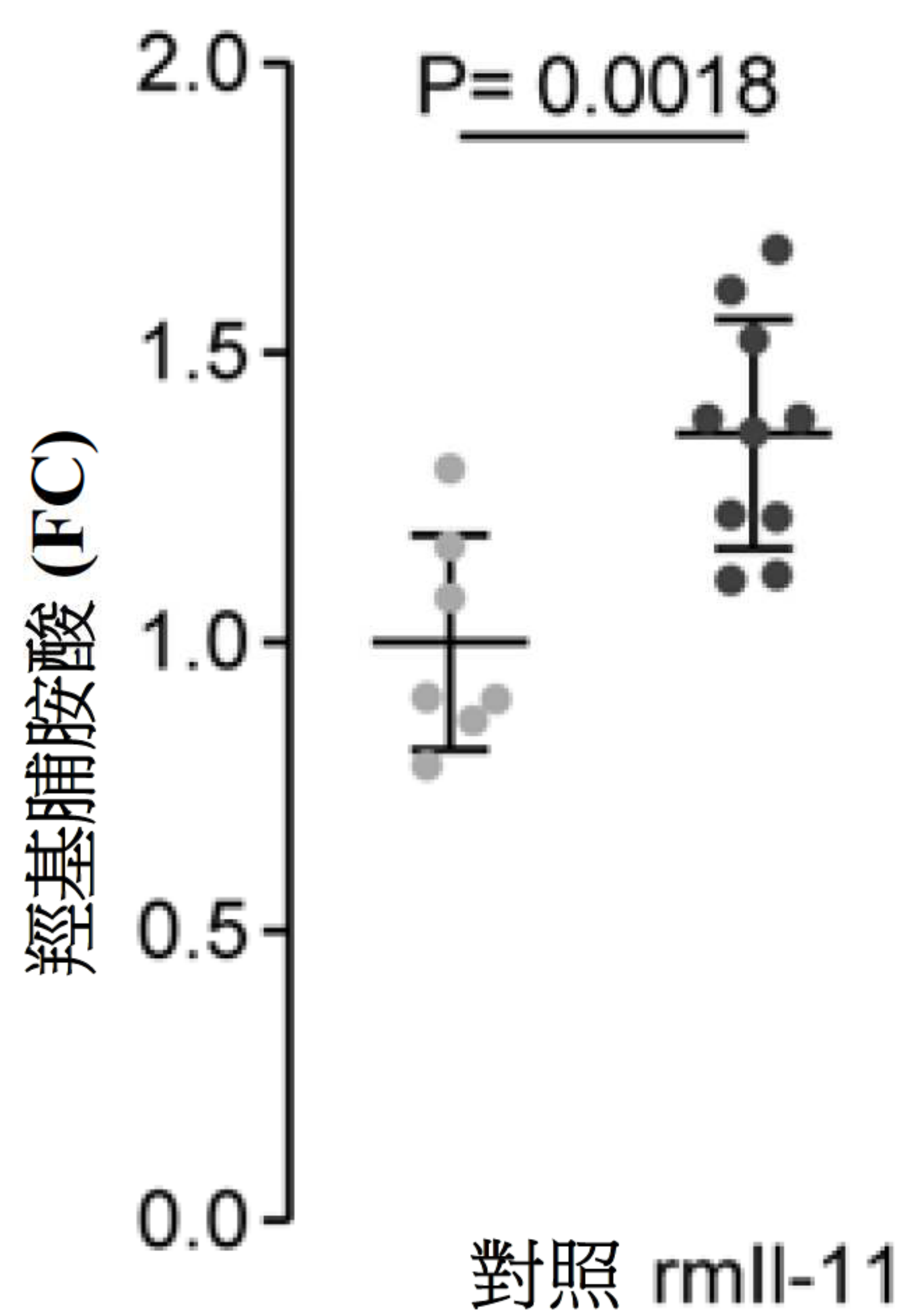
【圖17I】



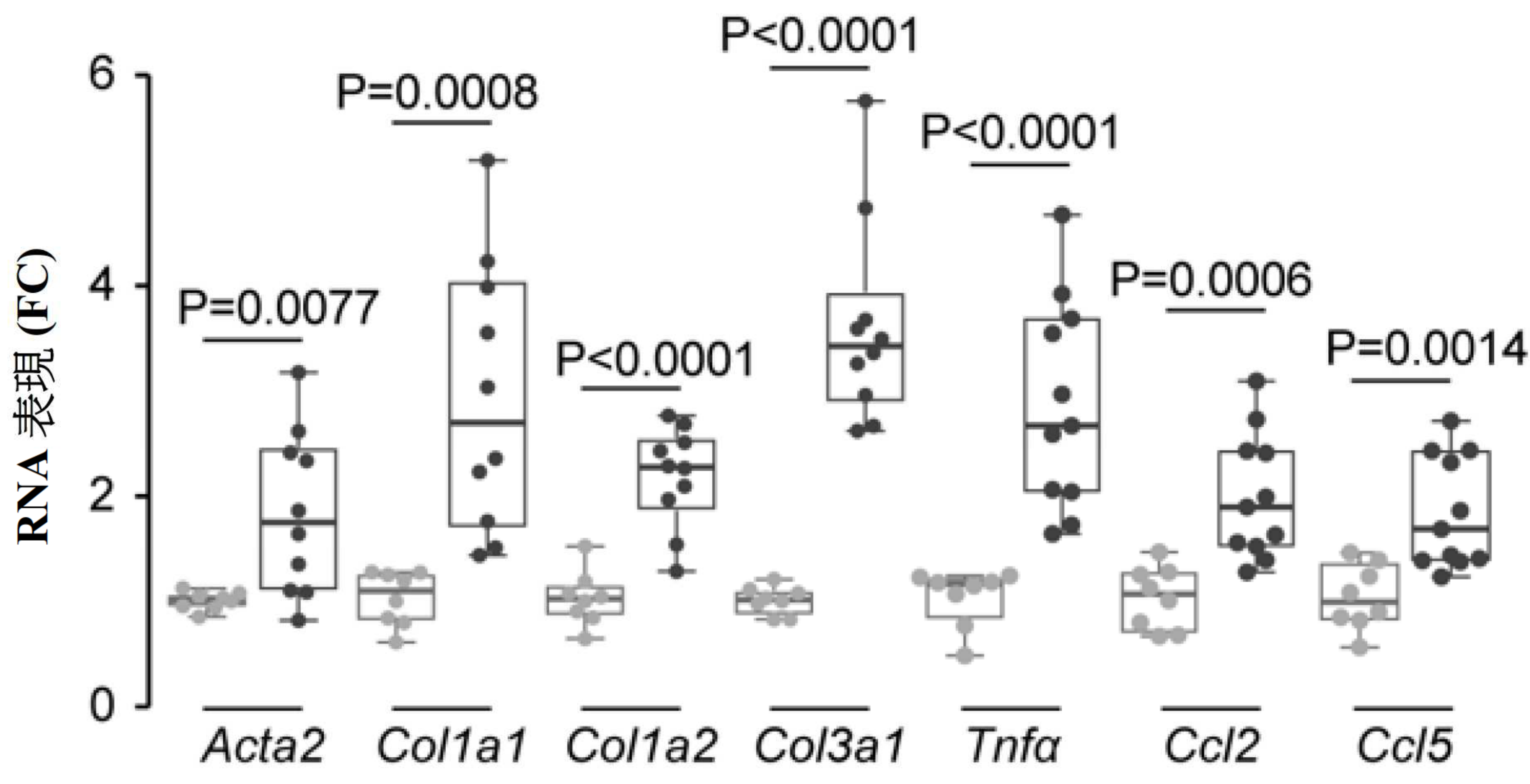
【圖17J】



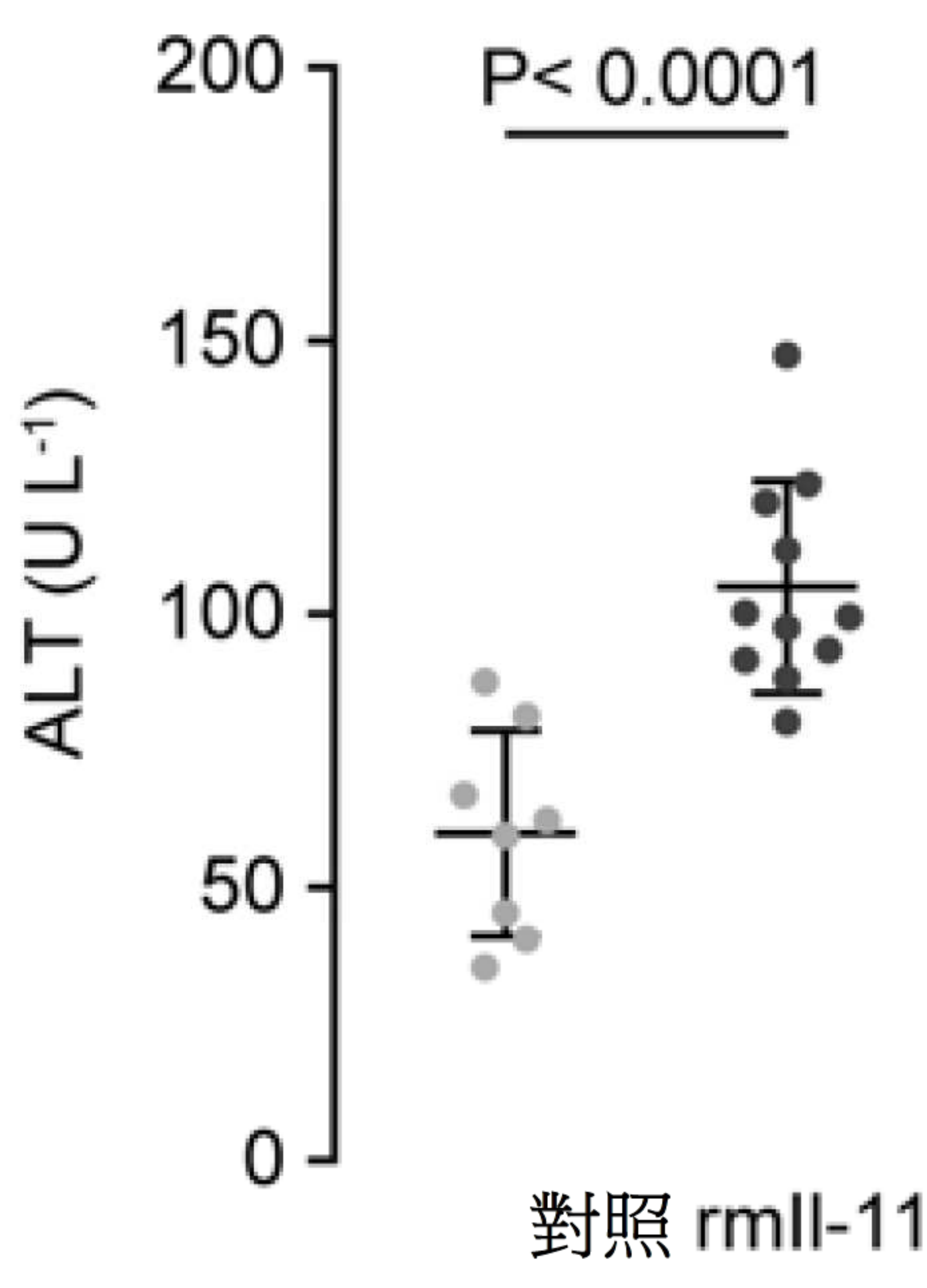
【圖17K】



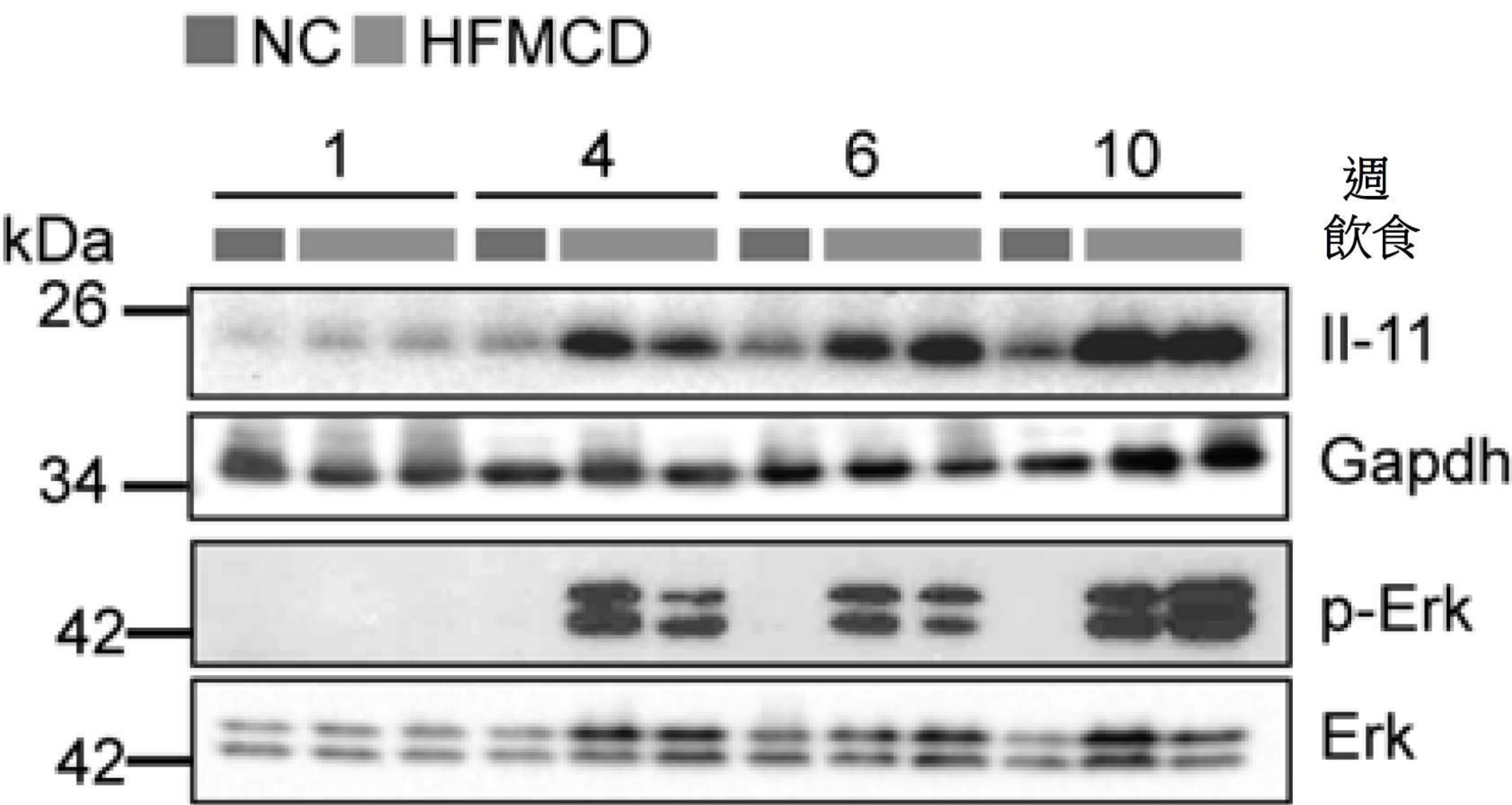
【圖17L】



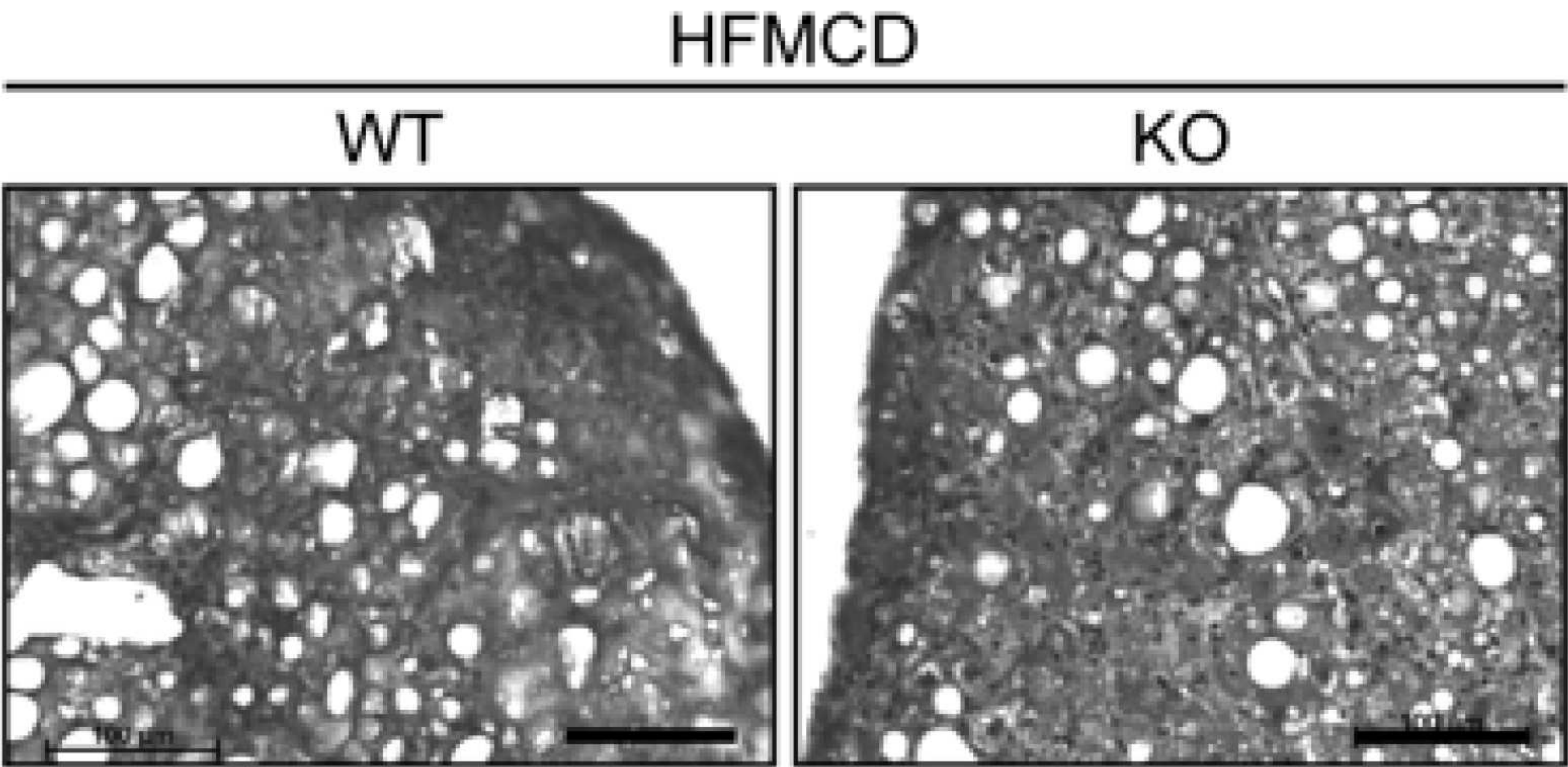
【圖17M】



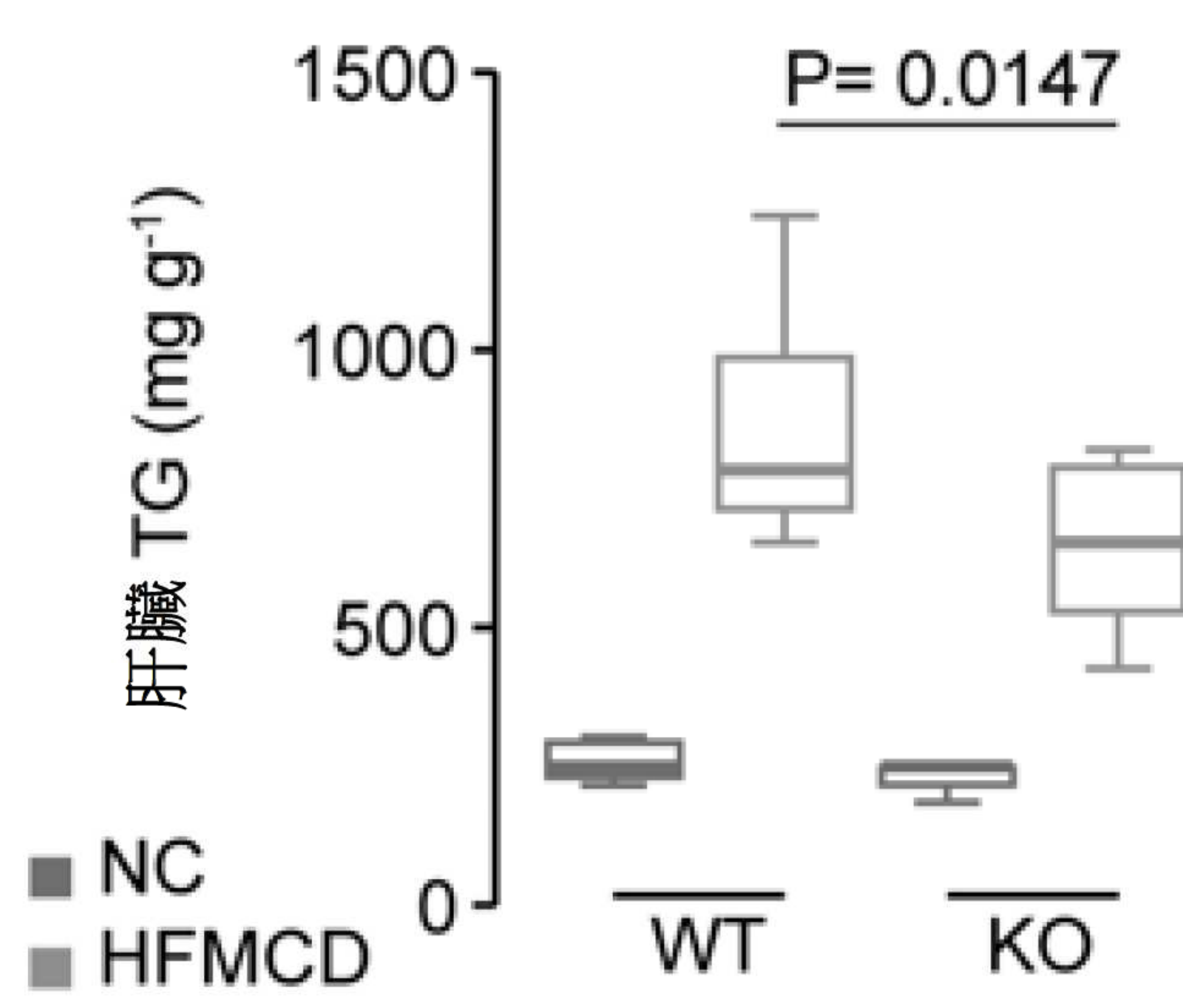
【圖17N】



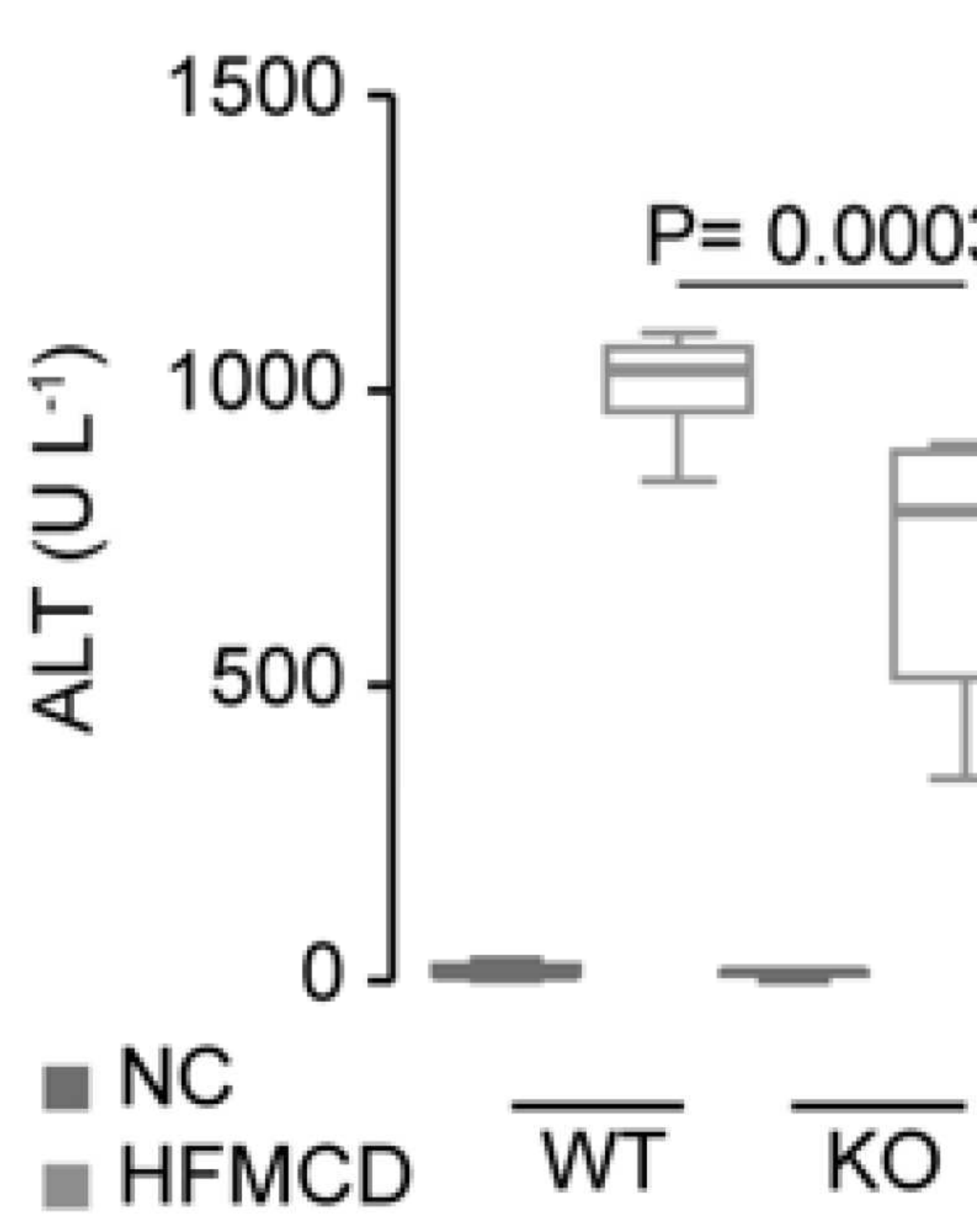
【圖18A】



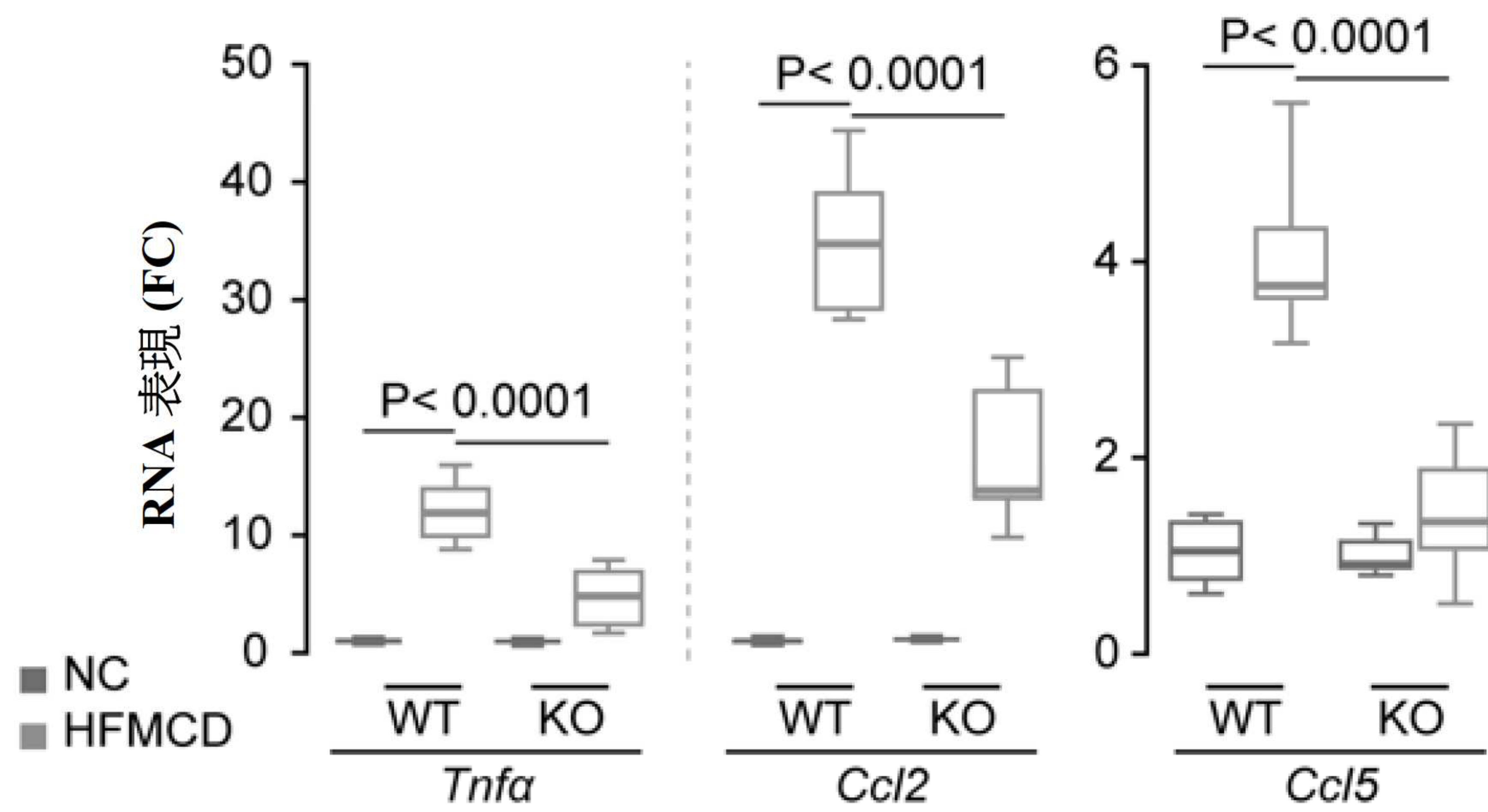
【圖18B】



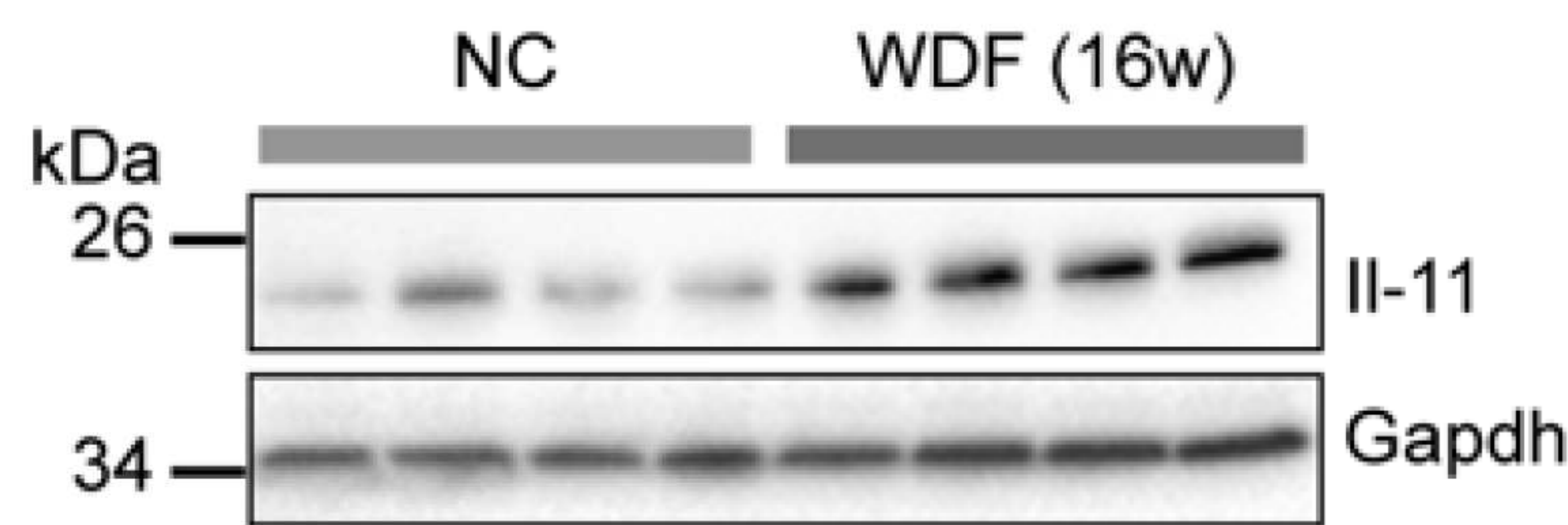
【圖18C】



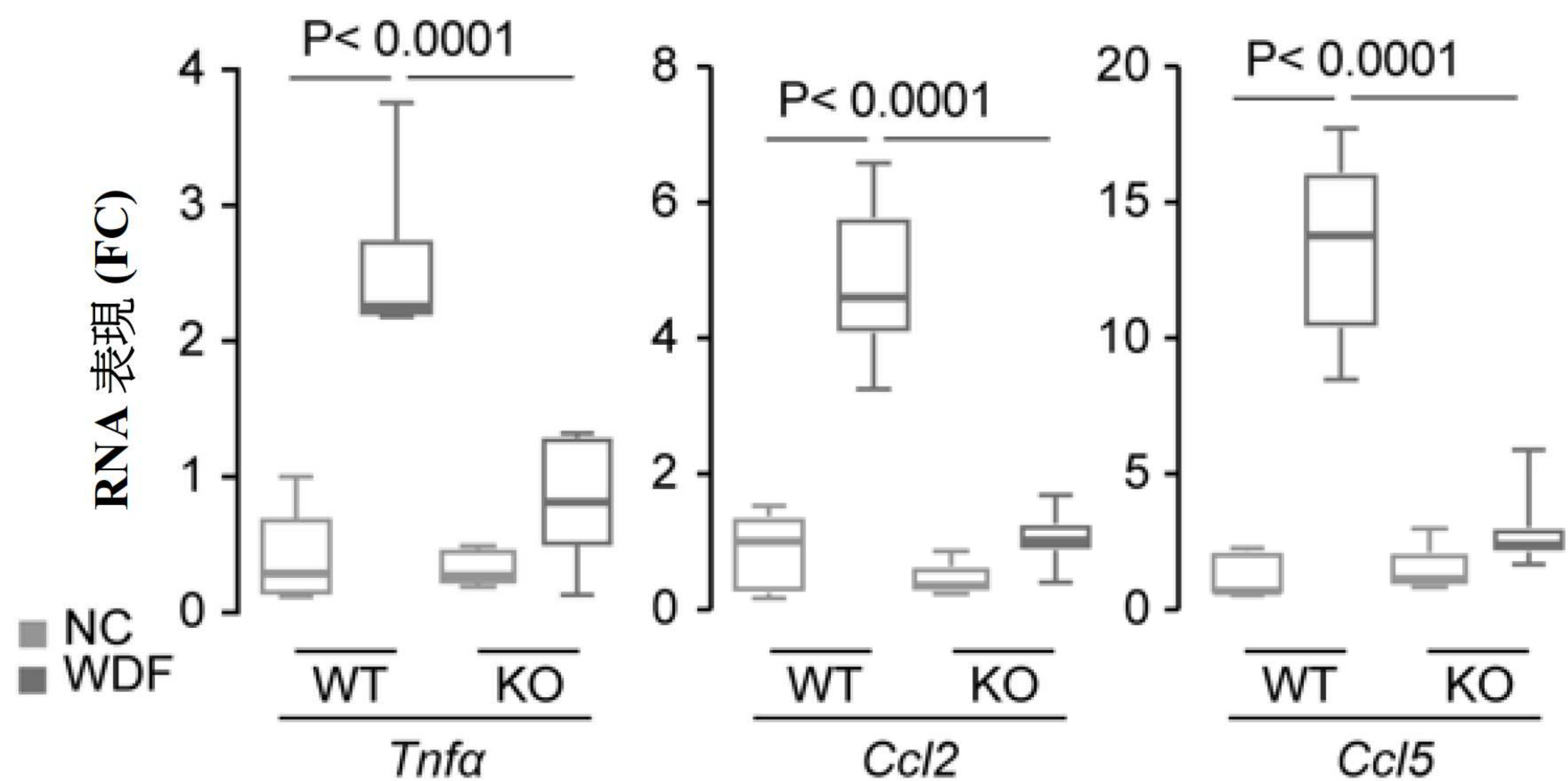
【圖18D】



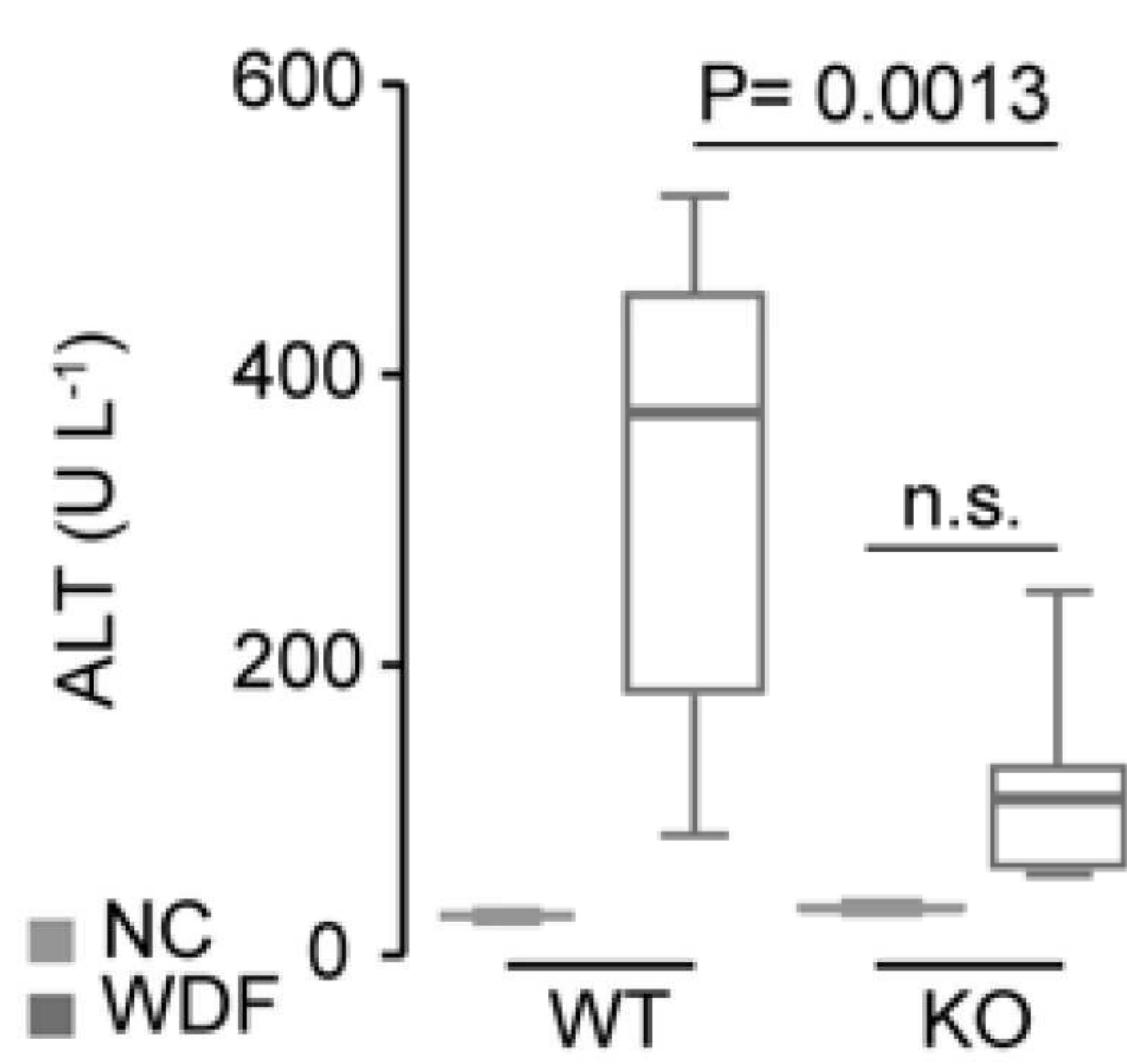
【圖18E】



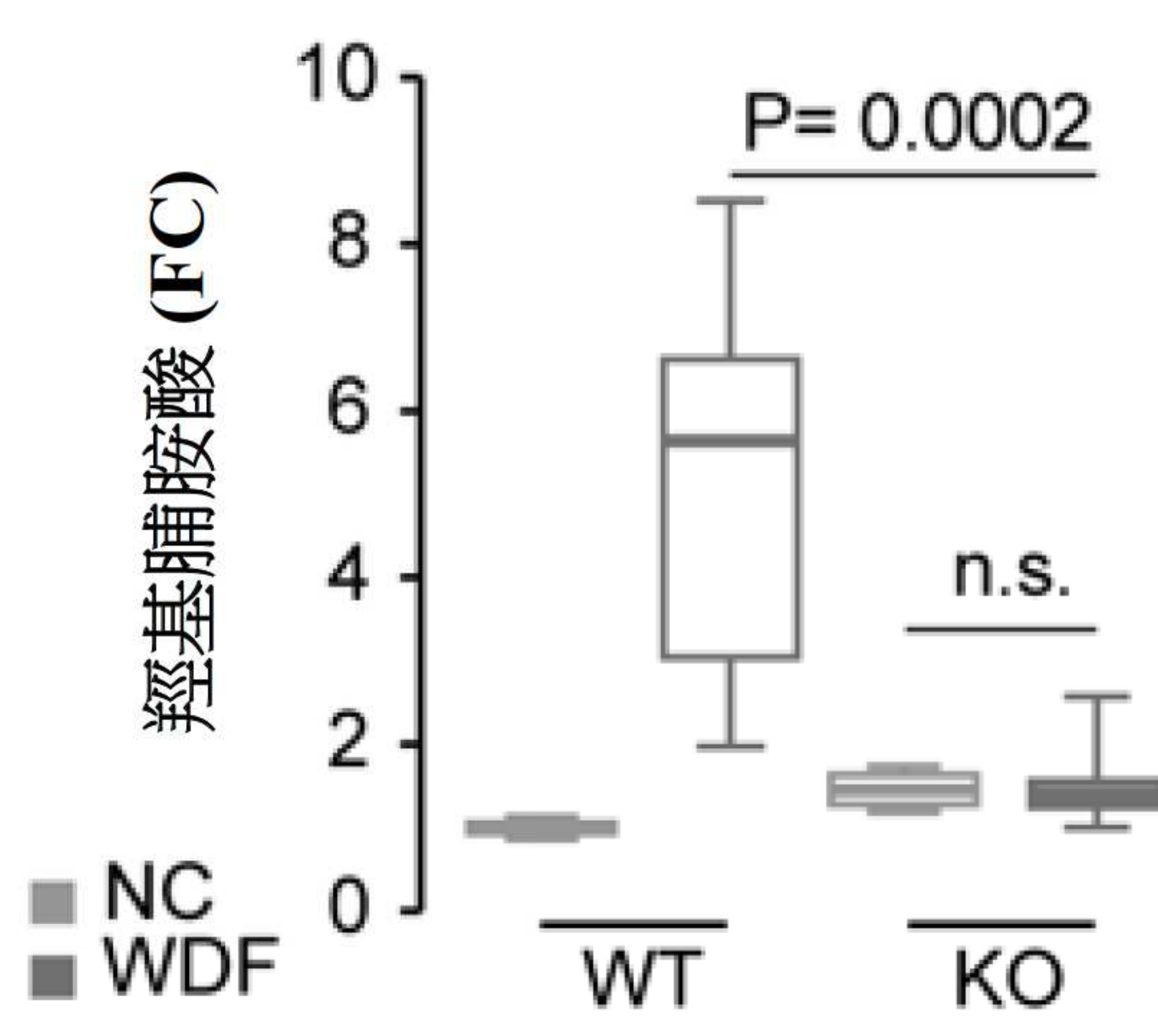
【圖18F】



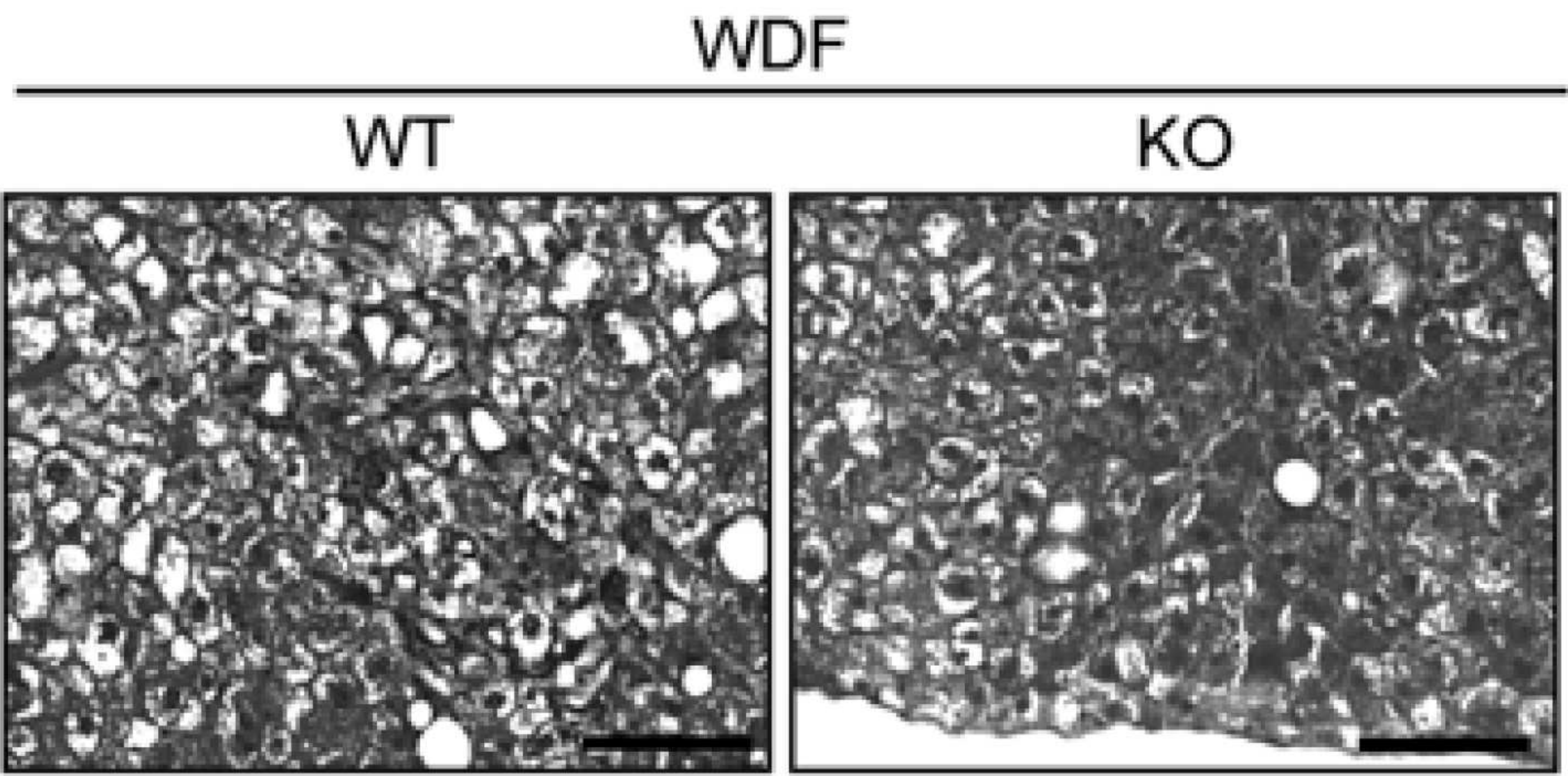
【圖18G】



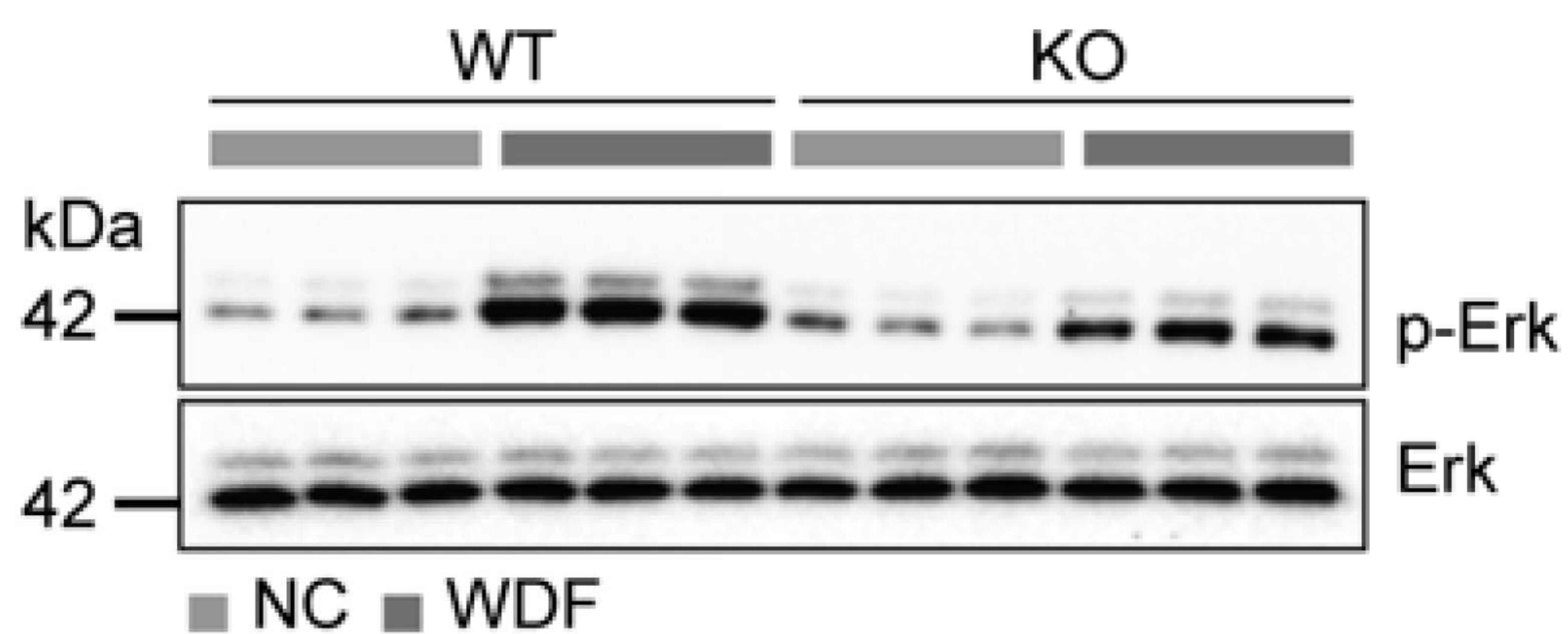
【圖18H】



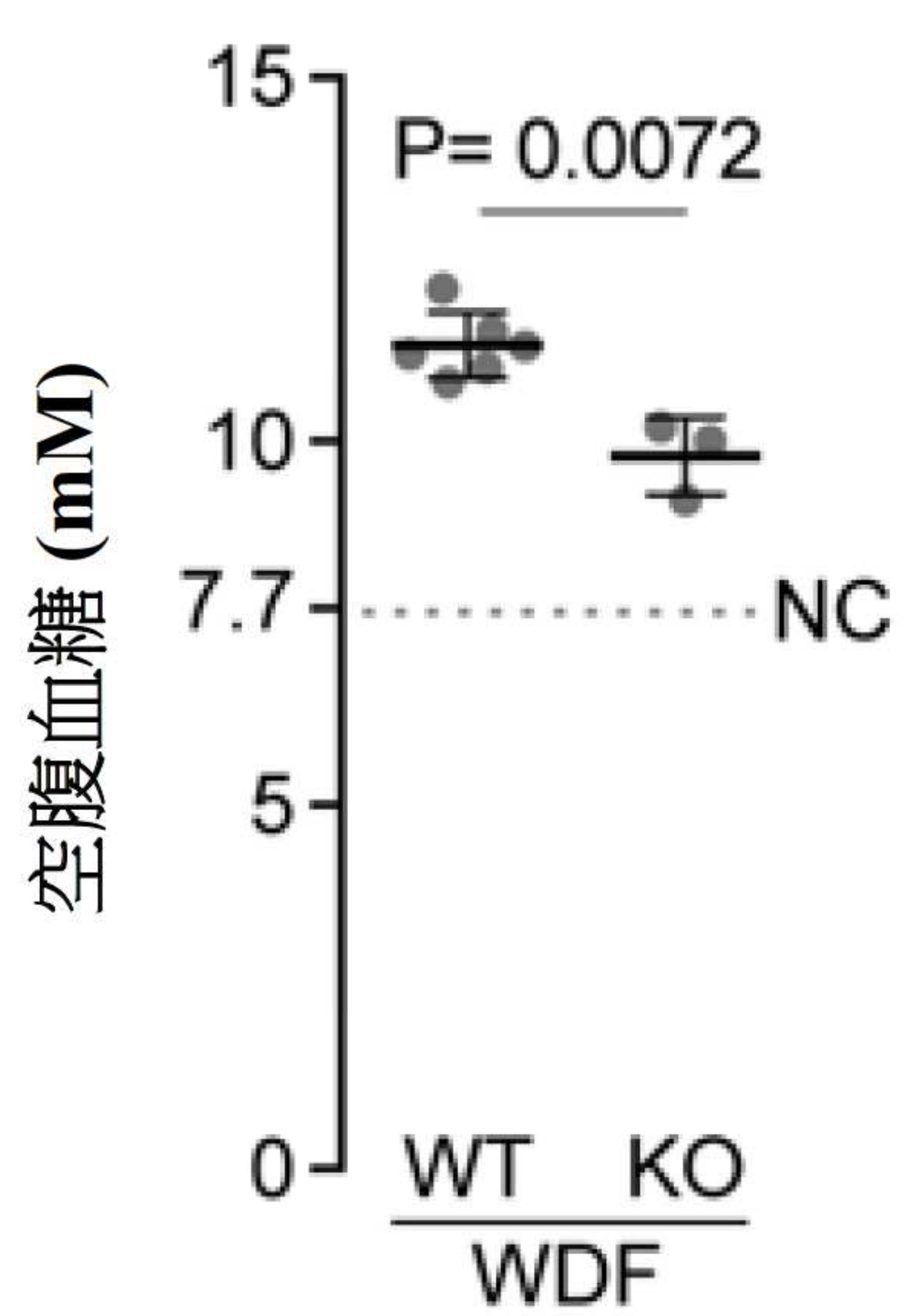
【圖18I】



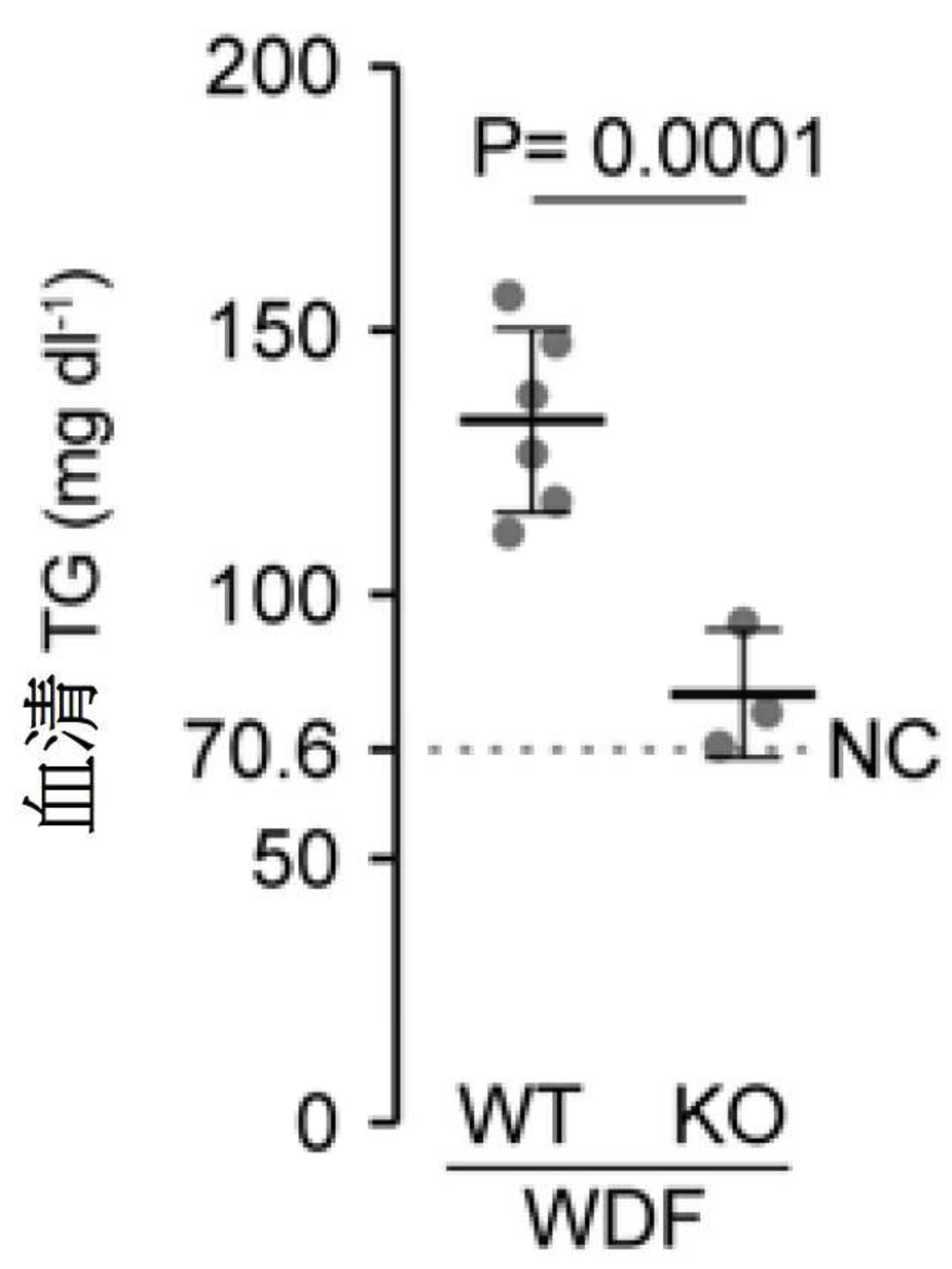
【圖18J】



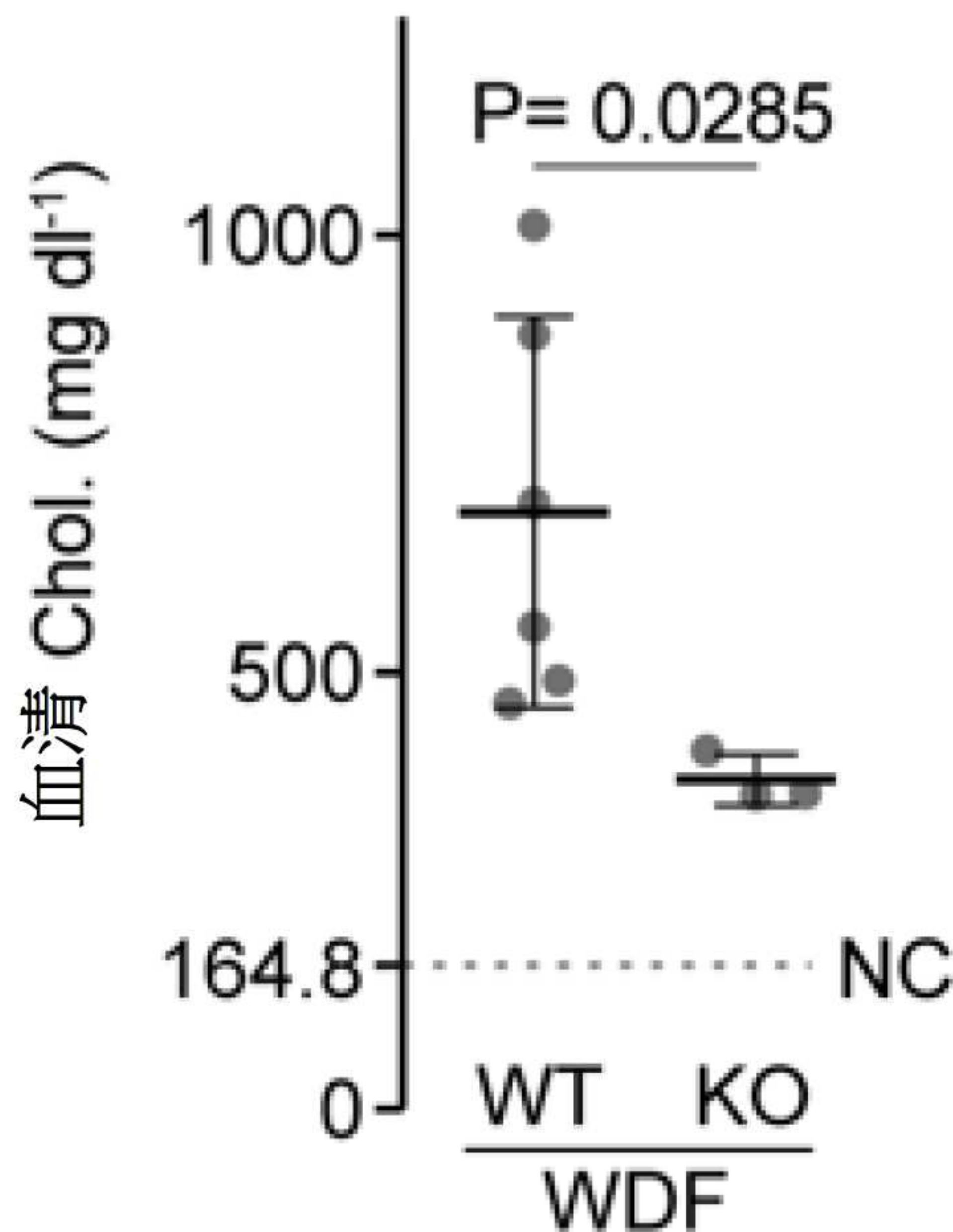
【圖18K】



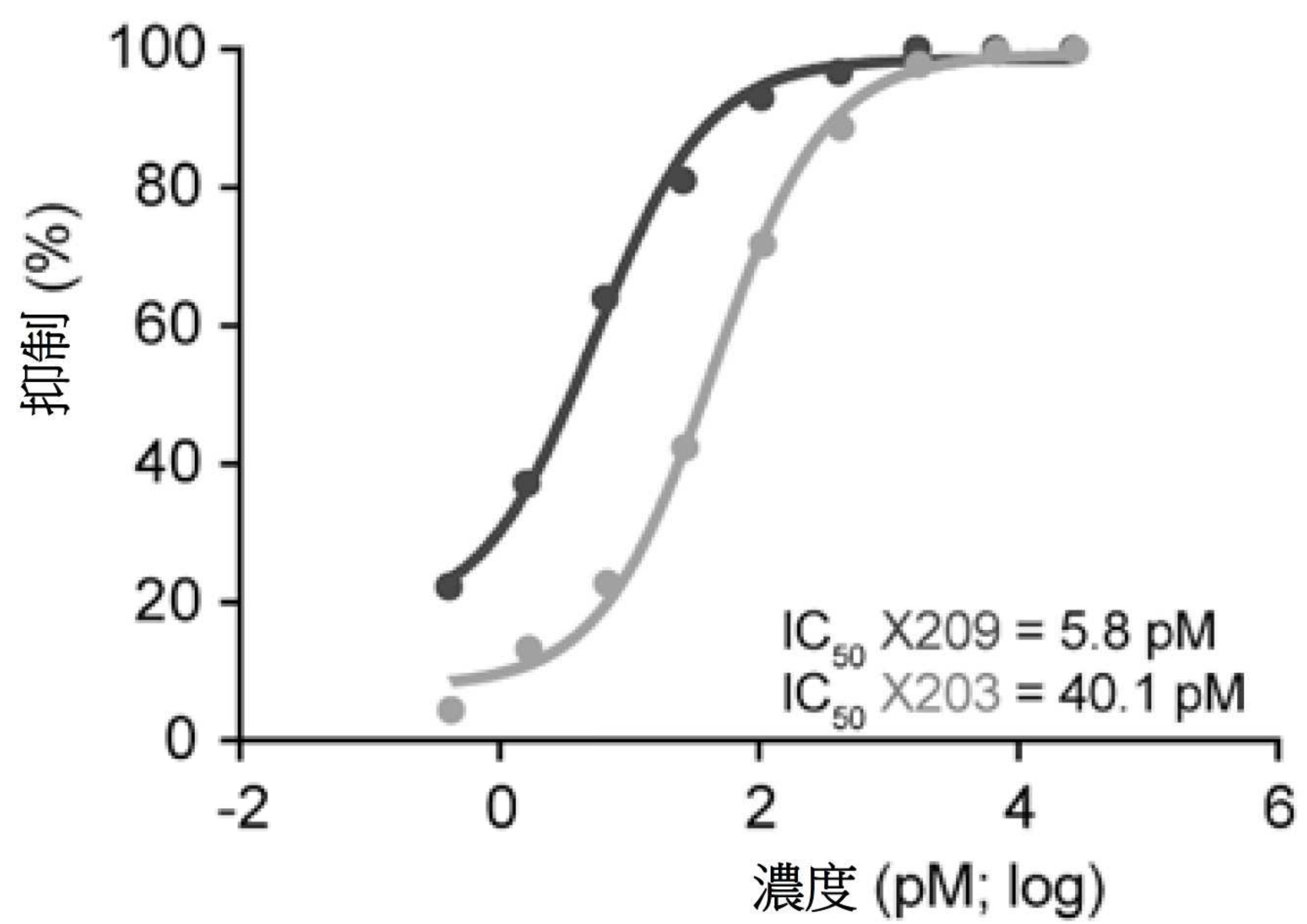
【圖18L】



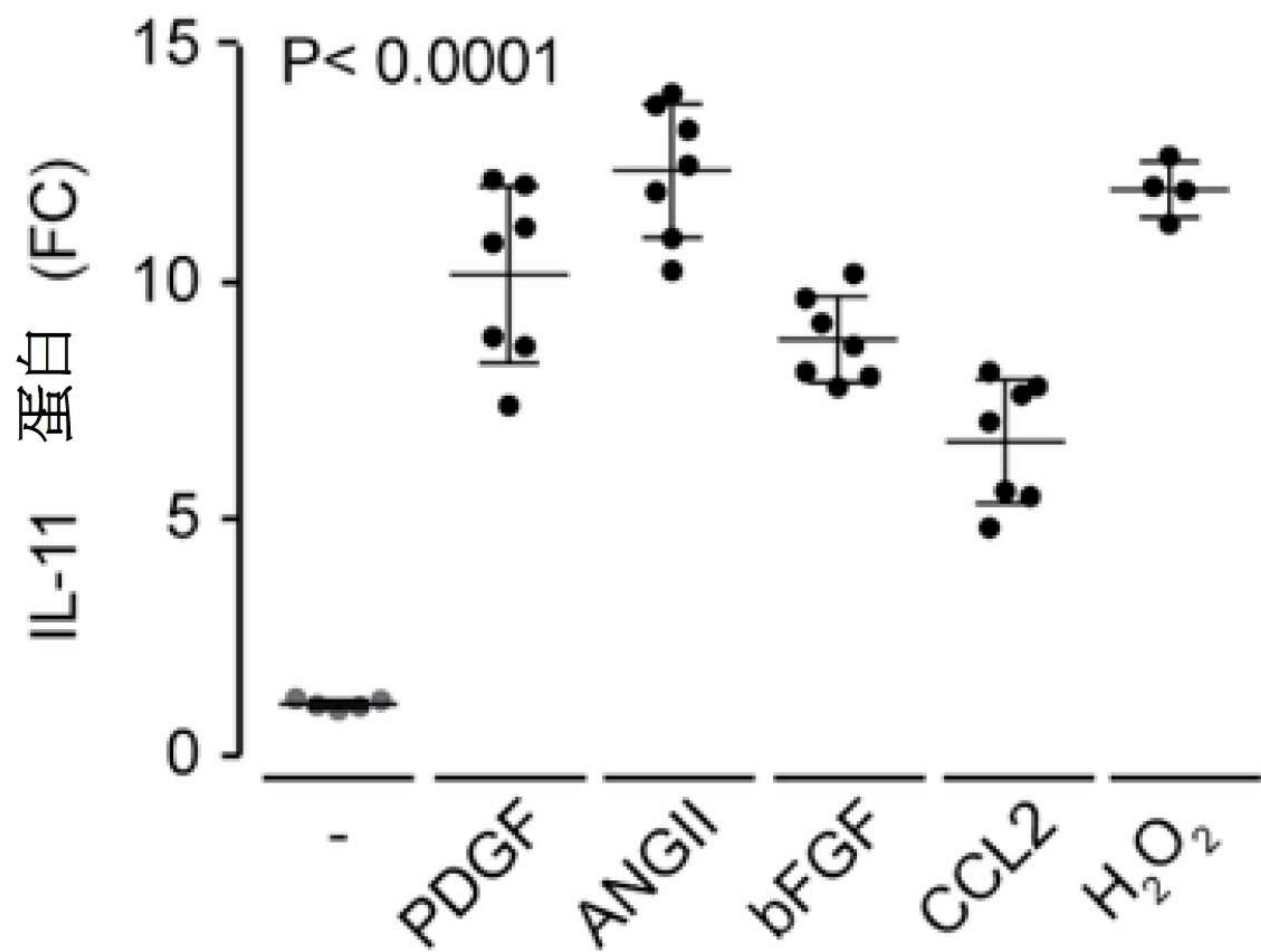
【圖18M】



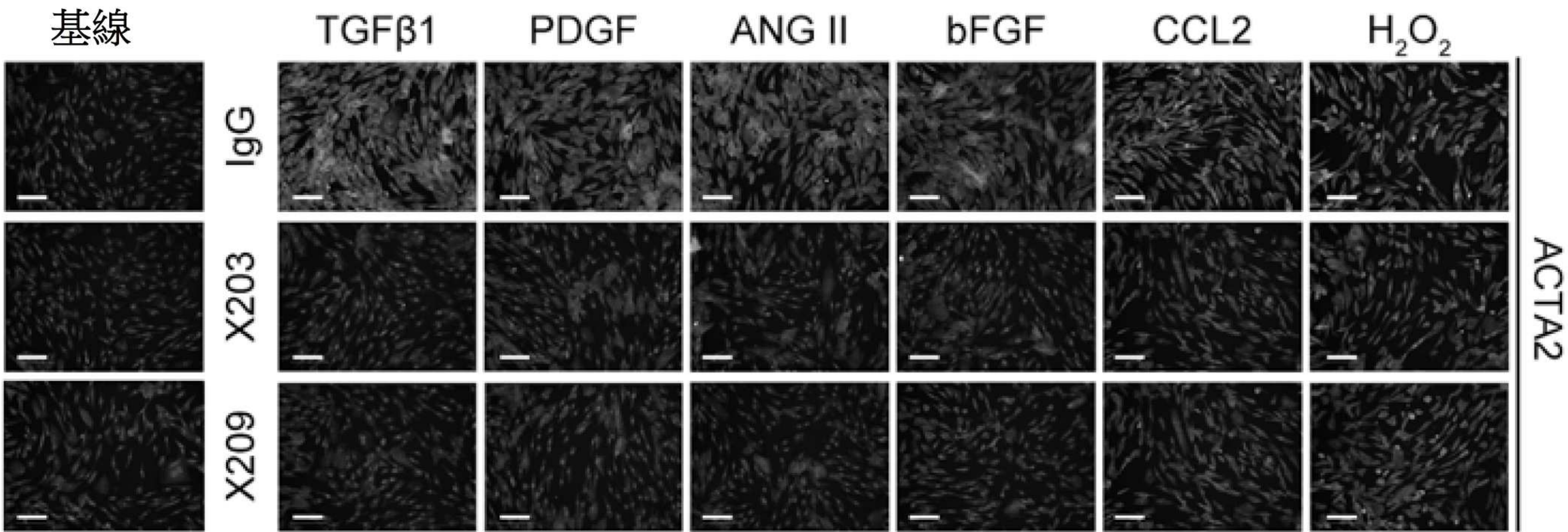
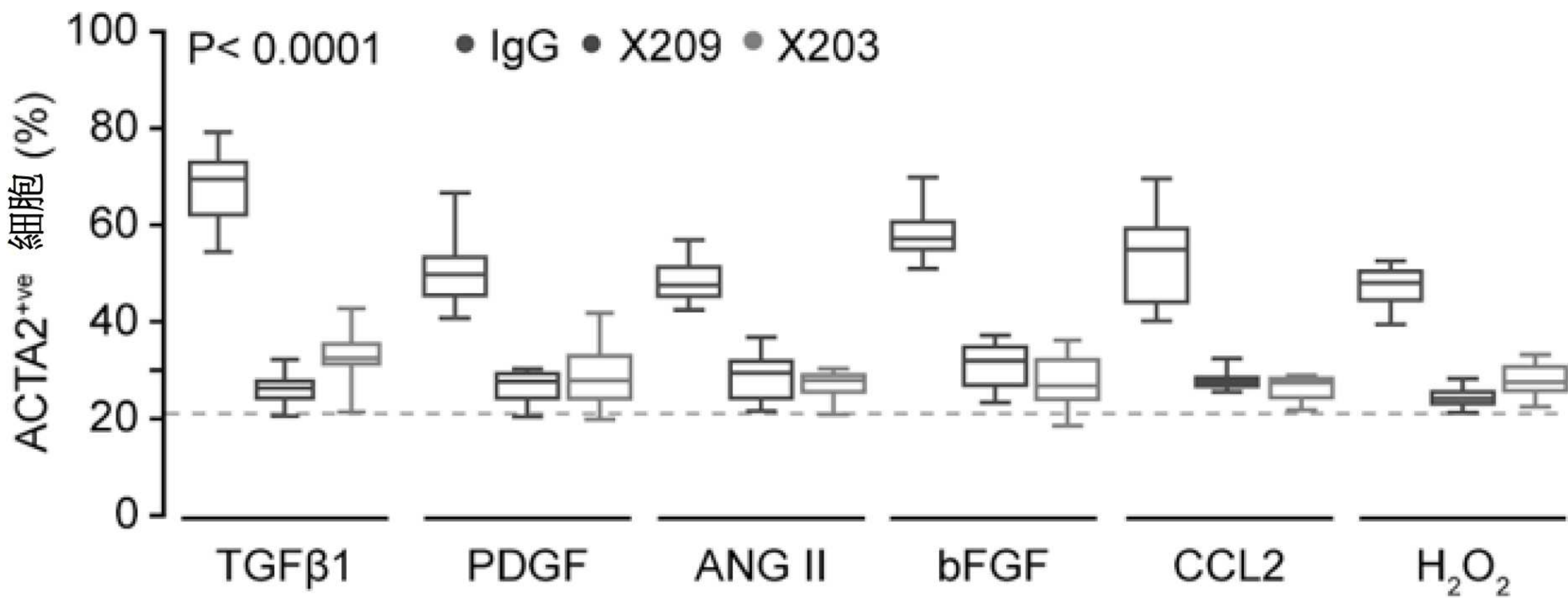
【圖18N】



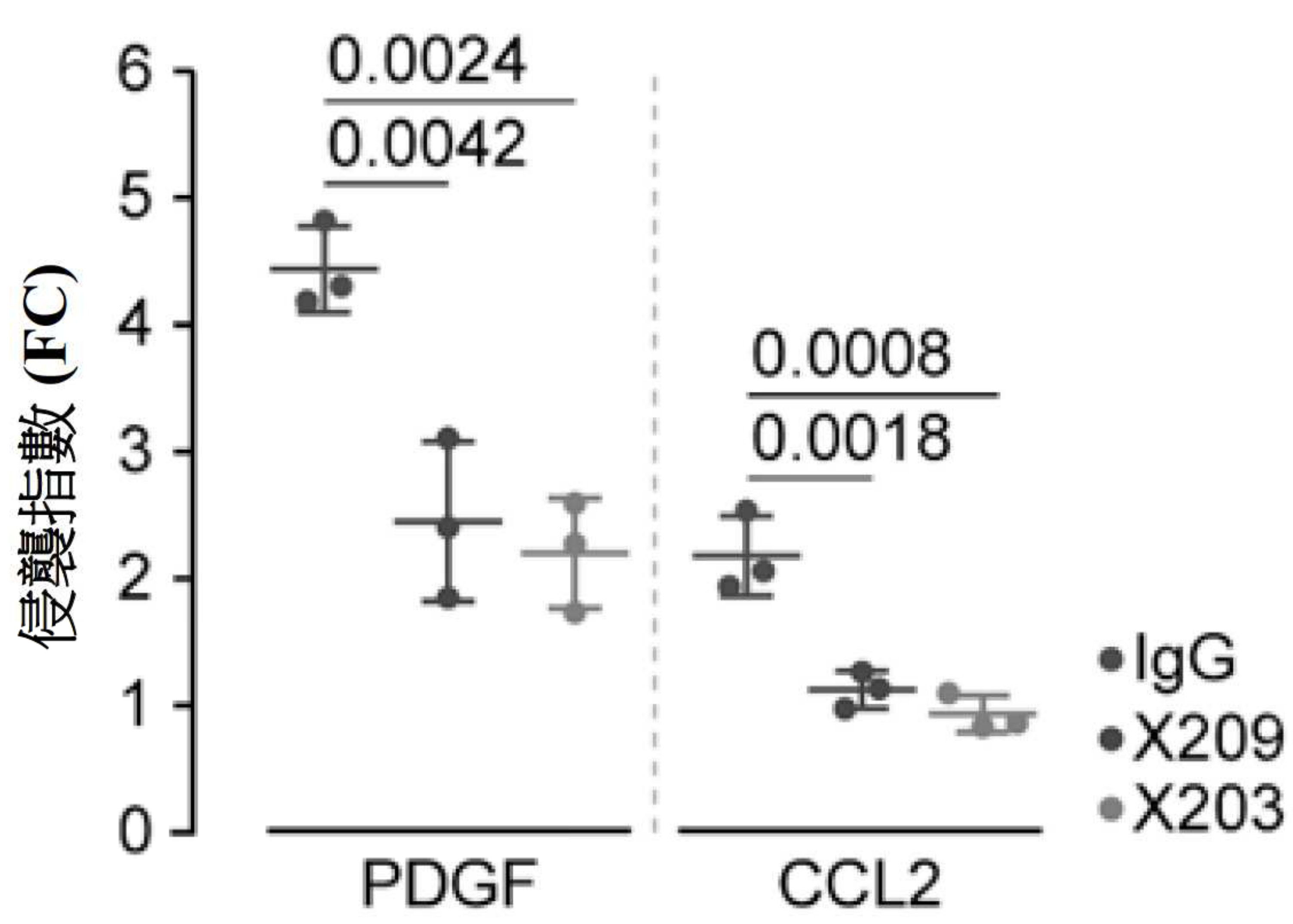
【圖19A】



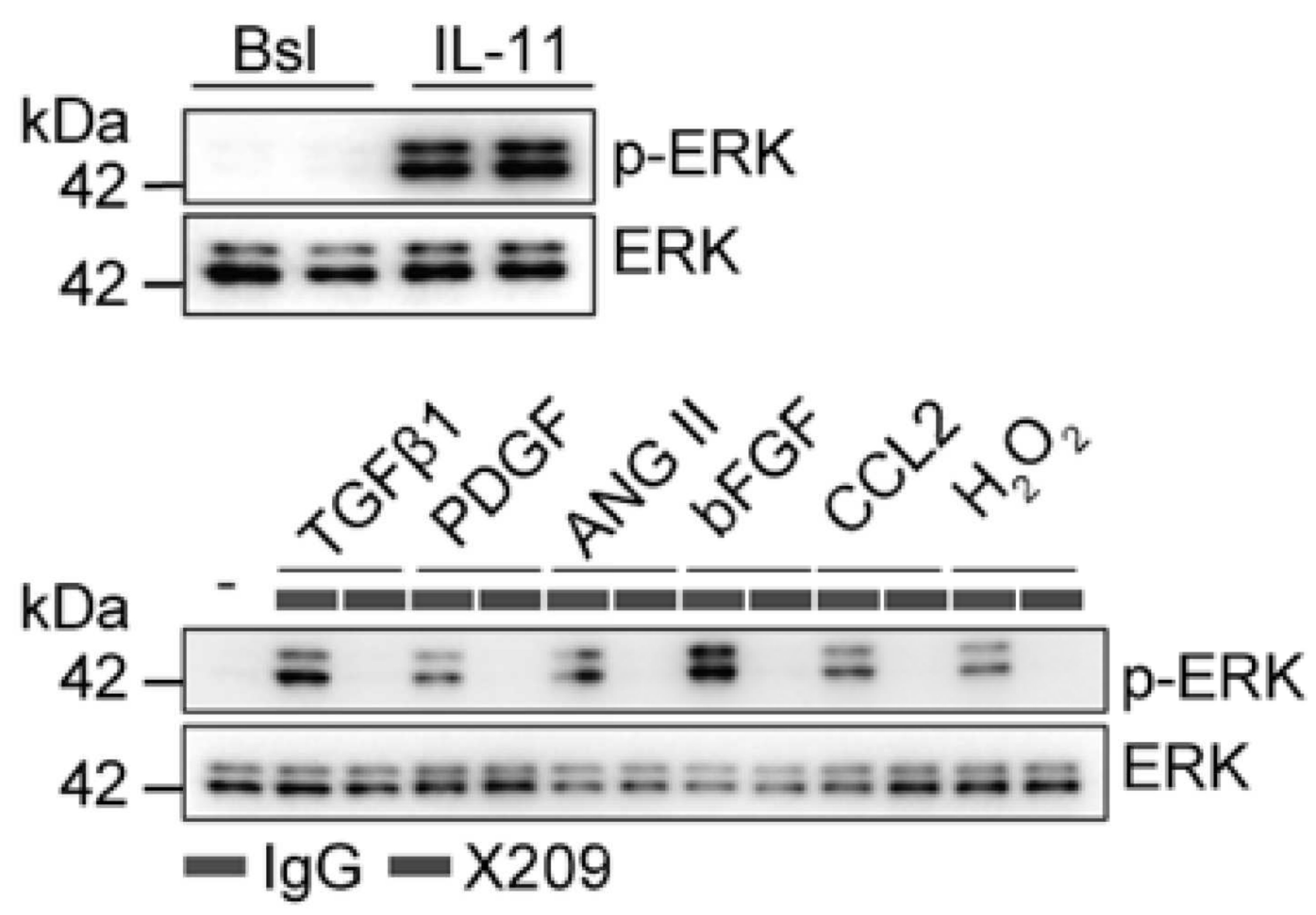
【圖19B】



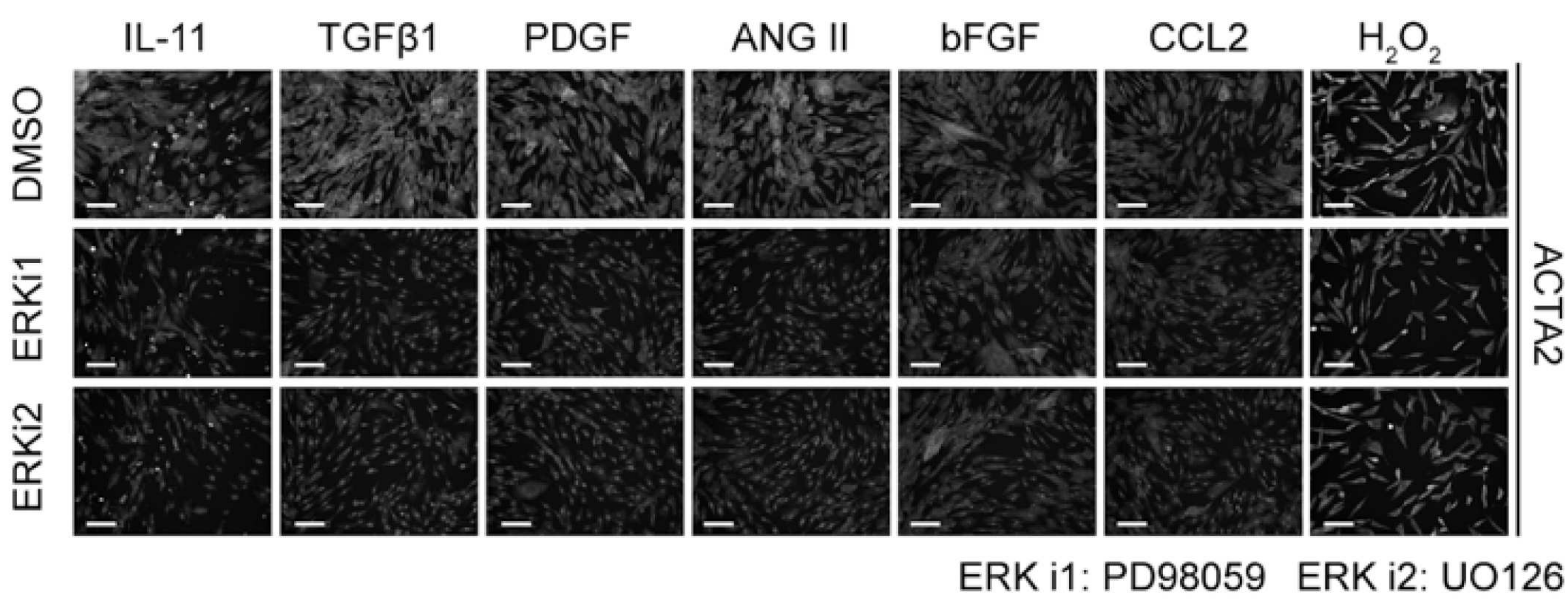
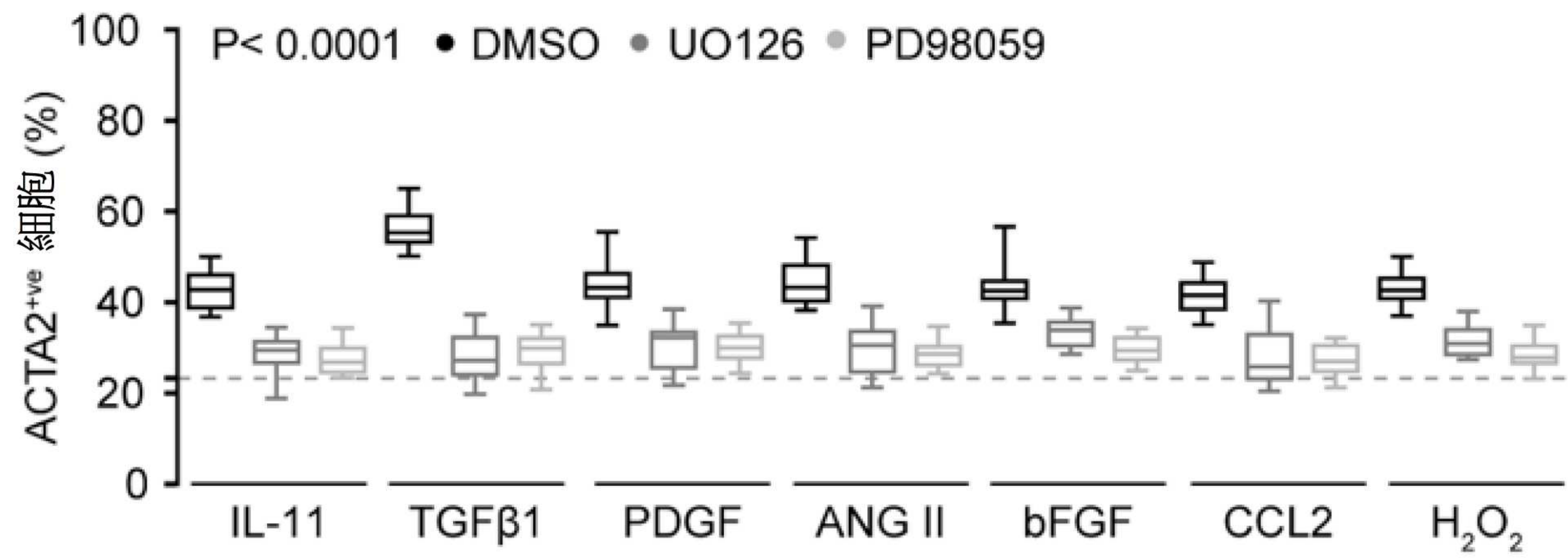
【圖19C】



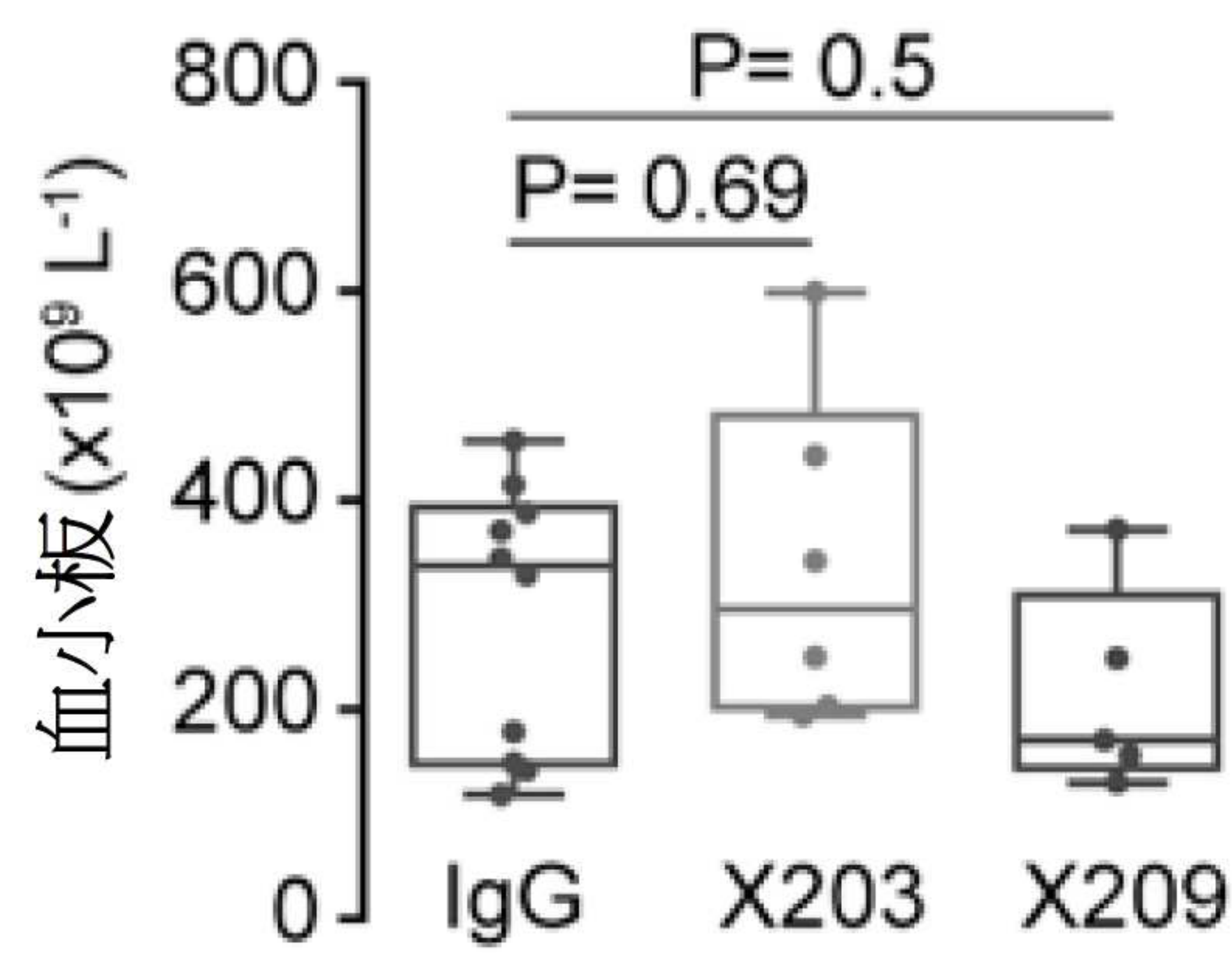
【圖19D】



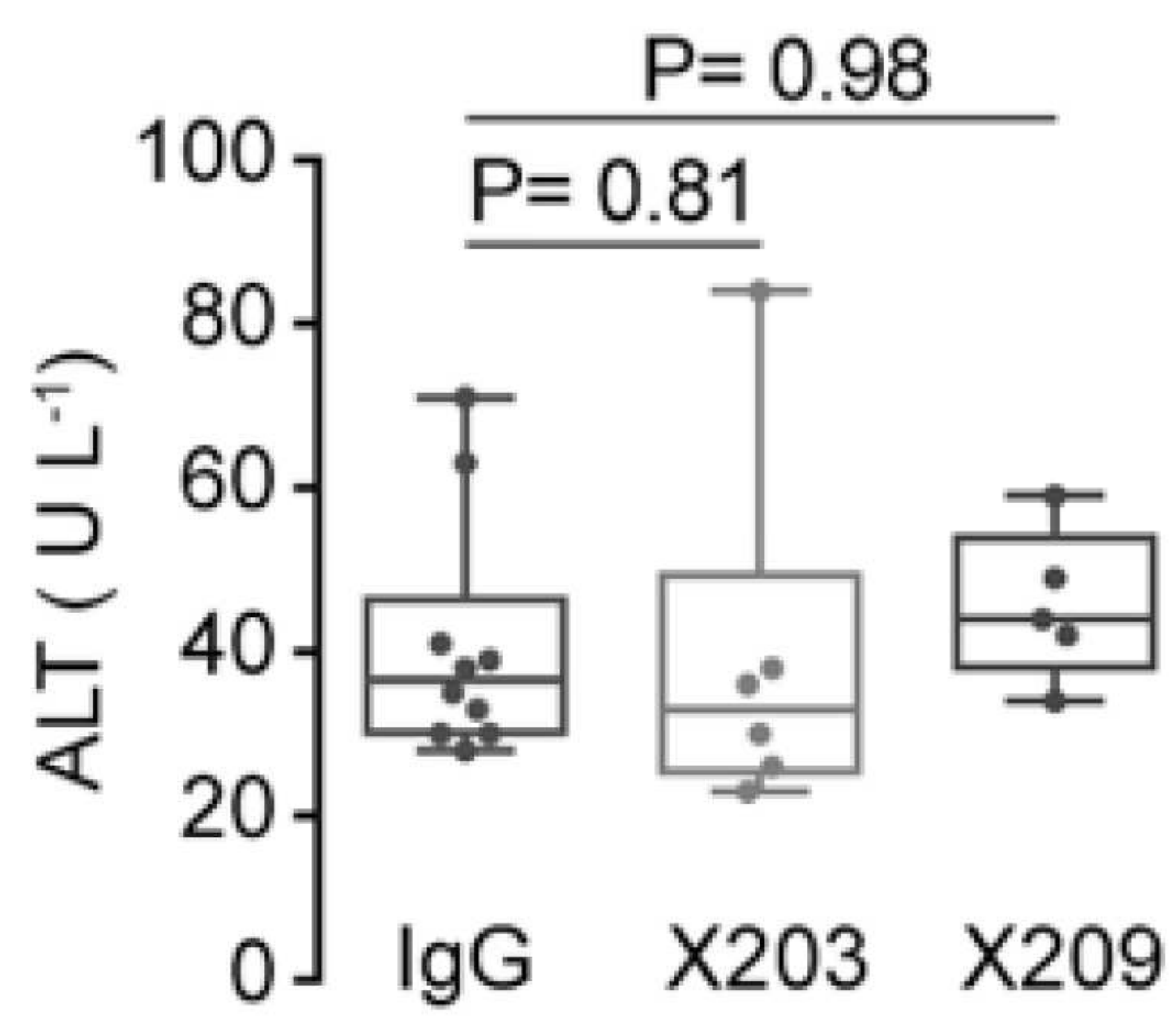
【圖19E】



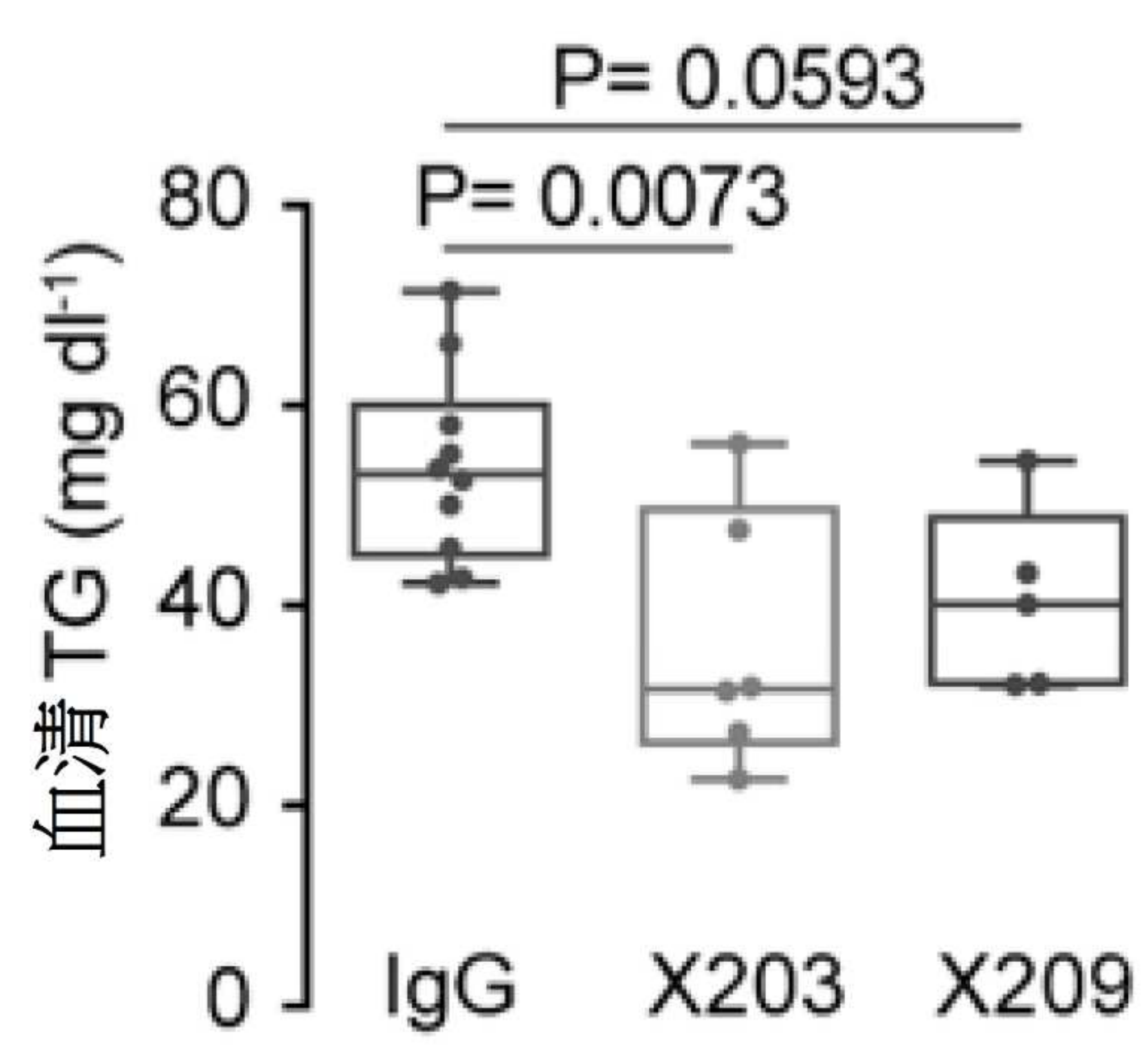
【圖19F】



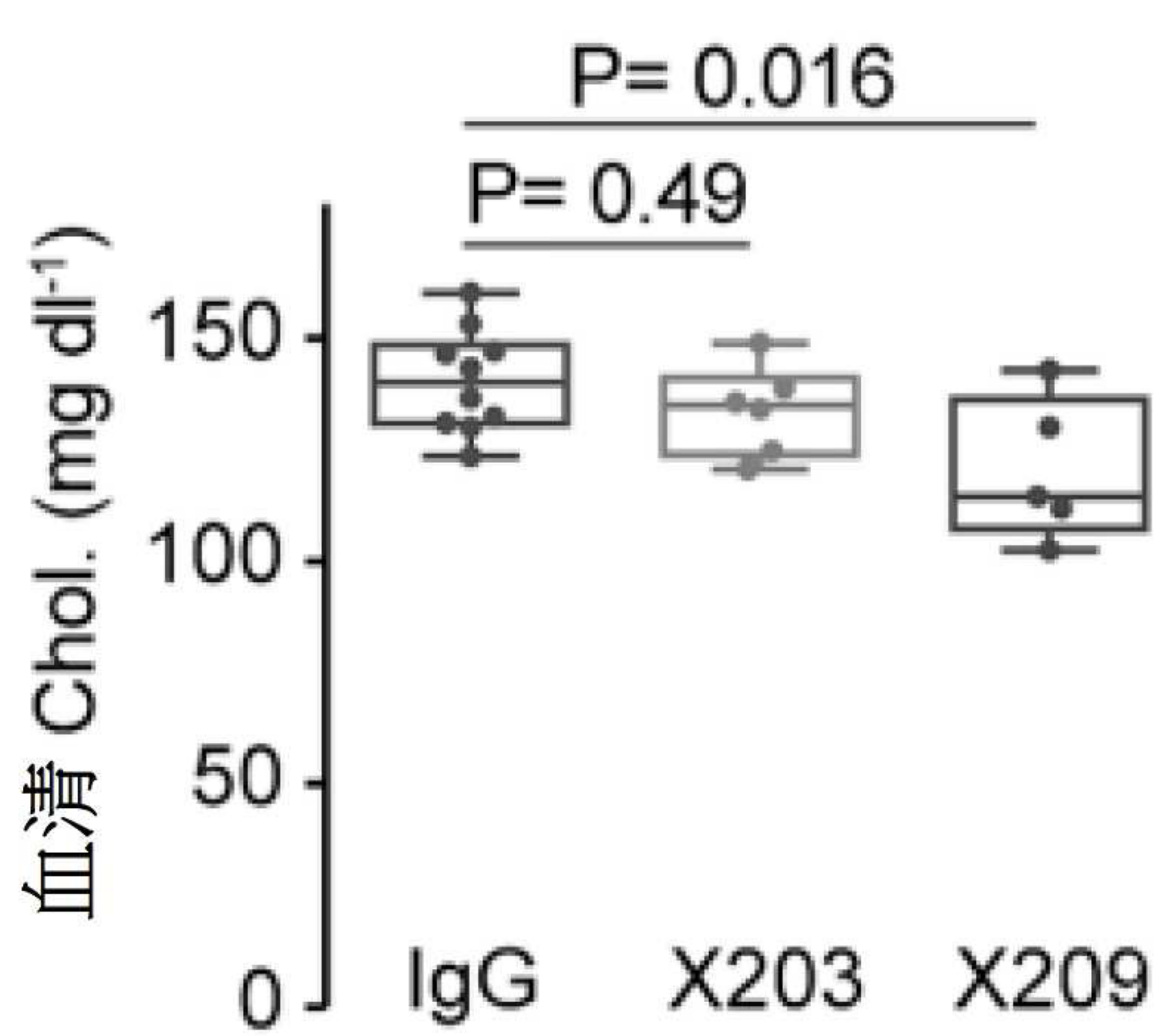
【圖19G】



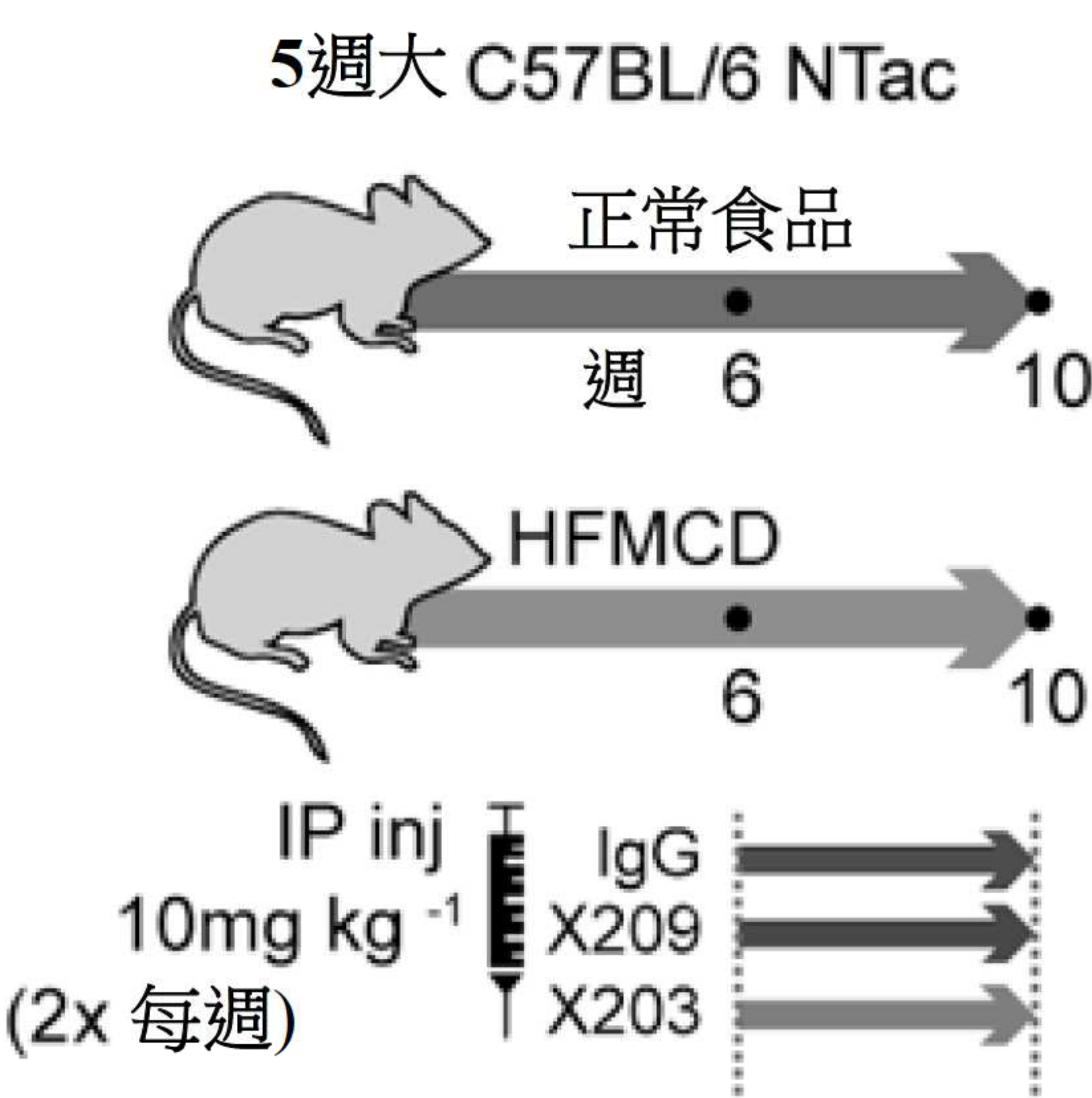
【圖19H】



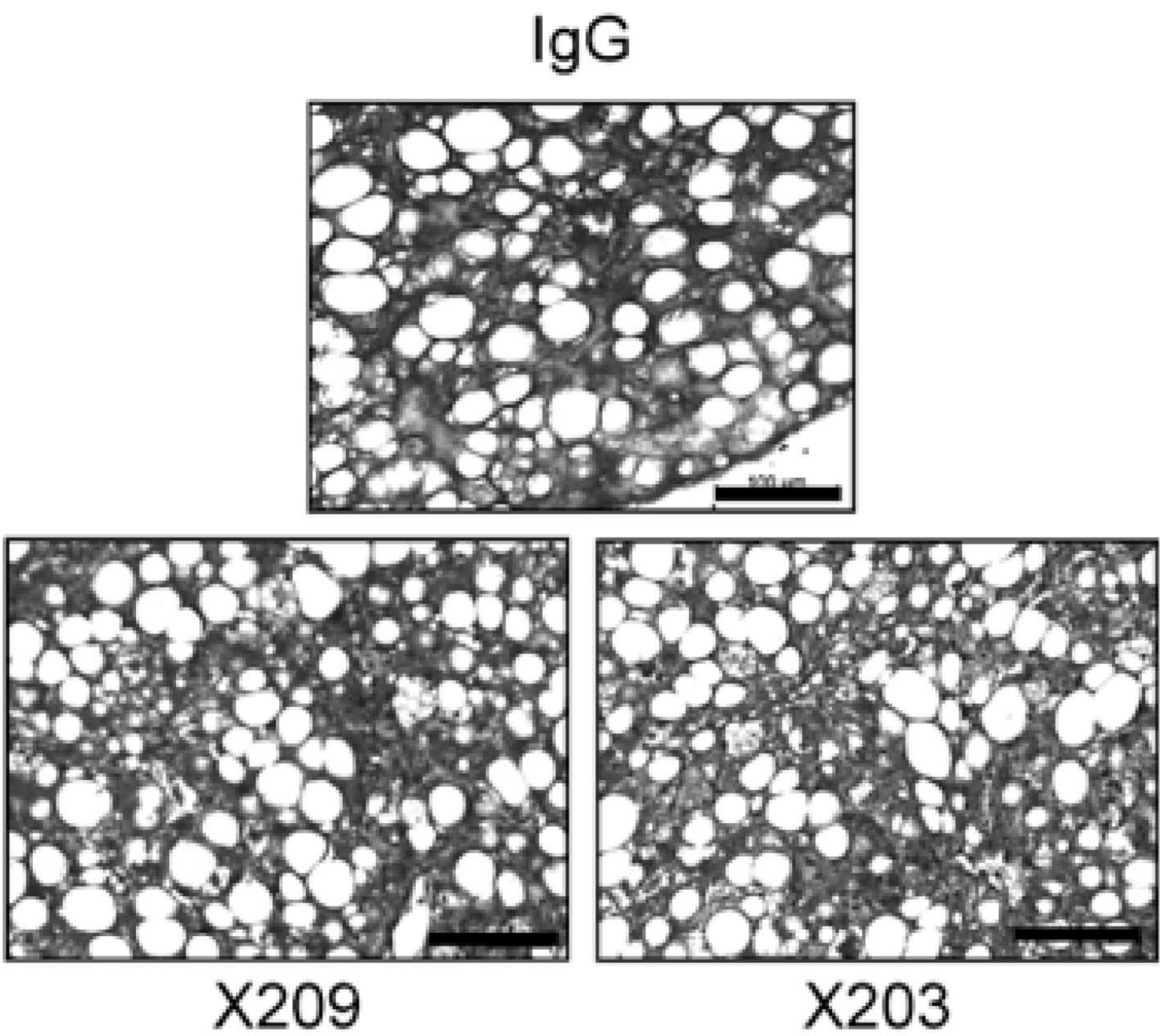
【圖19I】



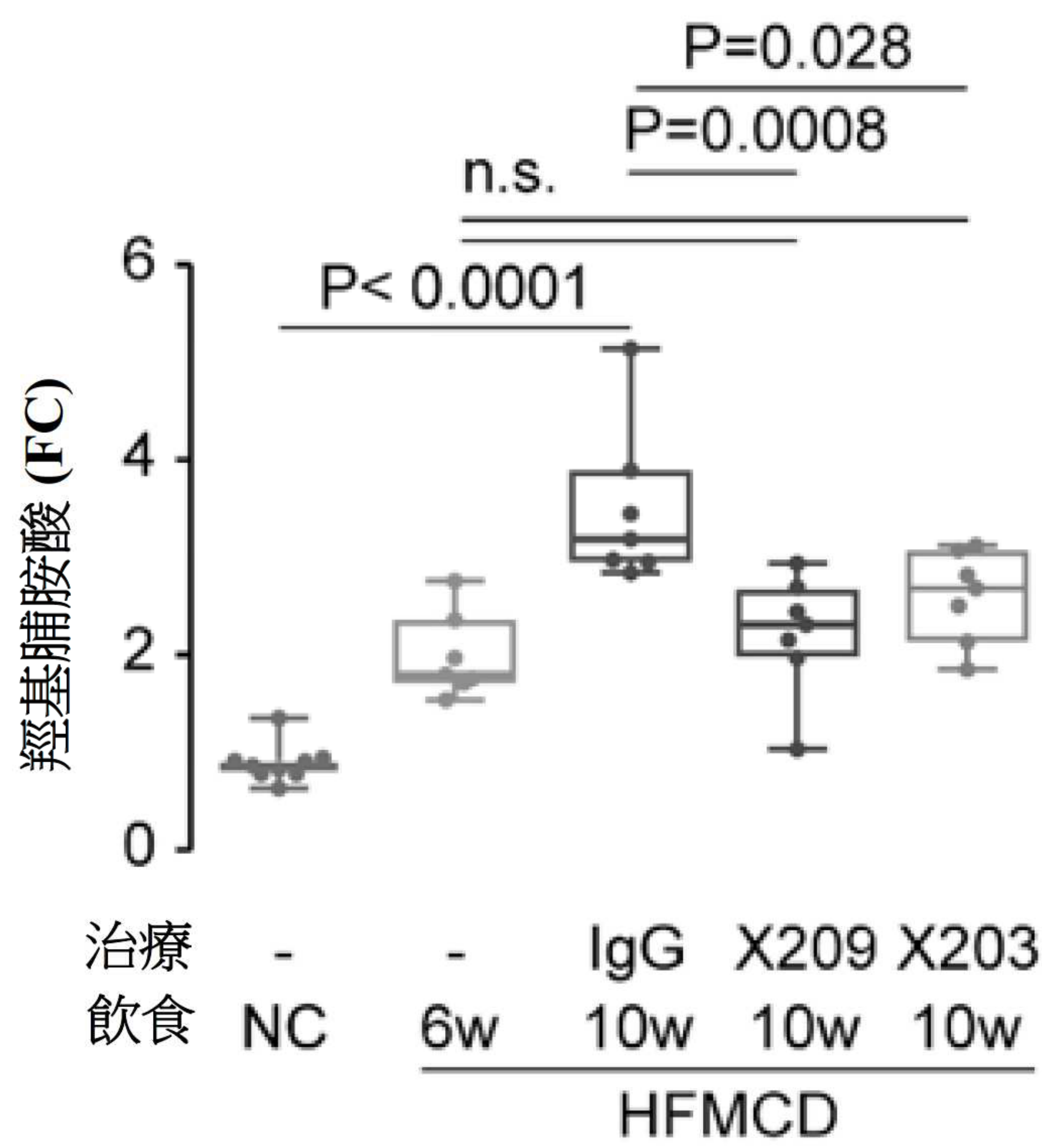
【圖19J】



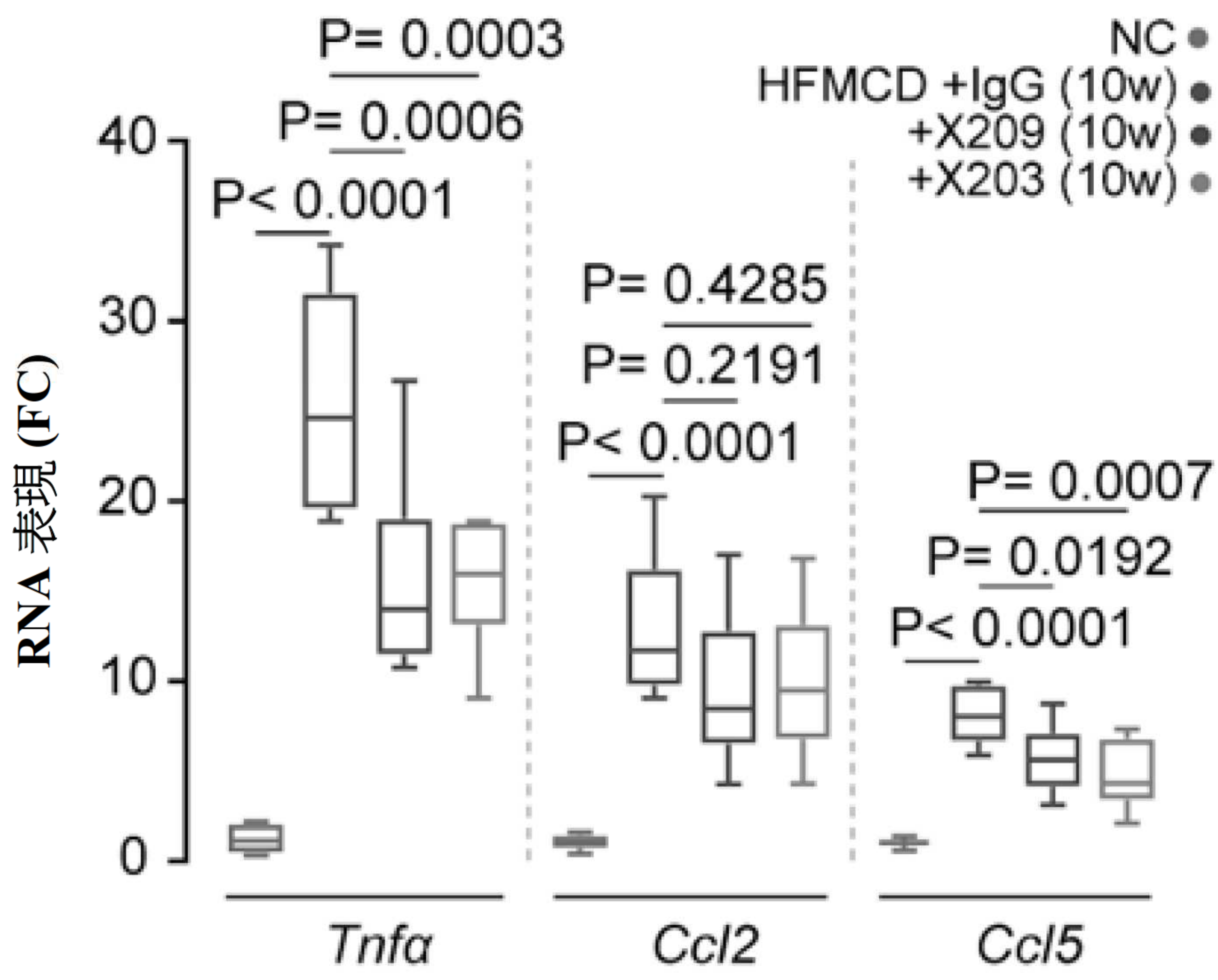
【圖20A】



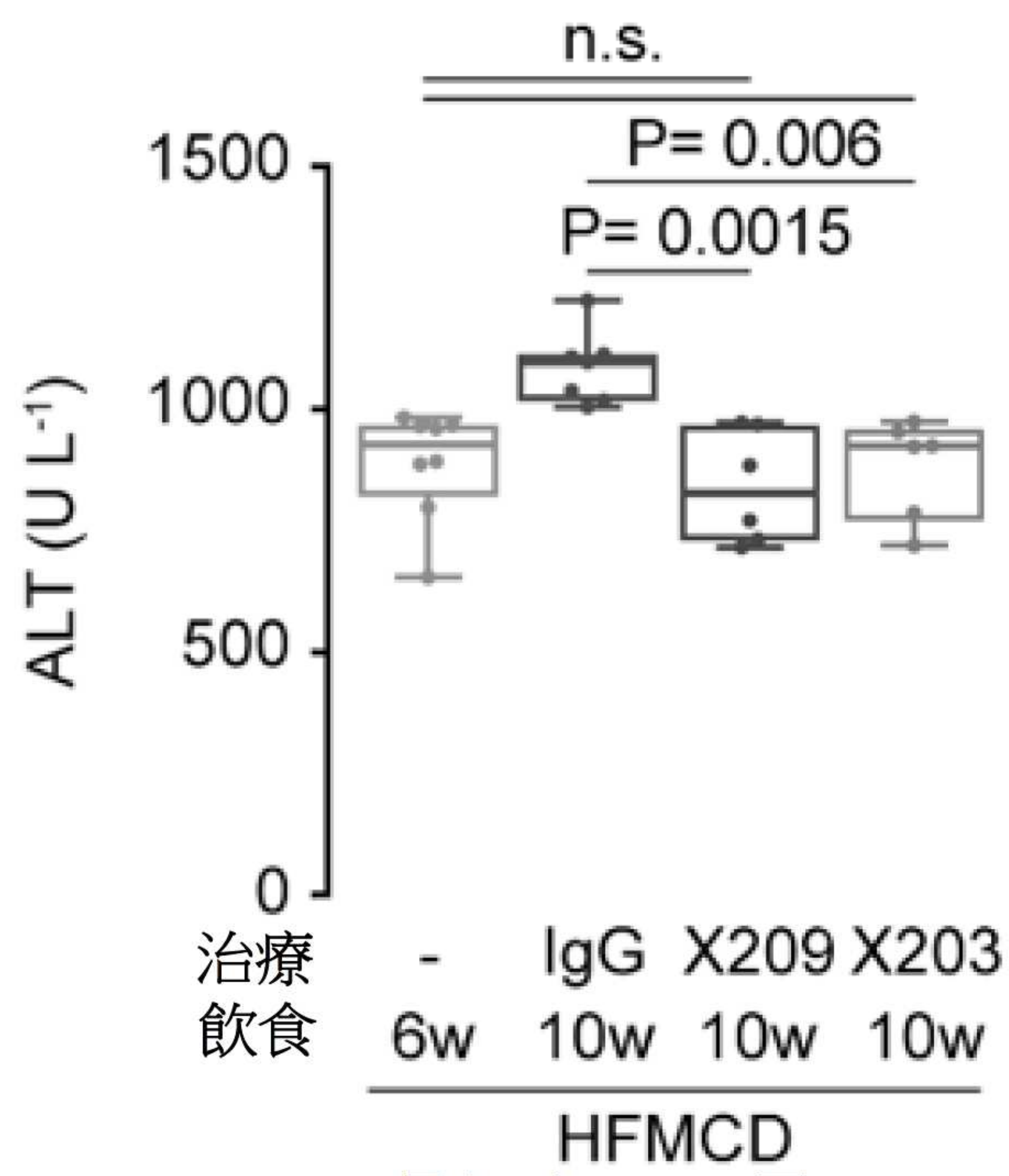
【圖20B】



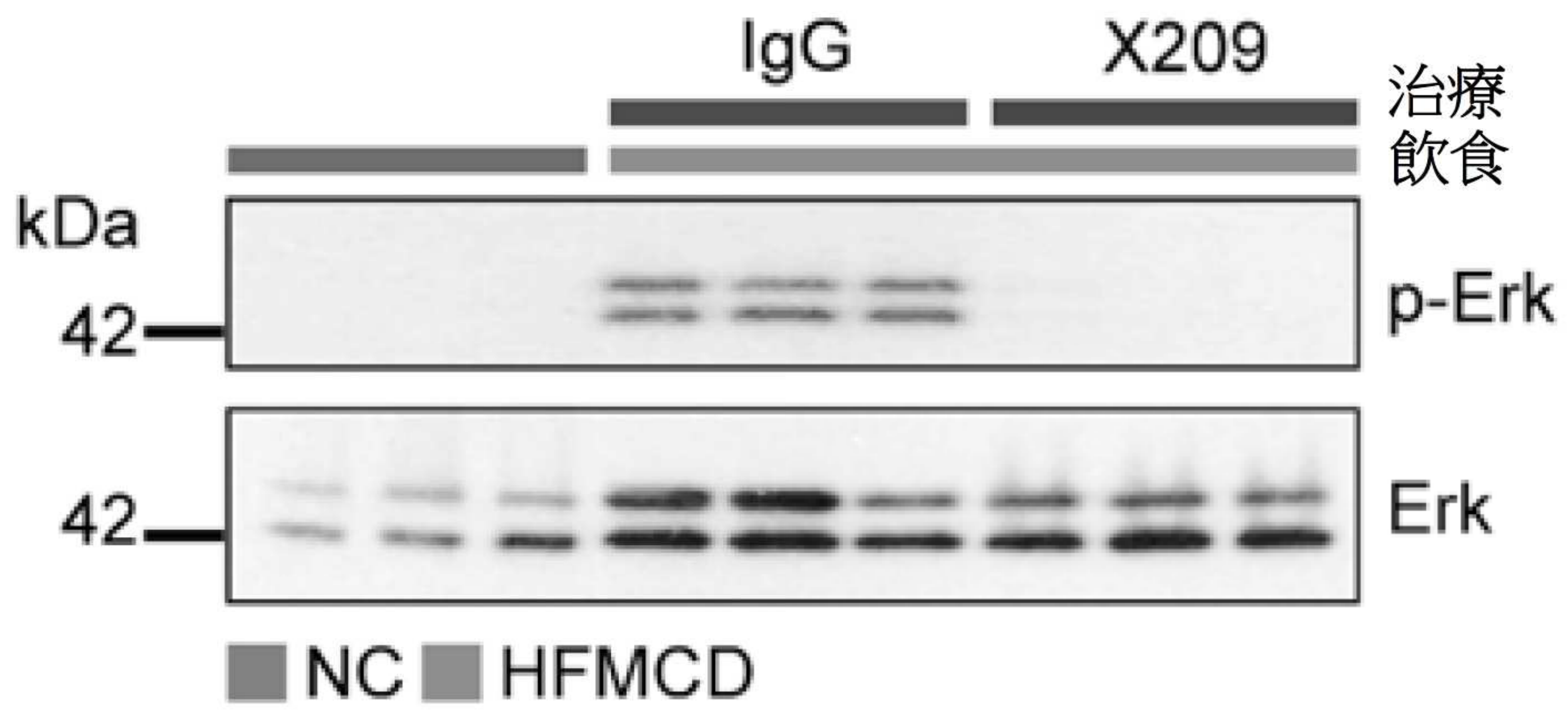
【圖20C】



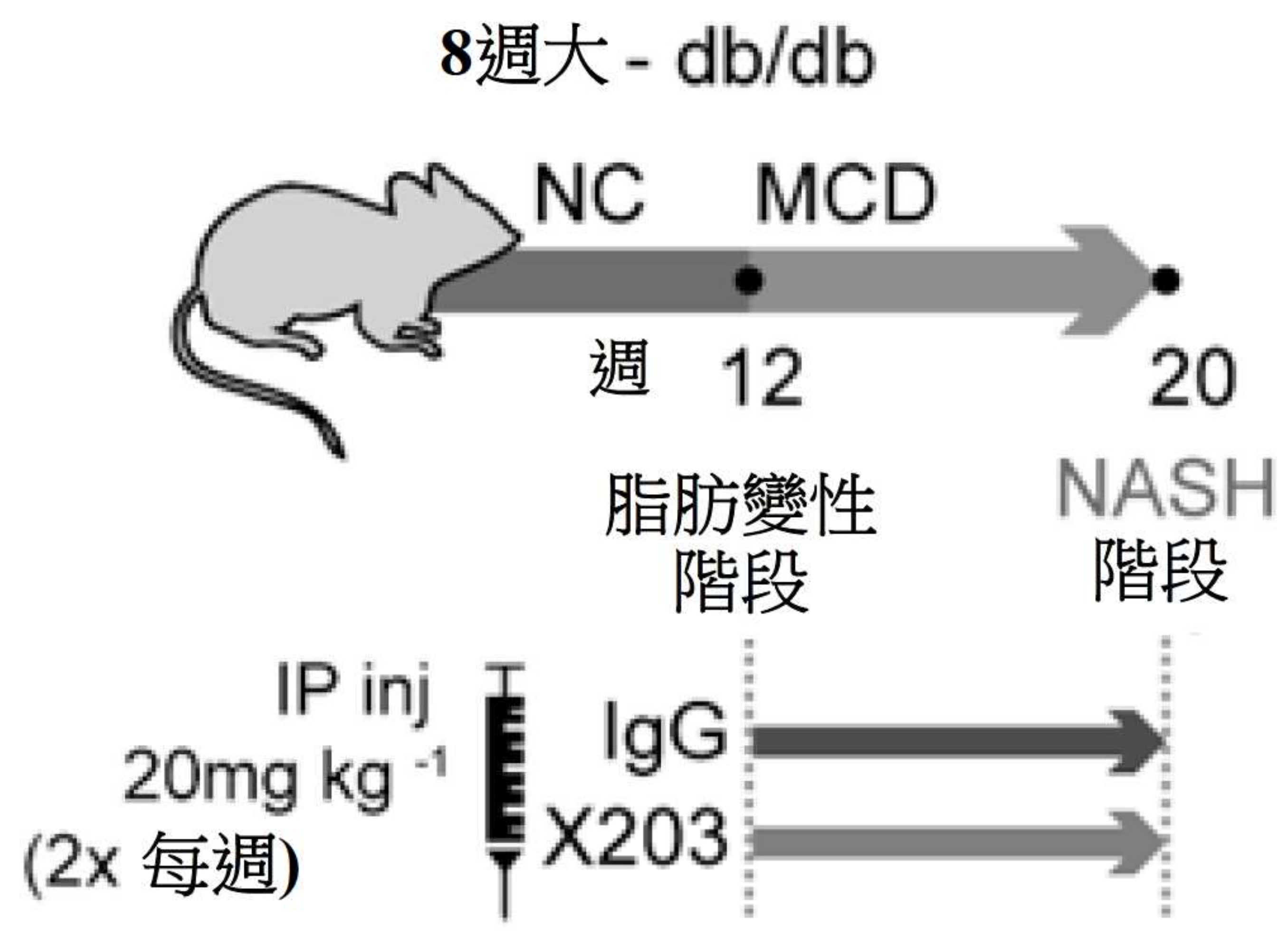
【圖20D】



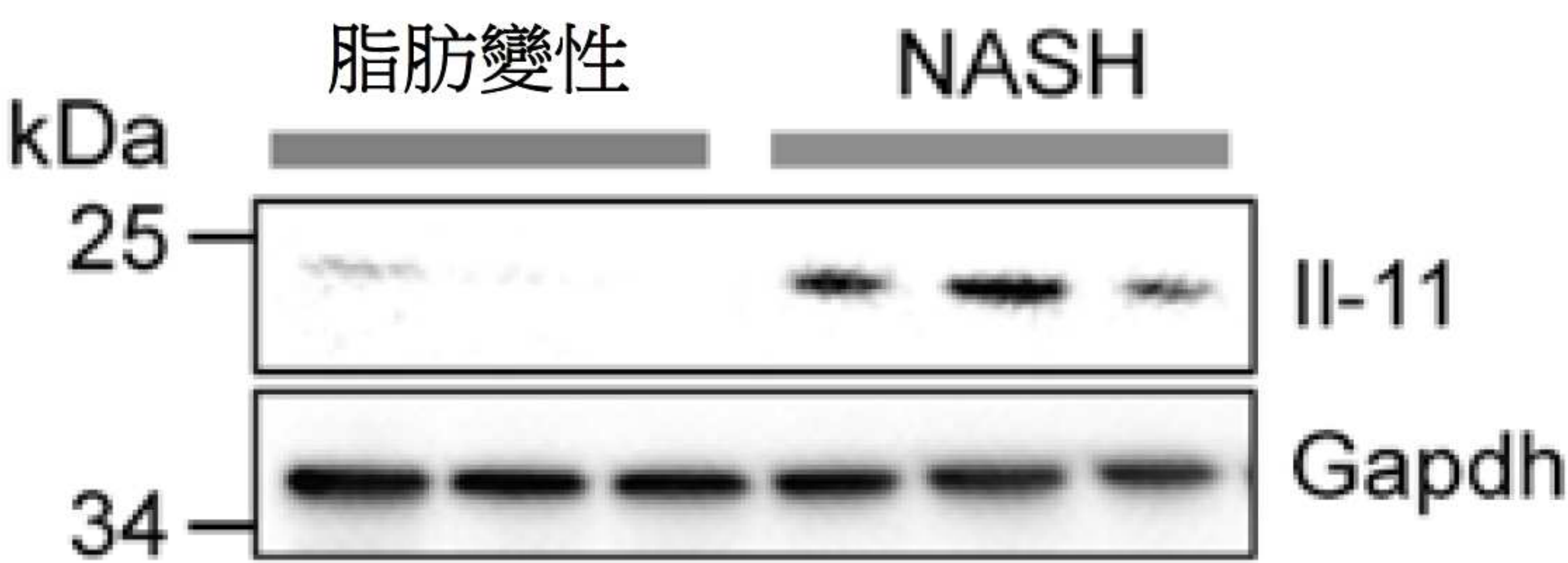
【圖20E】



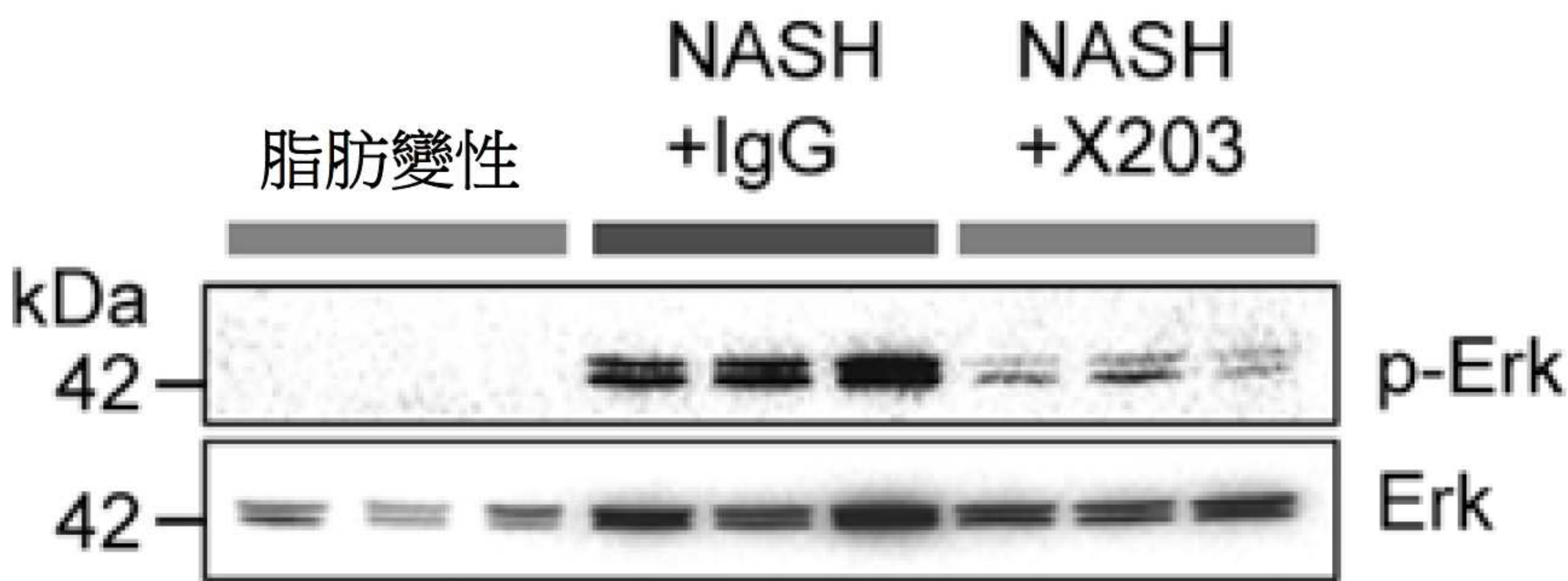
【圖20F】



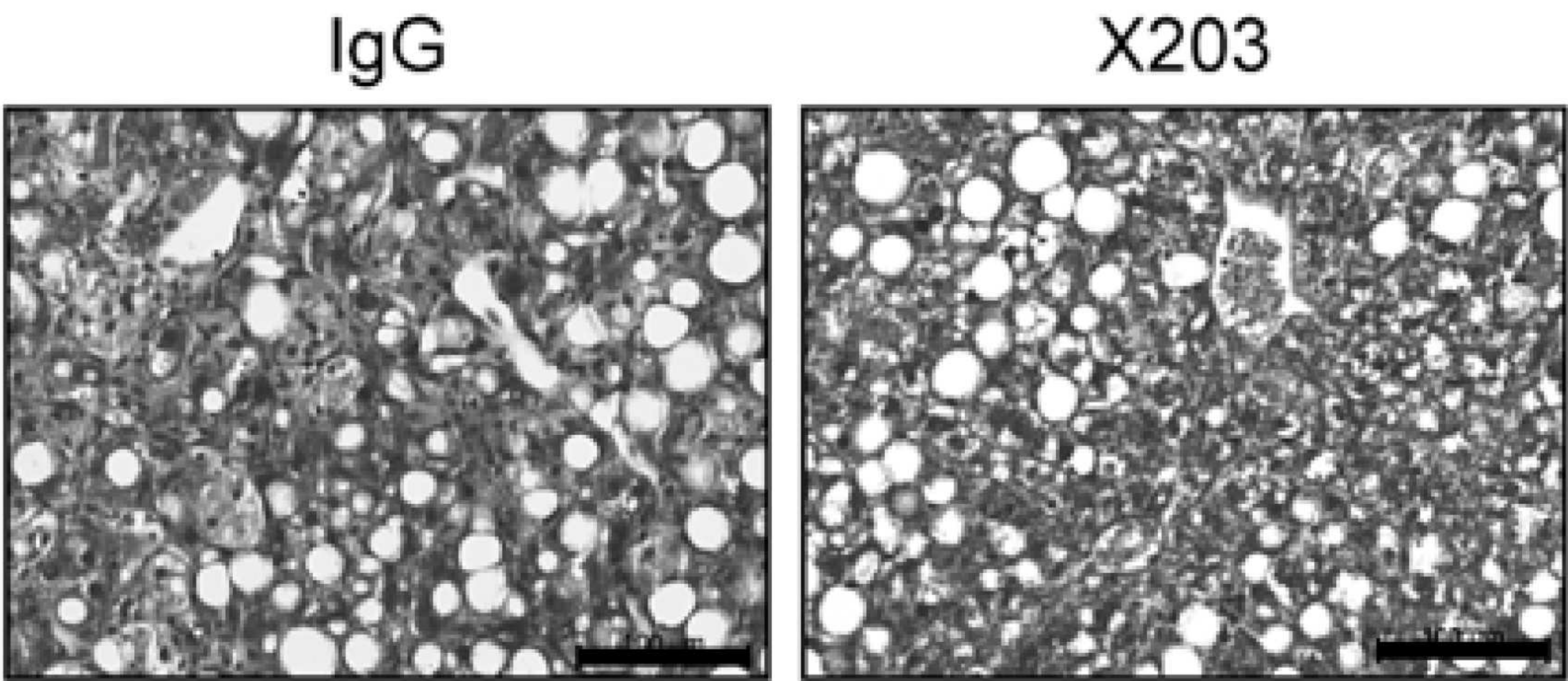
【圖20G】



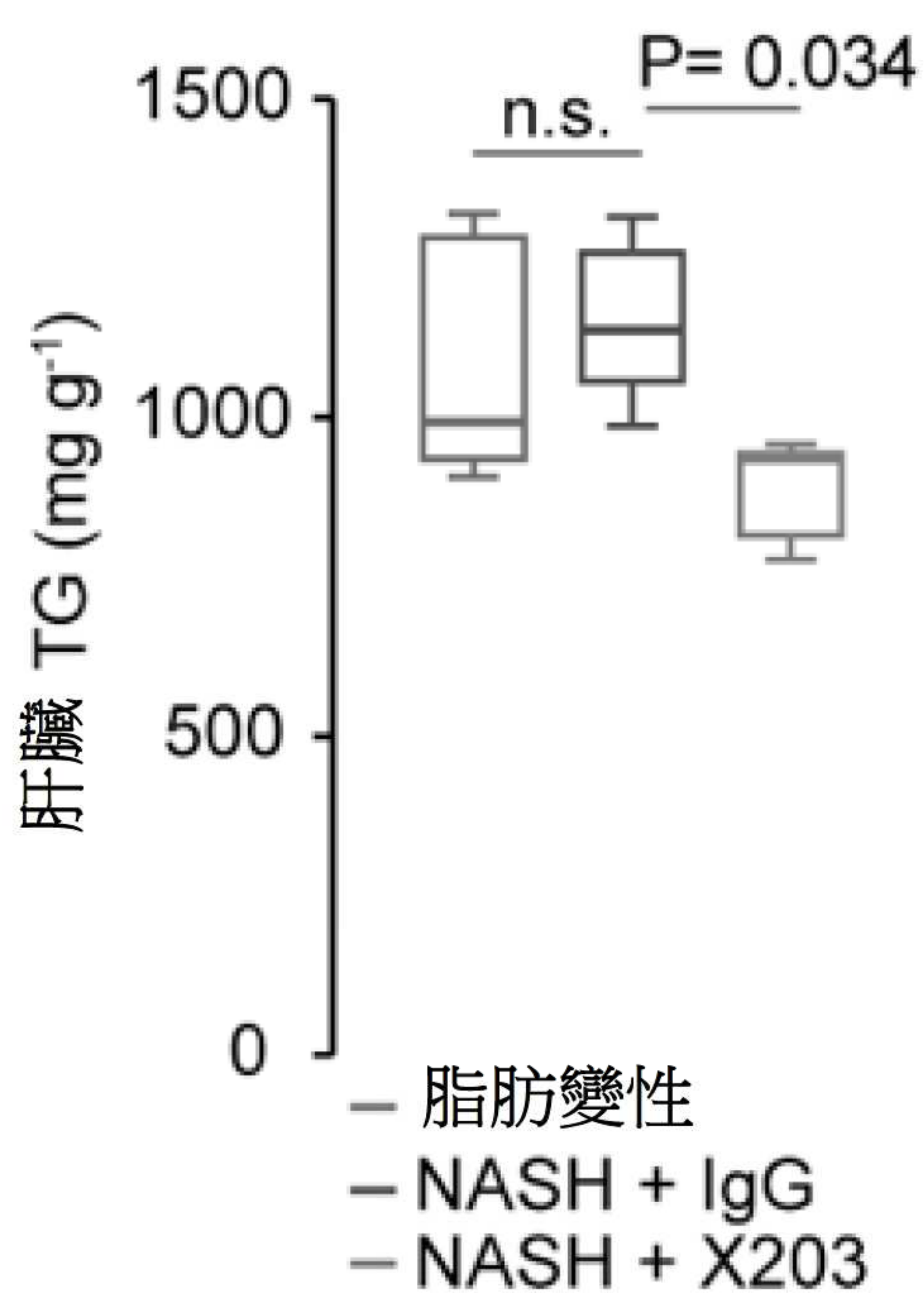
【圖20H】



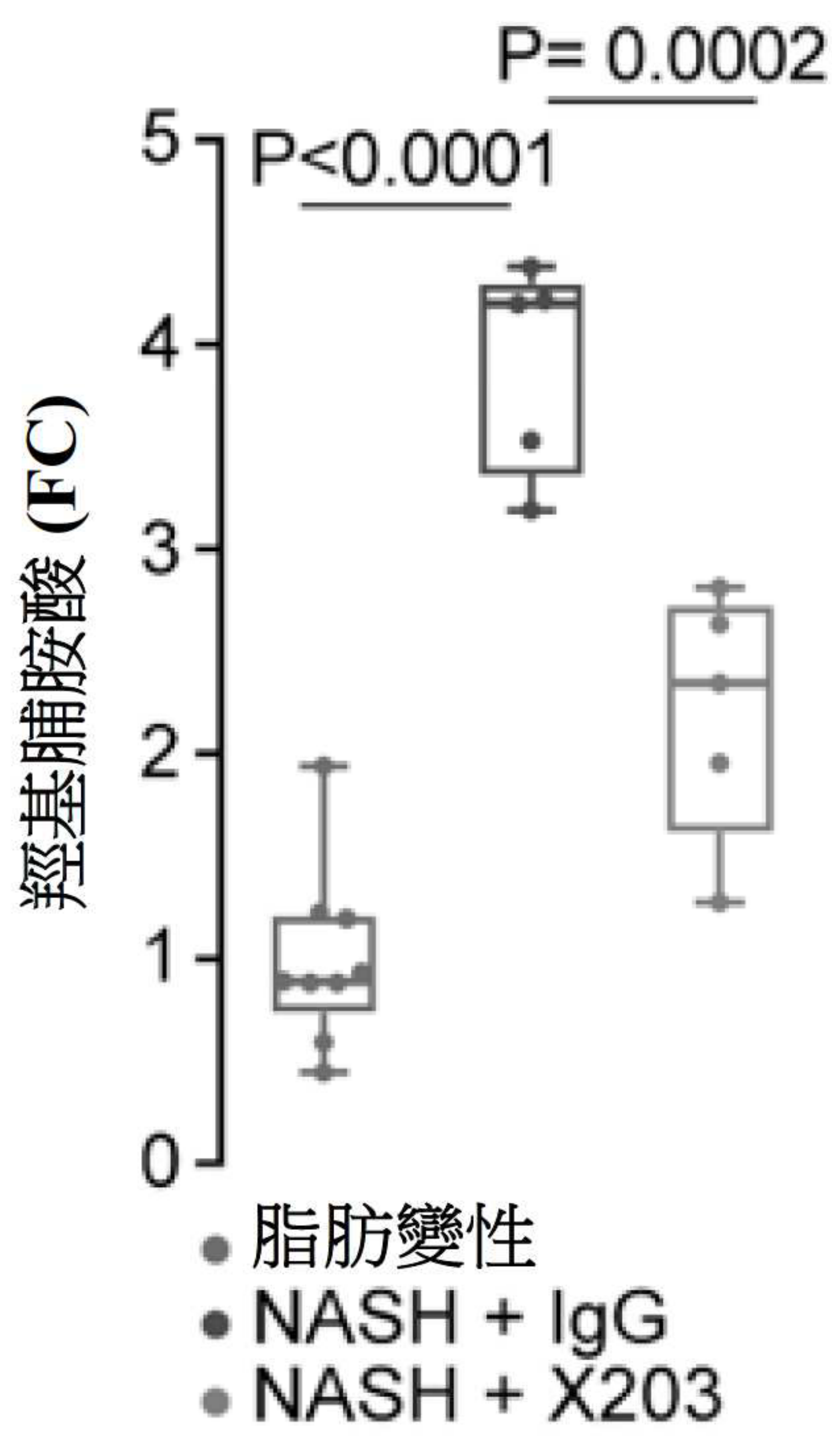
【圖20I】



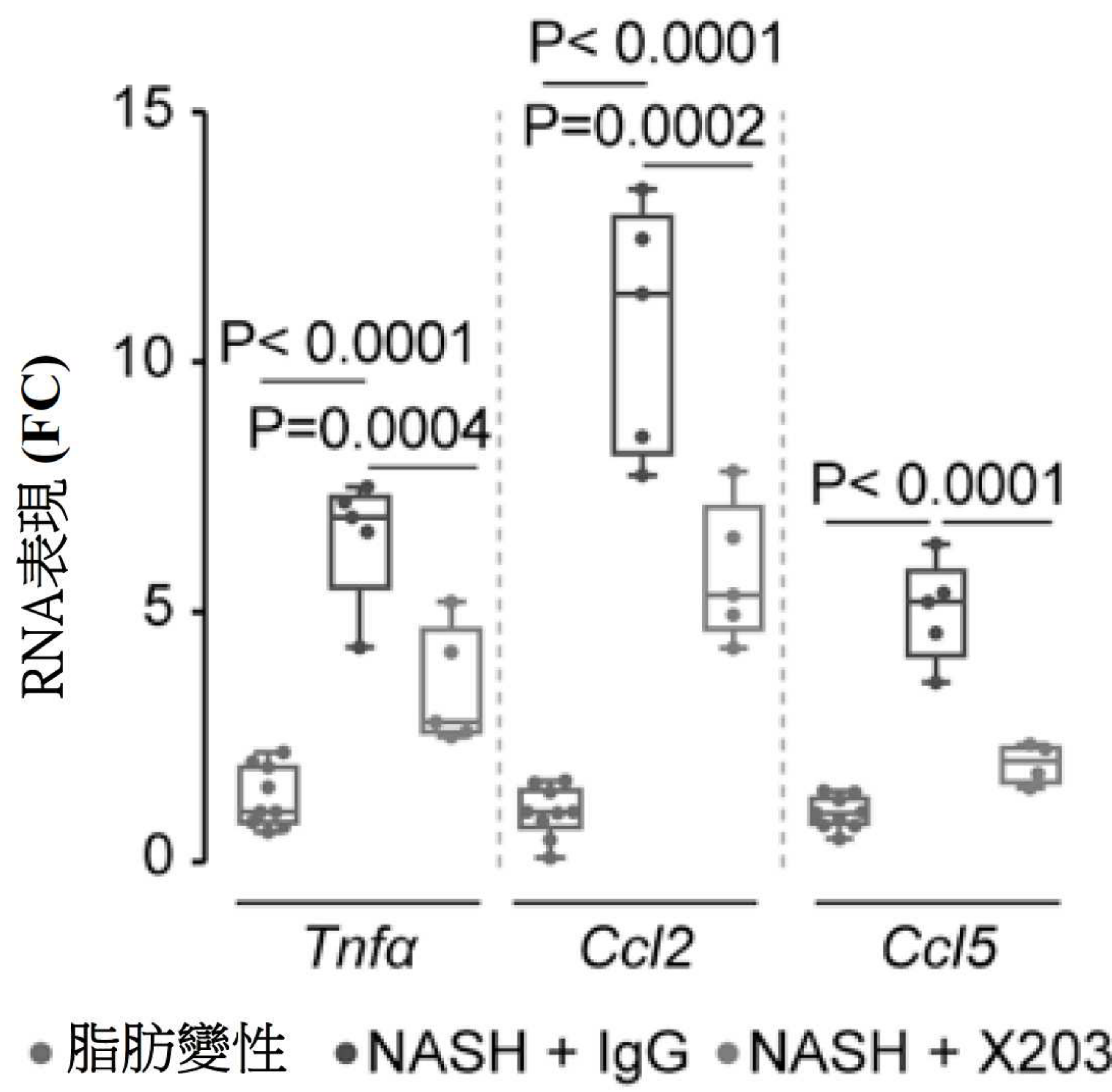
【圖20J】



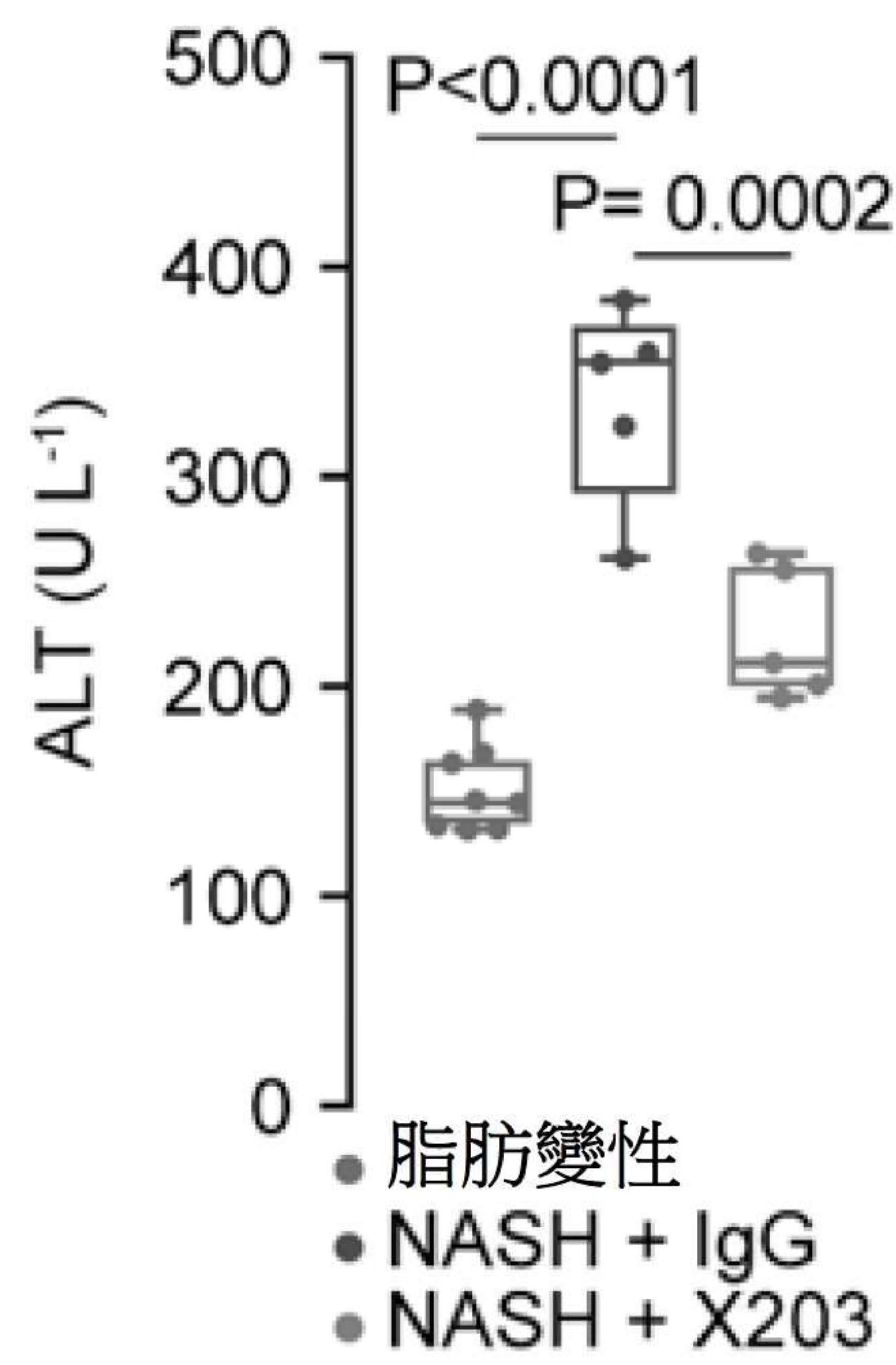
【圖20K】



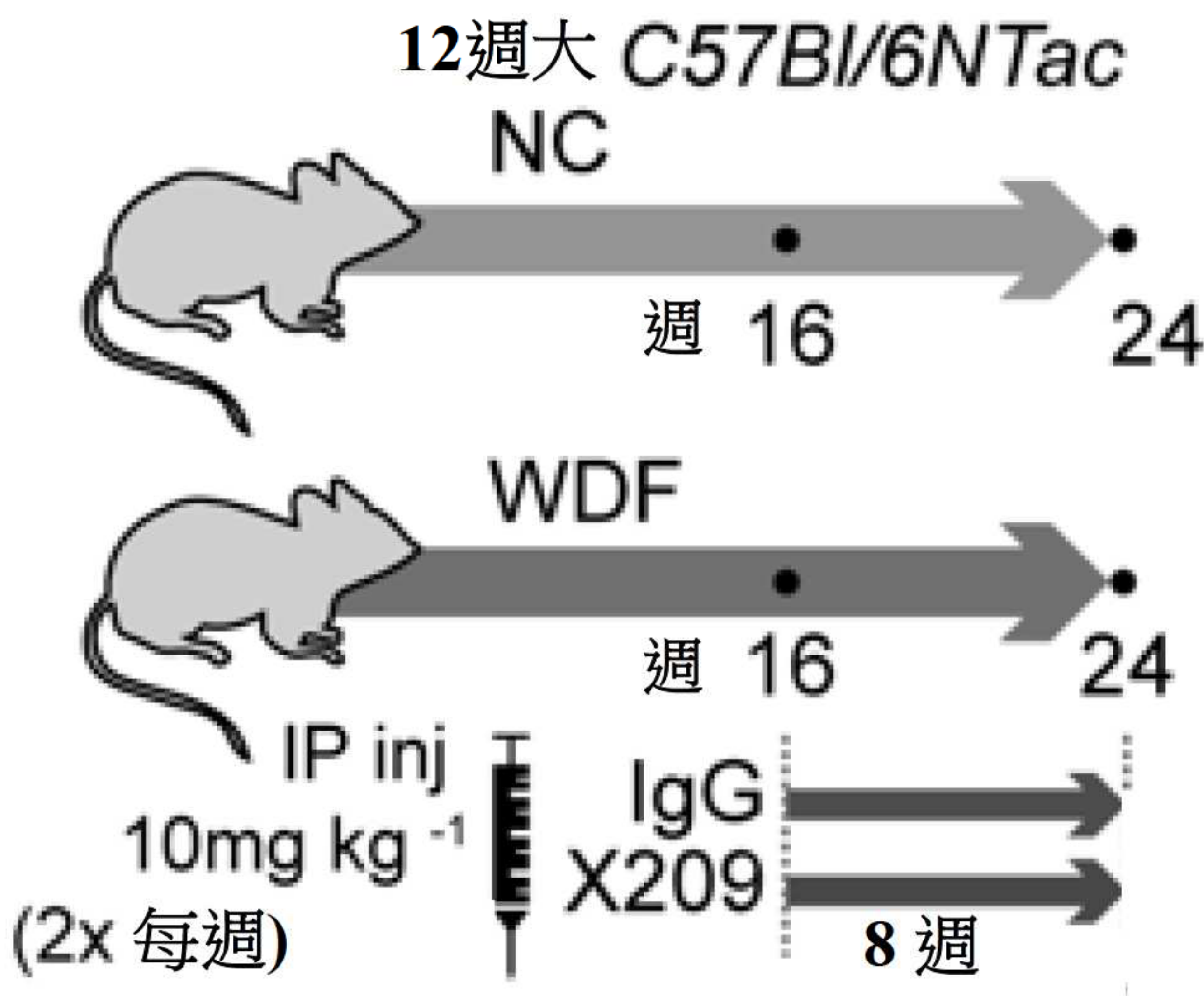
【圖20L】



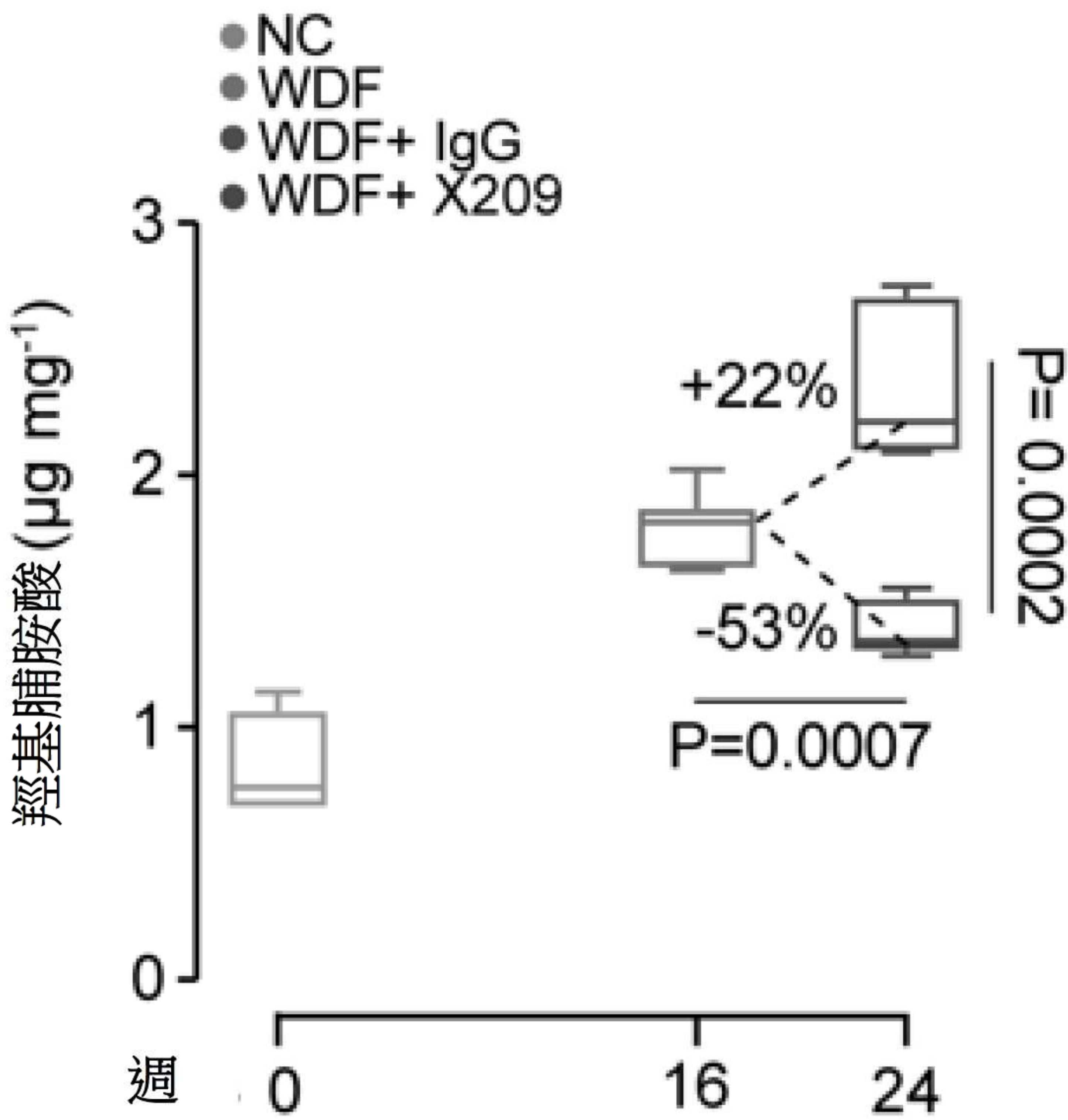
【圖20M】



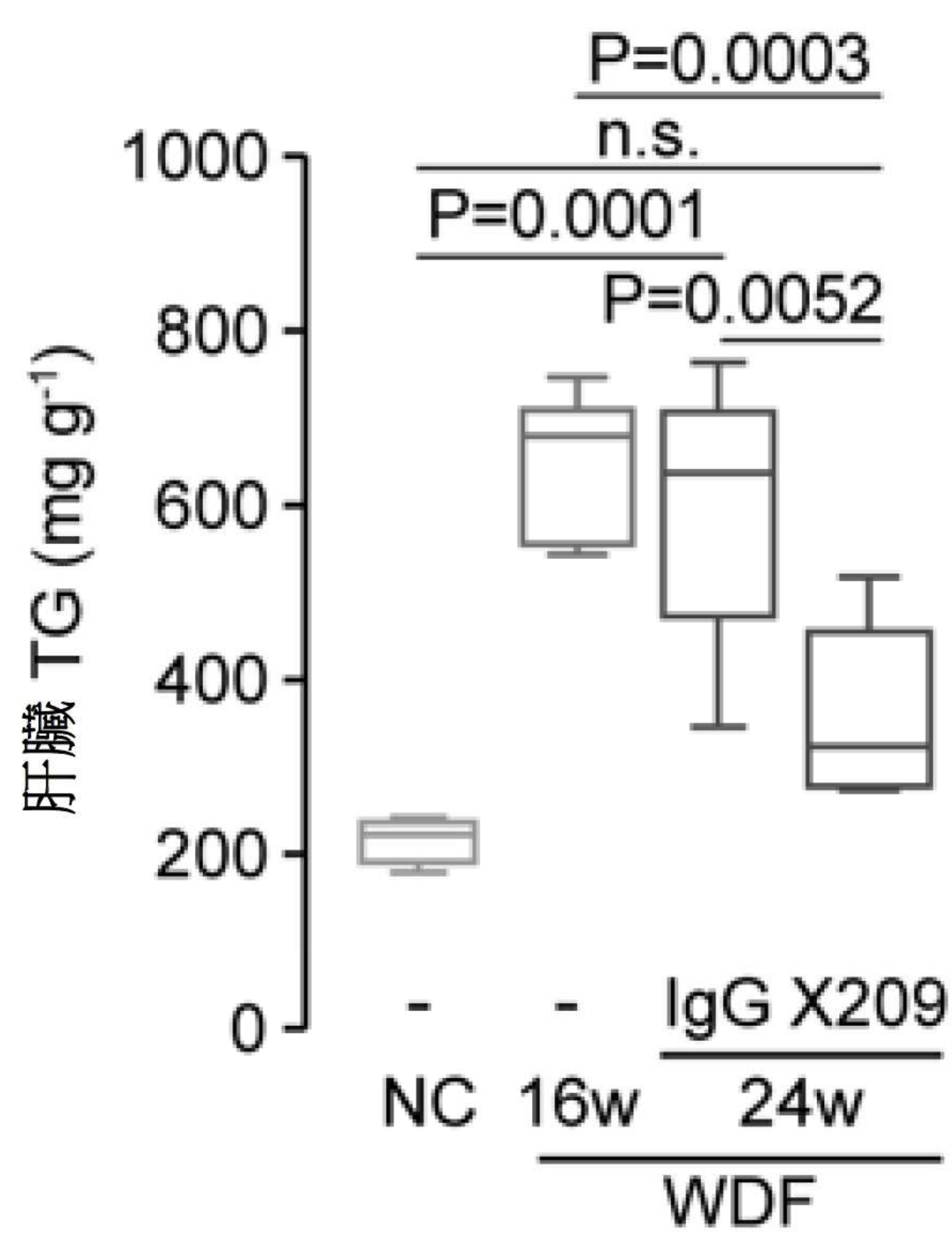
【圖20N】



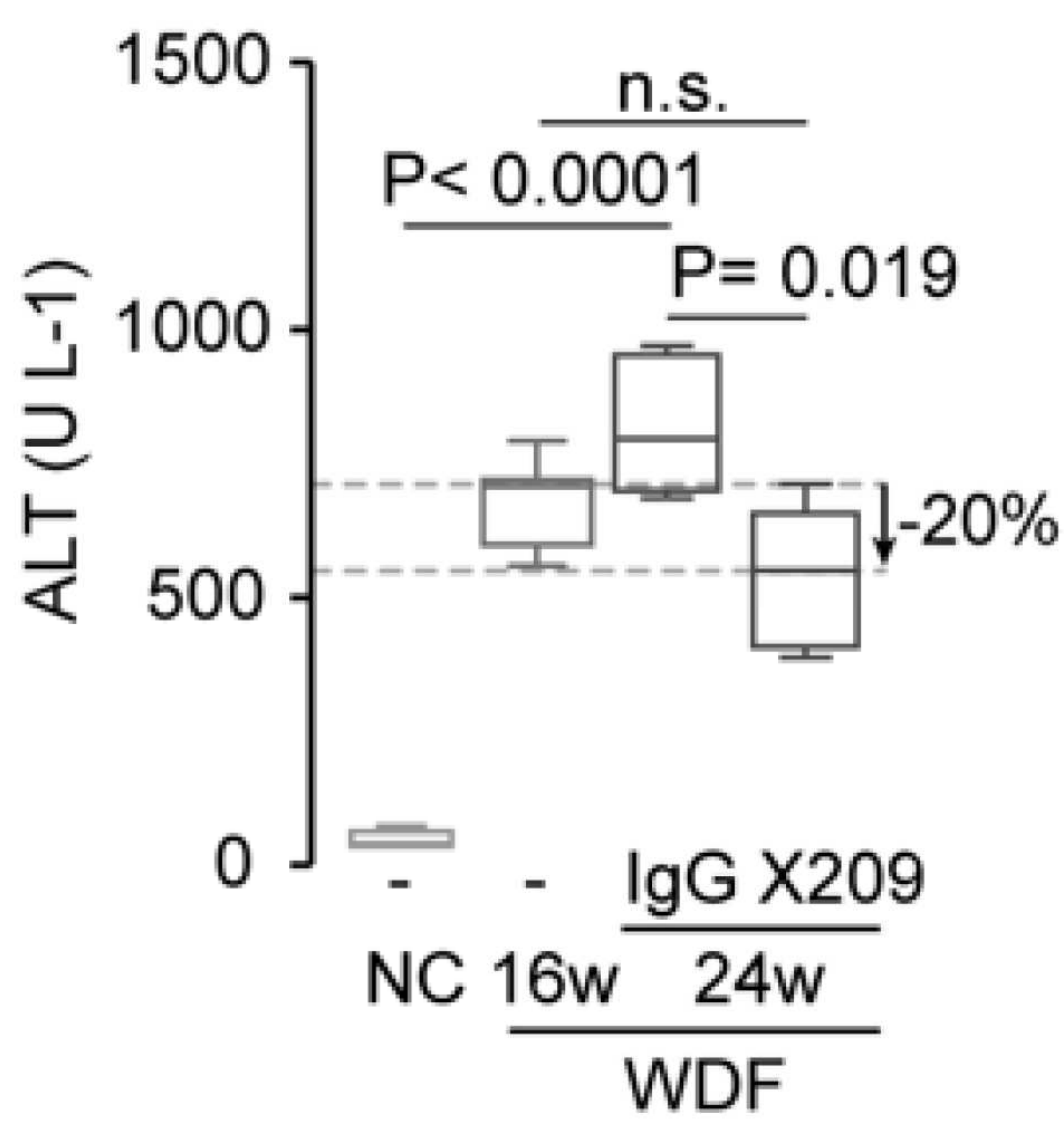
【圖21A】



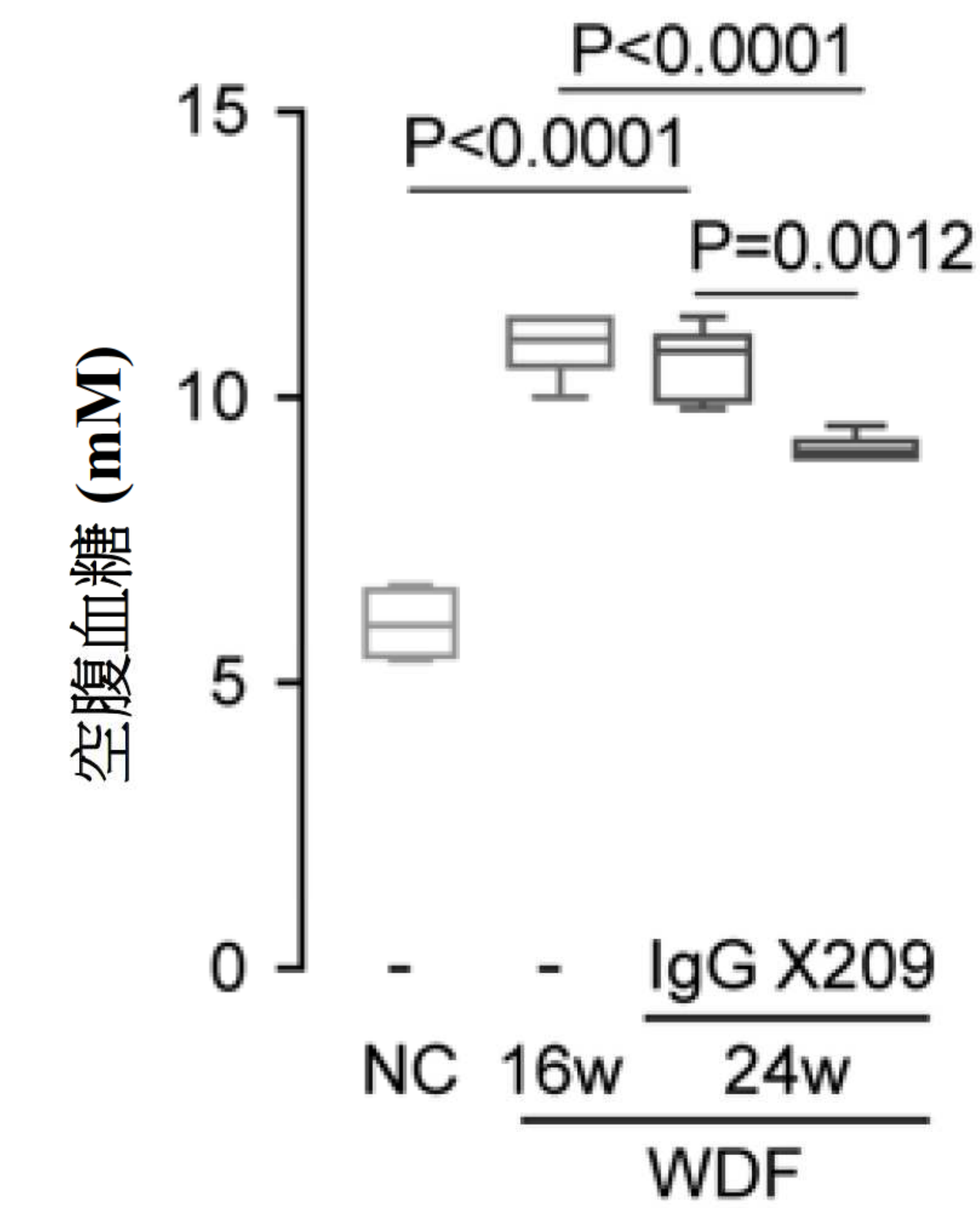
【圖21B】



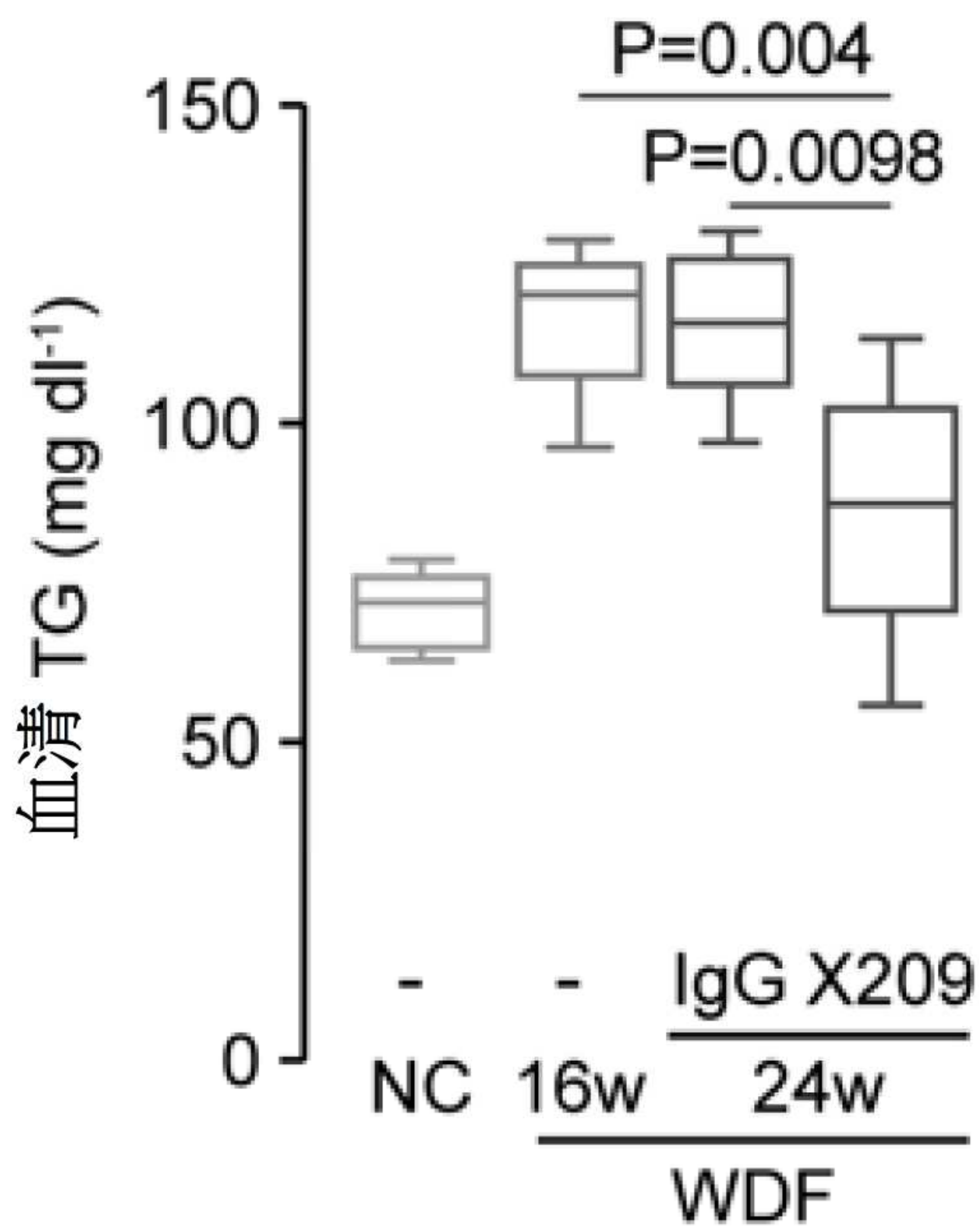
【圖21C】



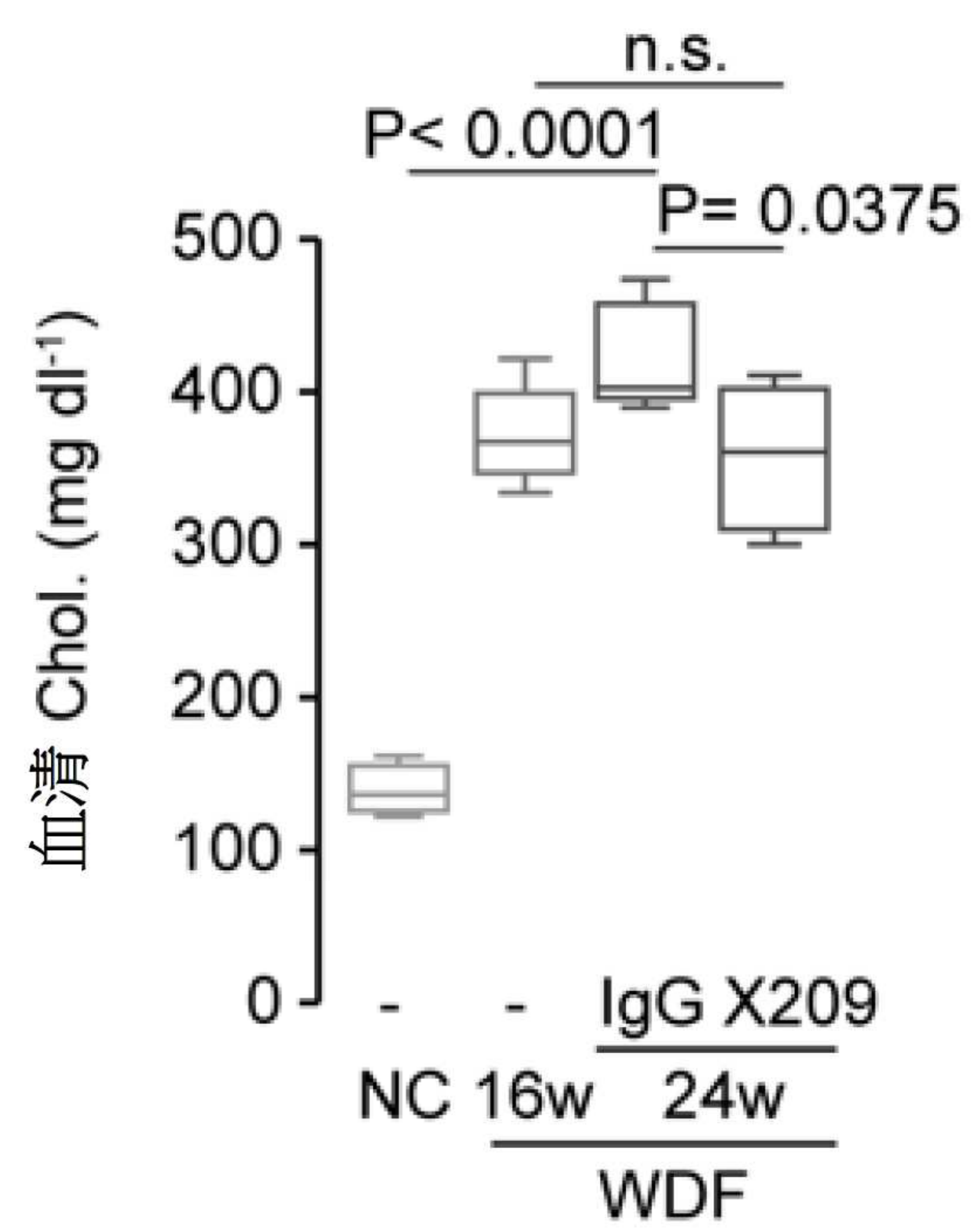
【圖21D】



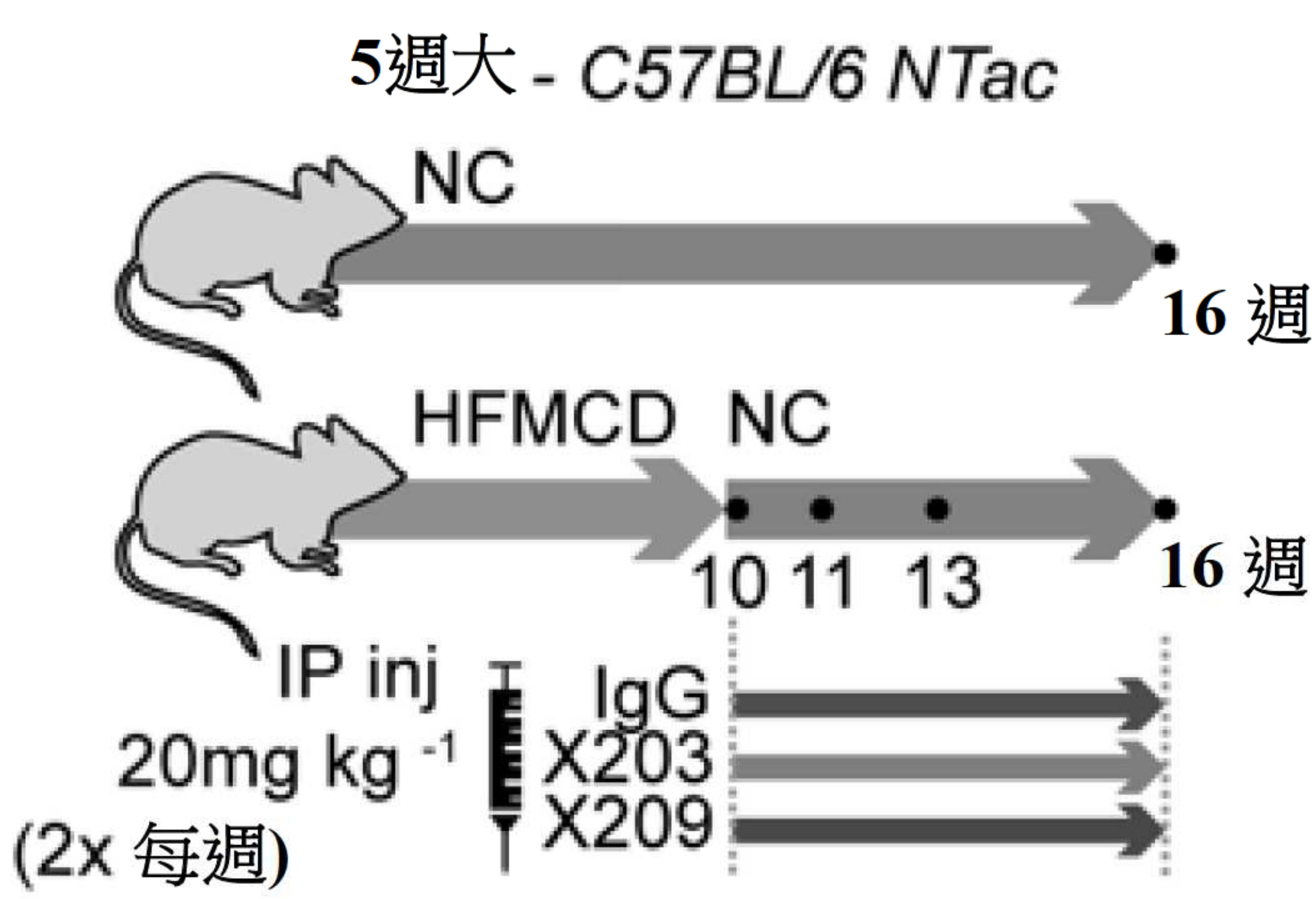
【圖21E】



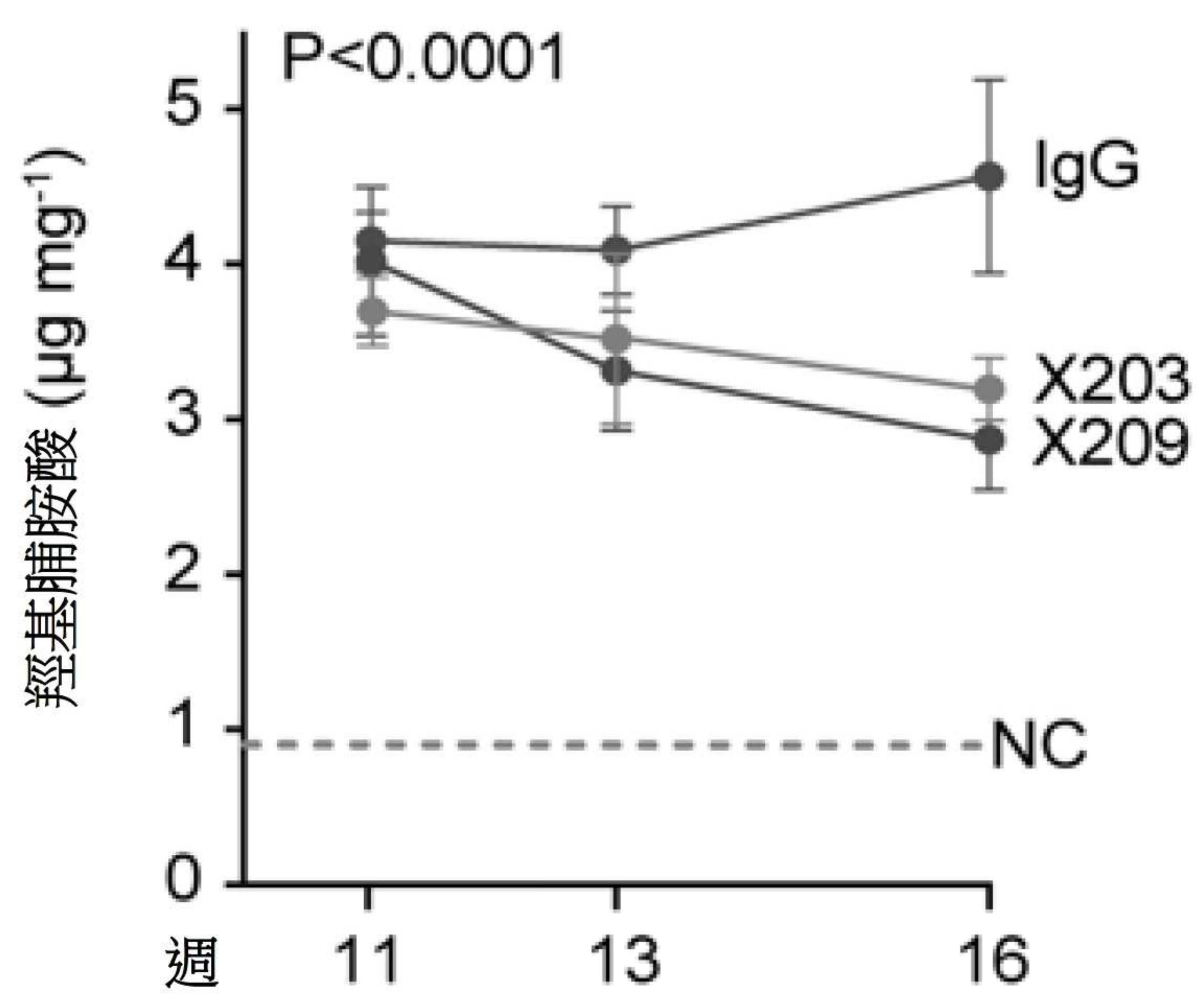
【圖21F】



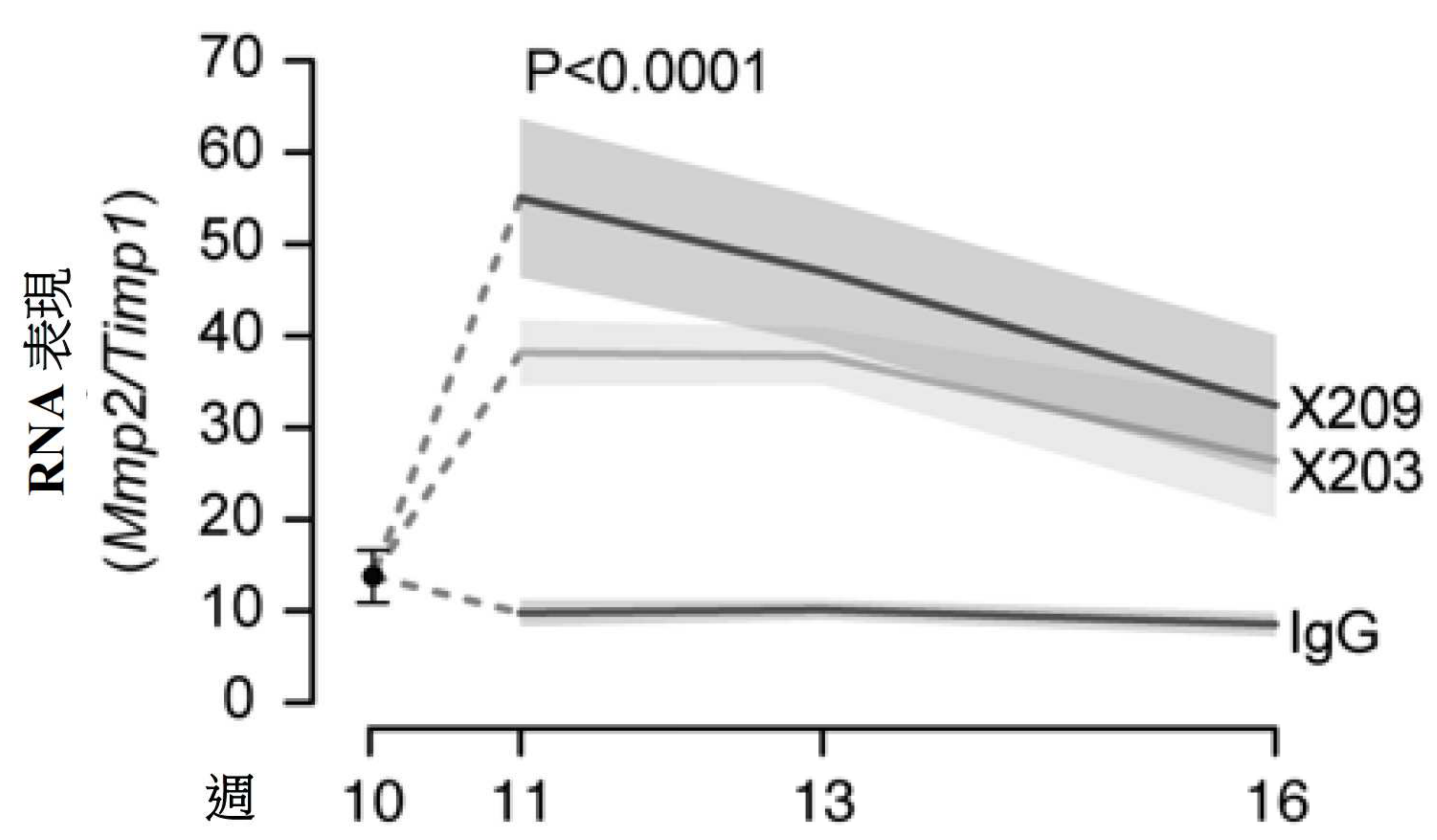
【圖21G】



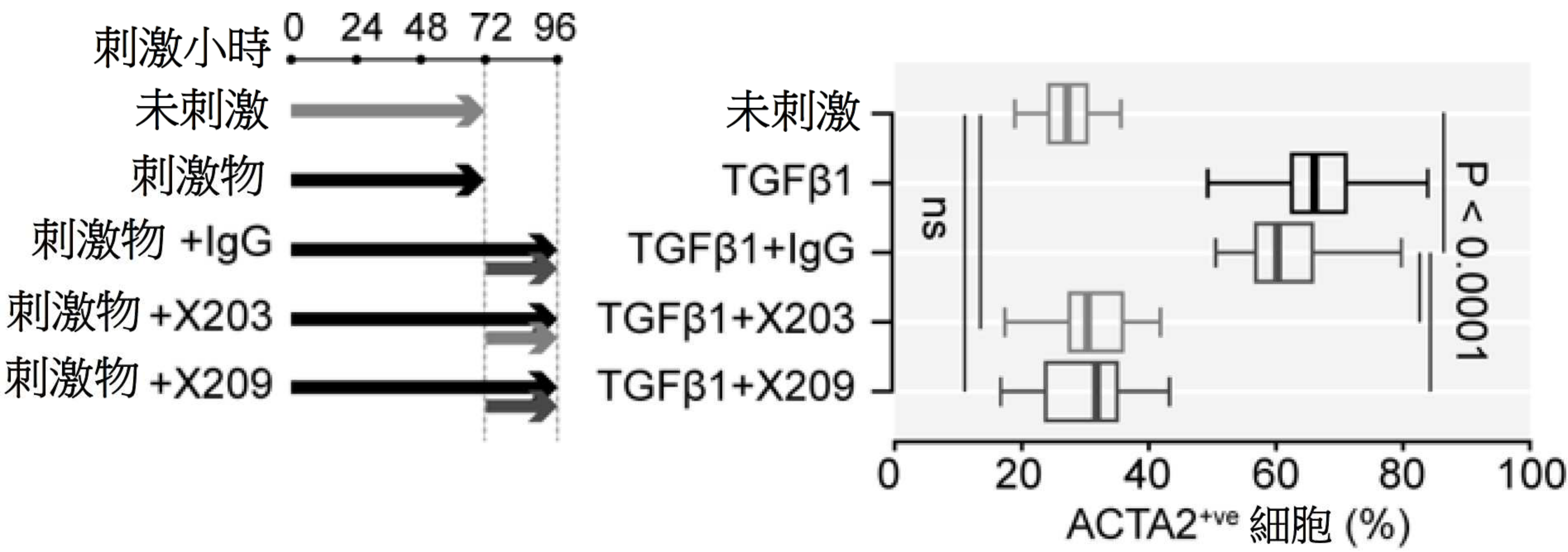
【圖21H】



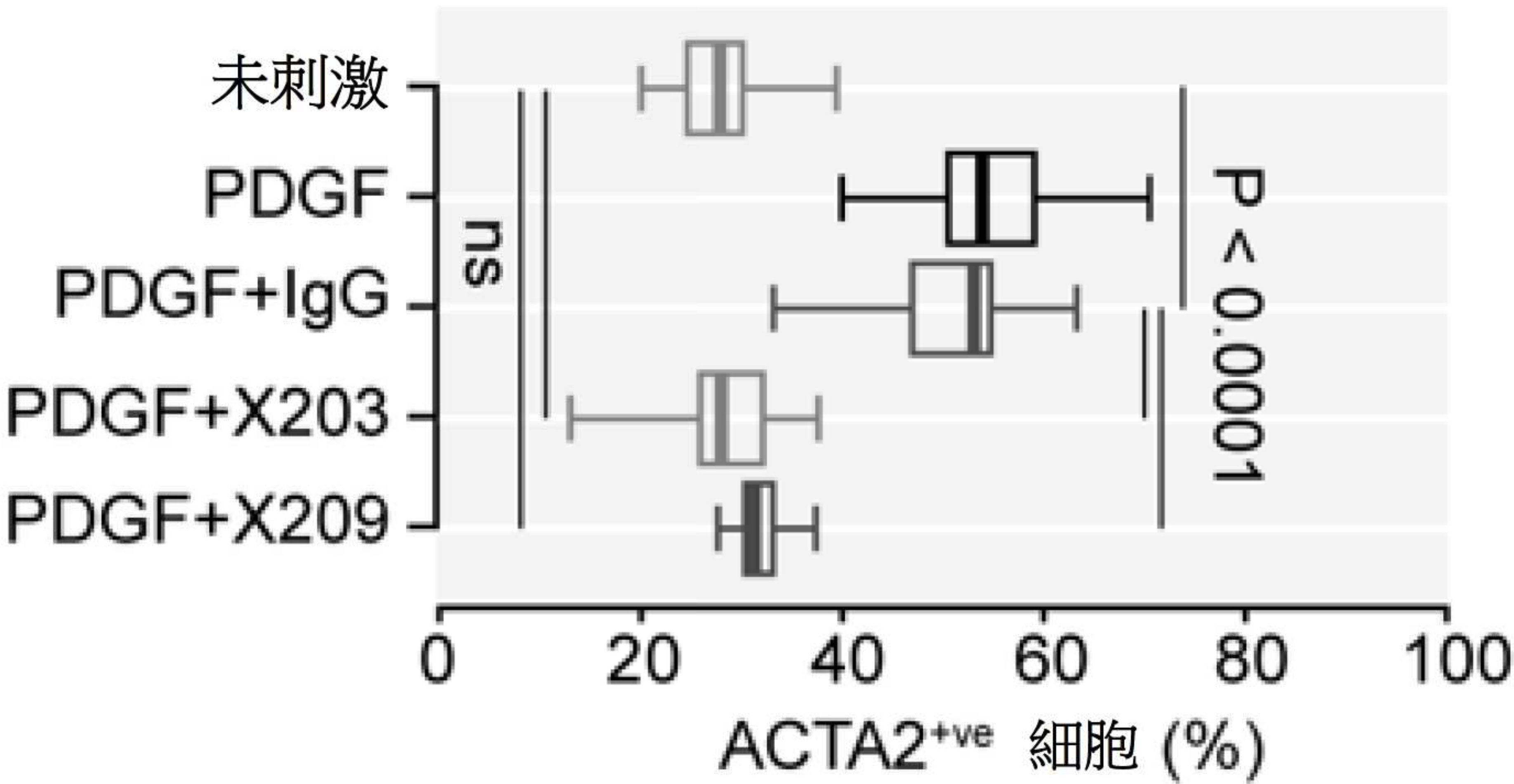
【圖21I】



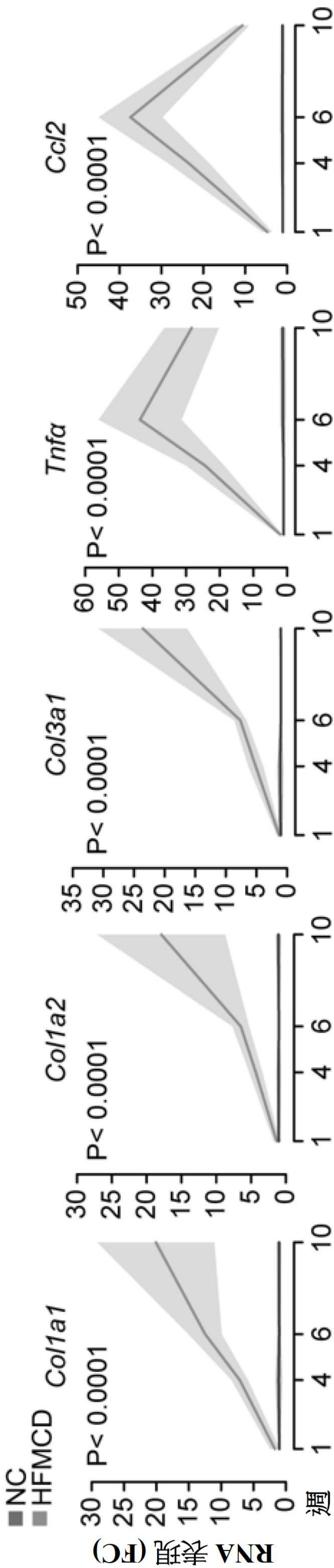
【圖21J】



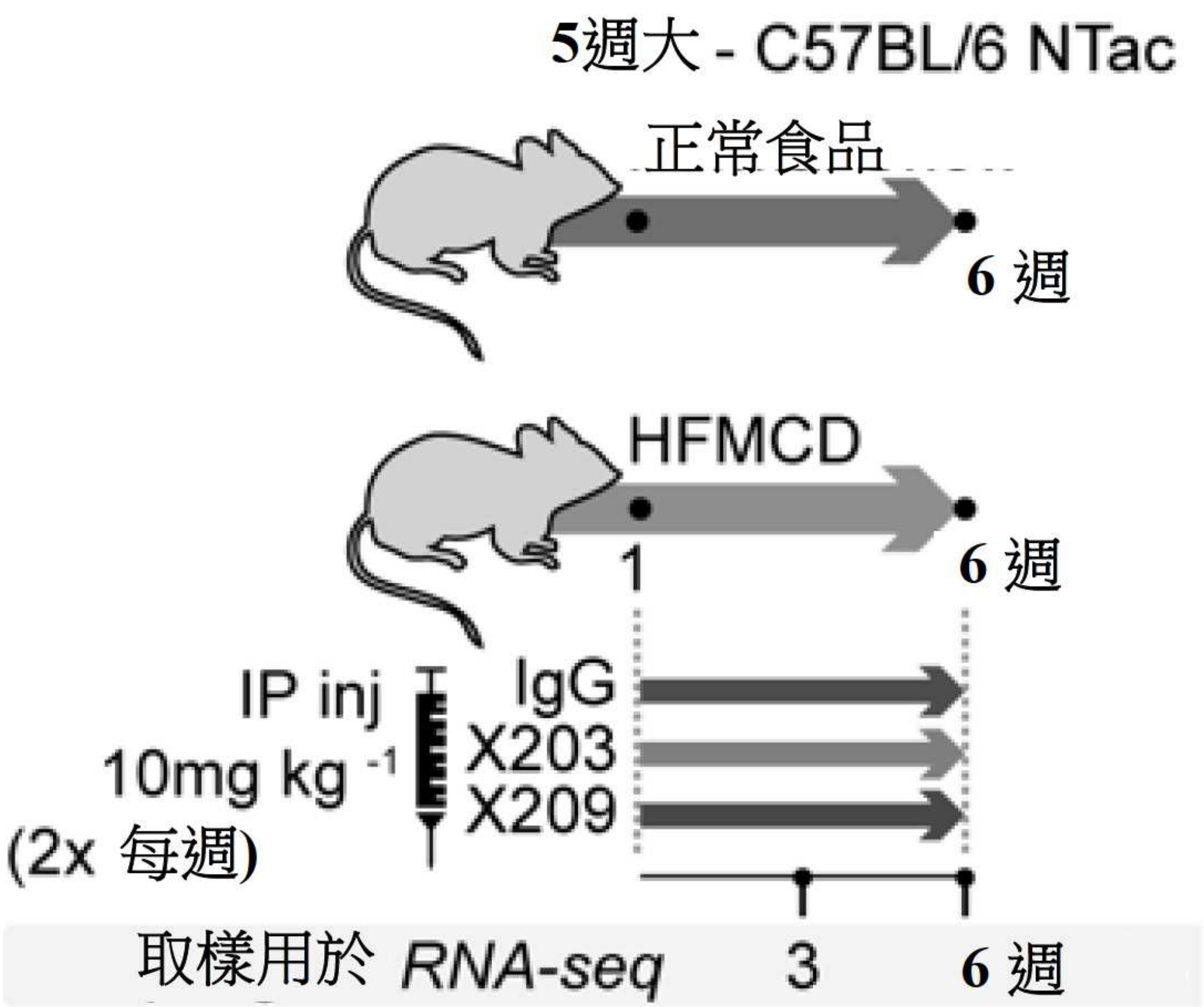
【圖21K】



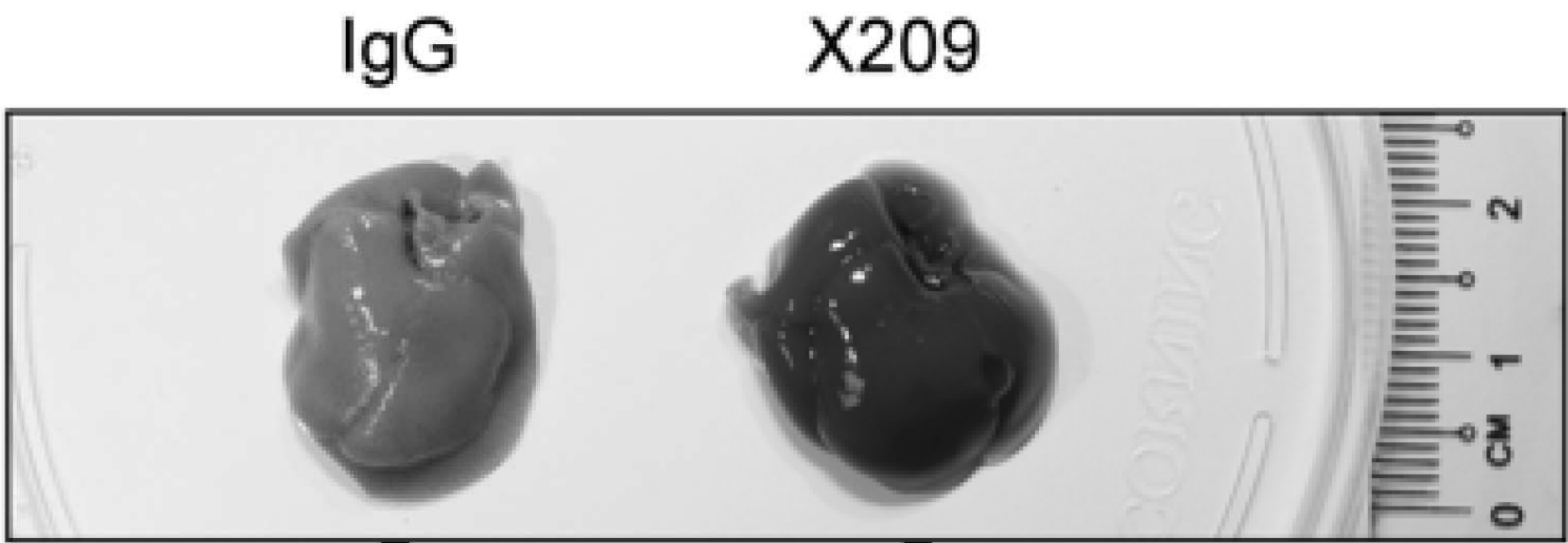
【圖21L】



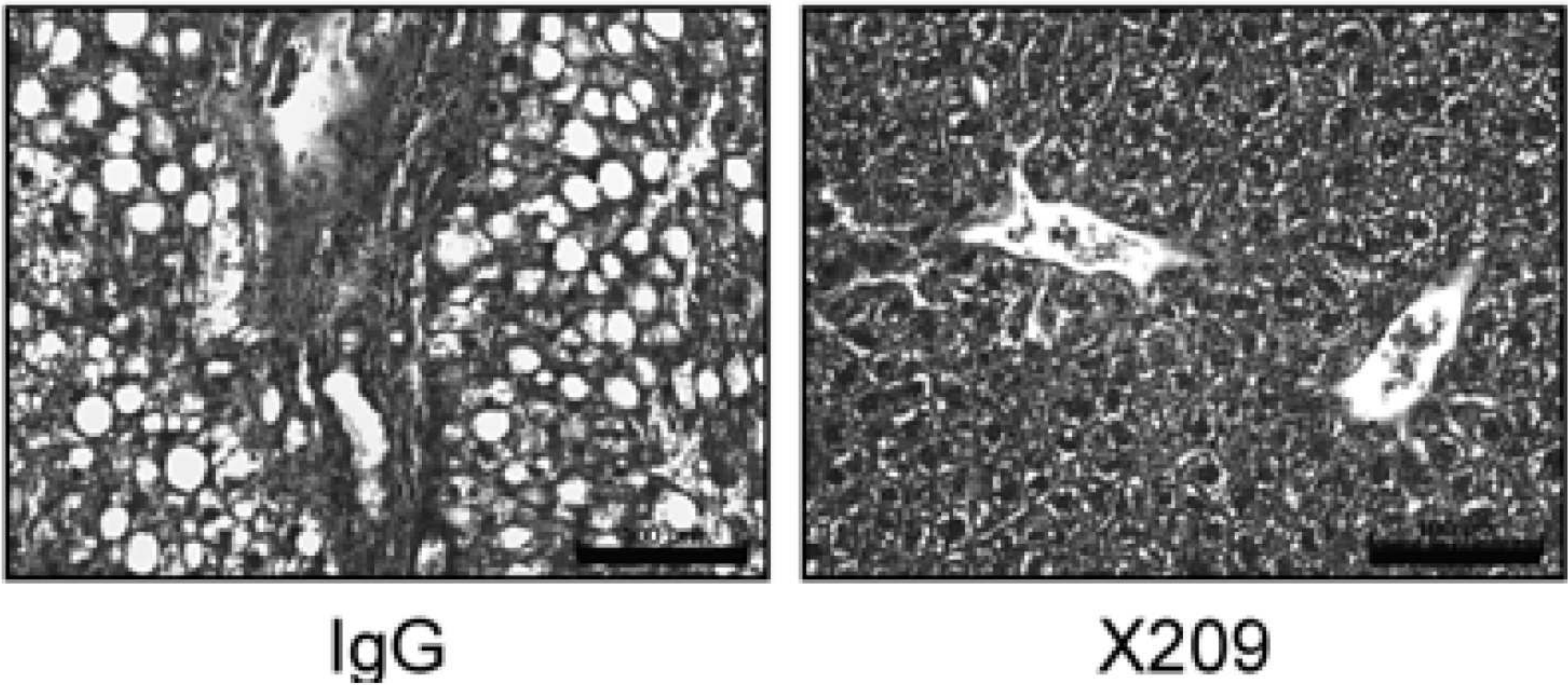
【圖22A】



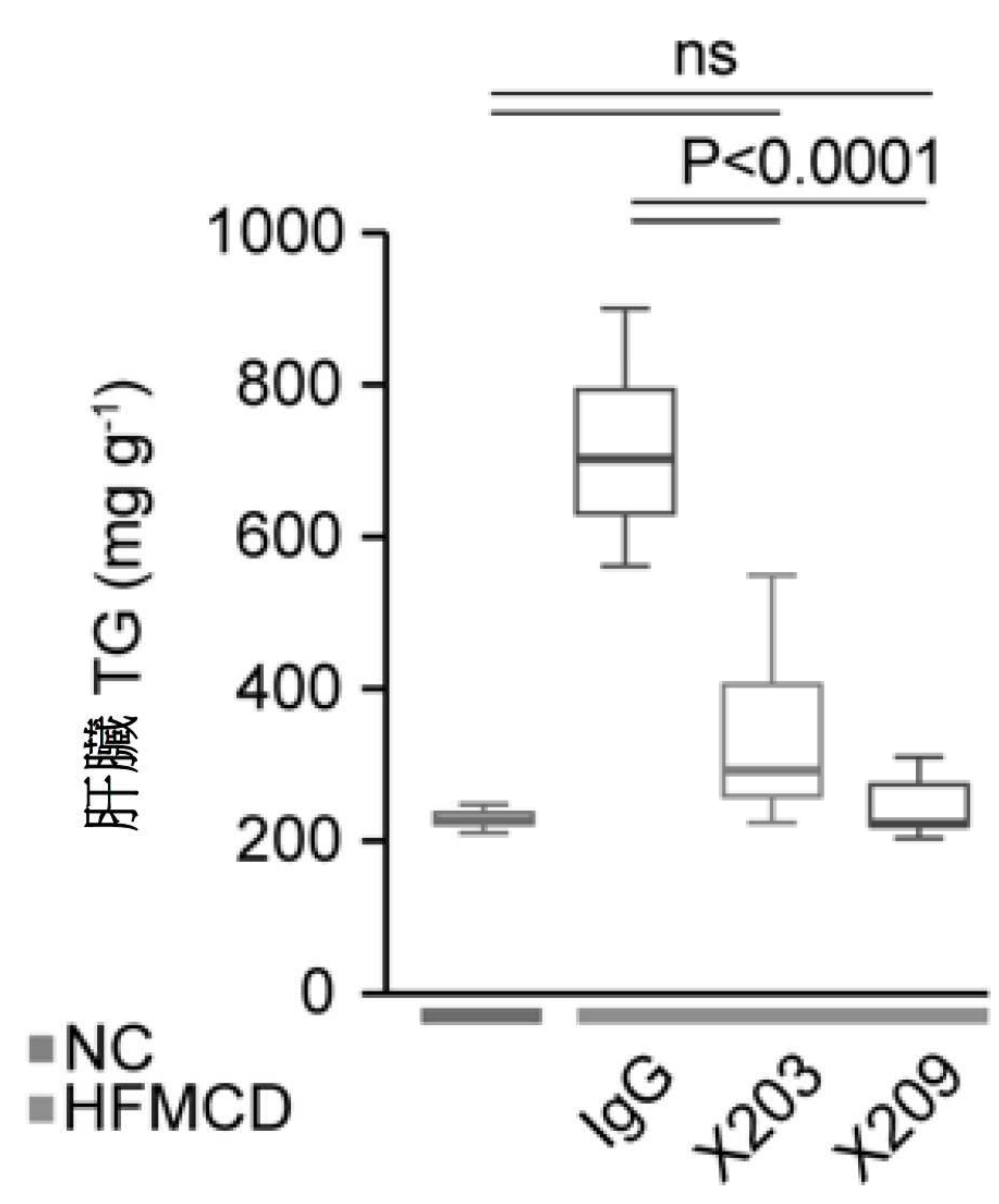
【圖22B】



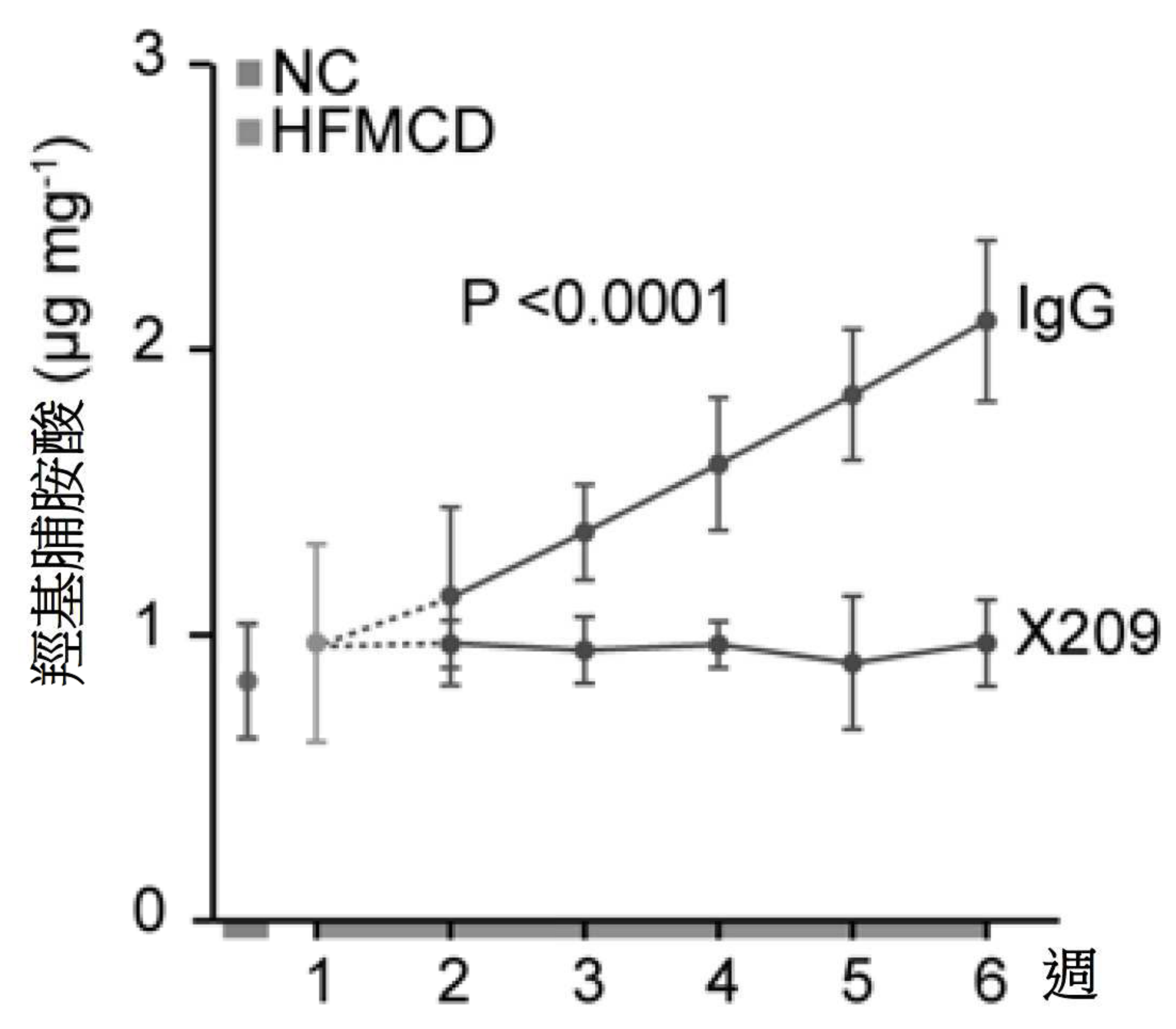
【圖22C】



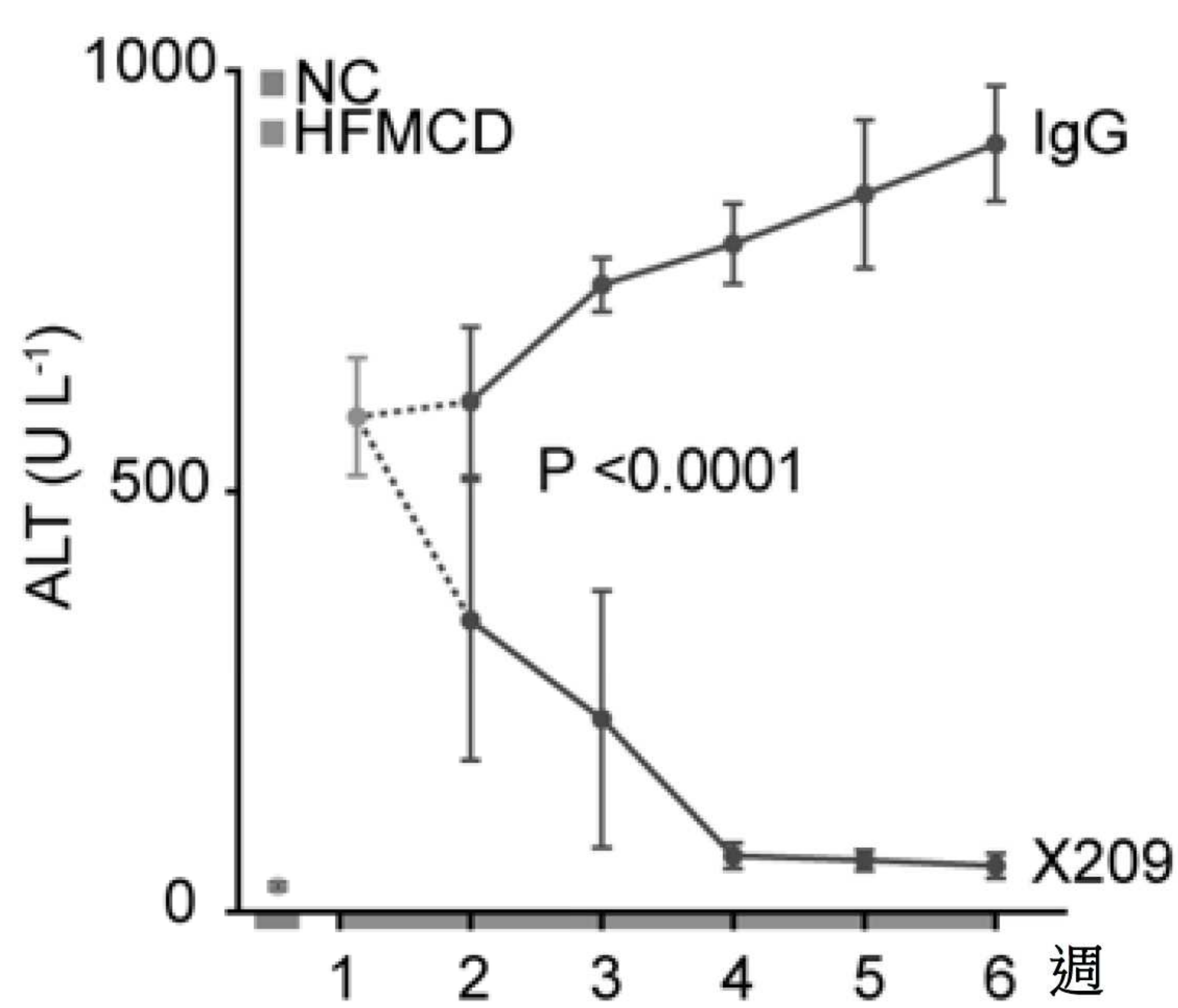
【圖22D】



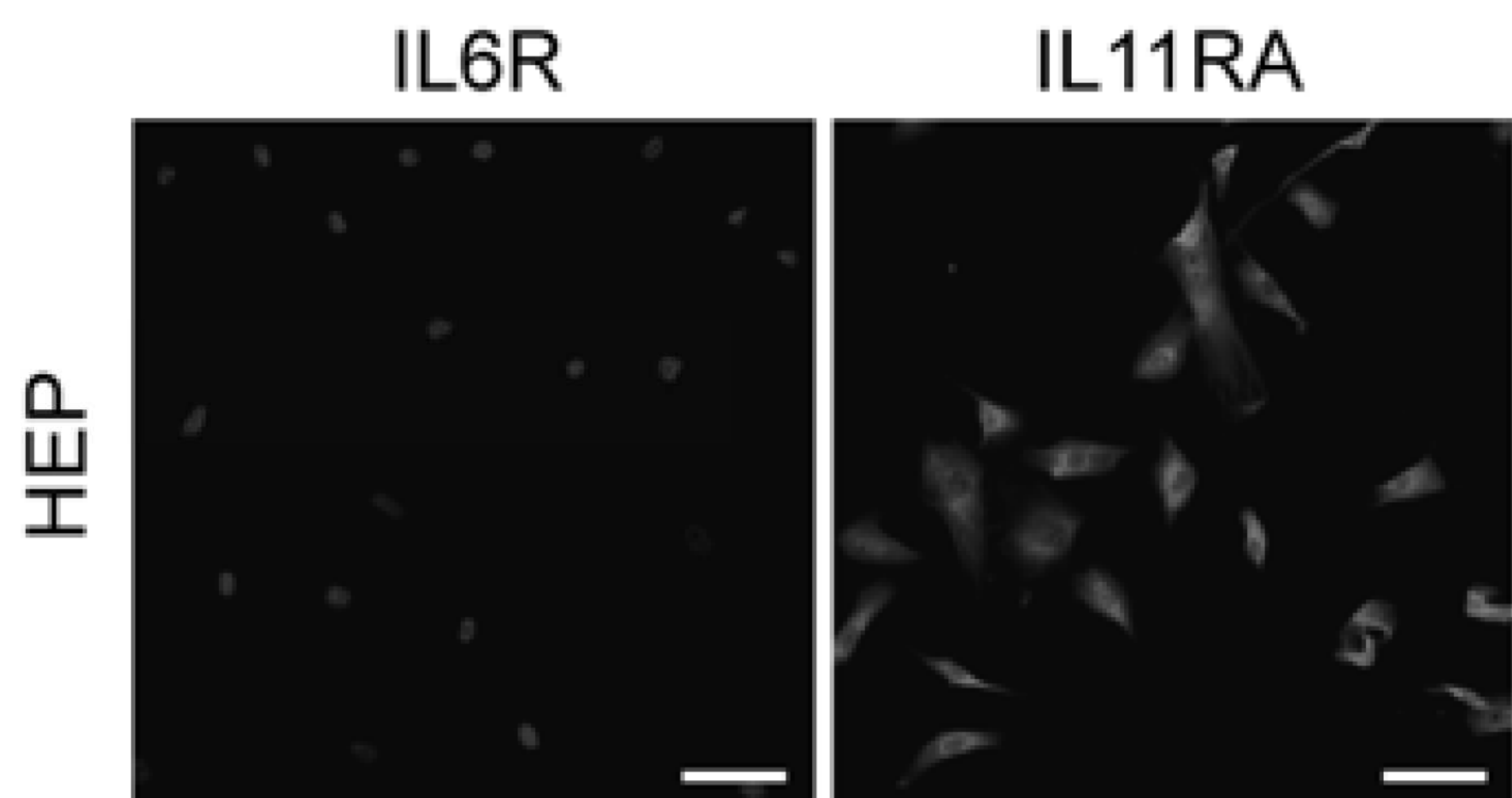
【圖22E】



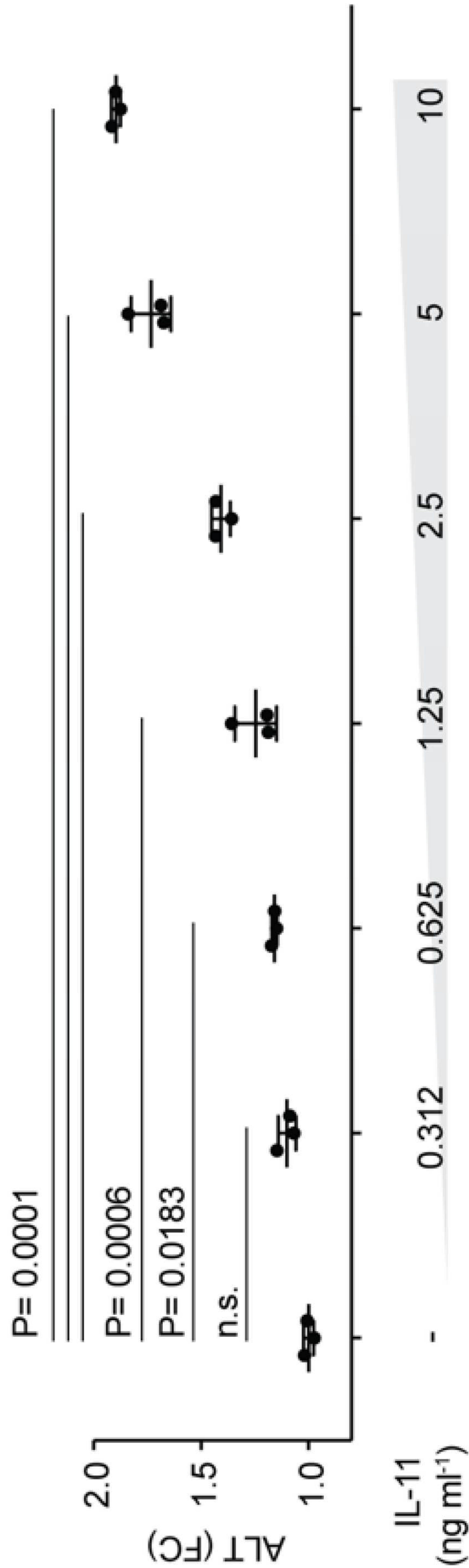
【圖22F】



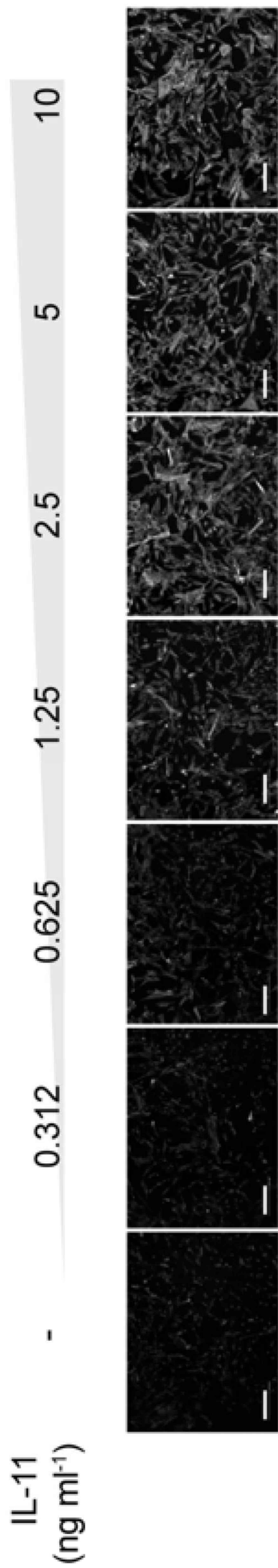
【圖22G】



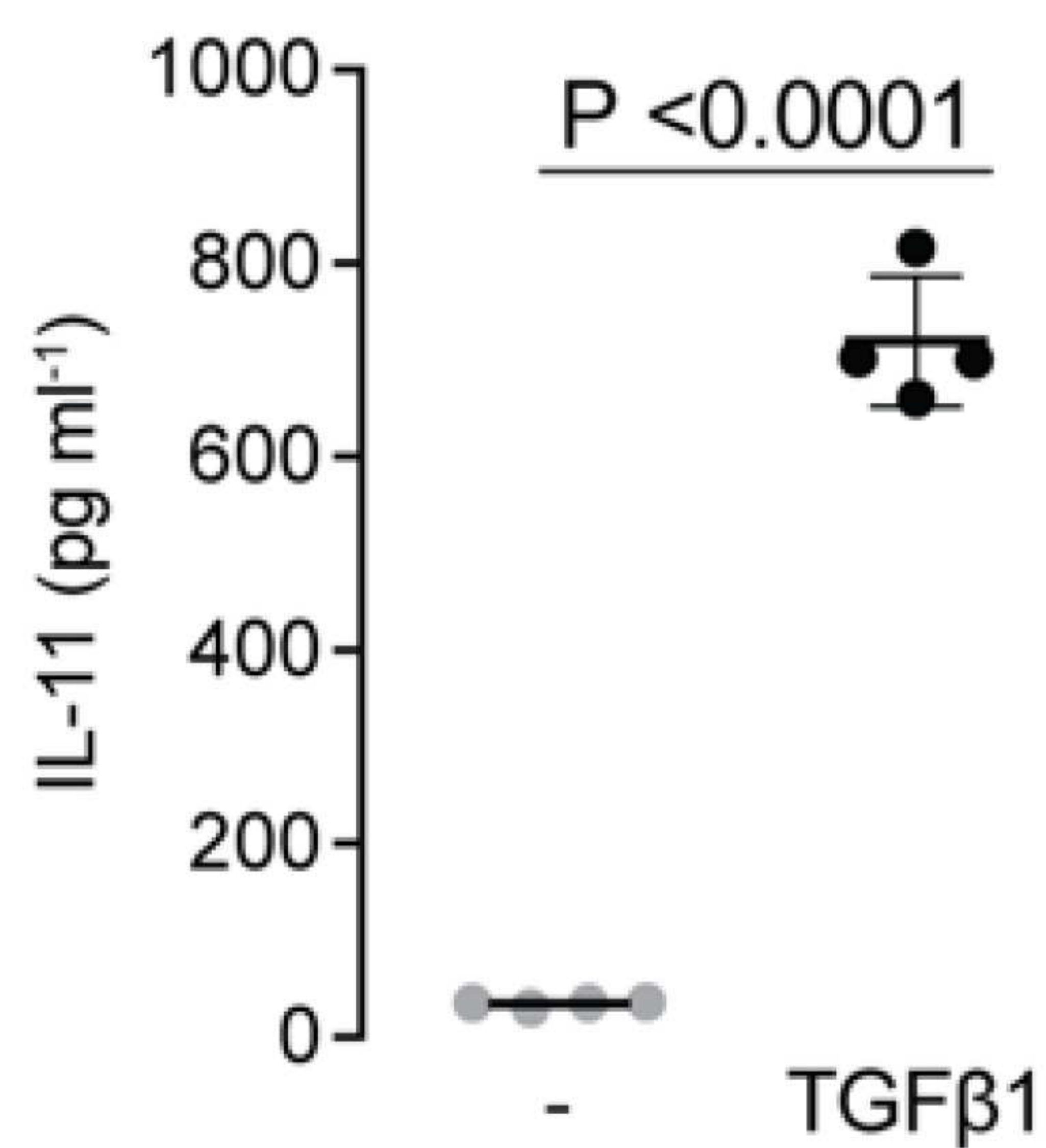
【圖22H】



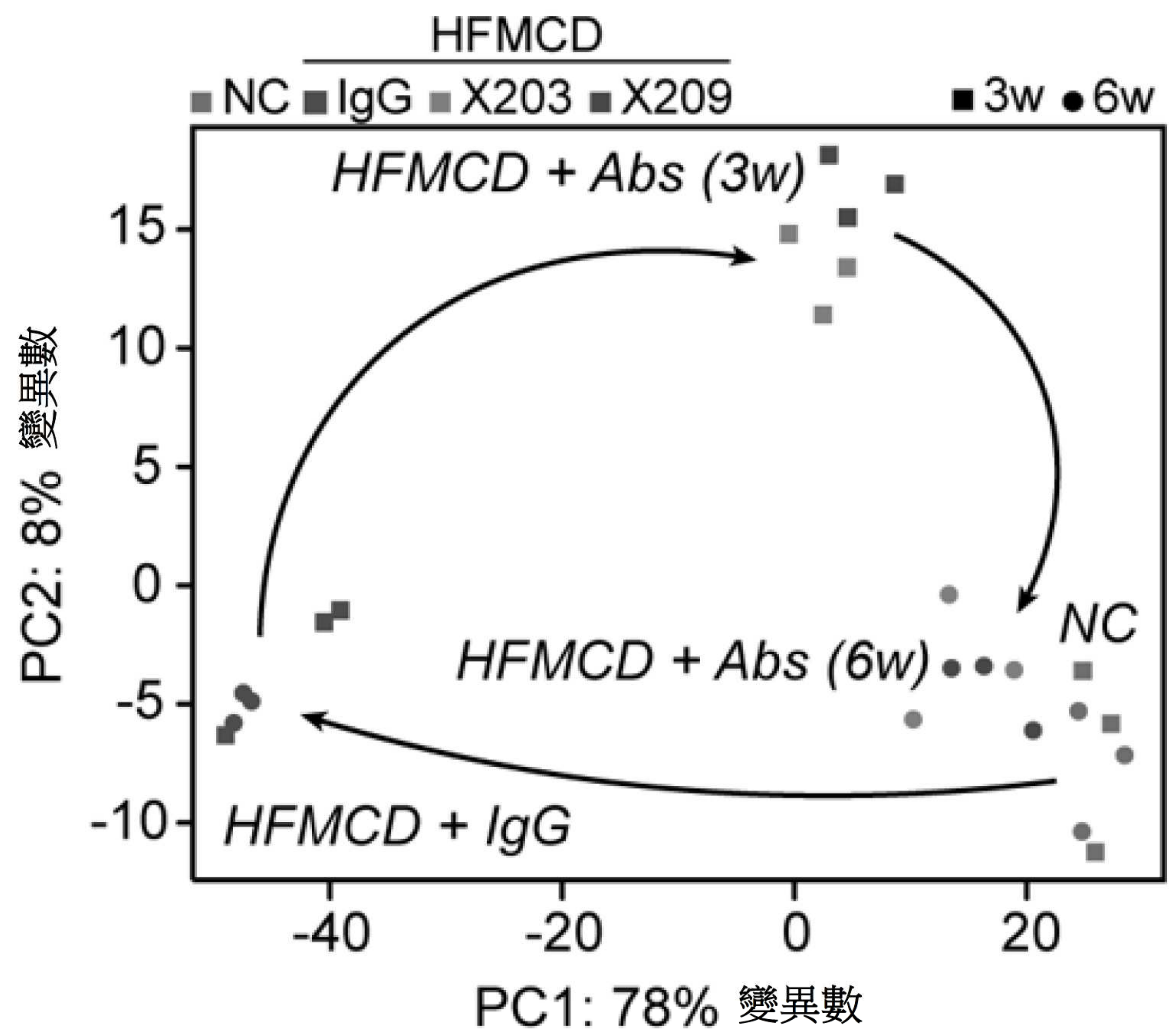
【圖22I】

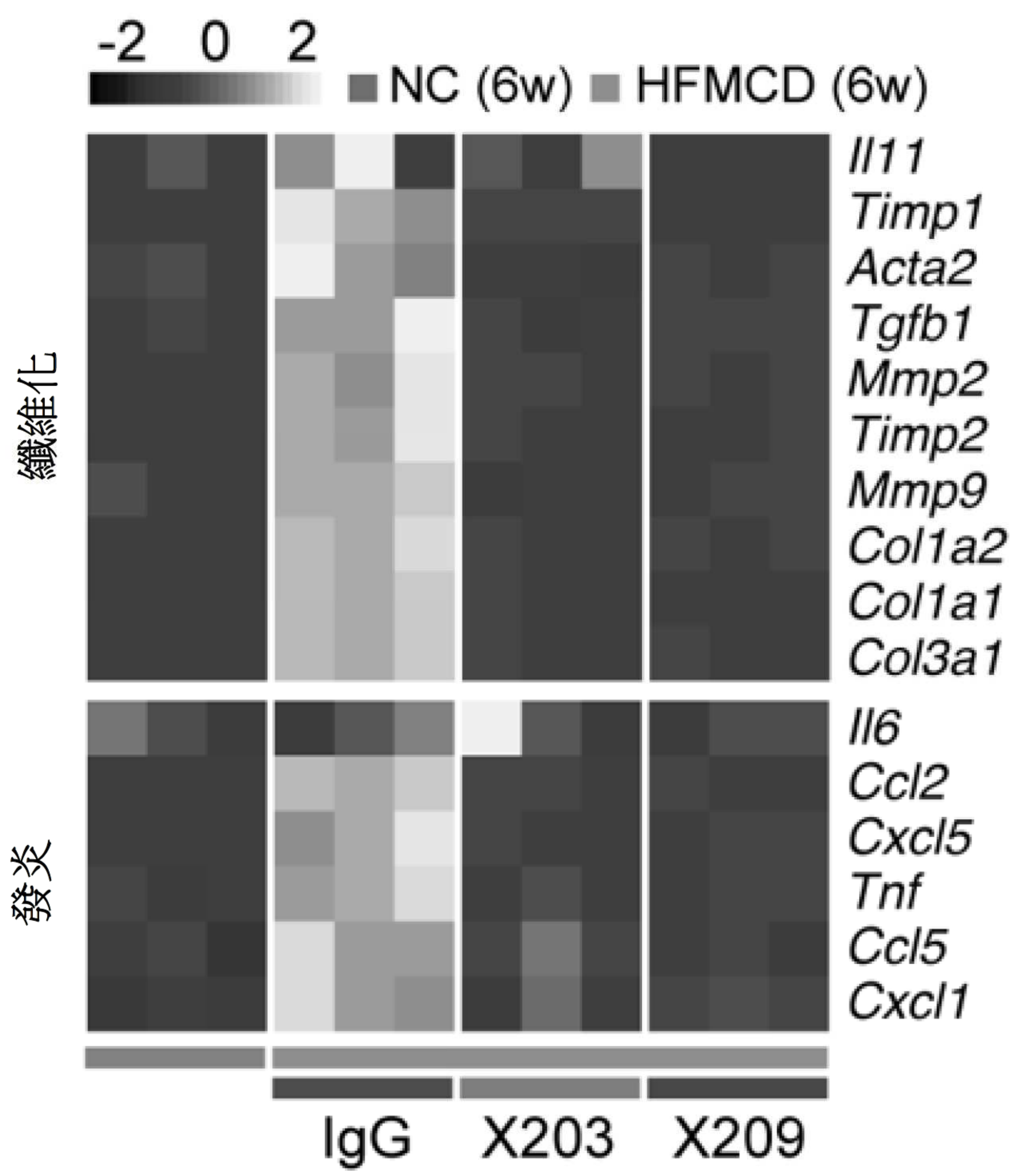


【圖22J】

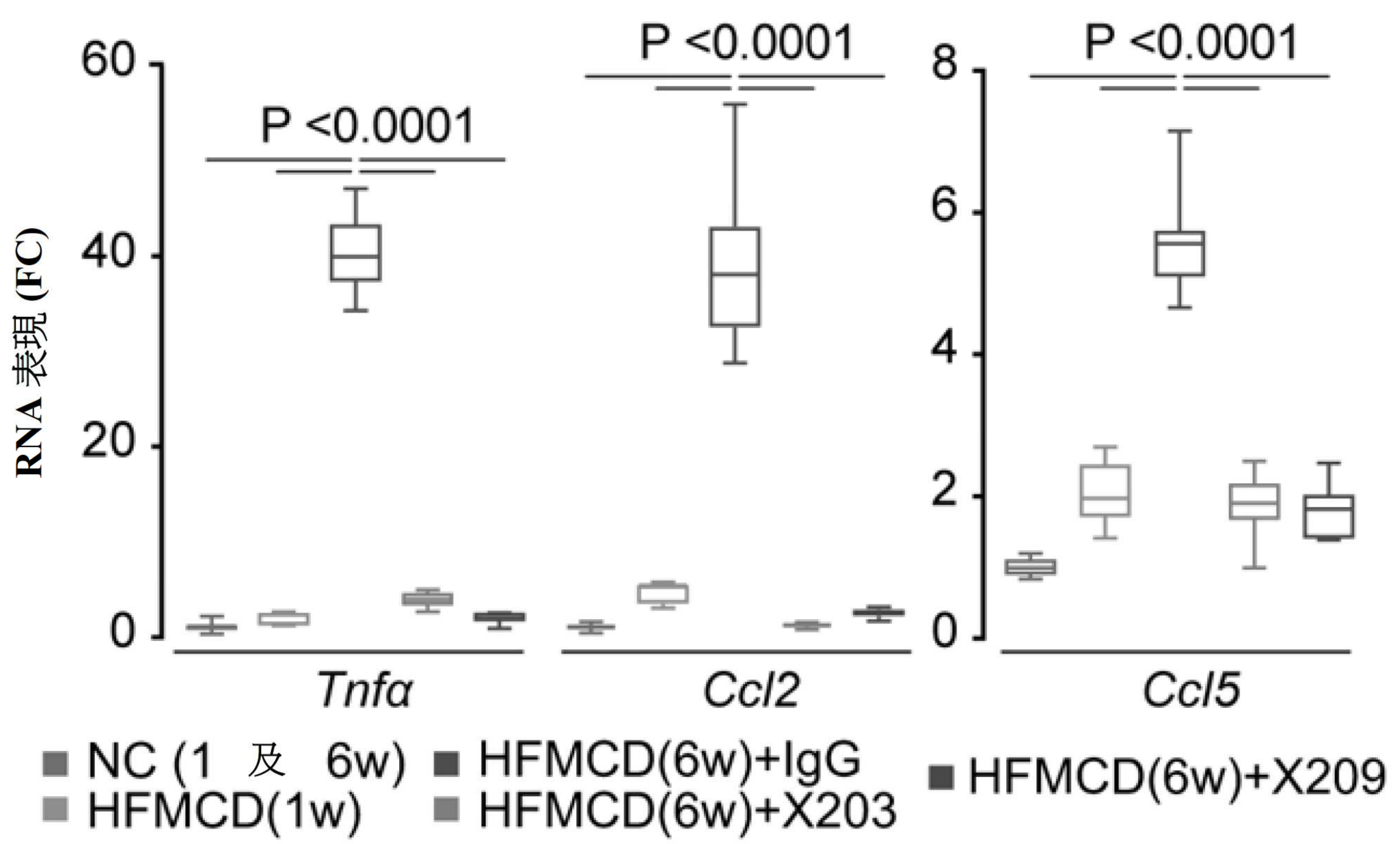


【圖22K】

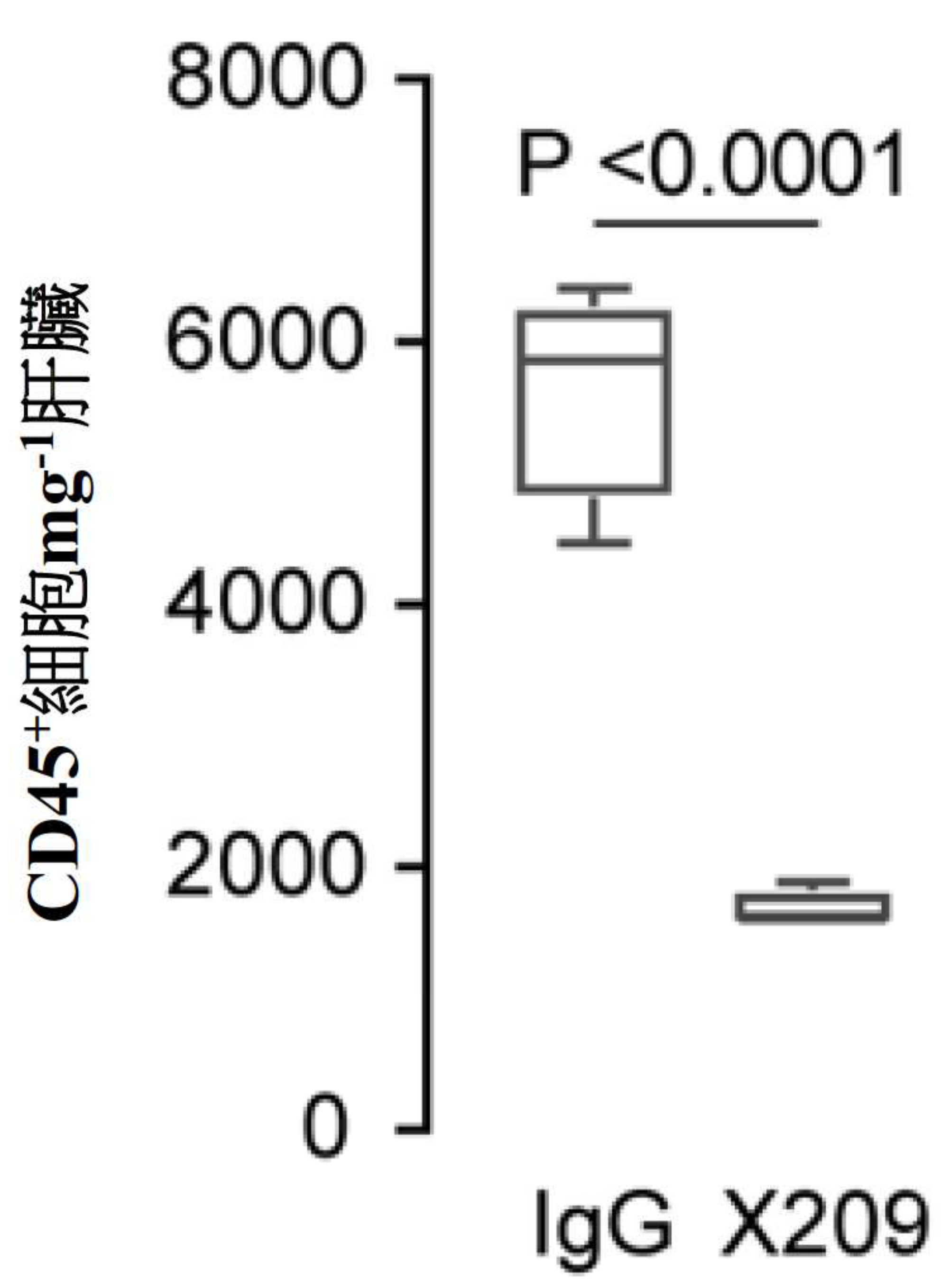




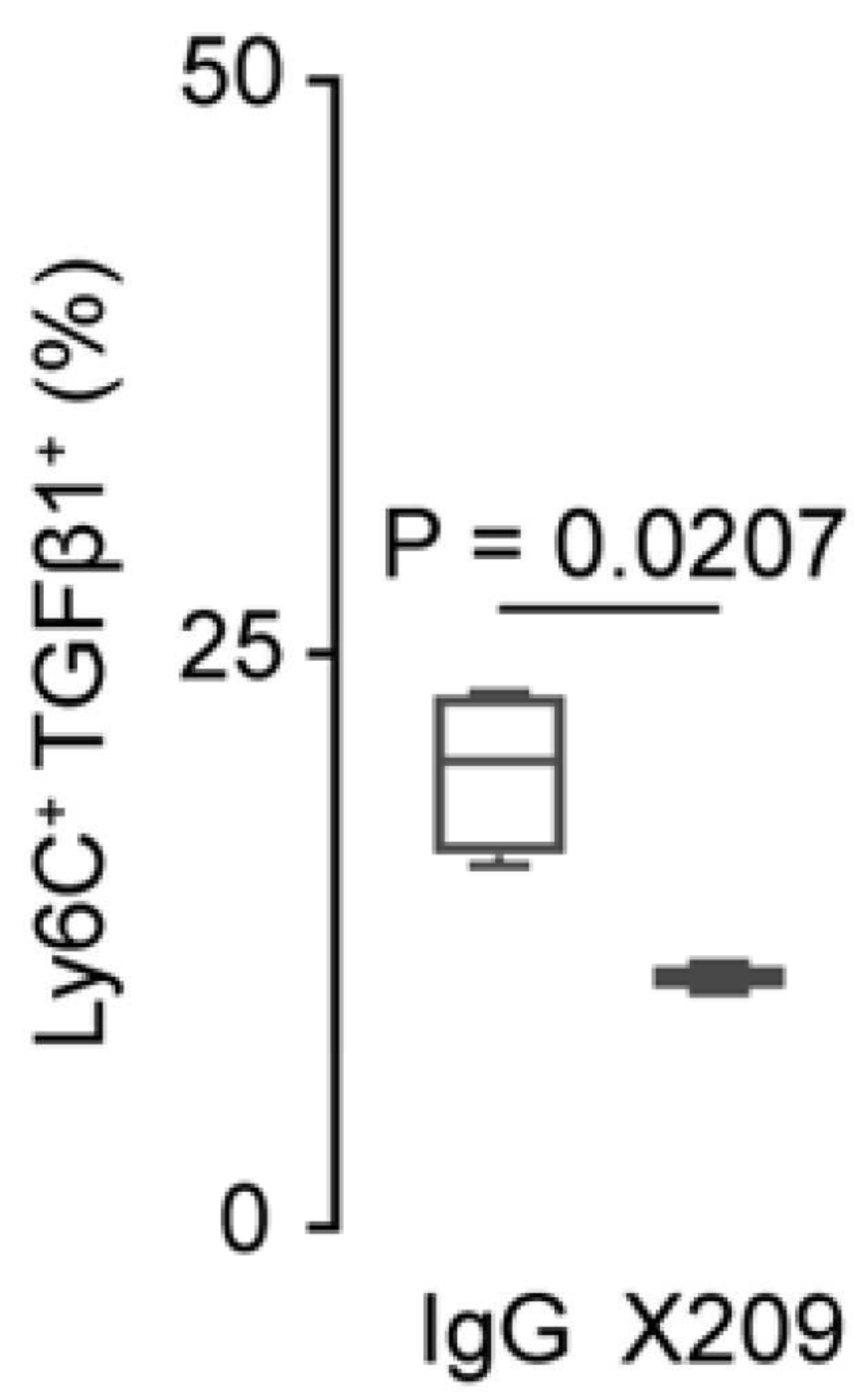
【圖23B】



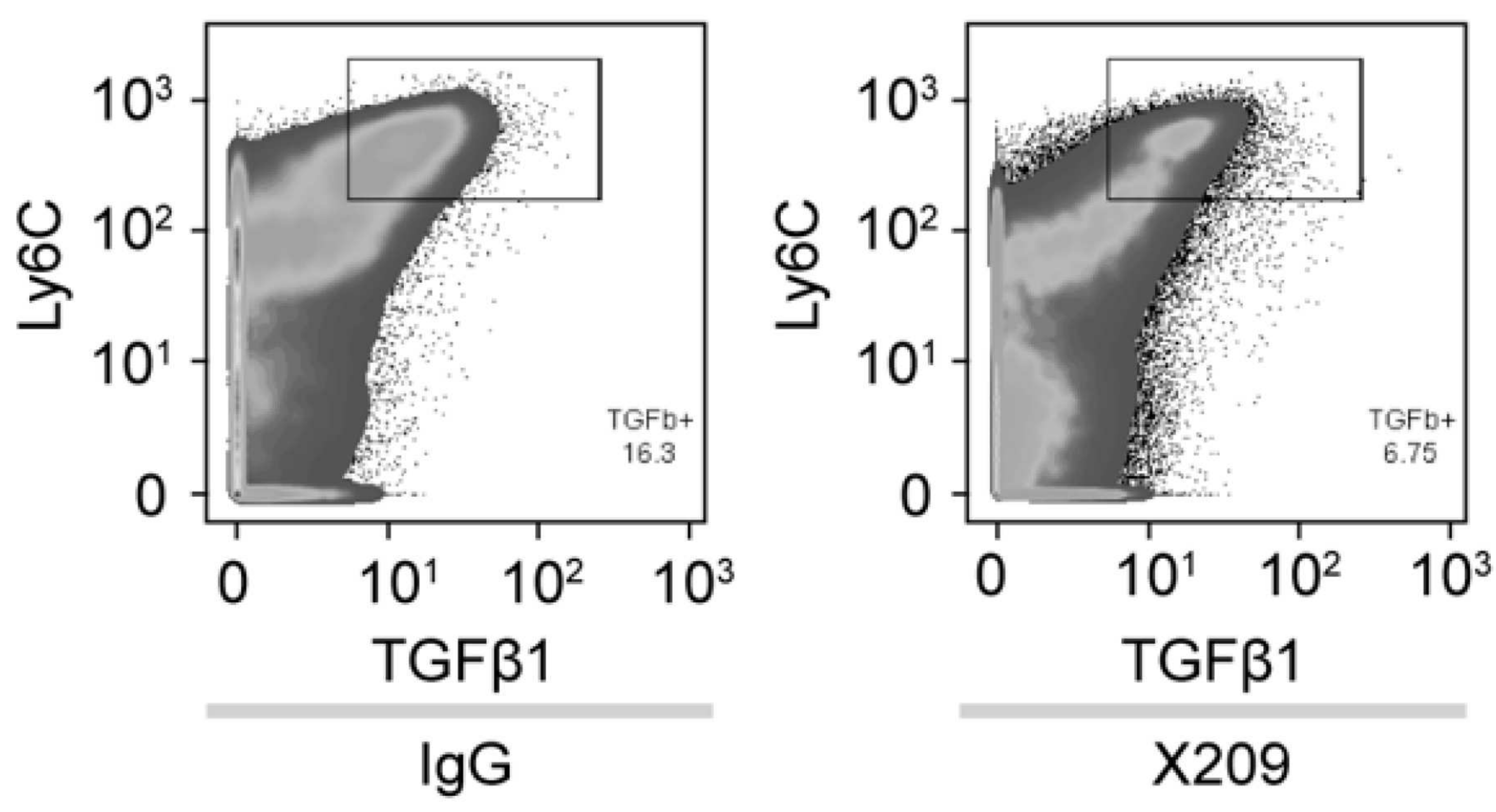
【圖23C】



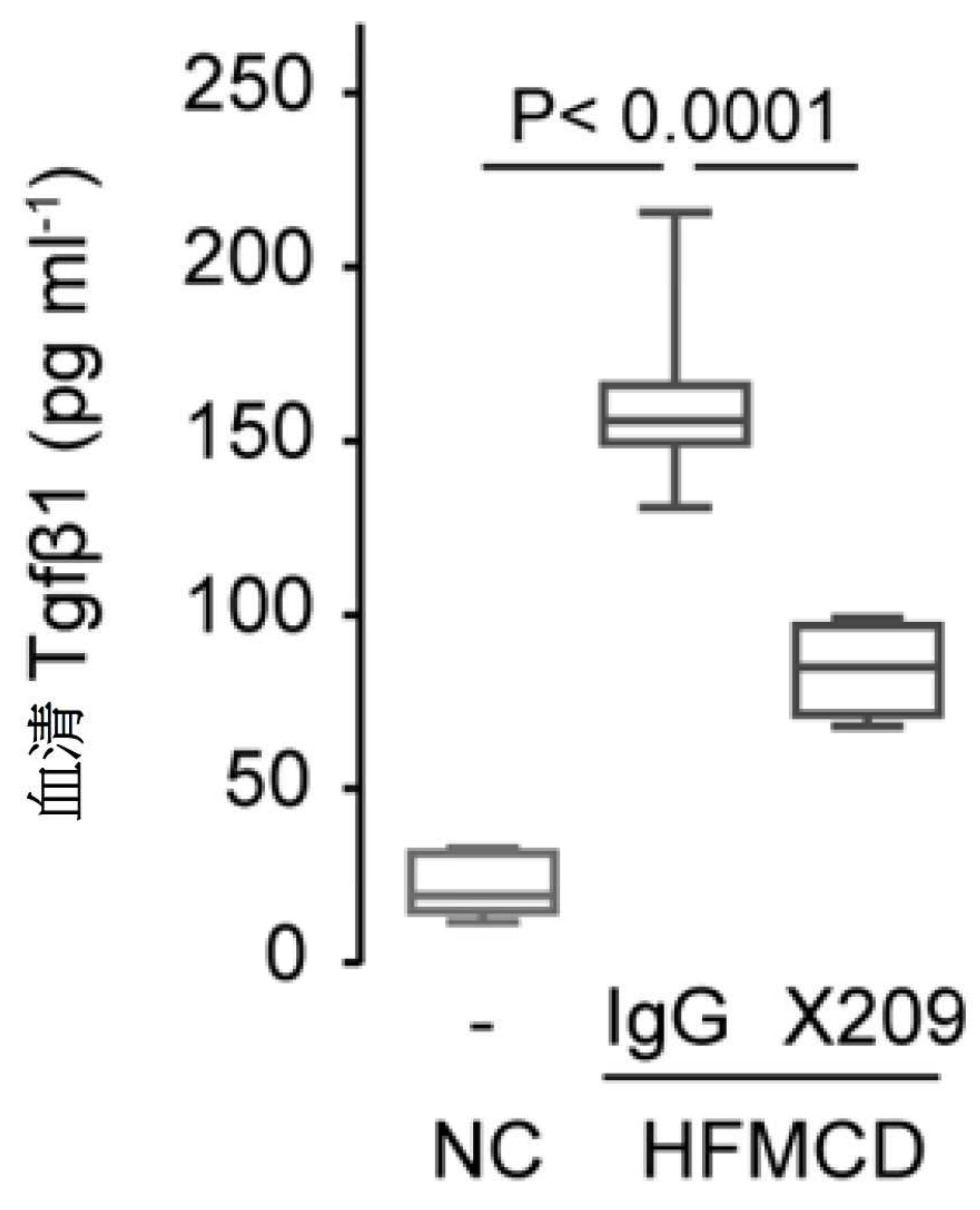
【圖23D】



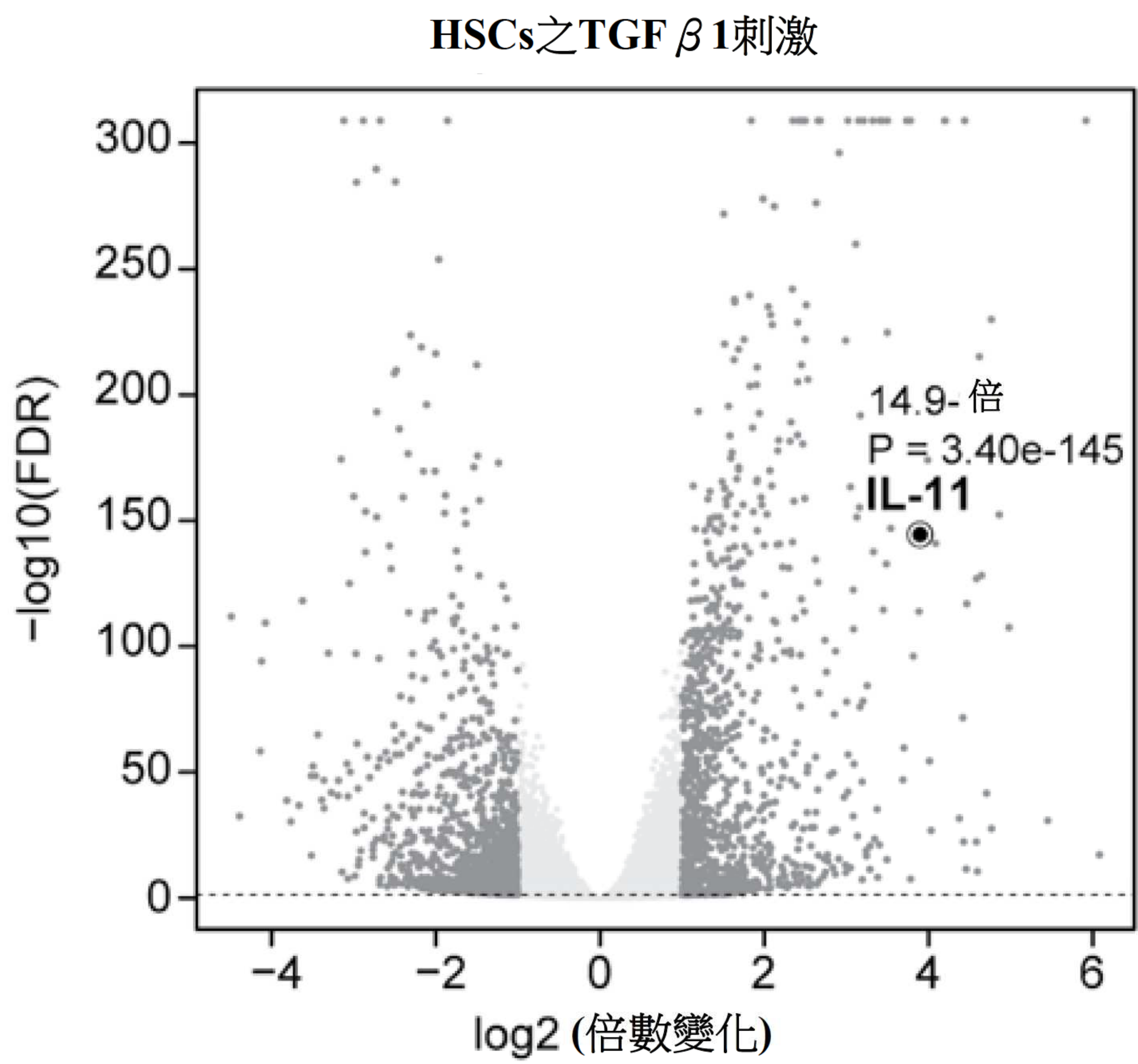
【圖23E】



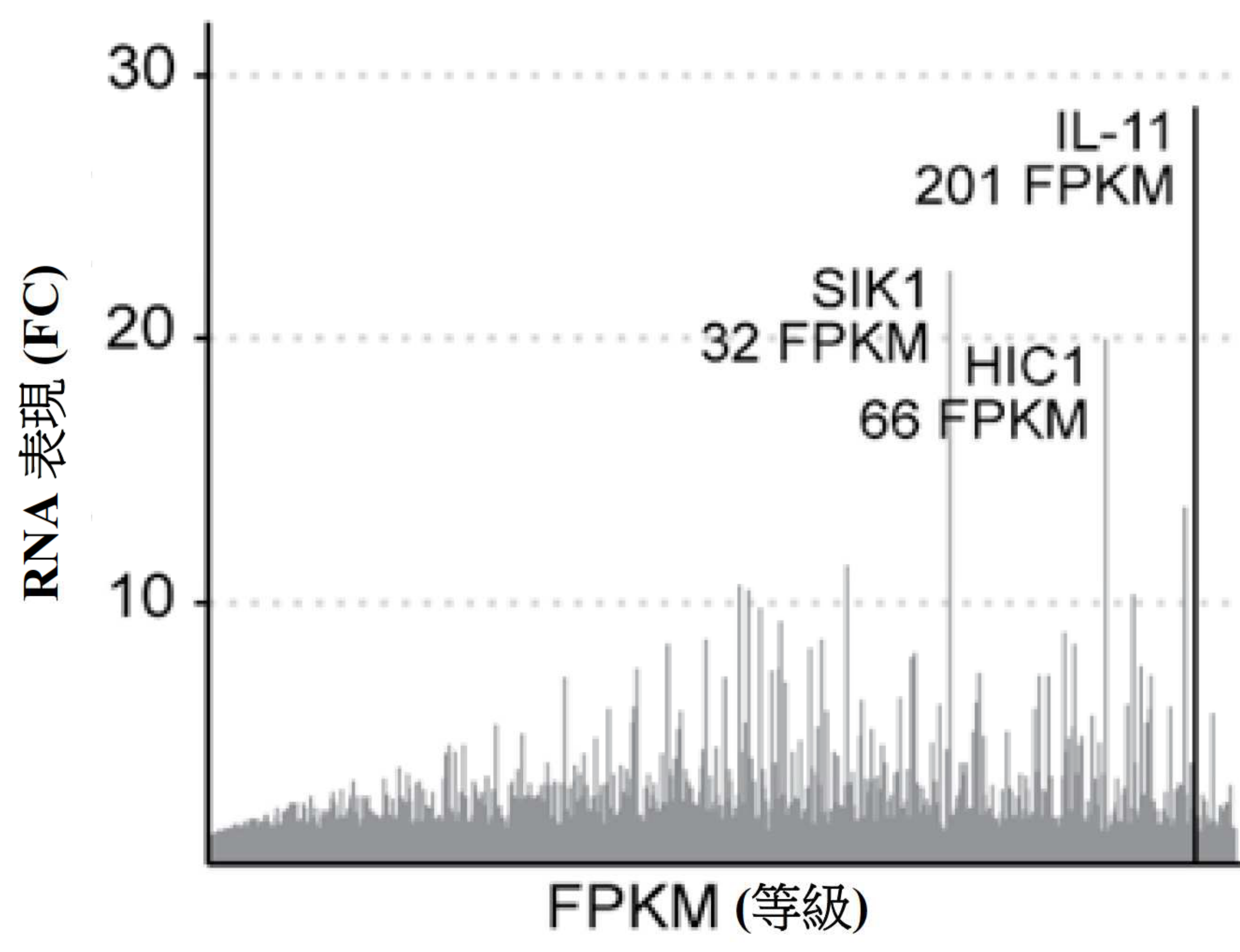
【圖23F】



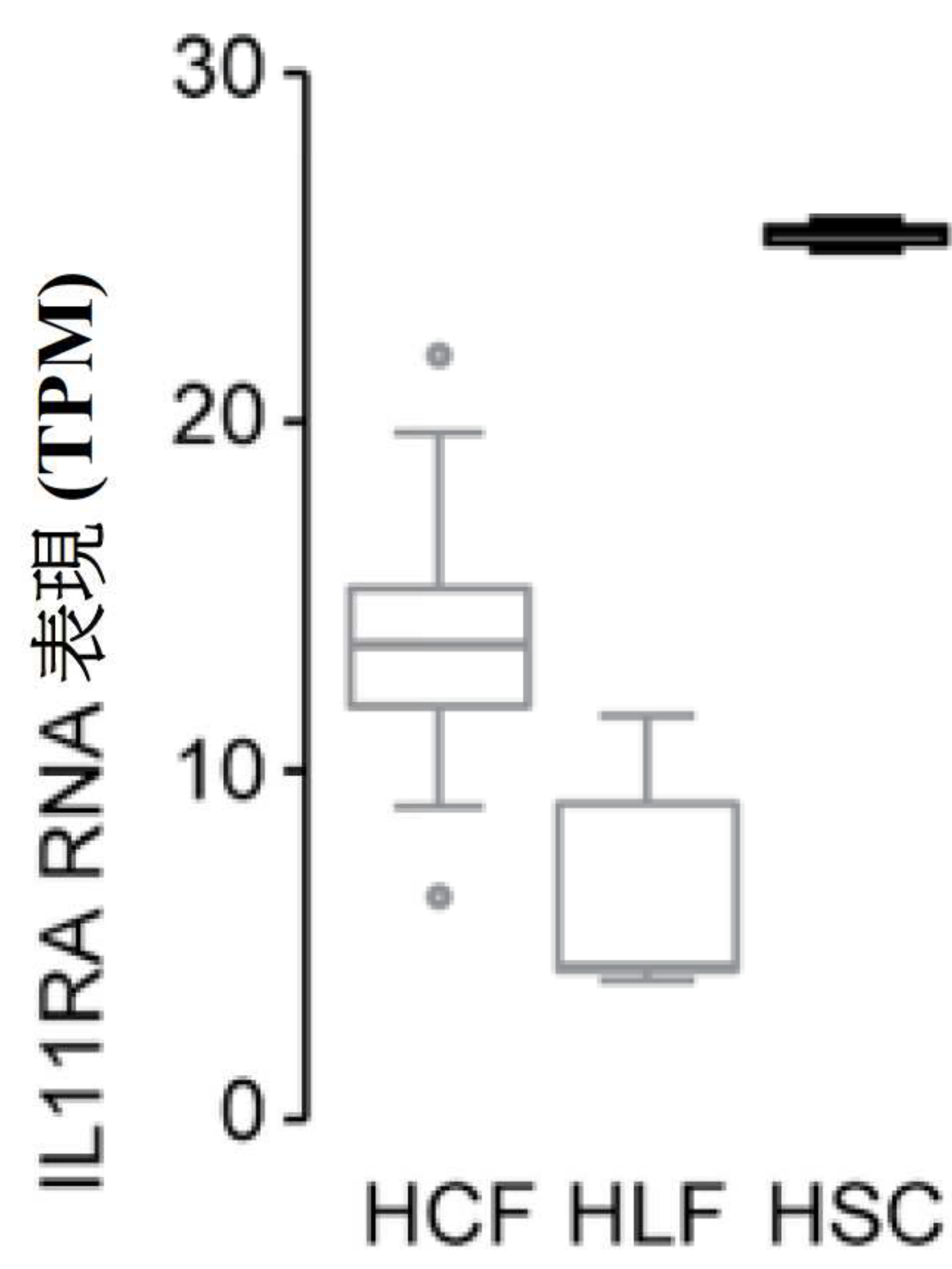
【圖23G】



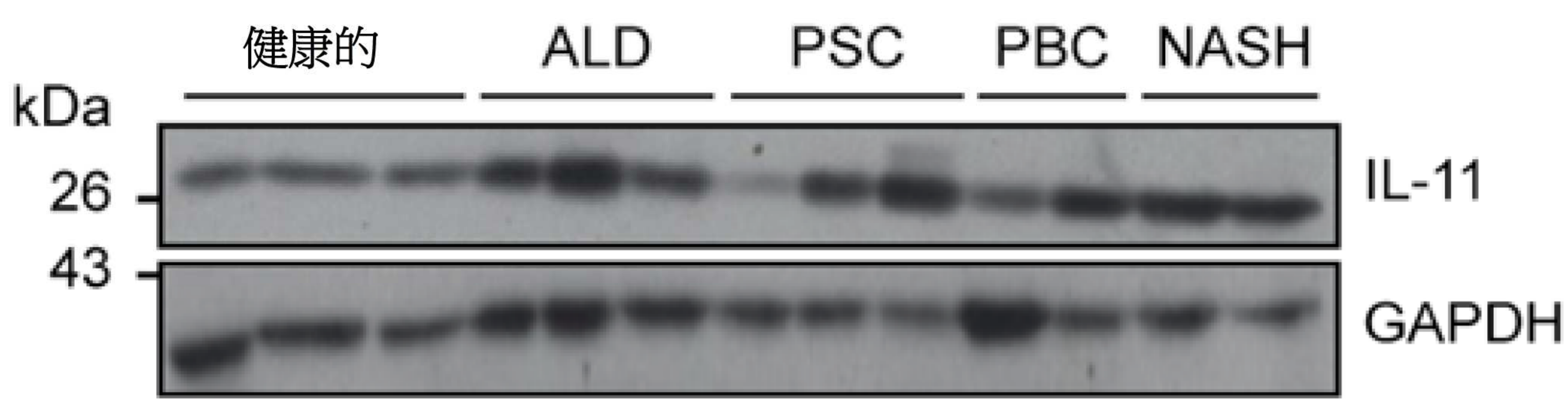
【圖24A】



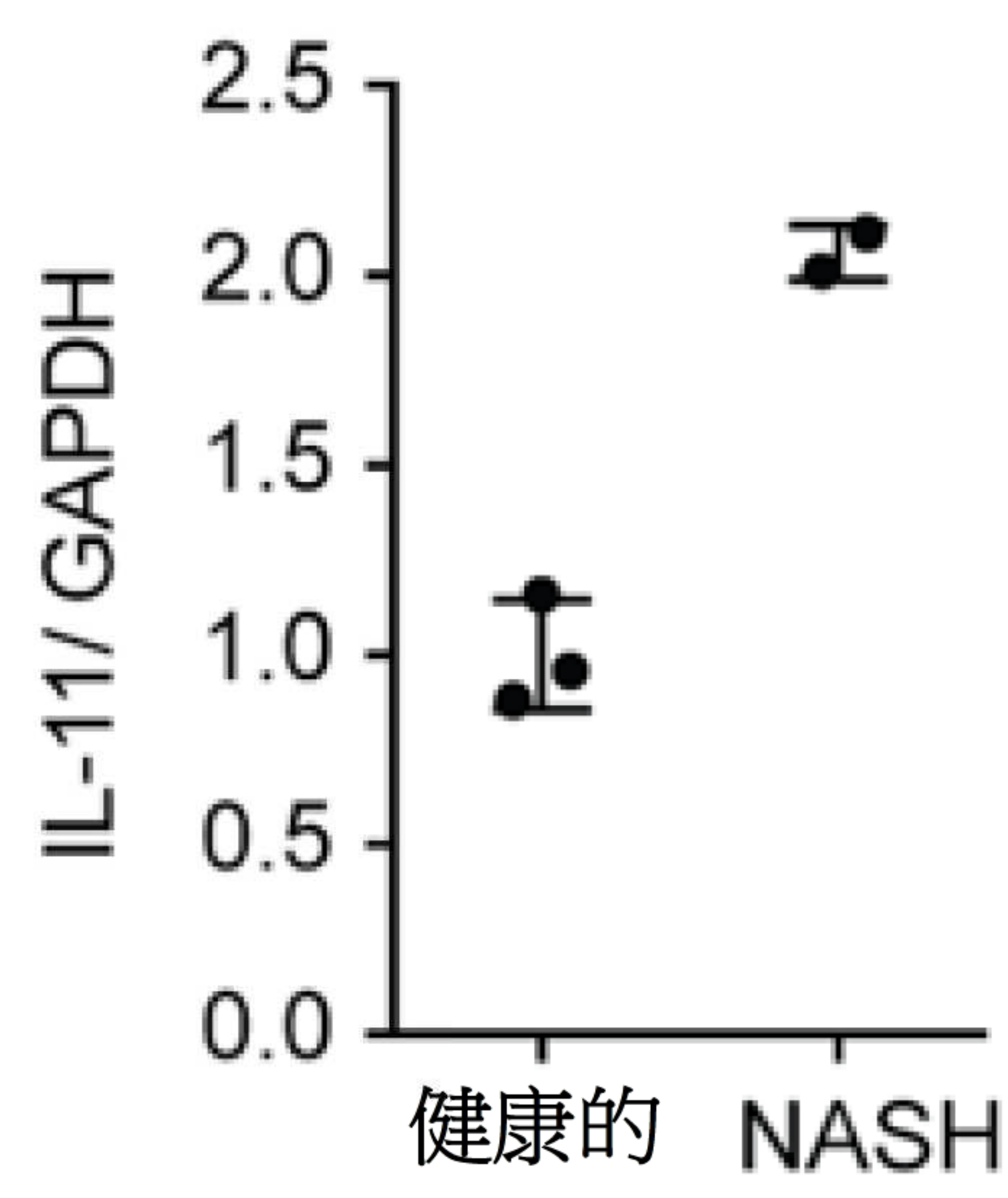
【圖24B】



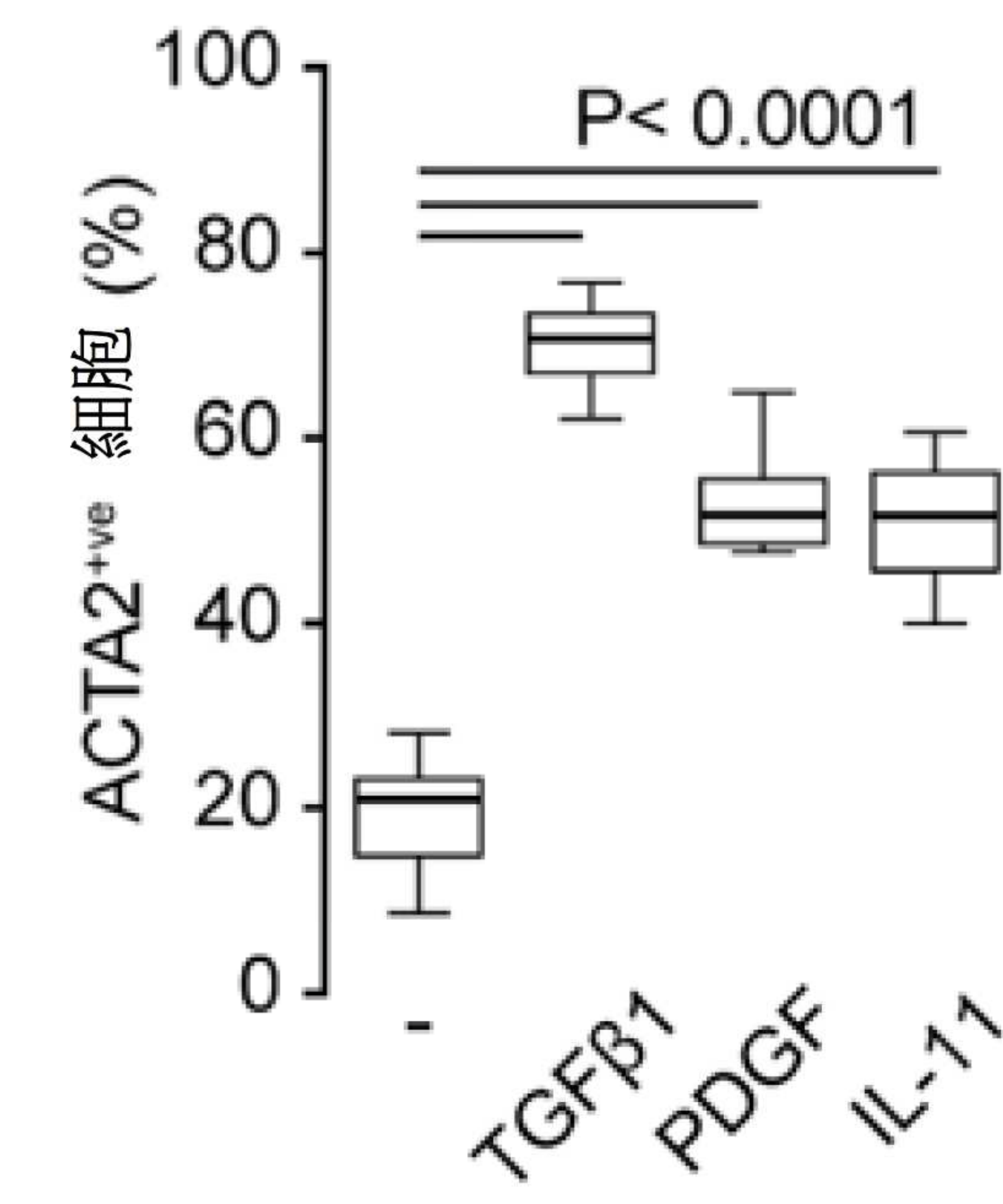
【圖24C】



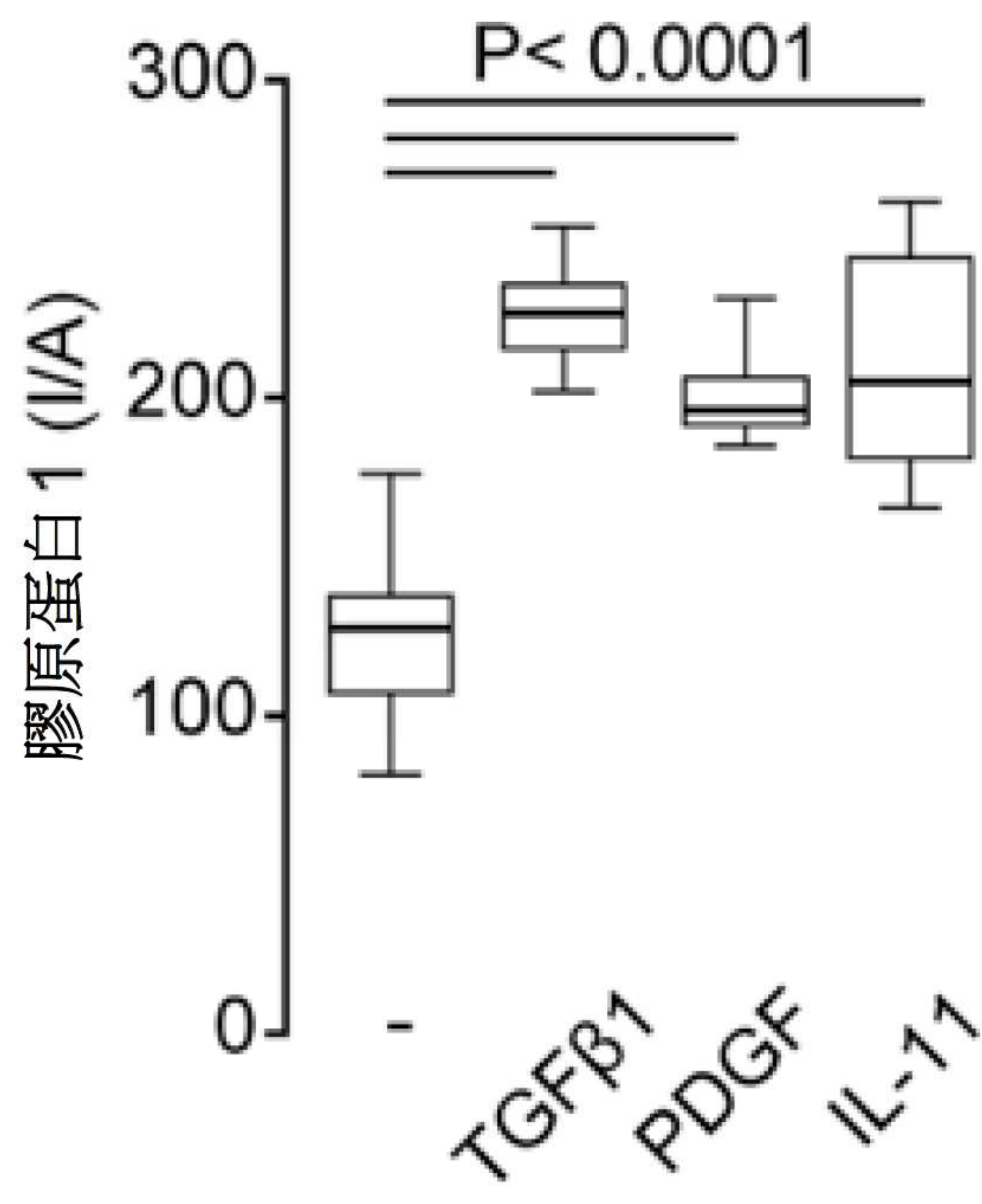
【圖24D】



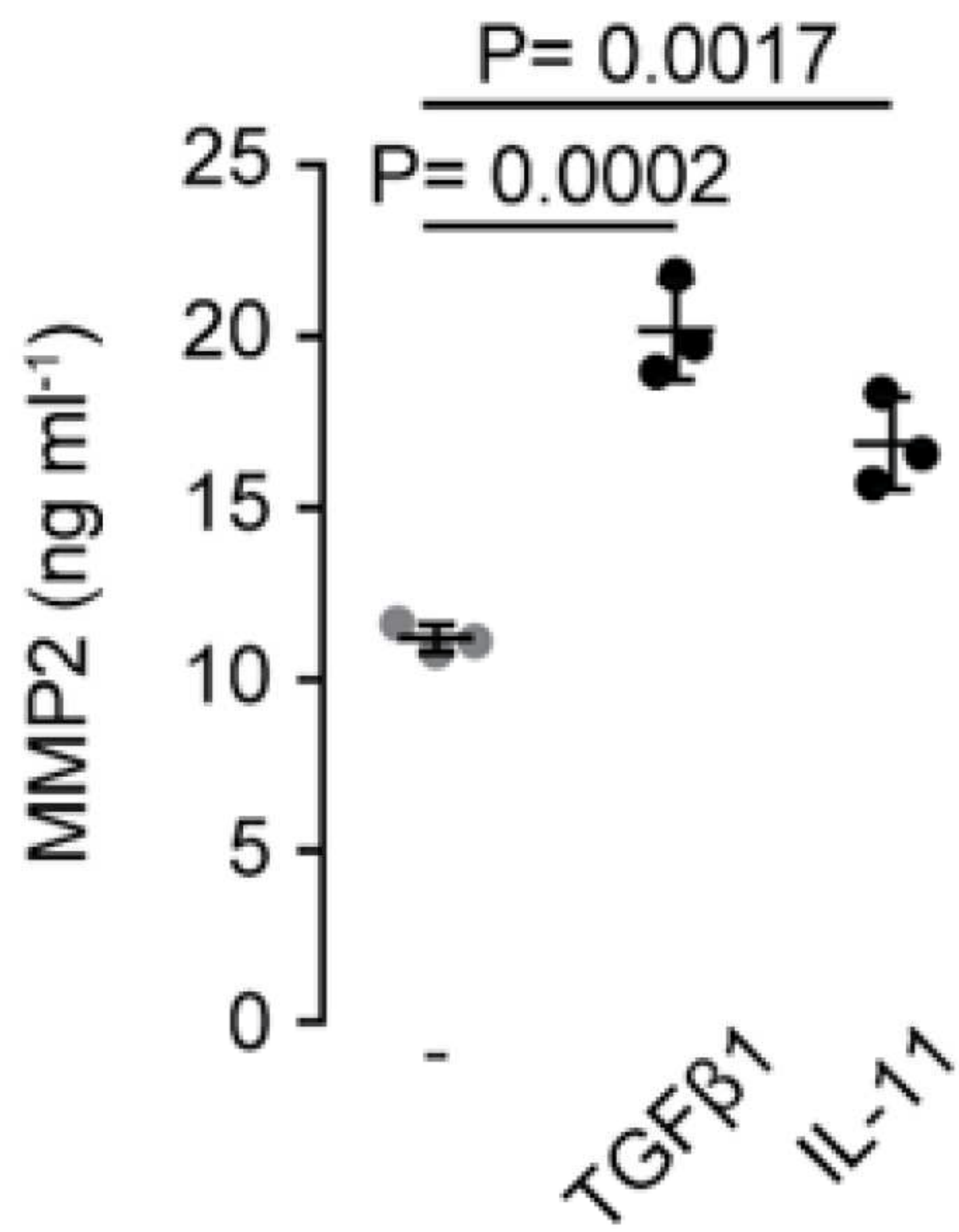
【圖24E】



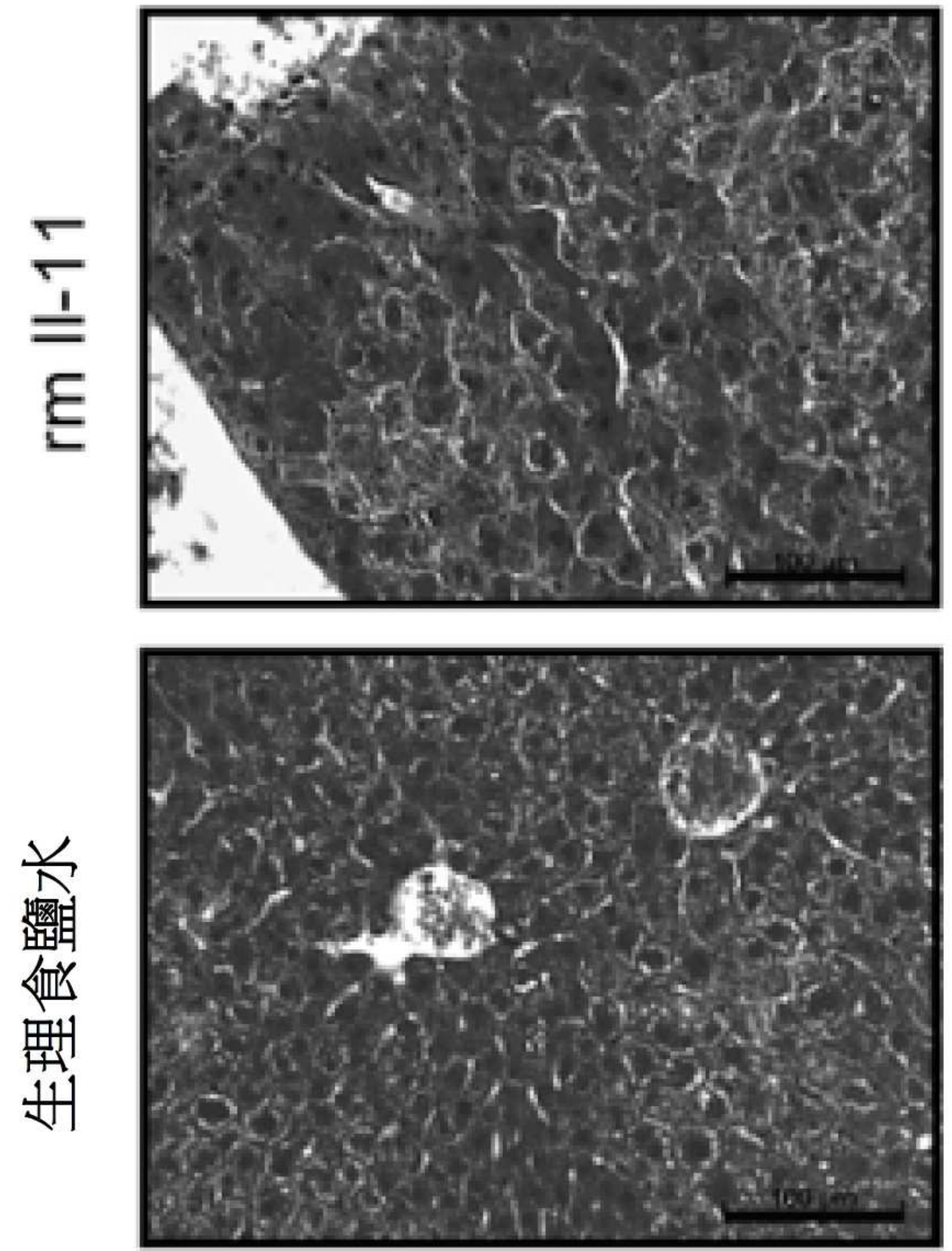
【圖24F】



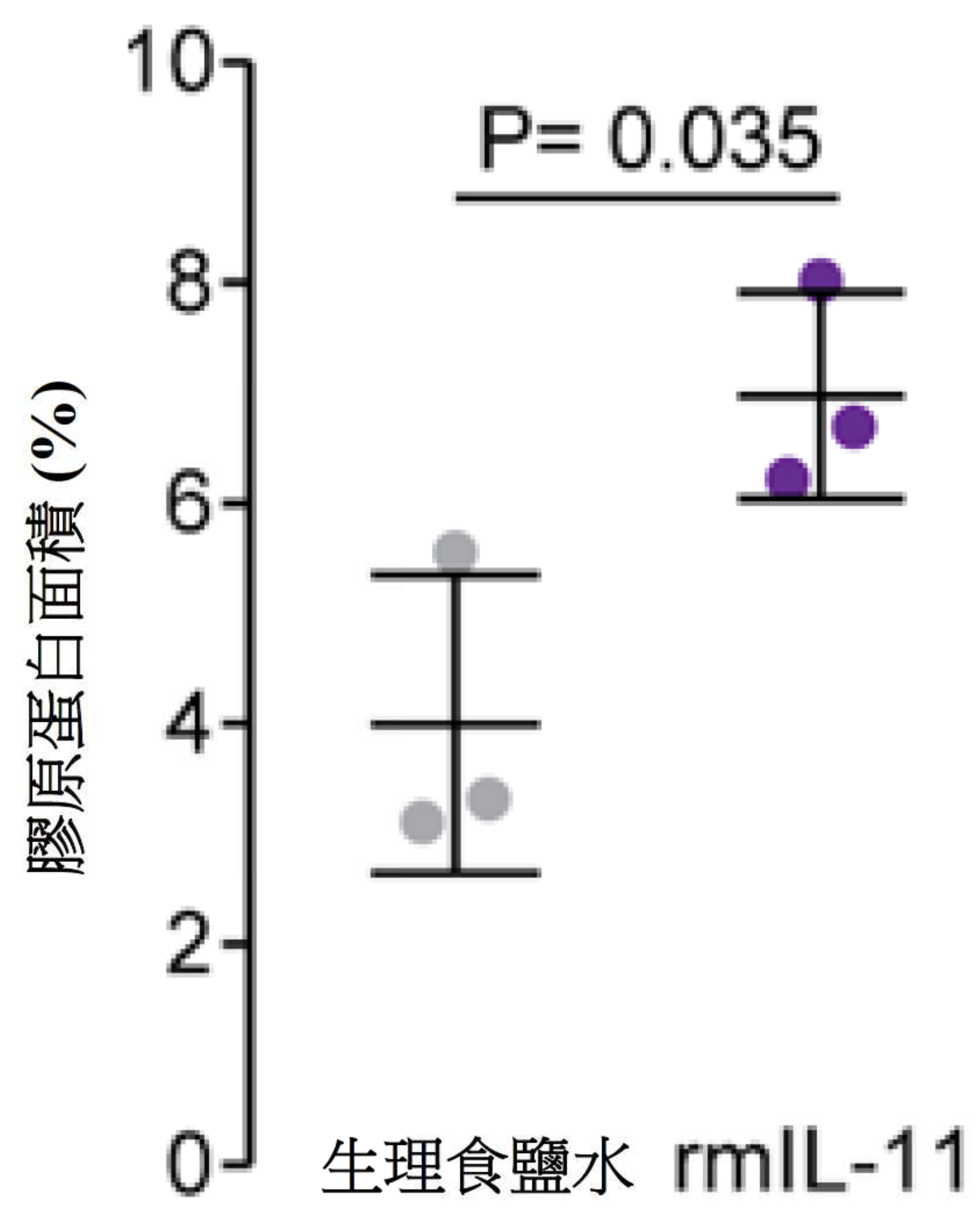
【圖24G】



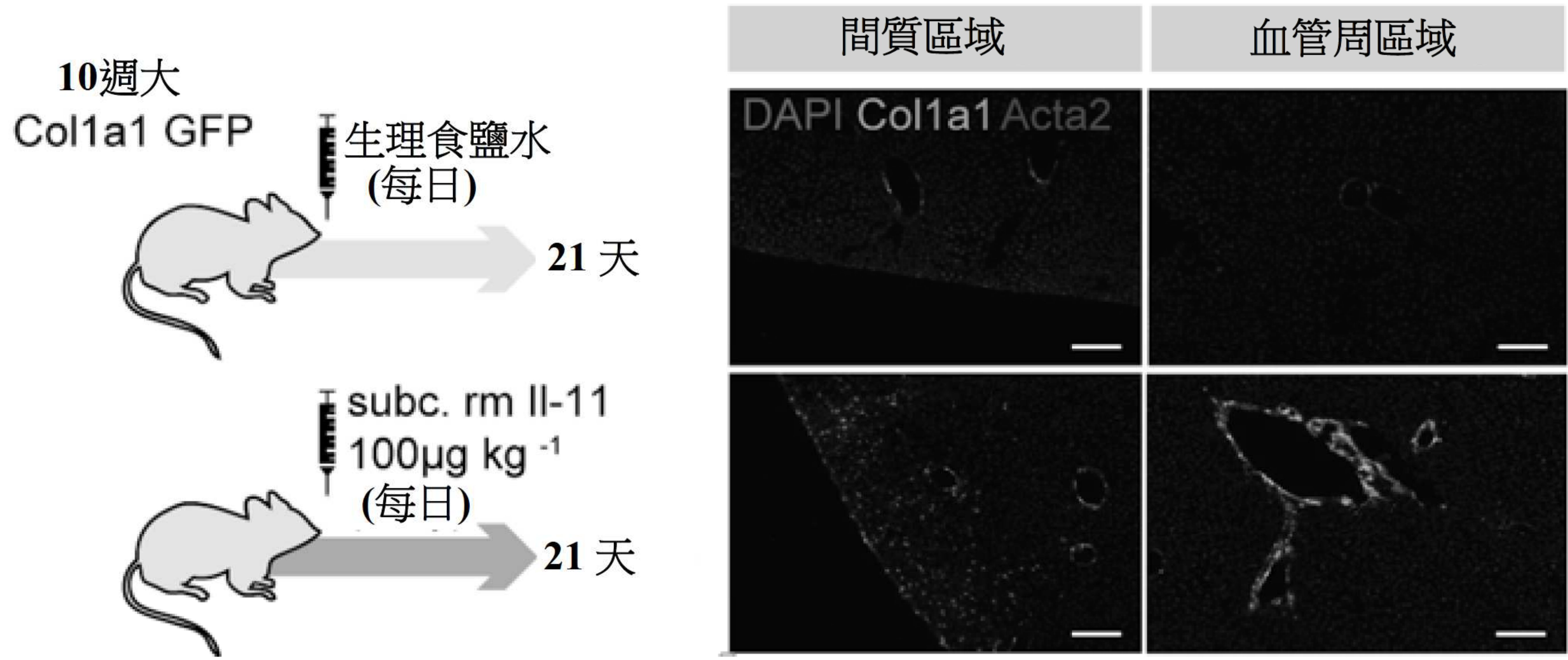
【圖24H】



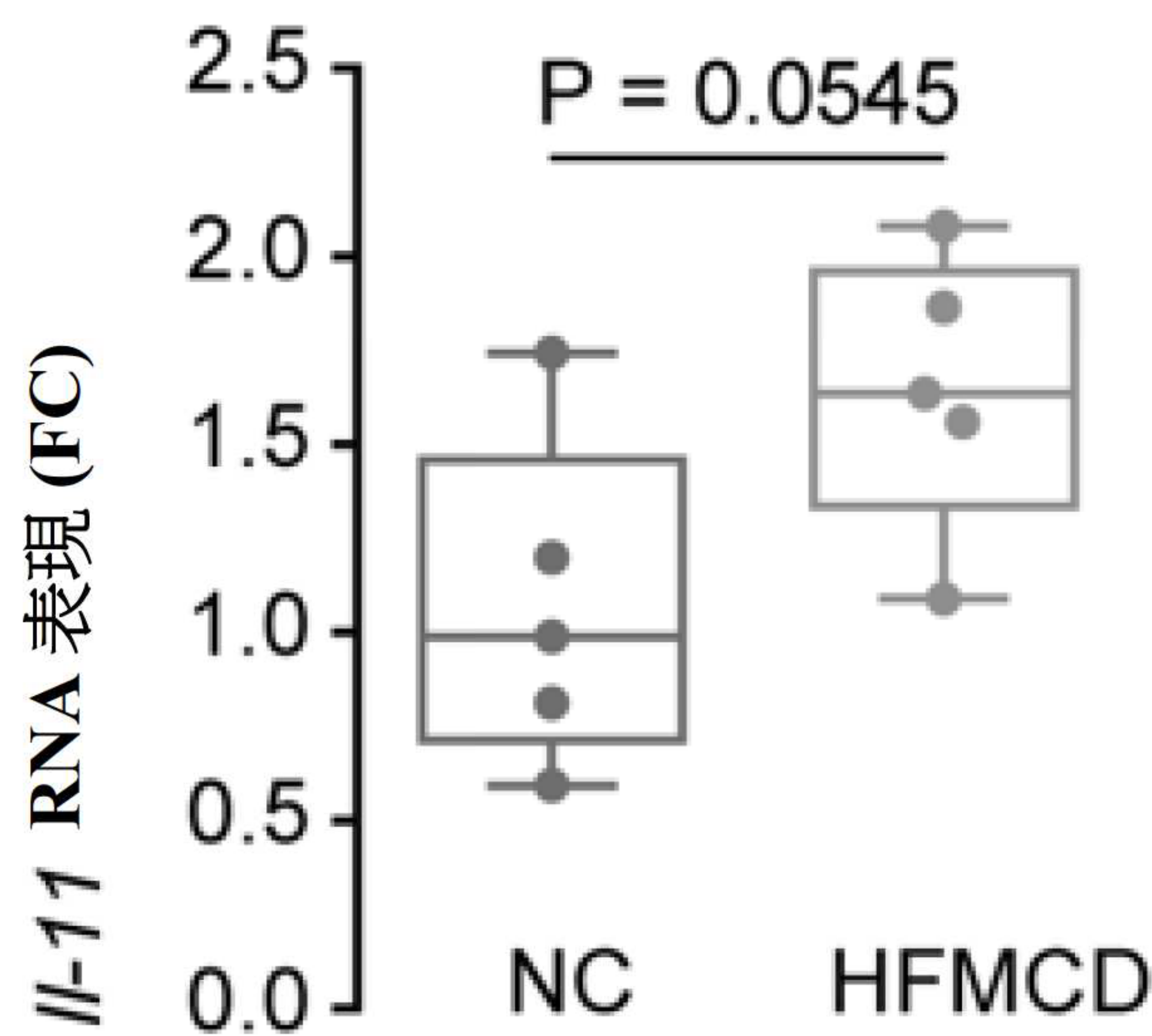
【圖24I】



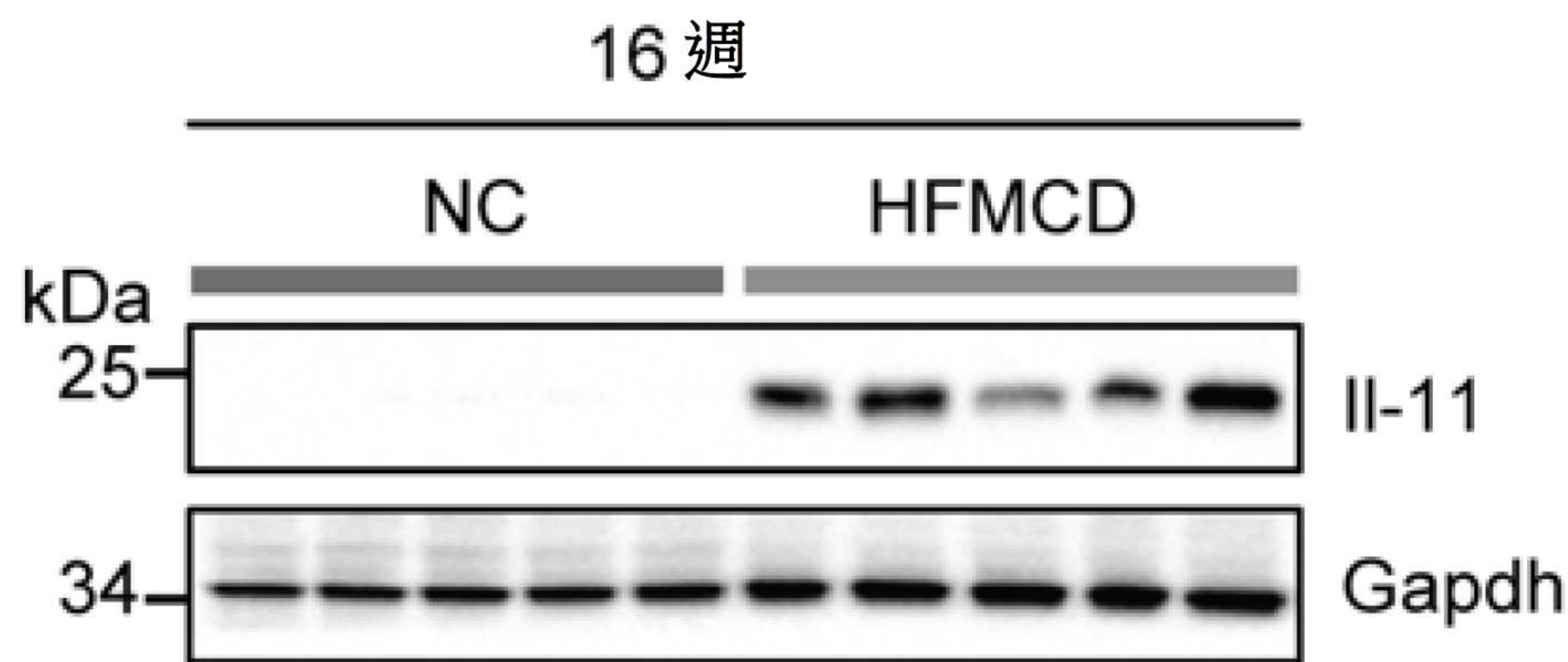
【圖24J】



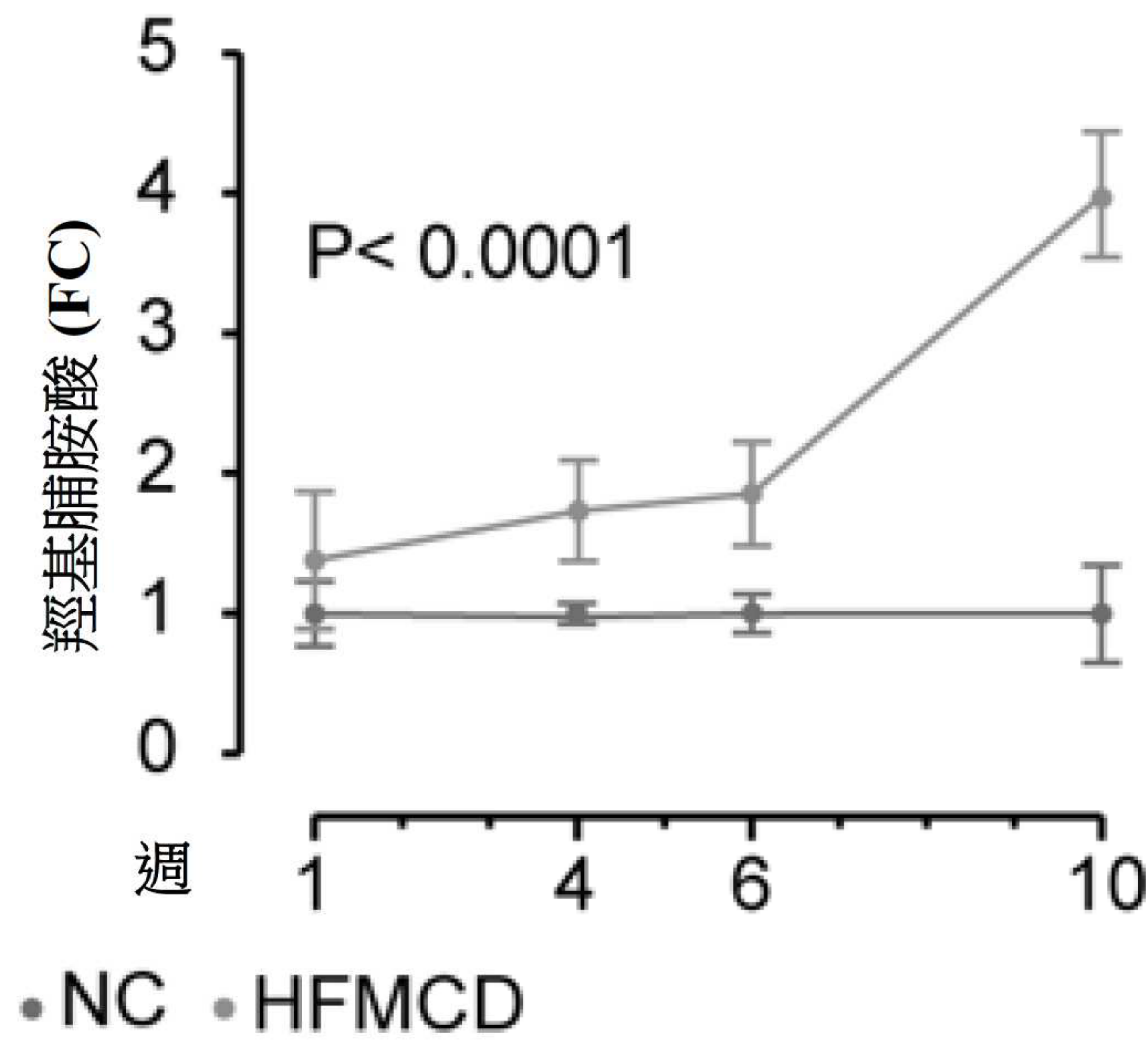
【圖24K】



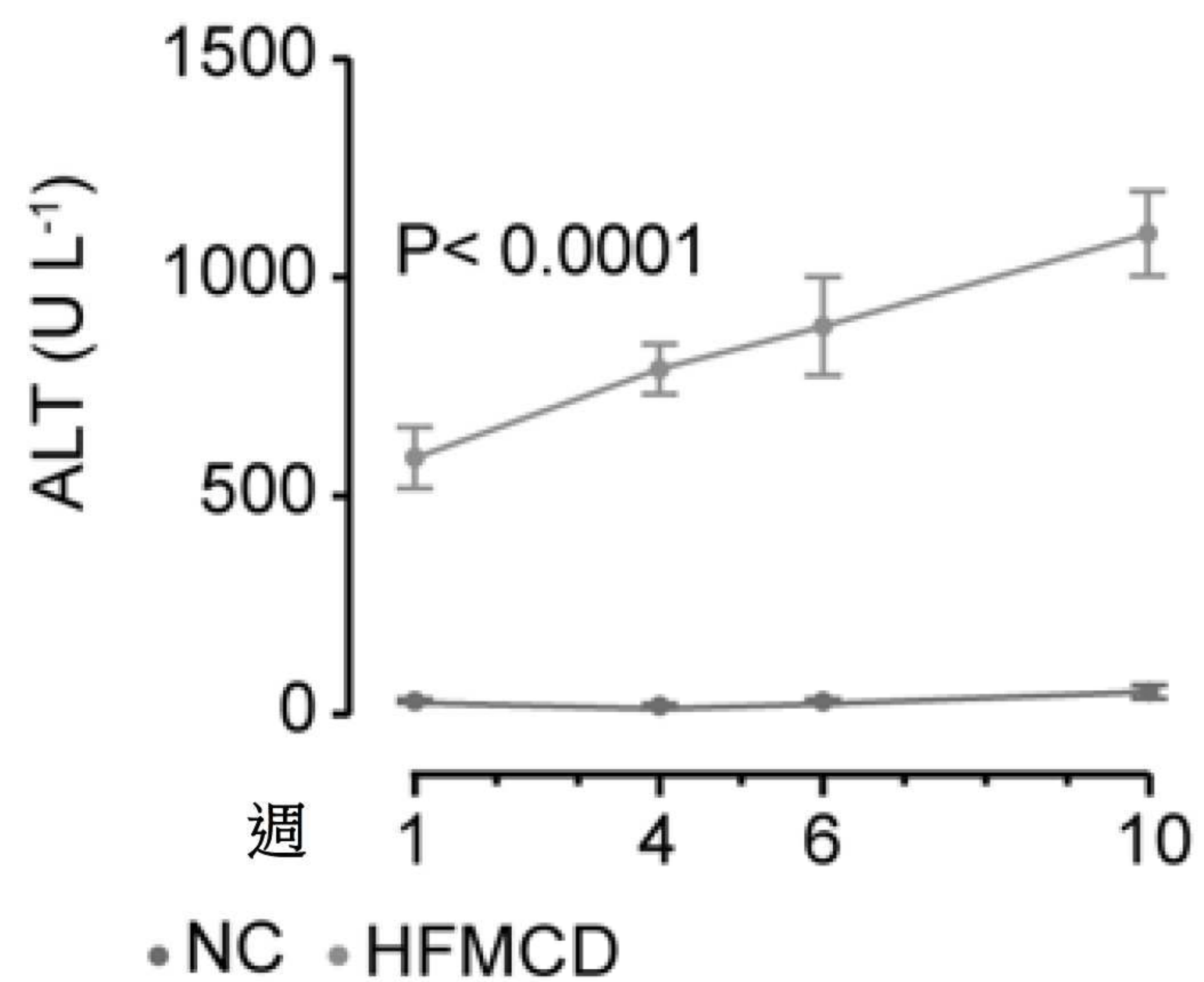
【圖25A】



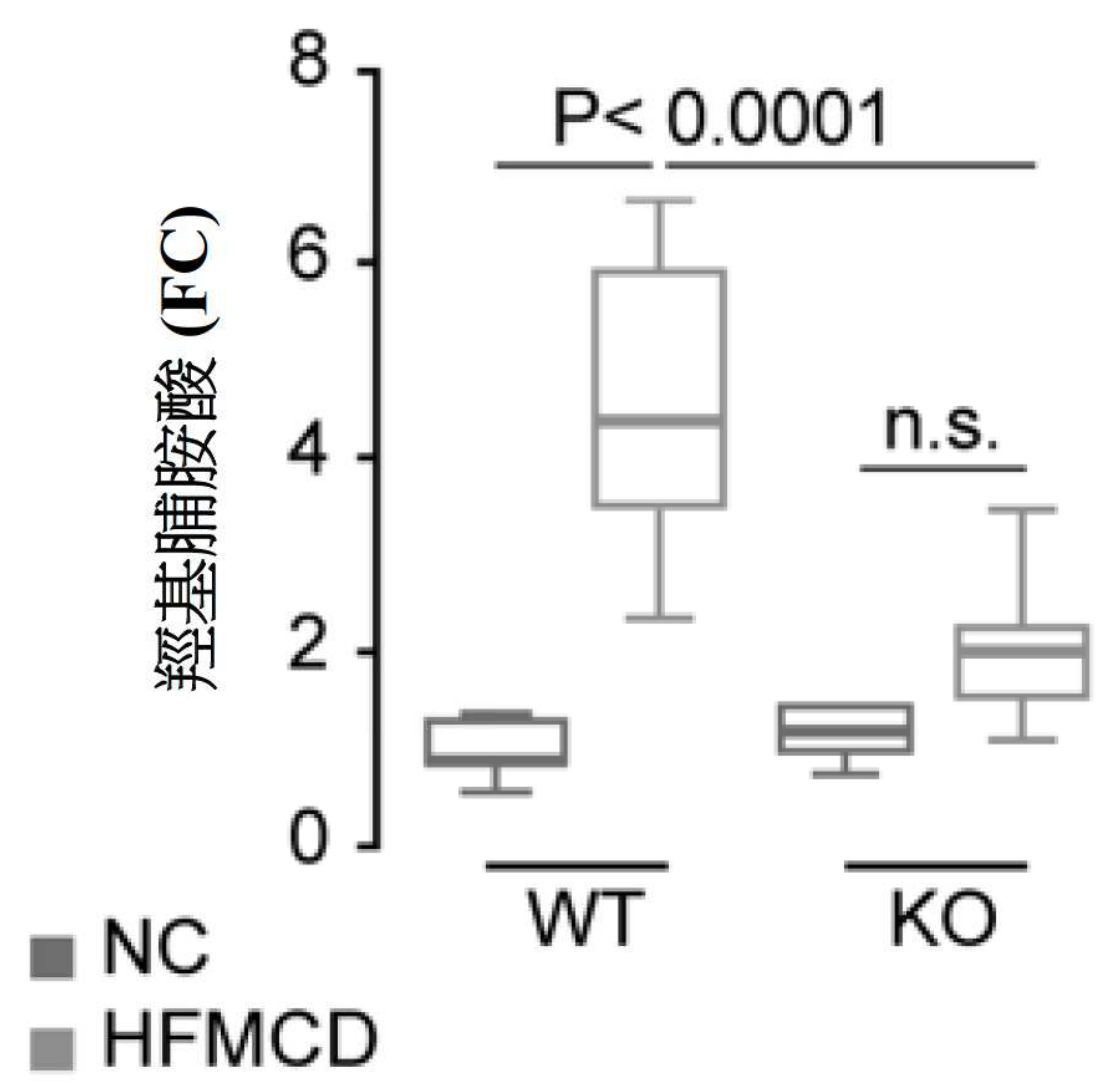
【圖25B】



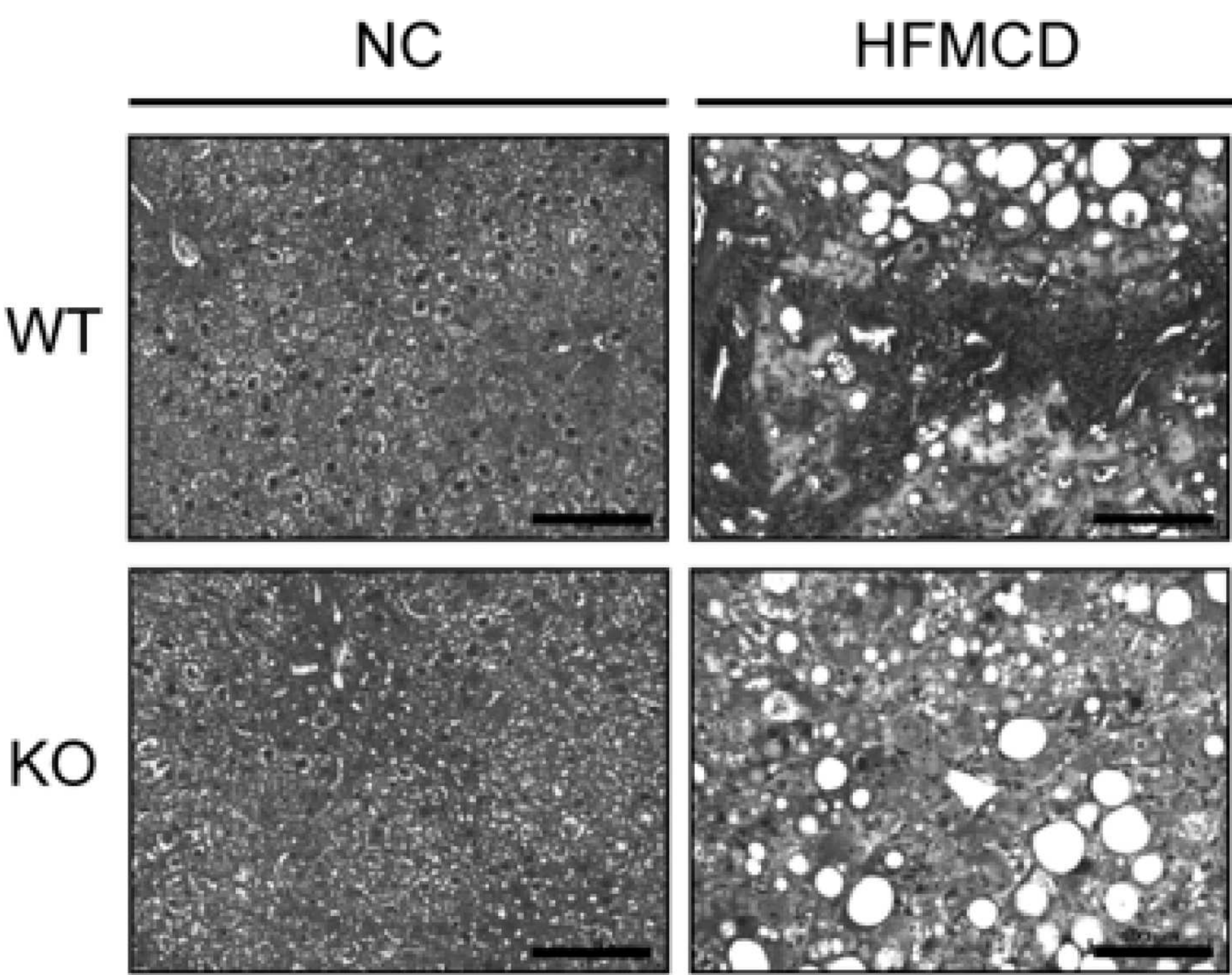
【圖25C】



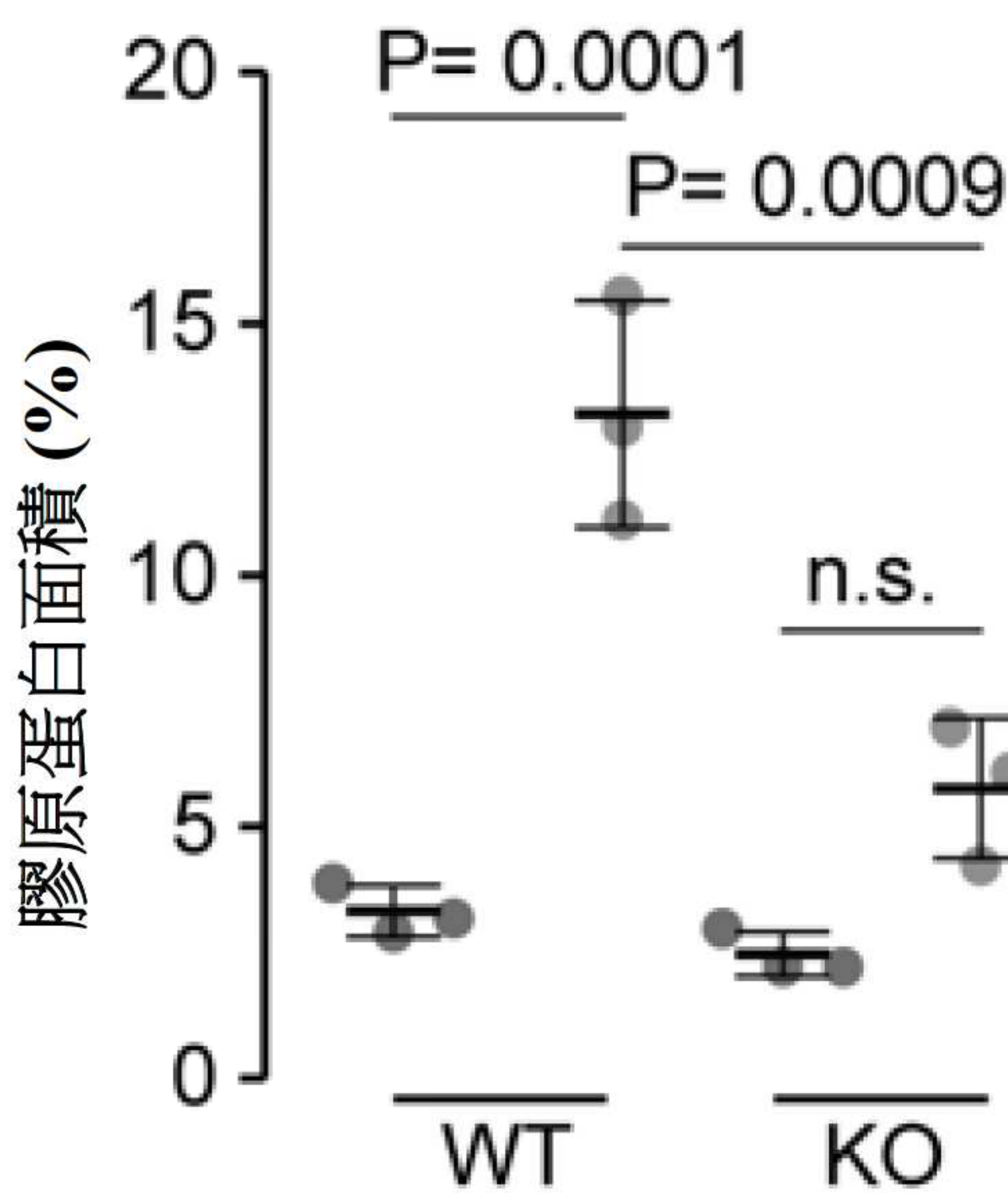
【圖25D】



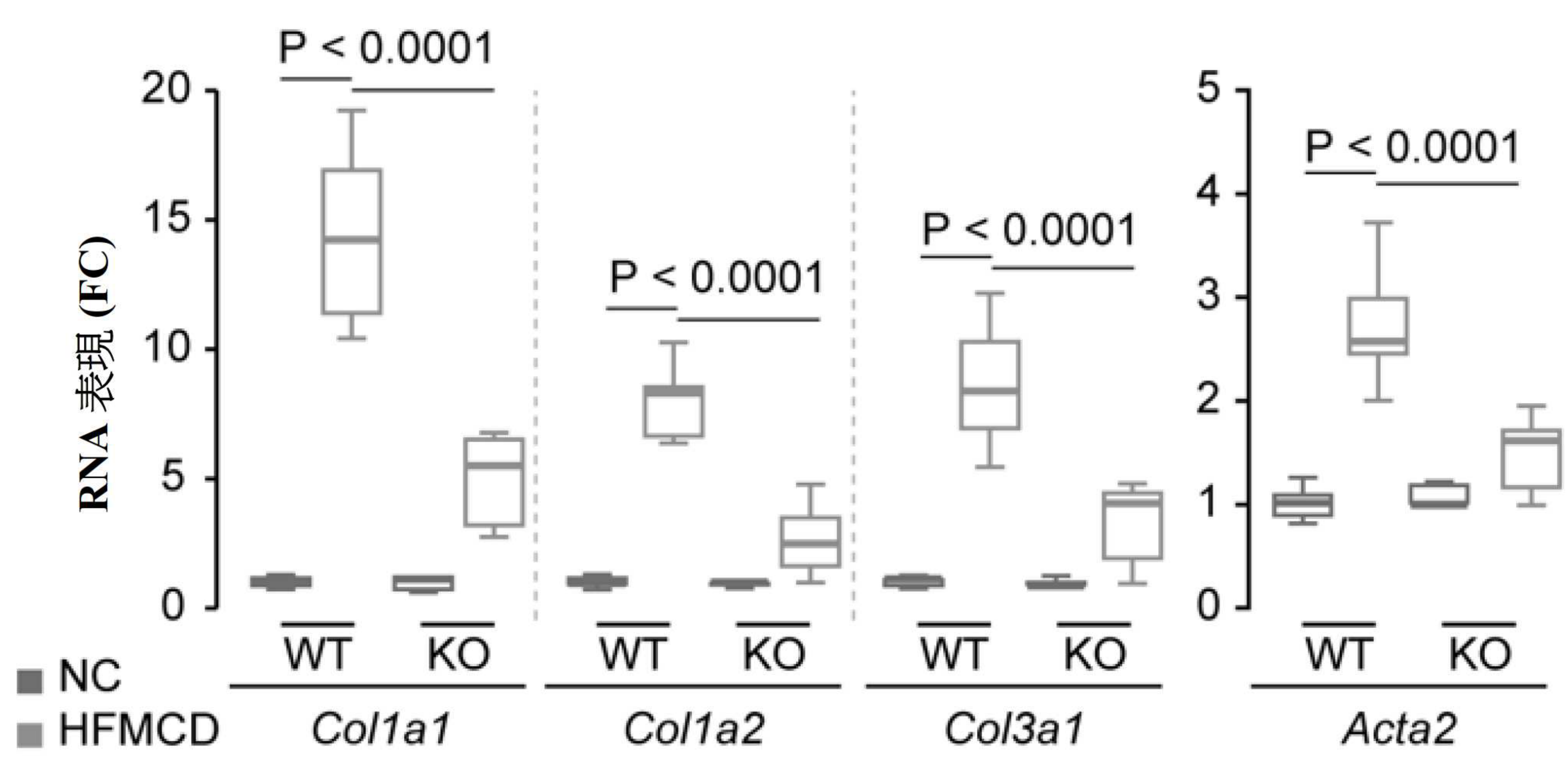
【圖25E】



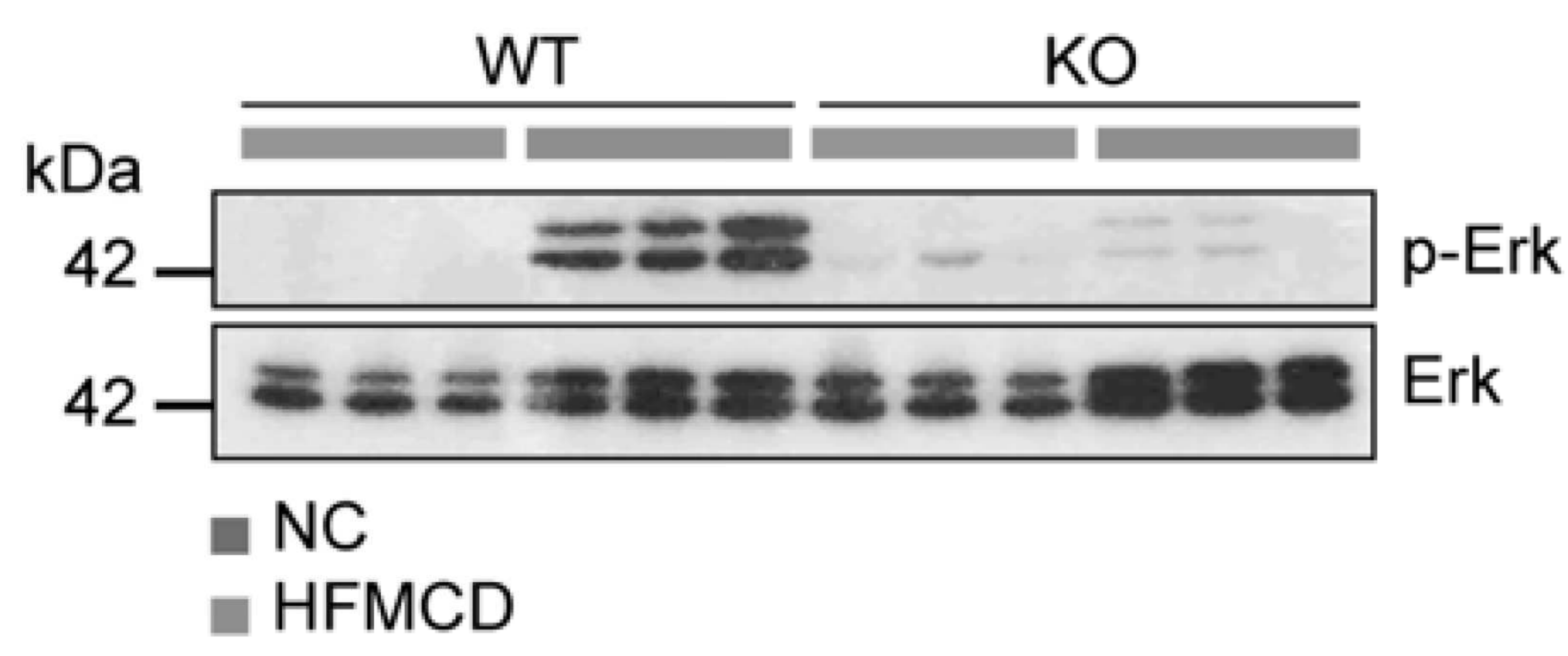
【圖25F】



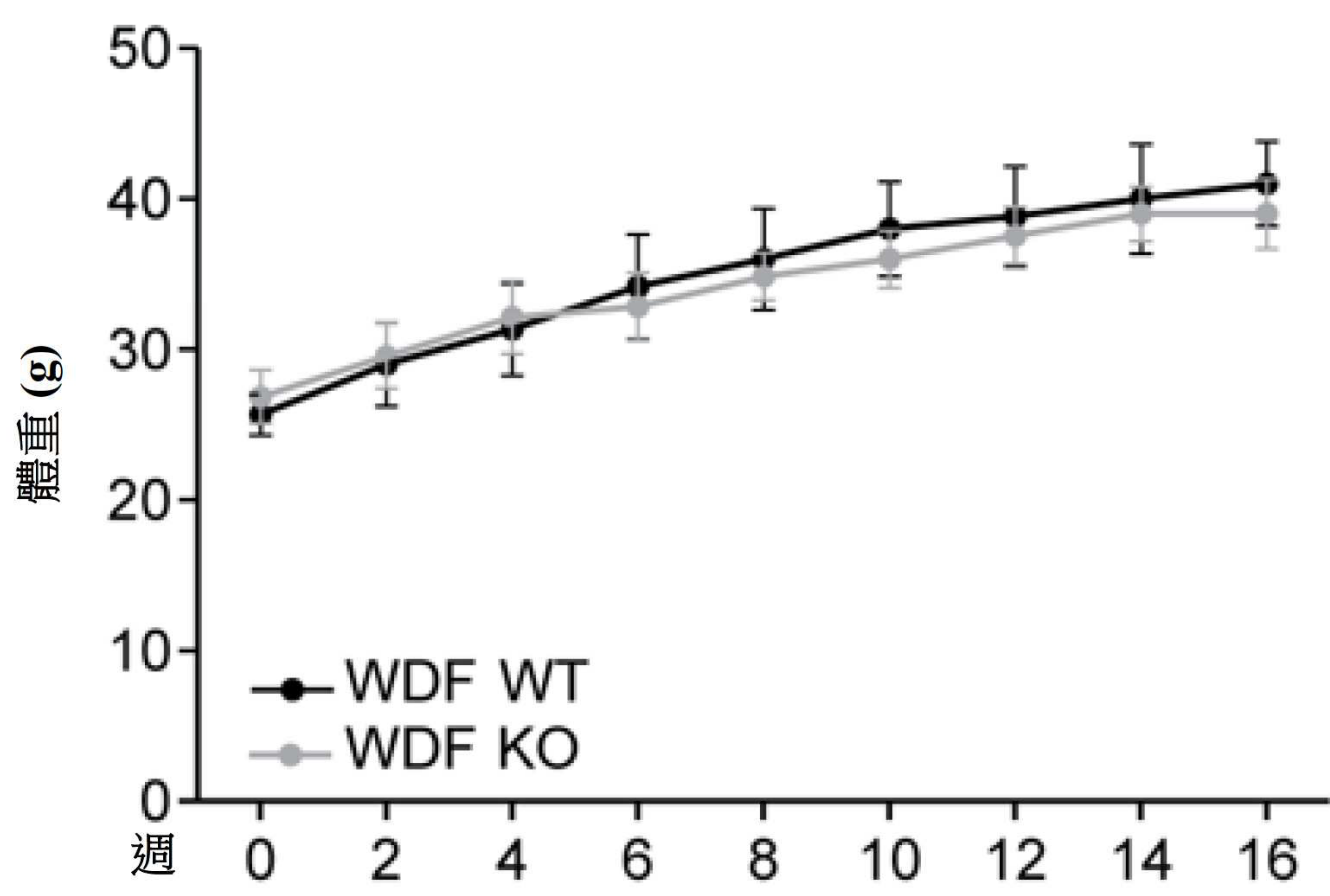
【圖25G】



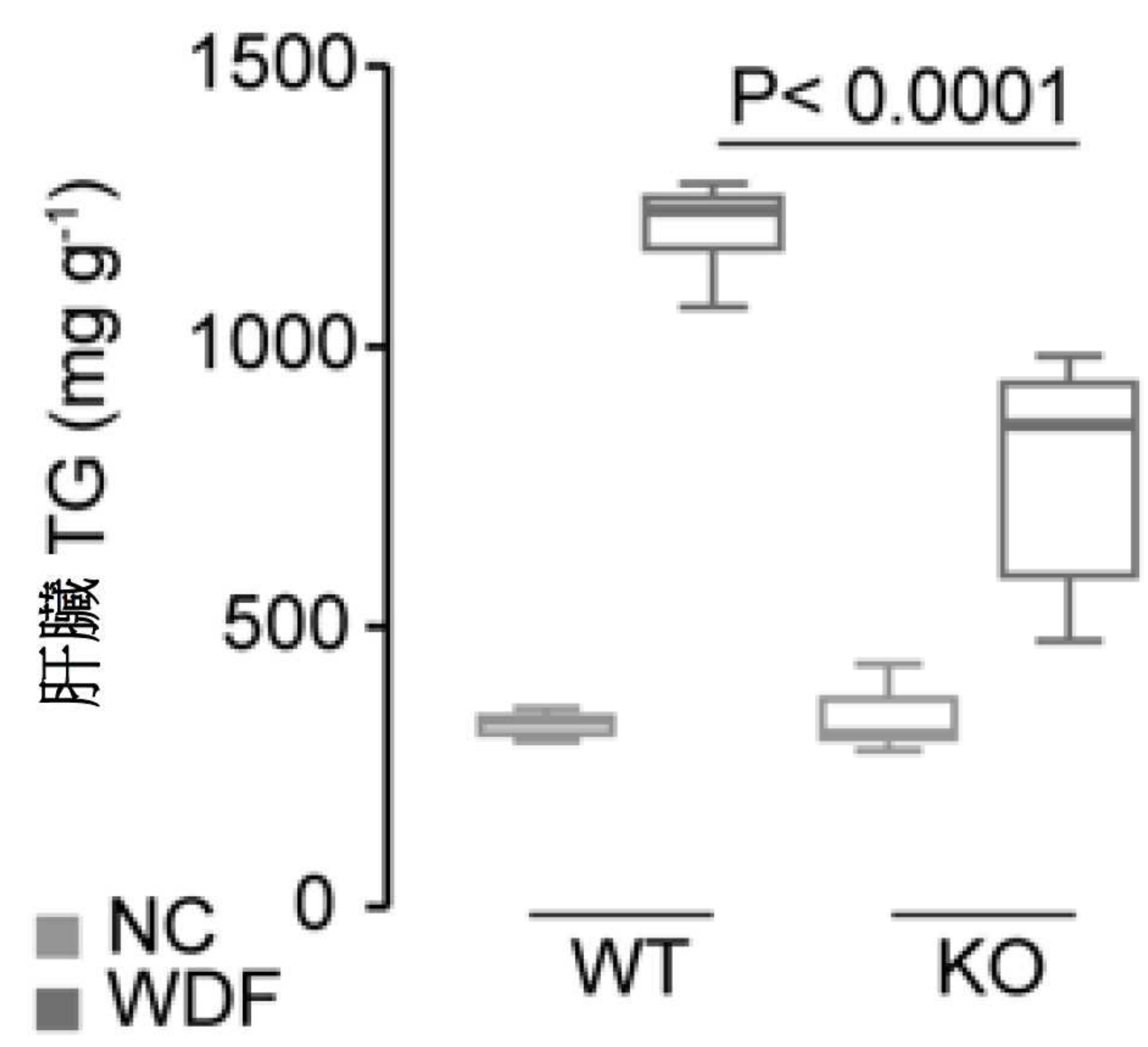
【圖25H】



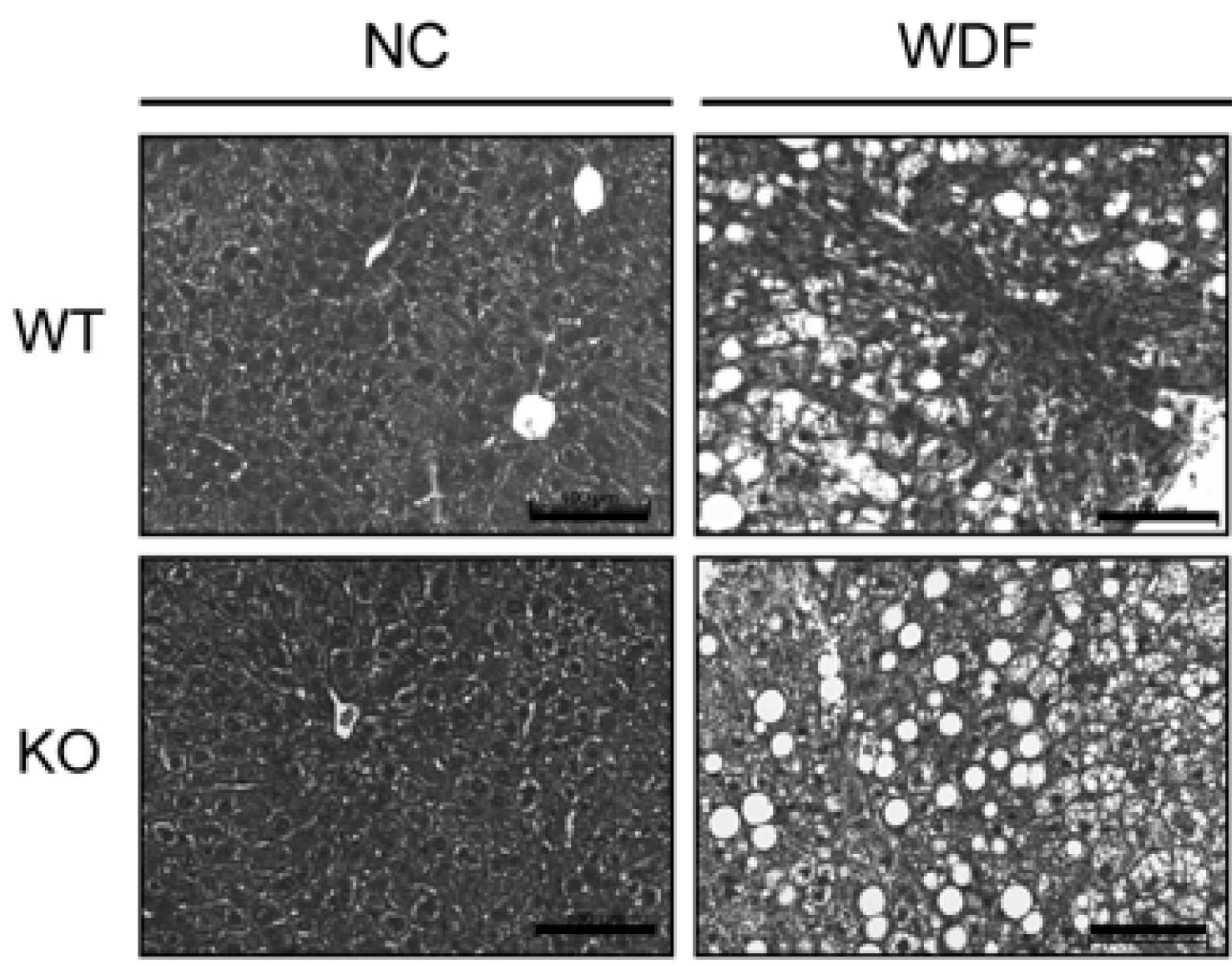
【圖25I】



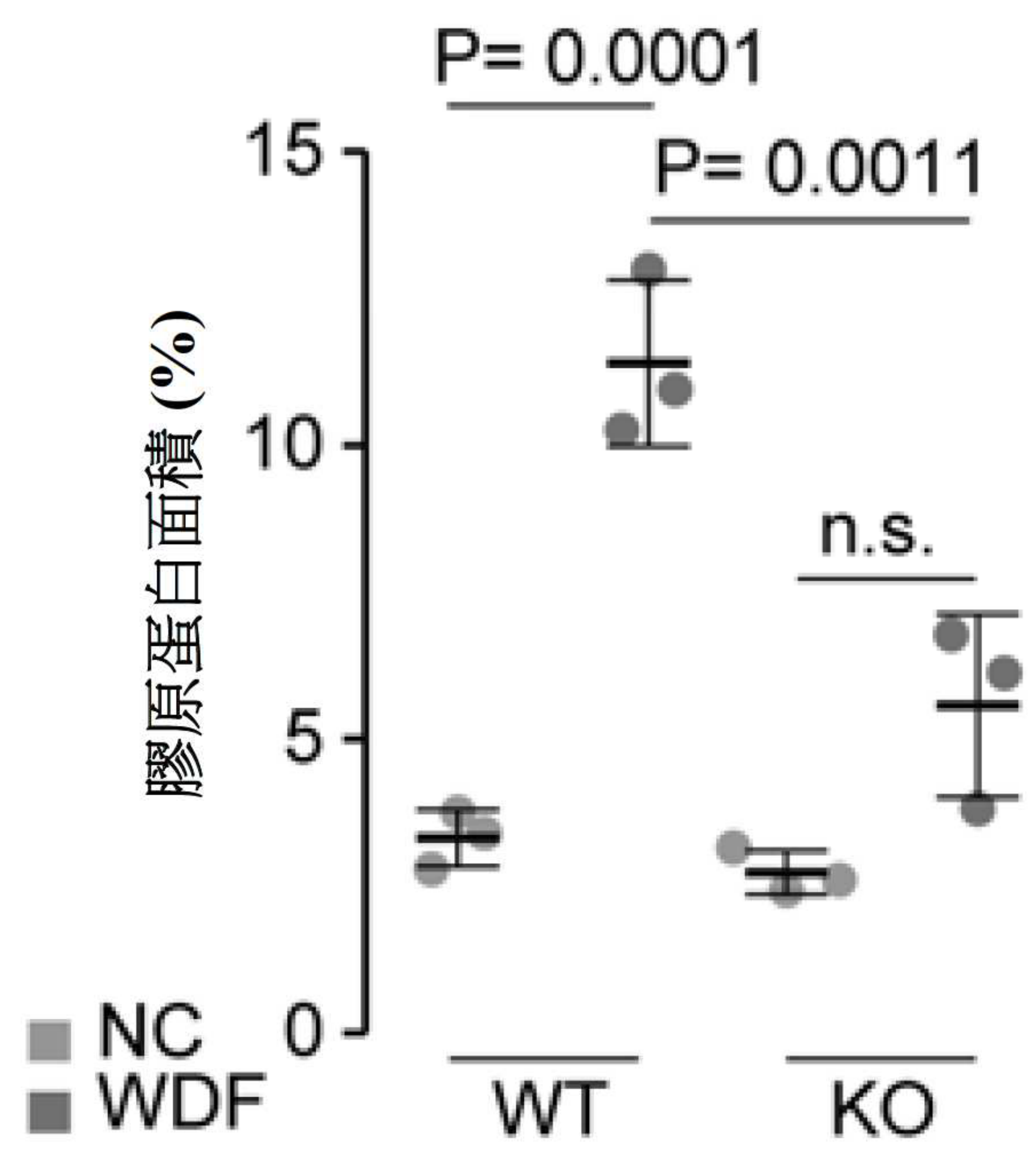
【圖26A】



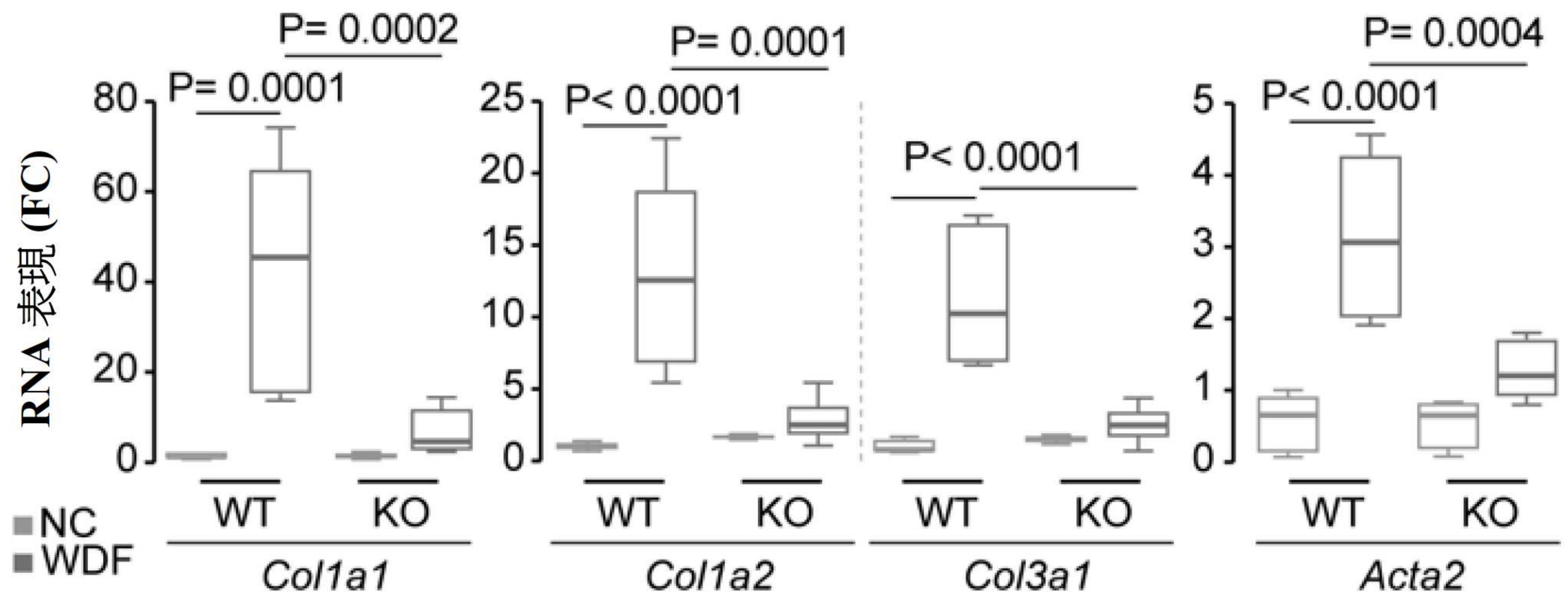
【圖26B】



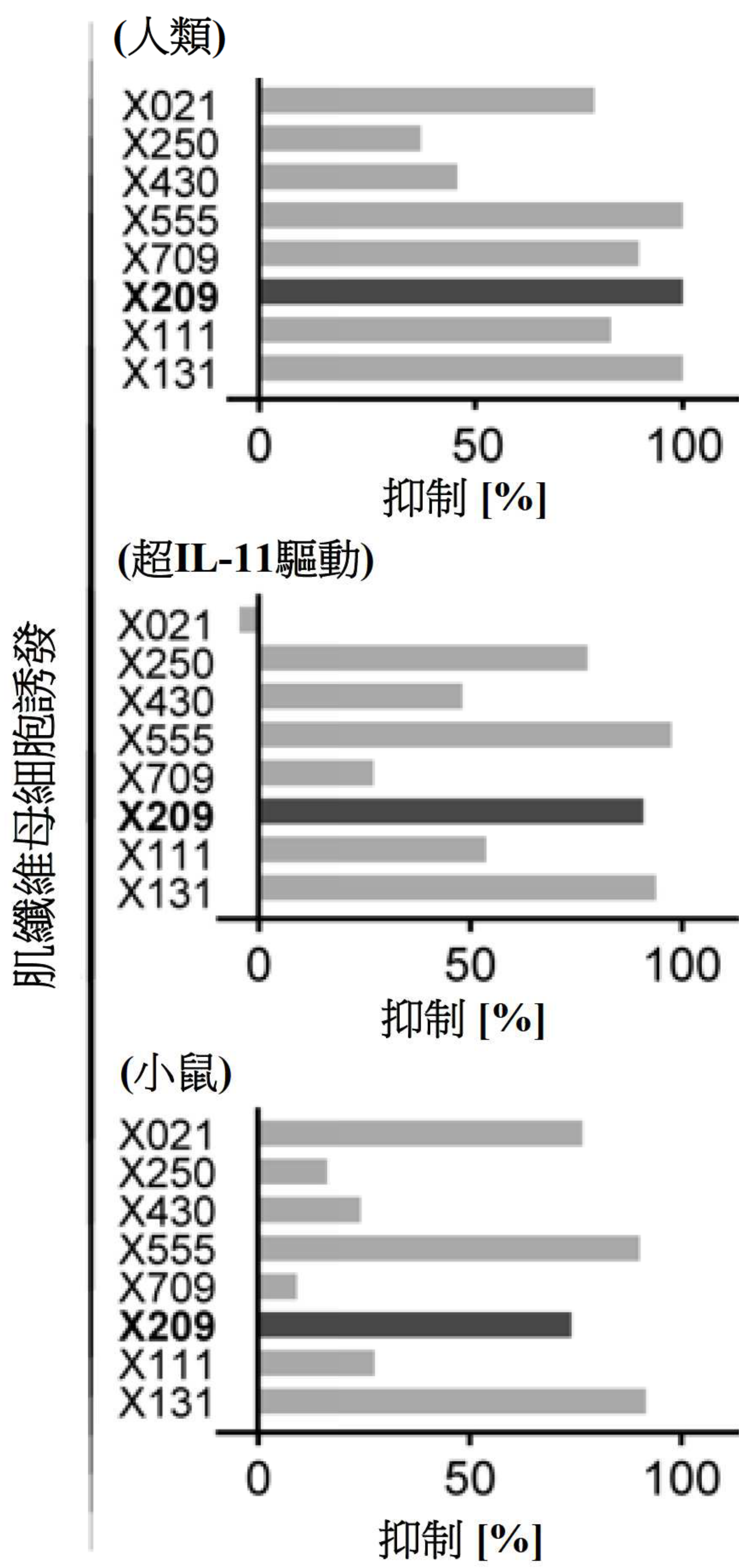
【圖26C】



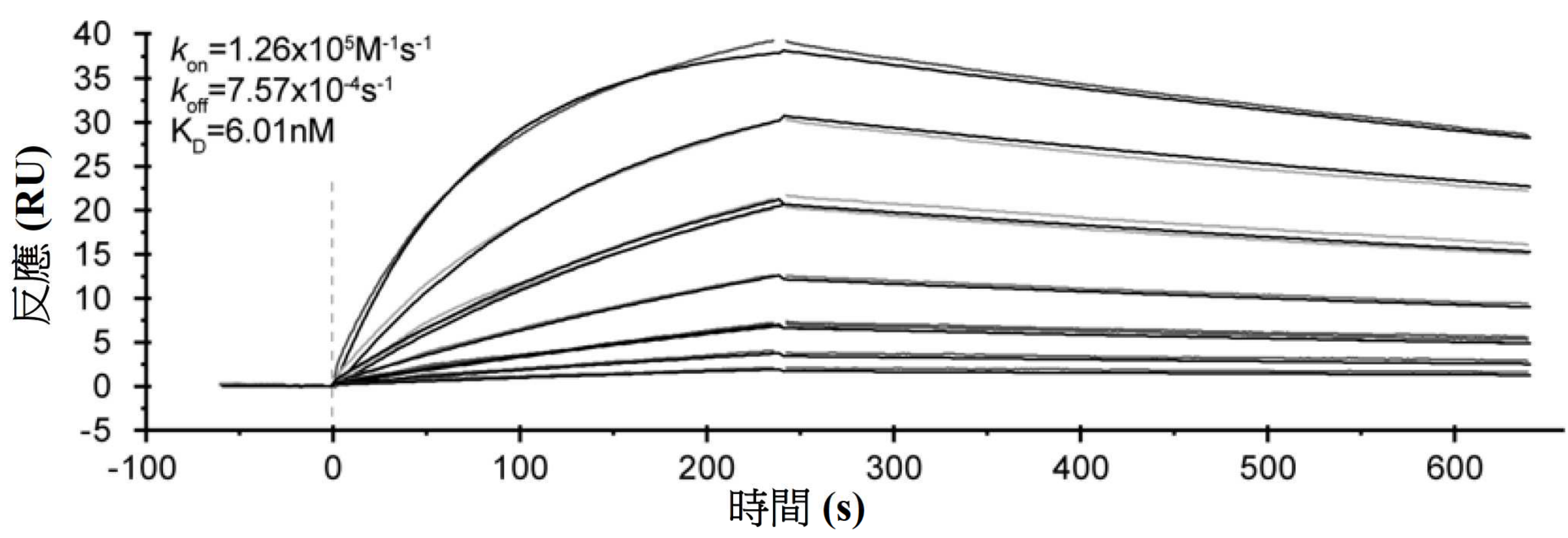
【圖26D】



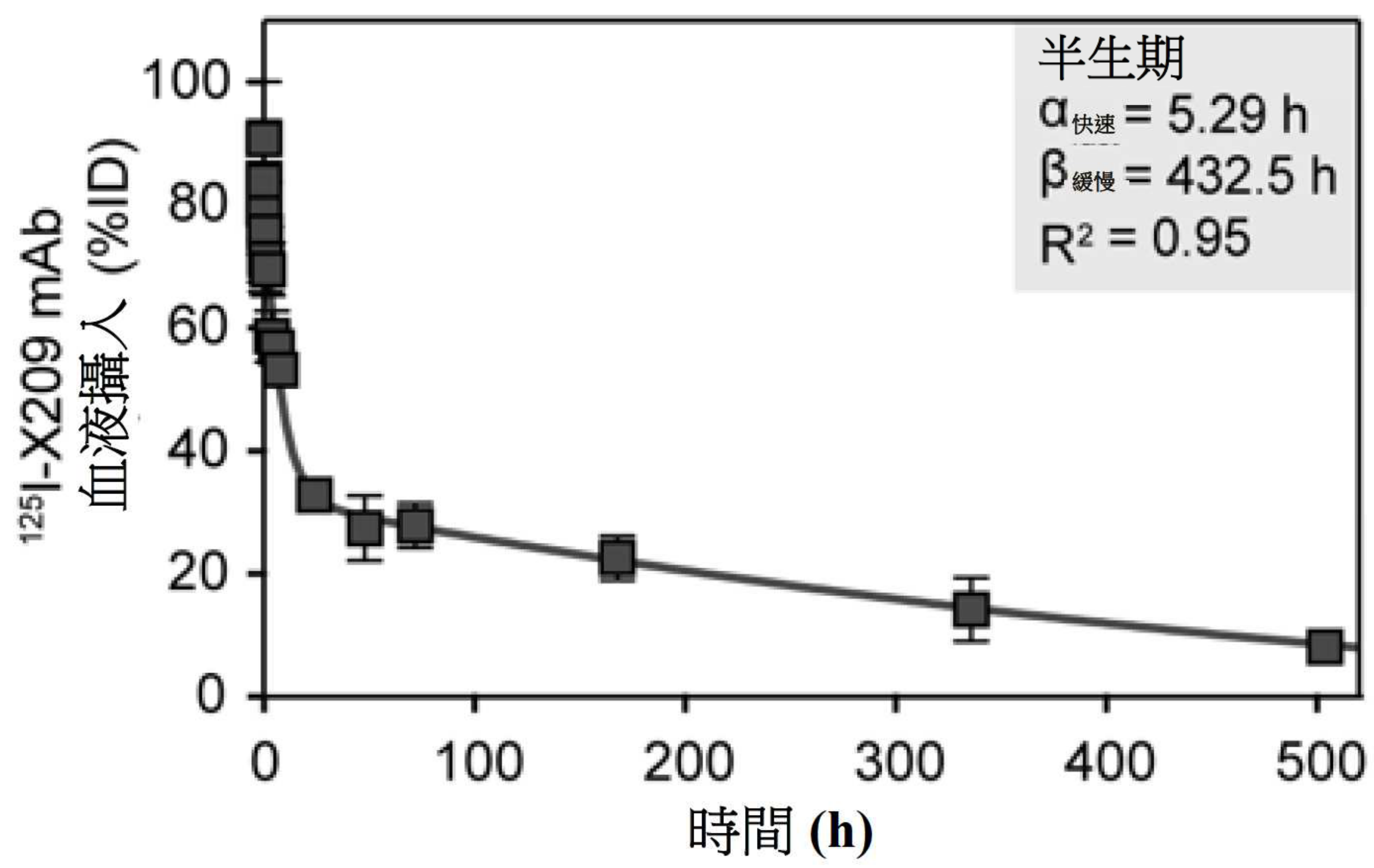
【圖26E】



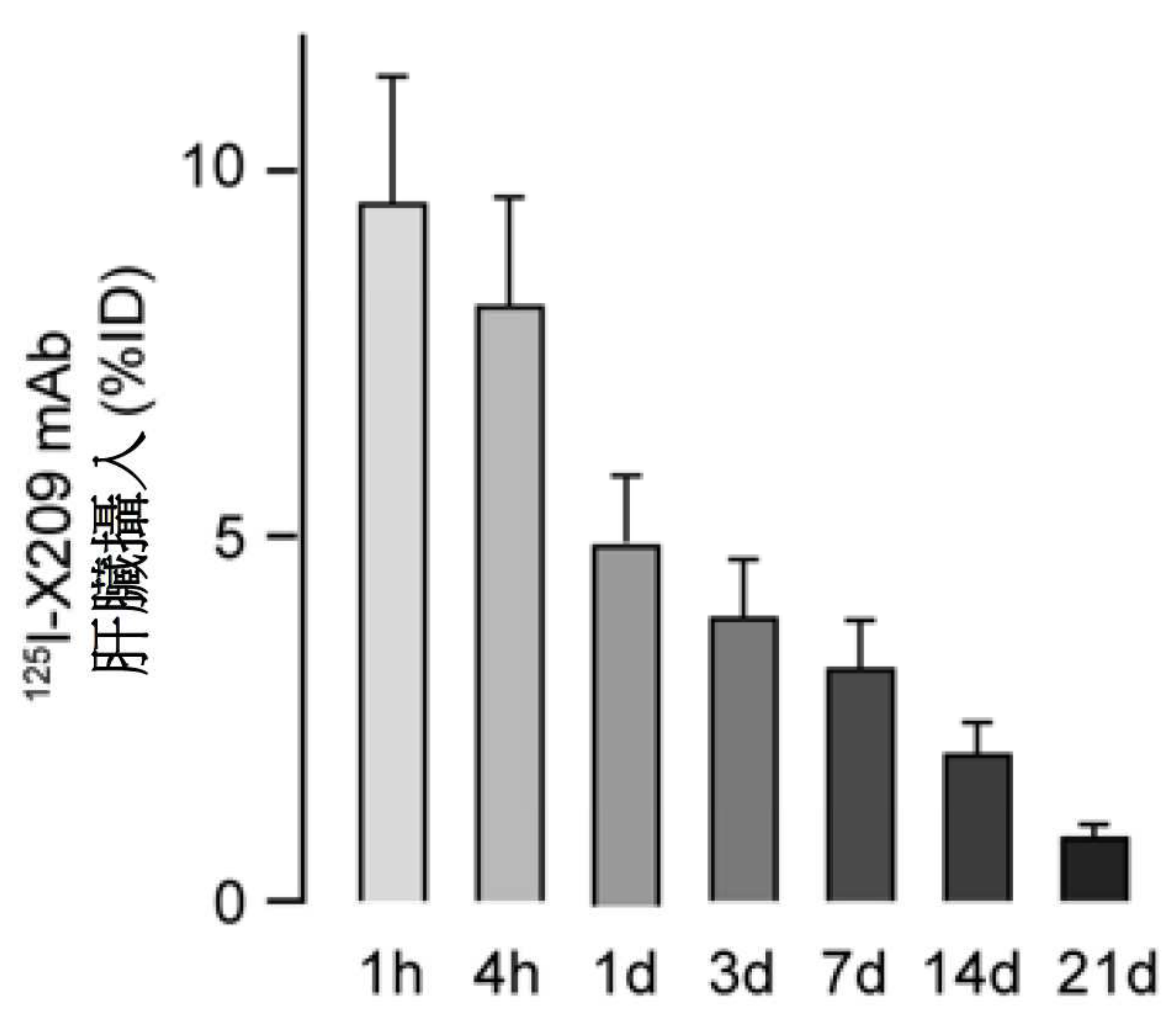
【圖27A】



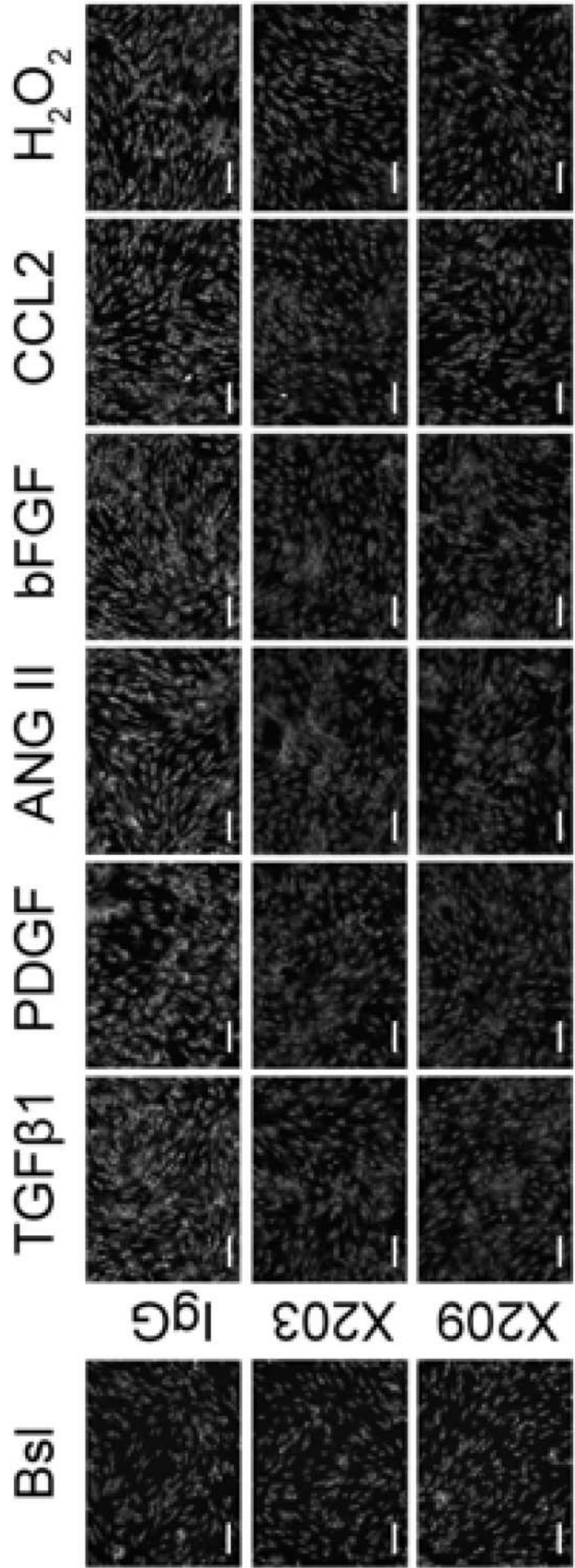
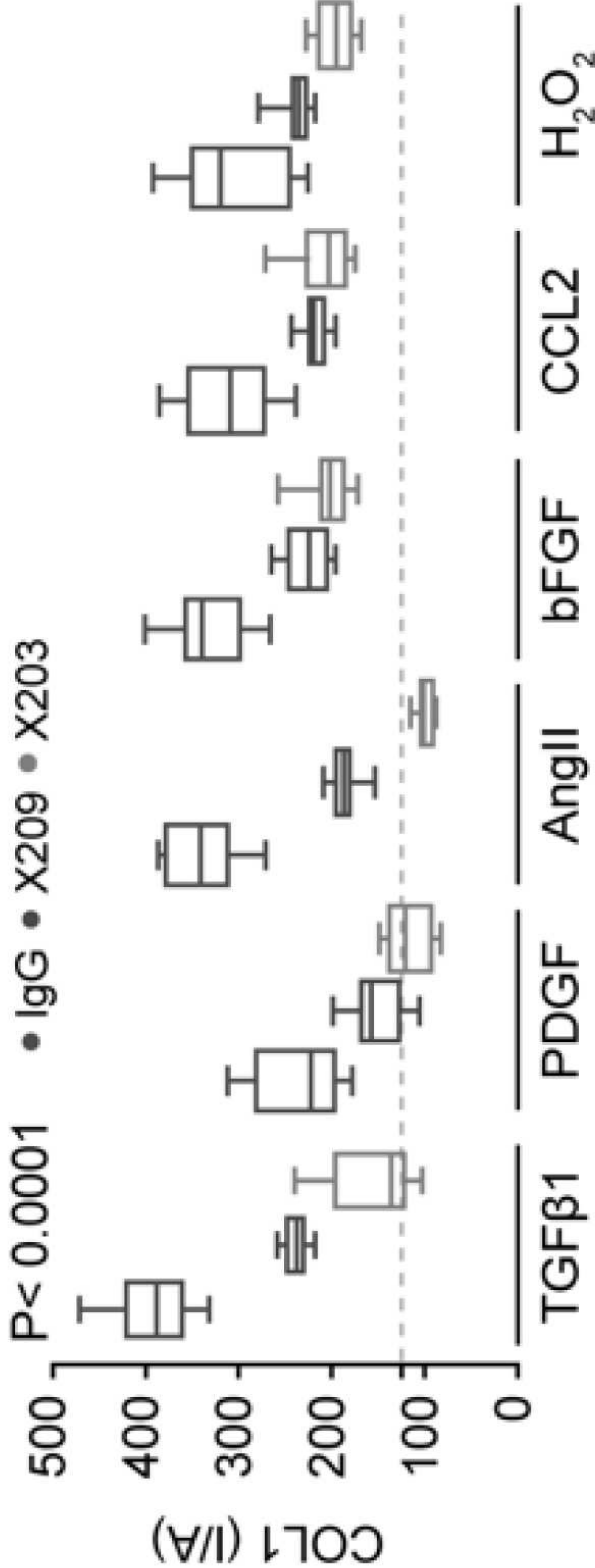
【圖27B】



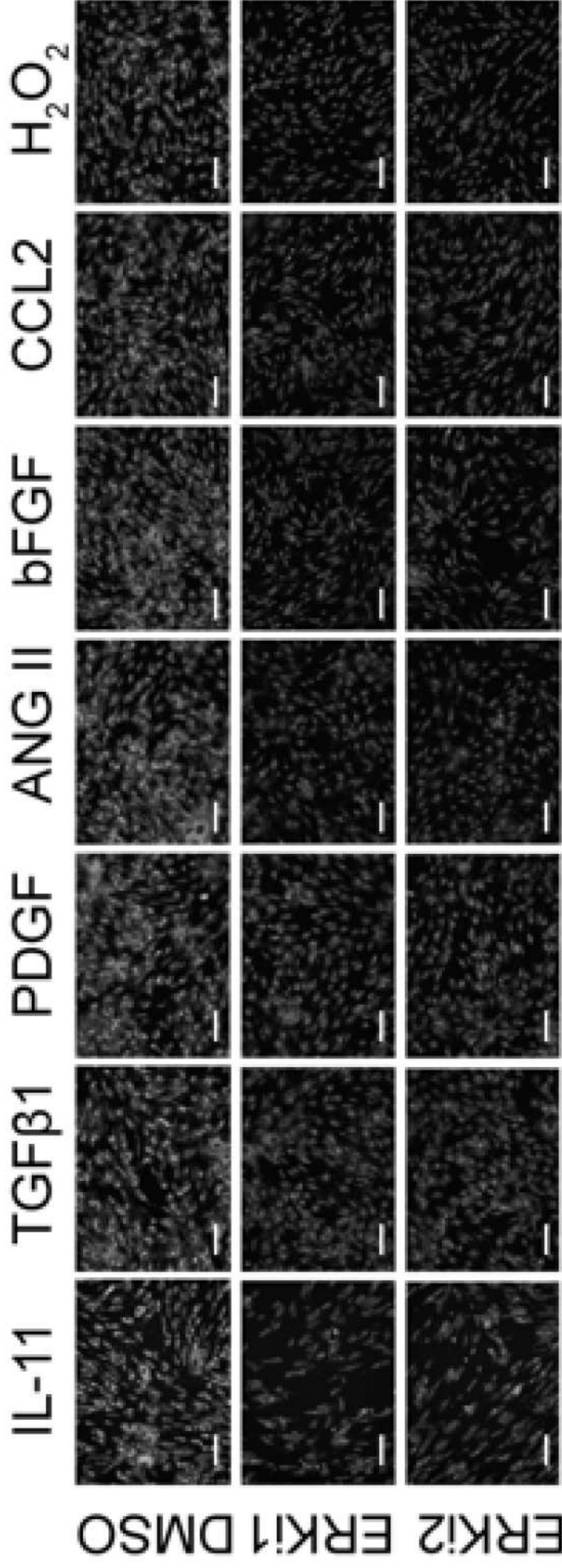
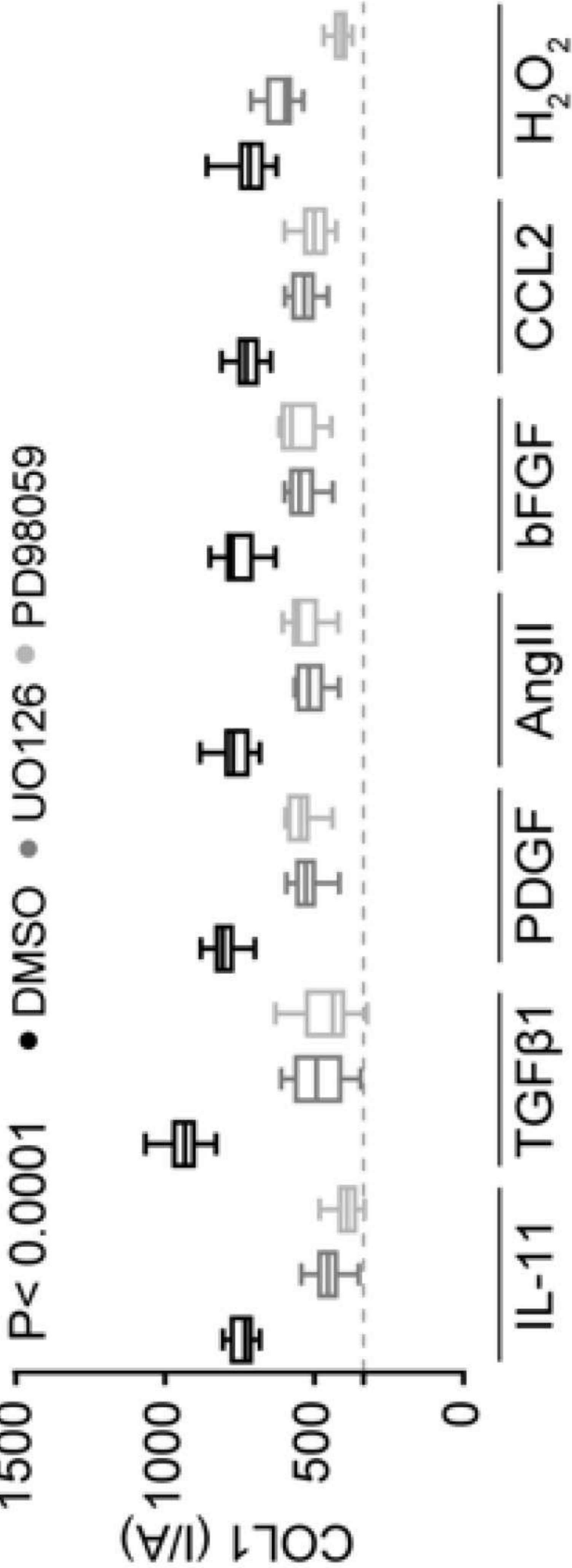
【圖27C】



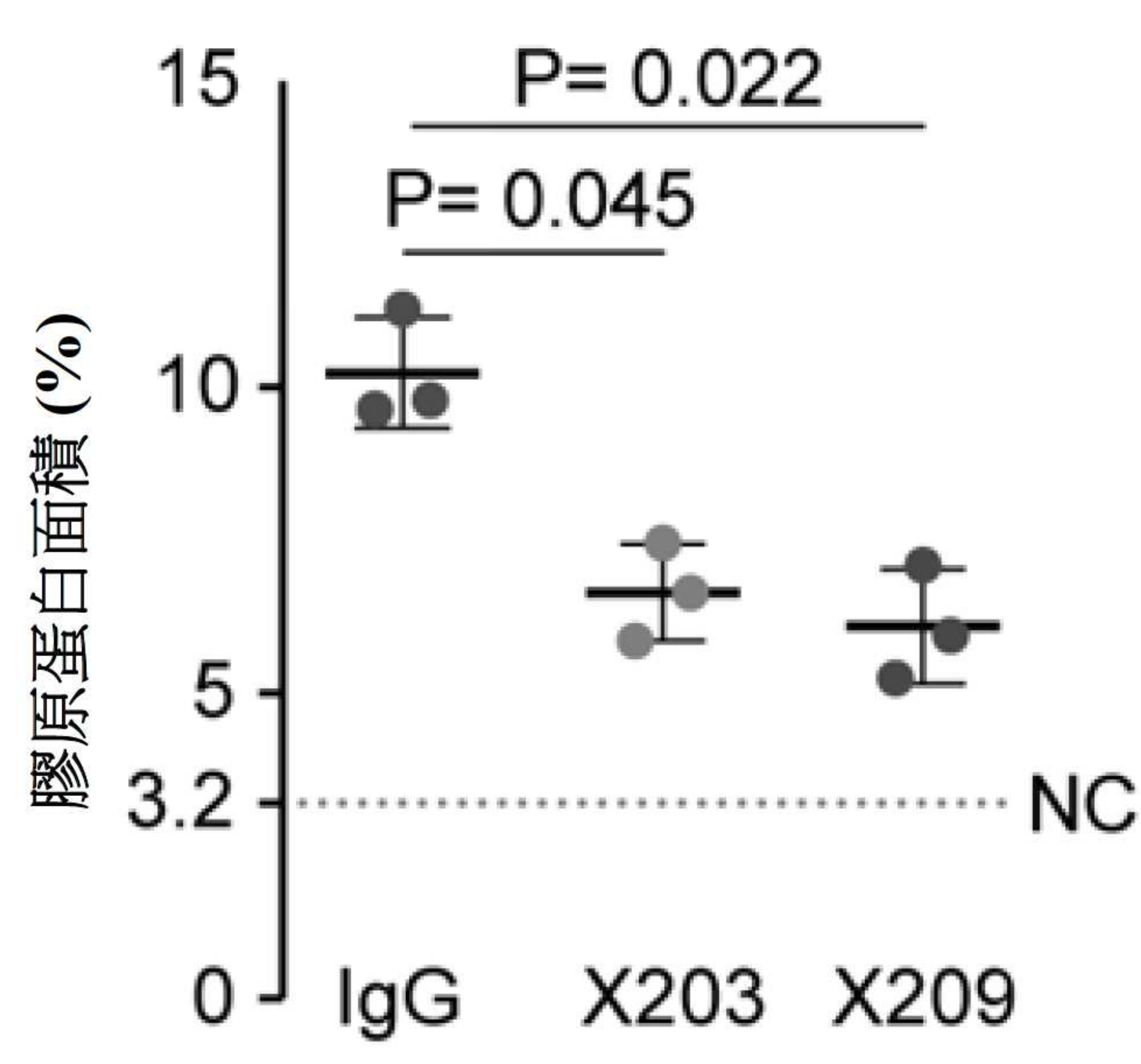
【圖27D】



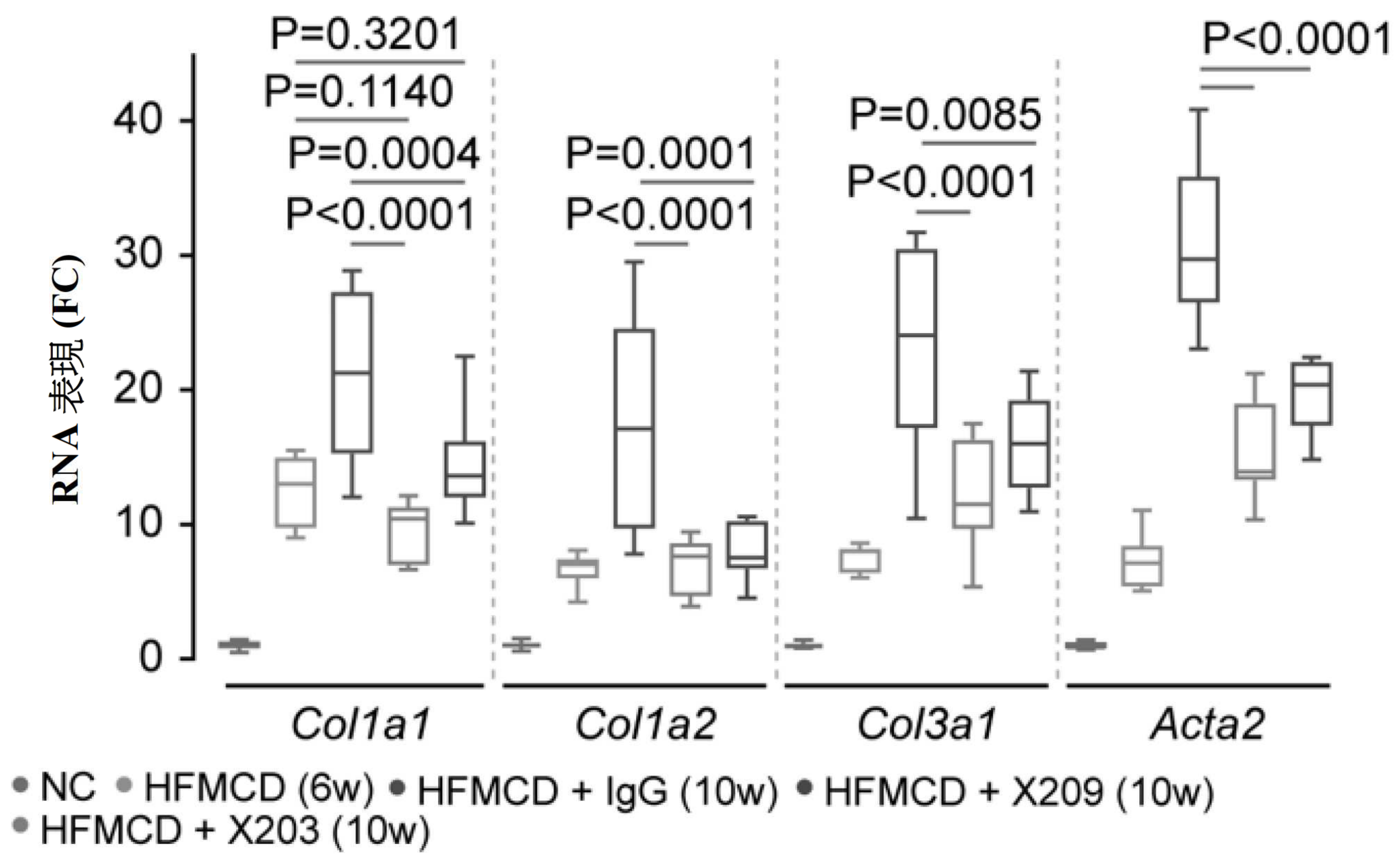
【圖27E】



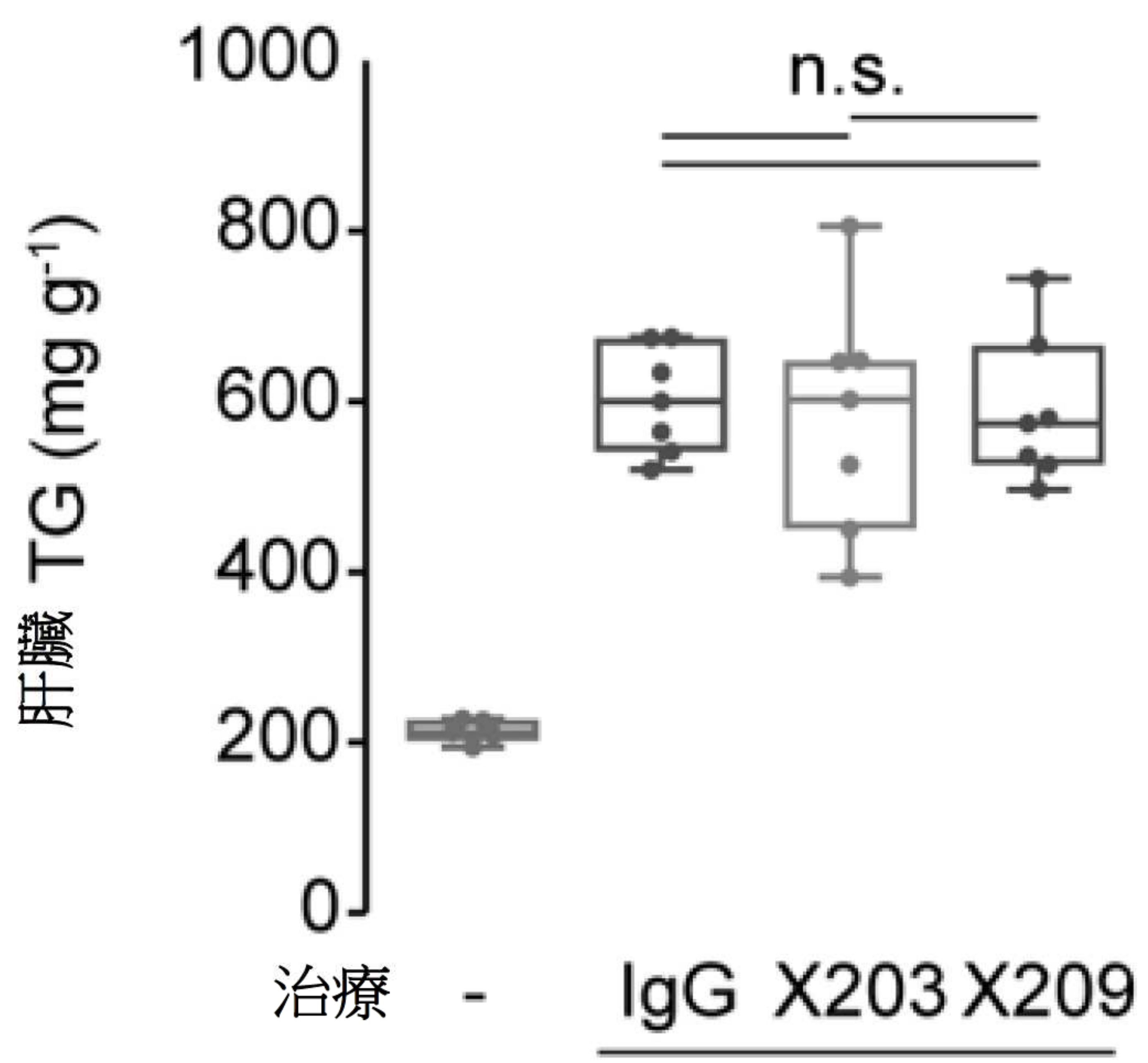
【圖27F】



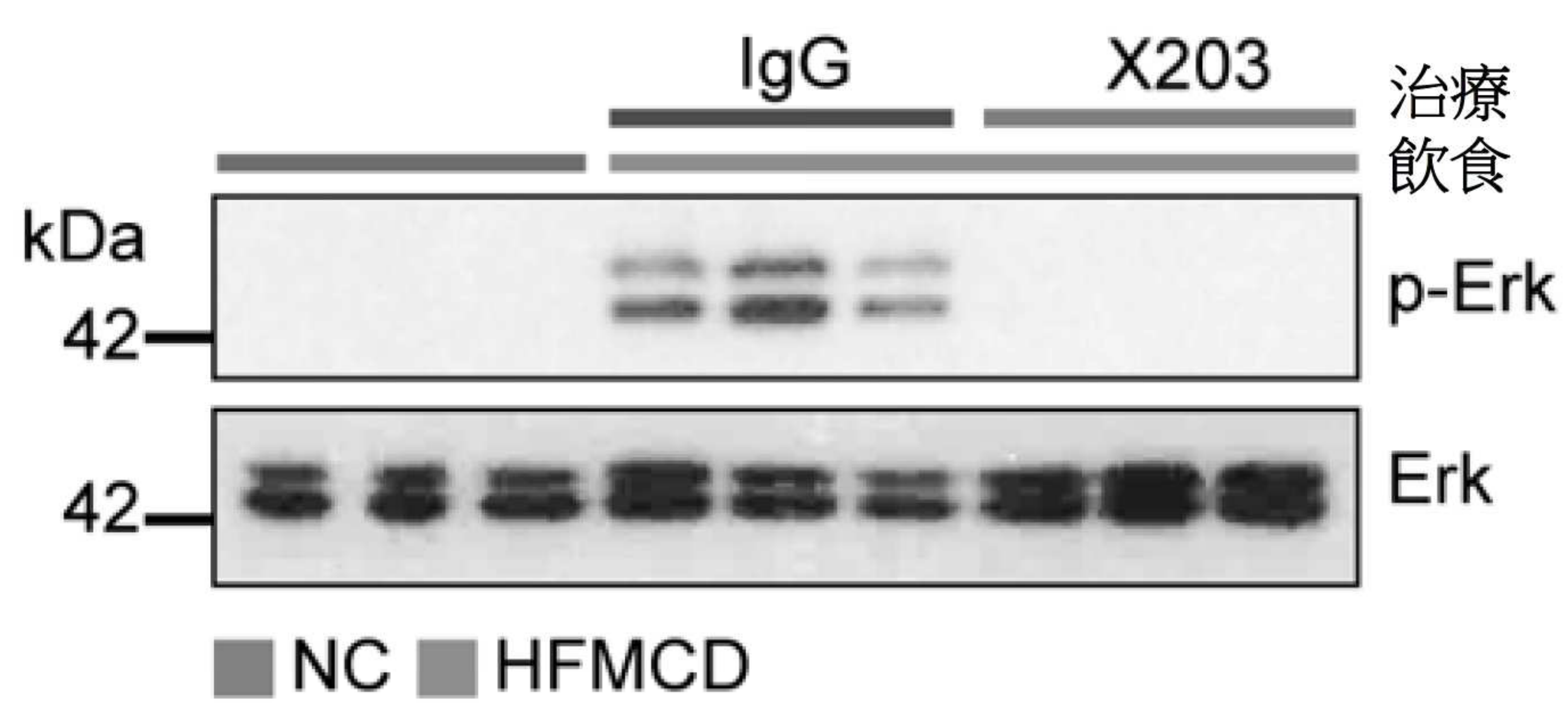
【圖28A】



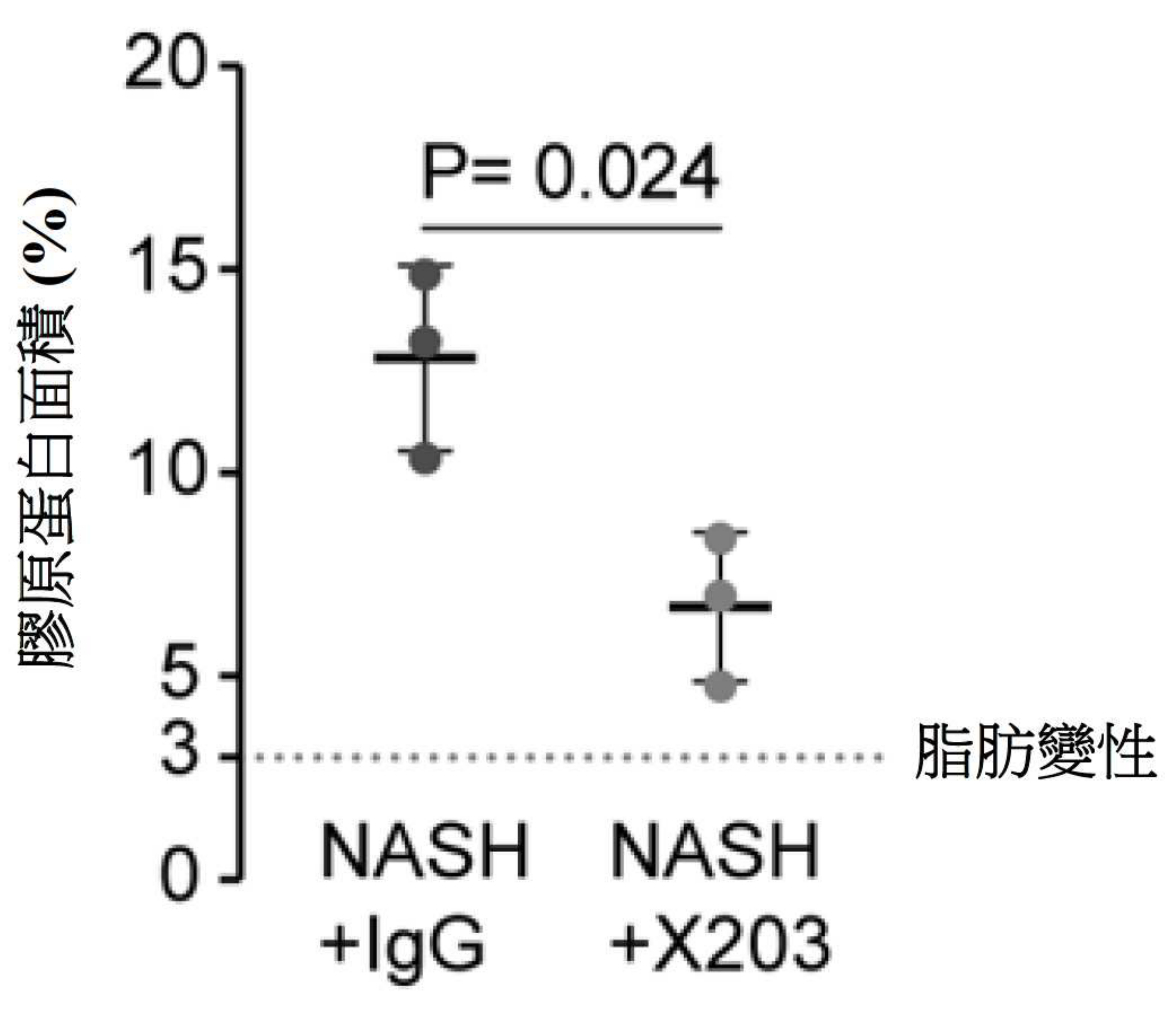
【圖28B】



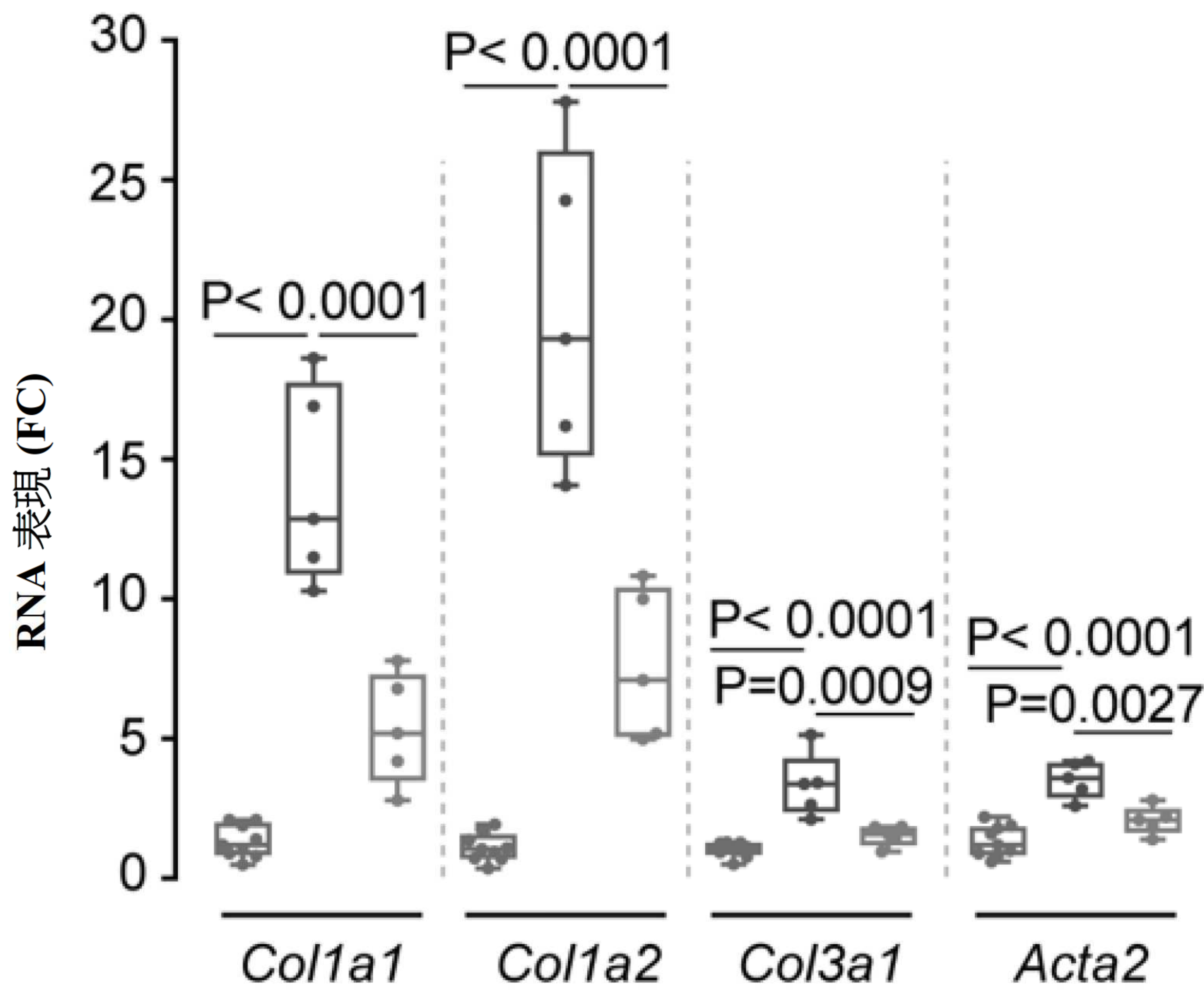
【圖28C】



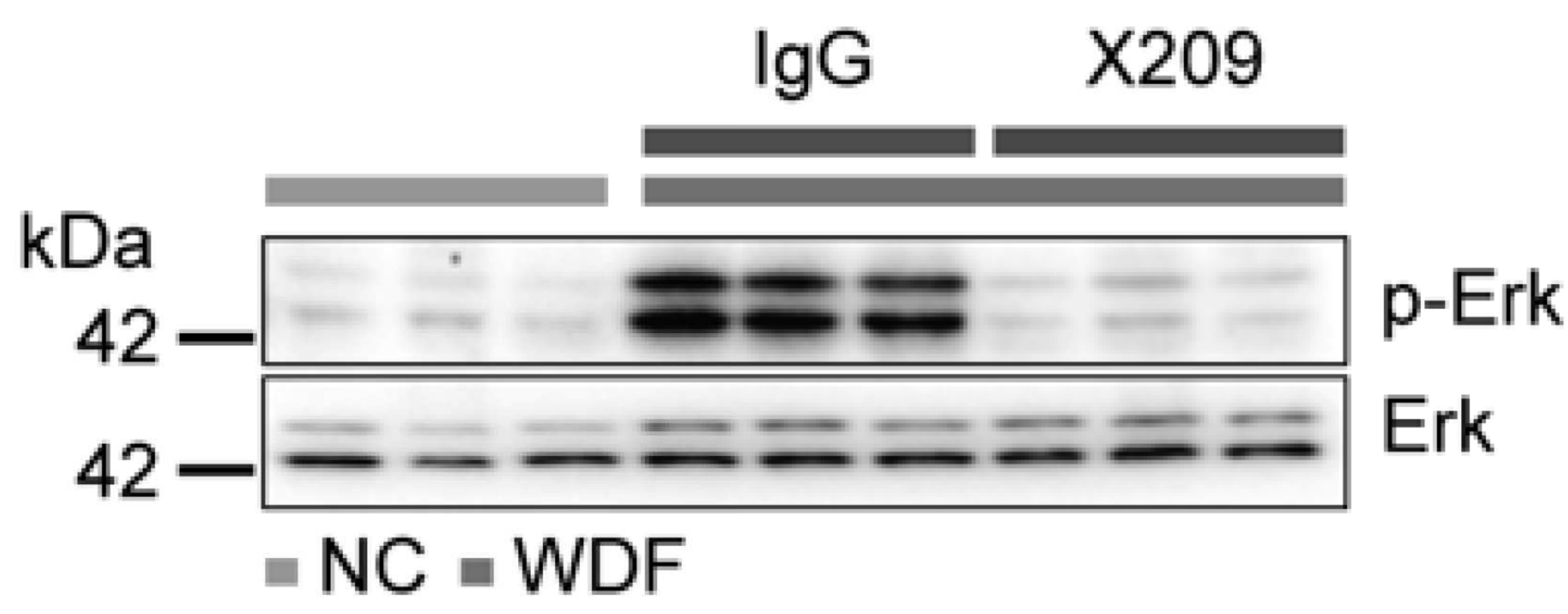
【圖28D】



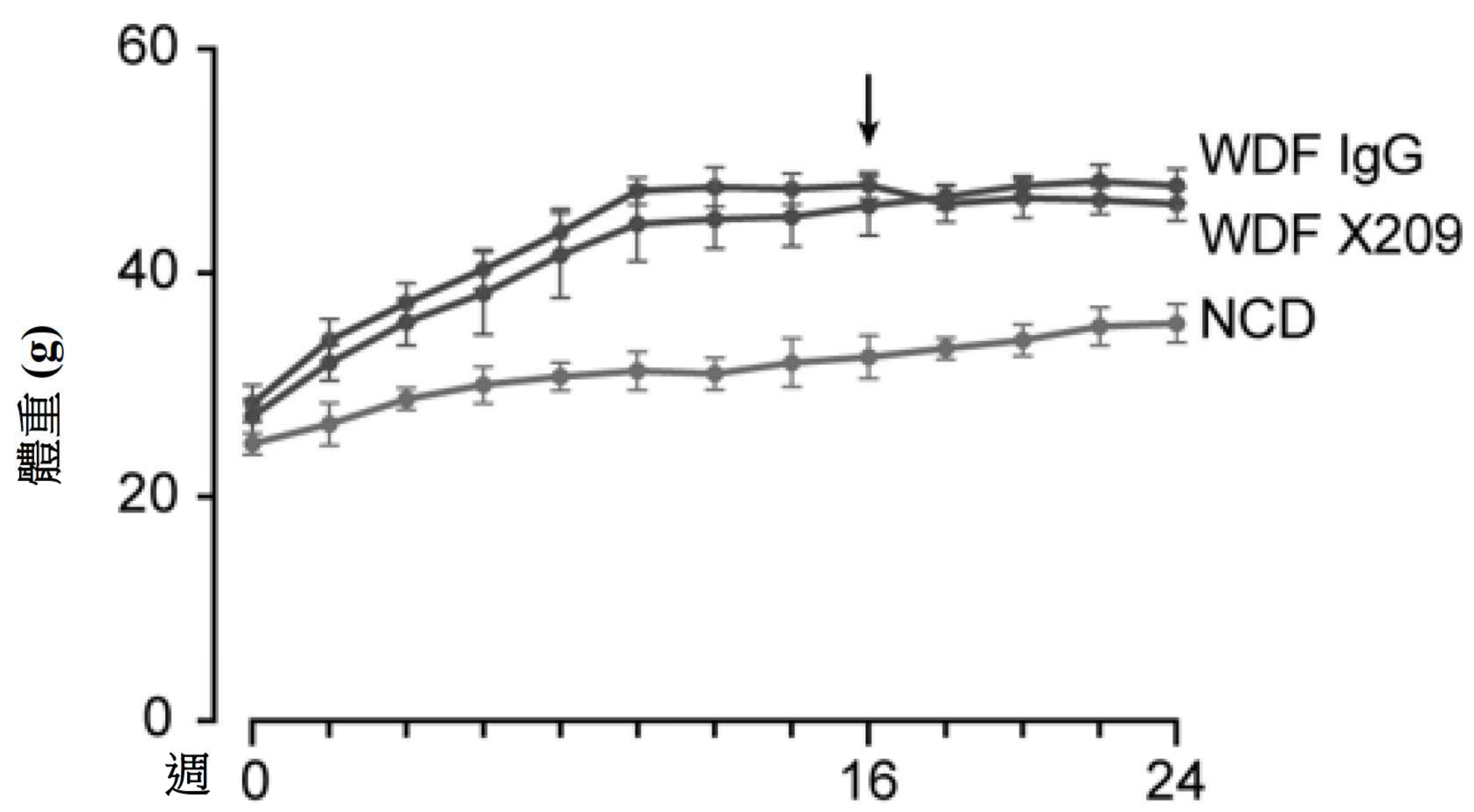
【圖28E】



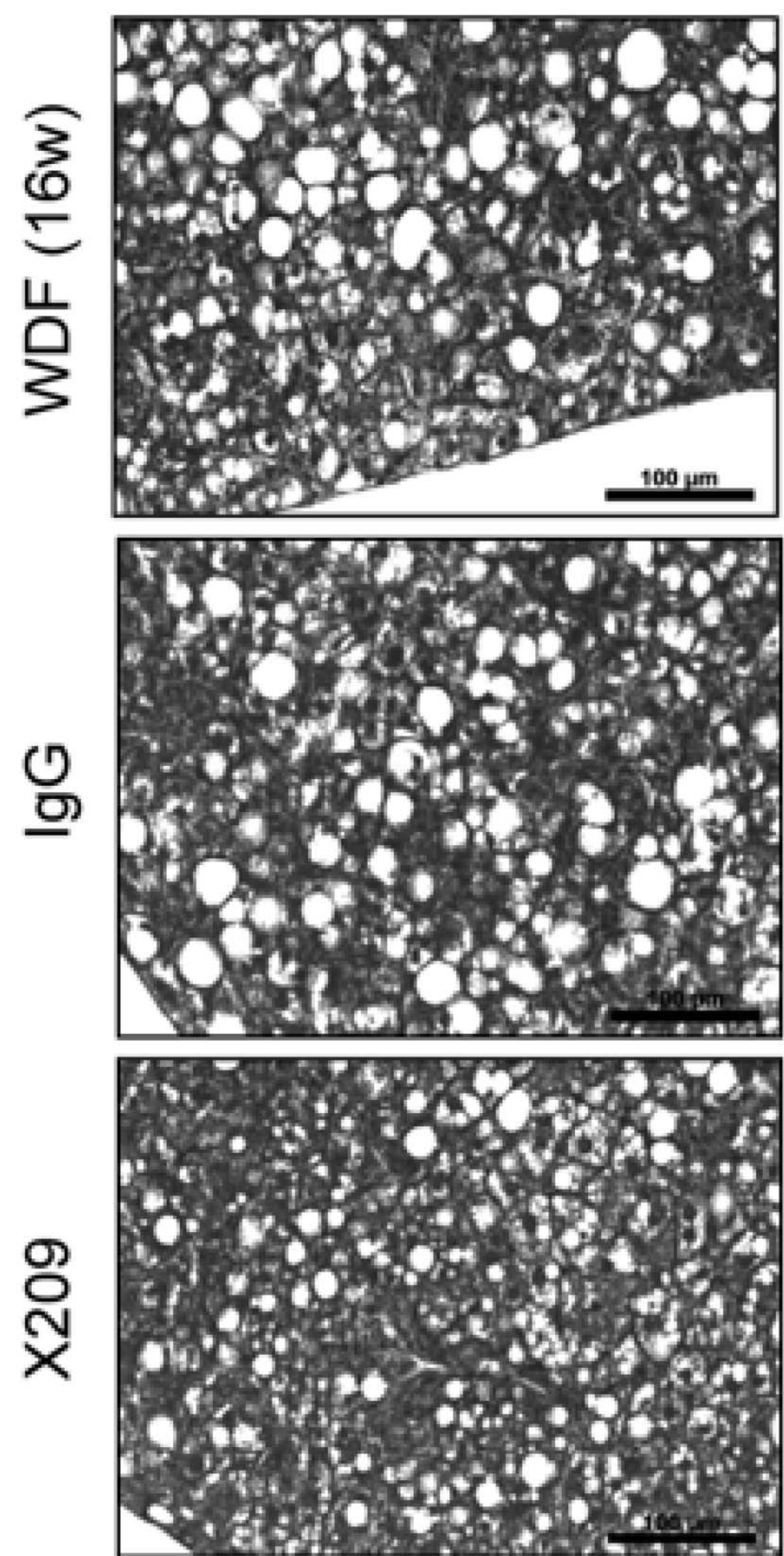
【圖28F】



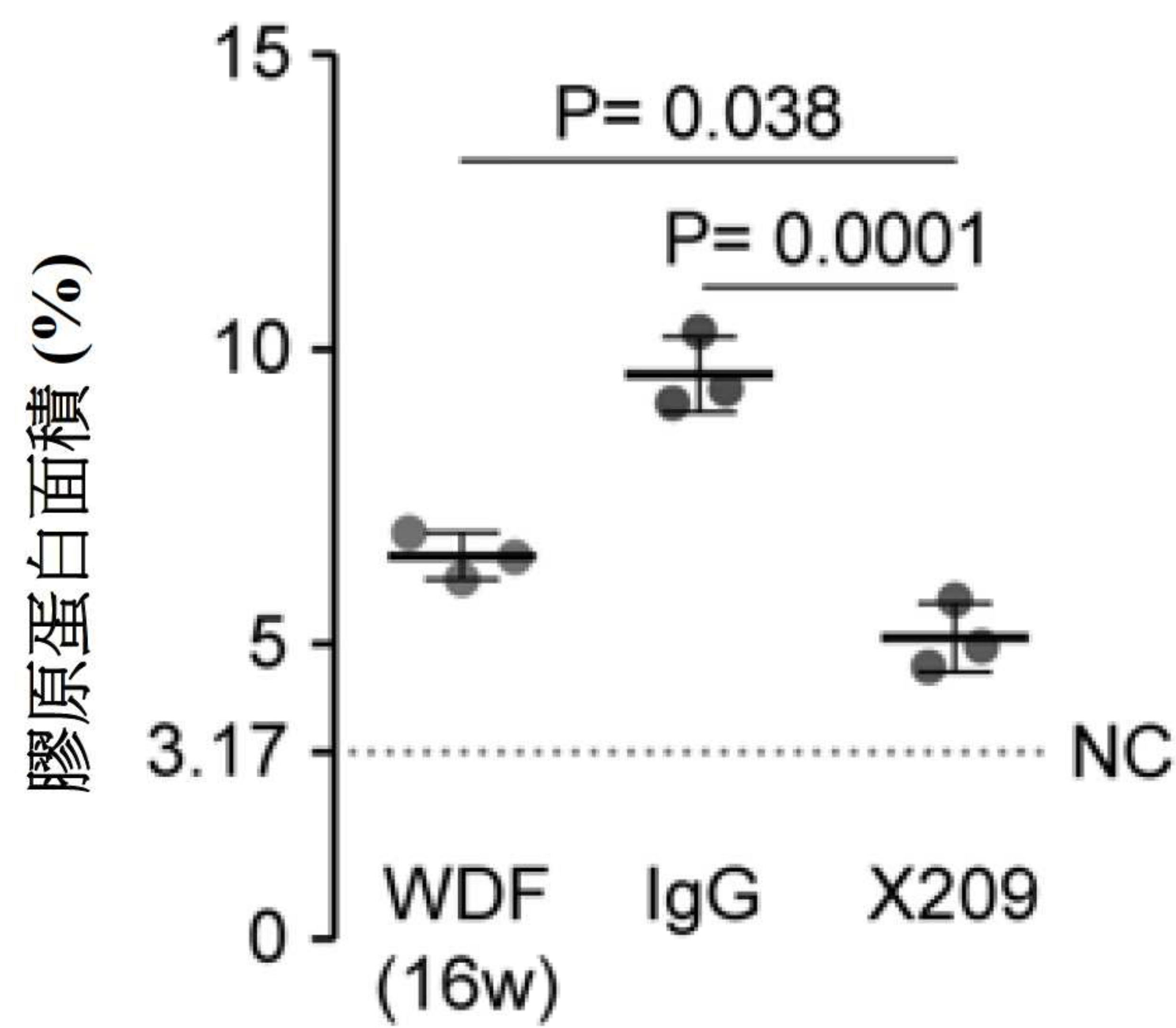
【圖29A】



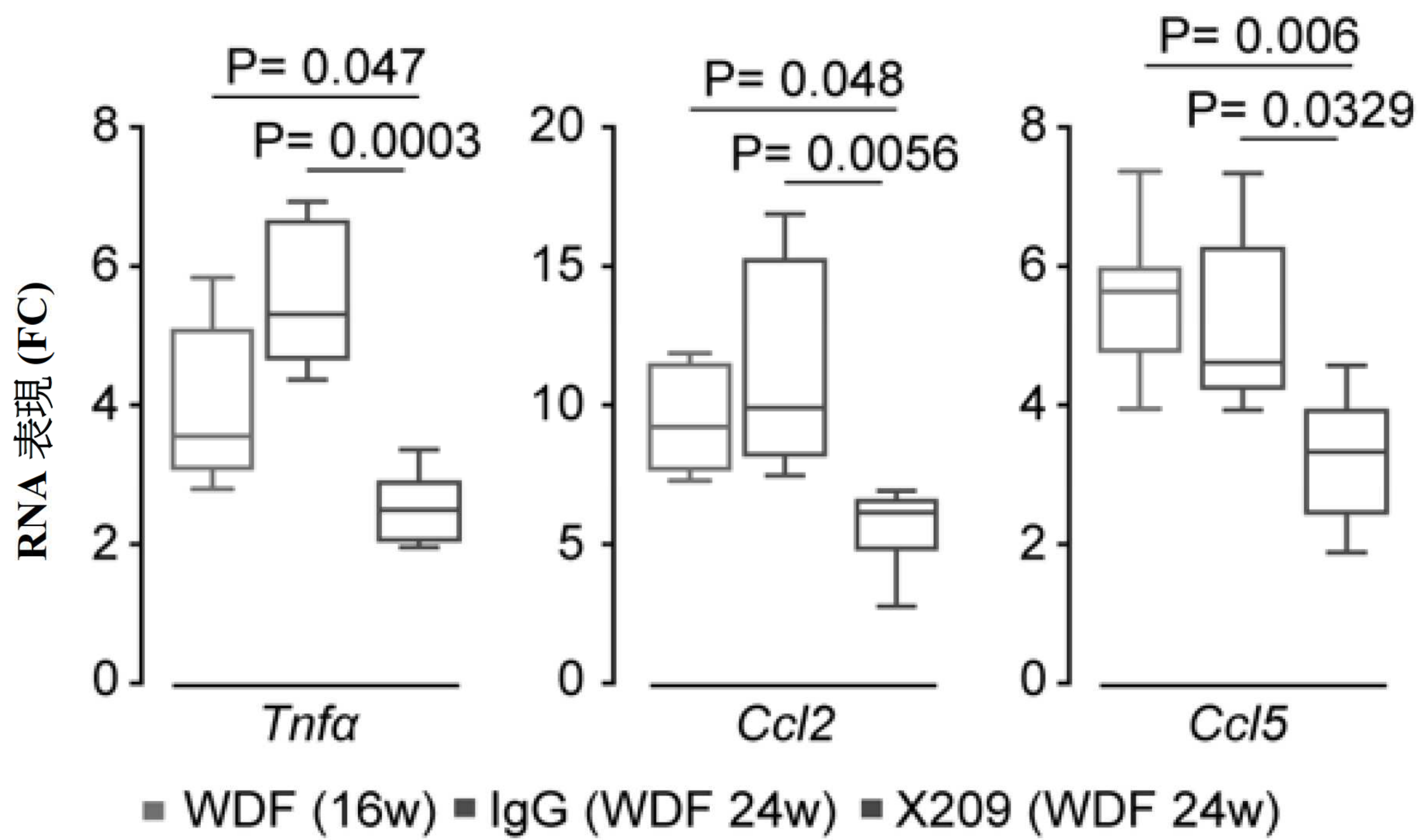
【圖29B】



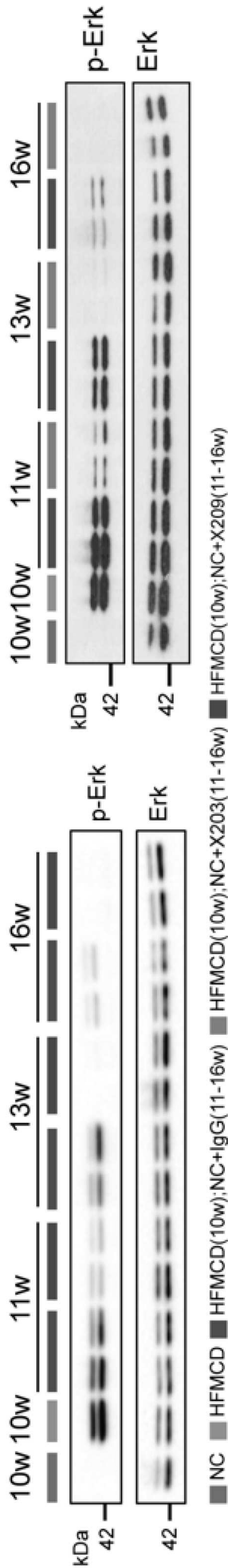
【圖29C】



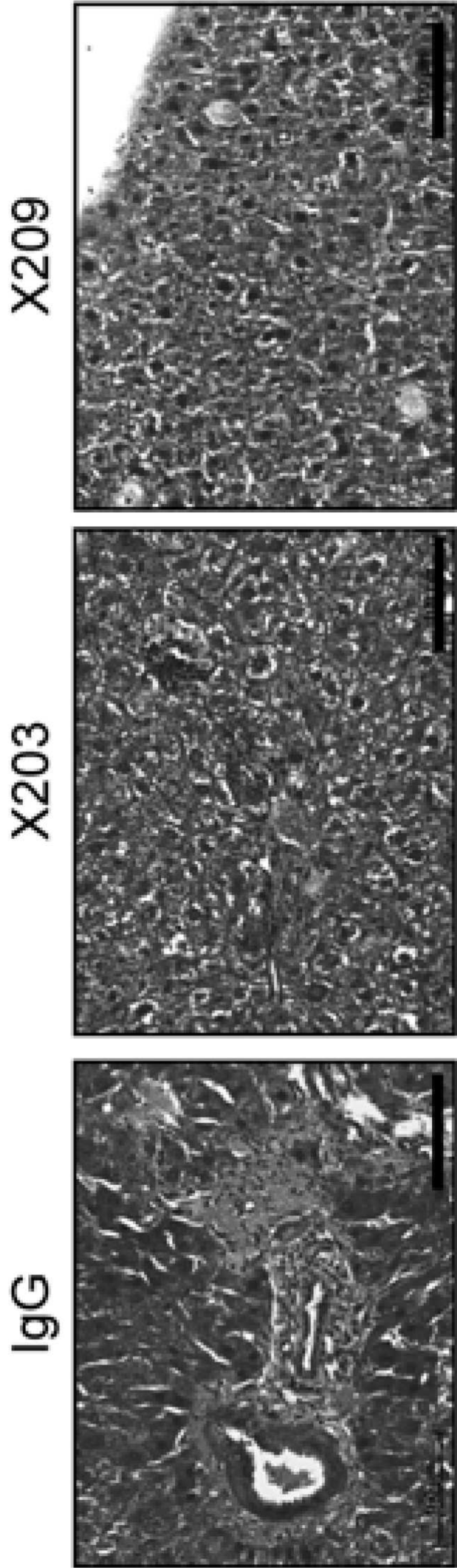
【圖29D】



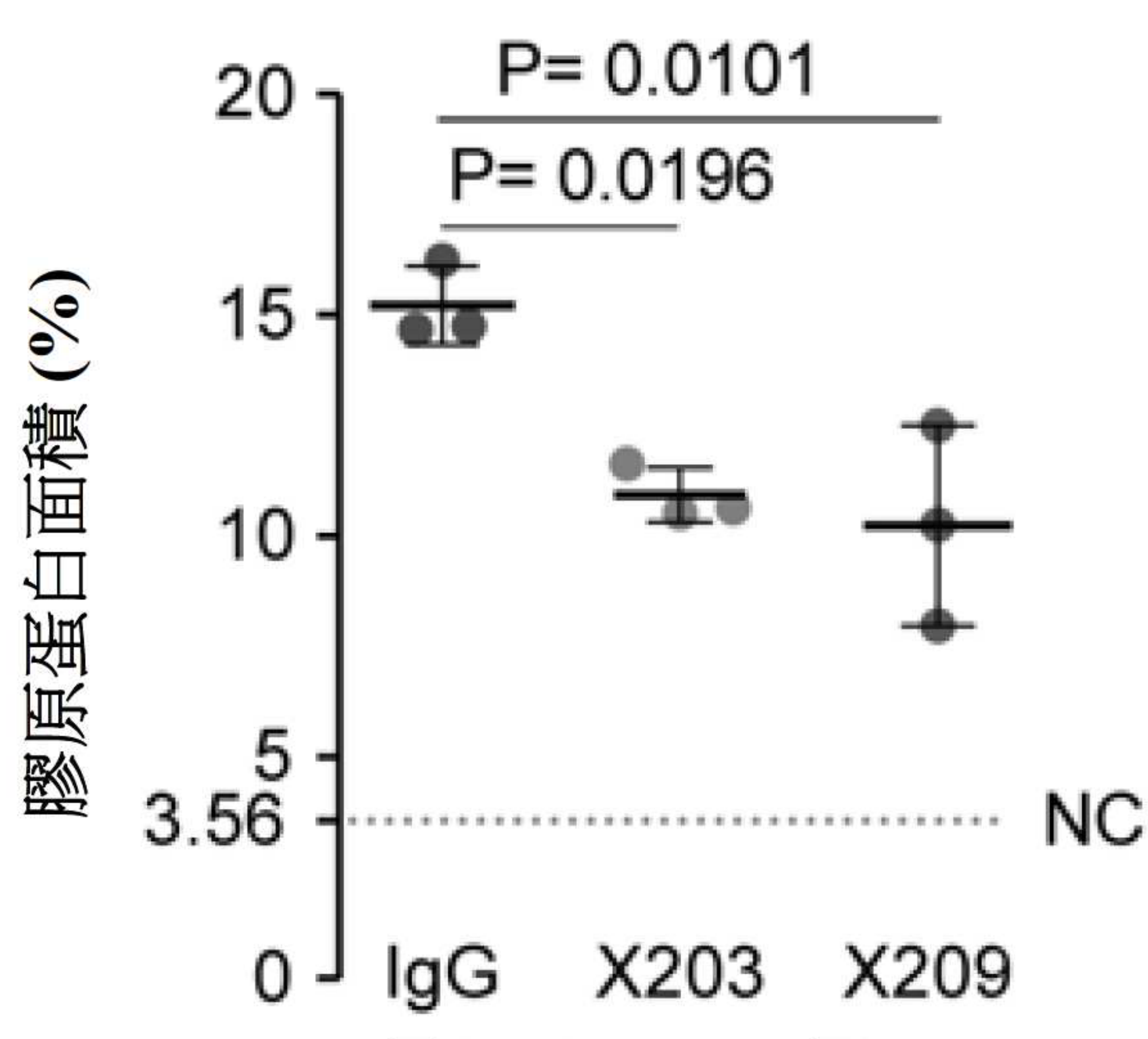
【圖29E】



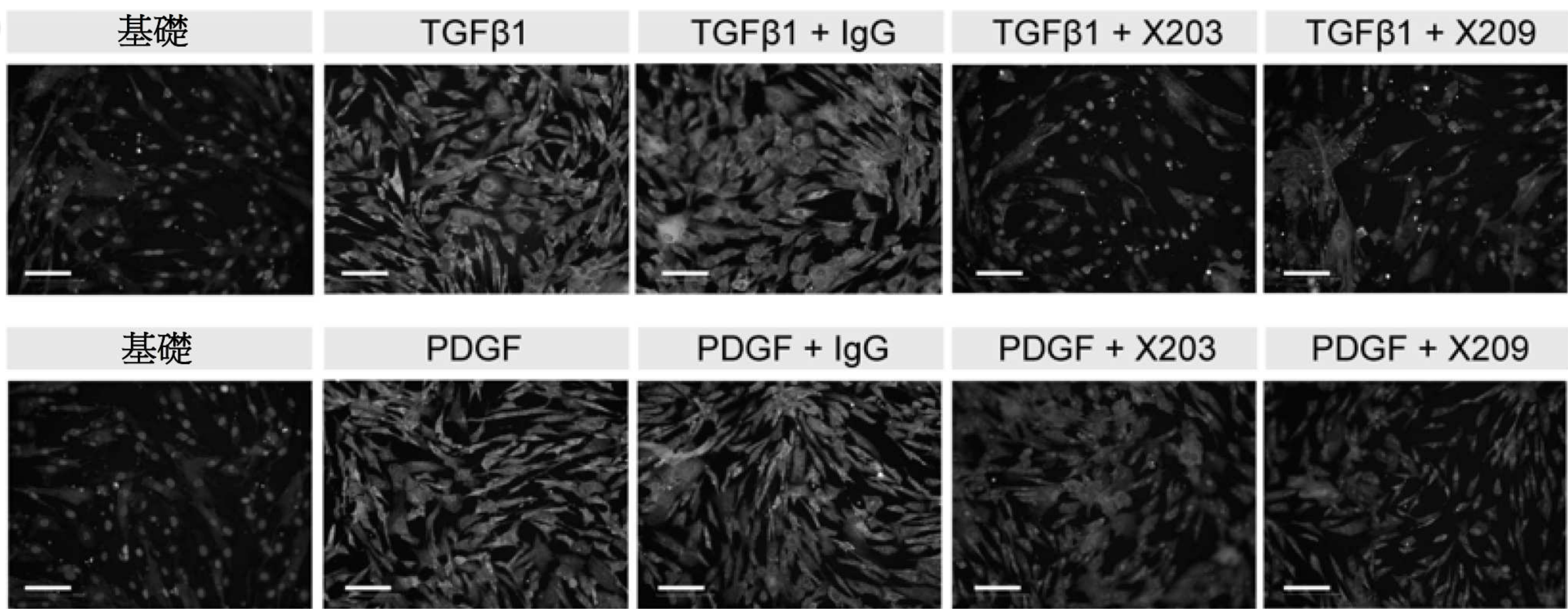
【圖30A】



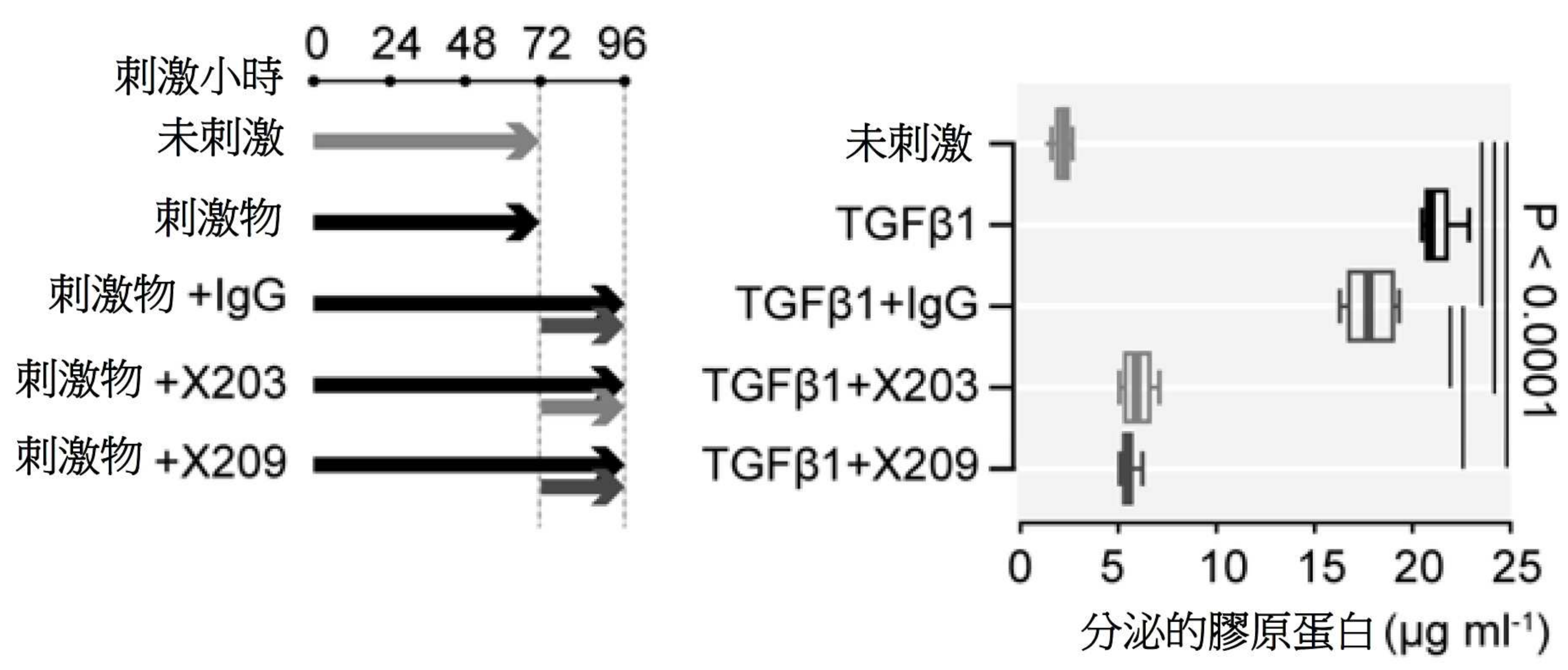
【圖30B】



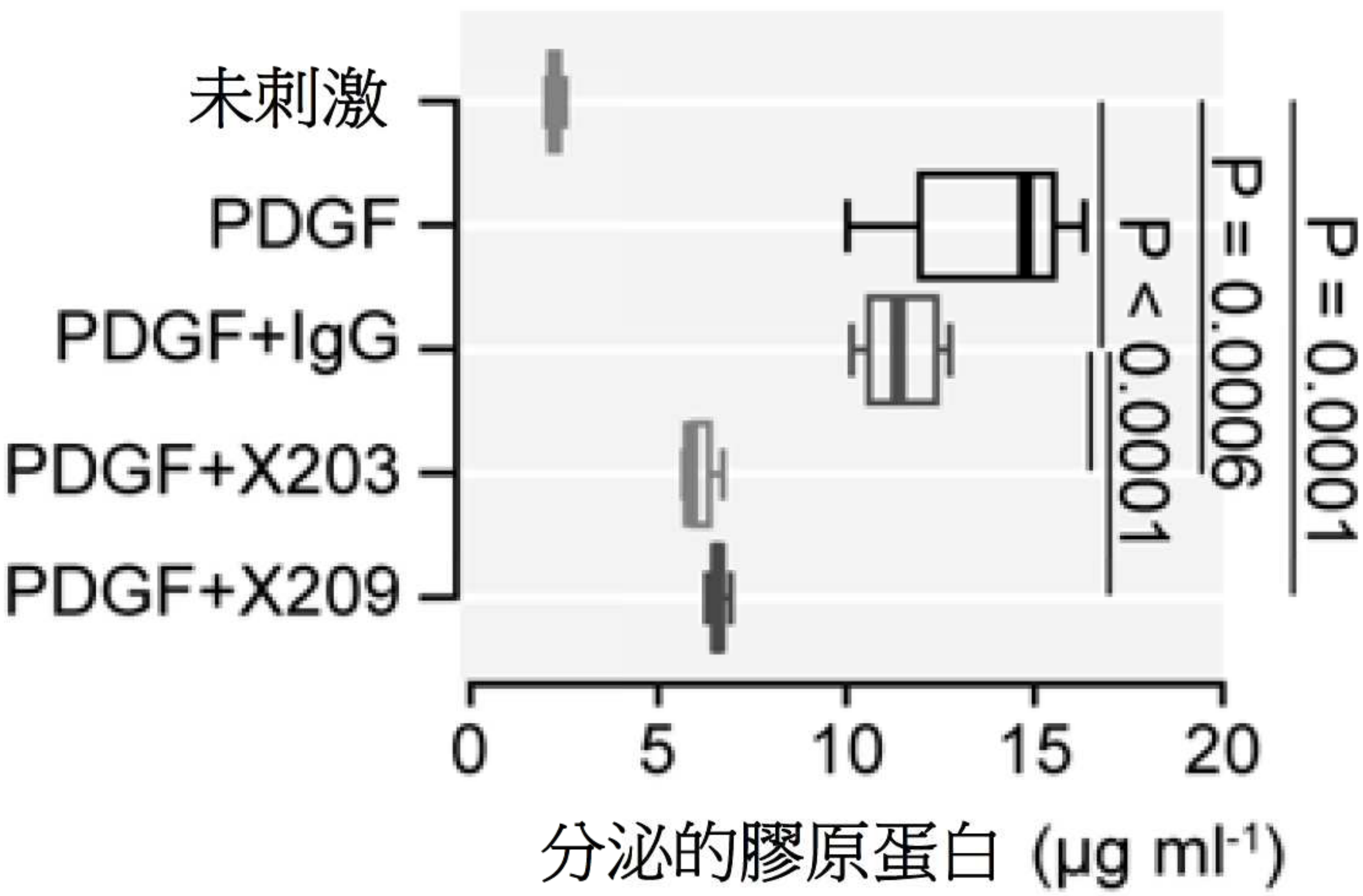
【圖30C】



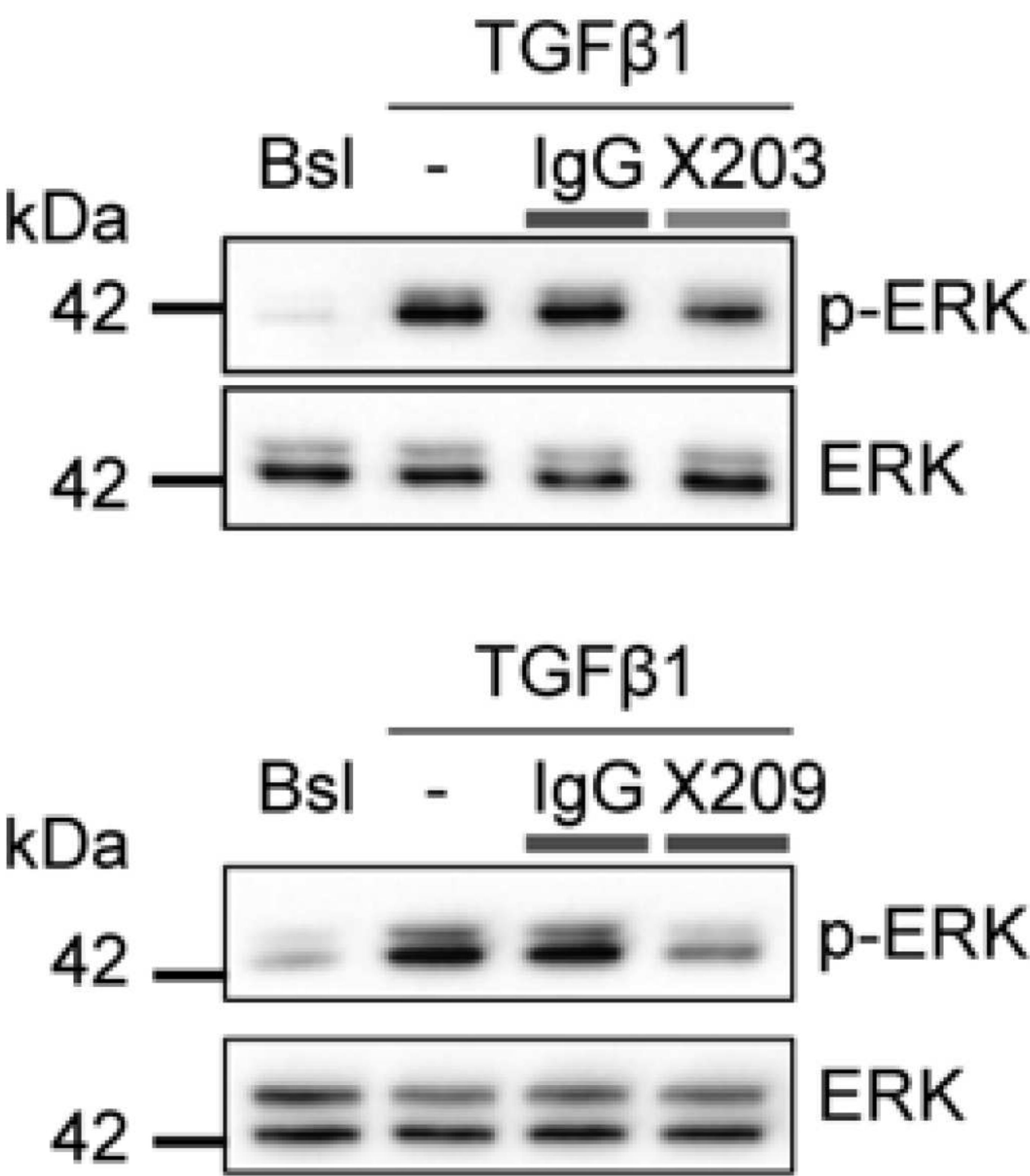
【圖30D】



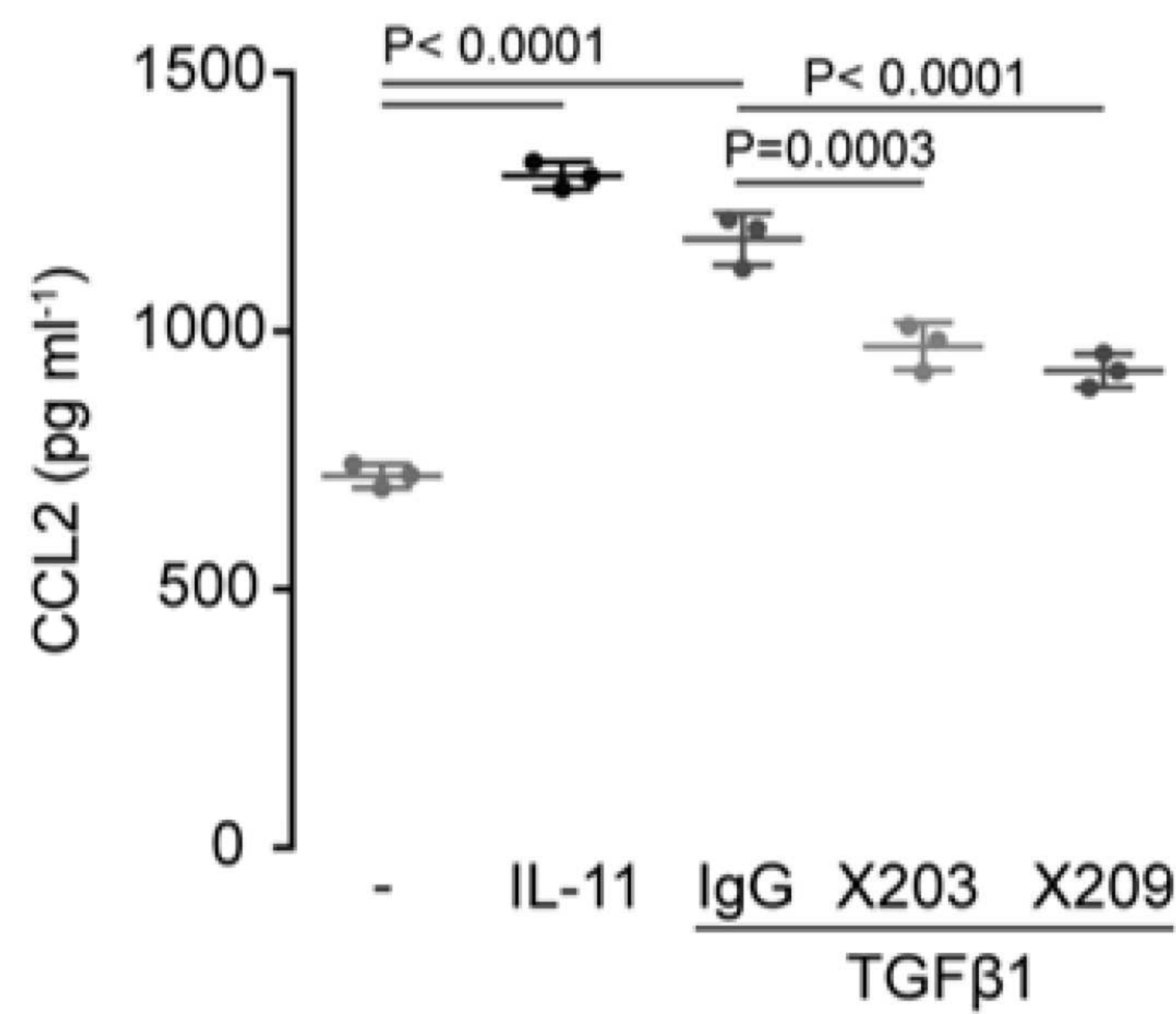
【圖30E】



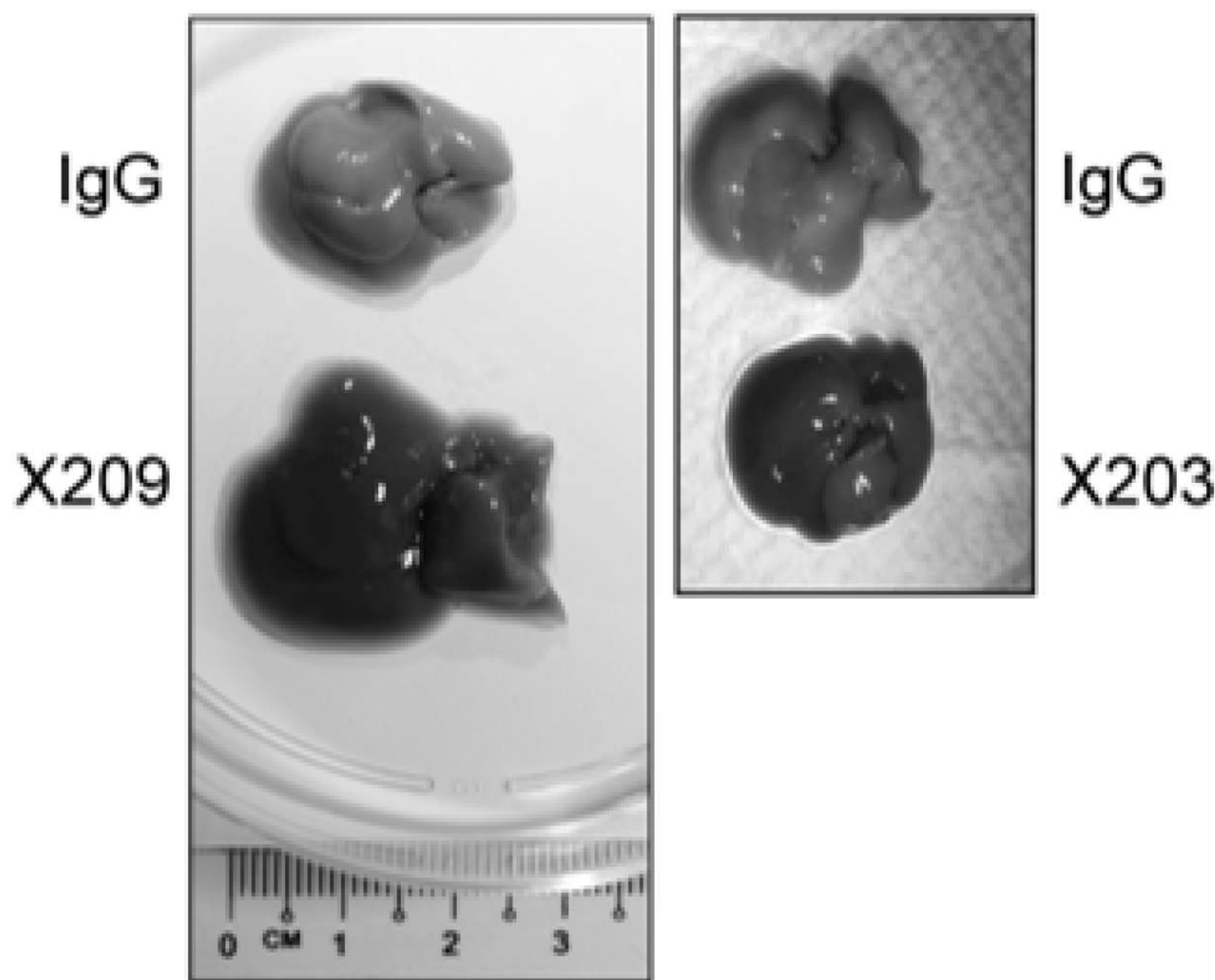
【圖30F】



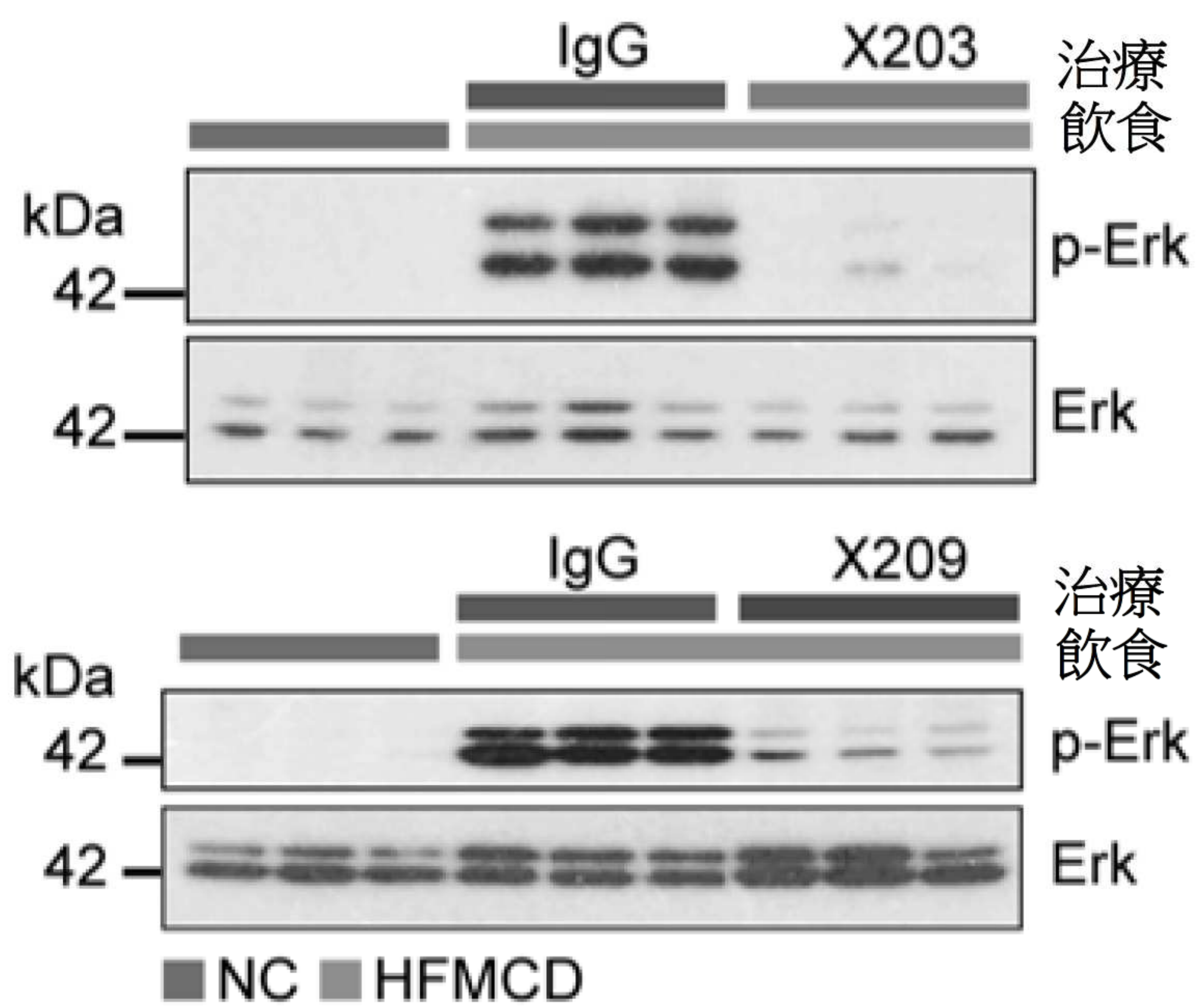
【圖30G】



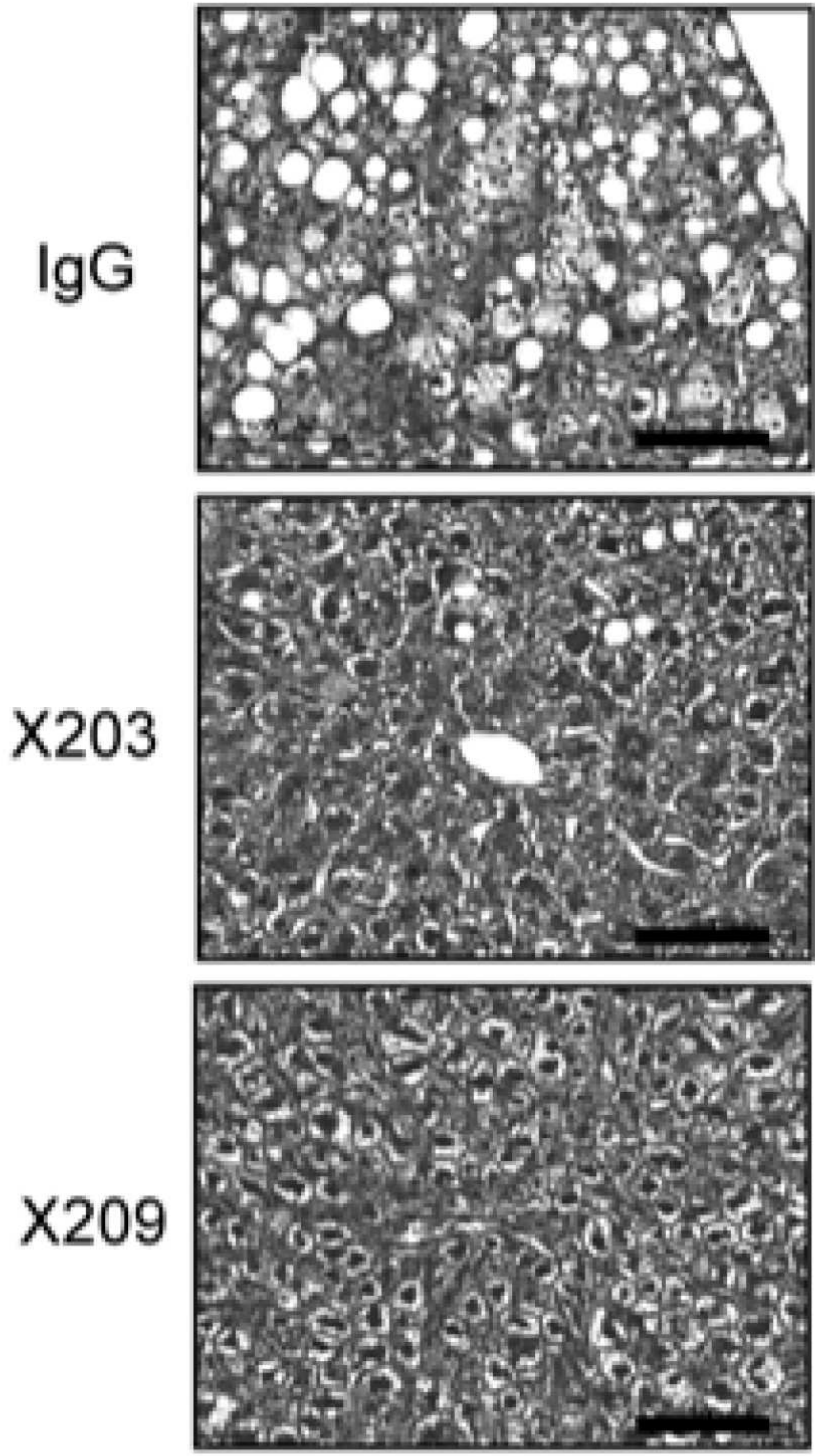
【圖31A】



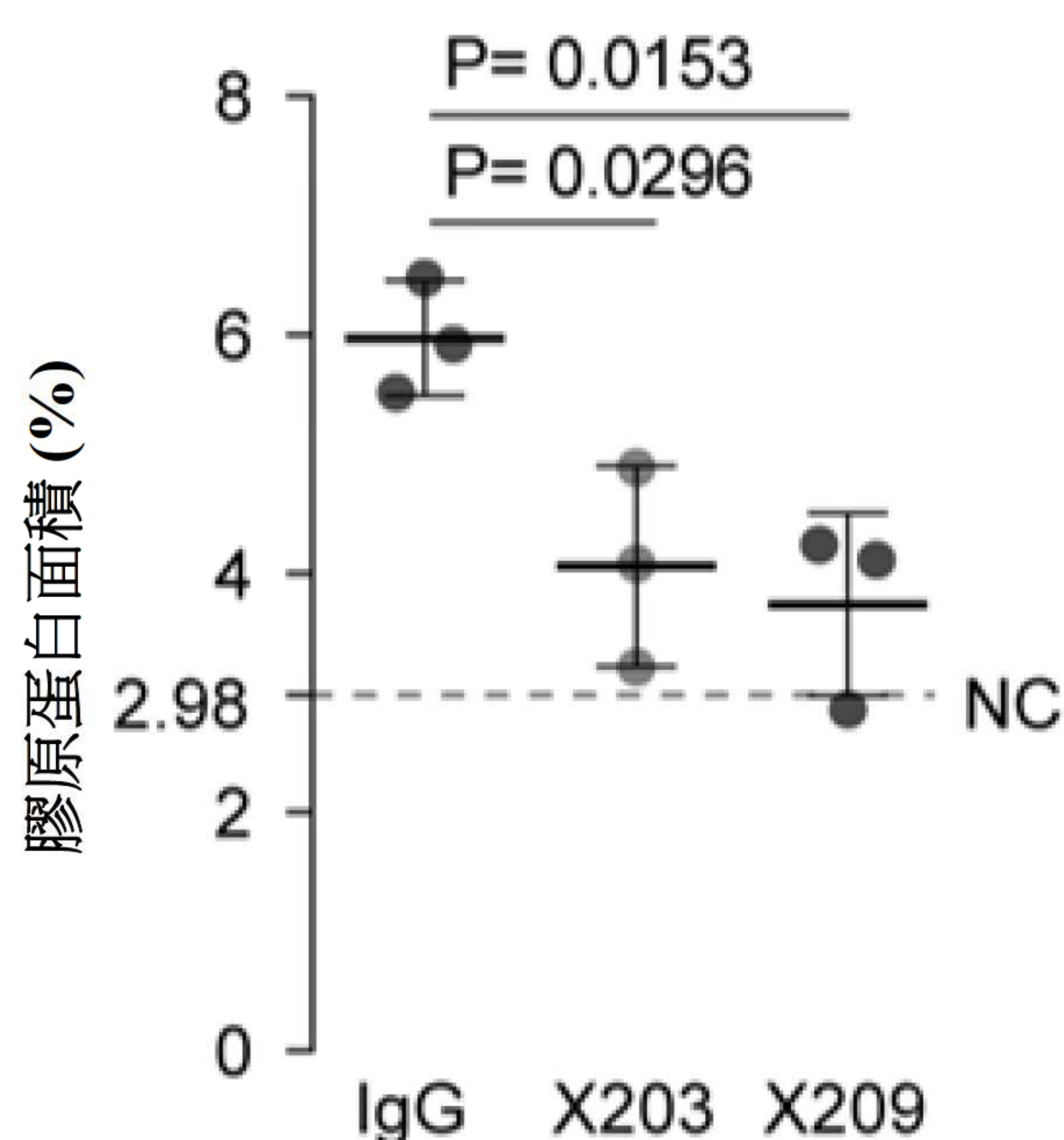
【圖31B】



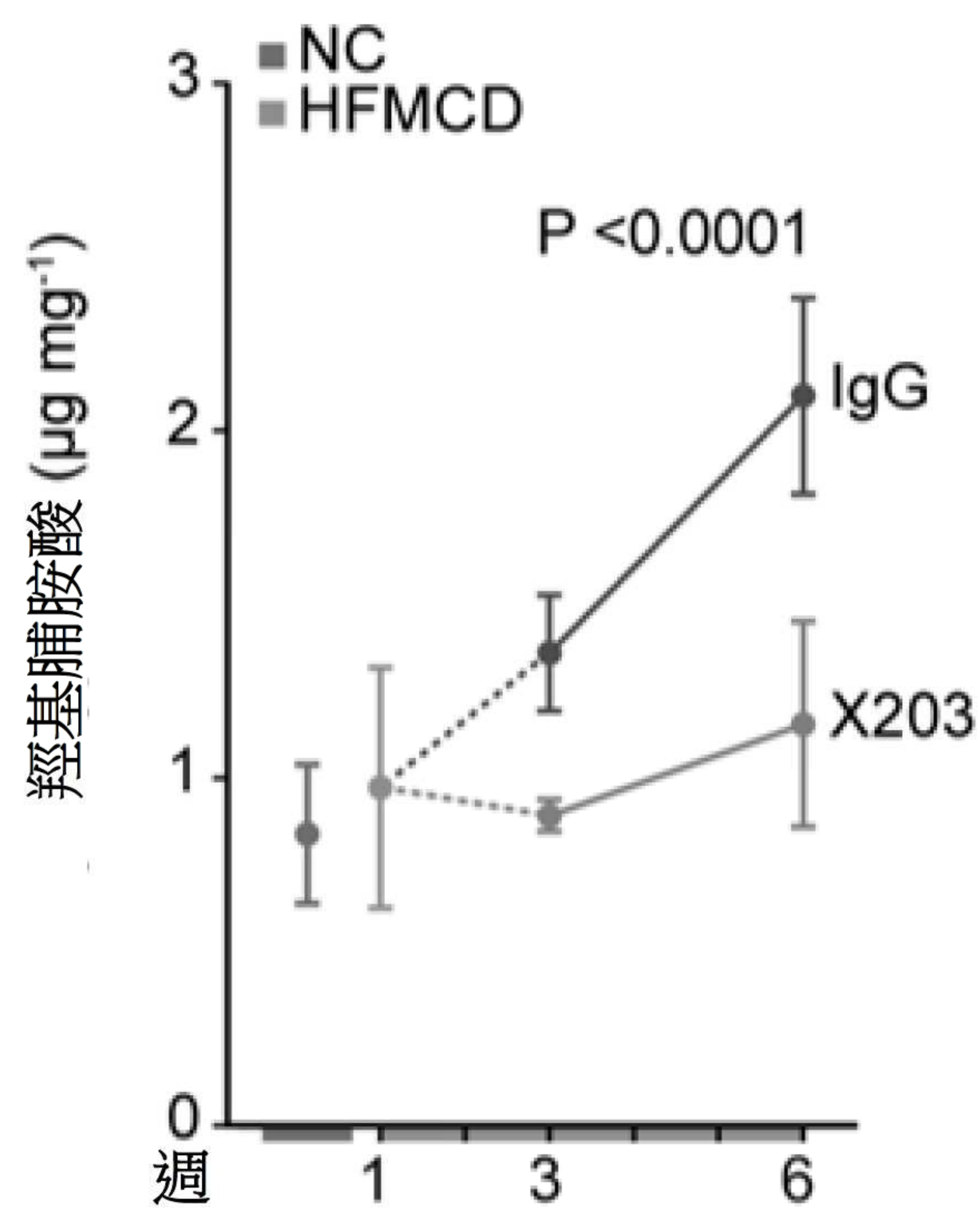
【圖31C】



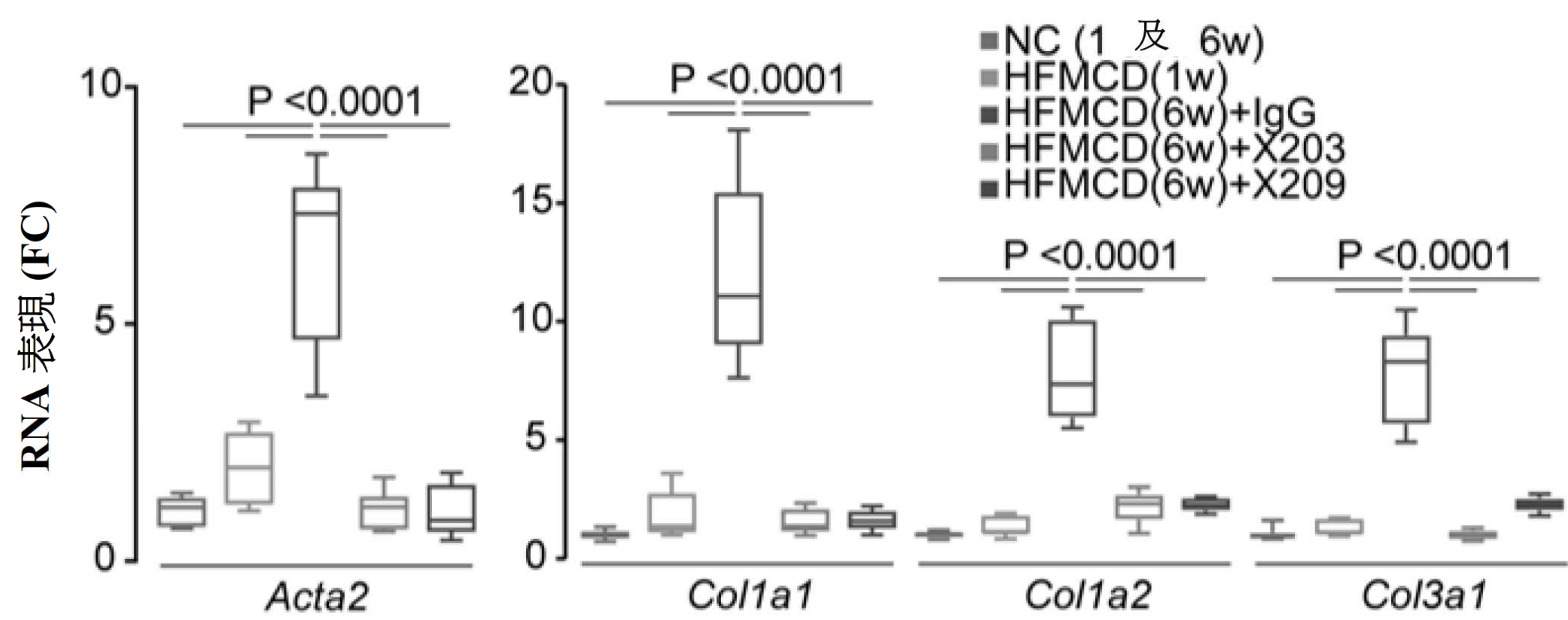
【圖31D】



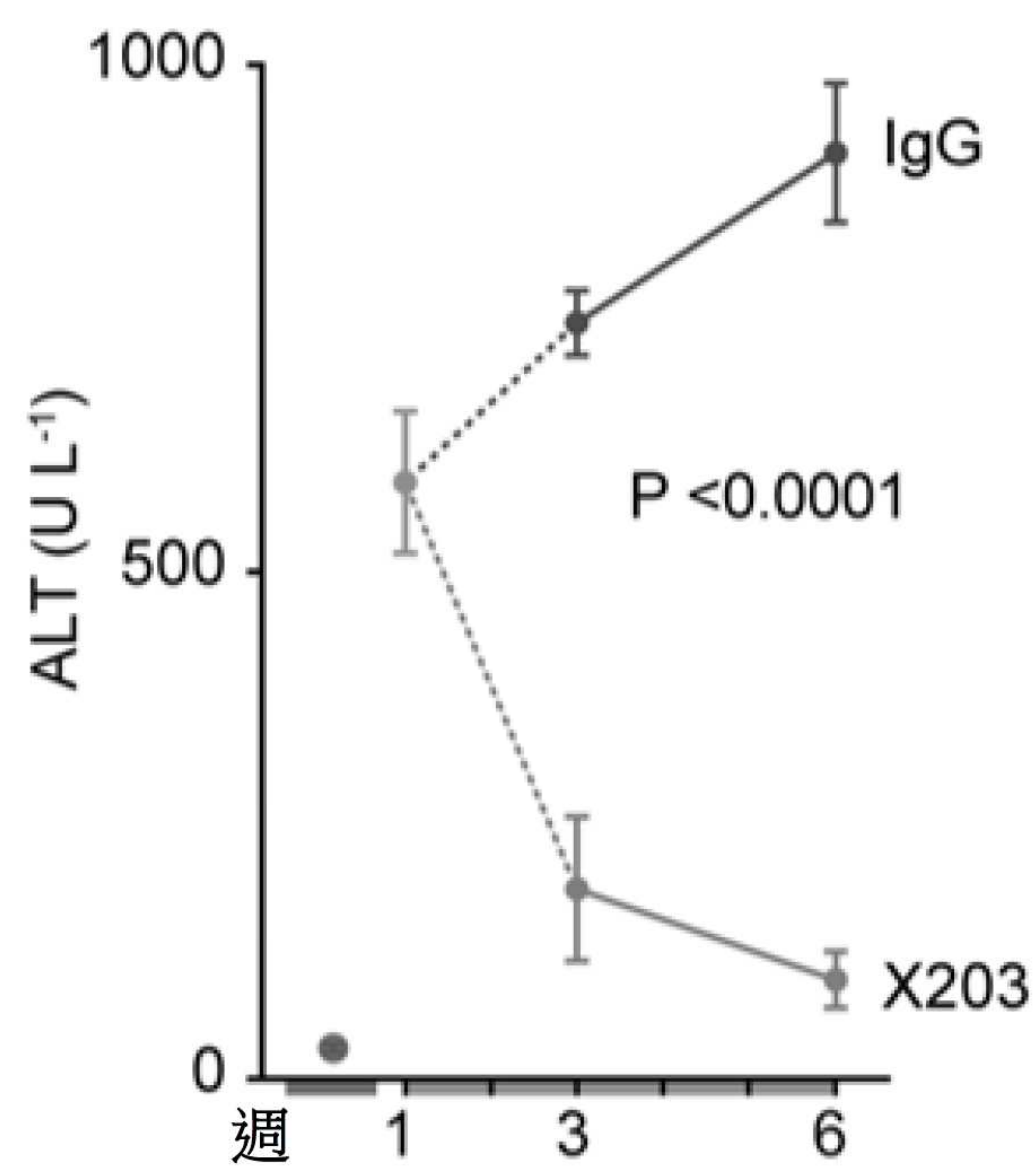
【圖31E】



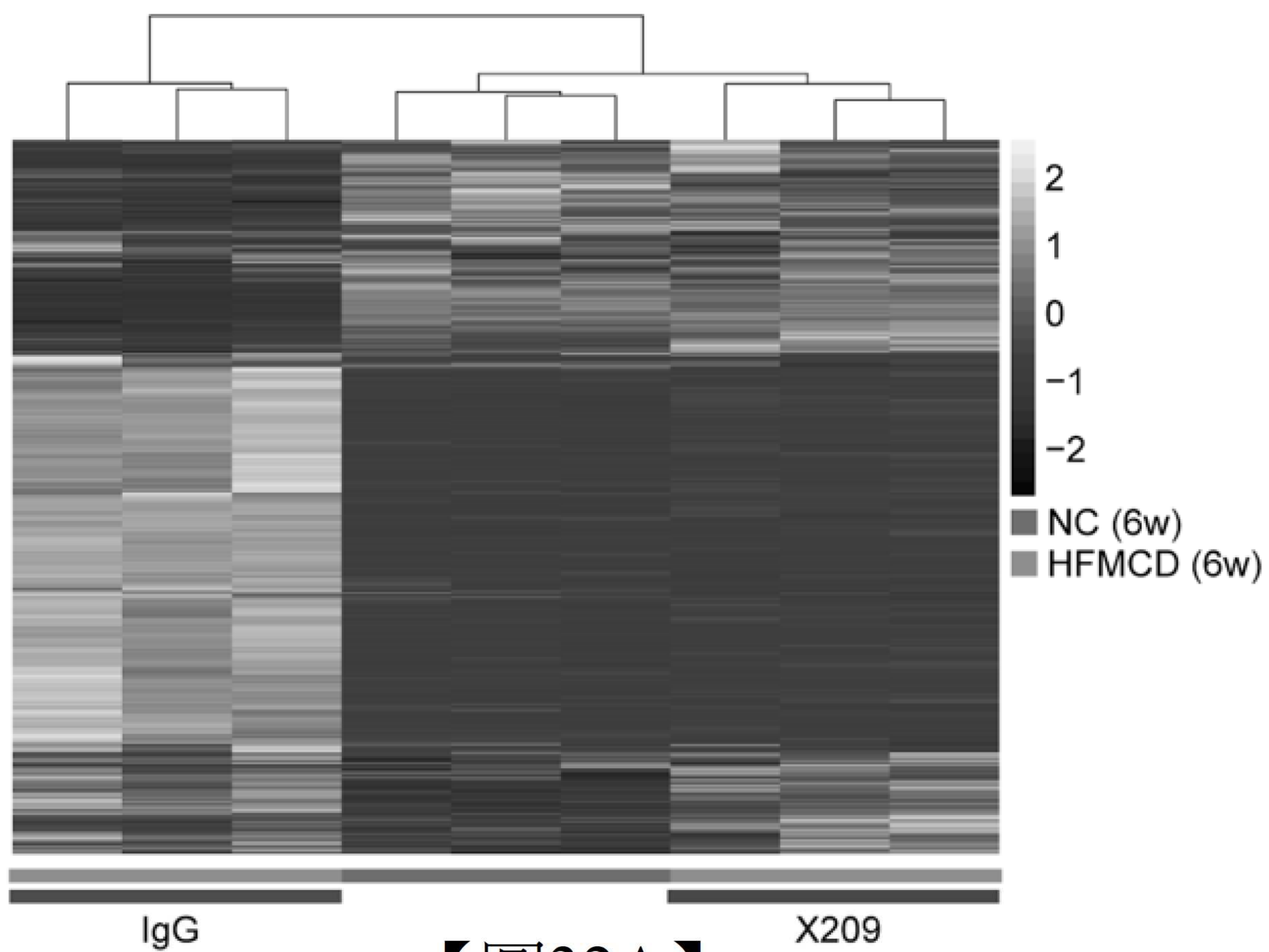
【圖31F】



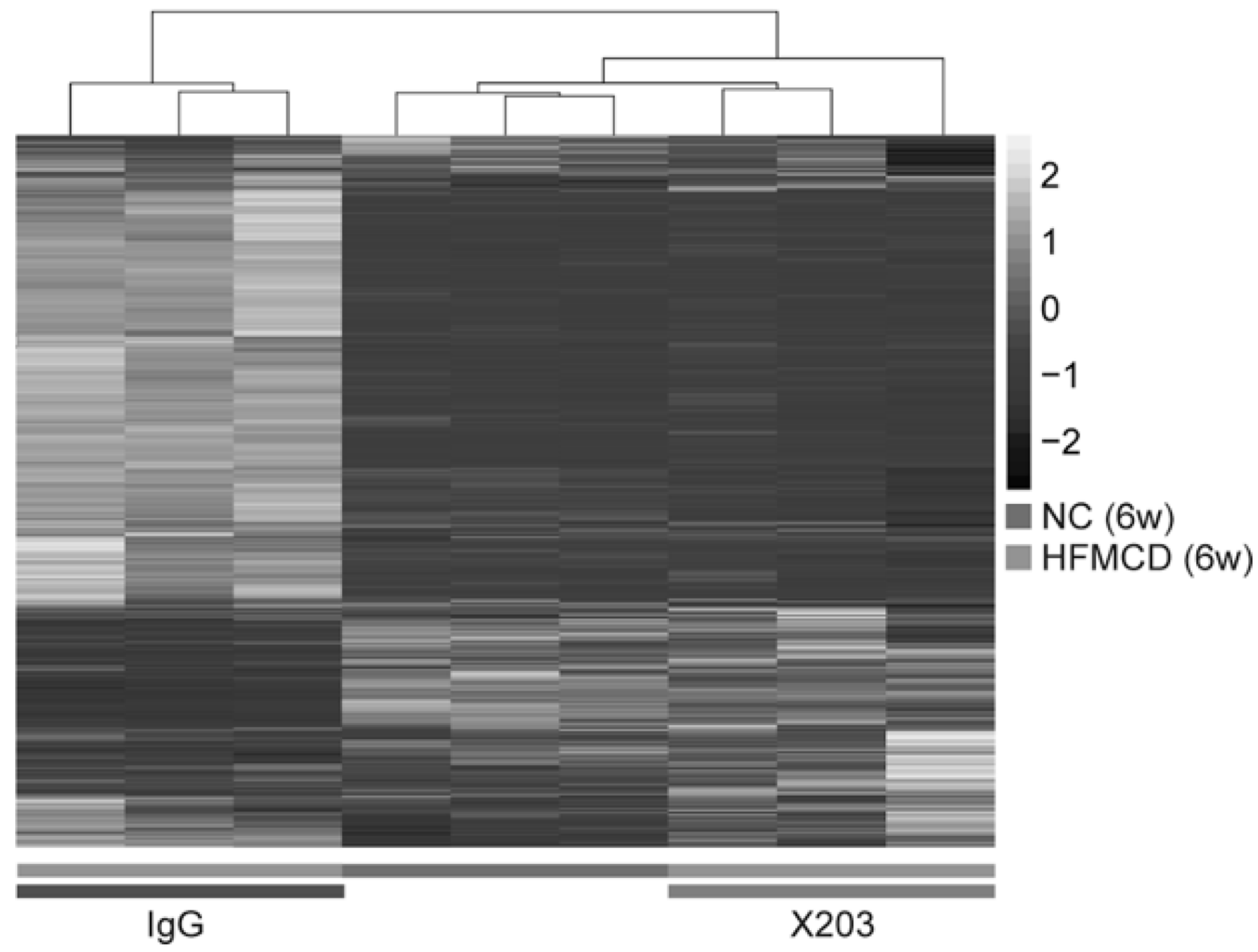
【圖31G】



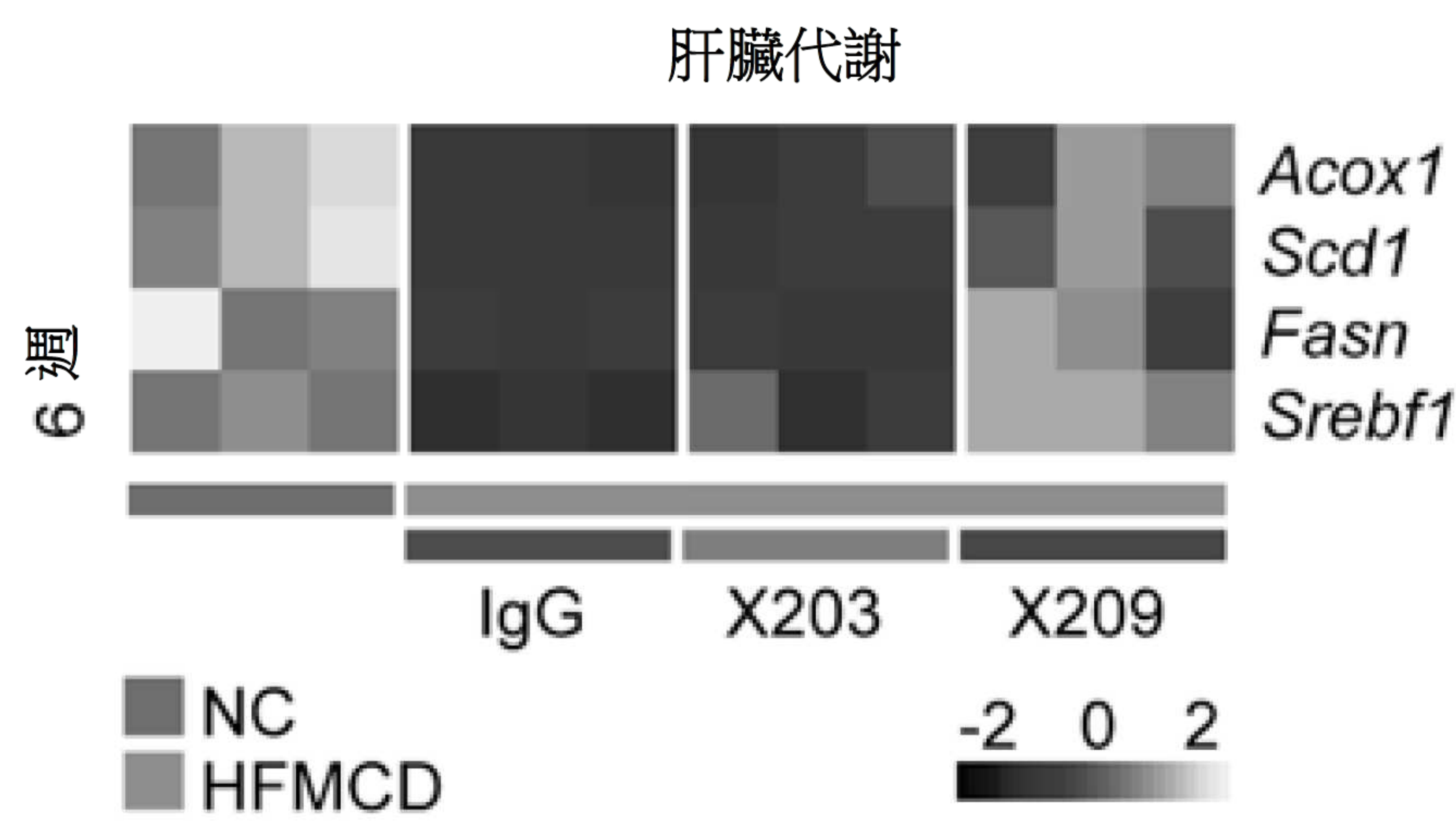
【圖31H】



【圖32A】



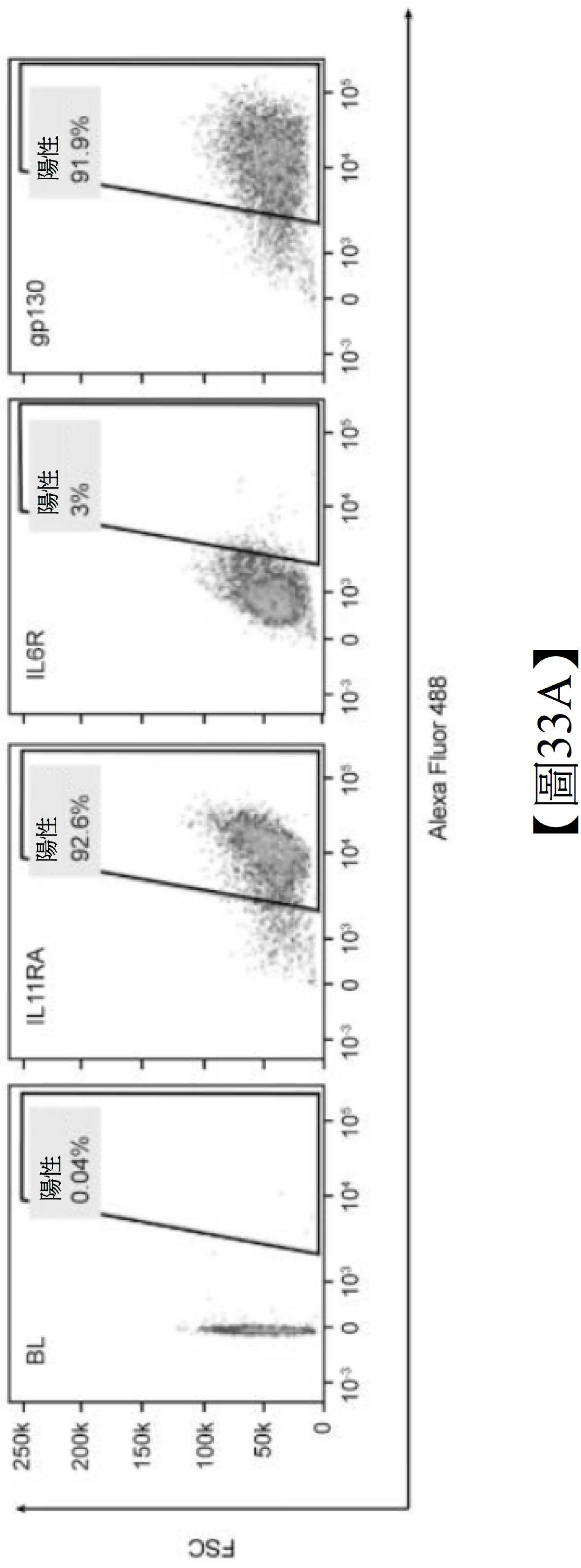
【圖32B】



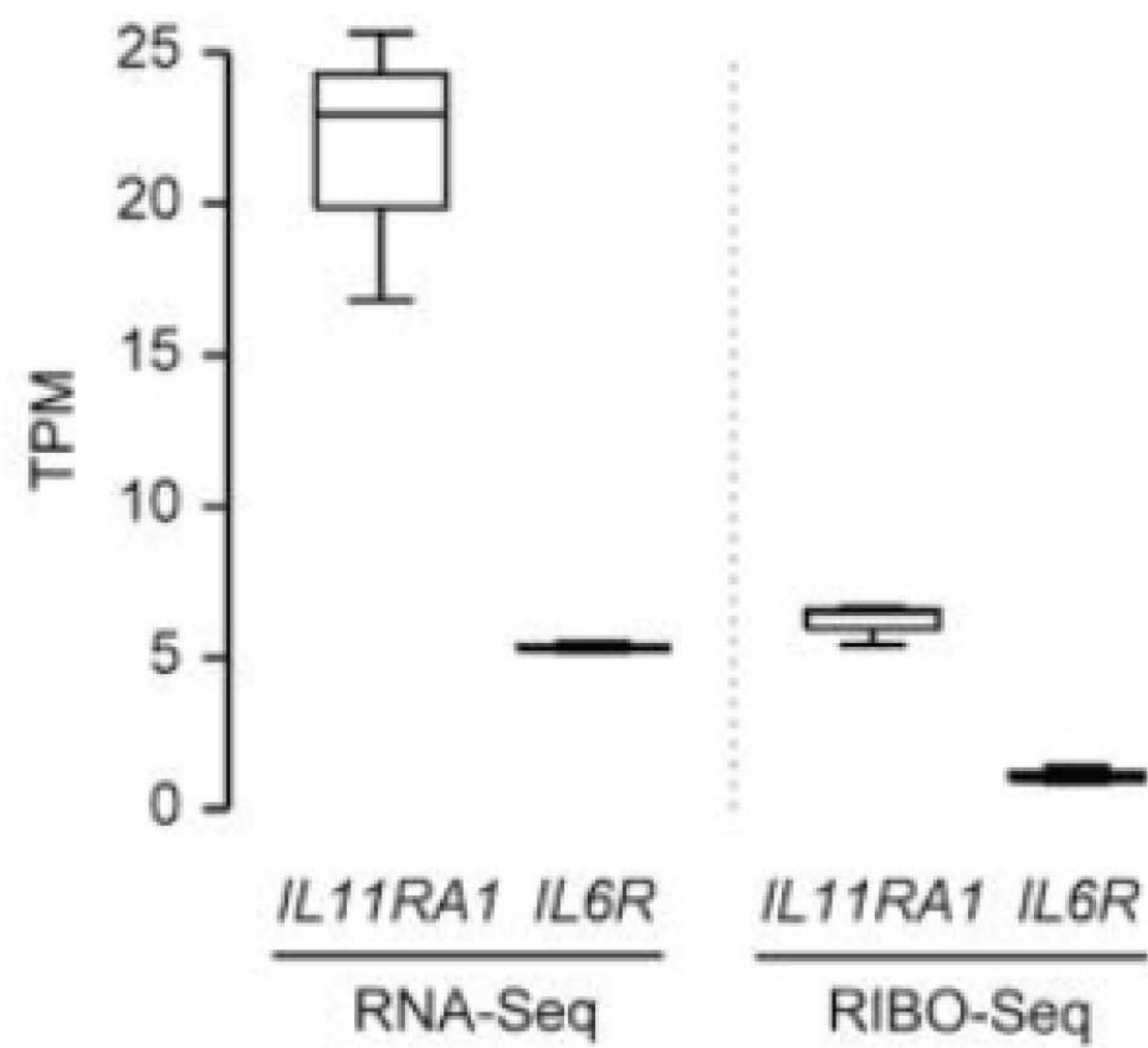
【圖32C】



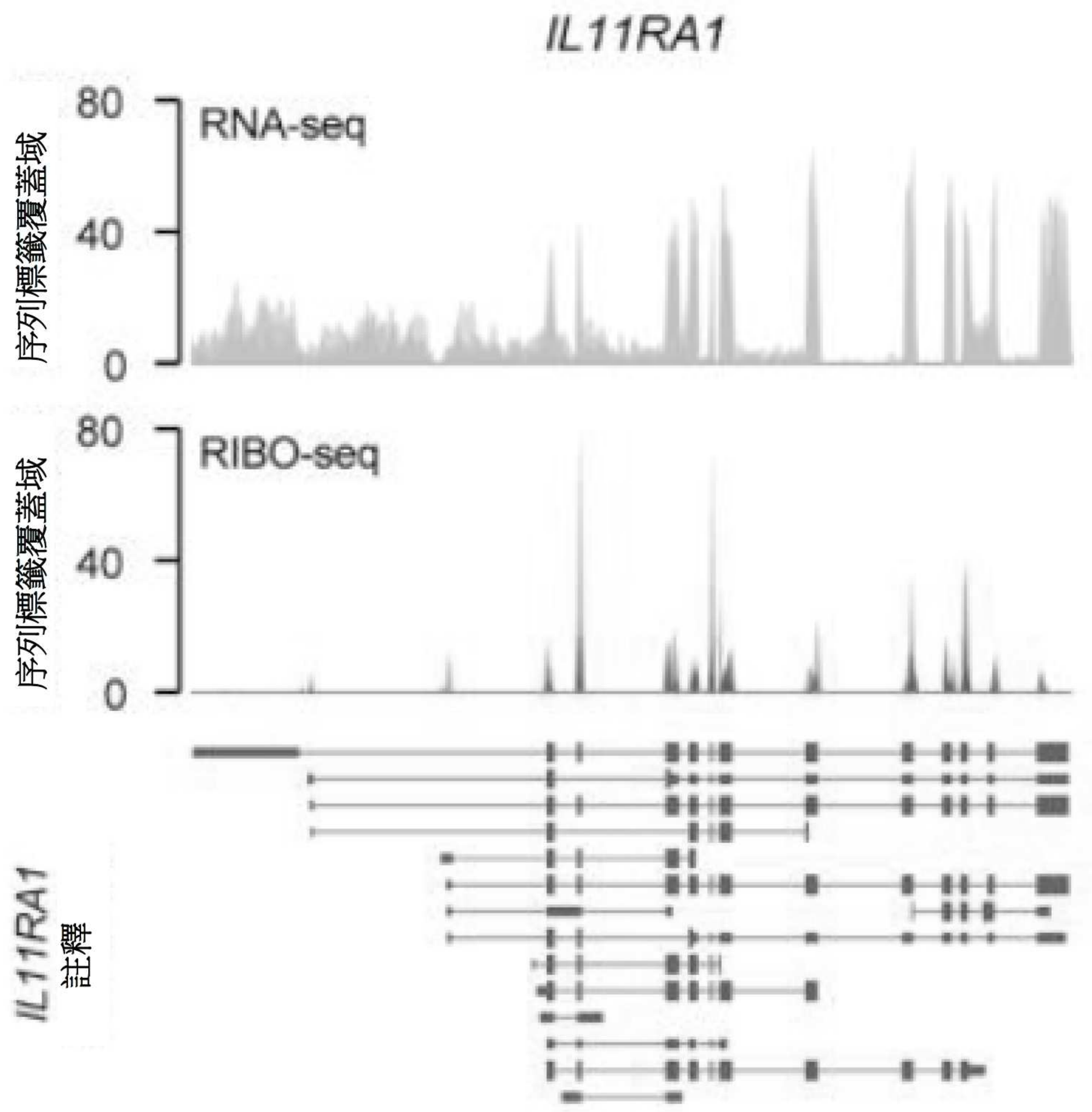
【圖32D】



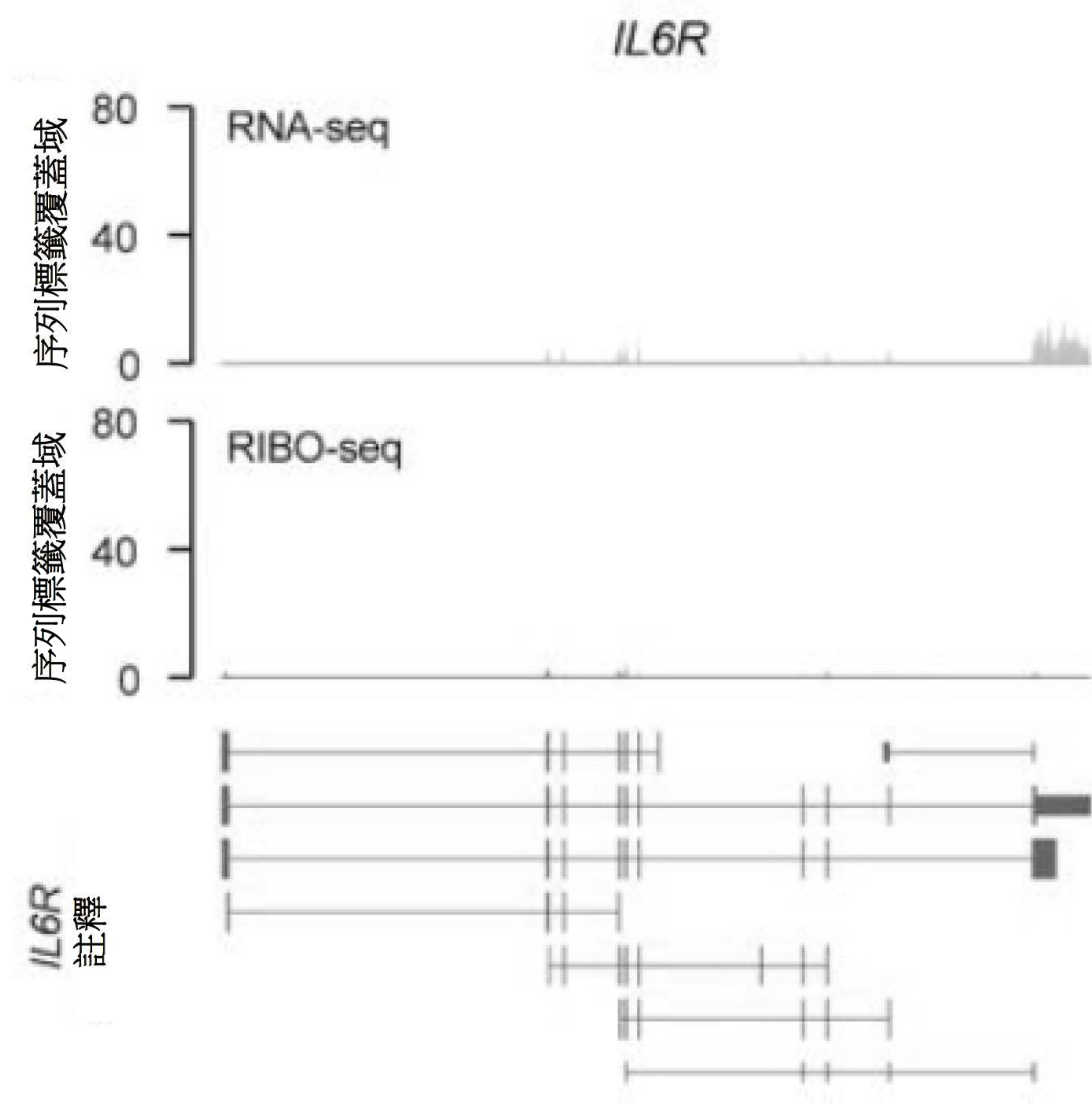
【圖33A】



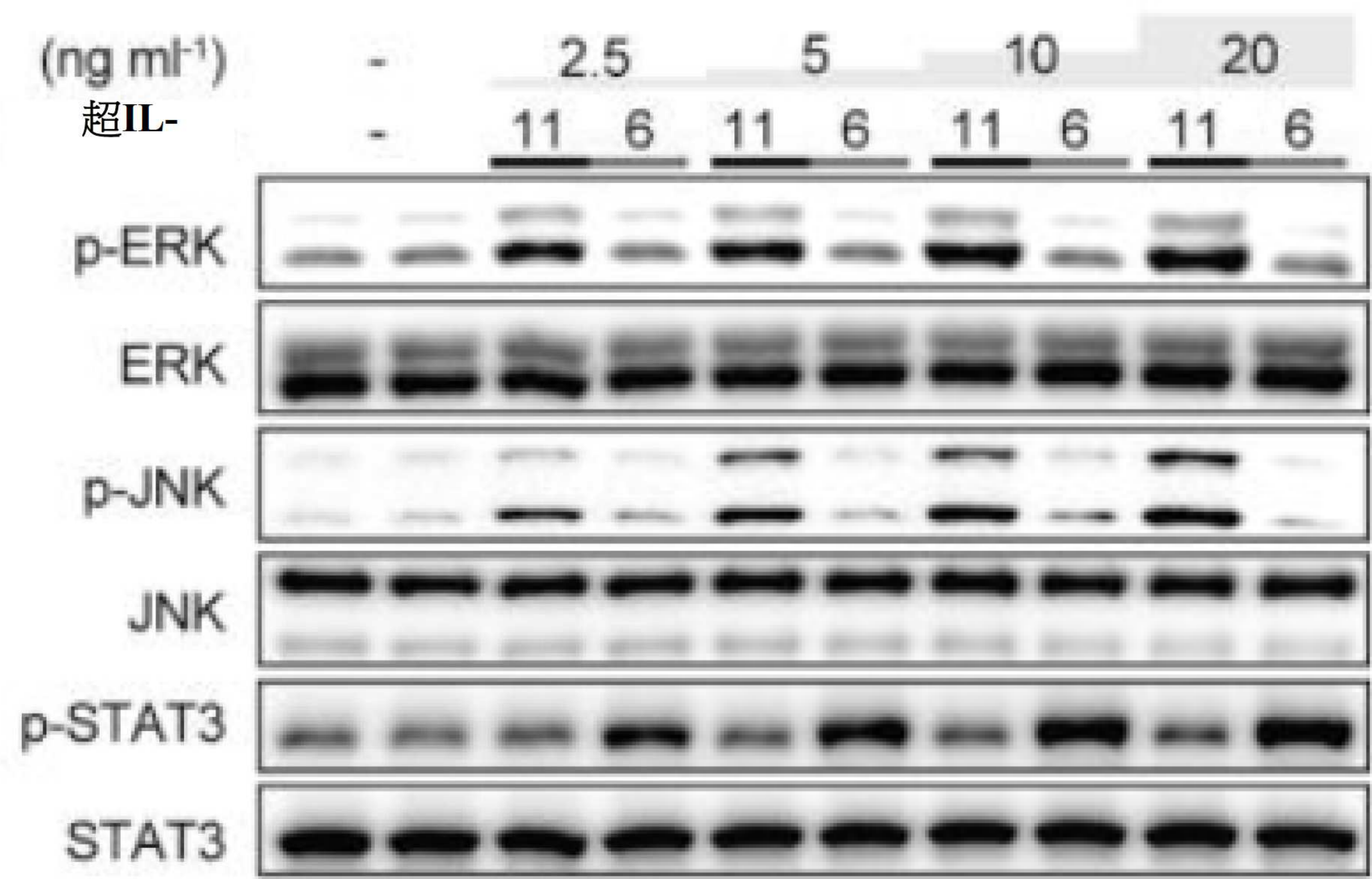
【圖33B】



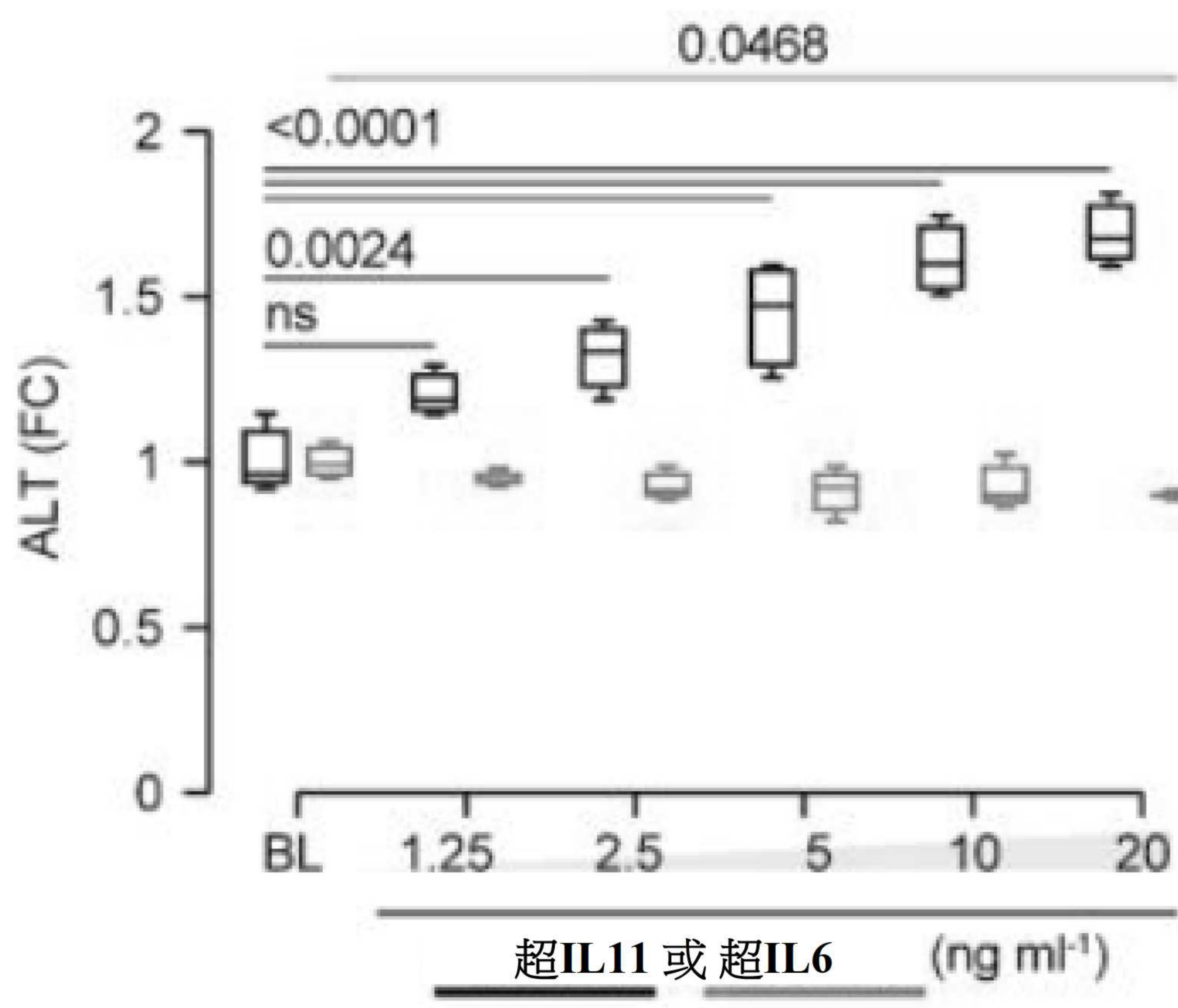
【圖33C】



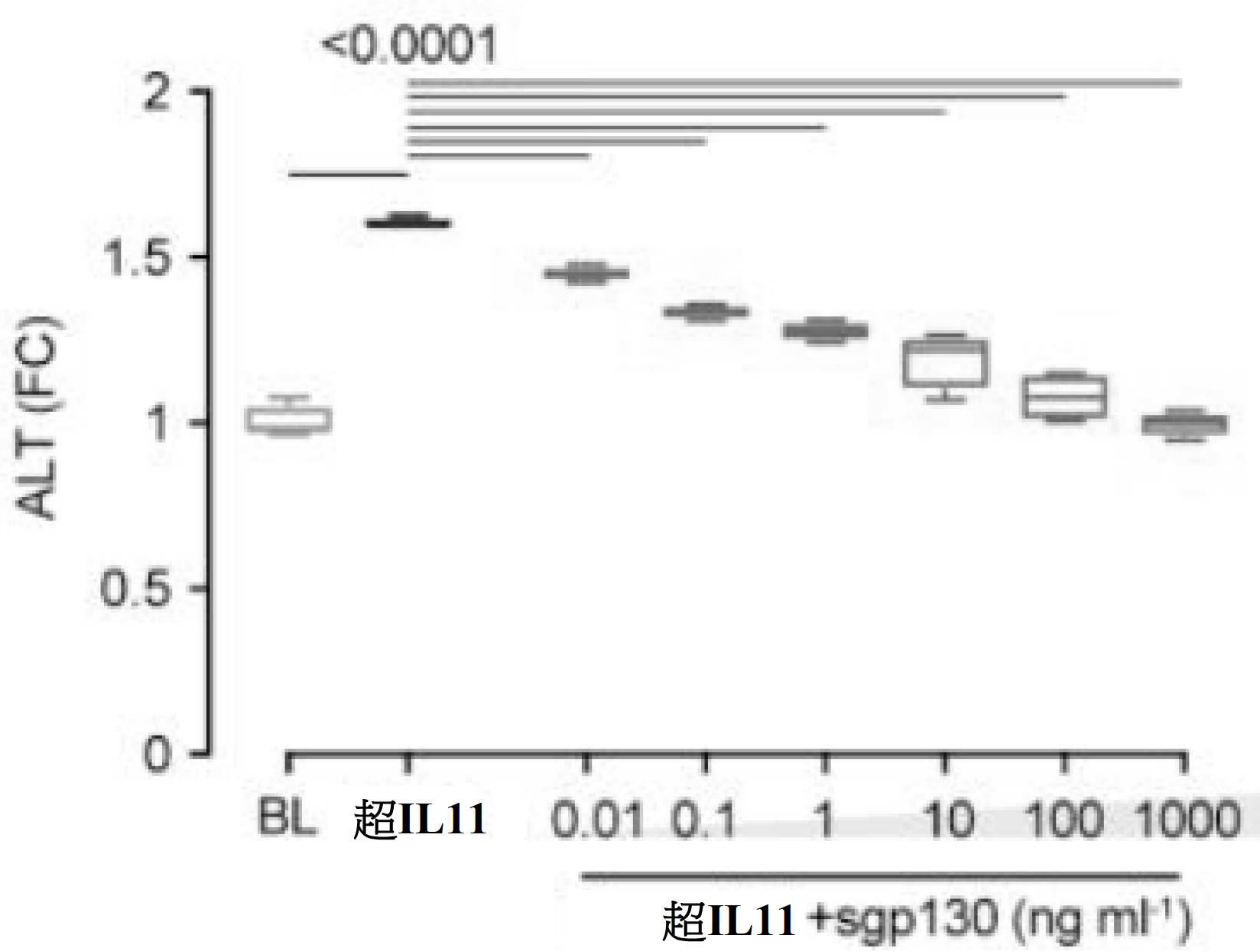
【圖33D】



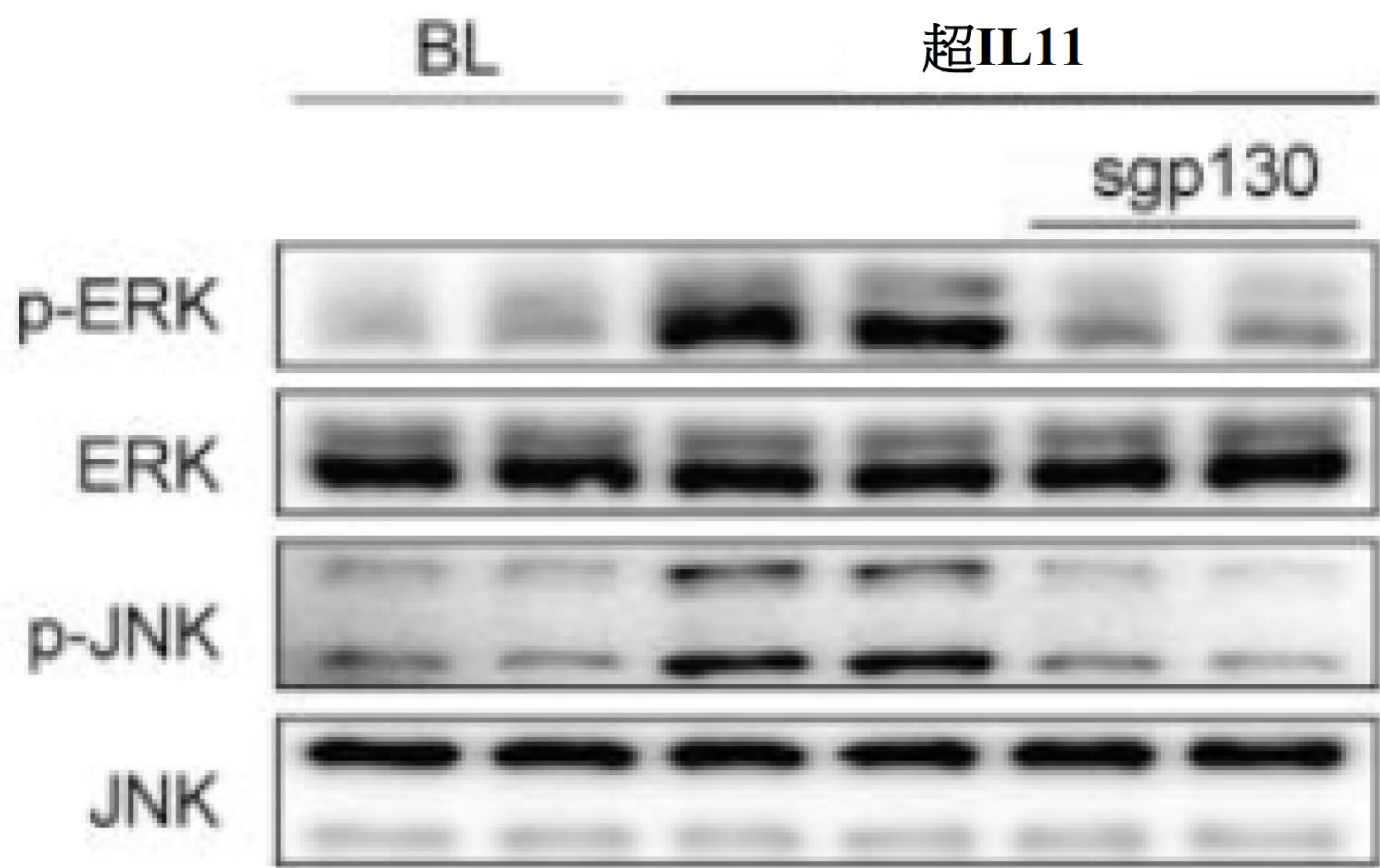
【圖33E】



【圖33F】



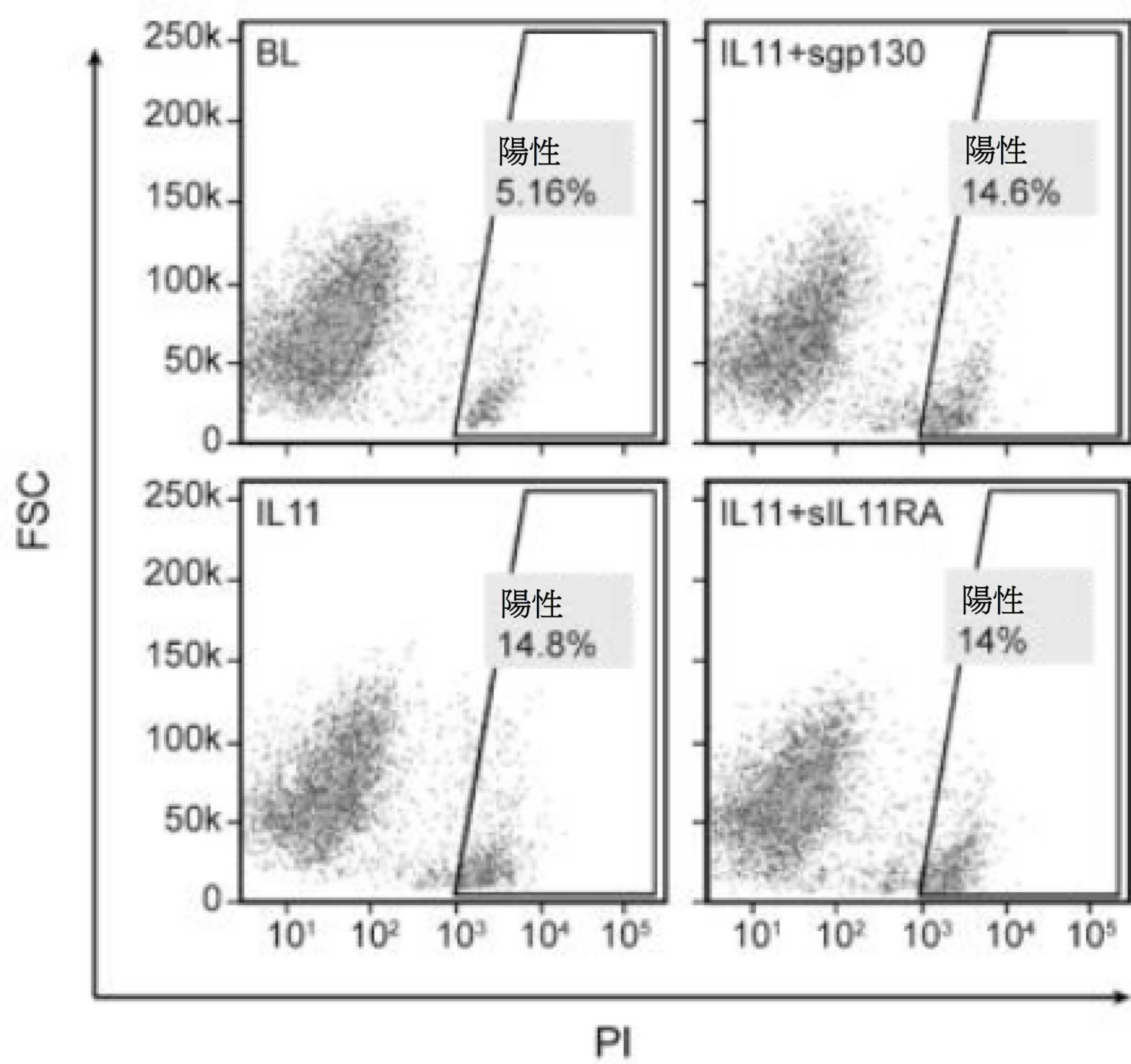
【圖33G】



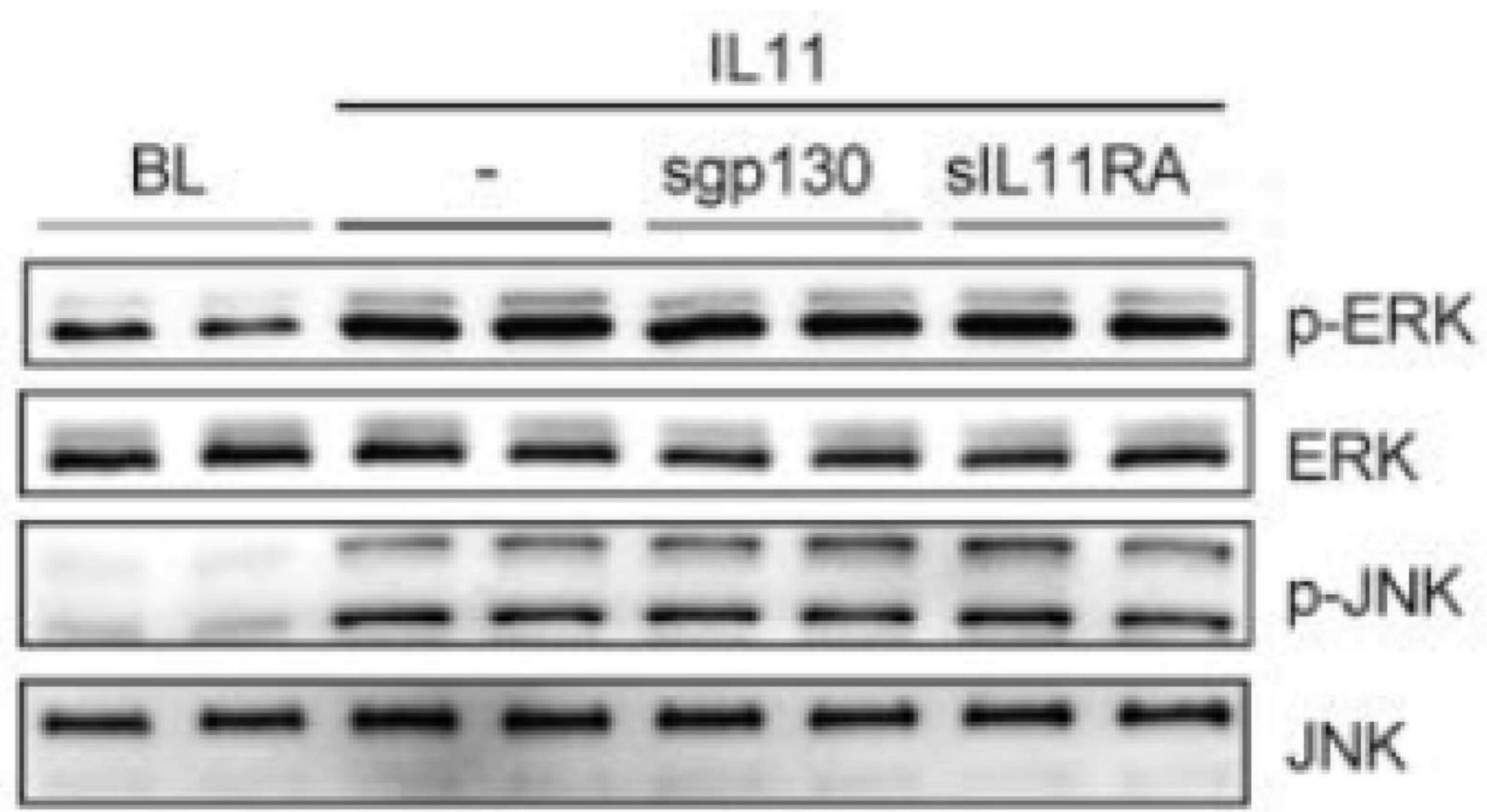
【圖33H】



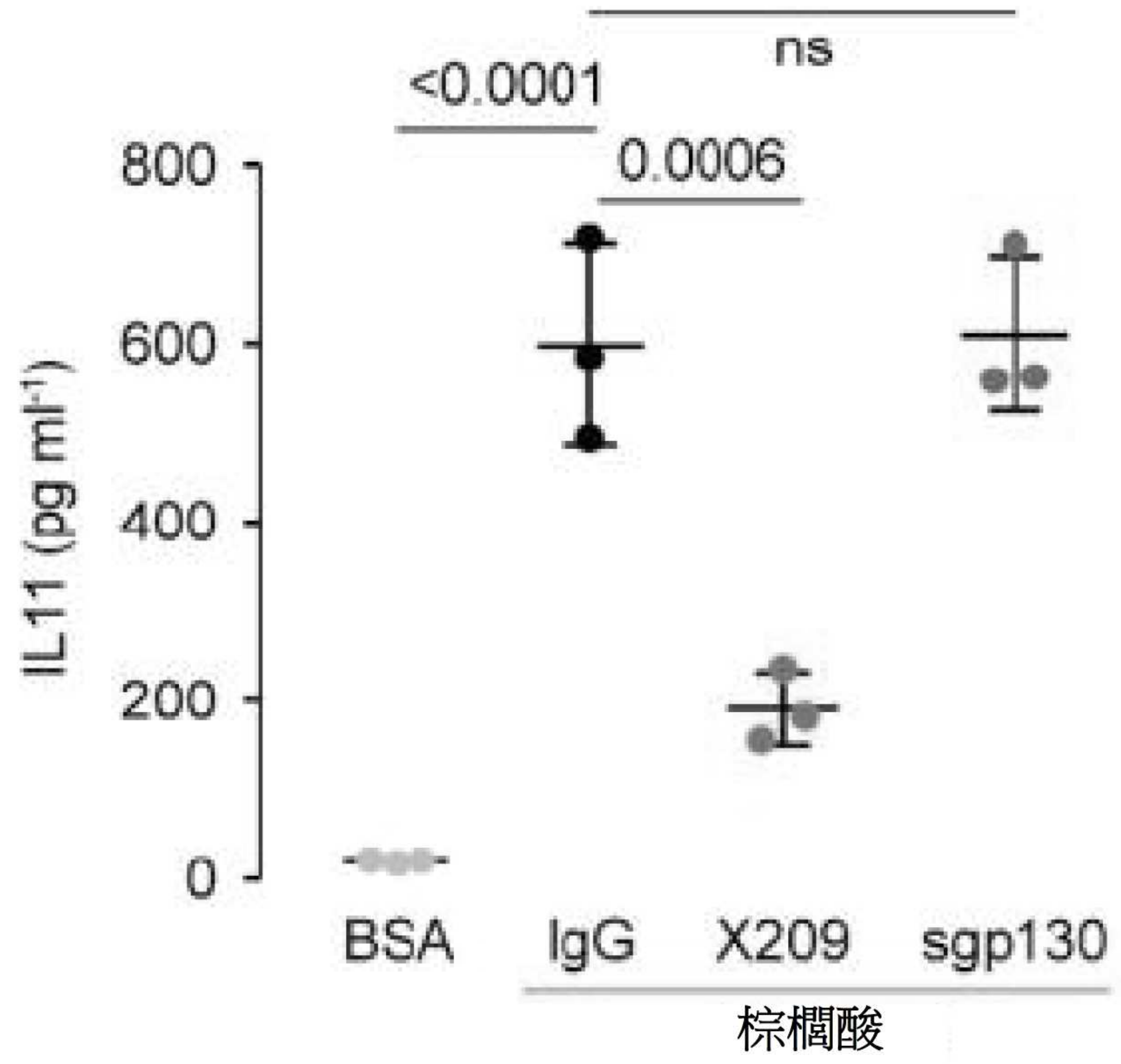
【圖33I】



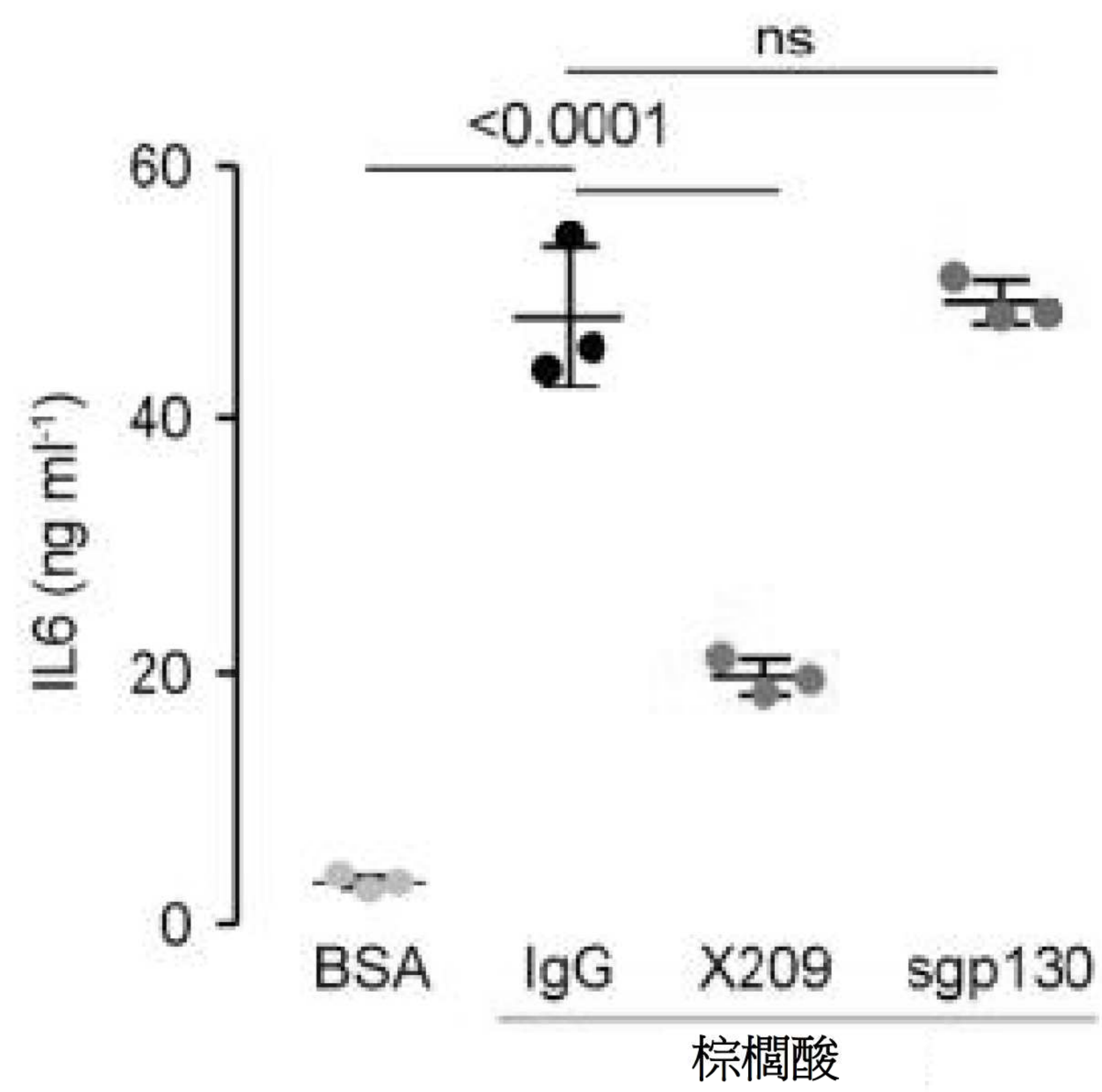
【圖33J】



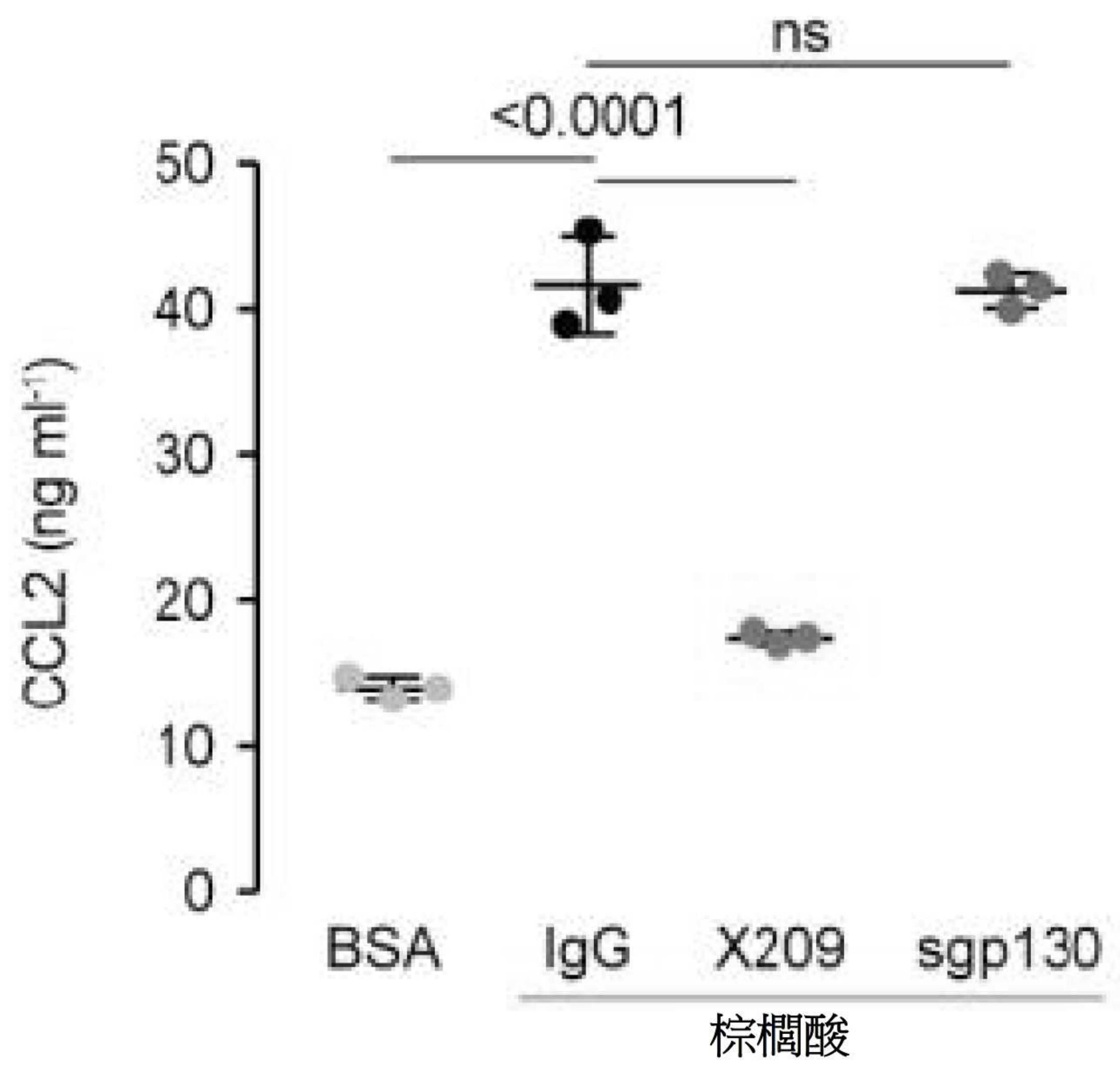
【圖33K】



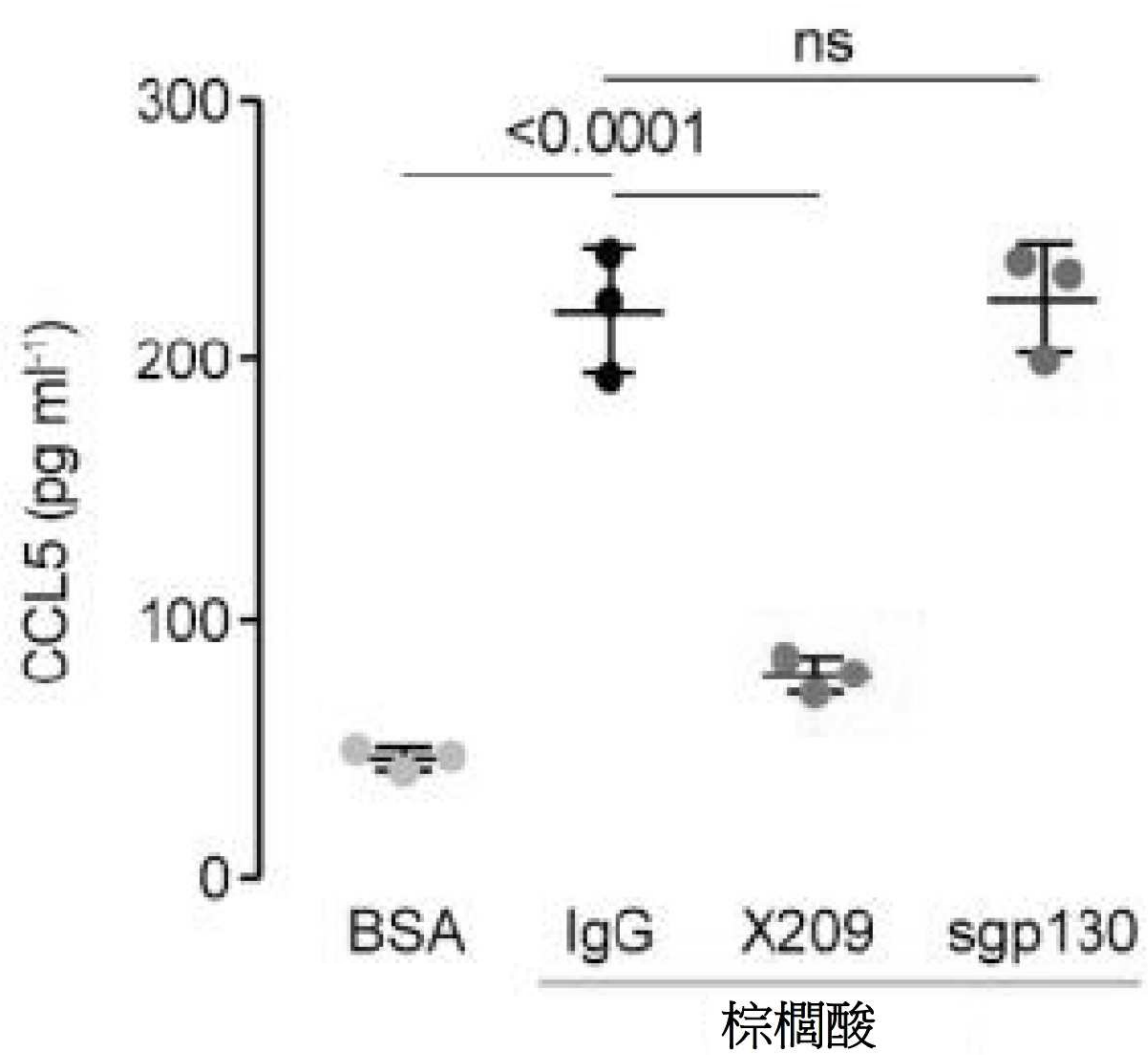
【圖34A】



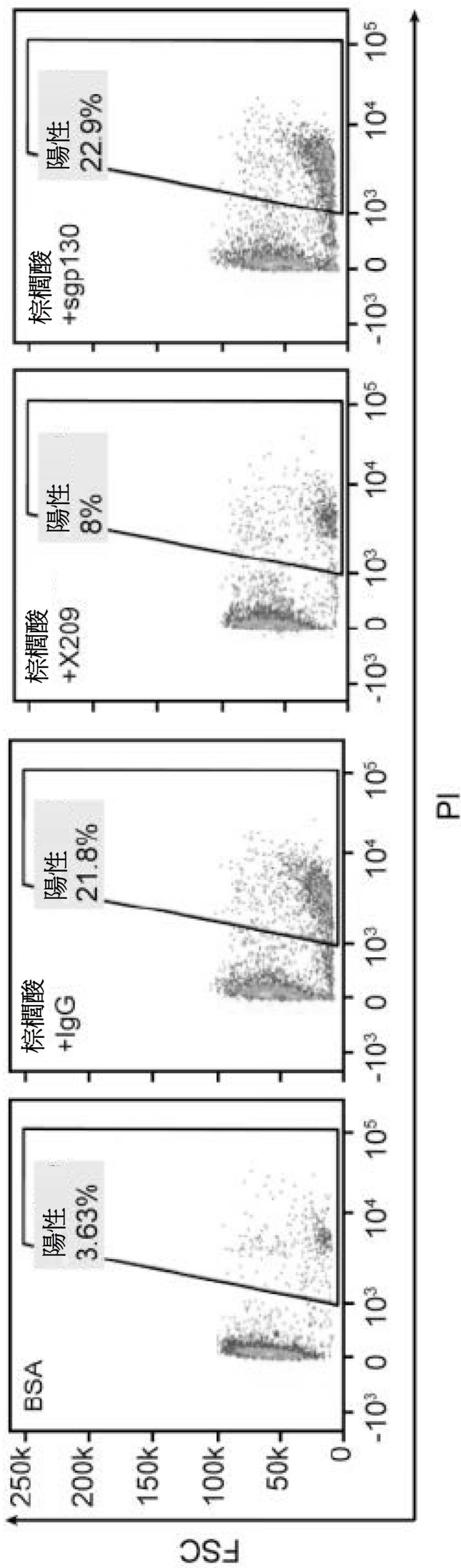
【圖34B】



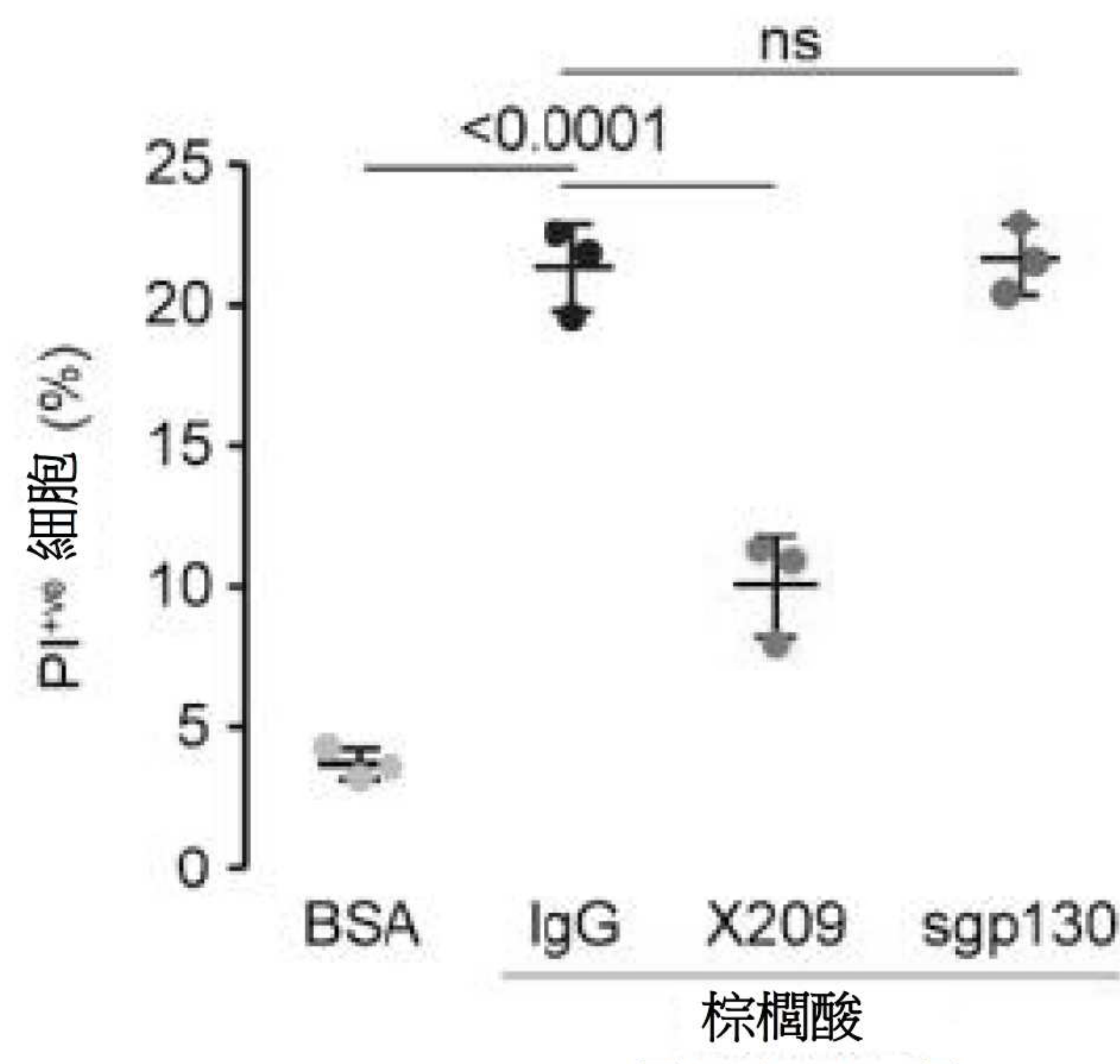
【圖34C】



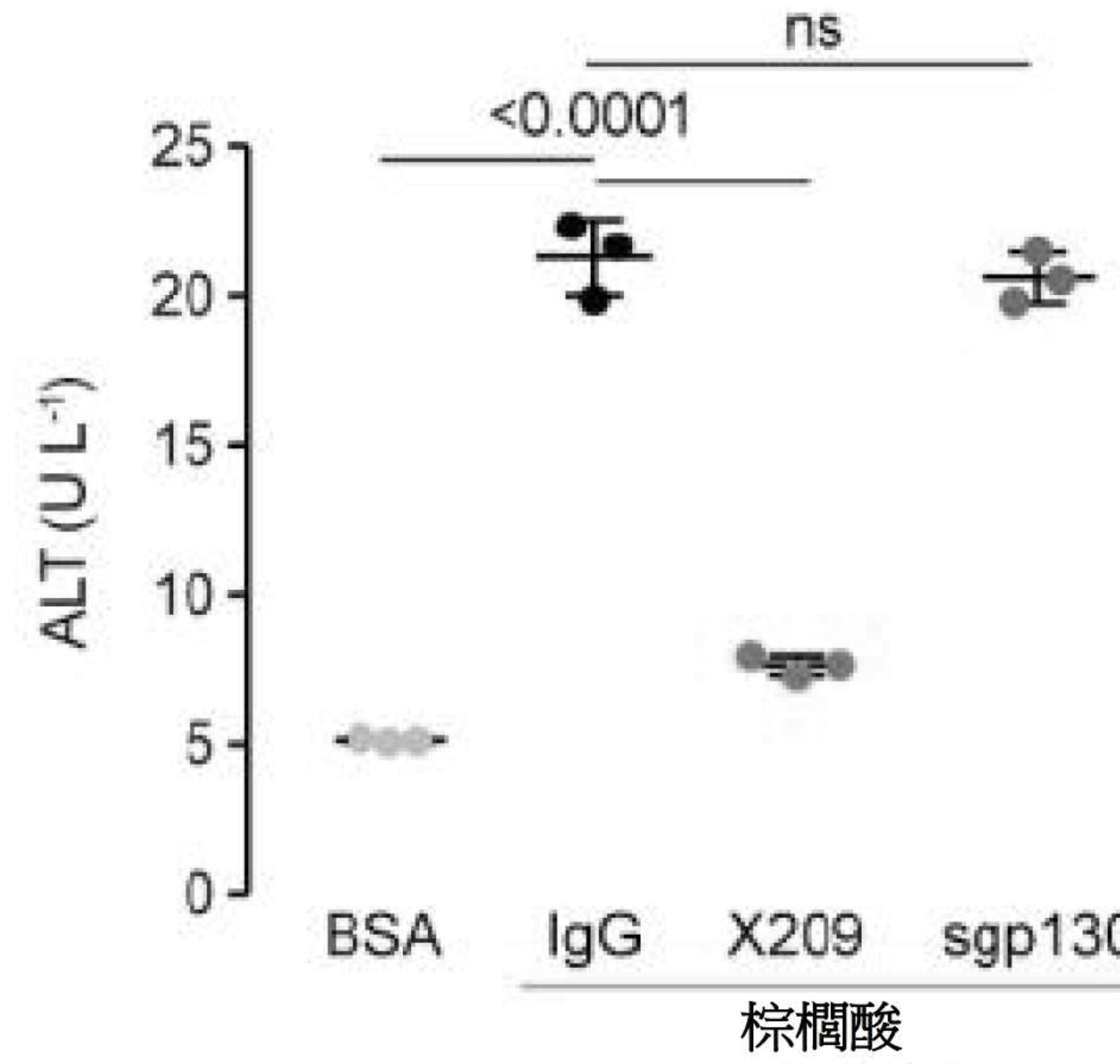
【圖34D】



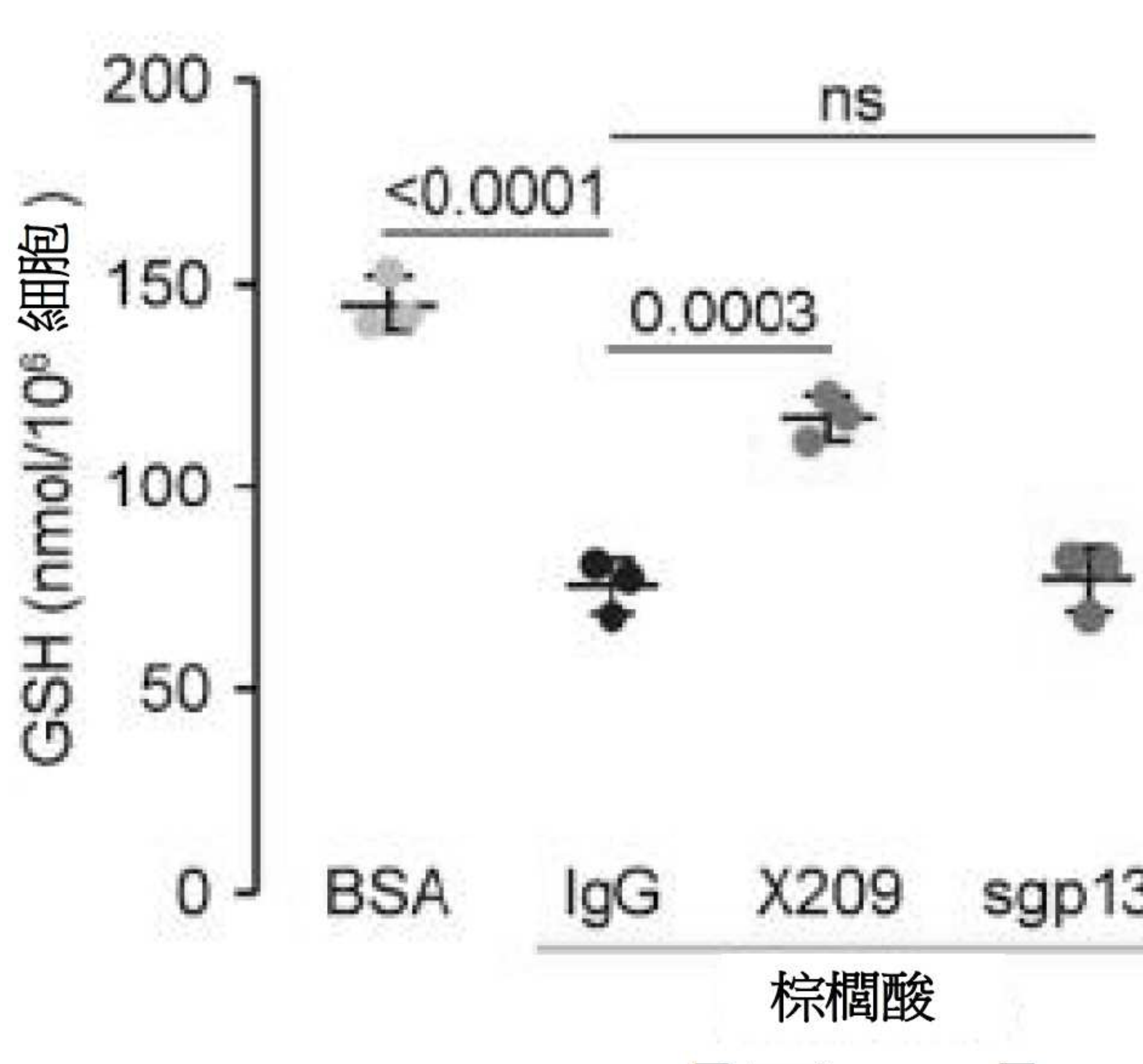
【圖34E】



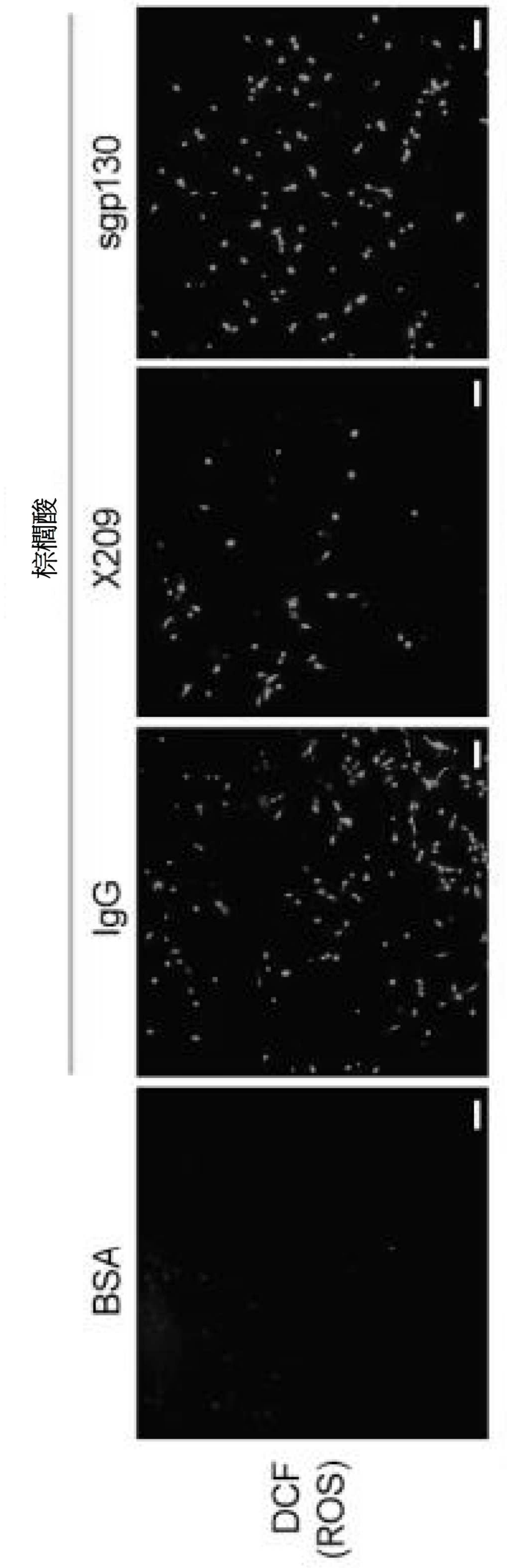
【圖34F】



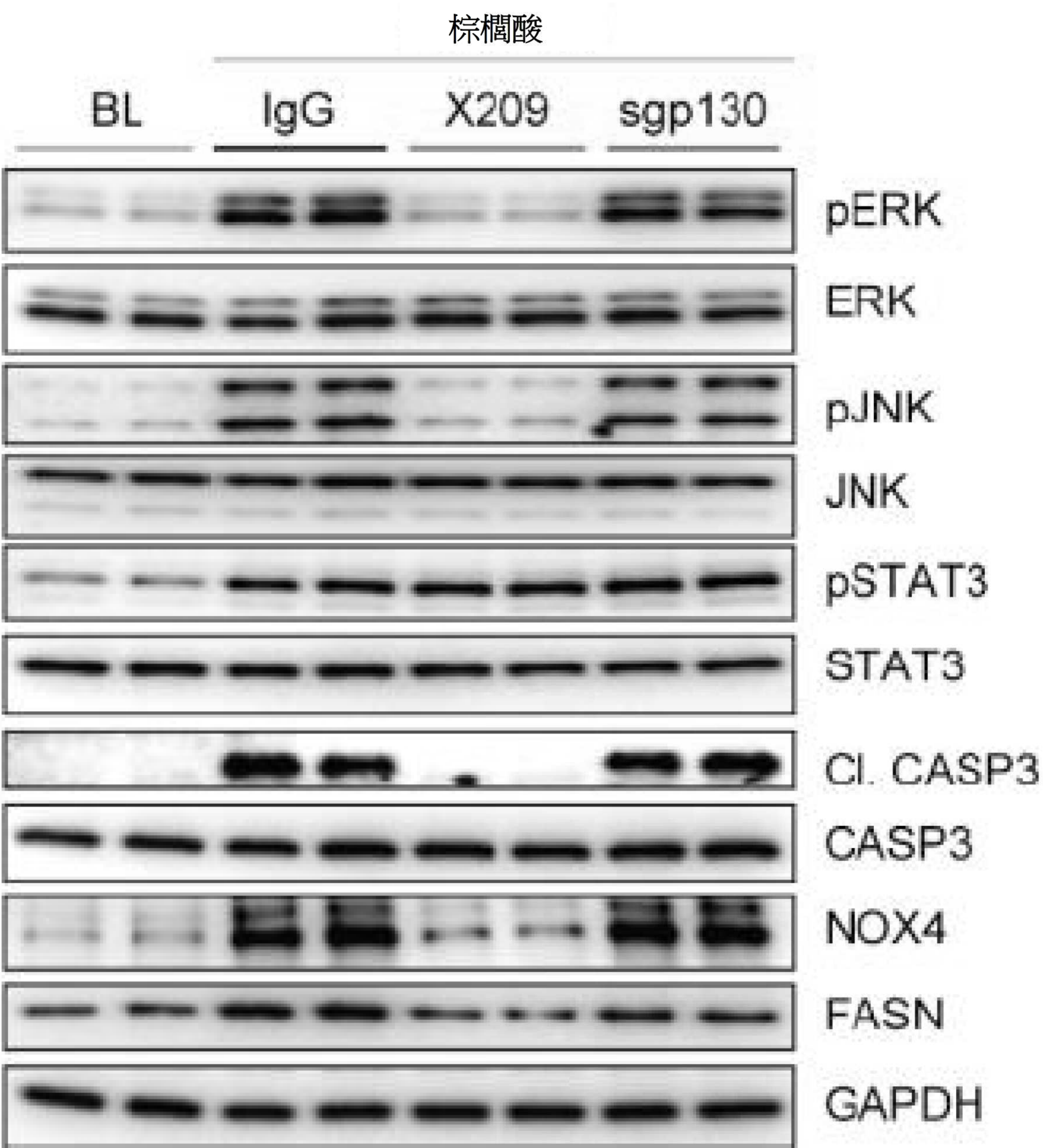
【圖34G】



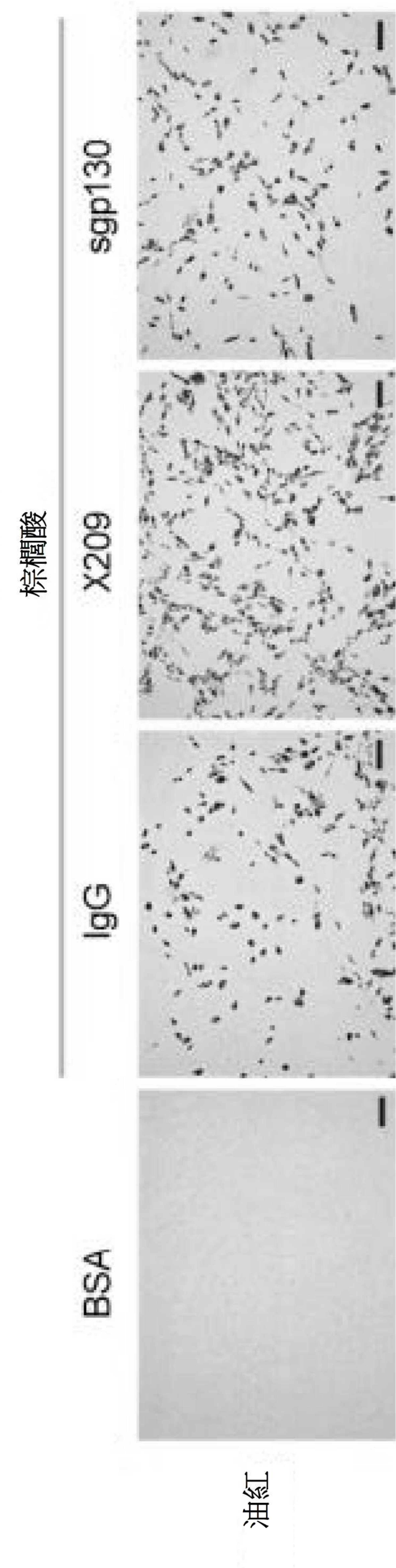
【圖34H】



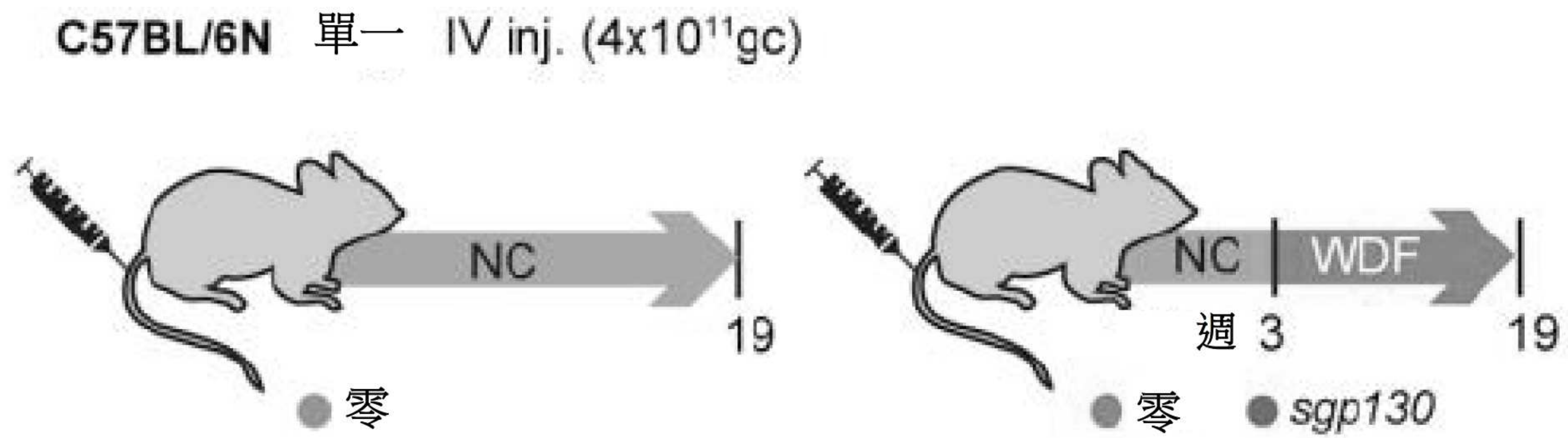
【圖34I】



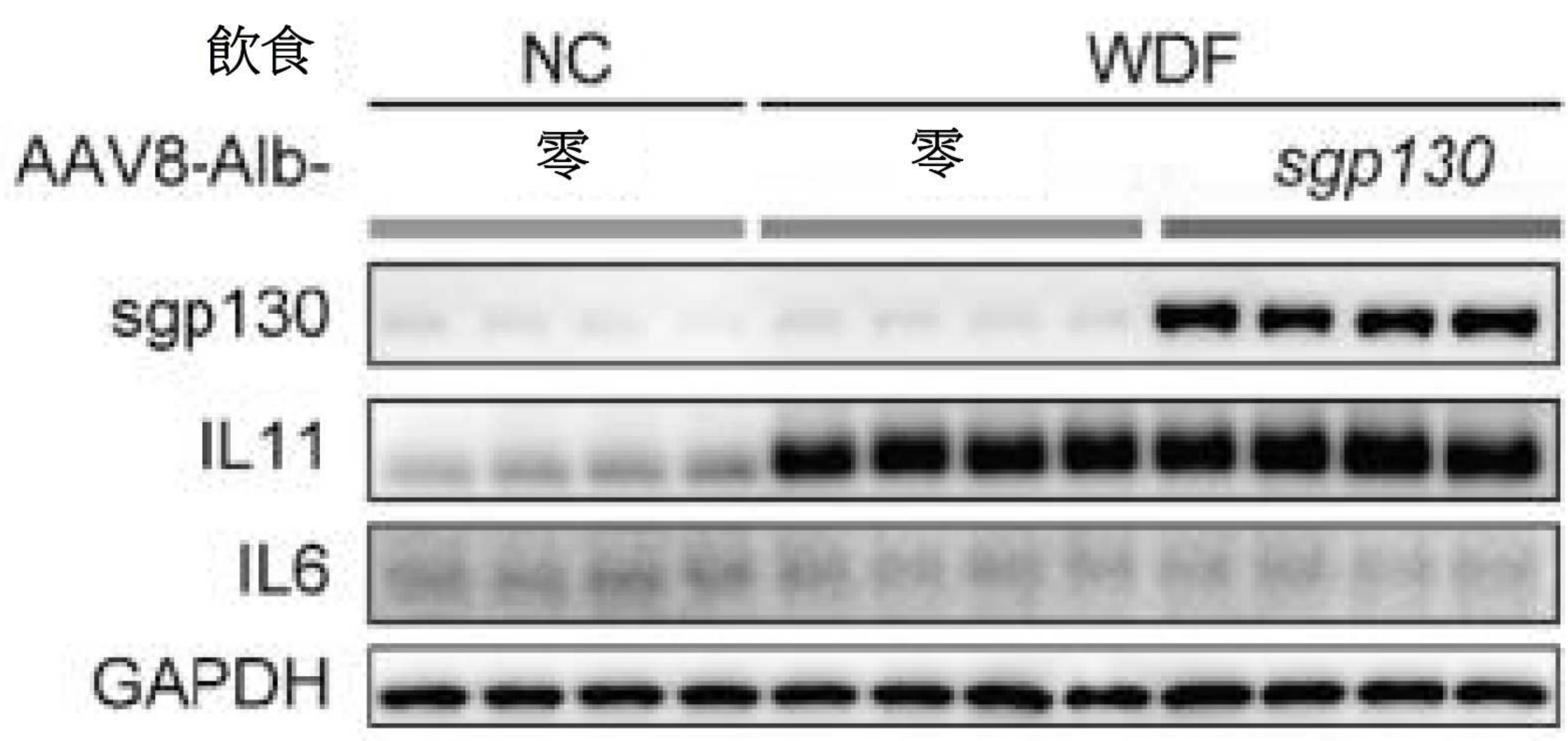
【圖34J】



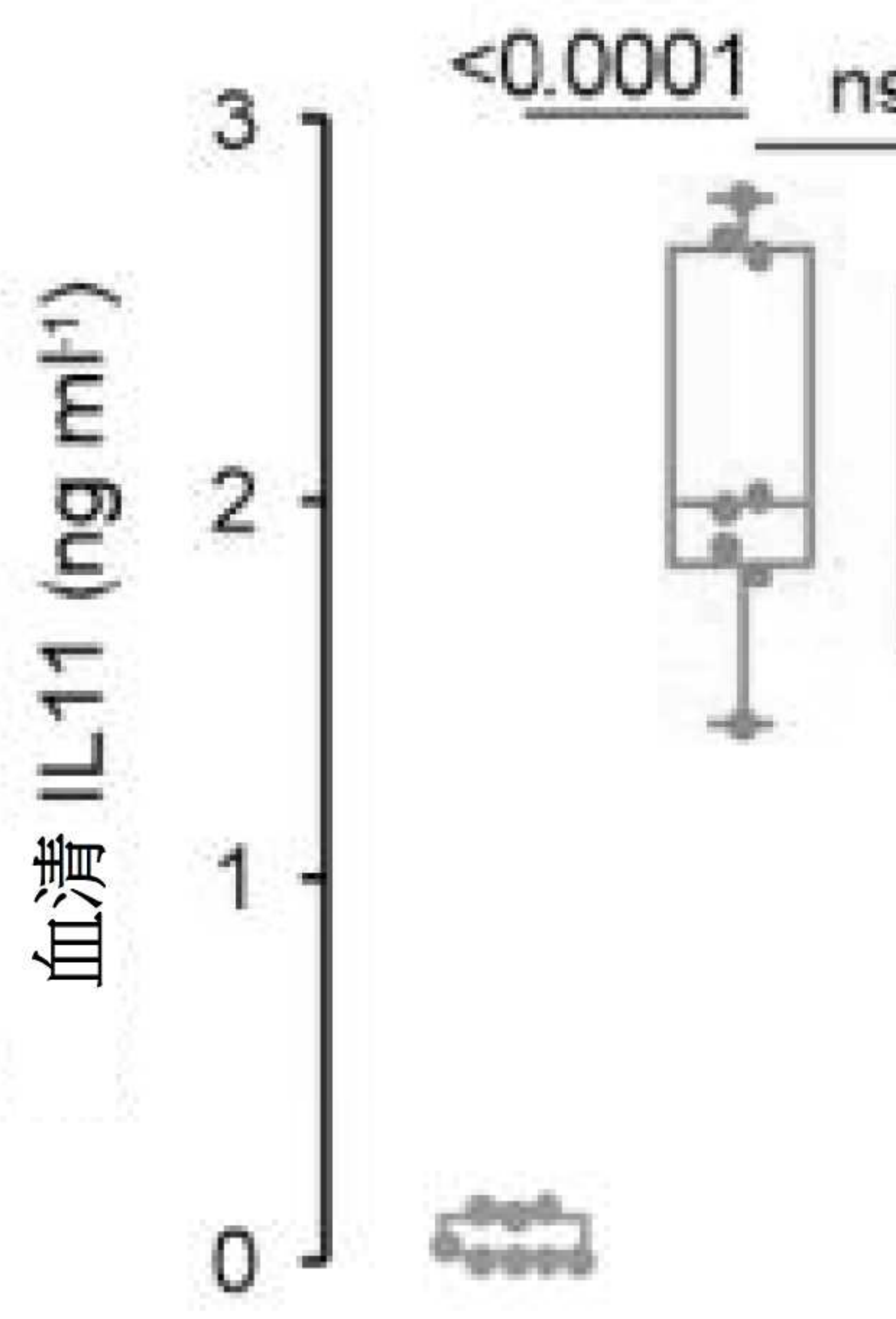
【圖34K】



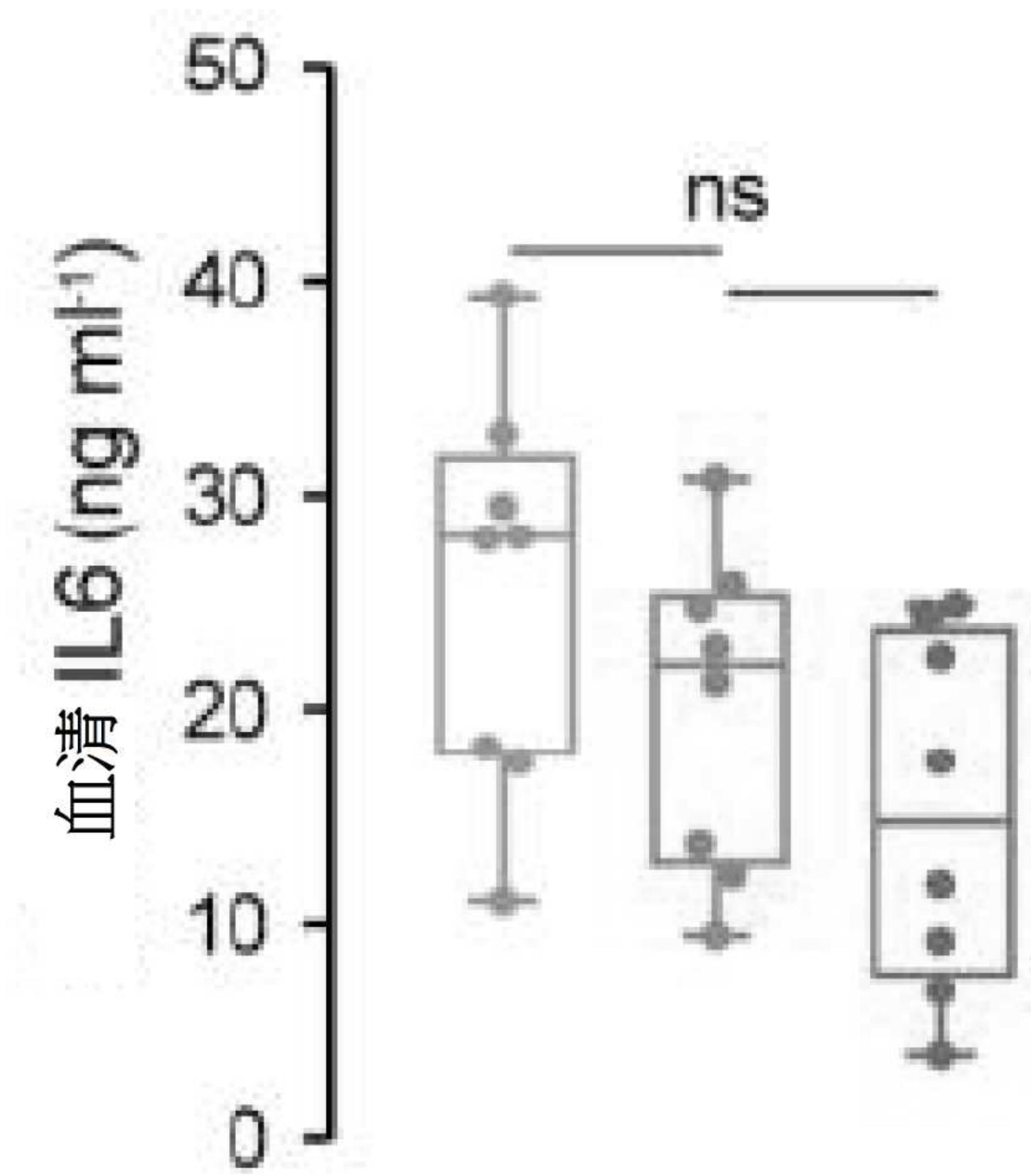
【圖35A】



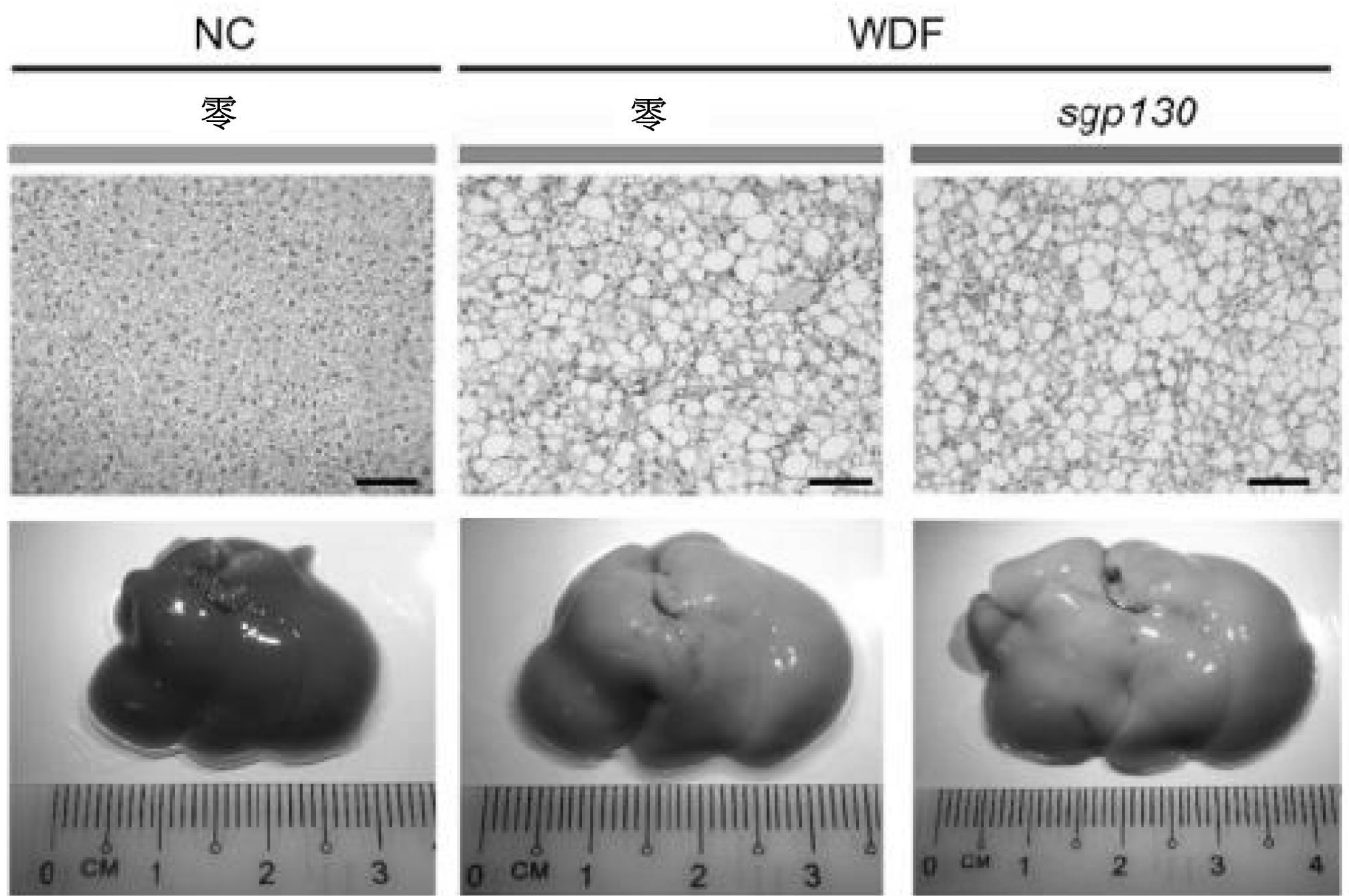
【圖35B】



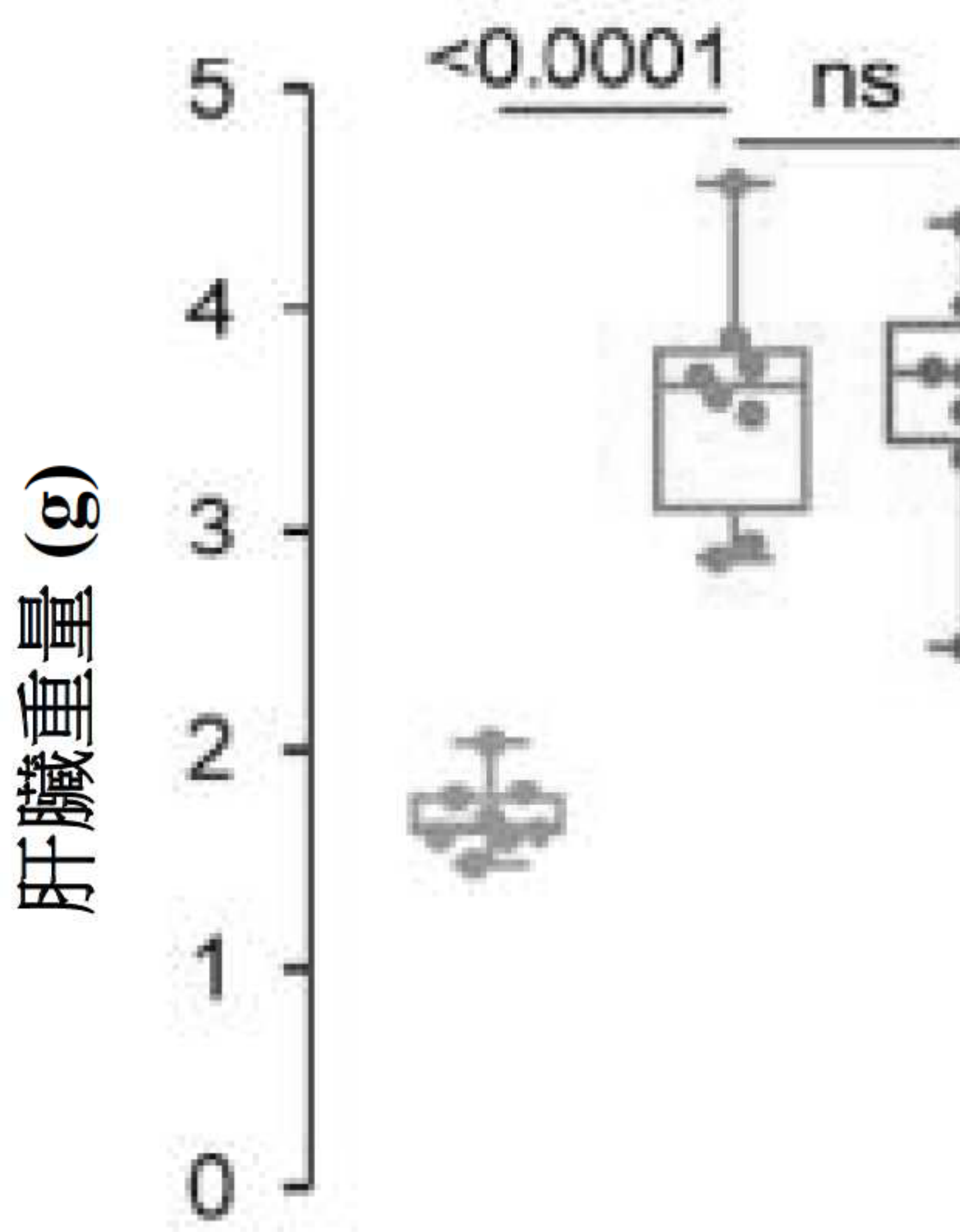
【圖35C】



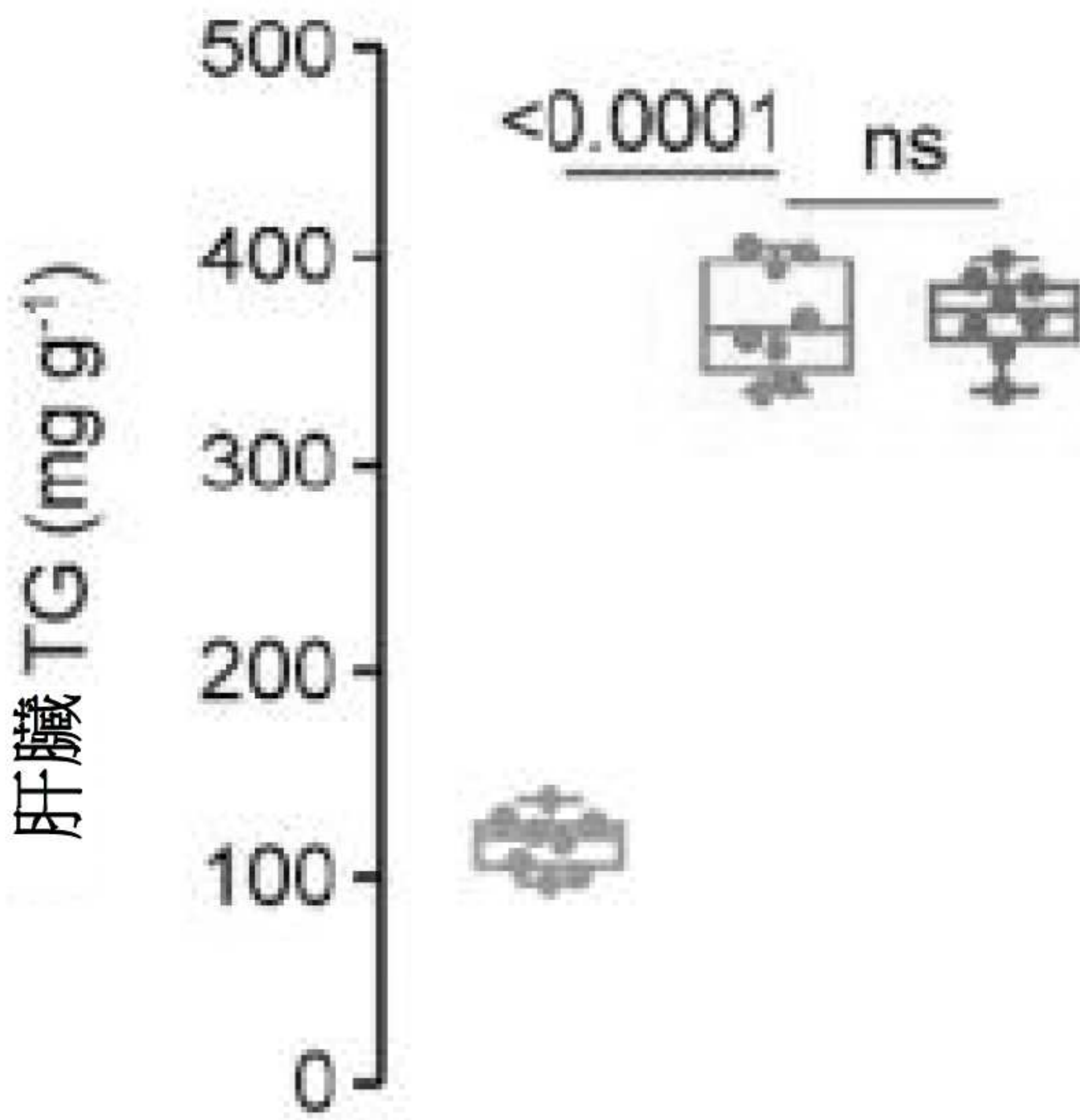
【圖35D】



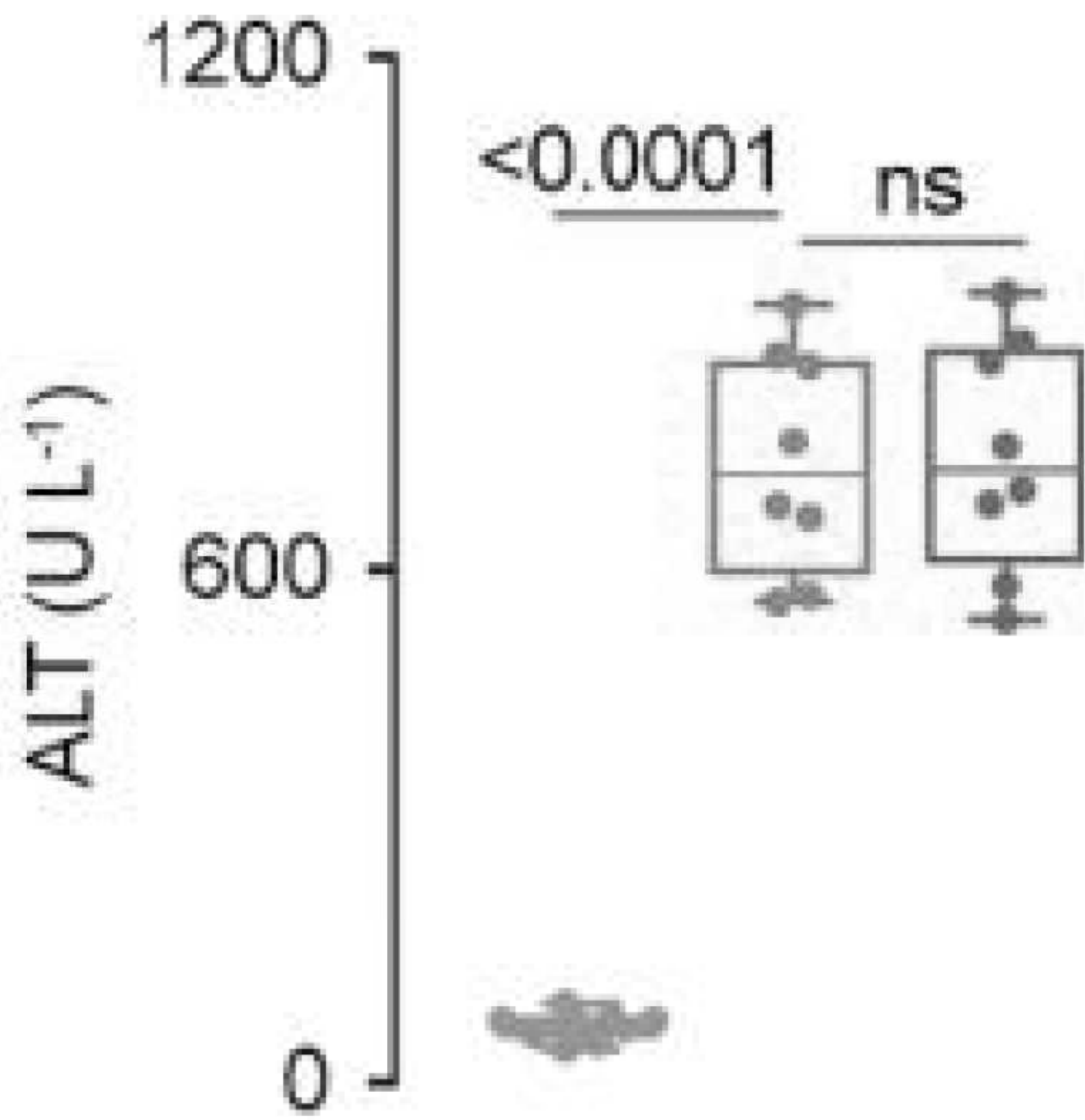
【圖35E】



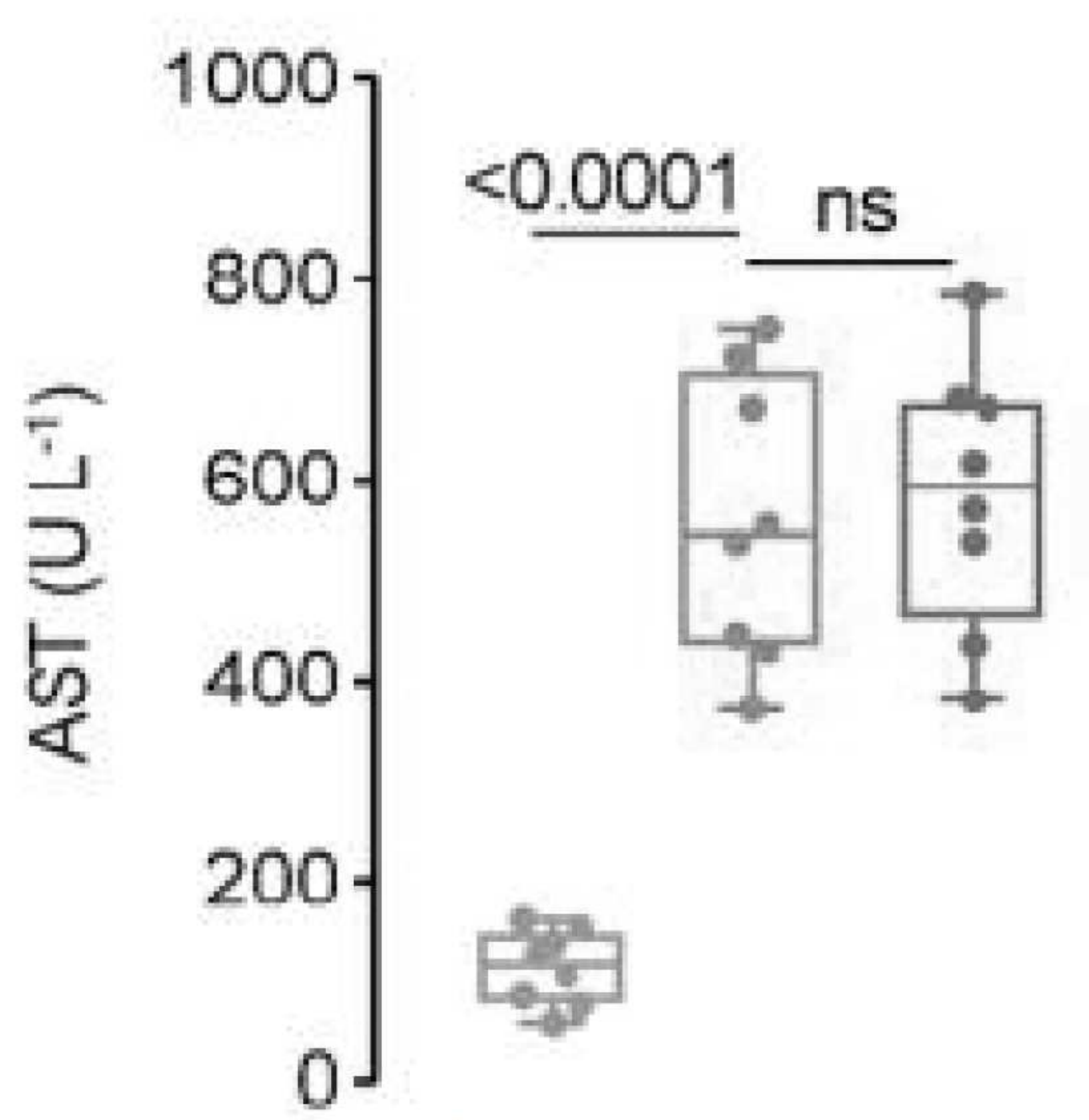
【圖35F】



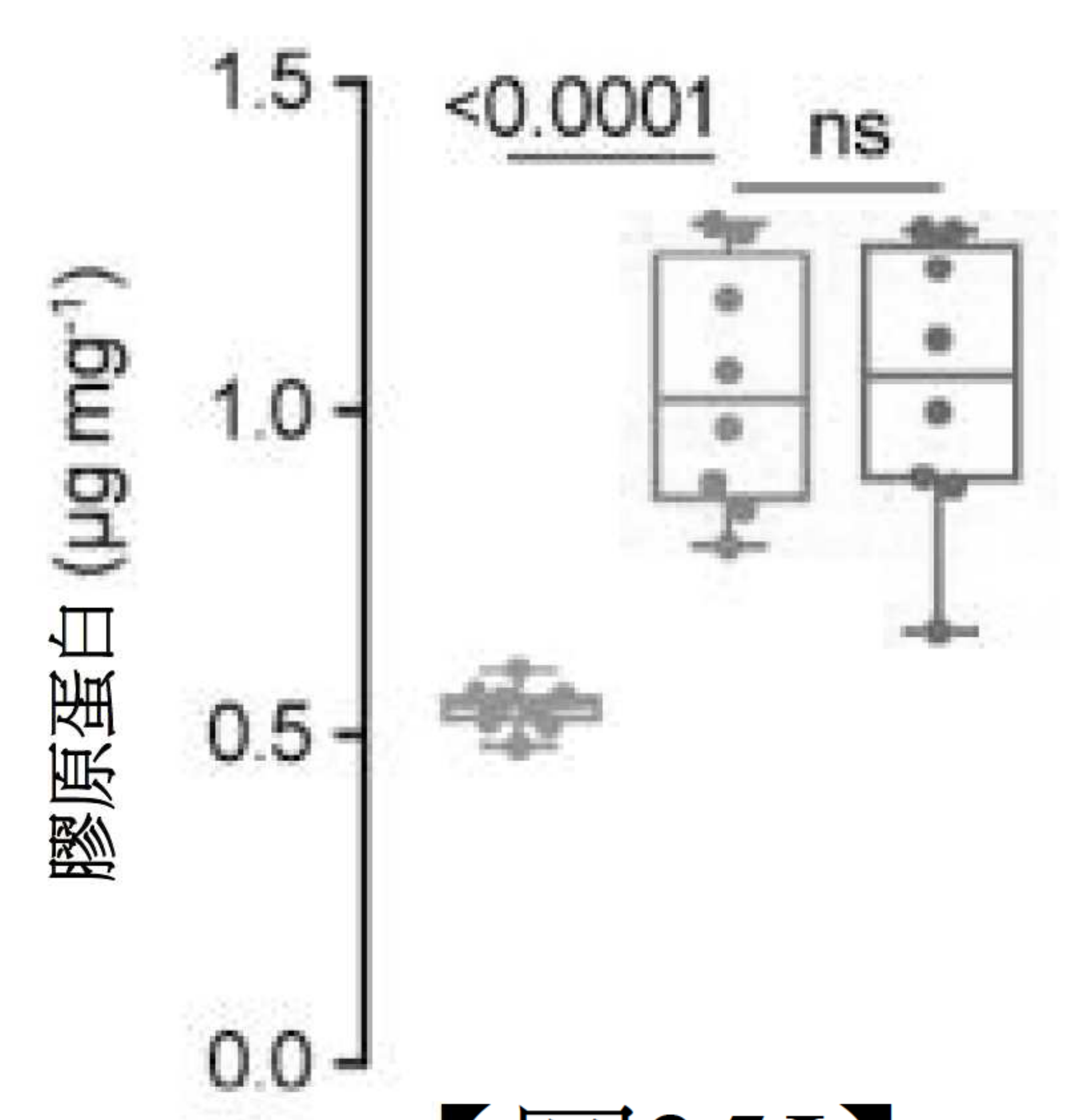
【圖35G】



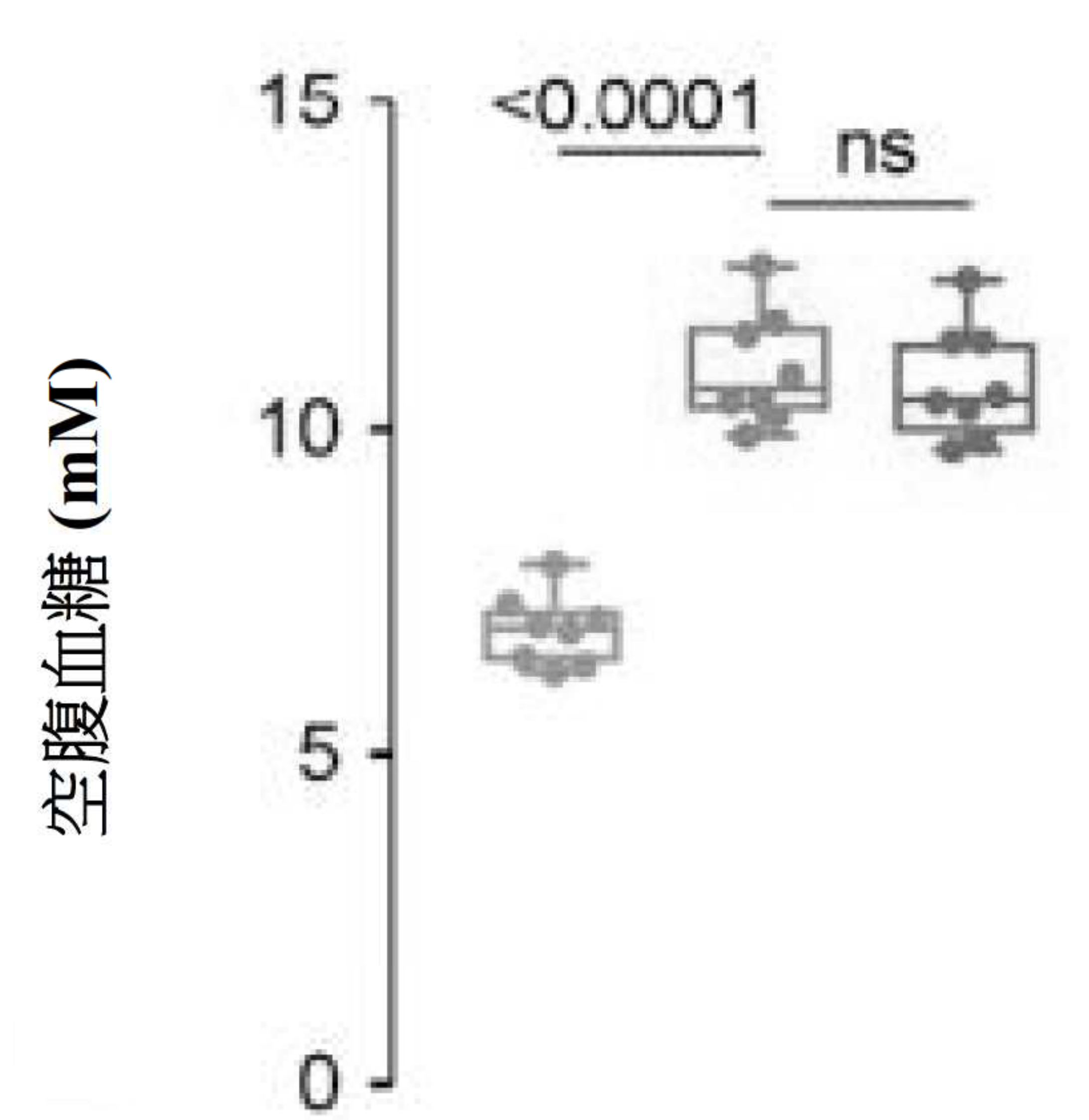
【圖35H】



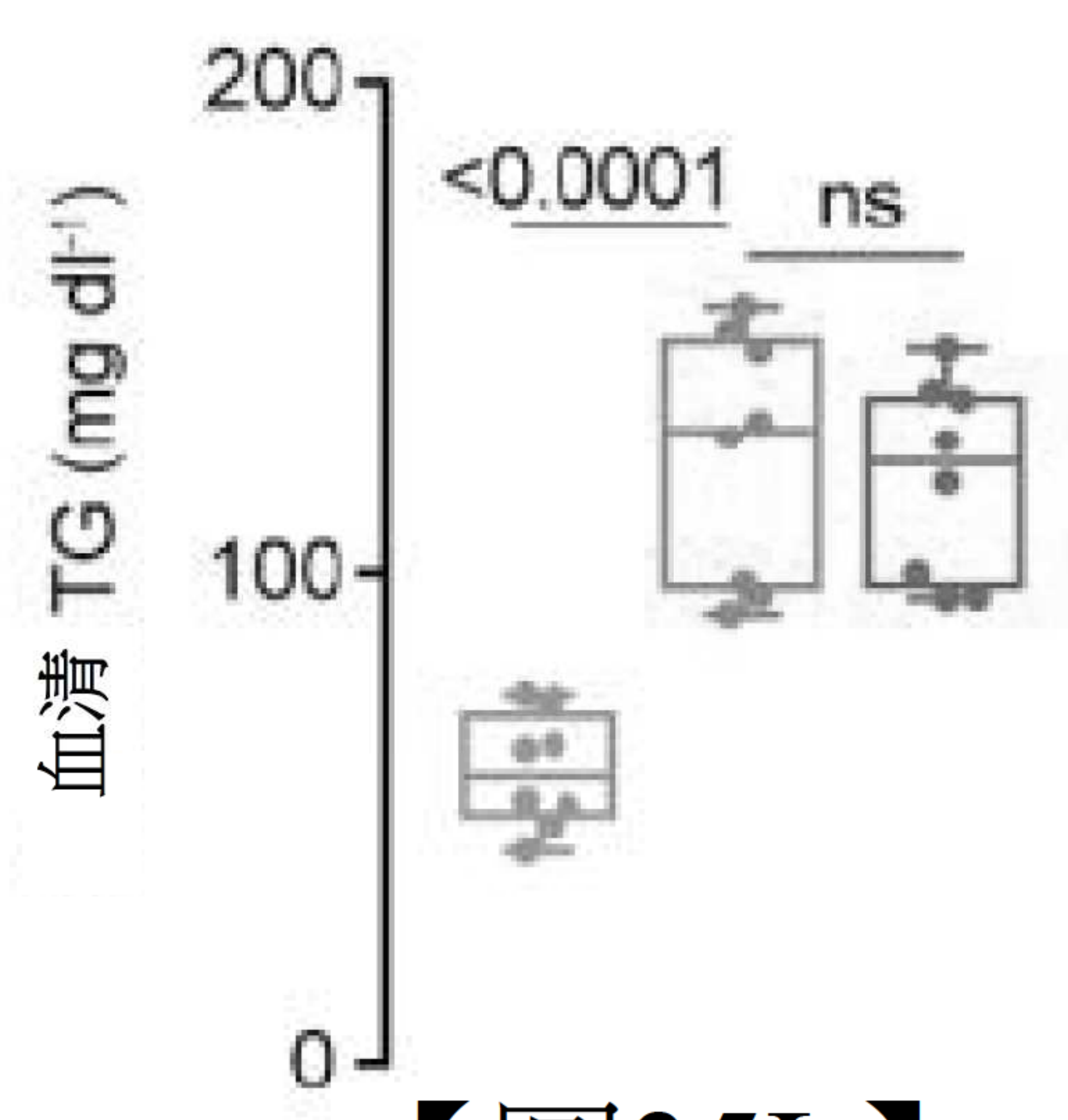
【圖35I】



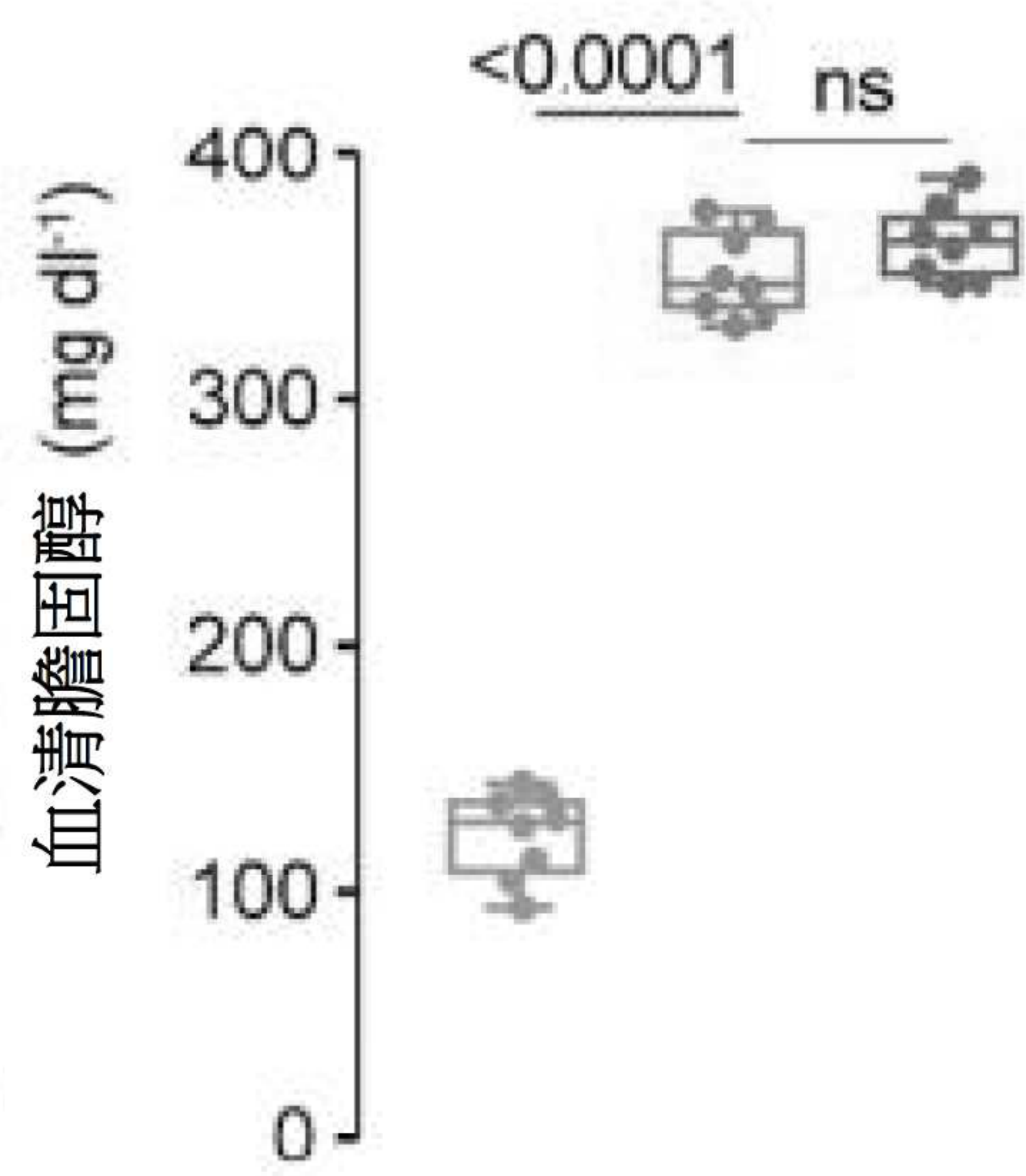
【圖35J】



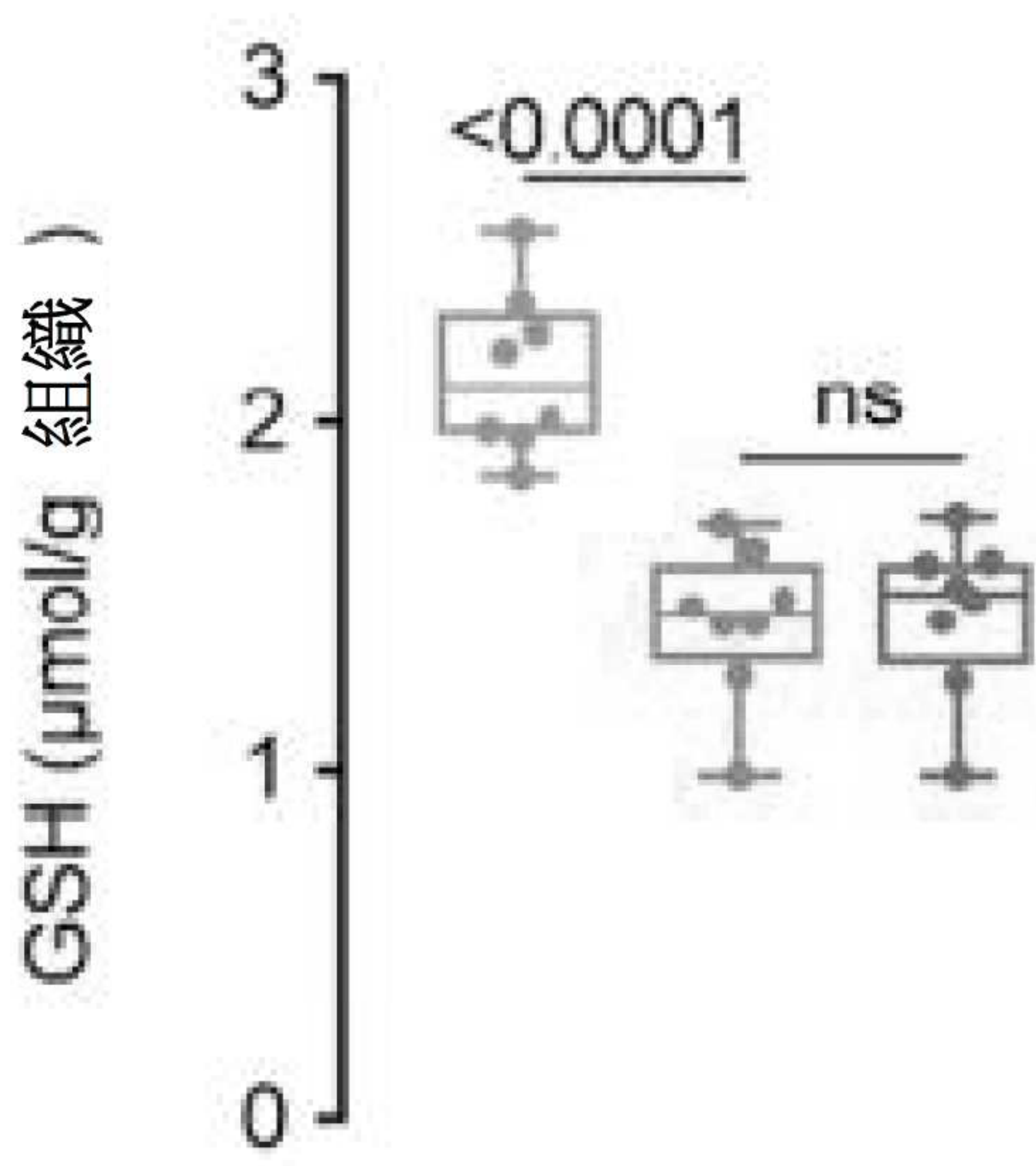
【圖35K】



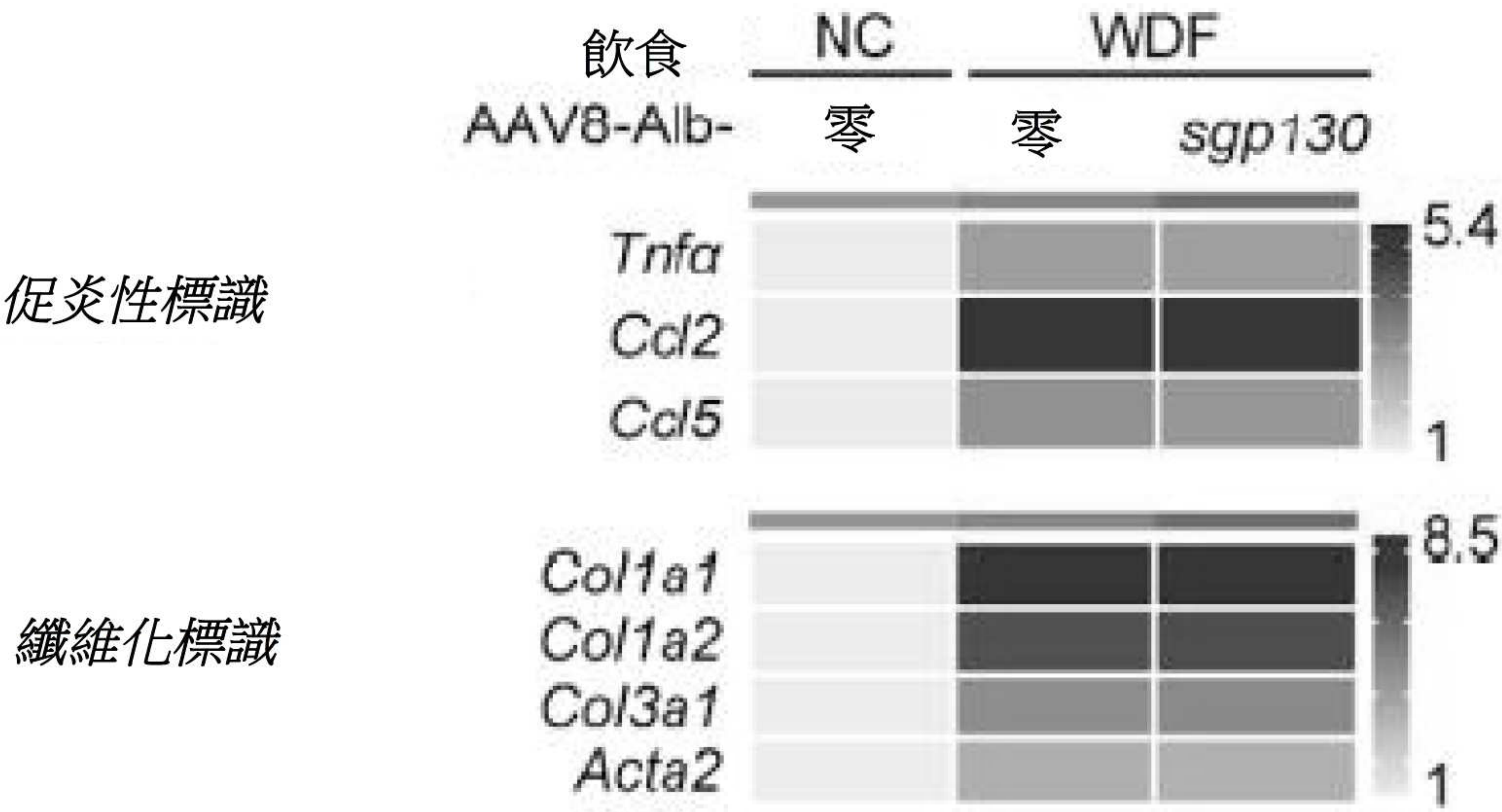
【圖35L】



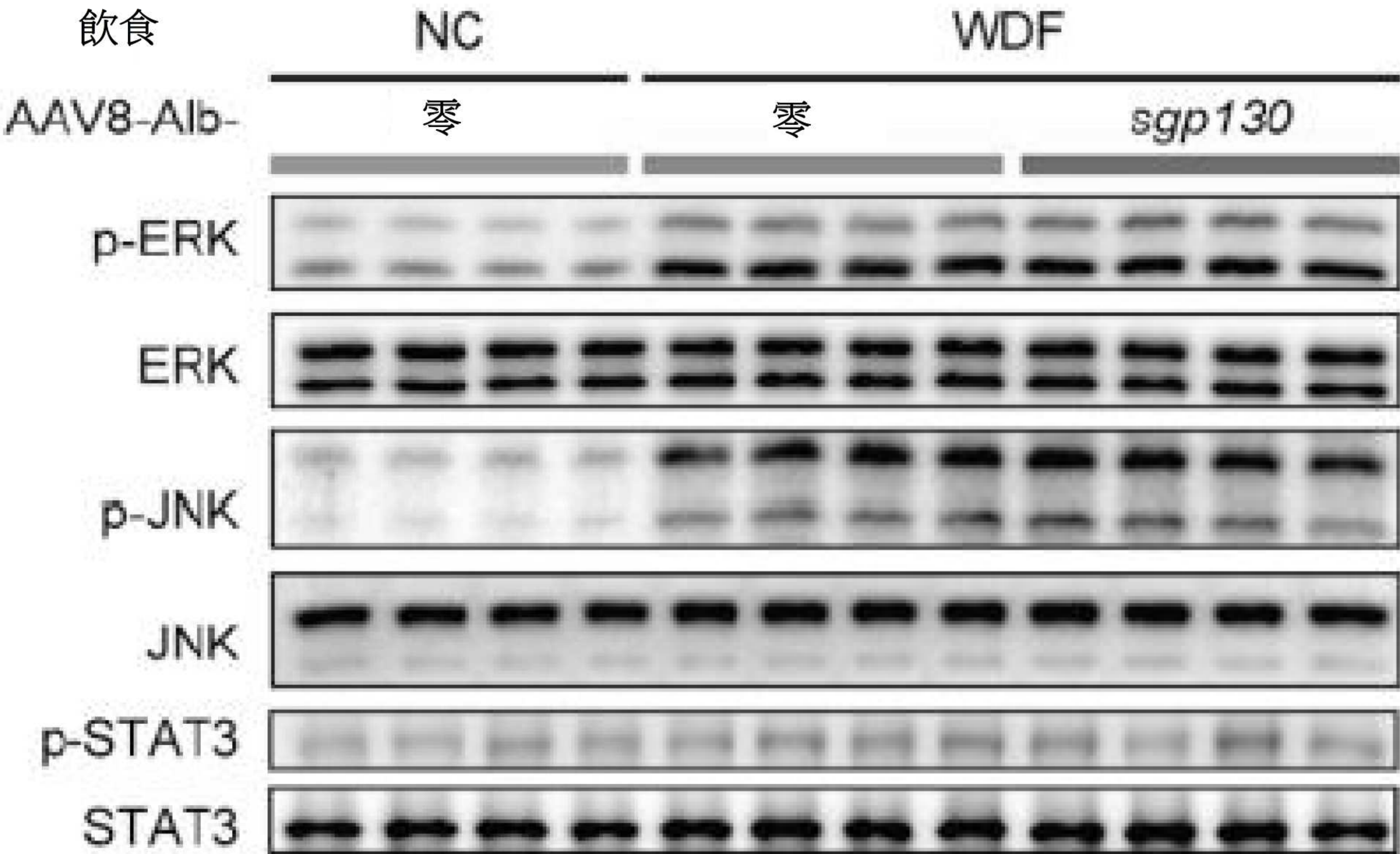
【圖35M】



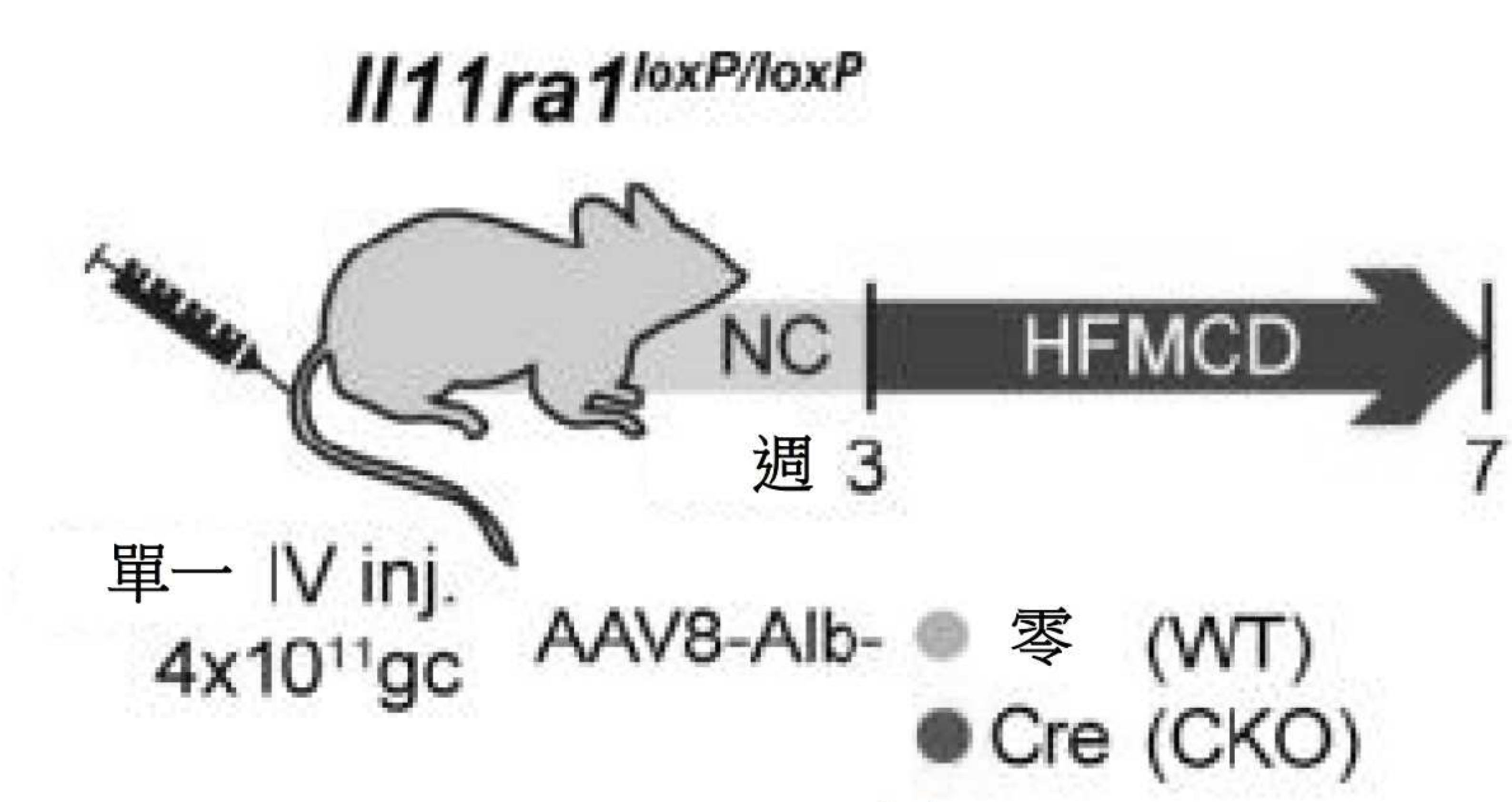
【圖35N】



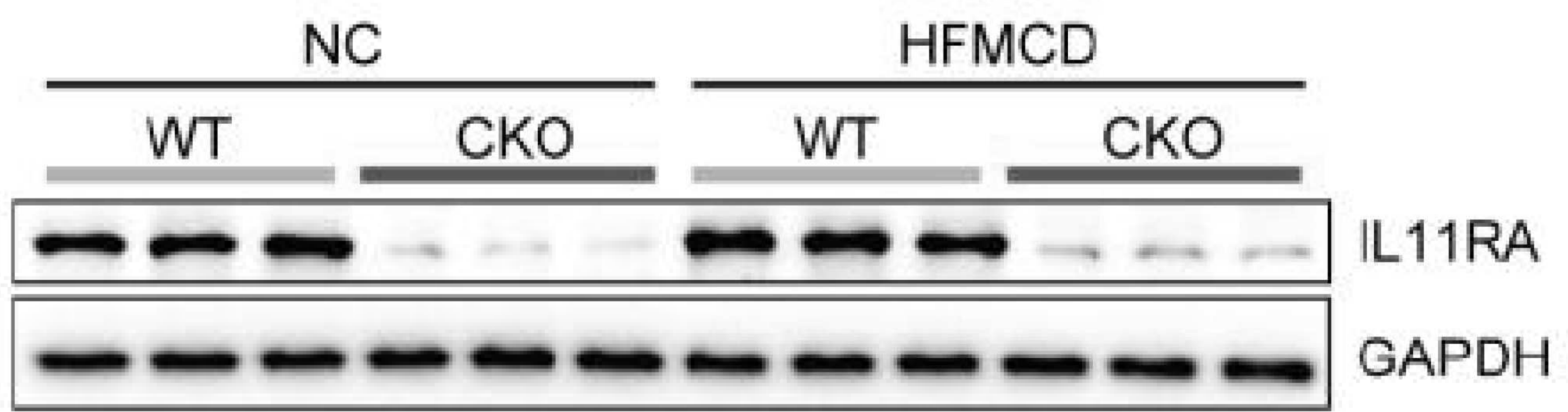
【圖35O】



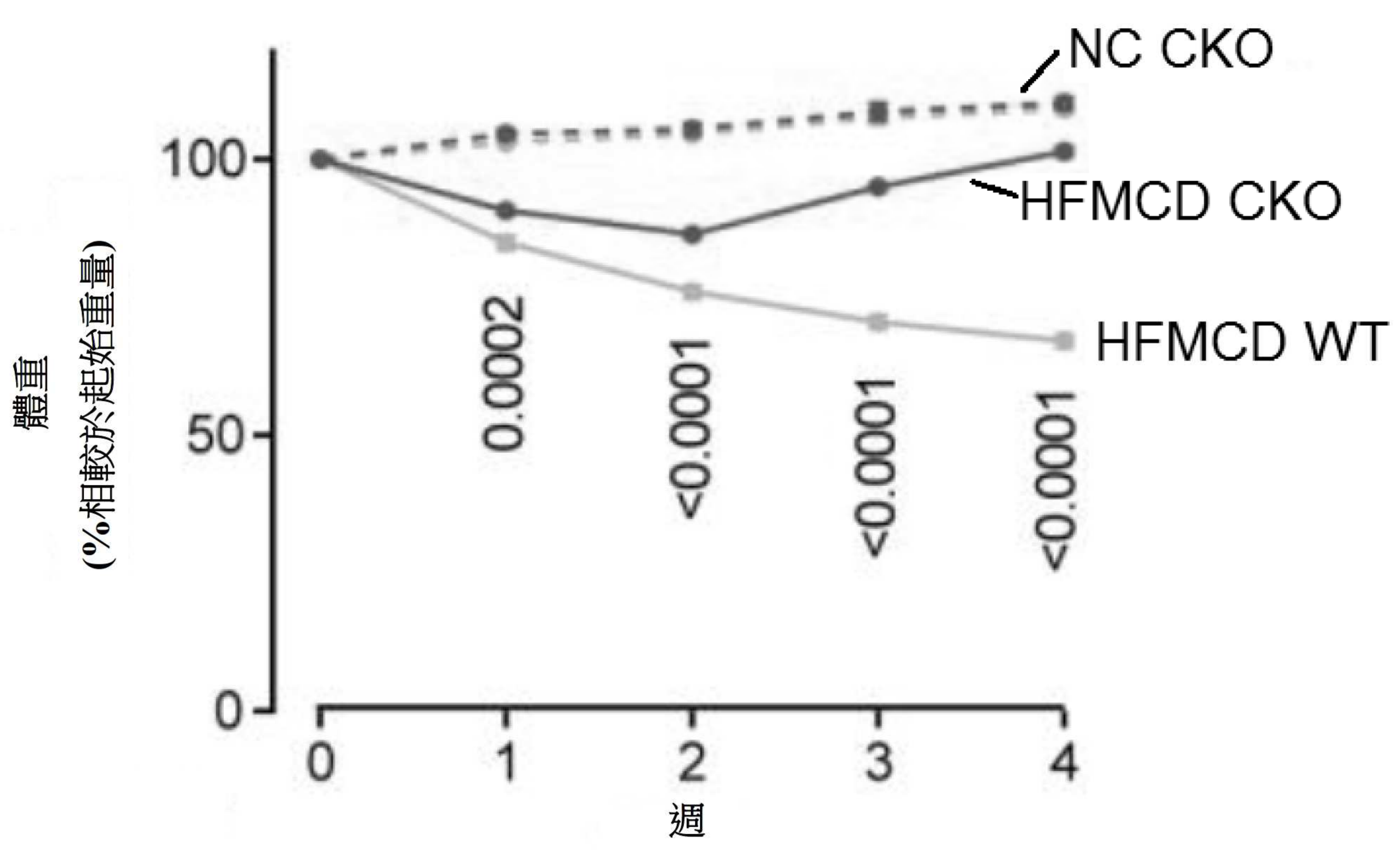
【圖35P】



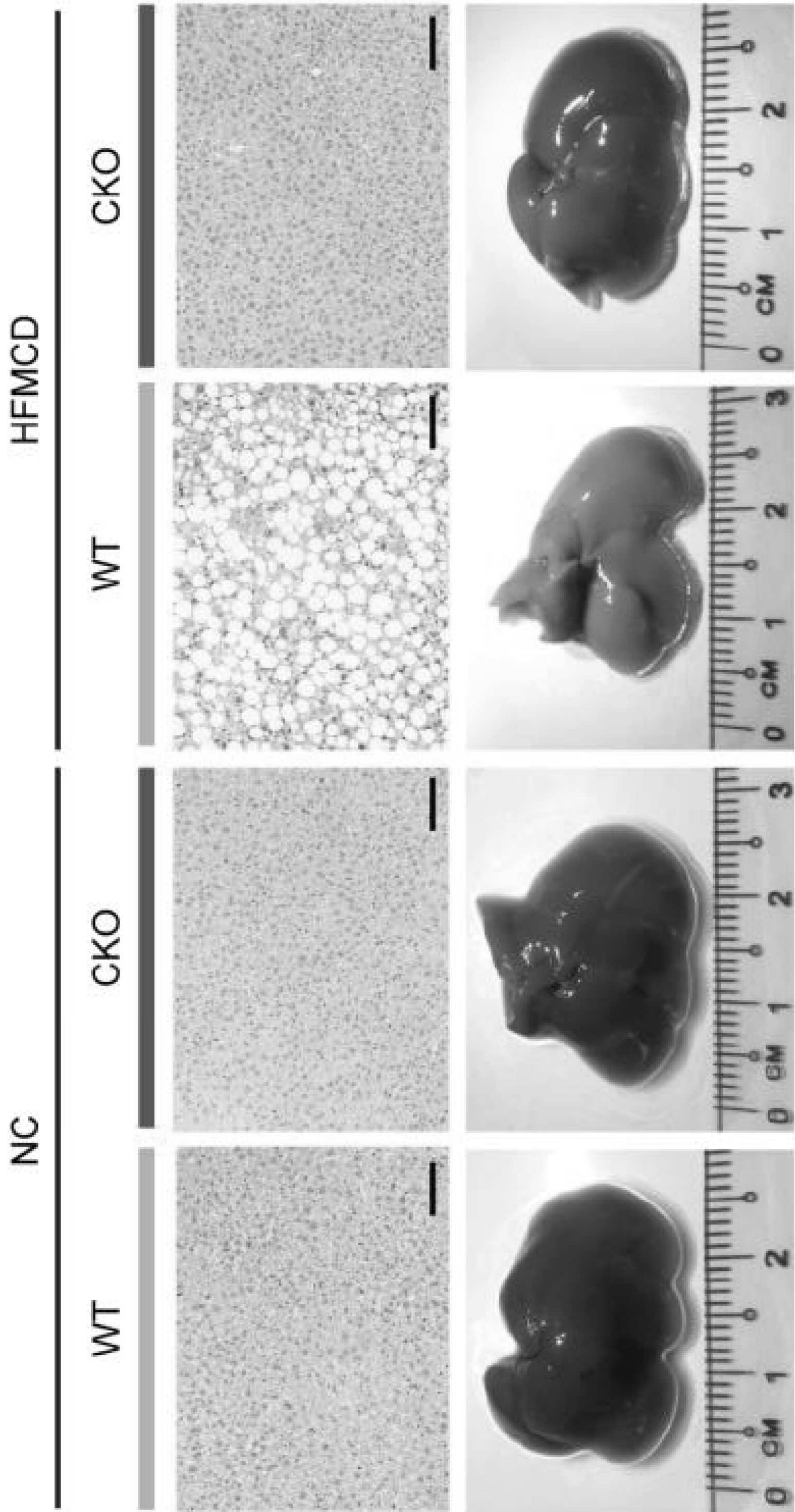
【圖36A】



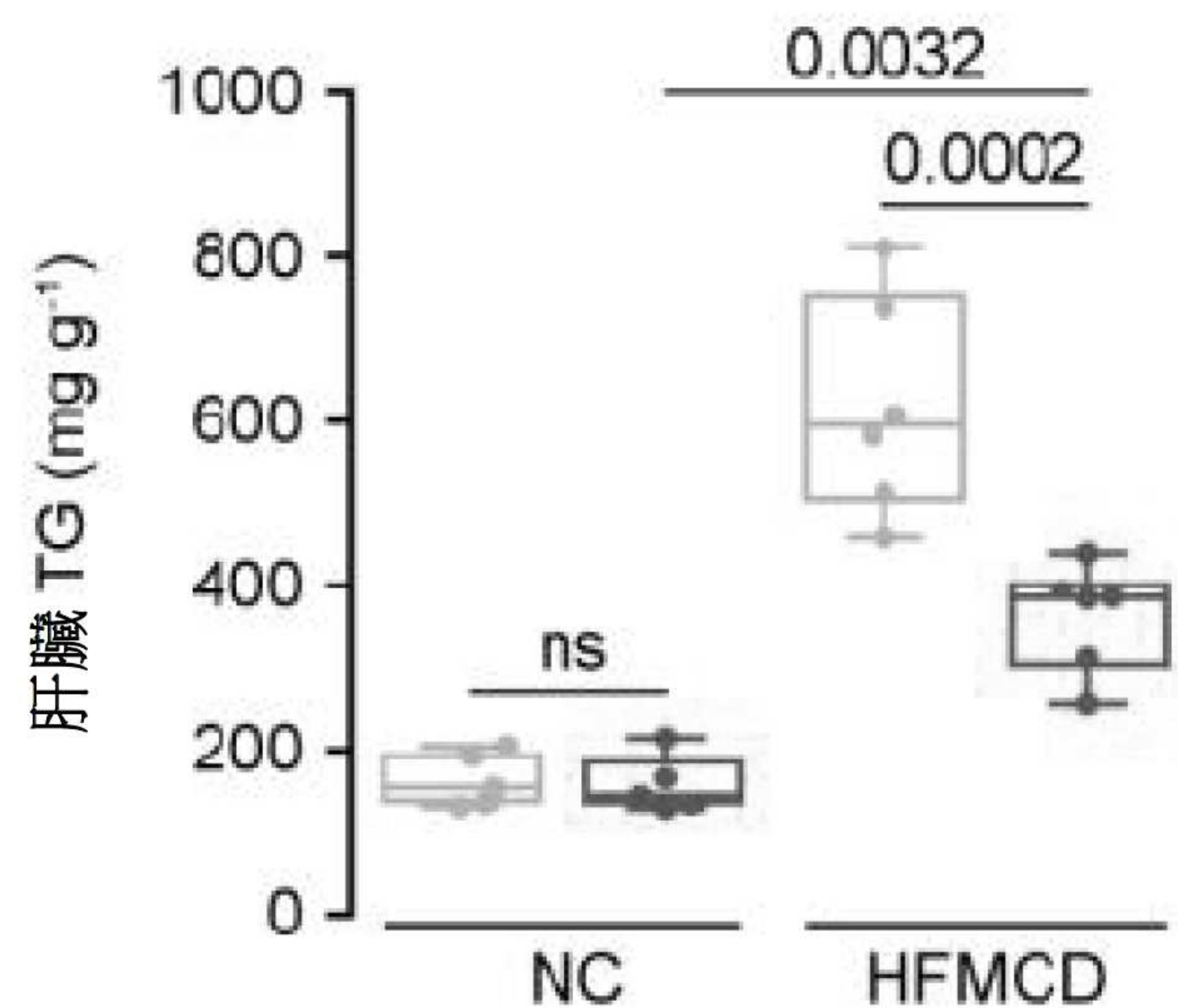
【圖36B】



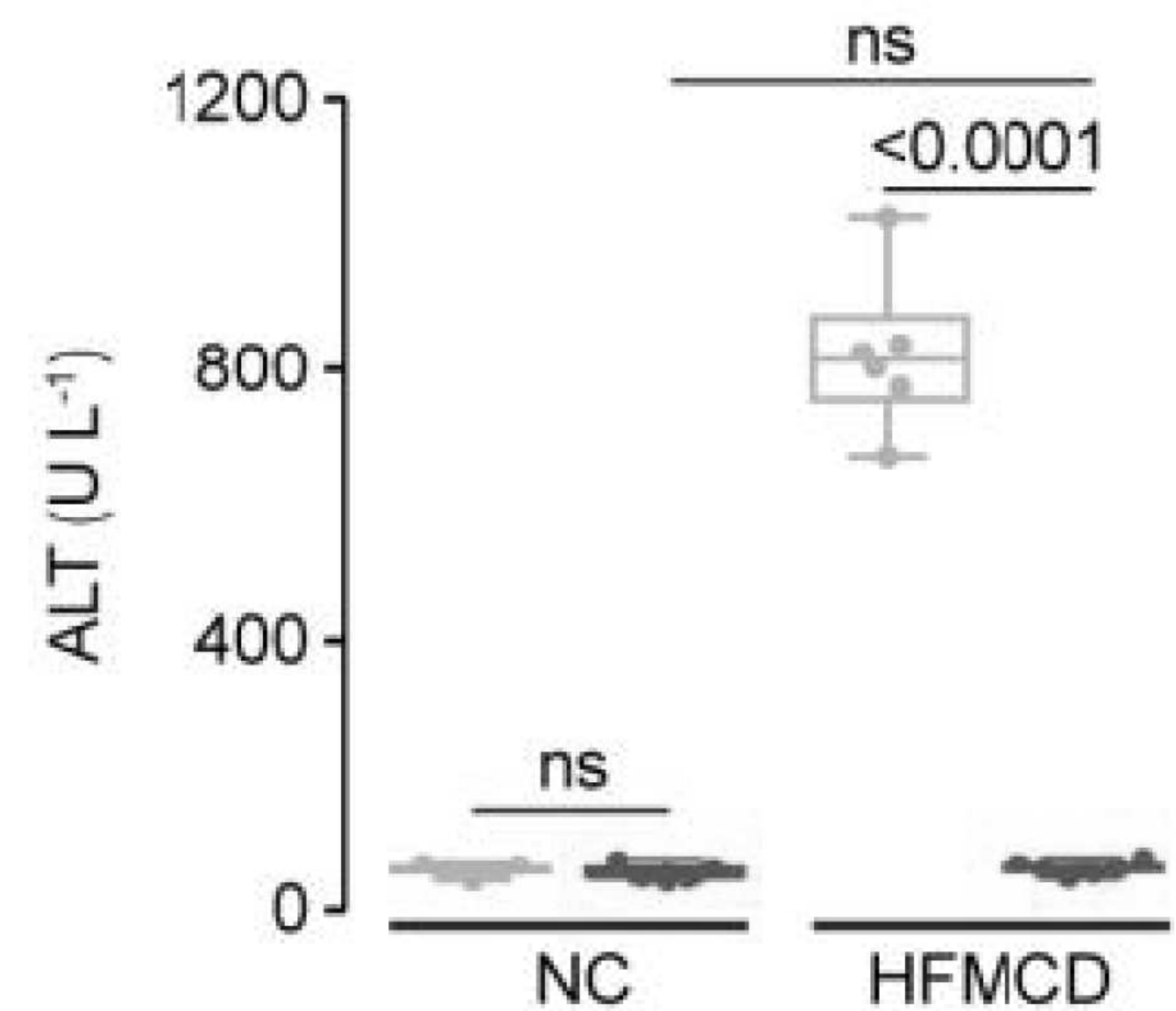
【圖36C】



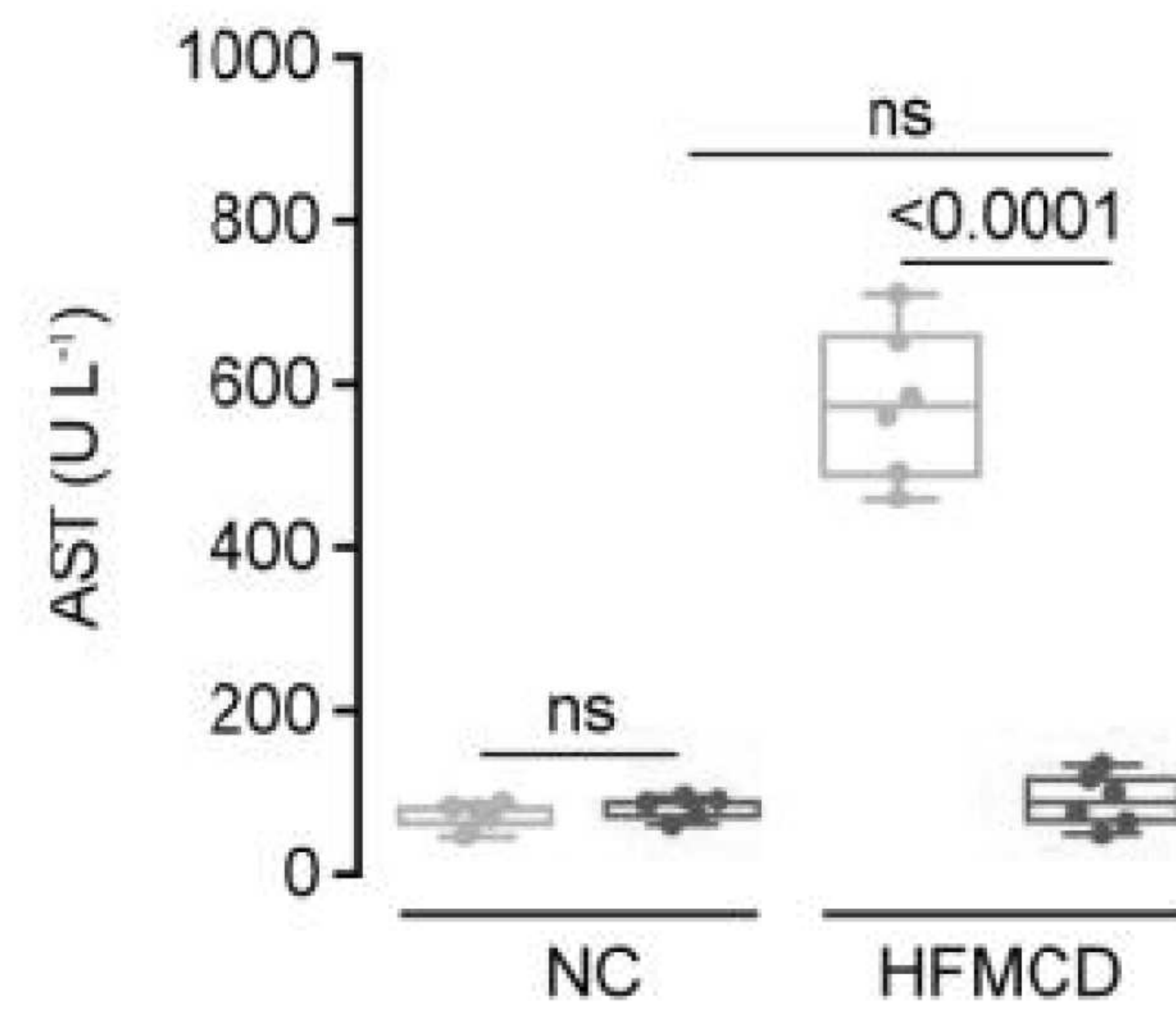
【圖36D】



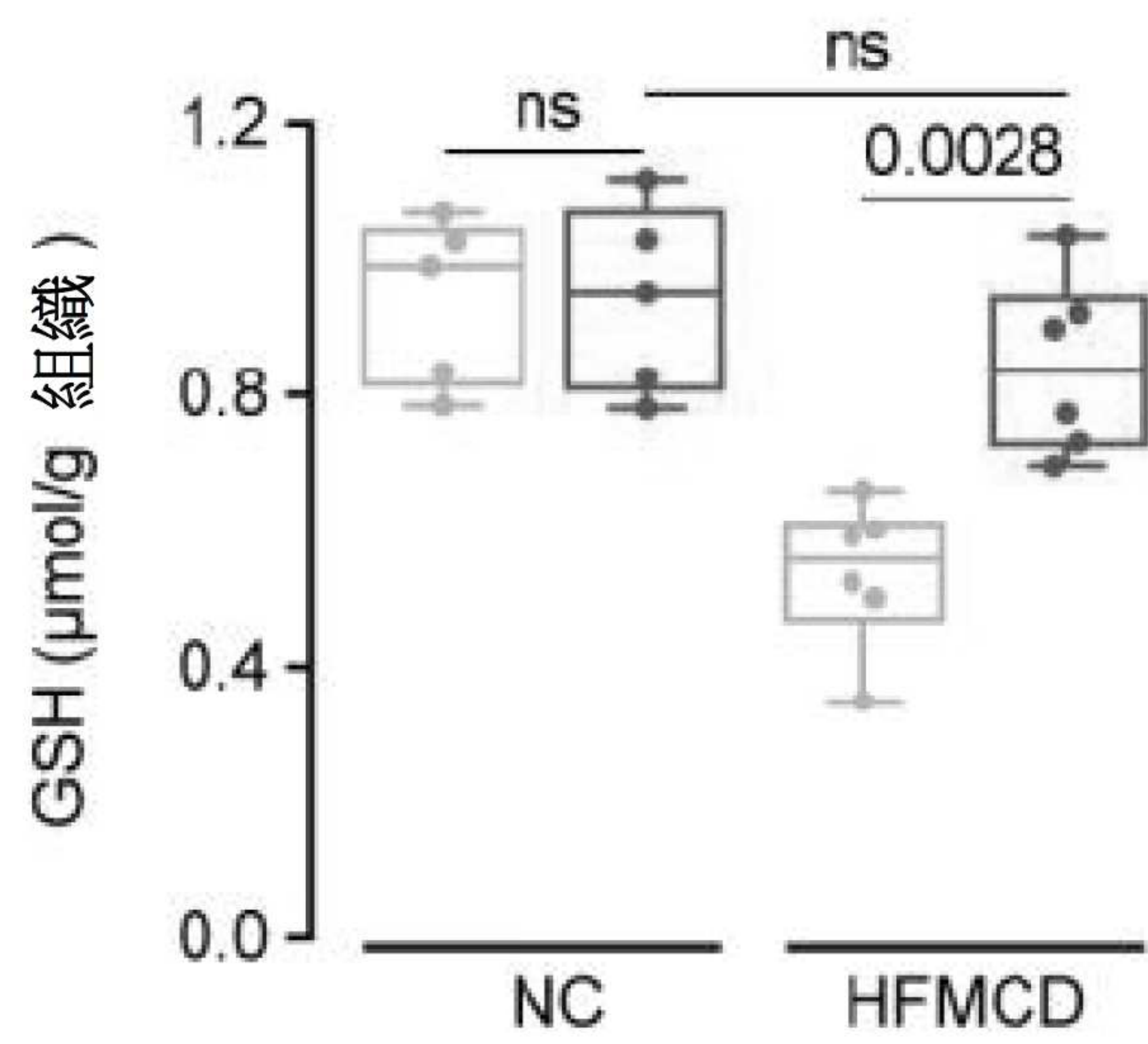
【圖36E】



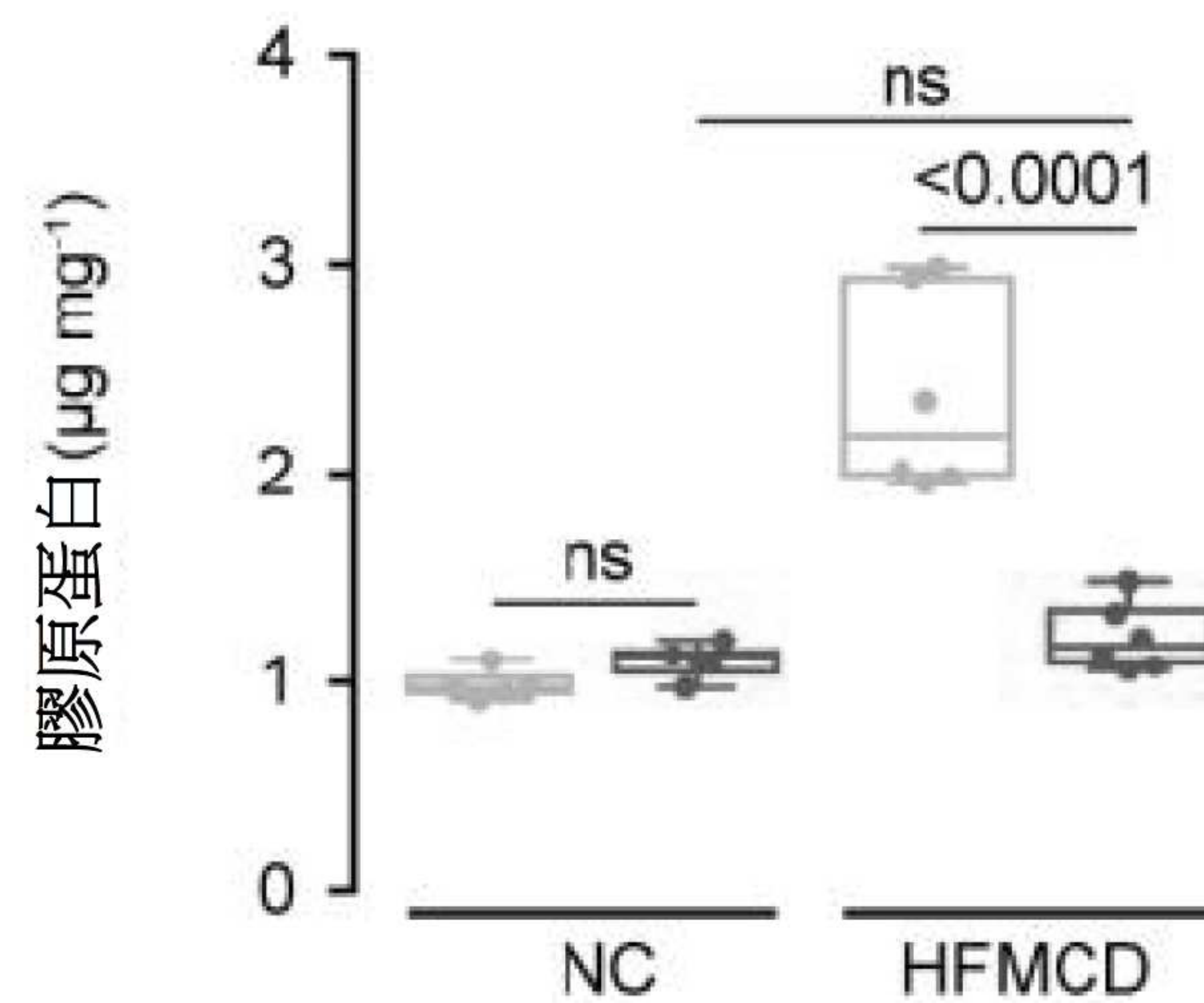
【圖36F】



【圖36G】

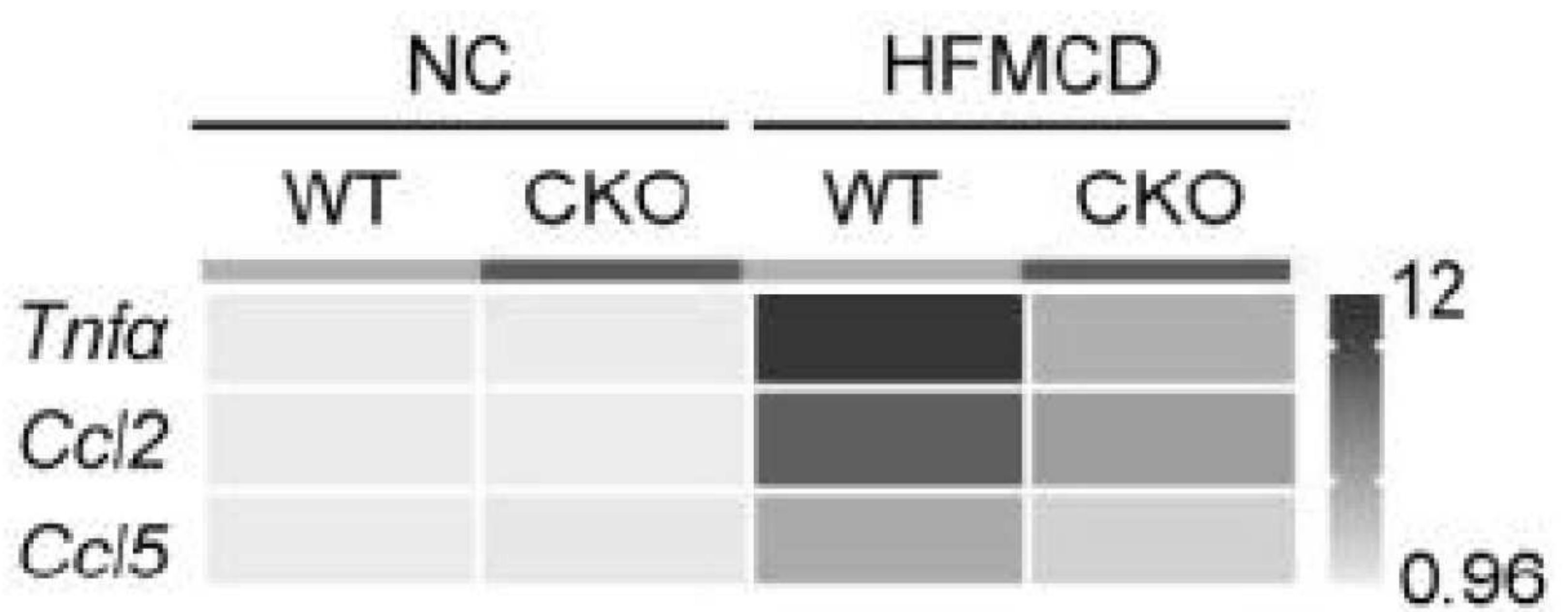


【圖36H】

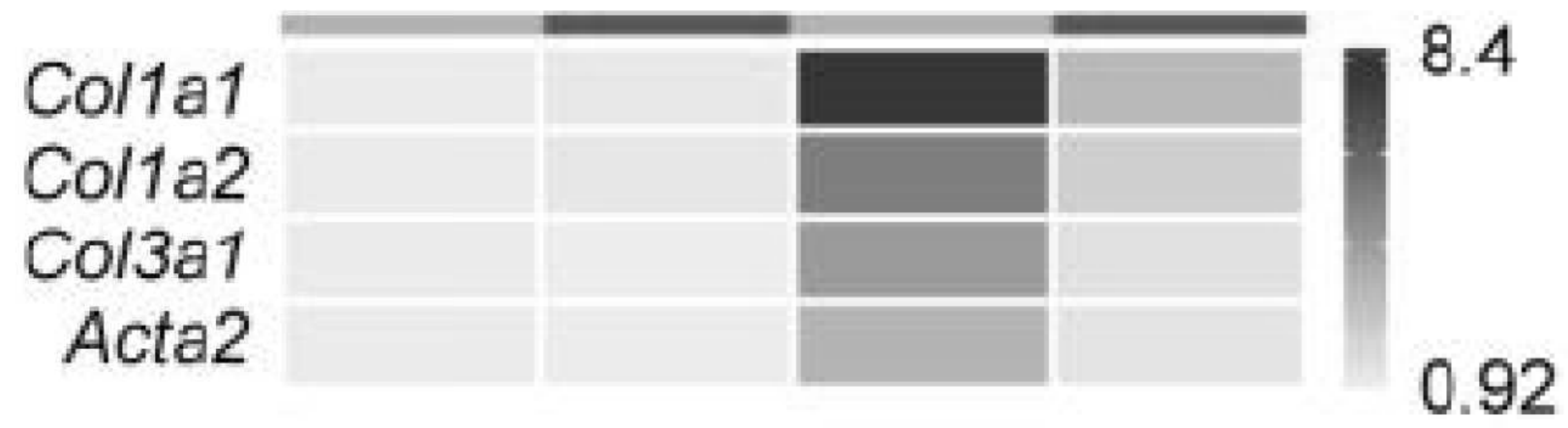


【圖36I】

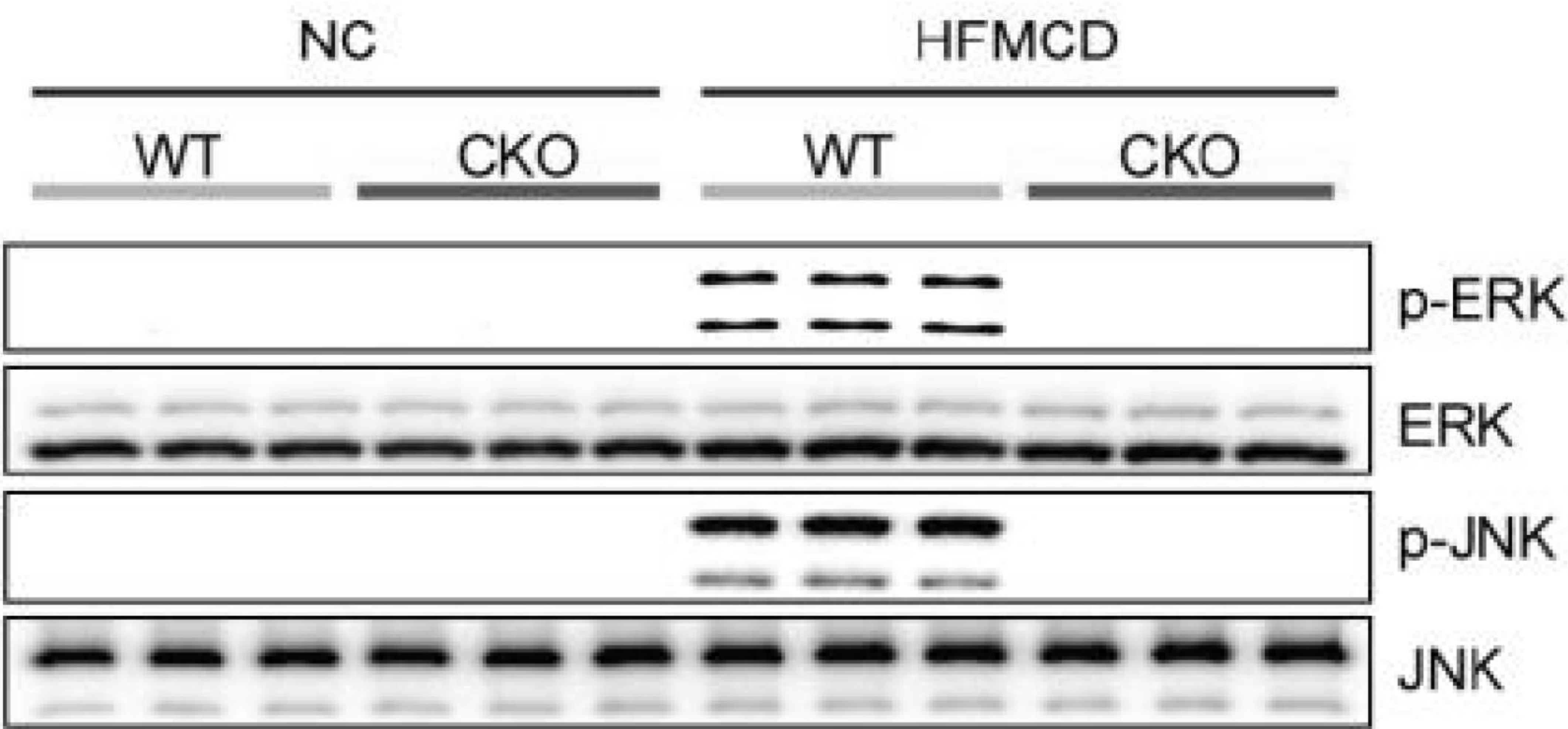
促炎性標識



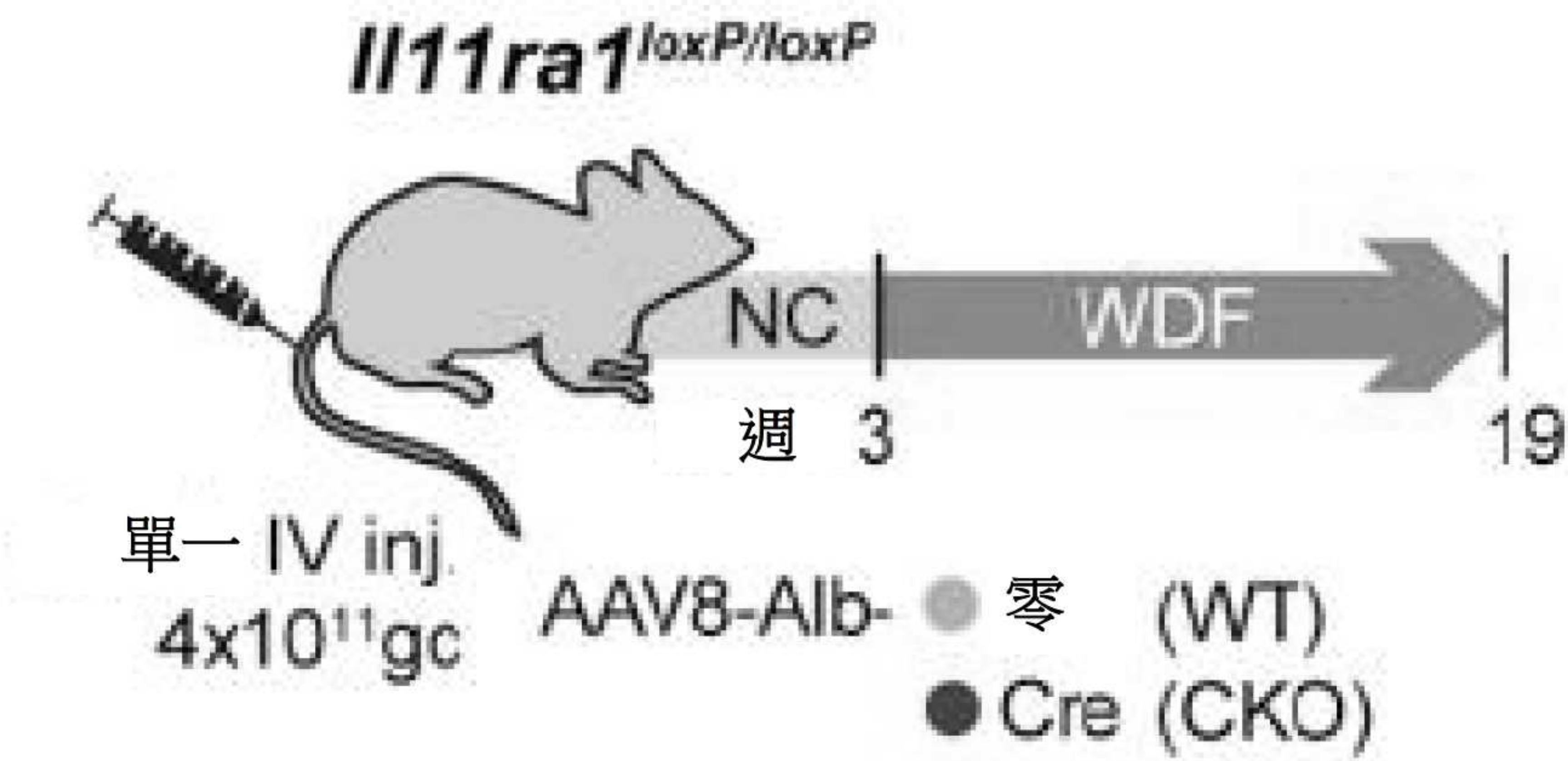
纖維化標識



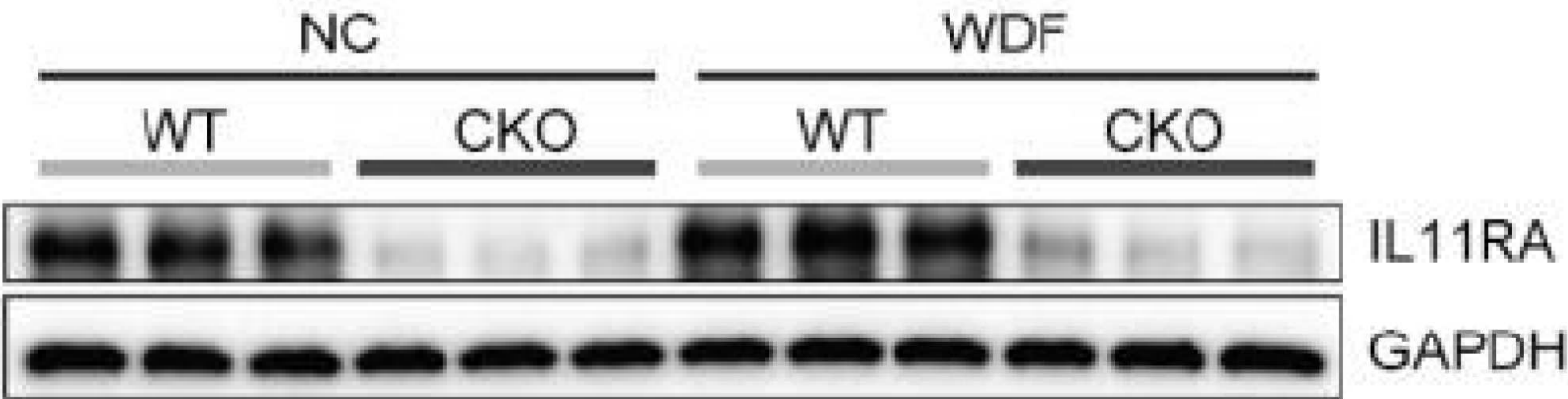
【圖36J】



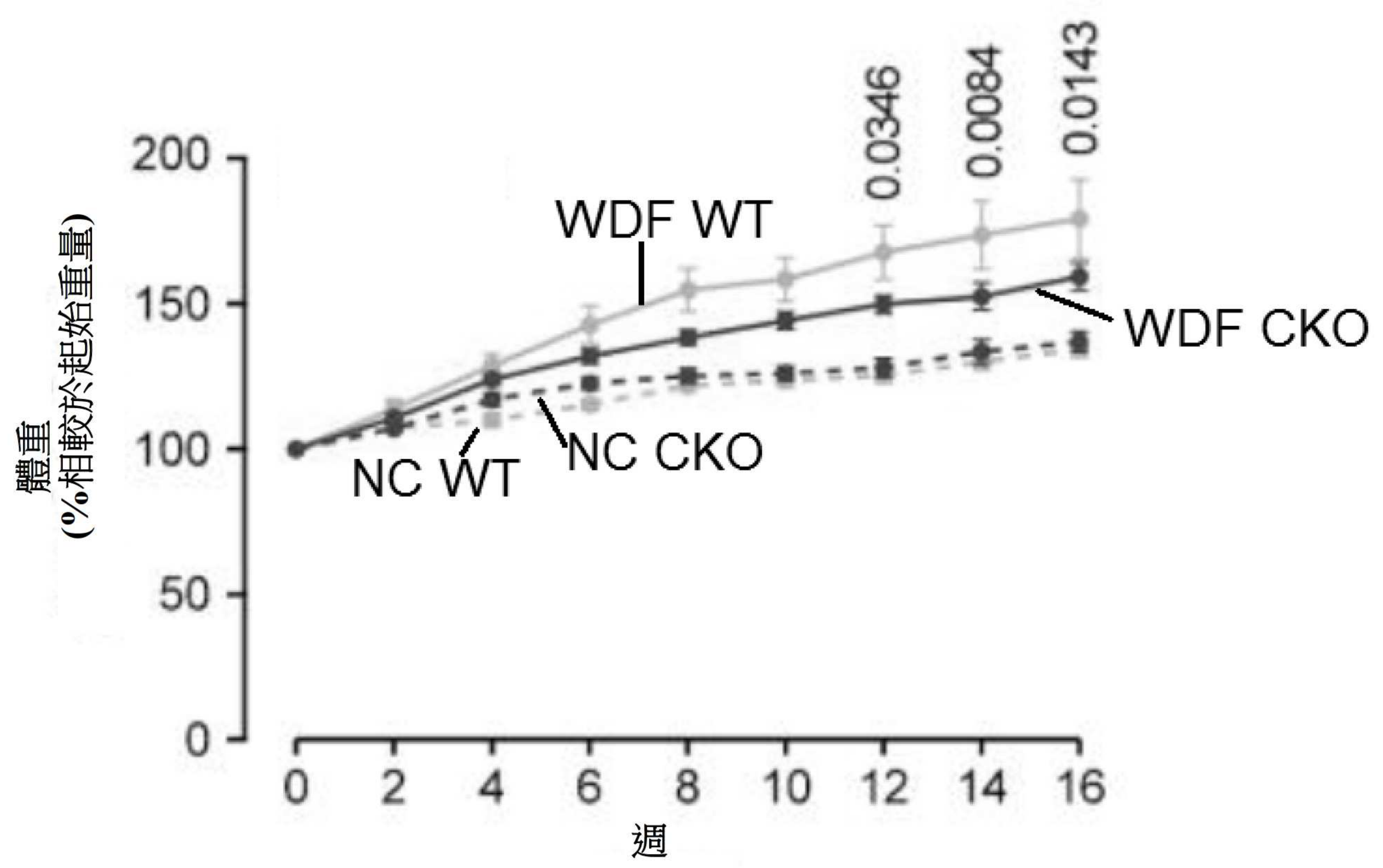
【圖36K】



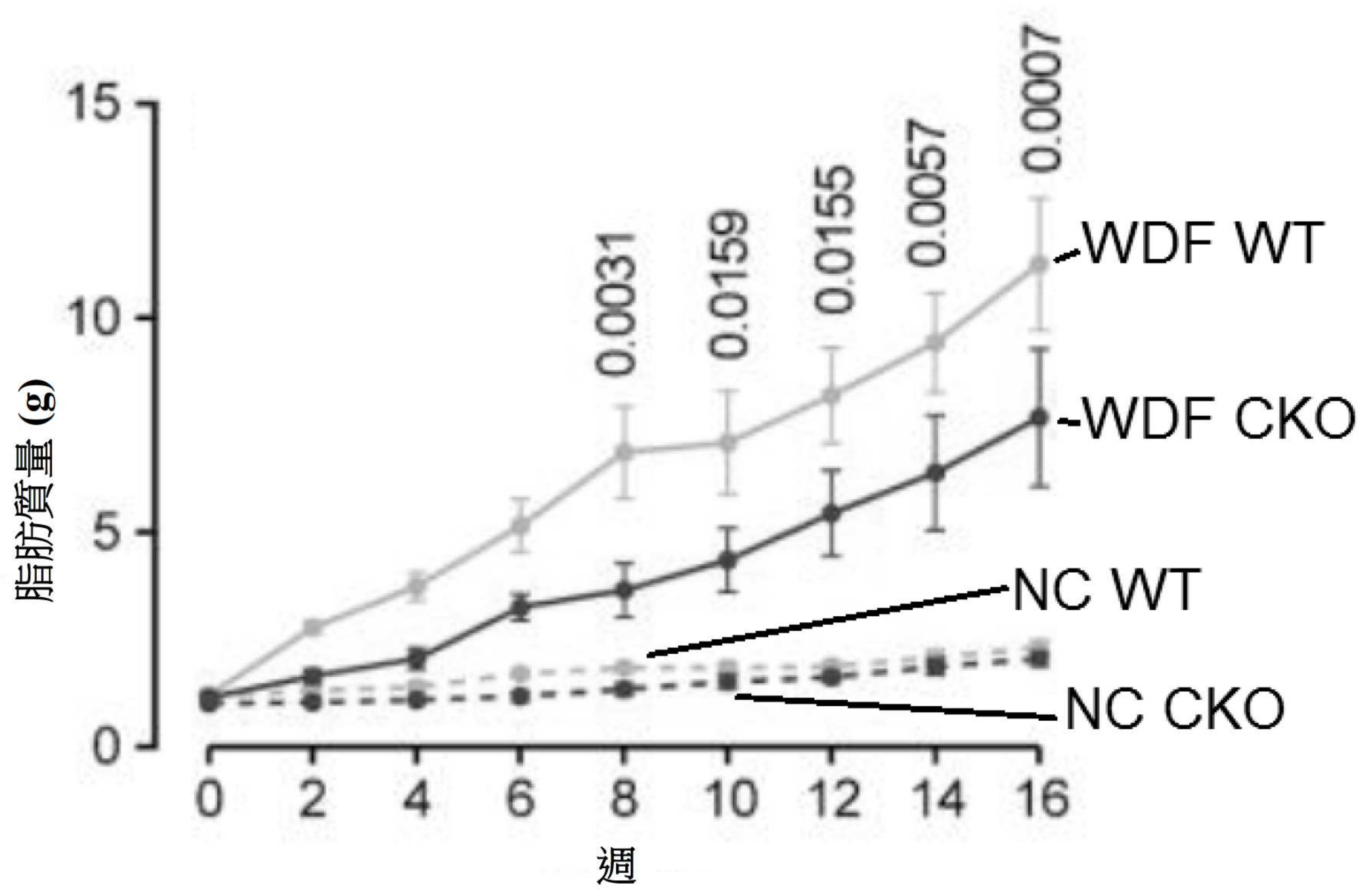
【圖37A】



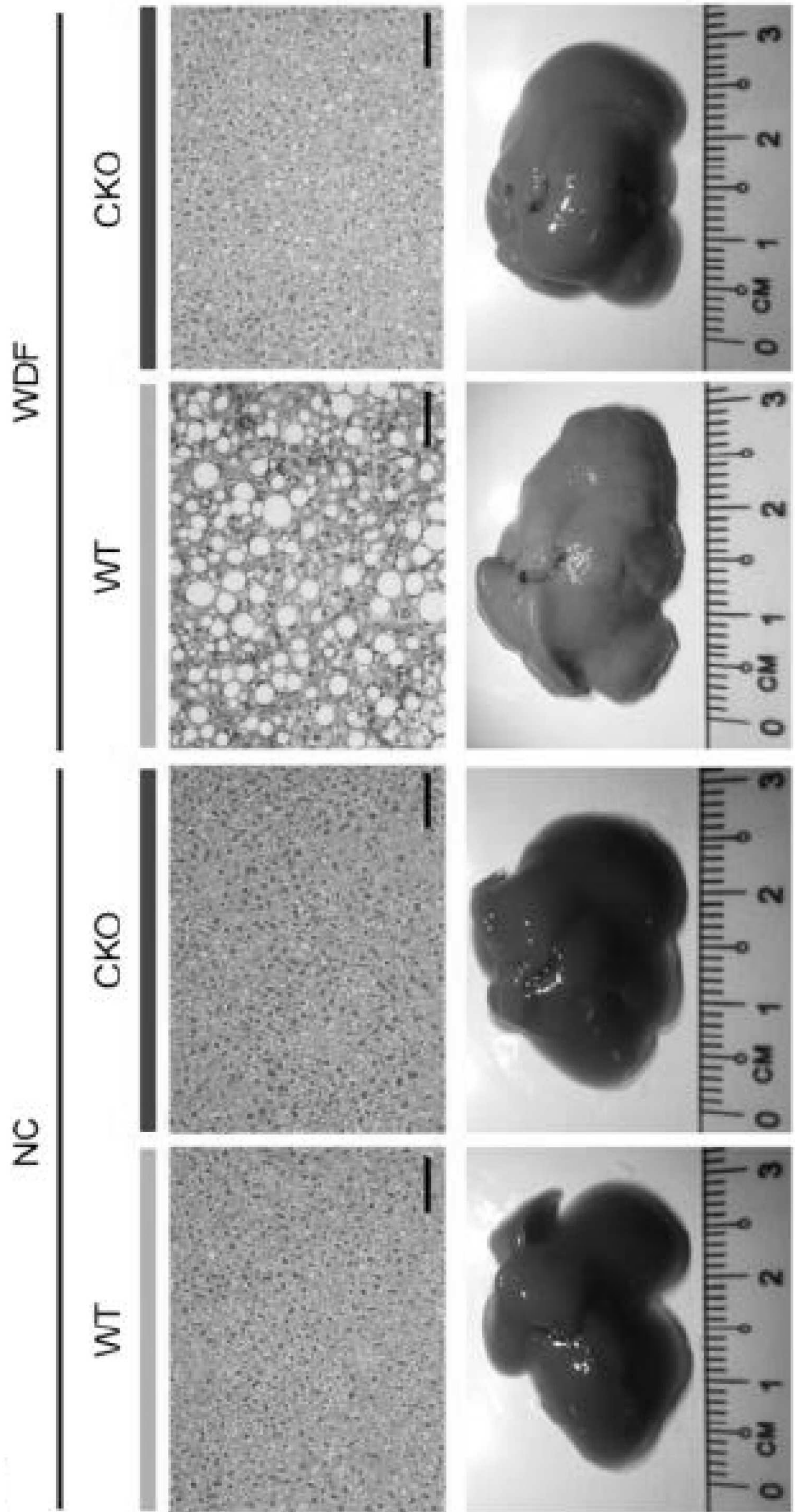
【圖37B】



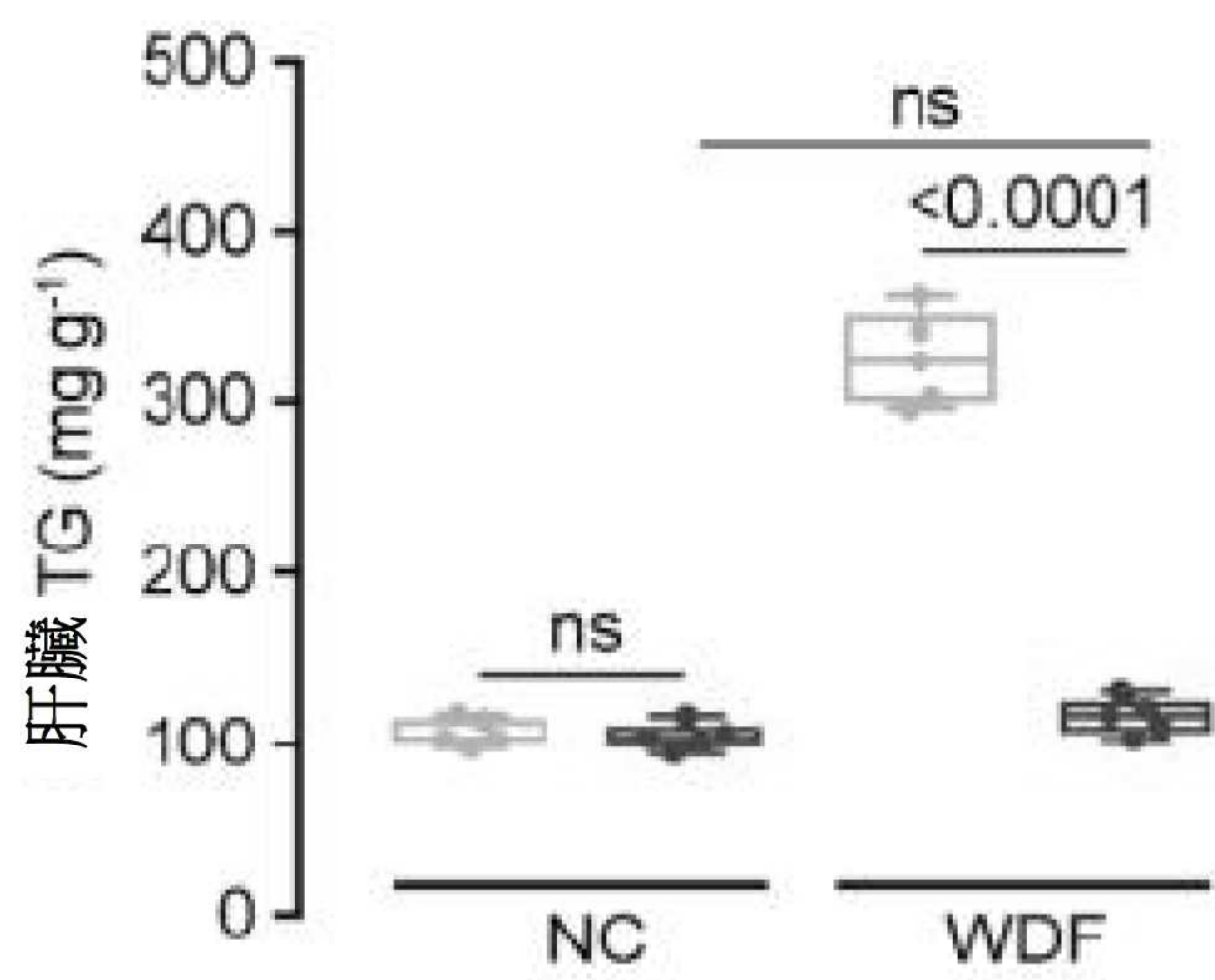
【圖37C】



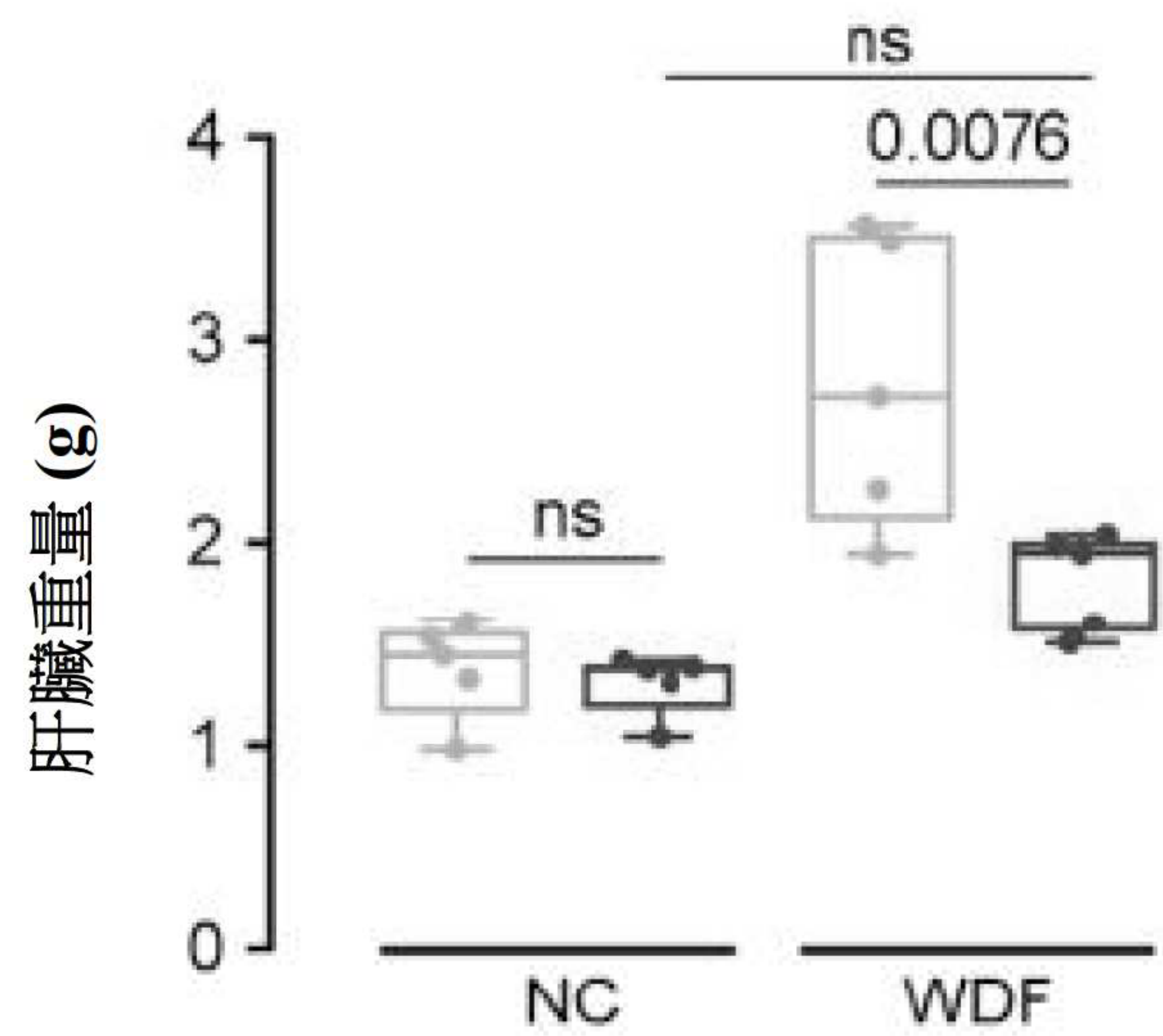
【圖37D】



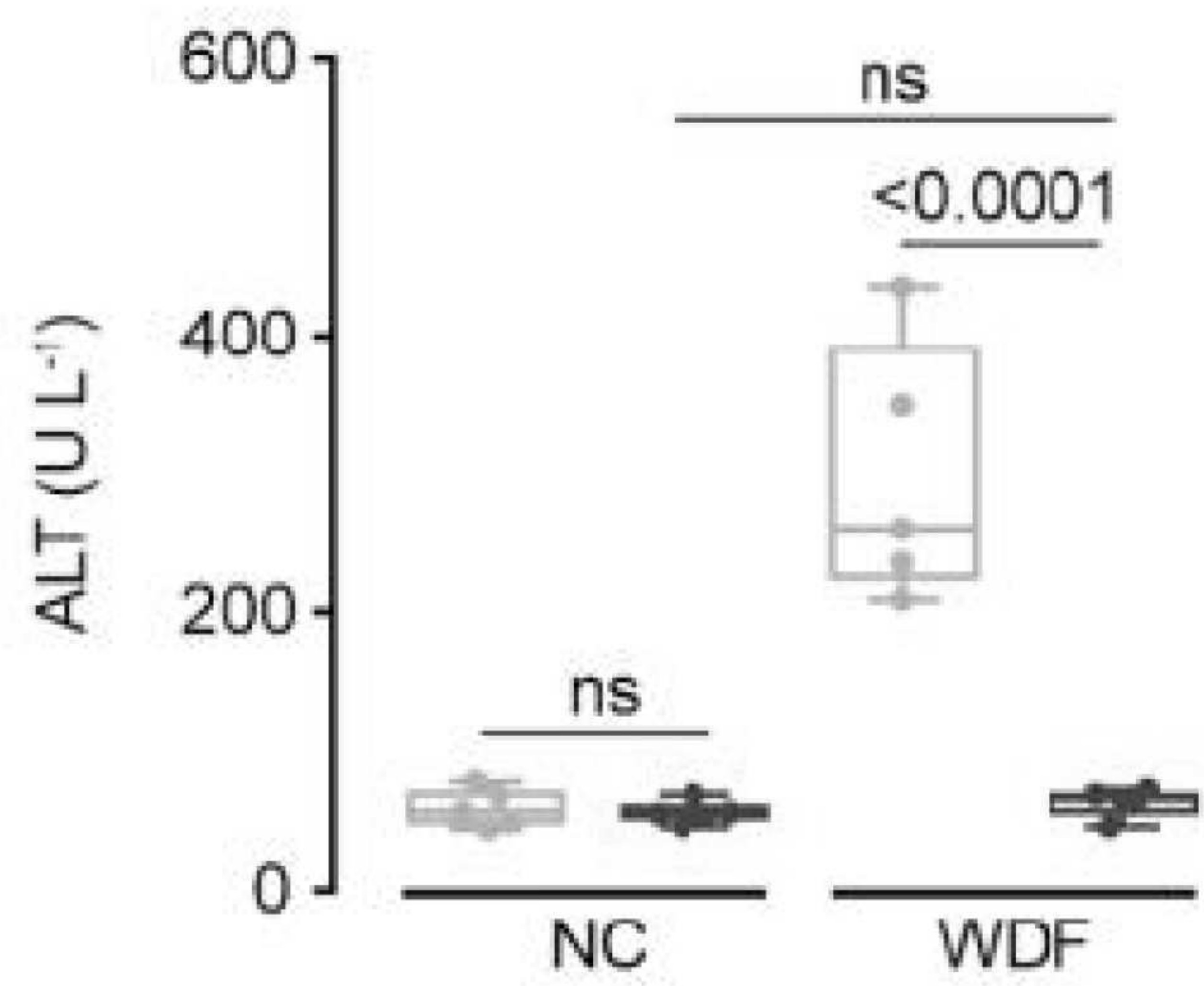
【圖37E】



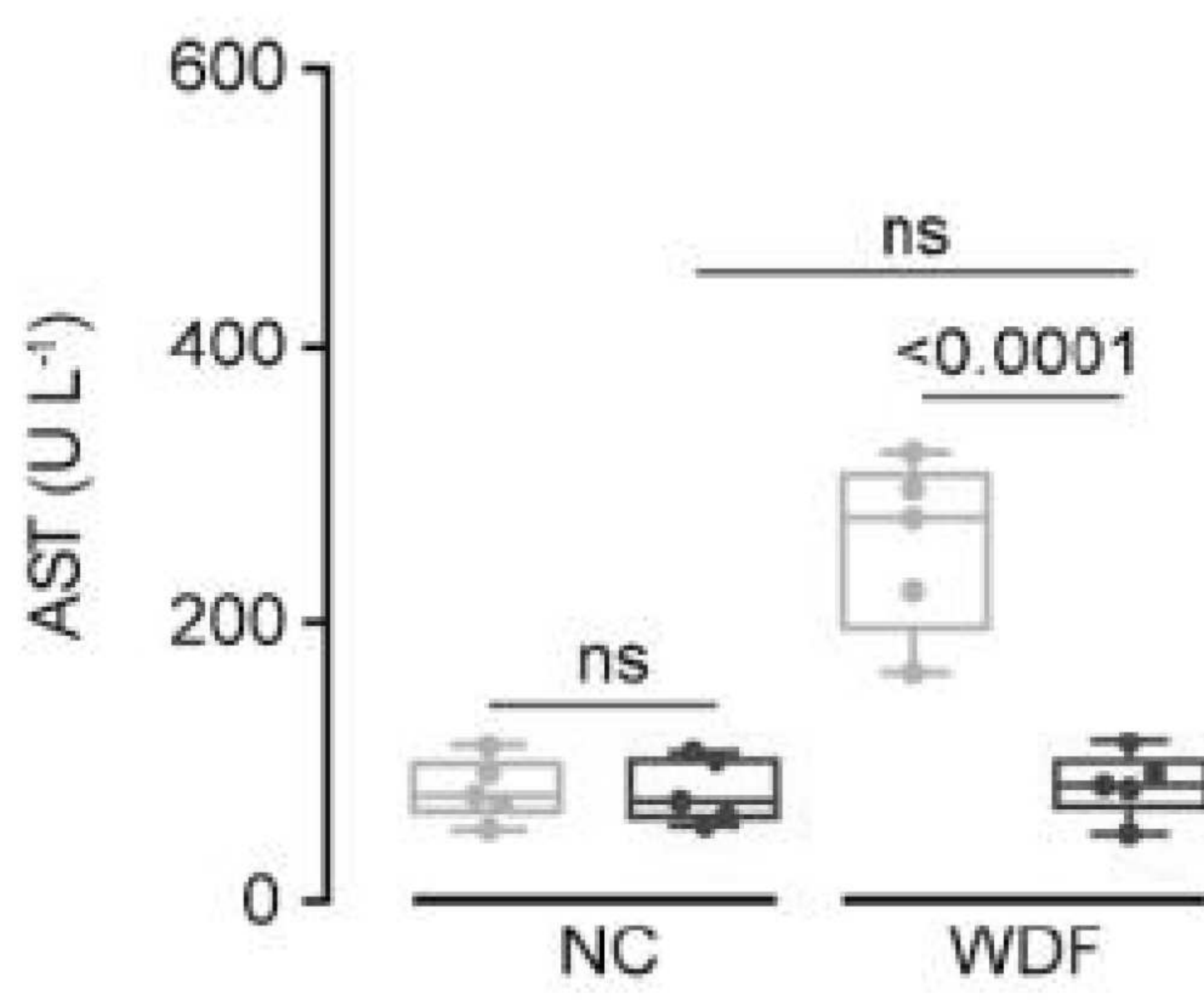
【圖37F】



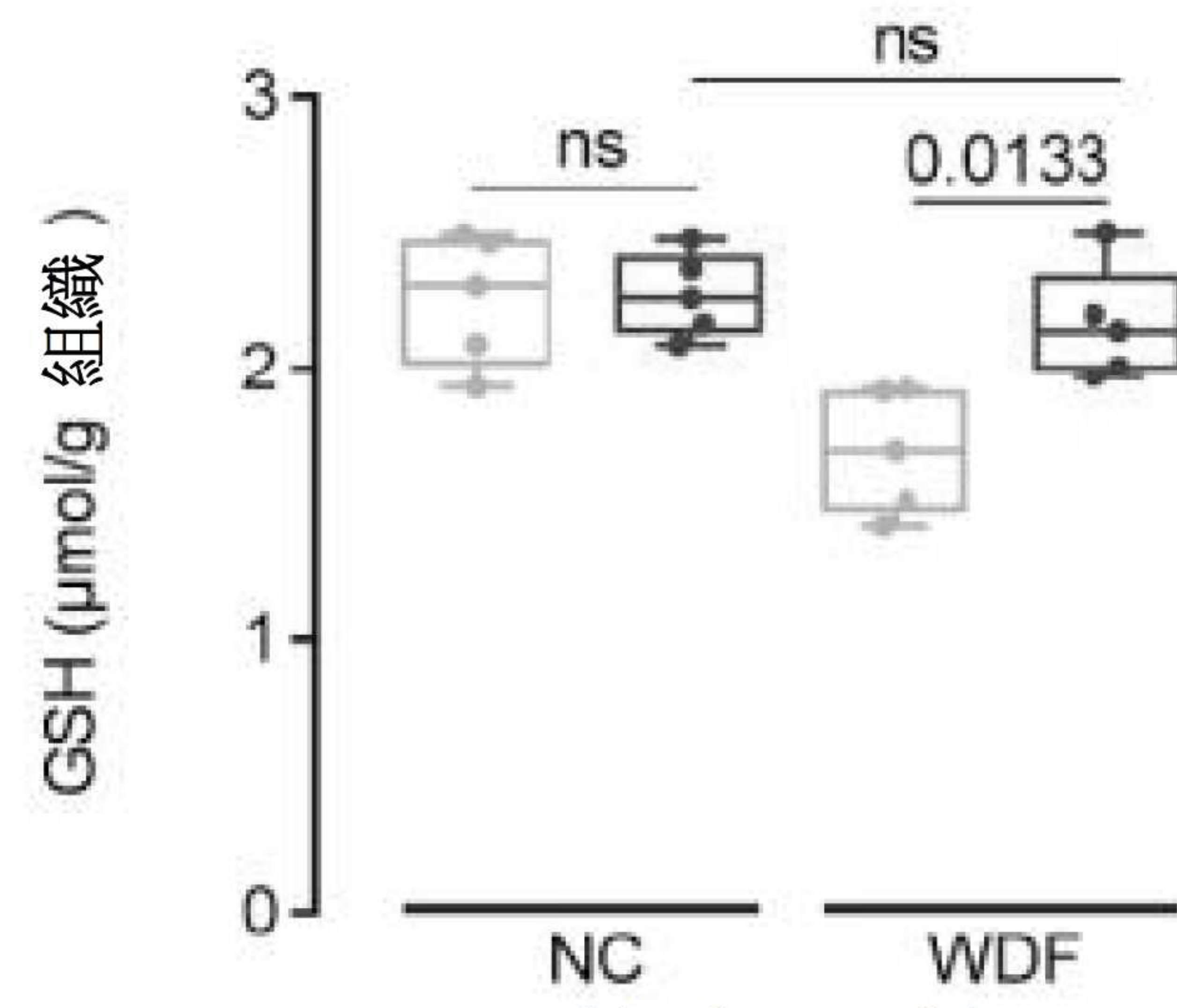
【圖37G】



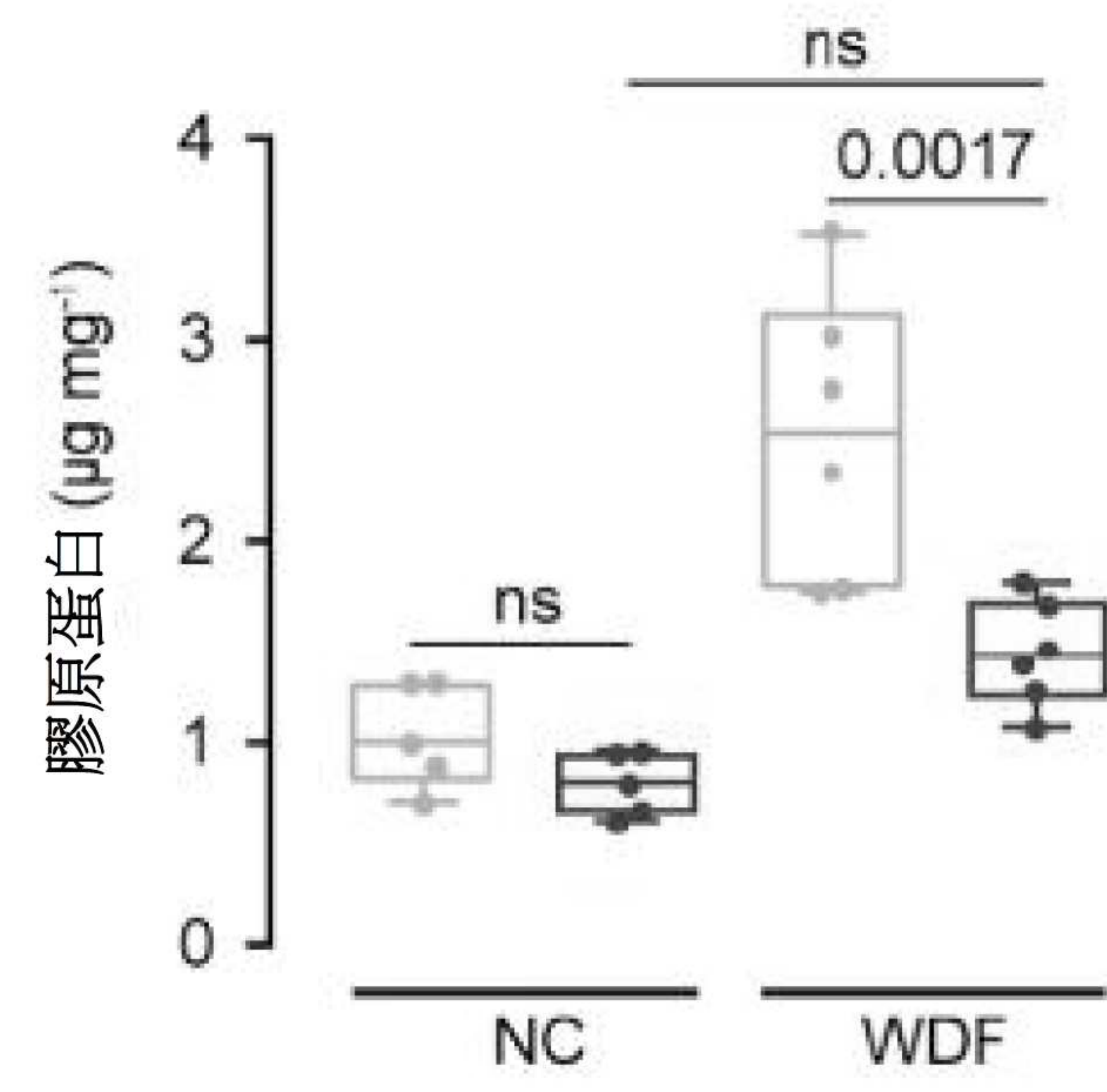
【圖37H】



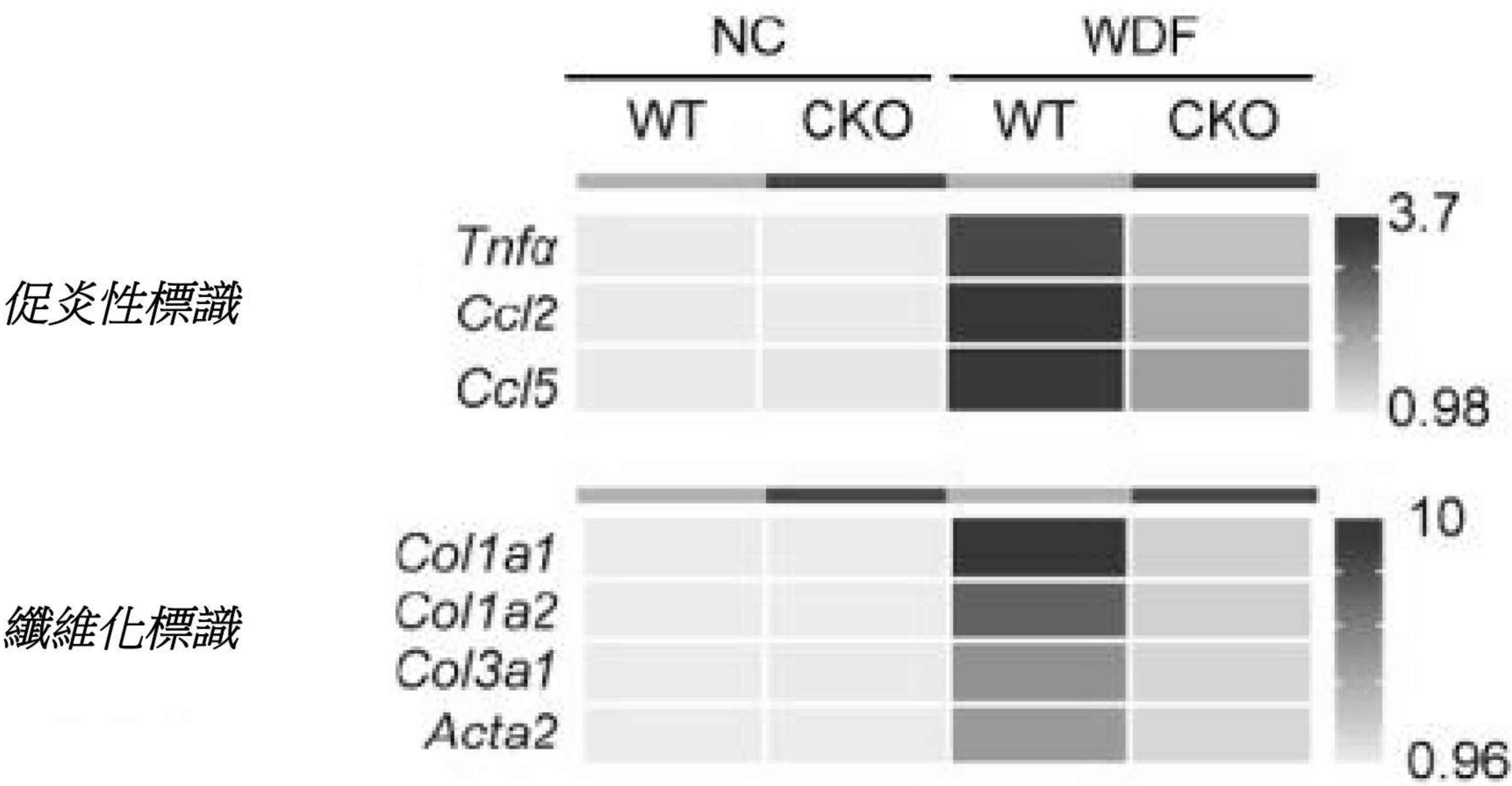
【圖37I】



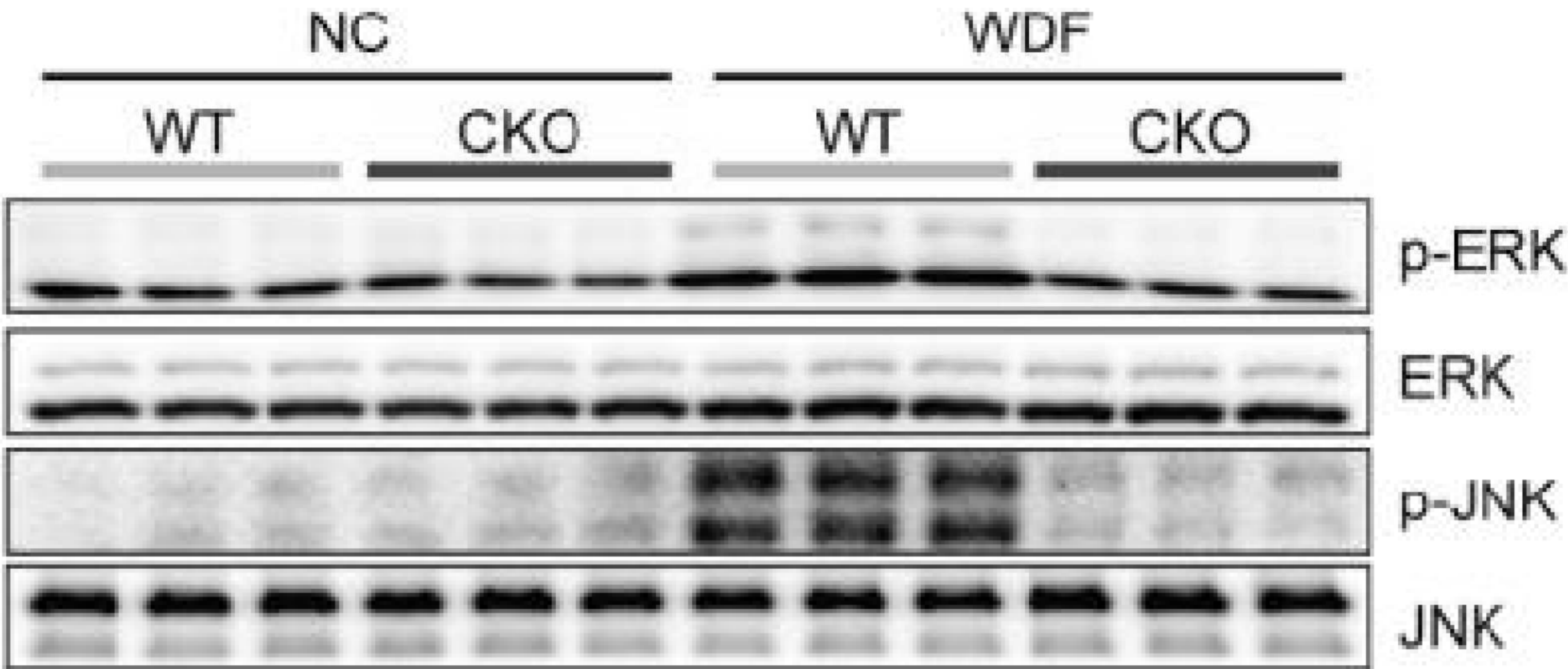
【圖37J】



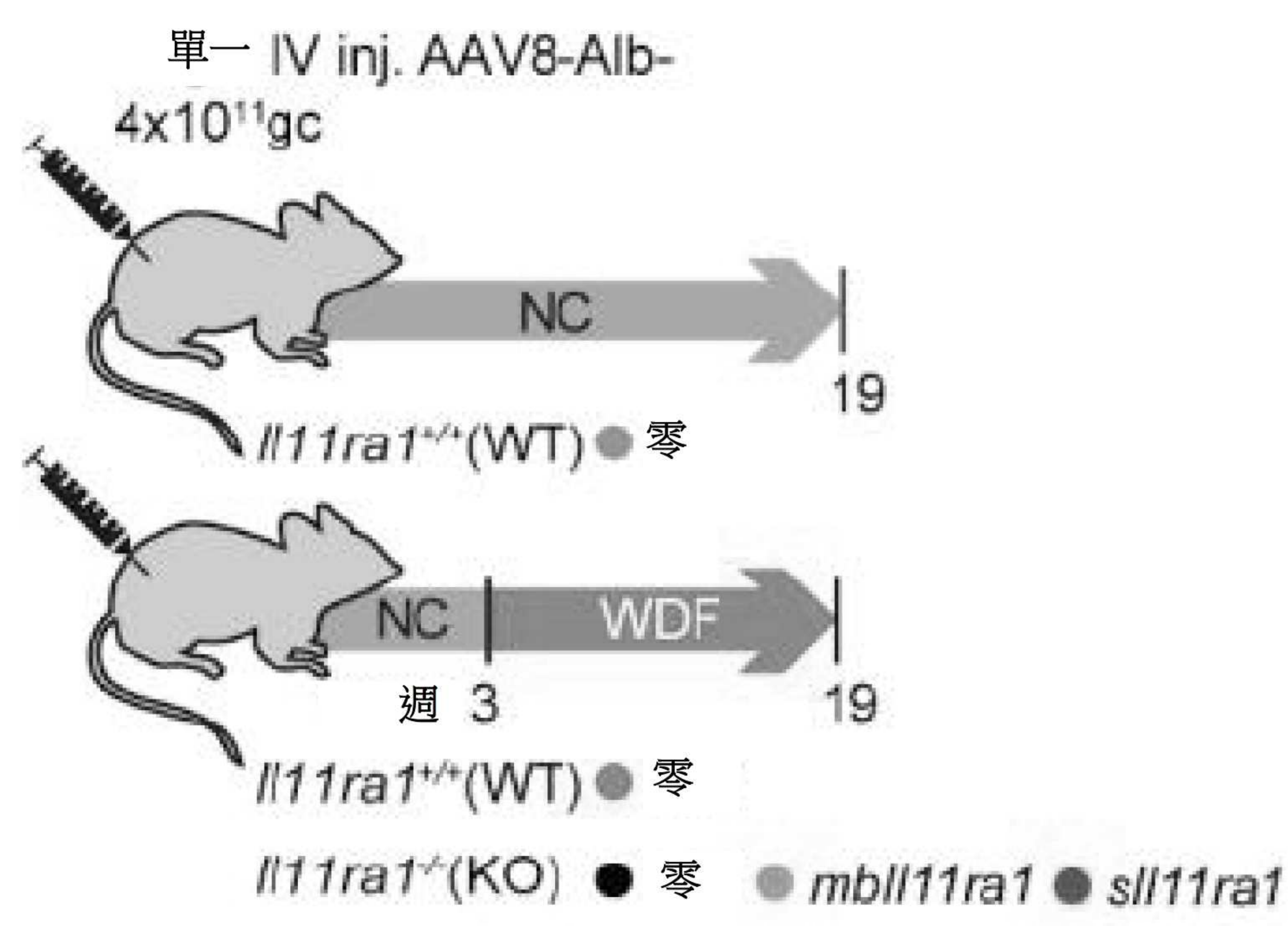
【圖37K】



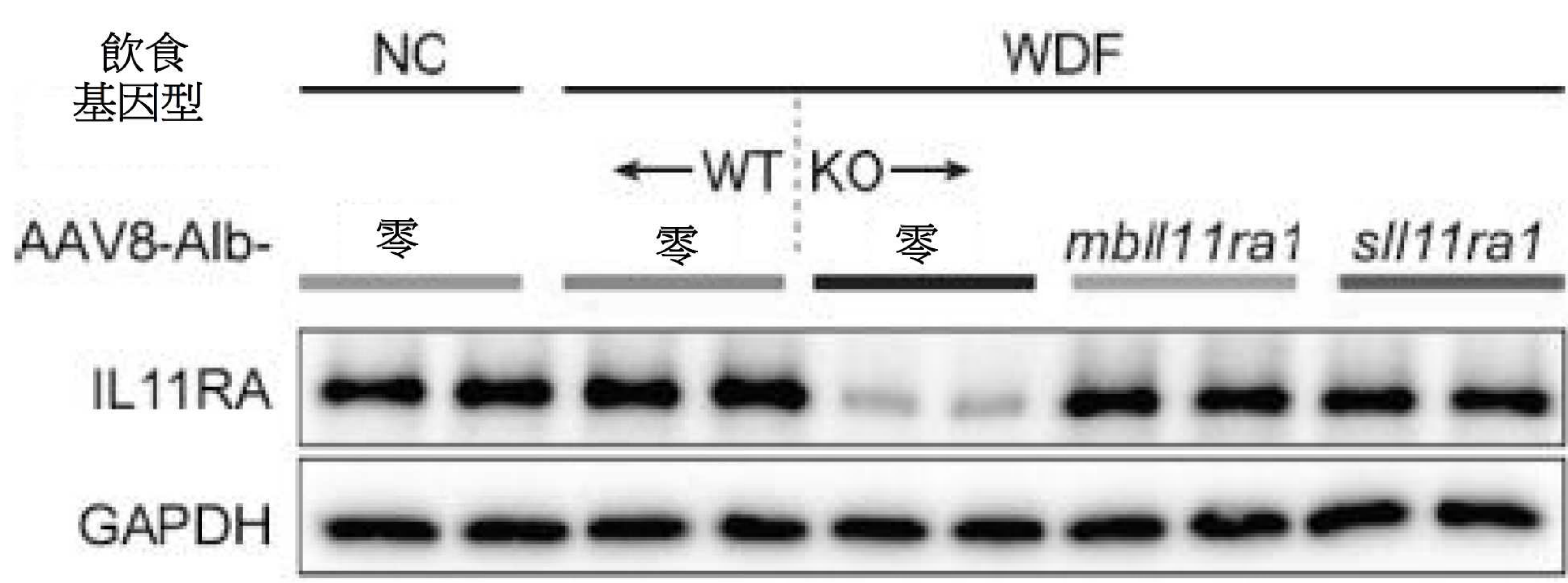
【圖37L】



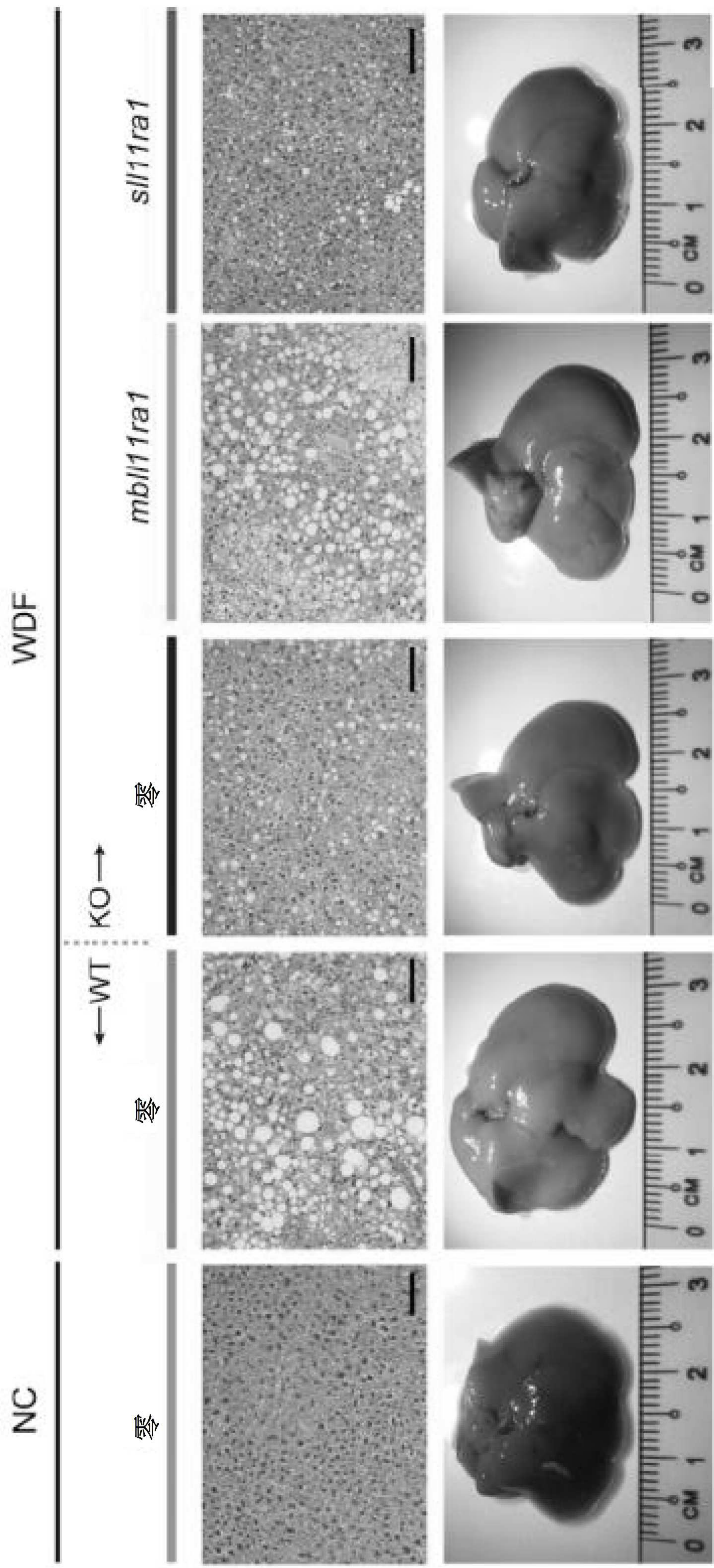
【圖37M】



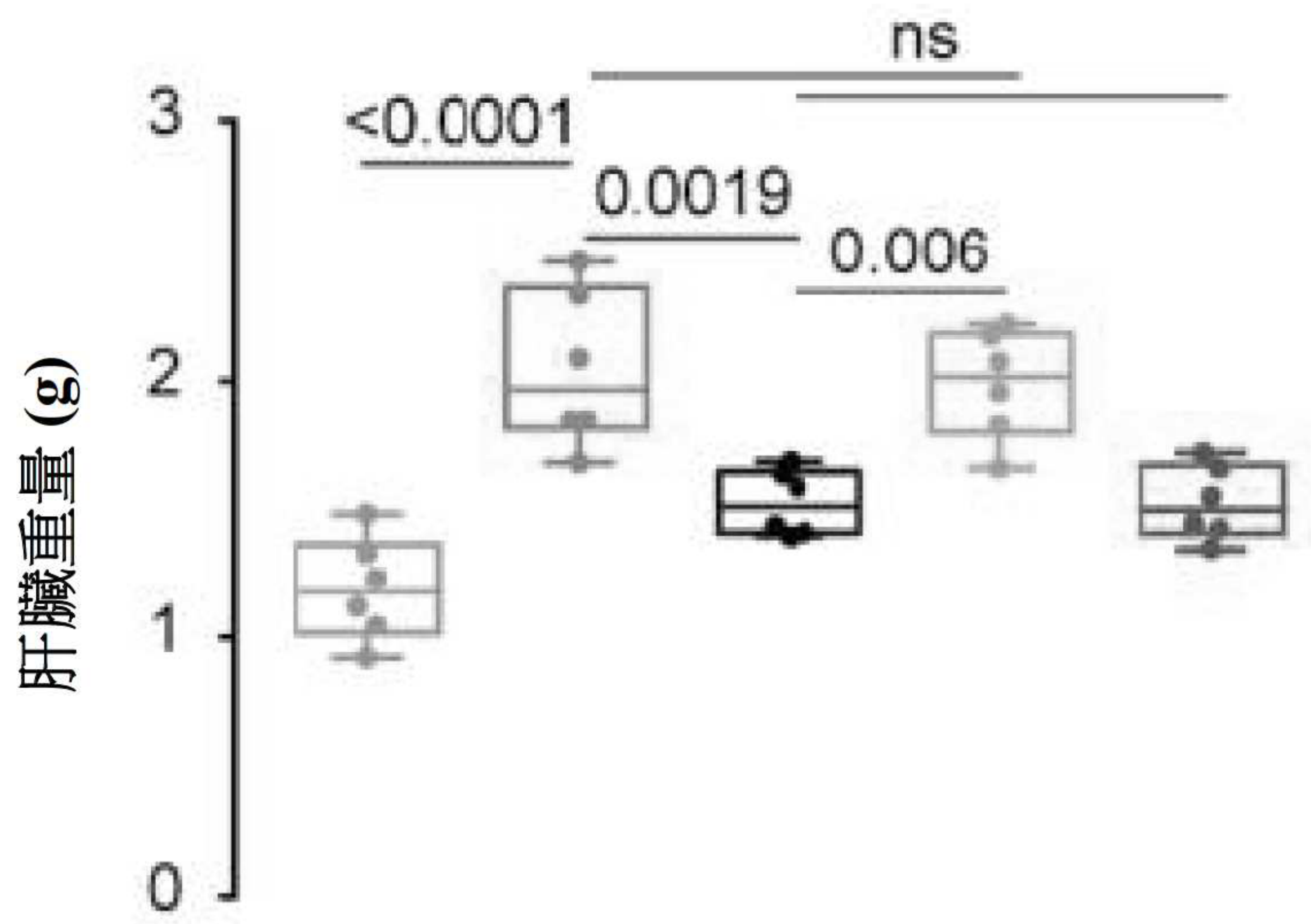
【圖38A】



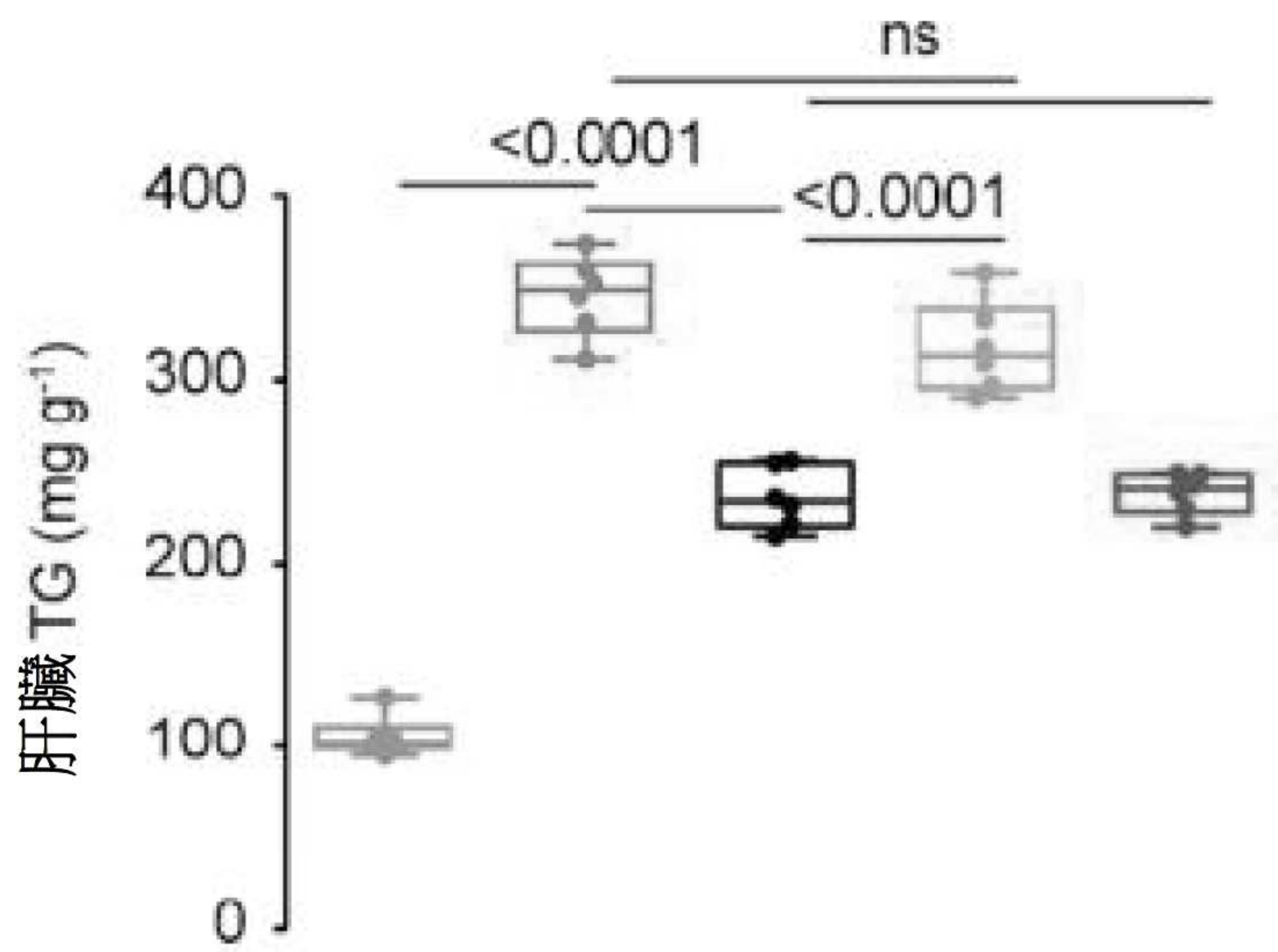
【圖38B】



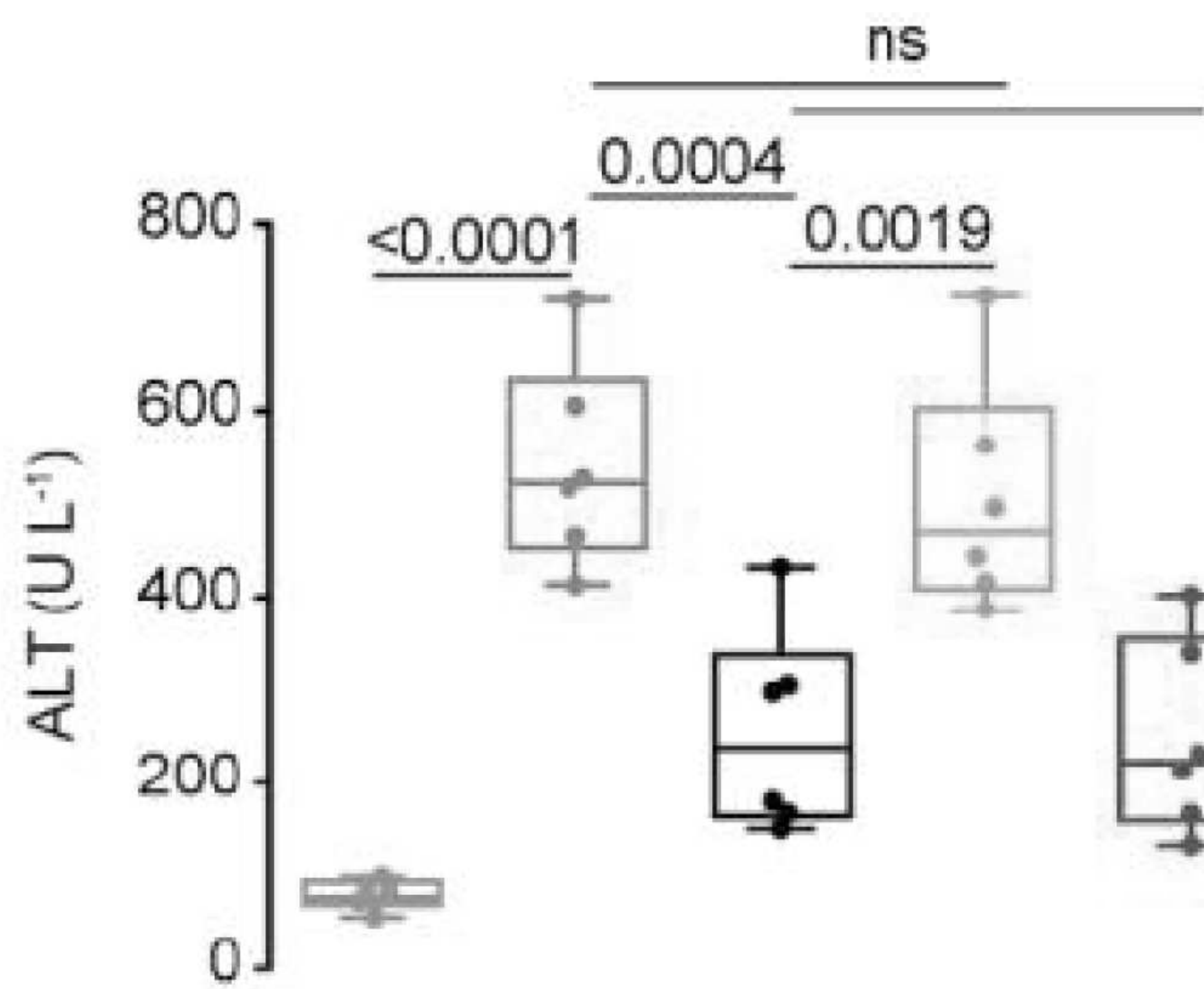
【圖38C】



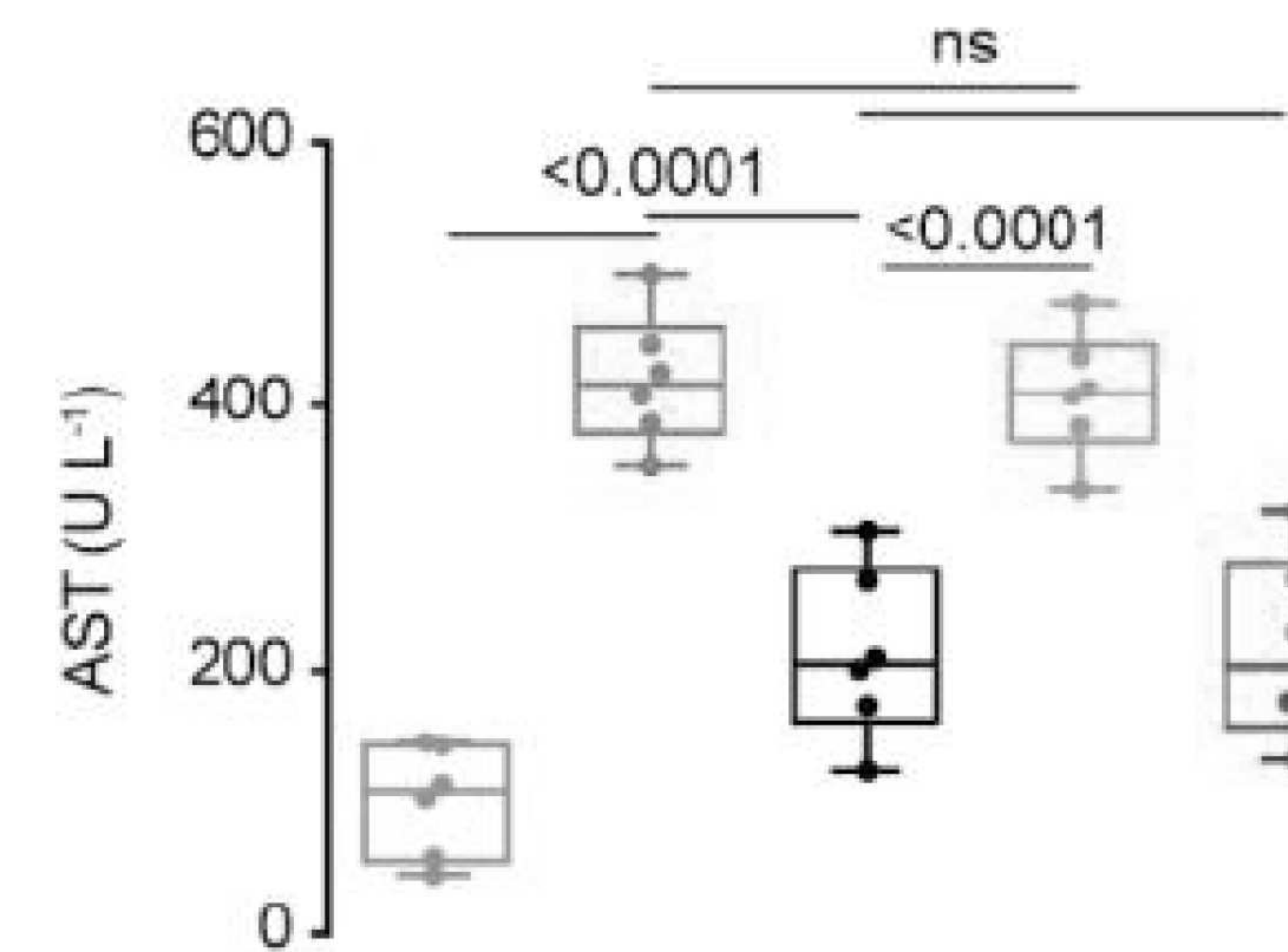
【圖38D】



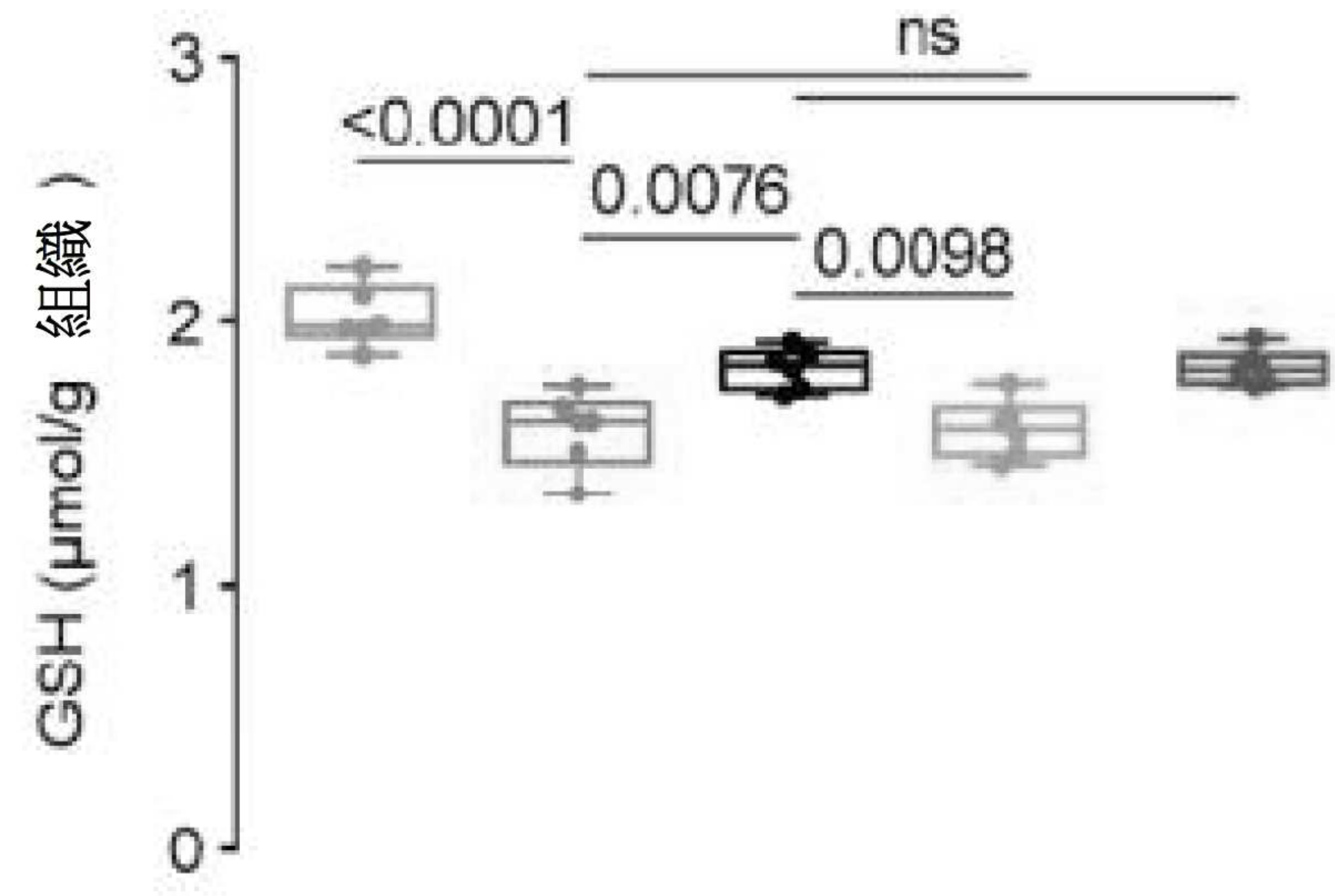
【圖38E】



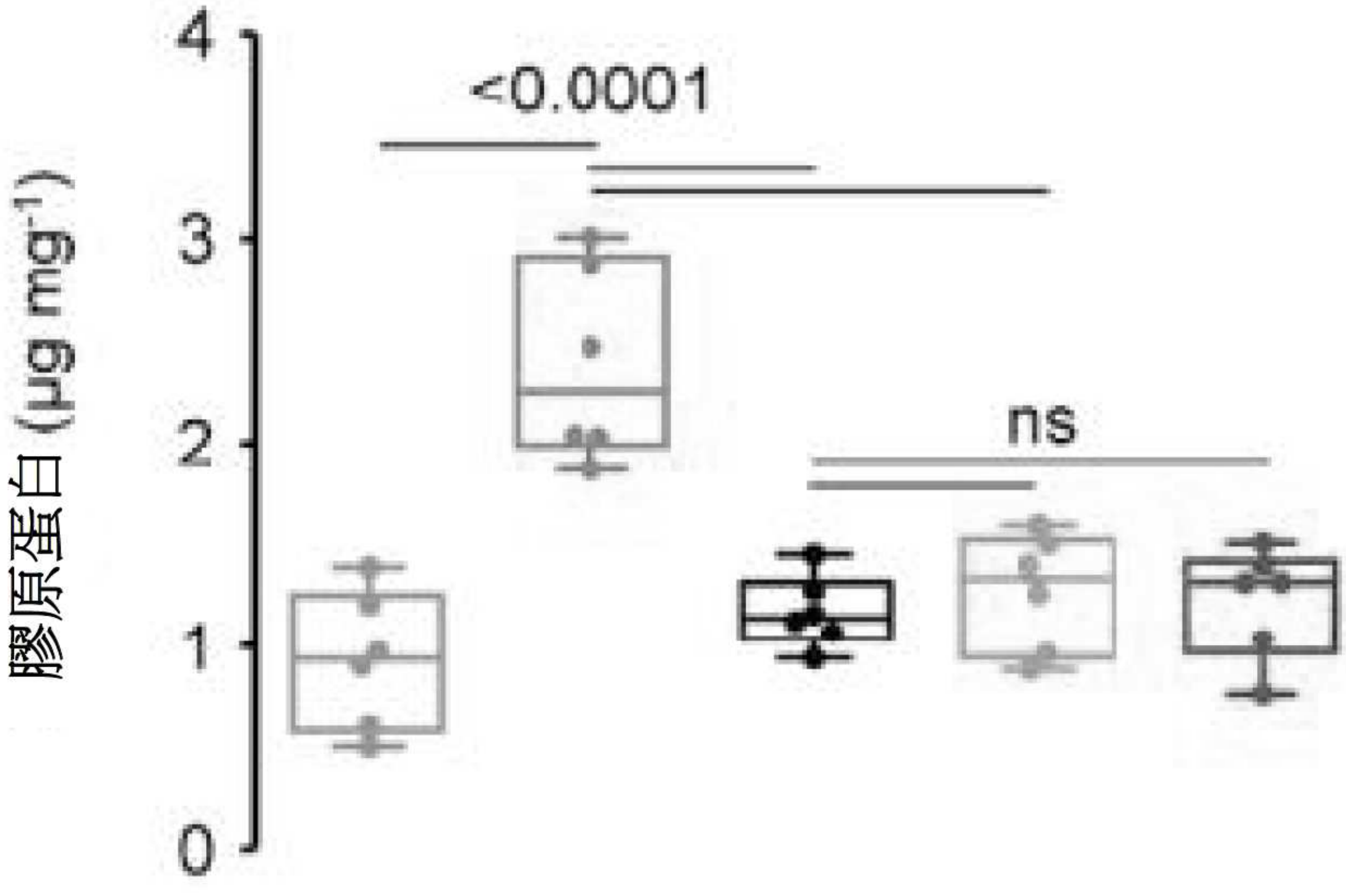
【圖38F】



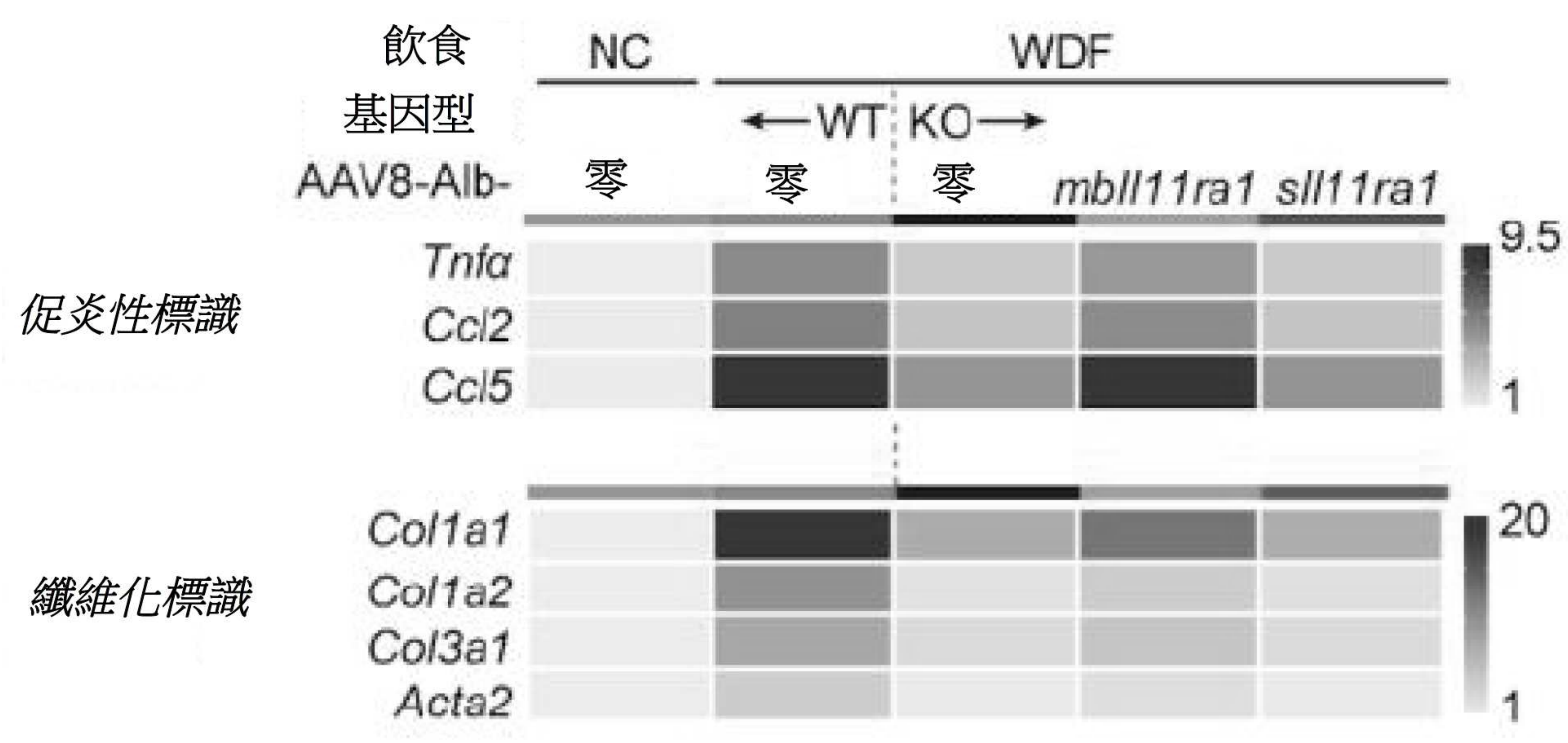
【圖38G】



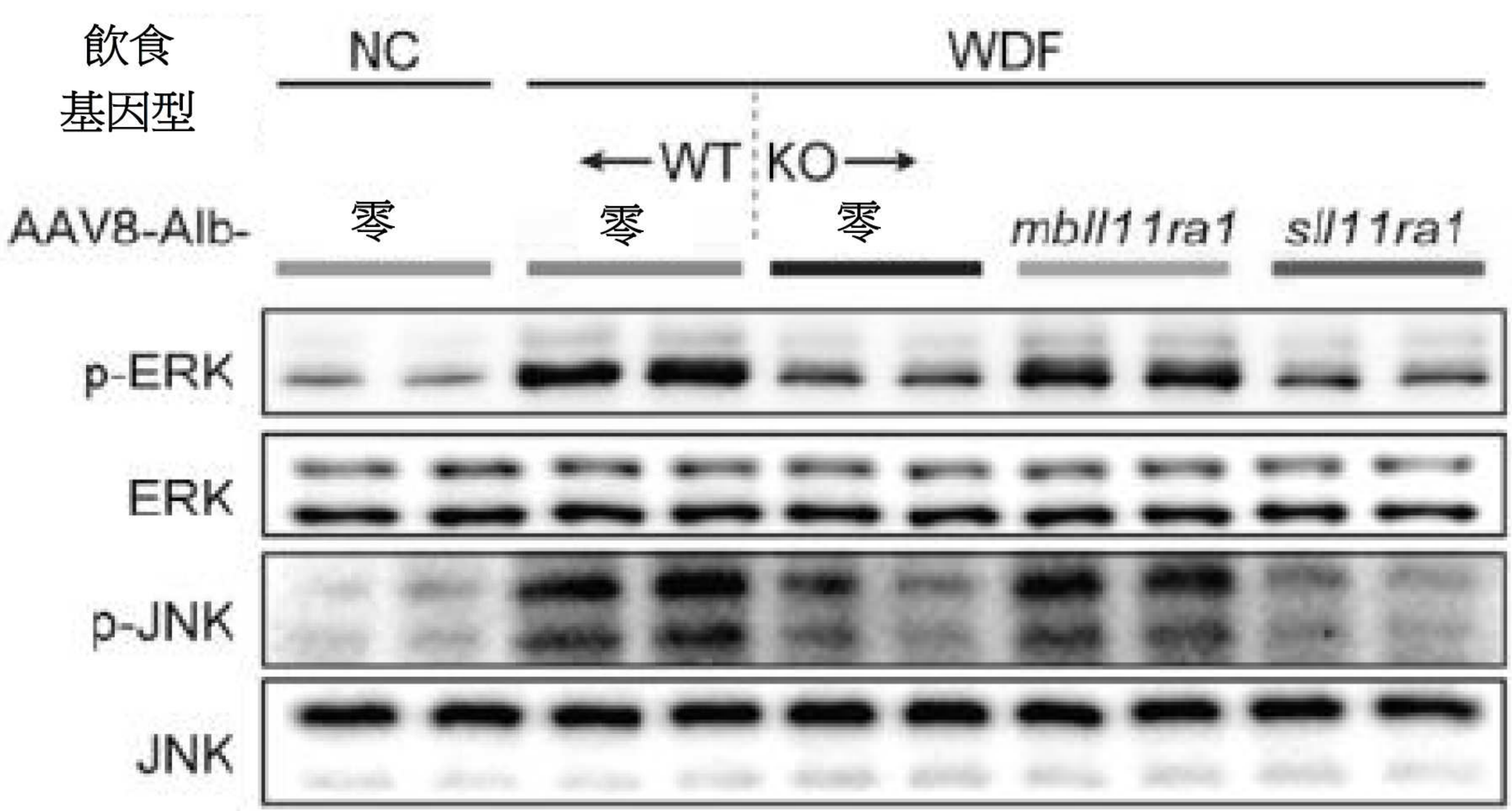
【圖38H】



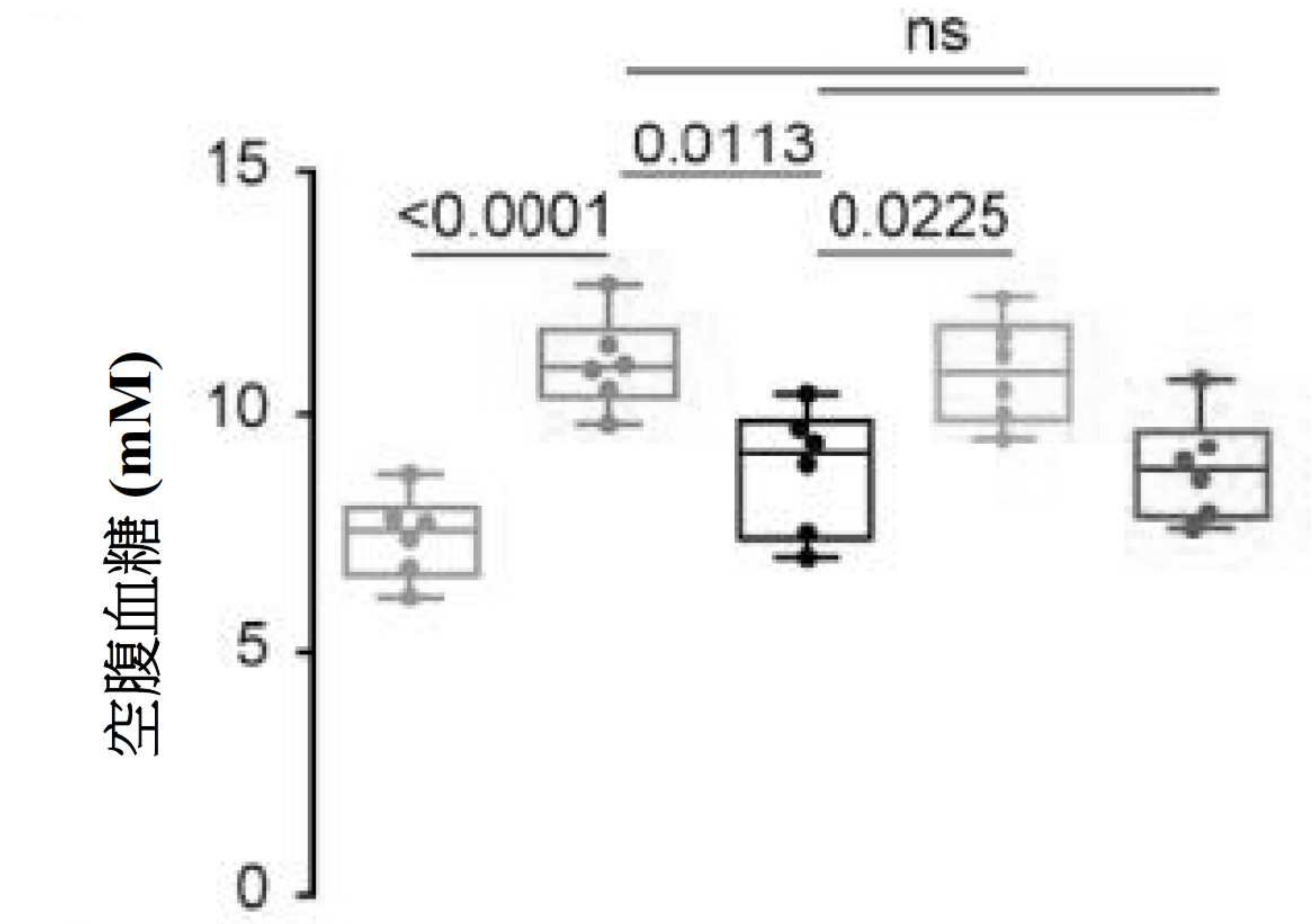
【圖38I】



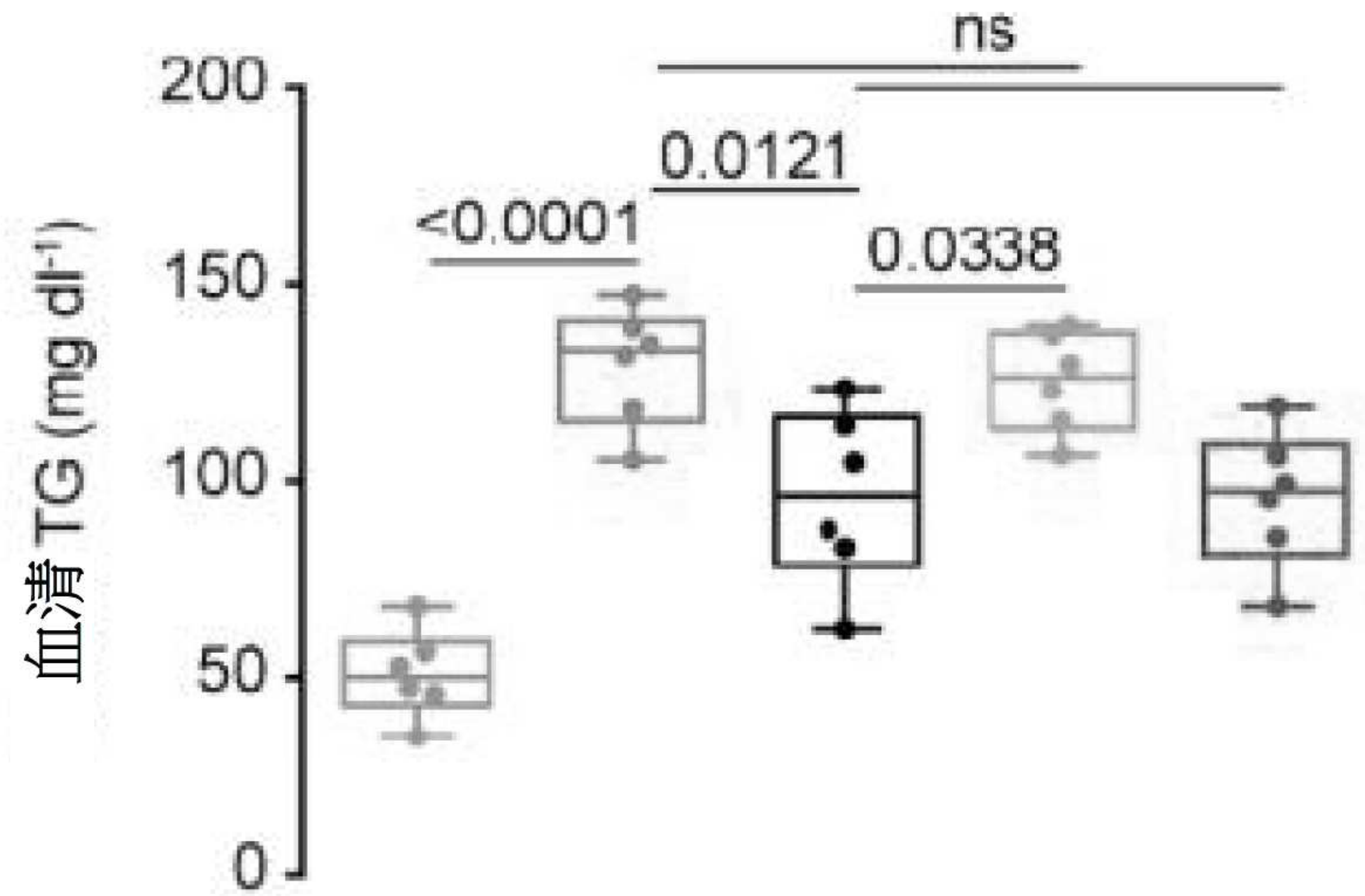
【圖38J】



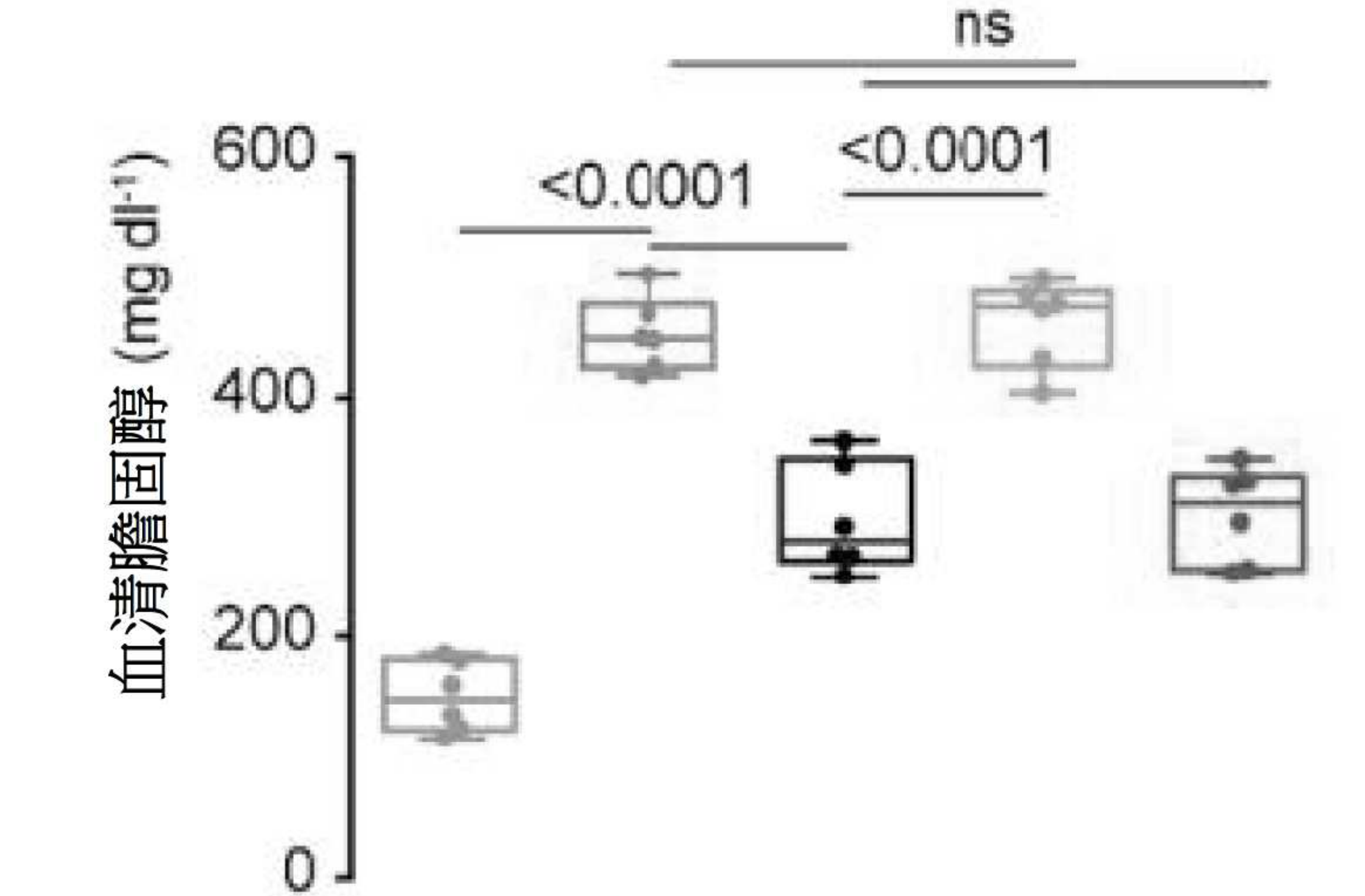
【圖38K】



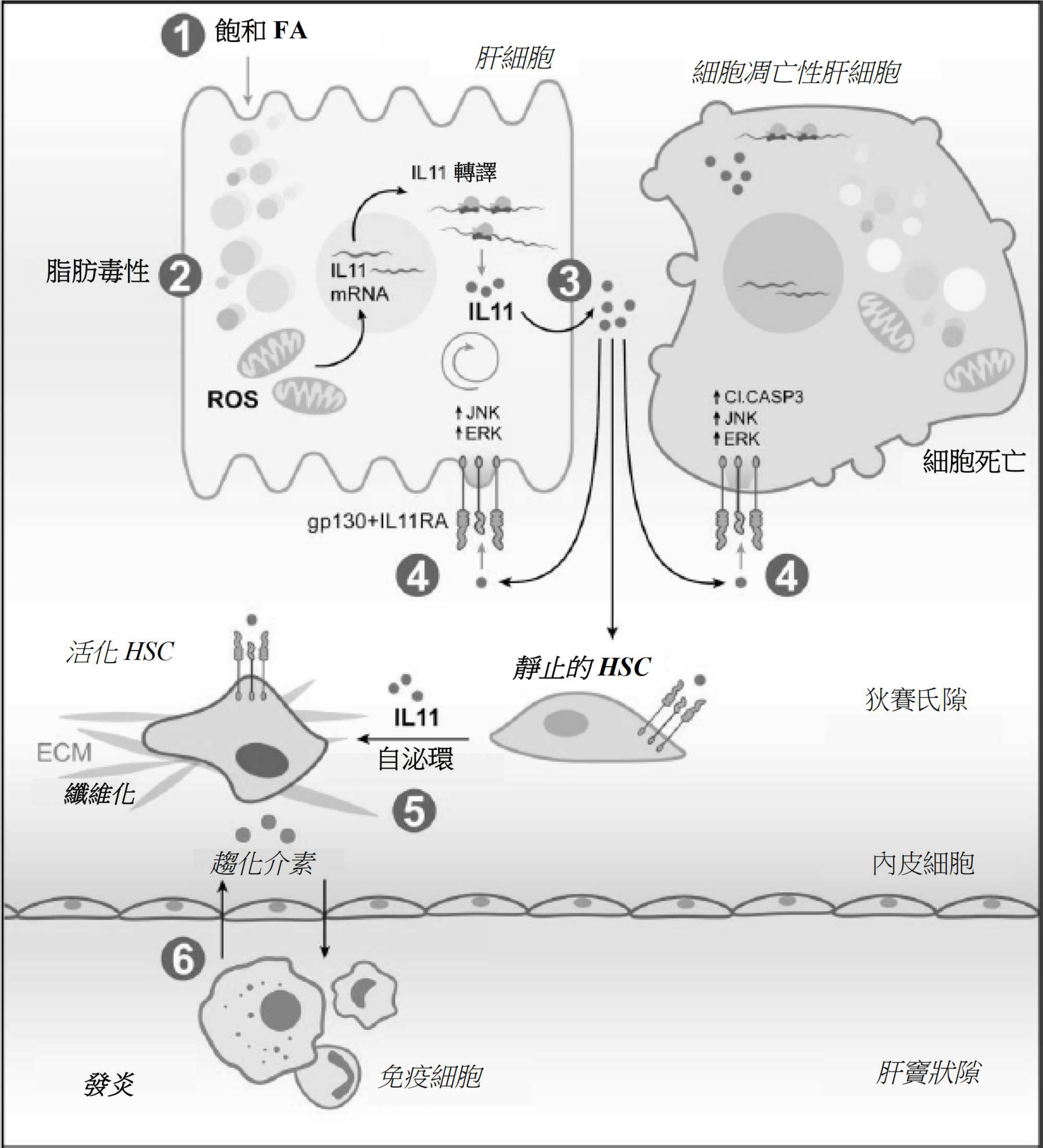
【圖38L】



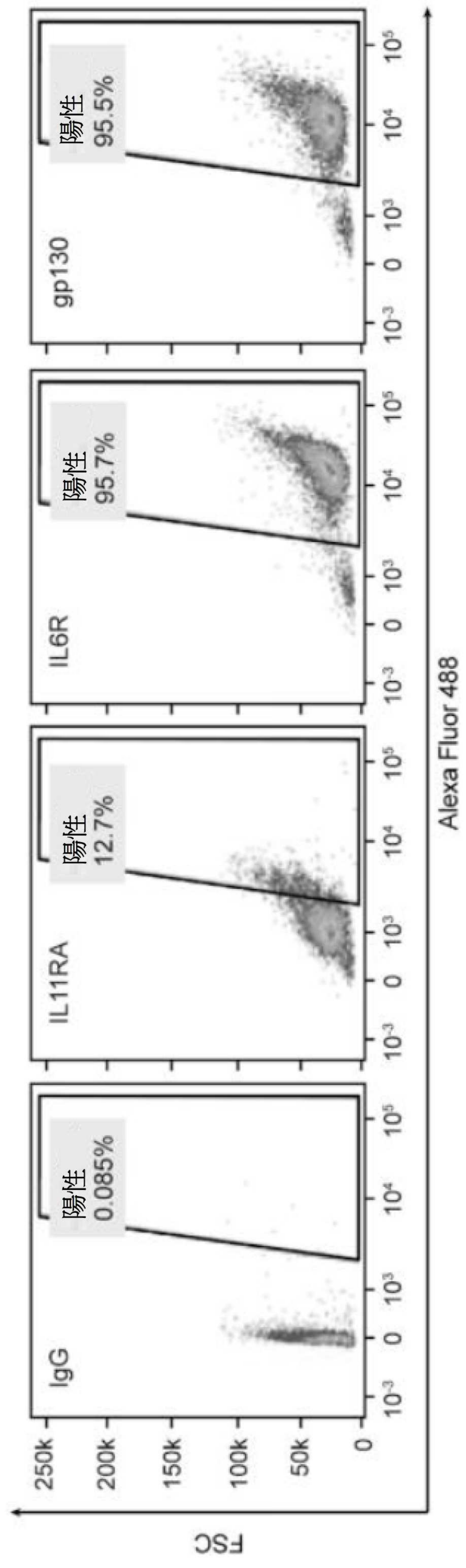
【圖38M】



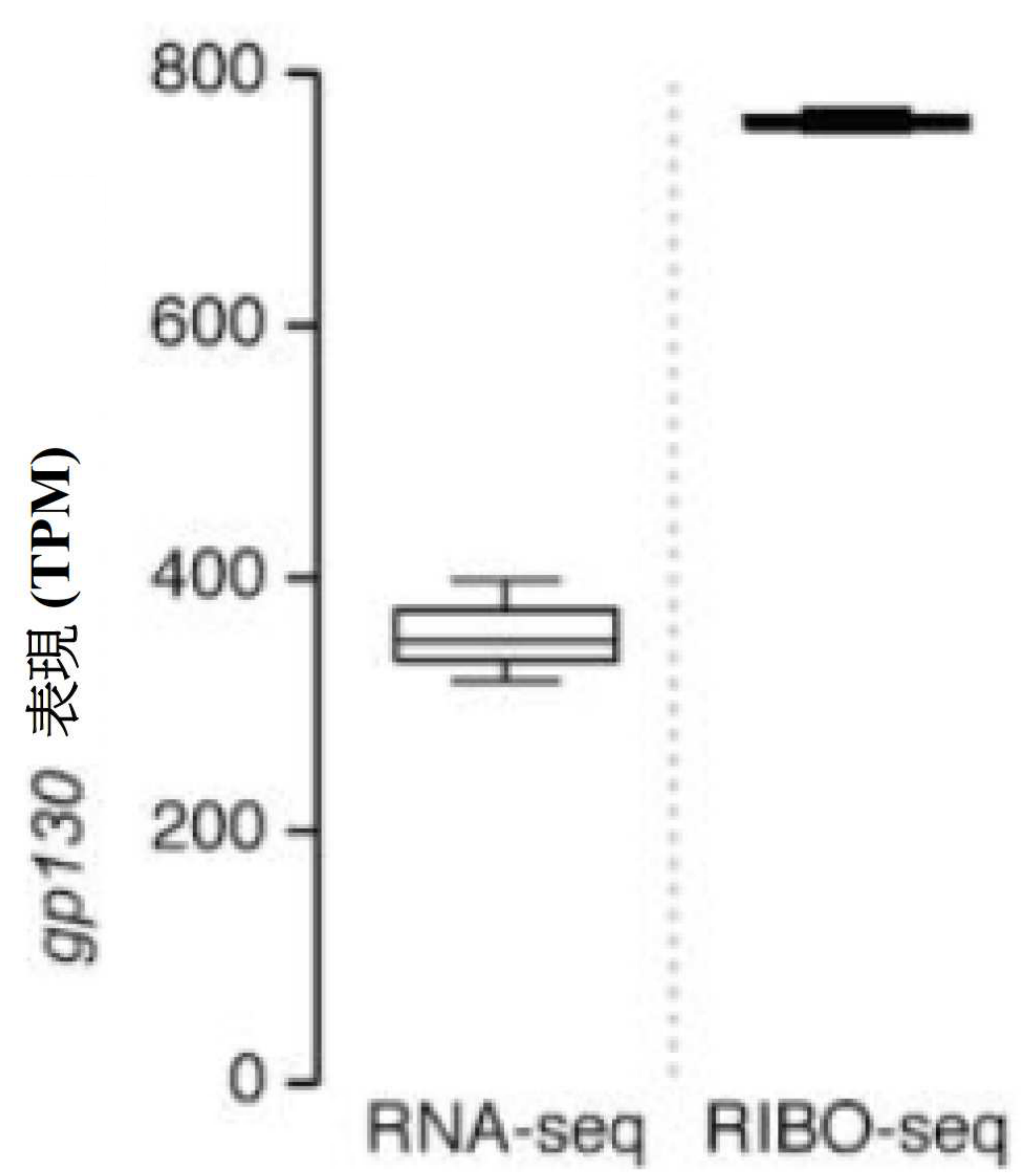
【圖38N】



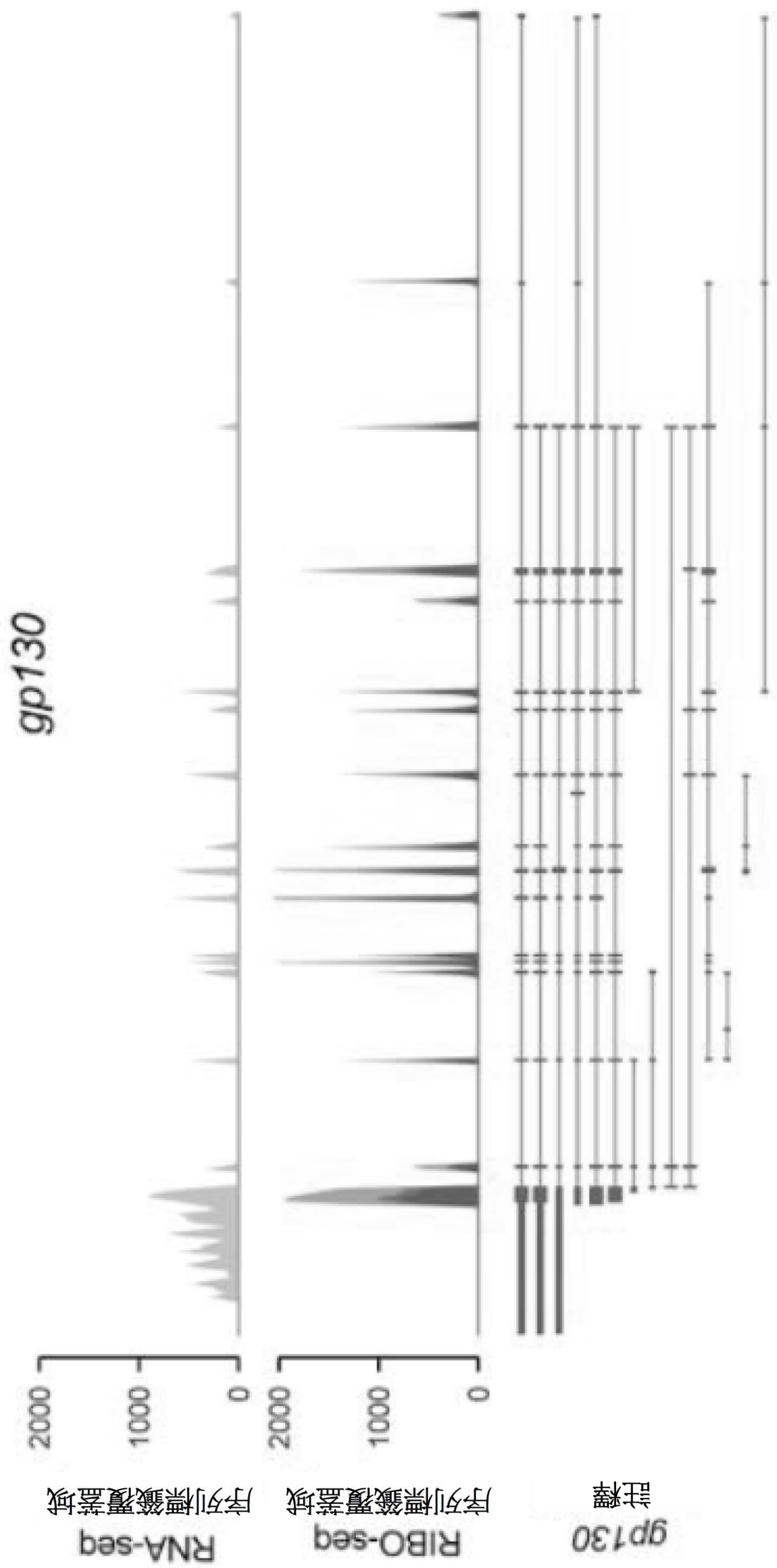
【圖39】



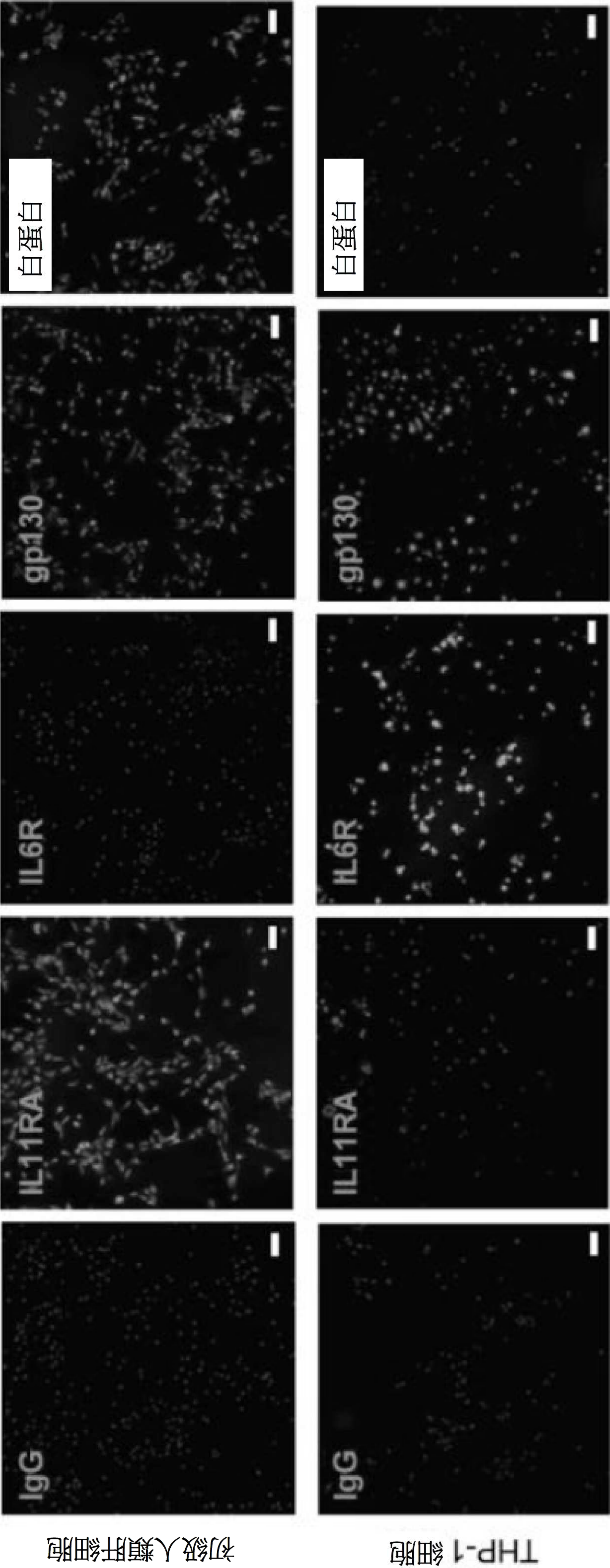
【圖40A】



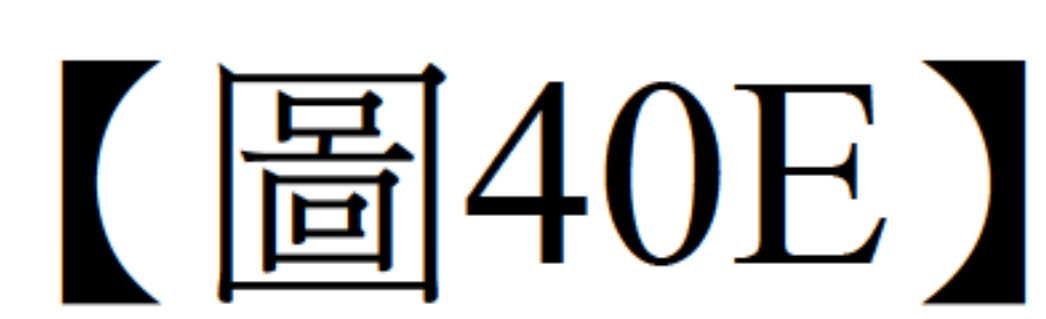
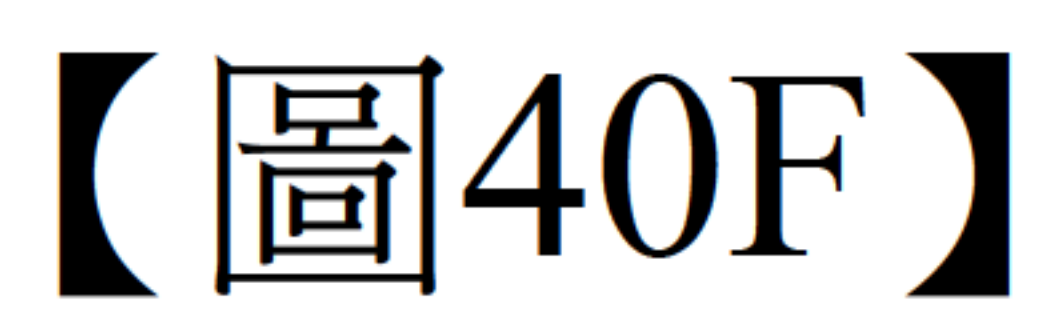
【圖40B】

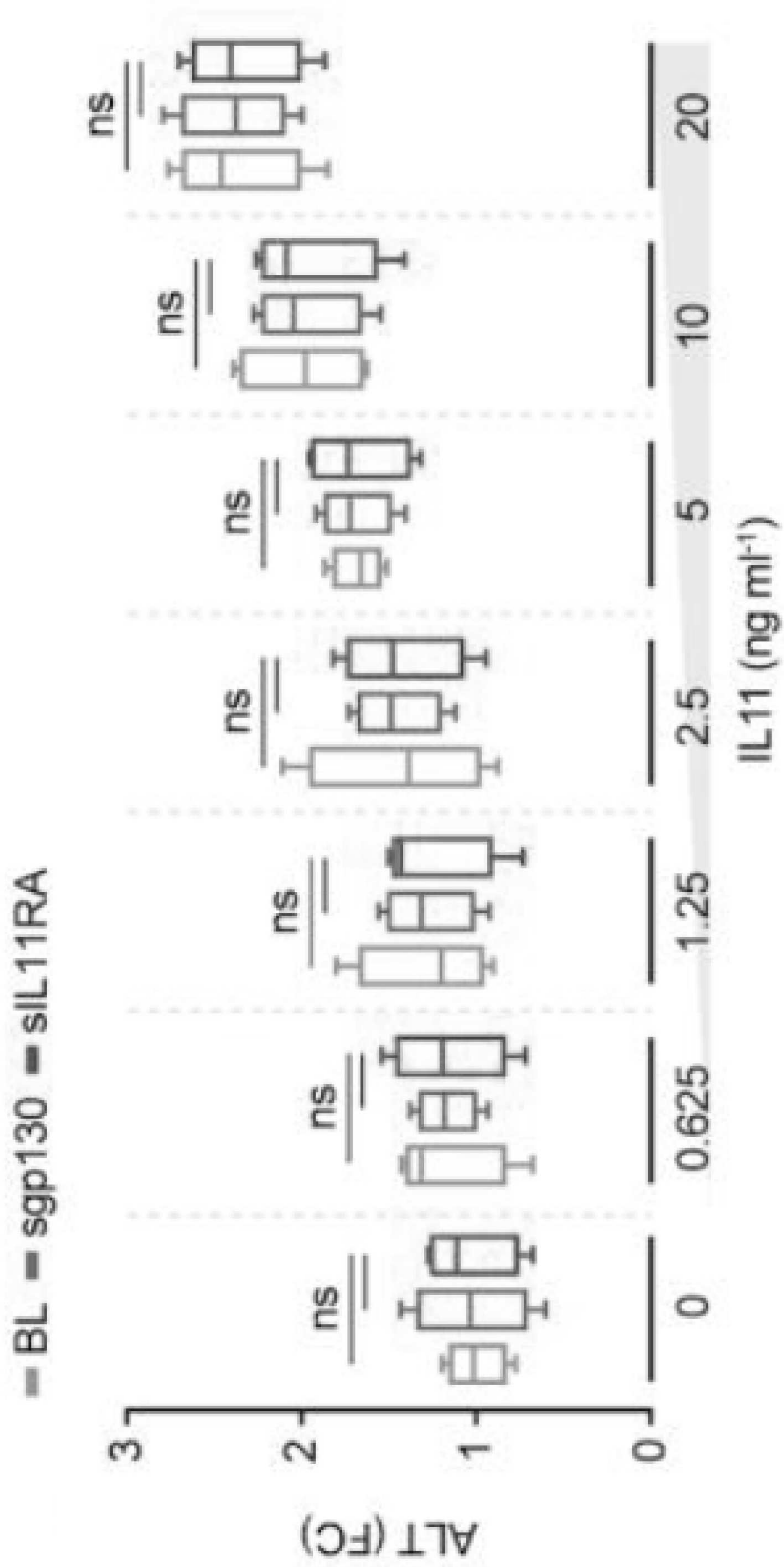


【圖40C】

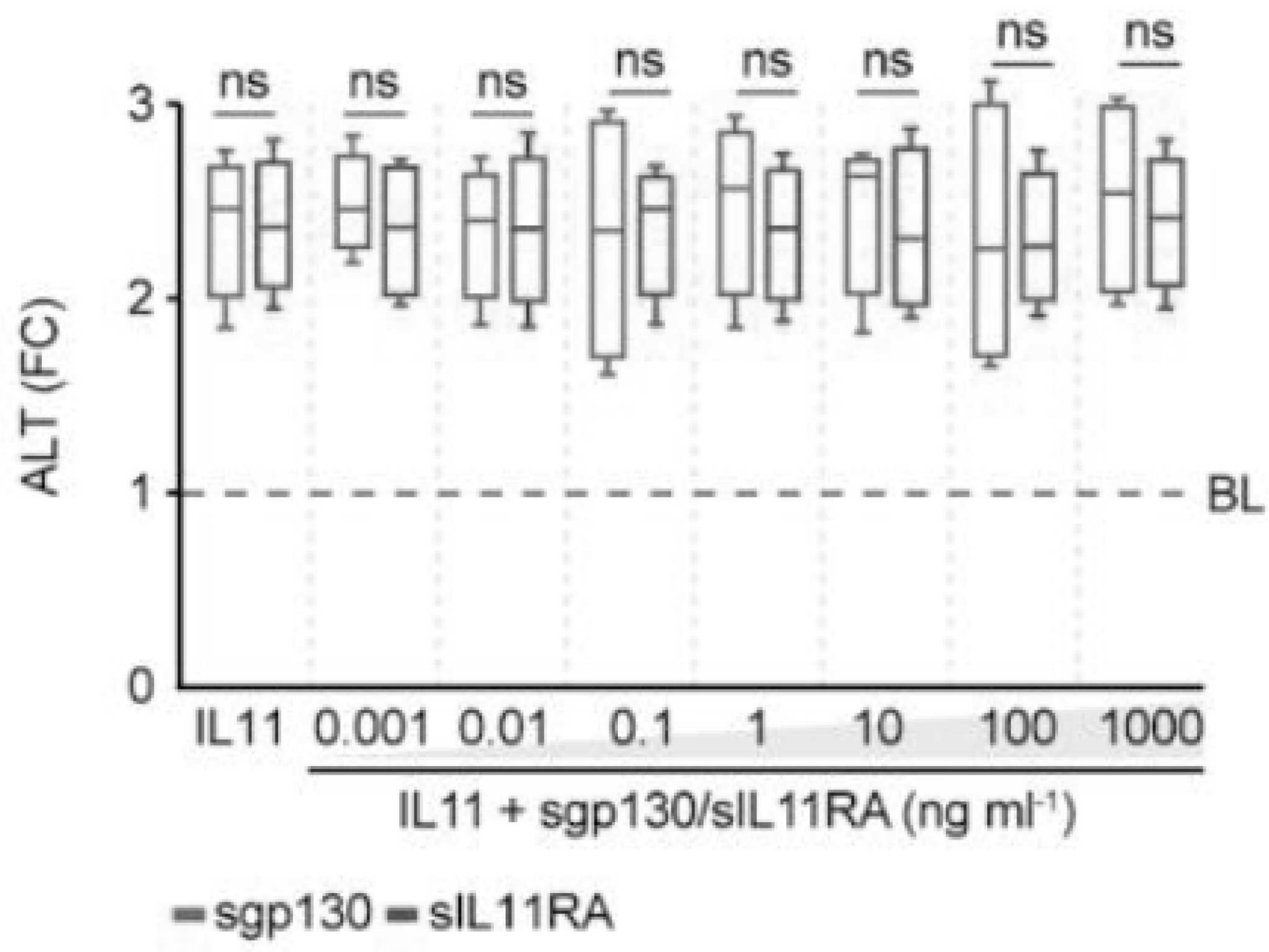


【圖40D】

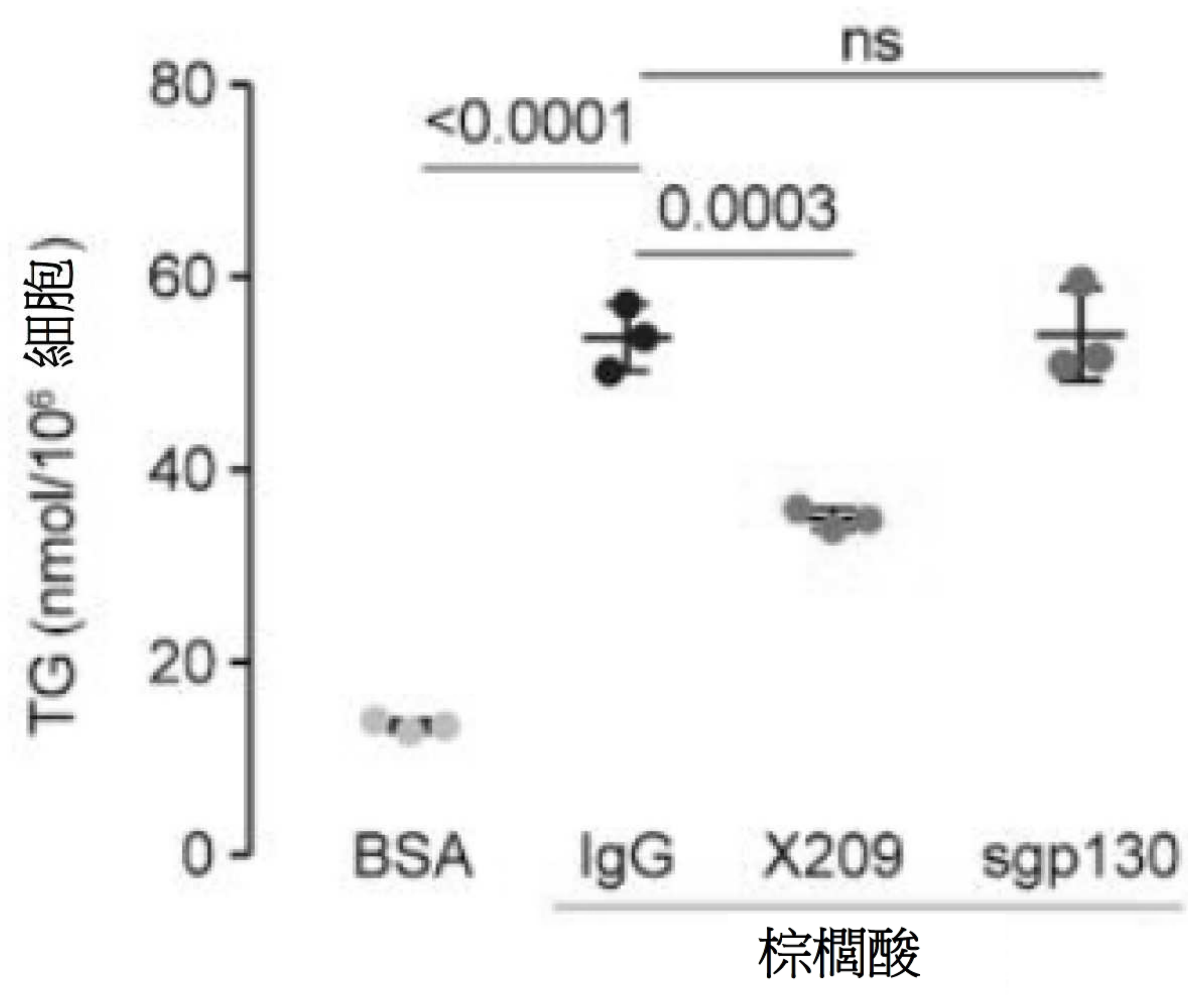




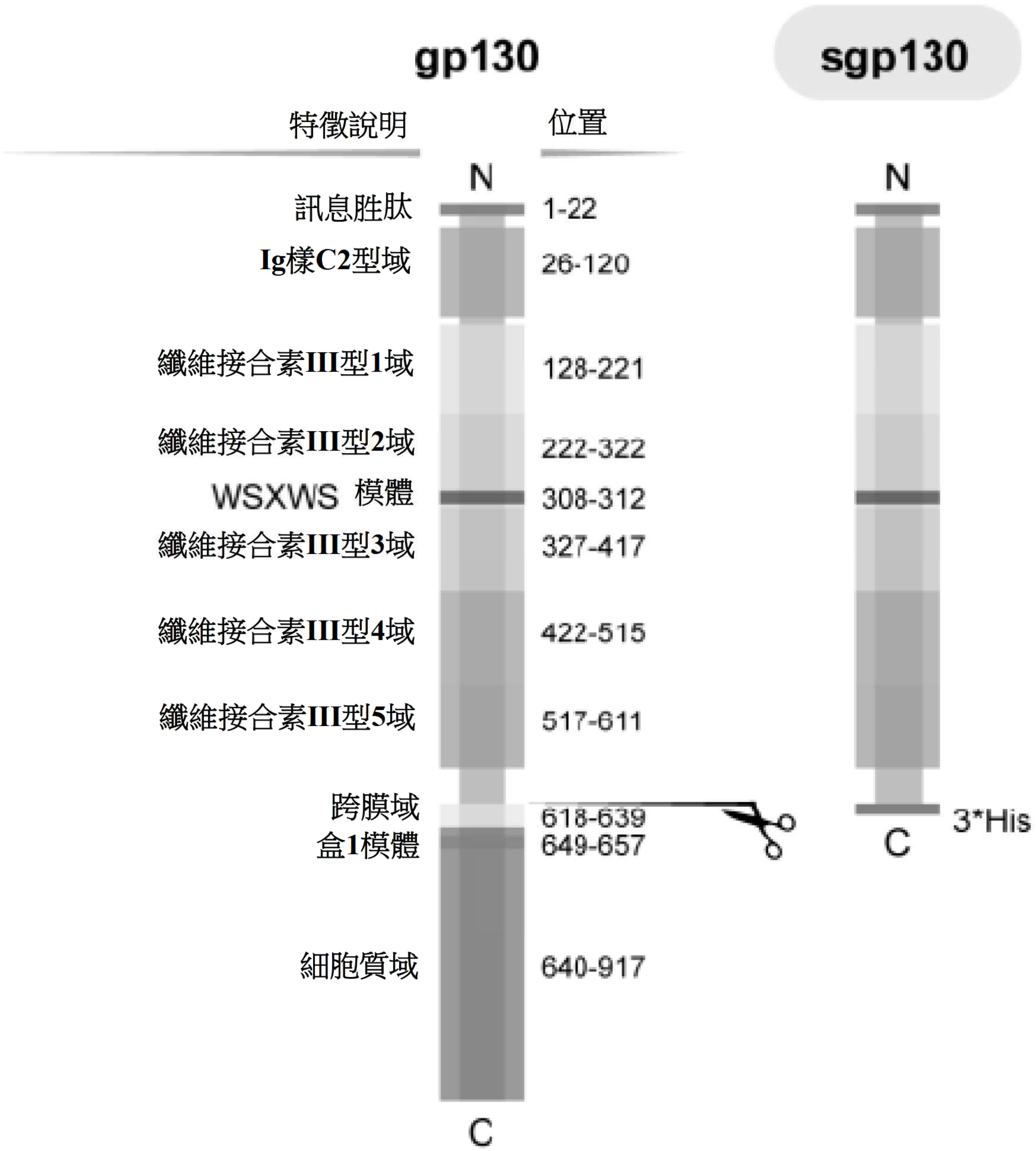
【圖40G】



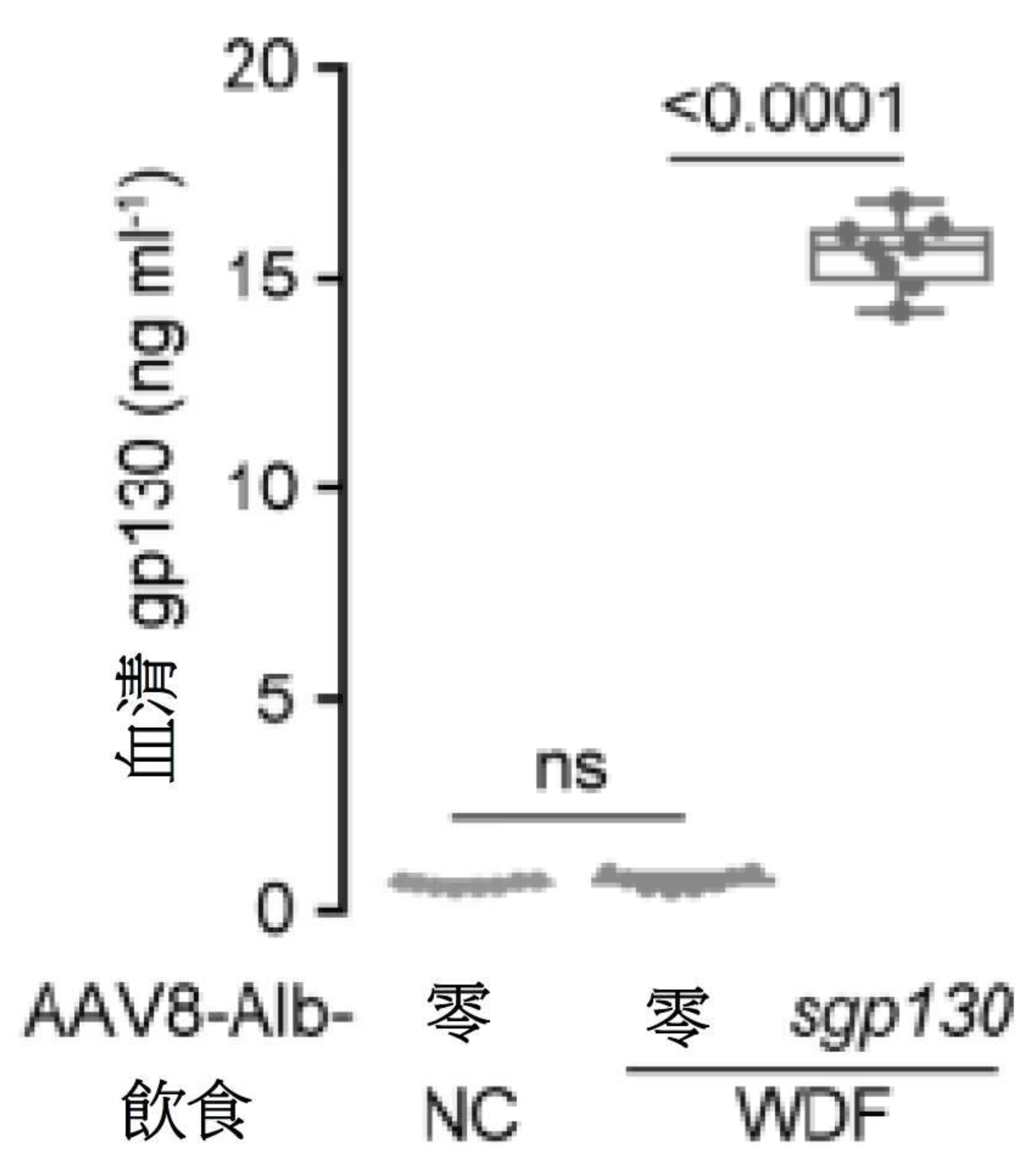
【圖40H】



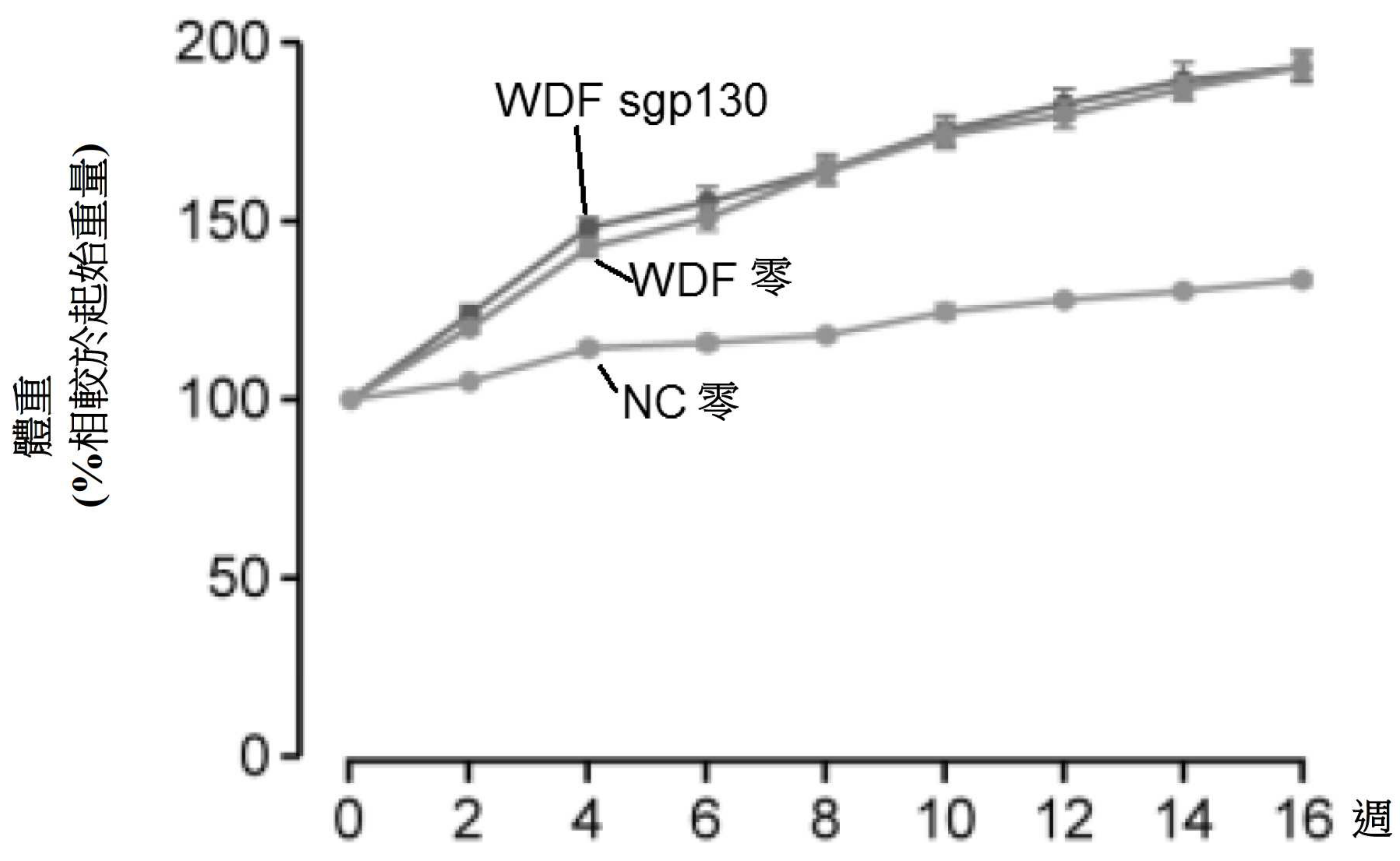
【圖40I】



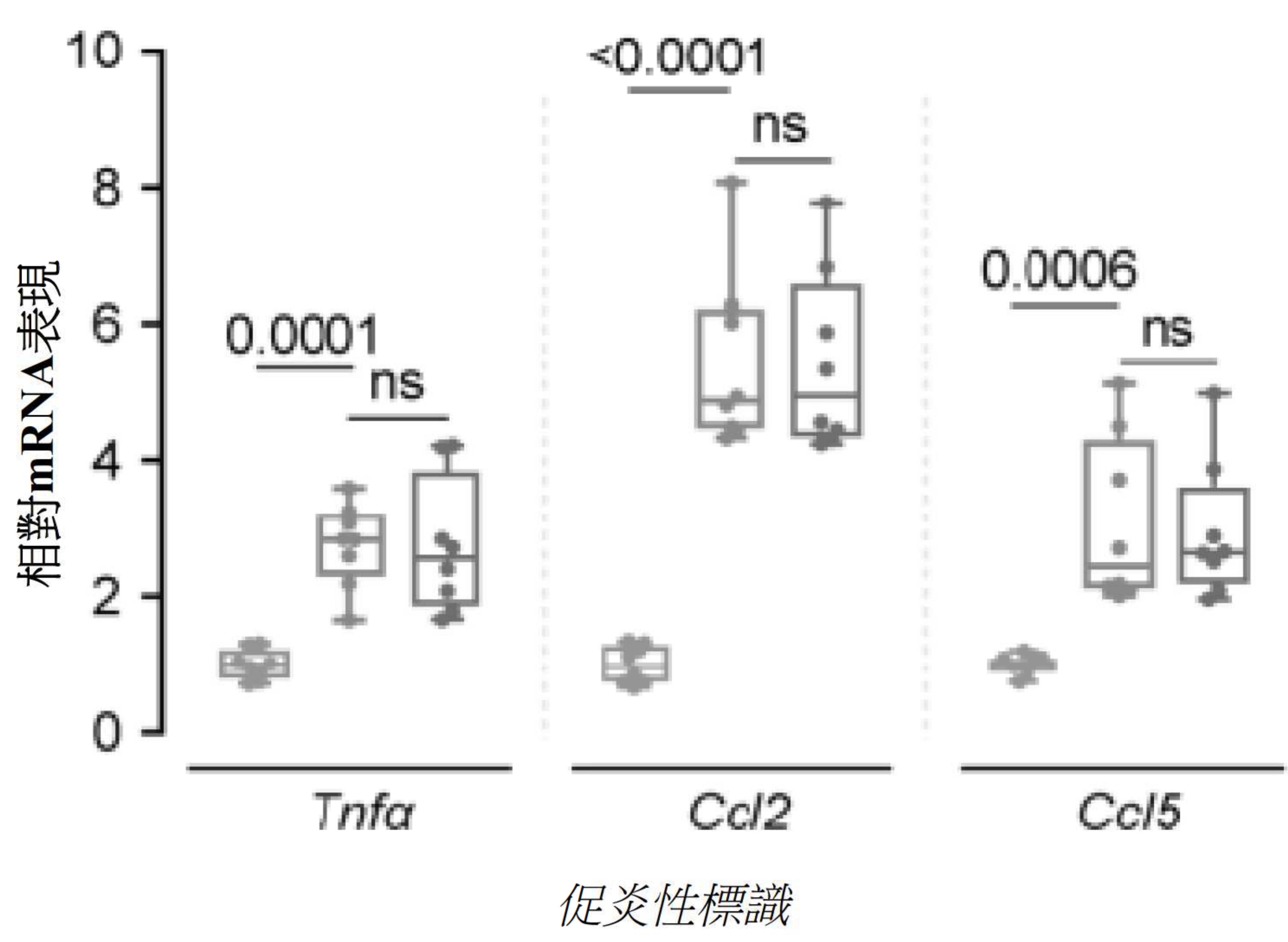
【圖41A】



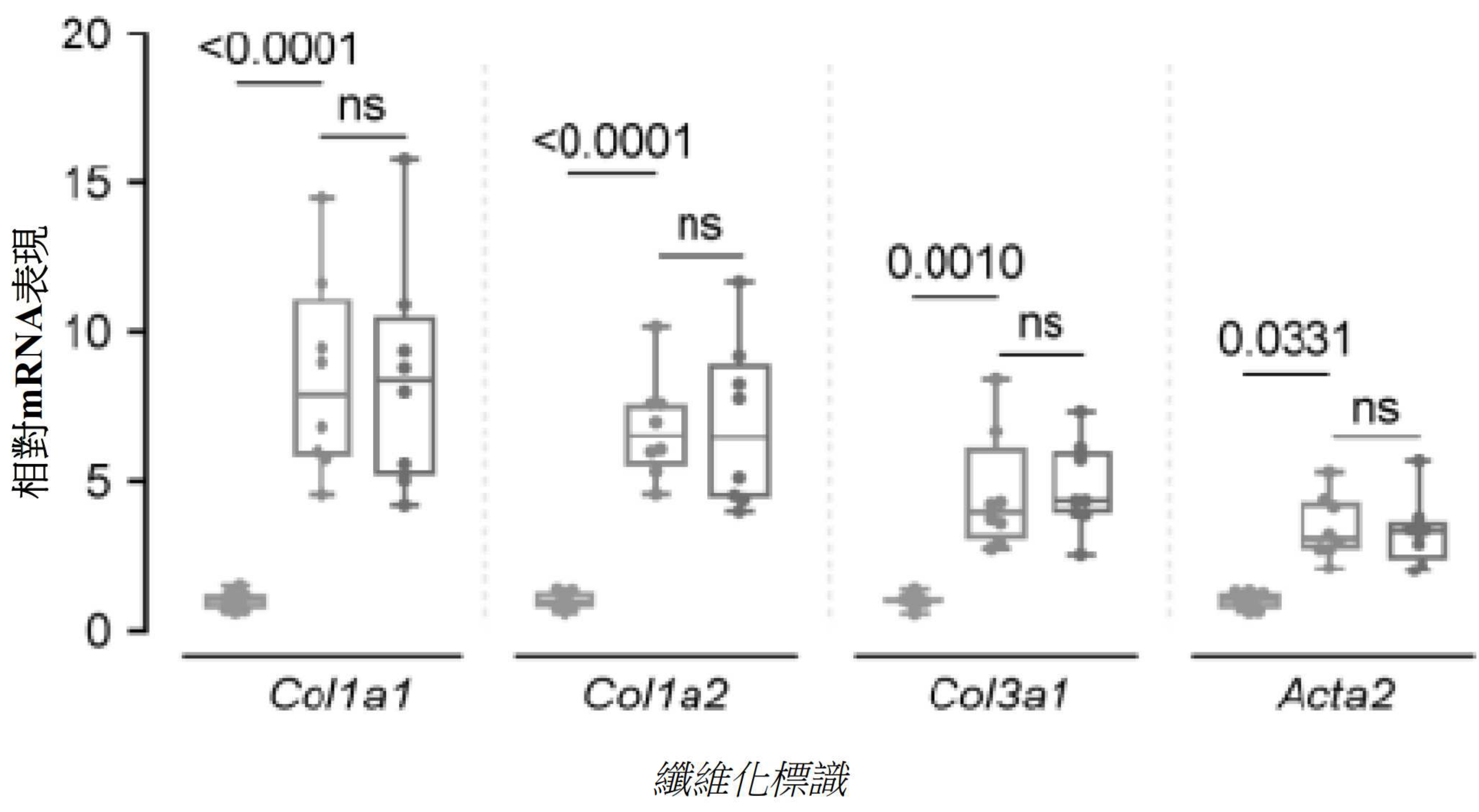
【圖41B】



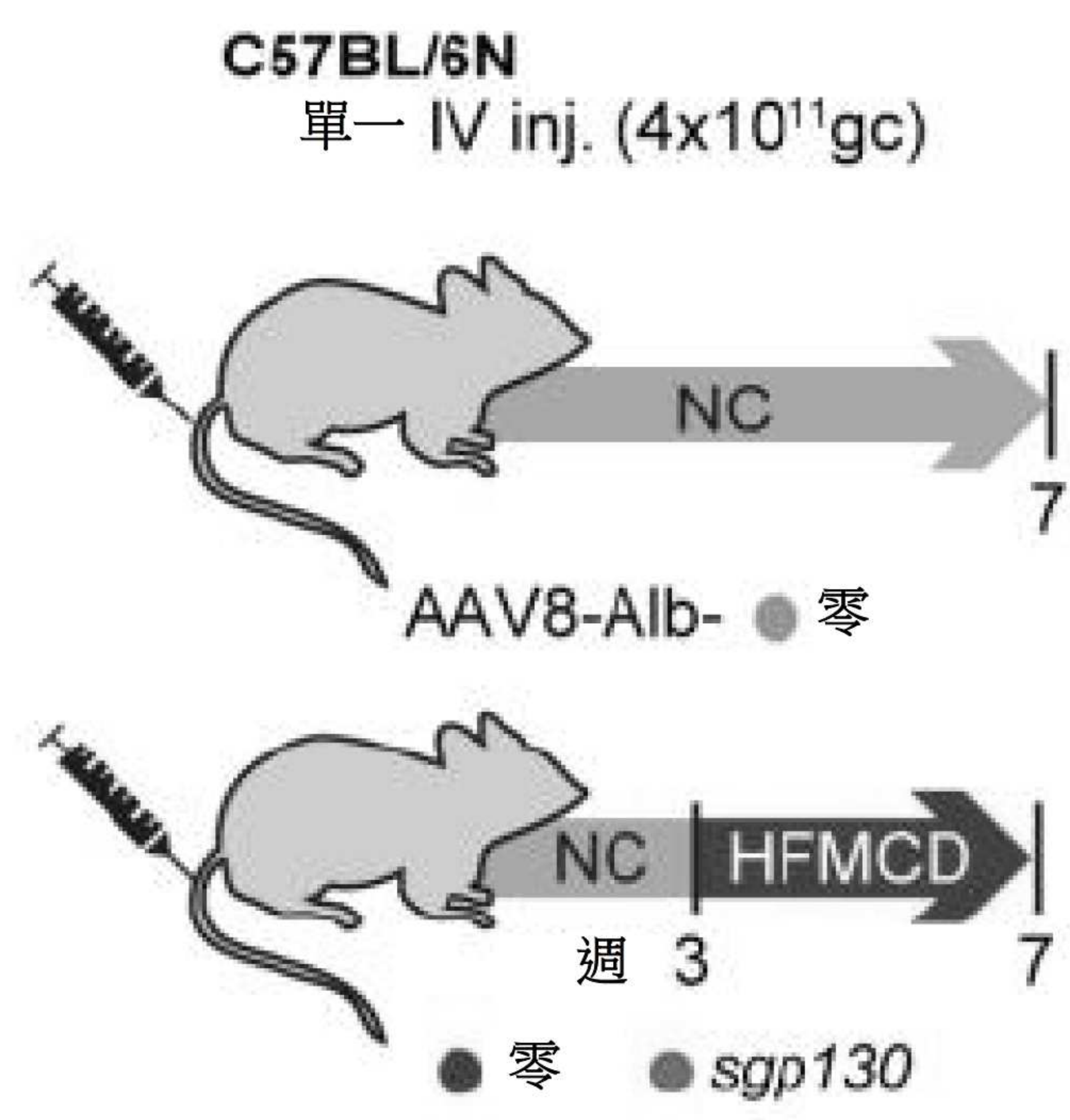
【圖41C】



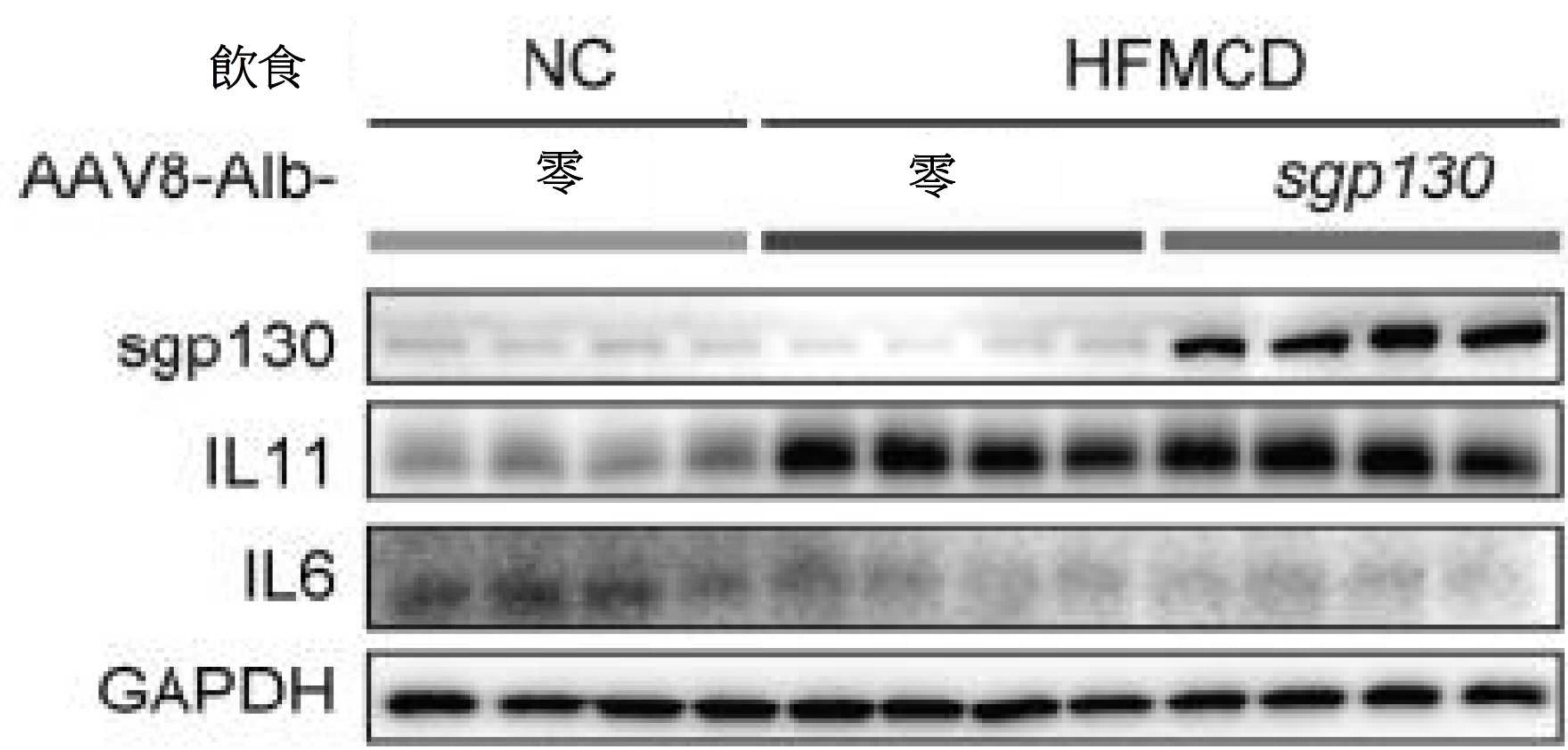
【圖41D】



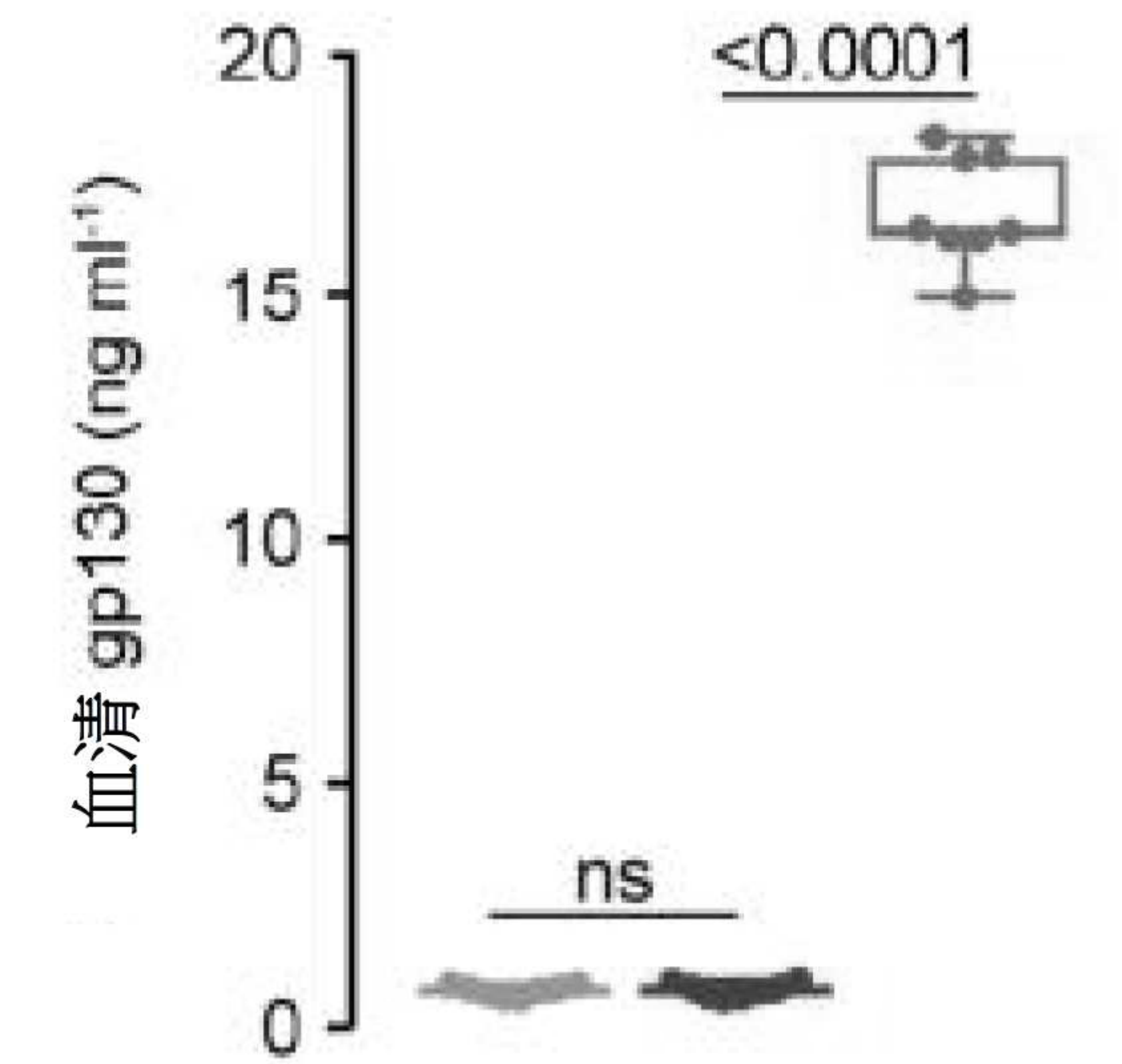
【圖41E】



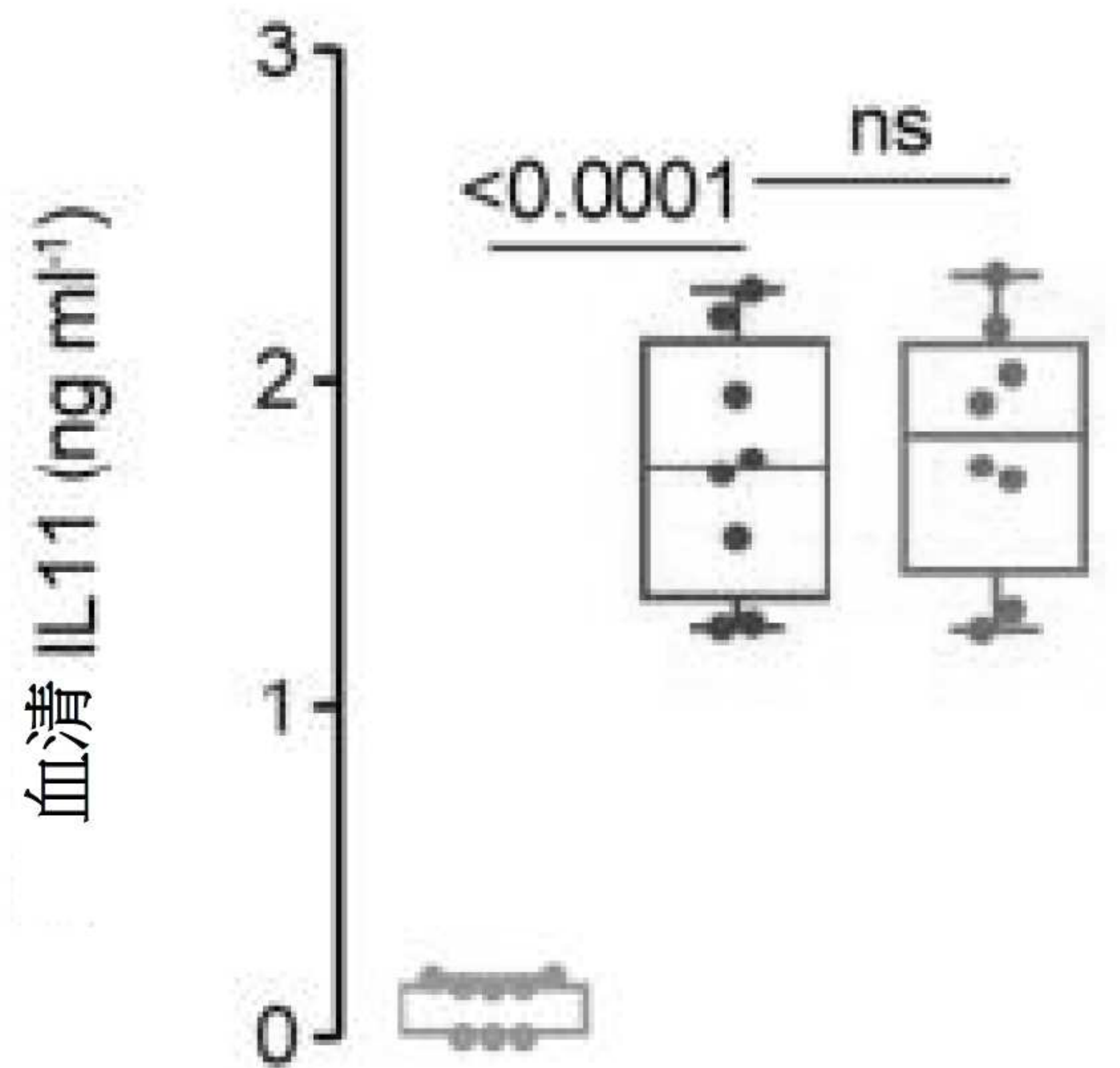
【圖42A】



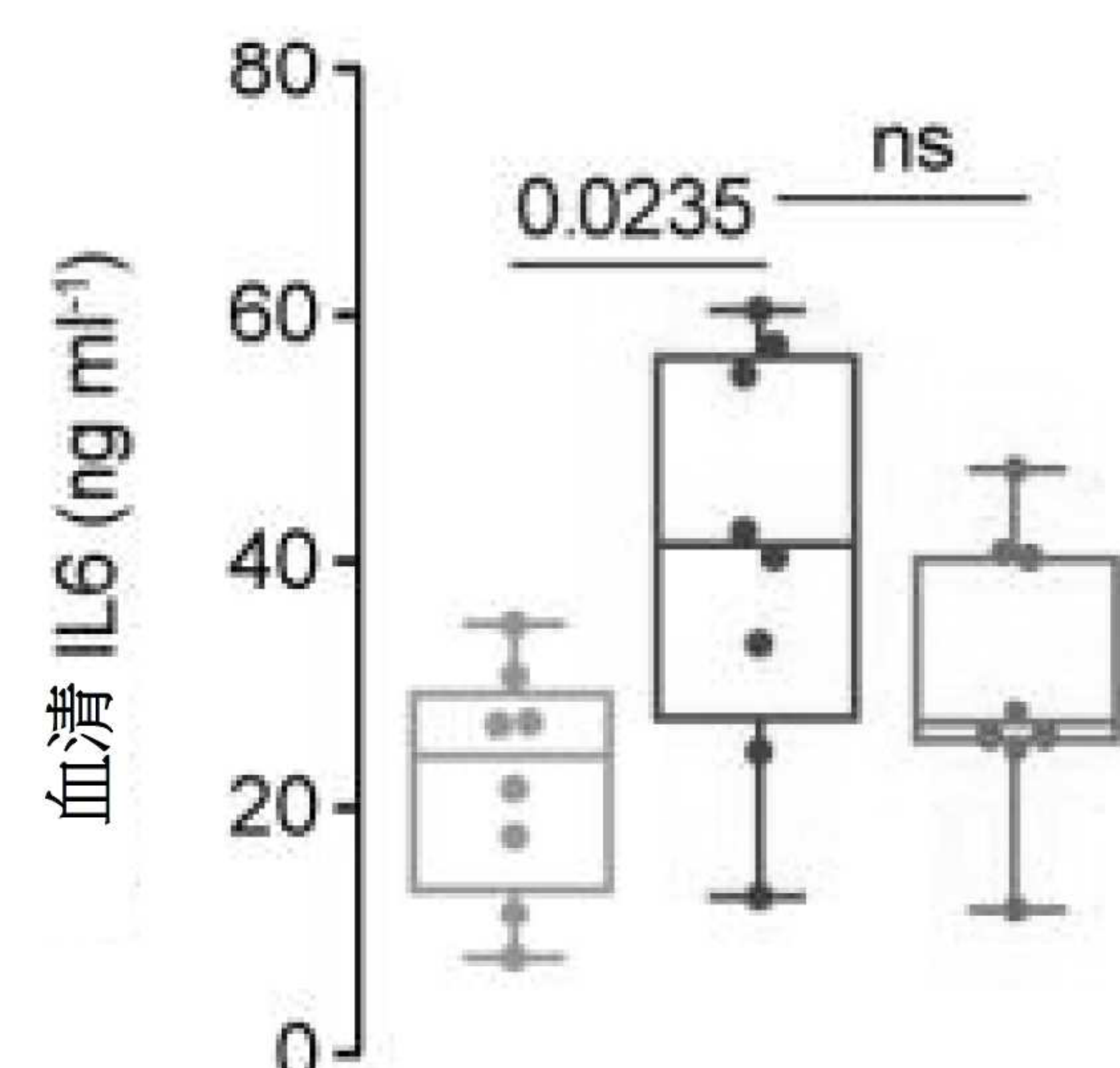
【圖42B】



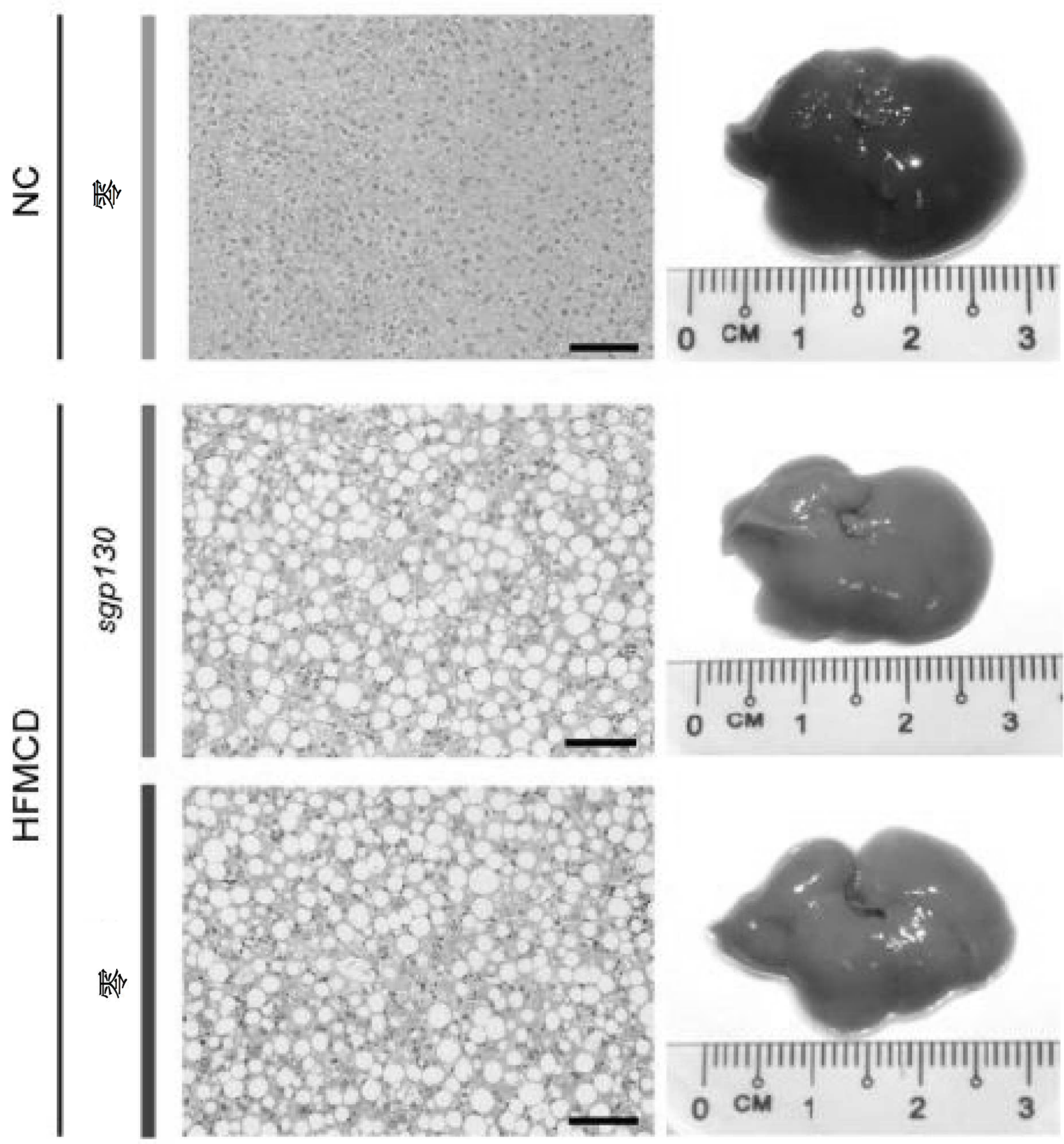
【圖42C】



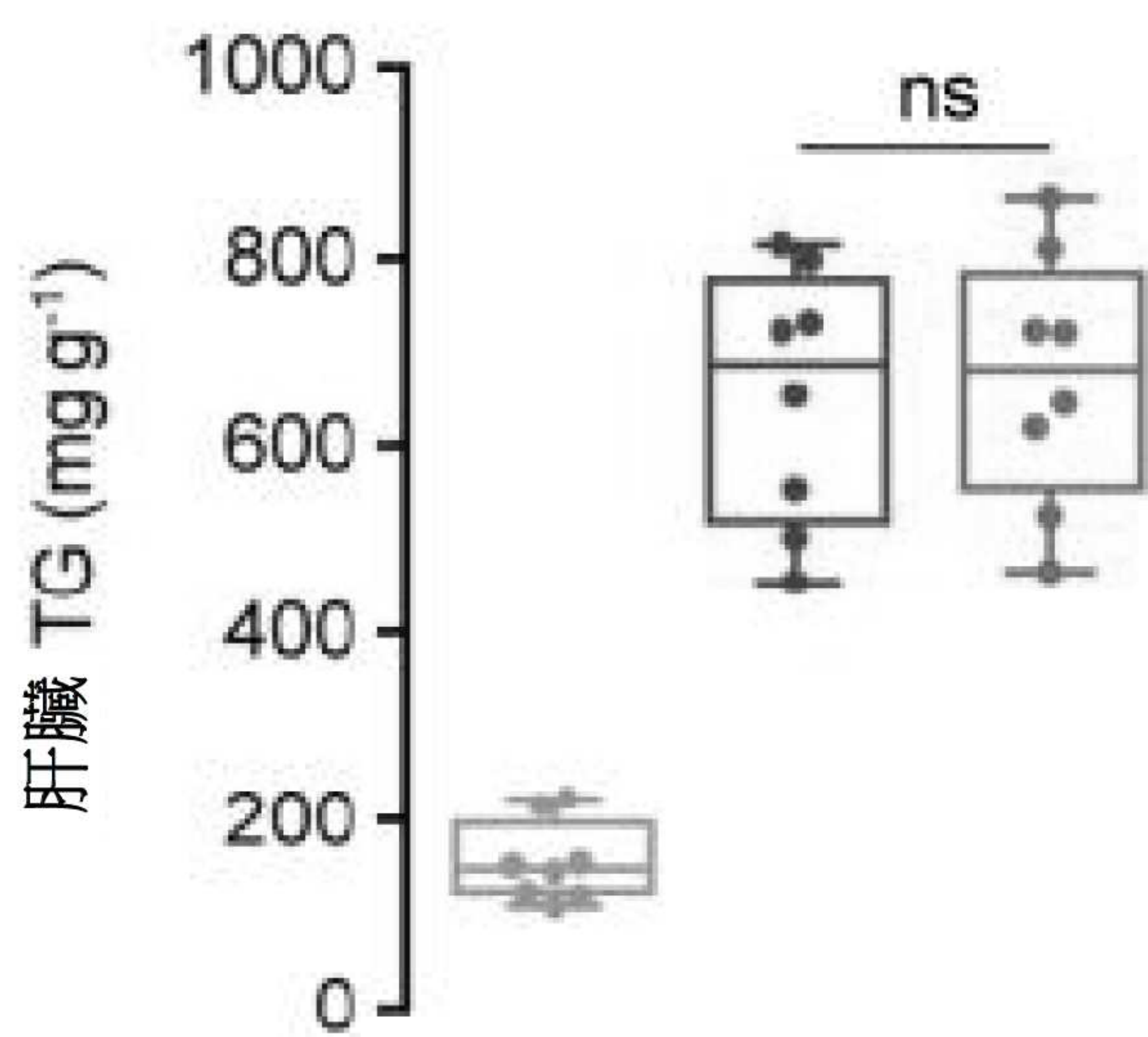
【圖42D】



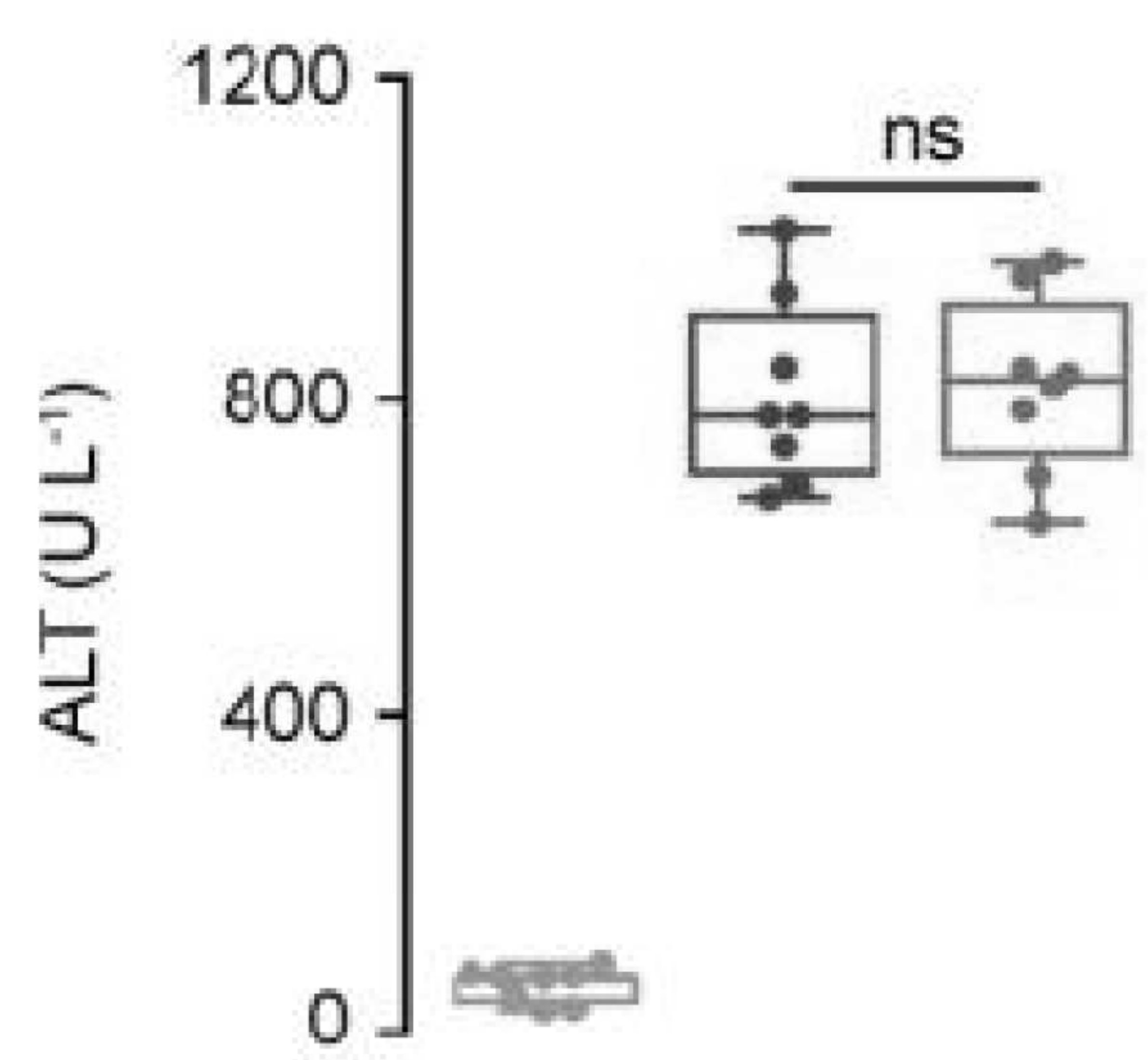
【圖42E】



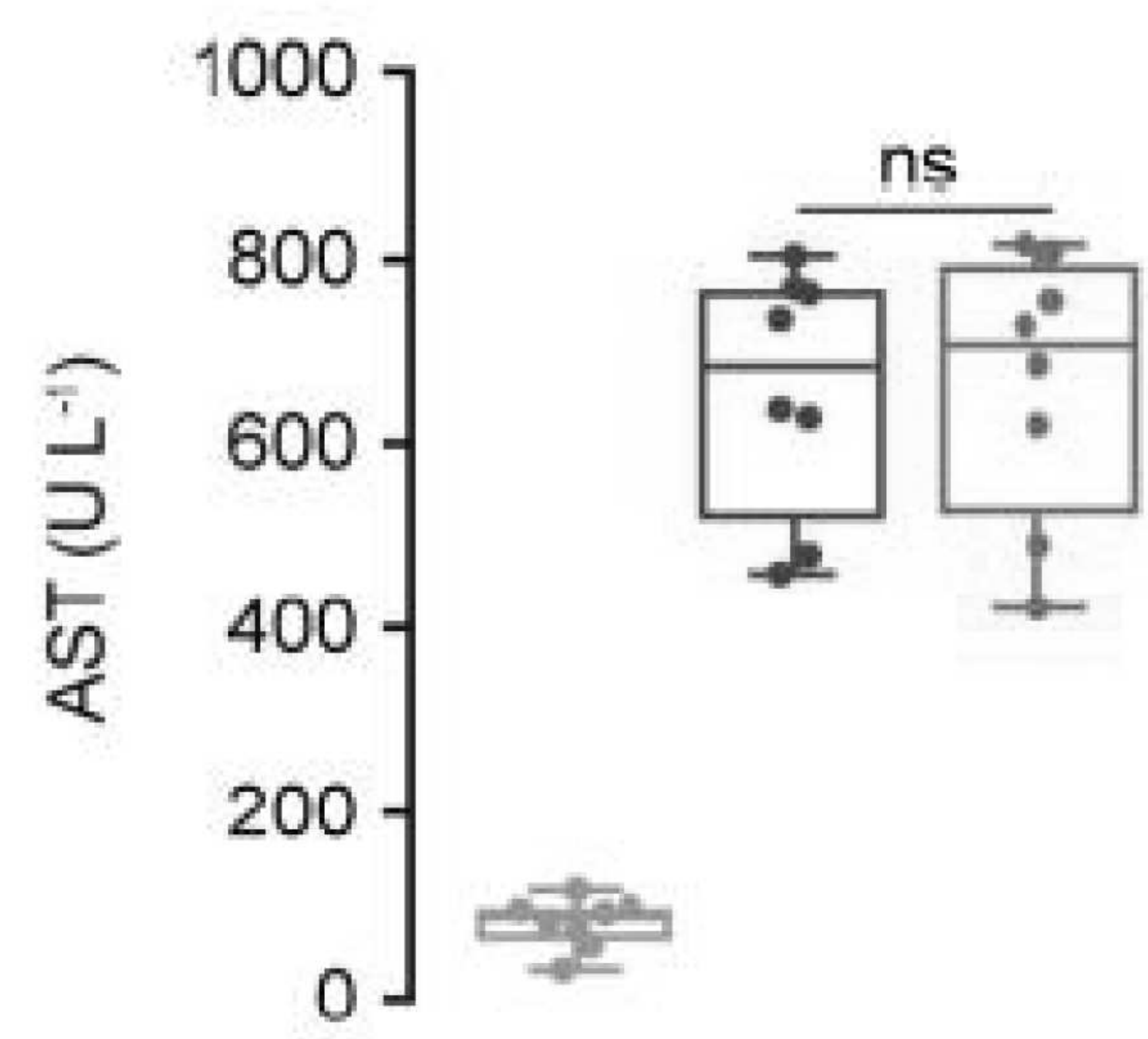
【圖42F】



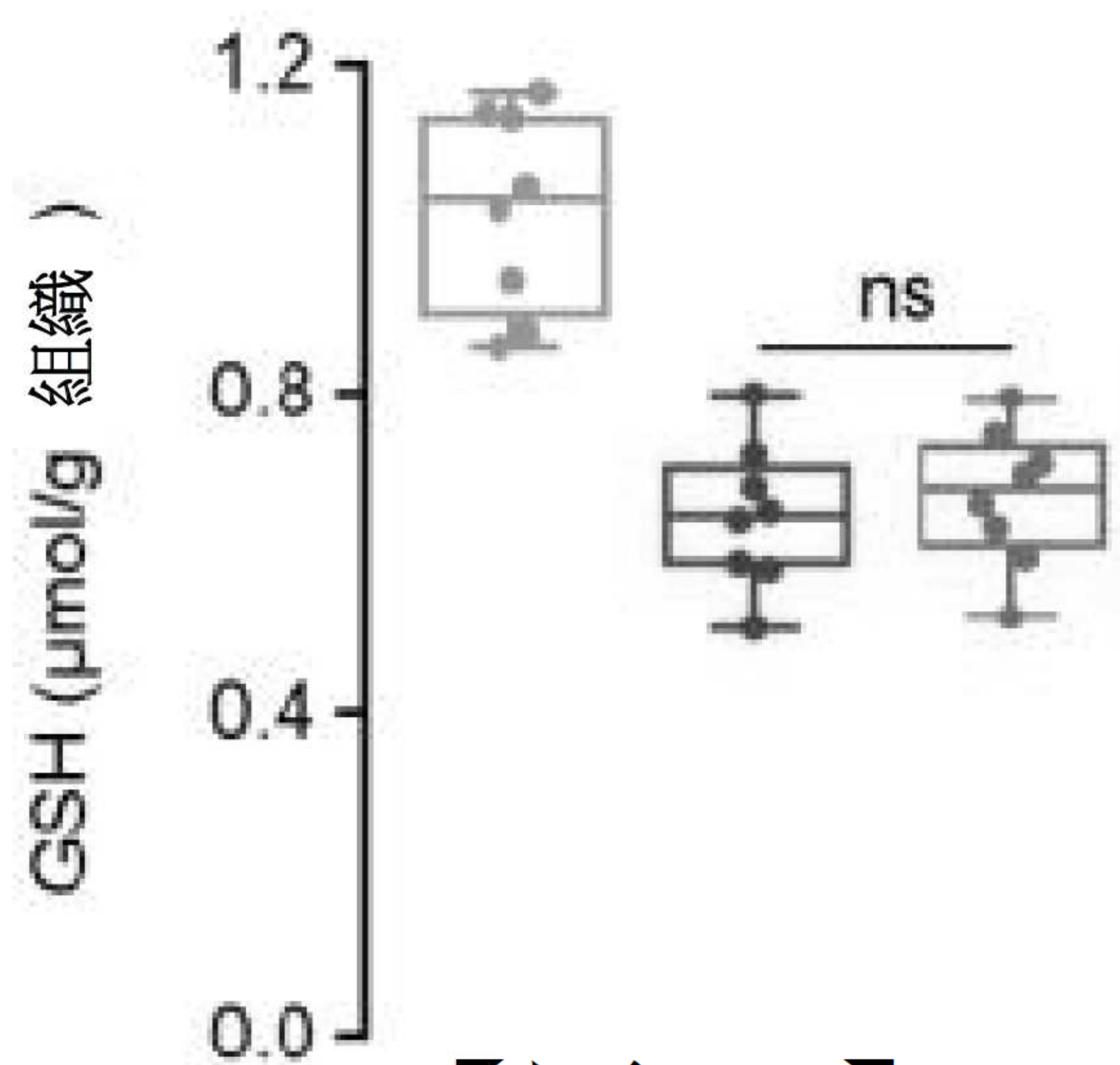
【圖42G】



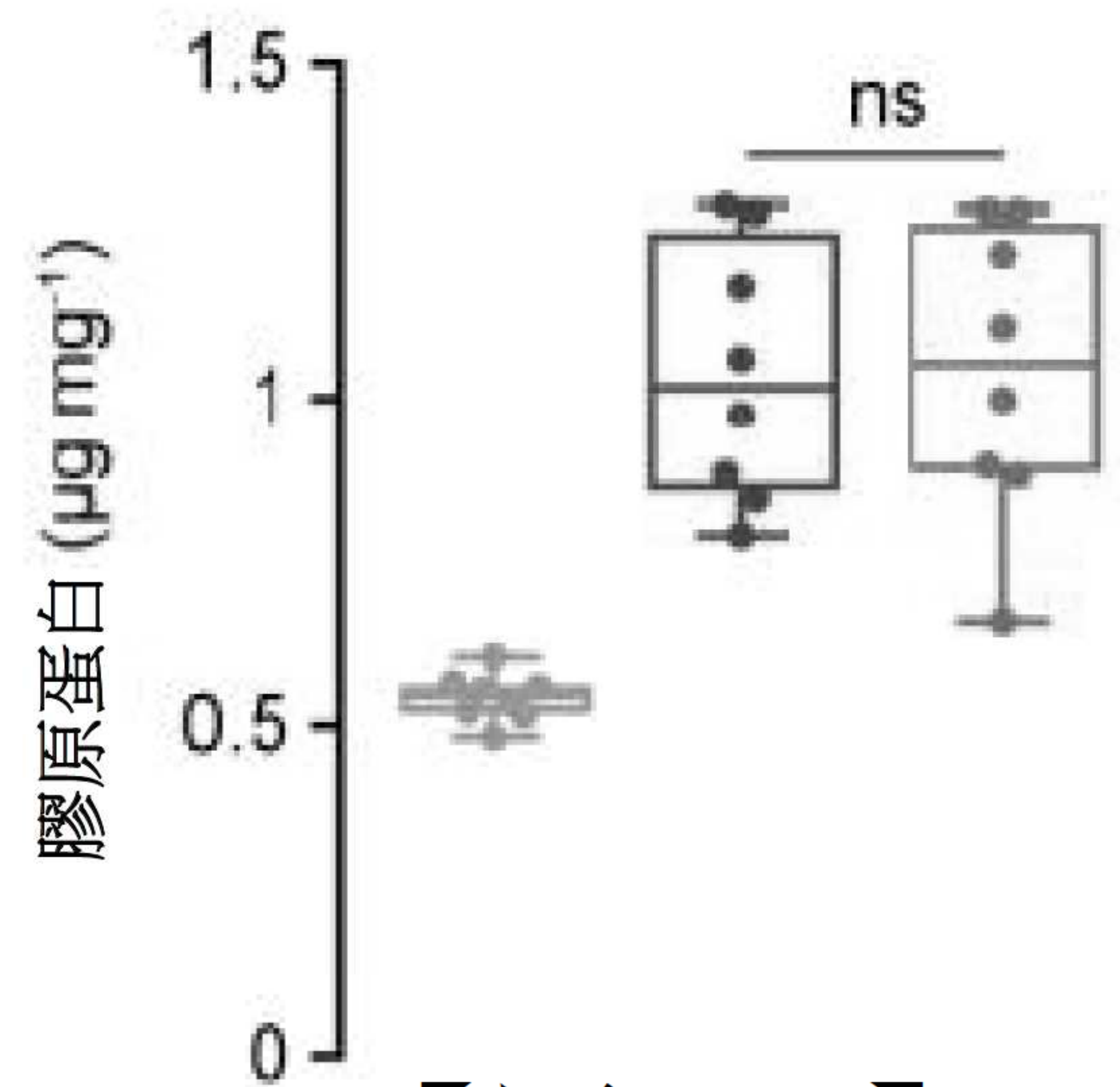
【圖42H】



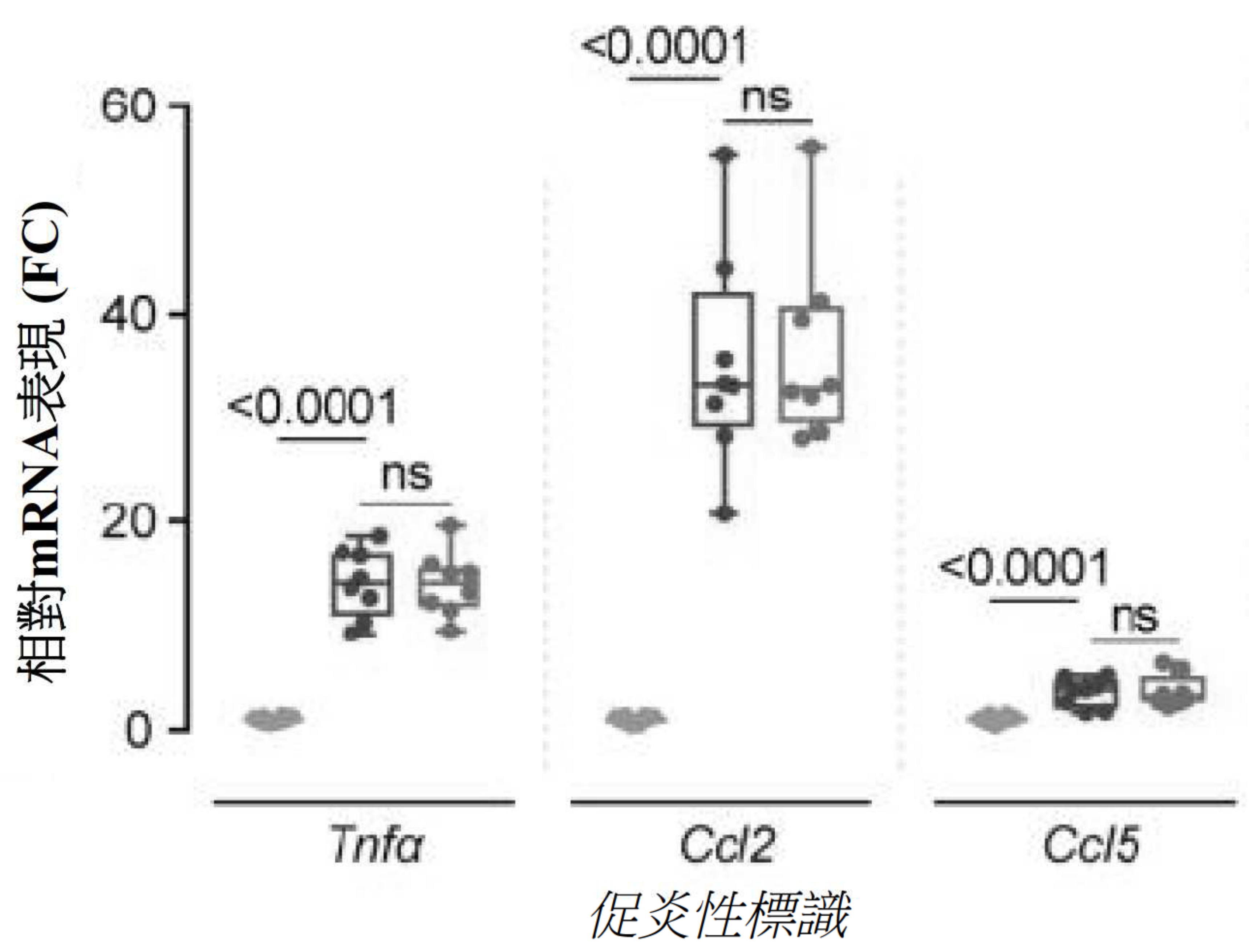
【圖42I】



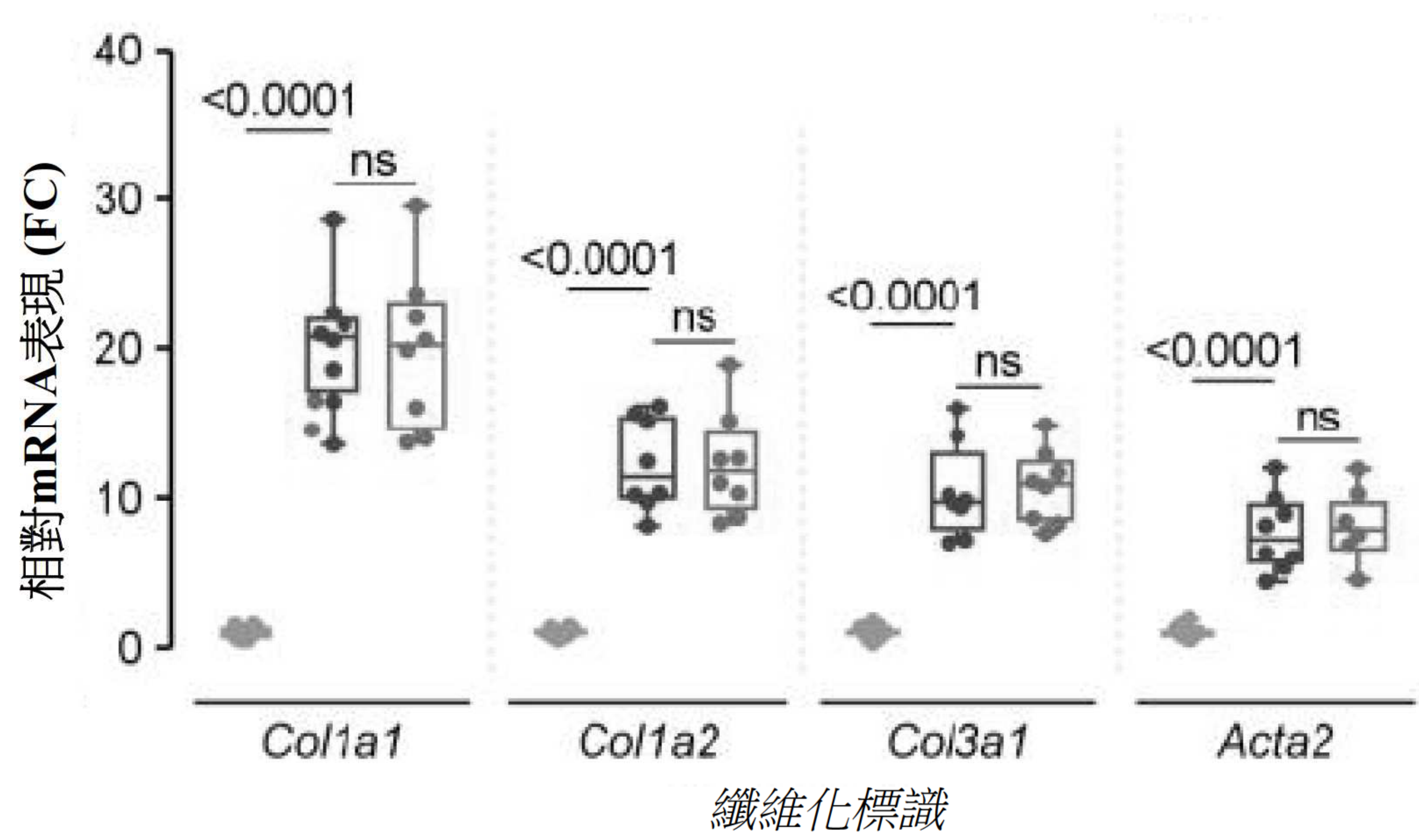
【圖42J】



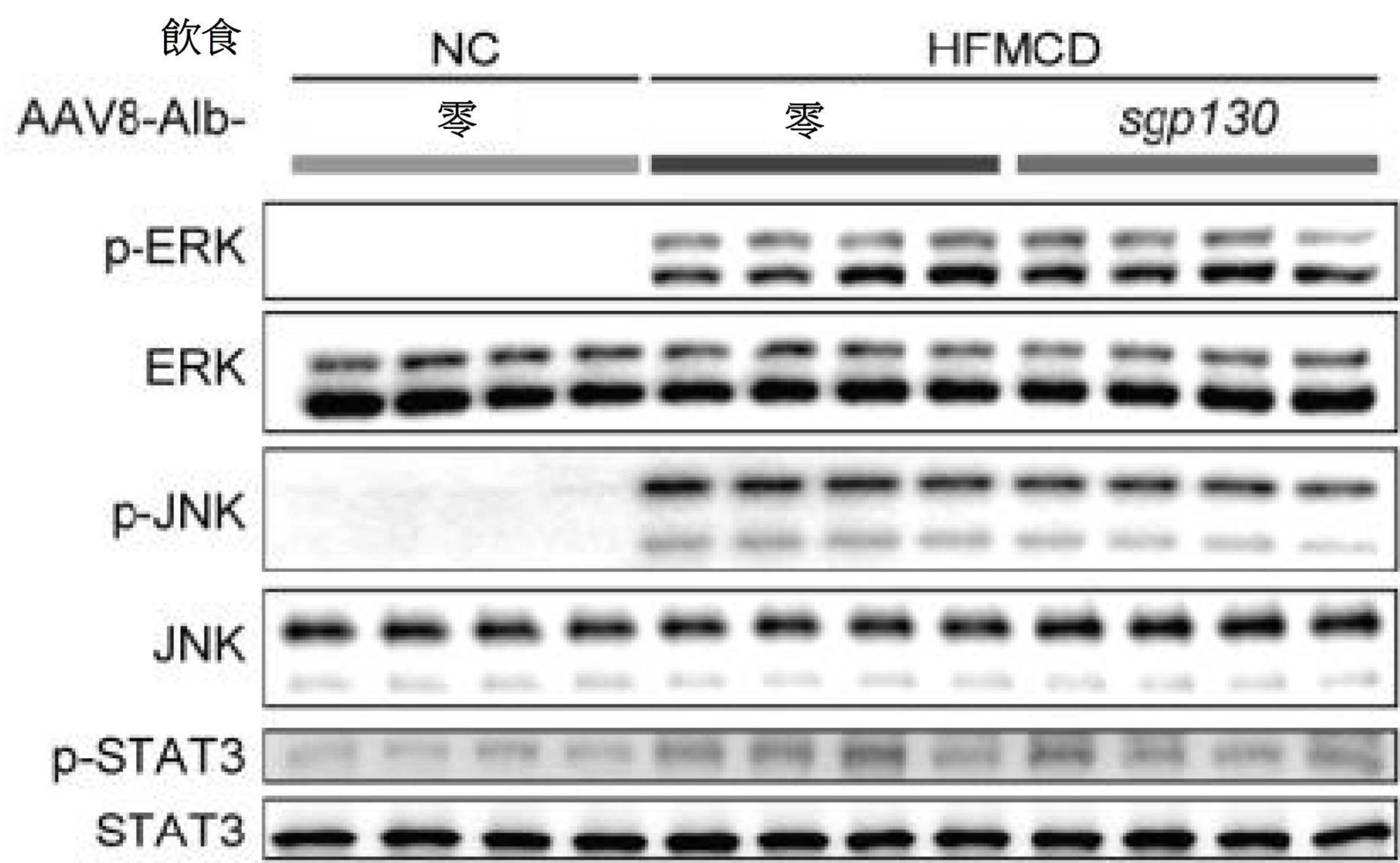
【圖42K】



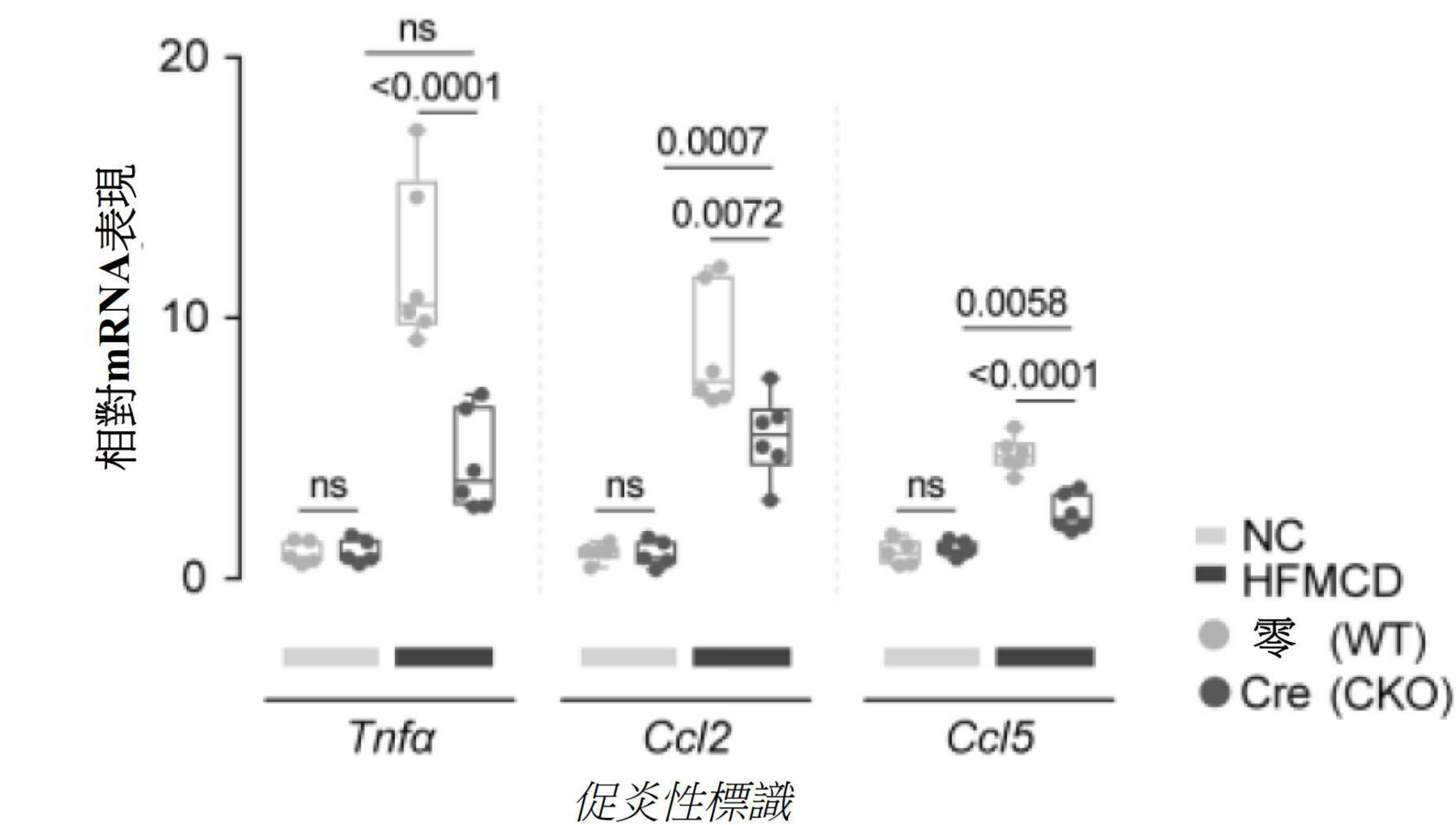
【圖42L】



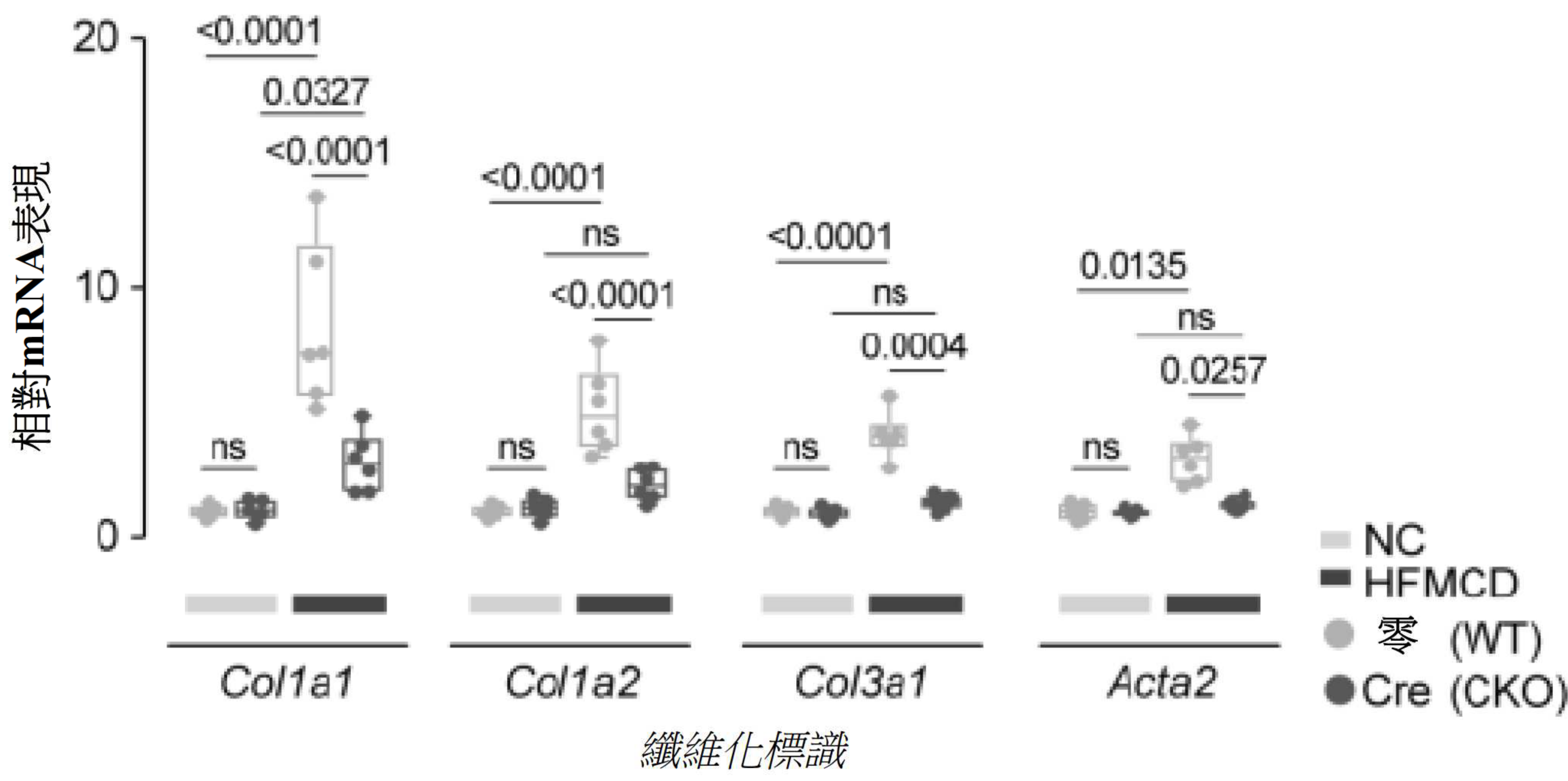
【圖42M】



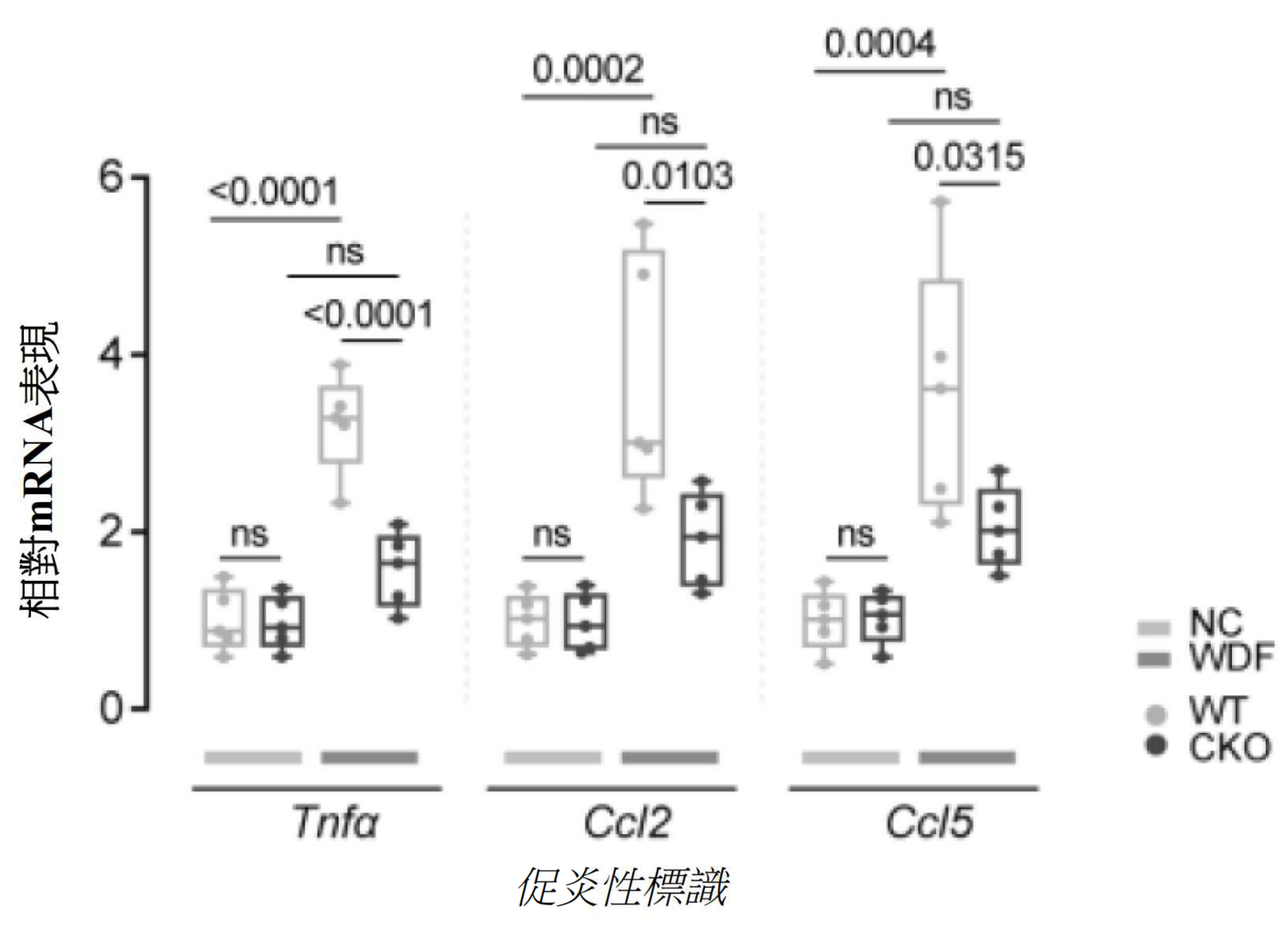
【圖42N】



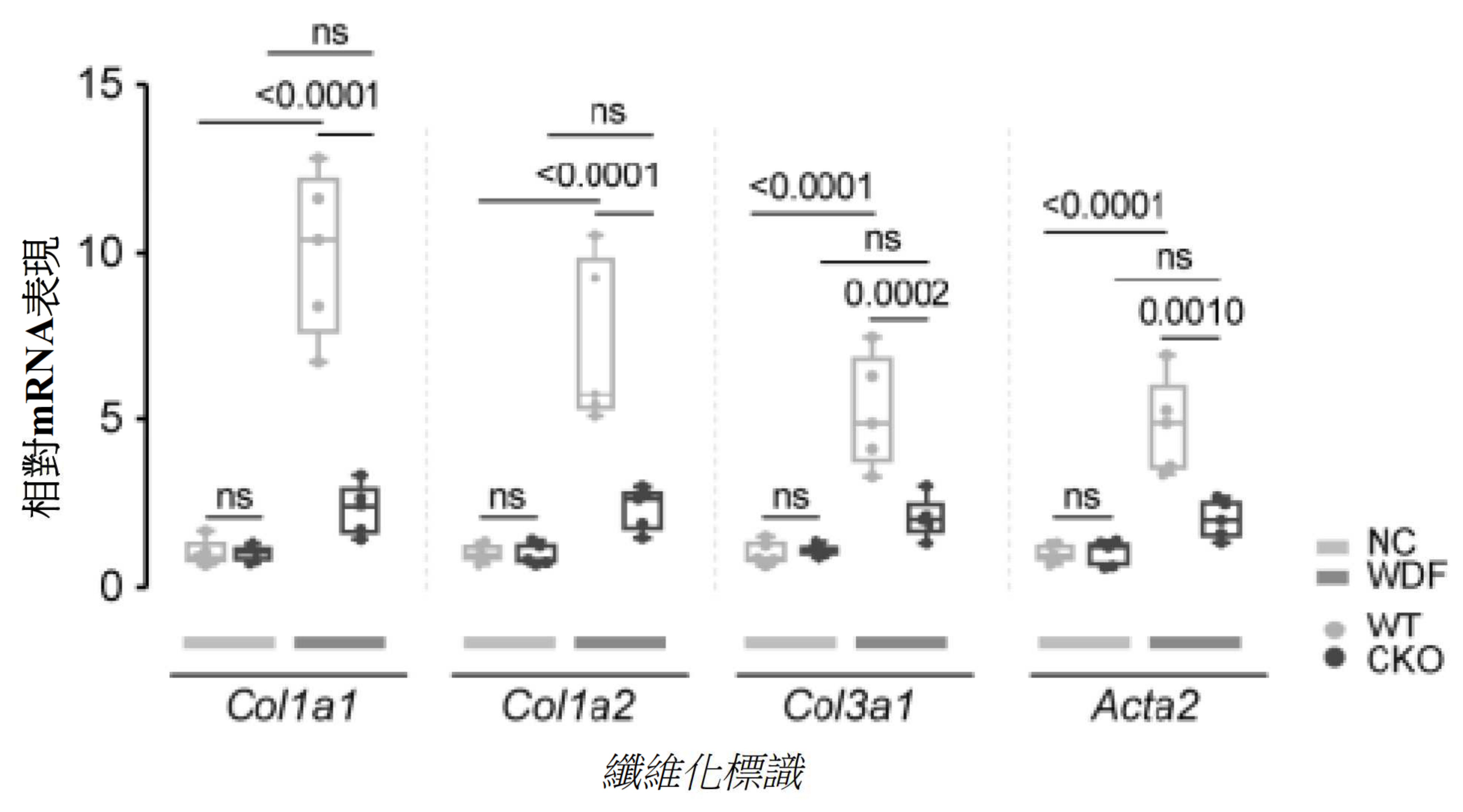
【圖43A】



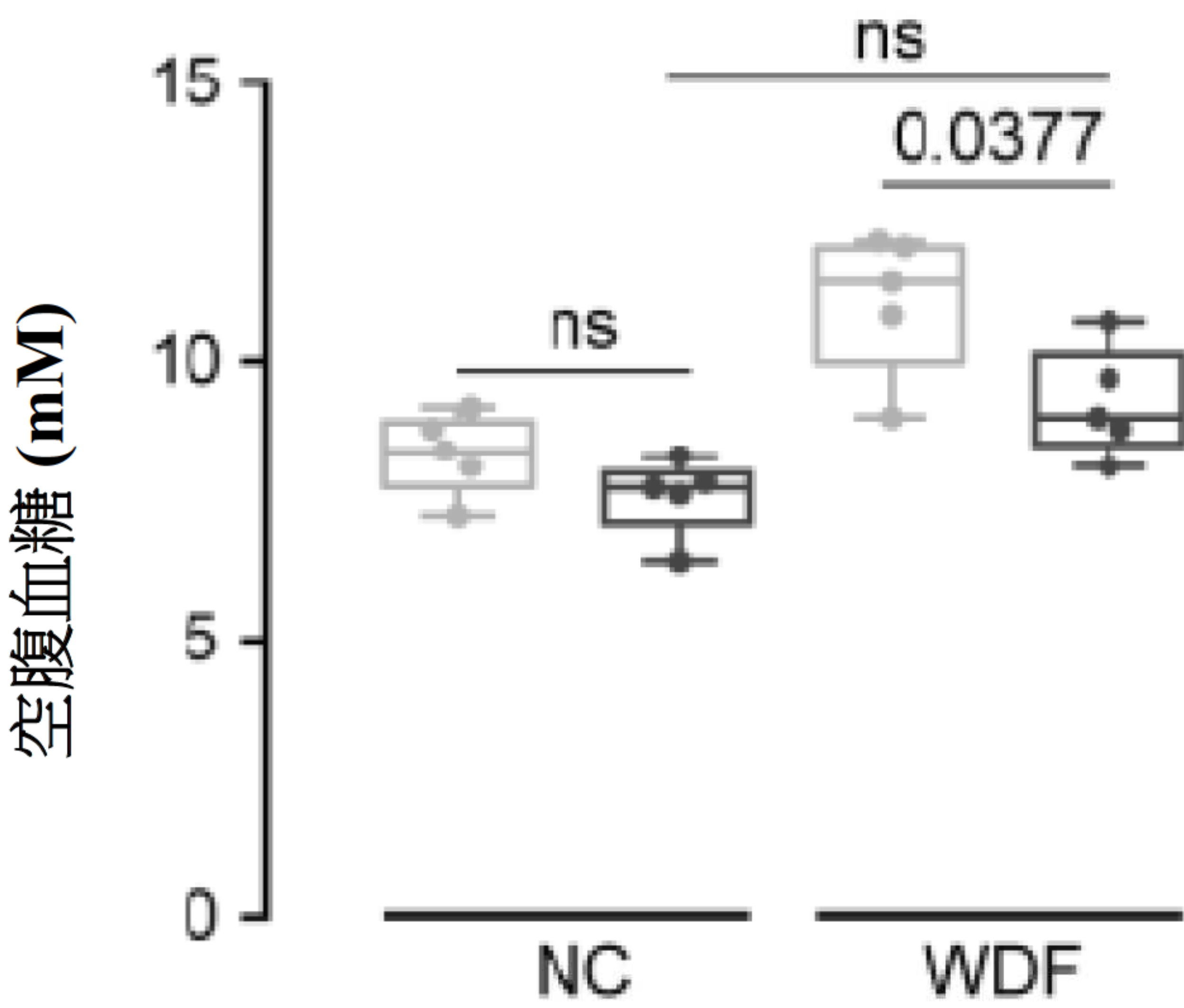
【圖43B】



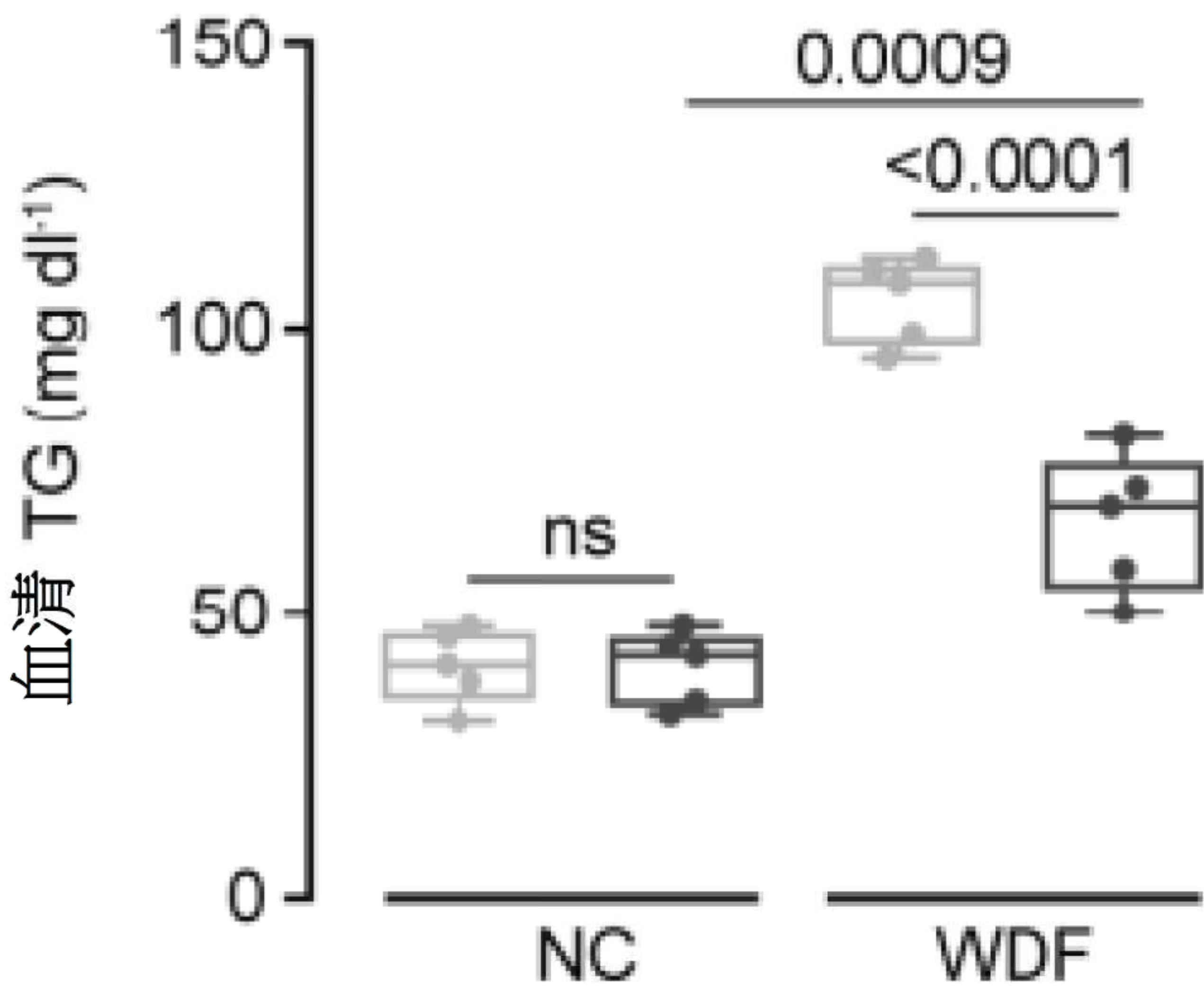
【圖44A】



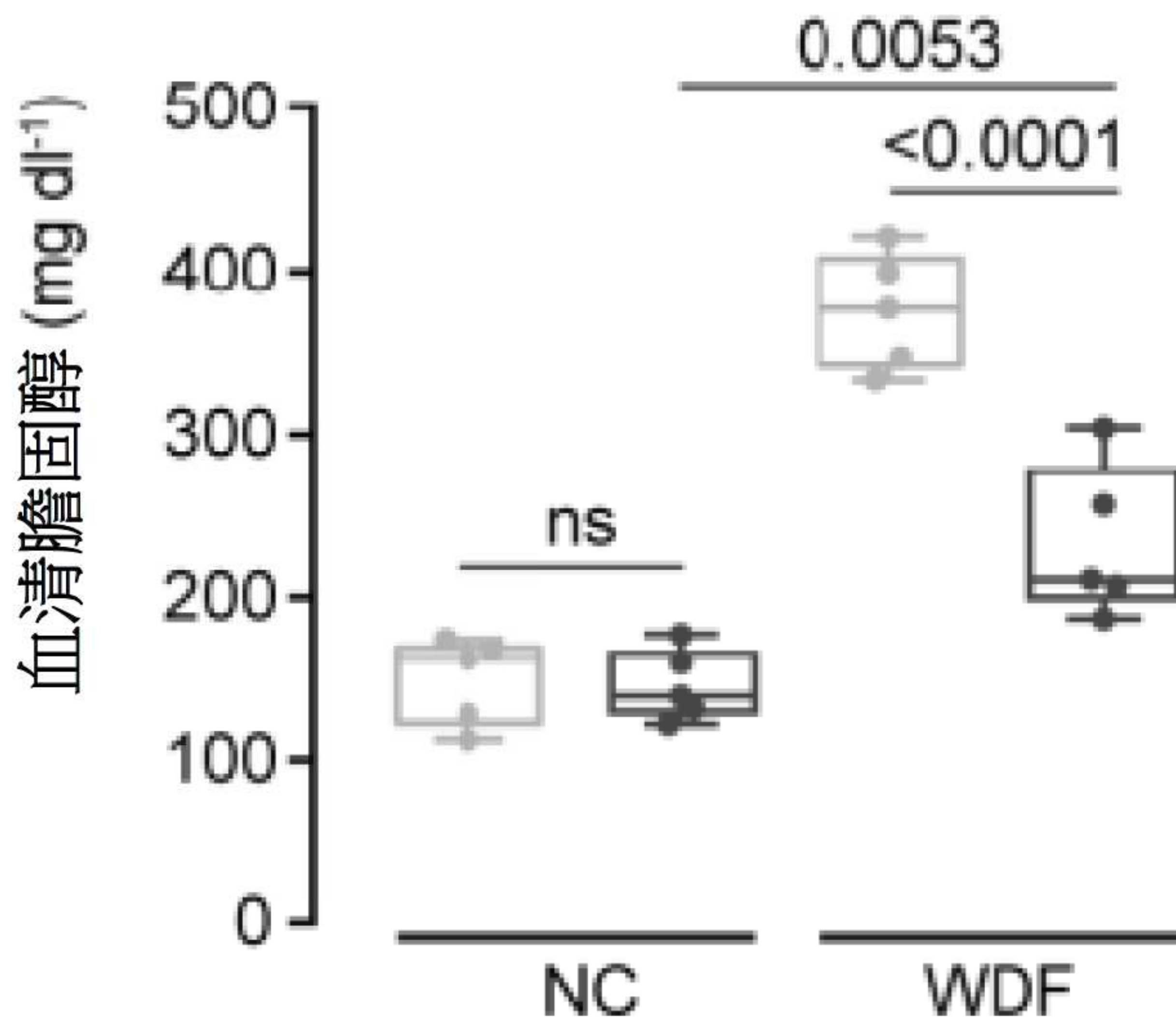
【圖44B】



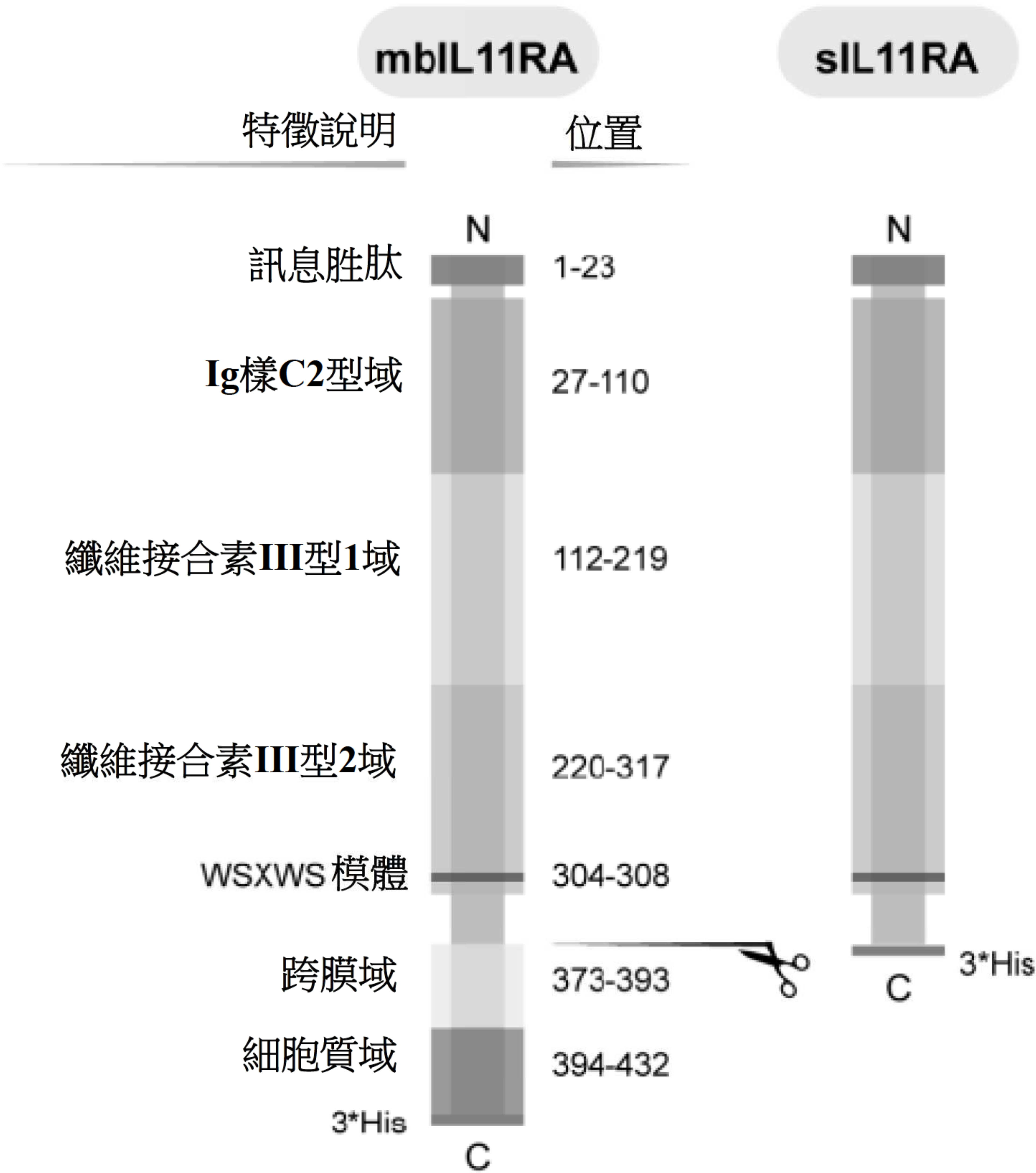
【圖44C】



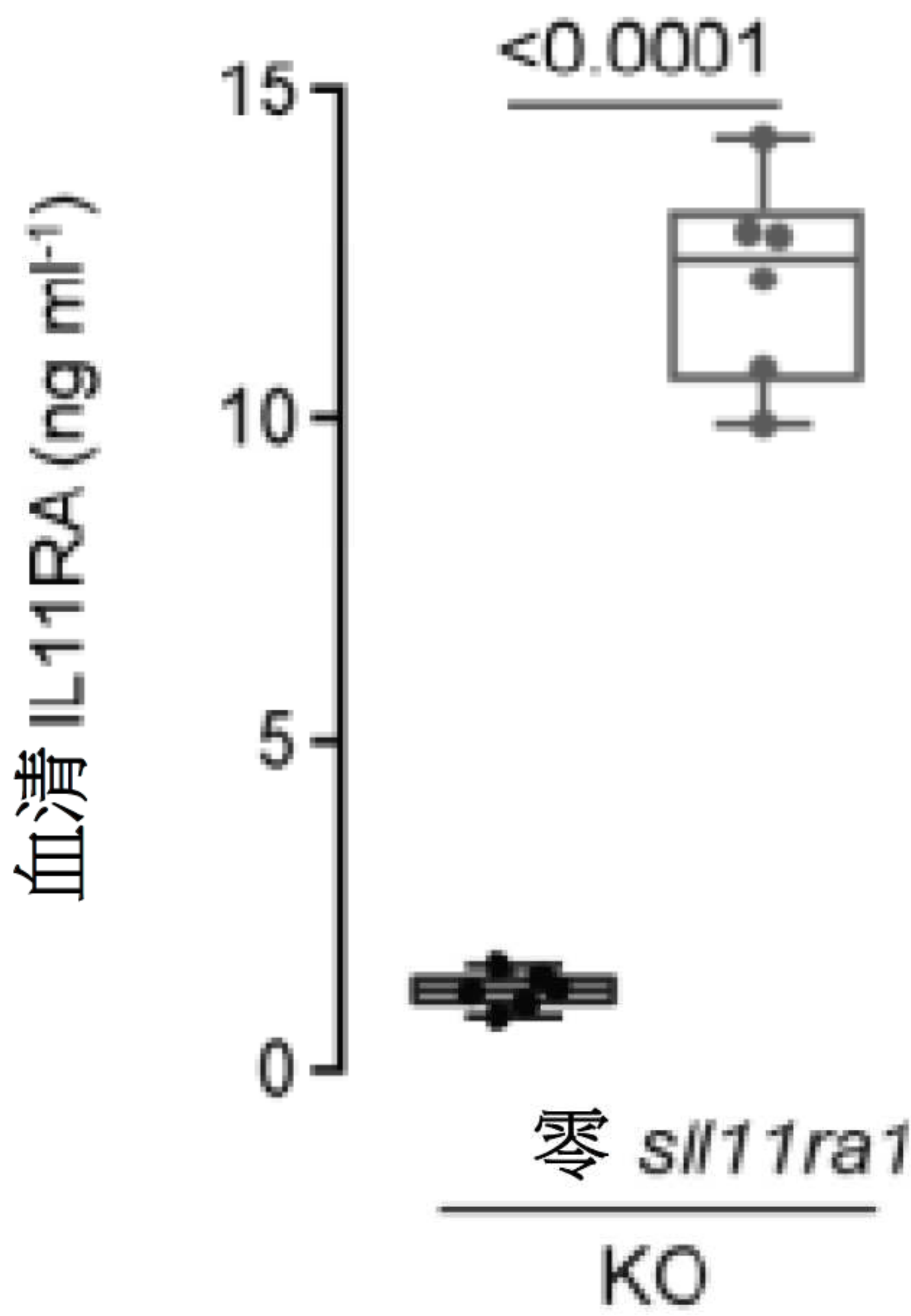
【圖44D】



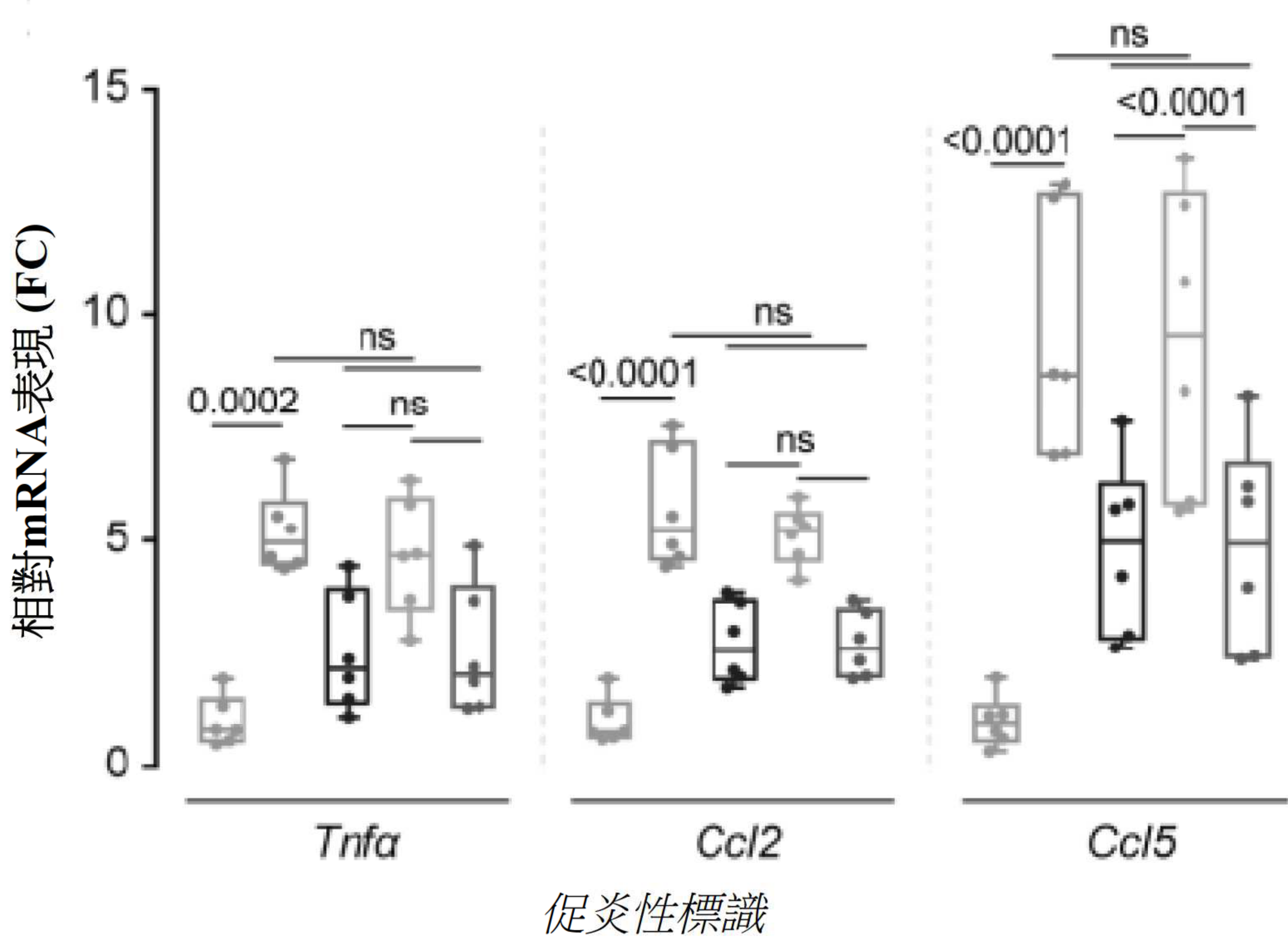
【圖44E】



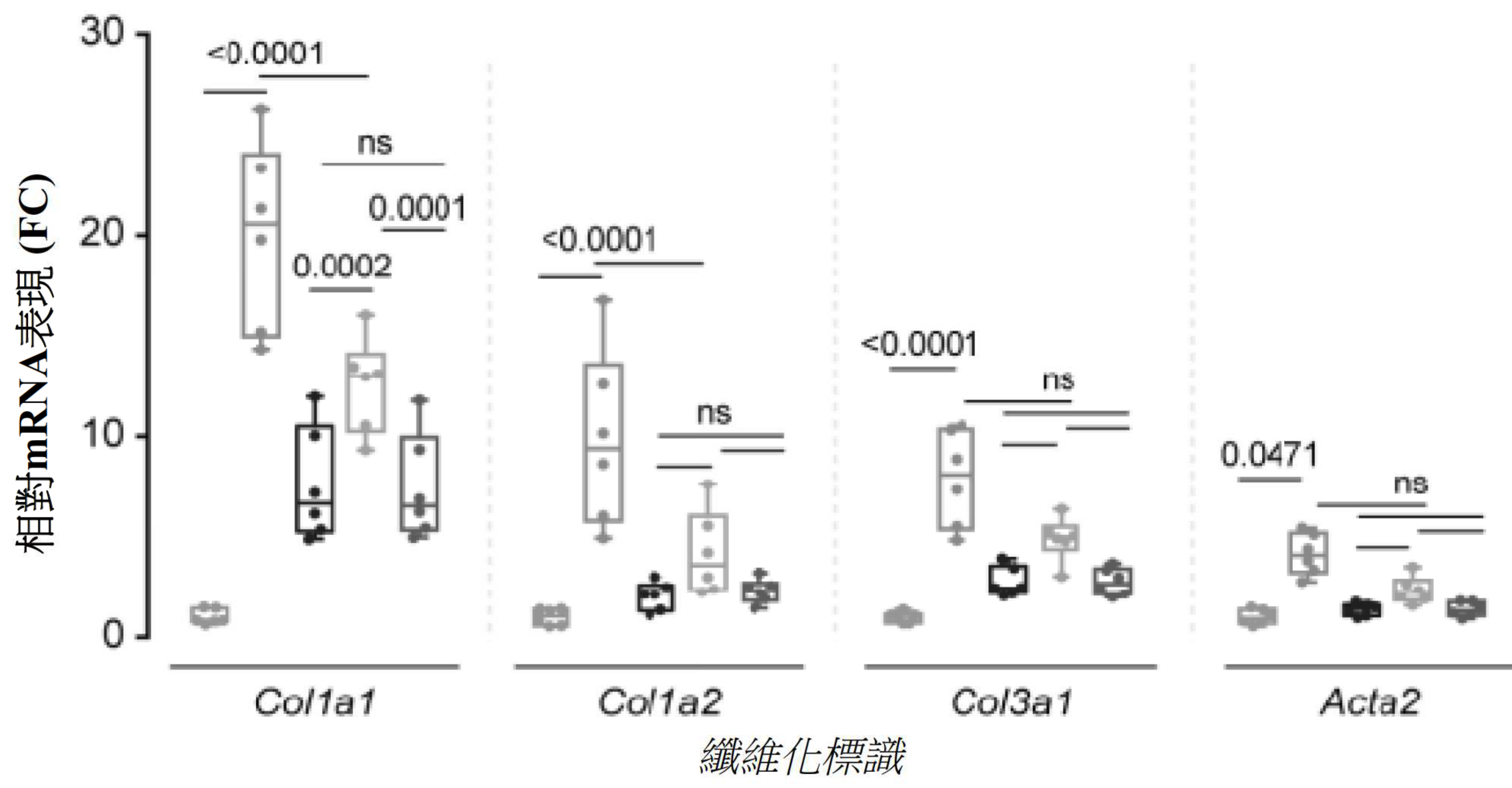
【圖45A】



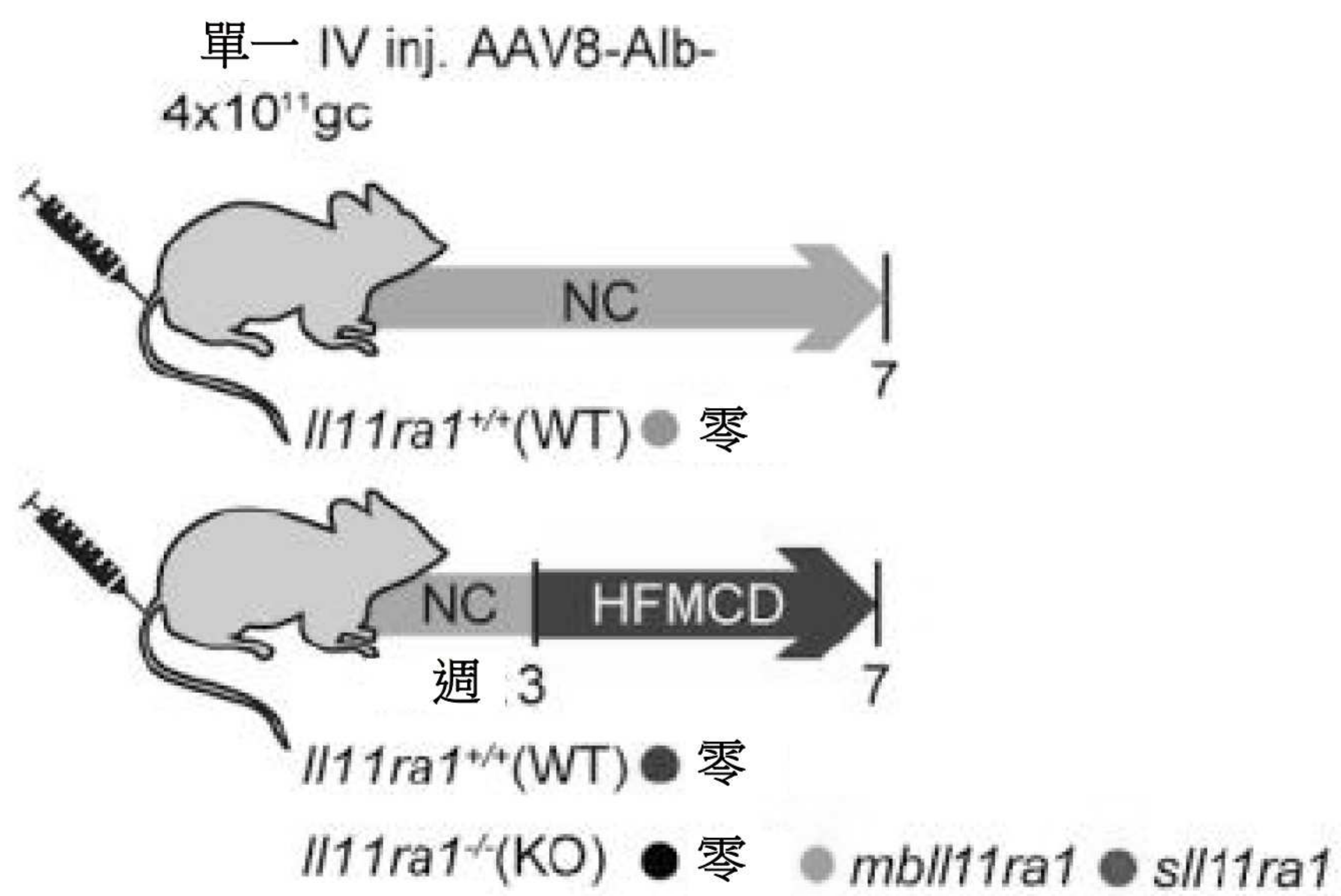
【圖45B】



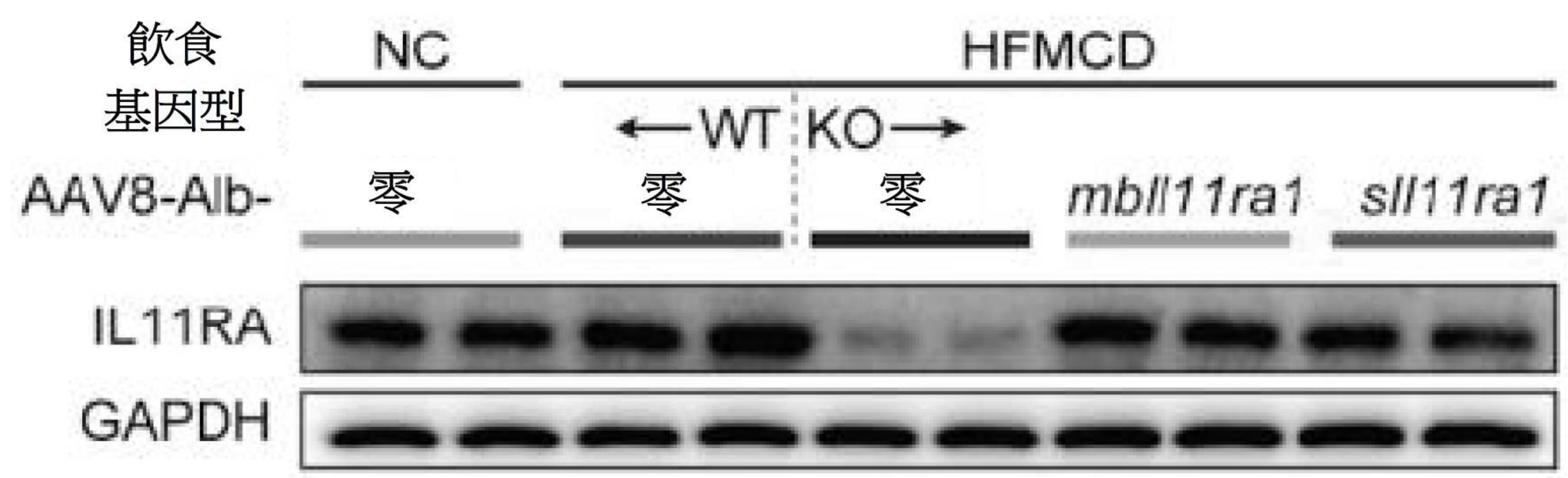
【圖45C】



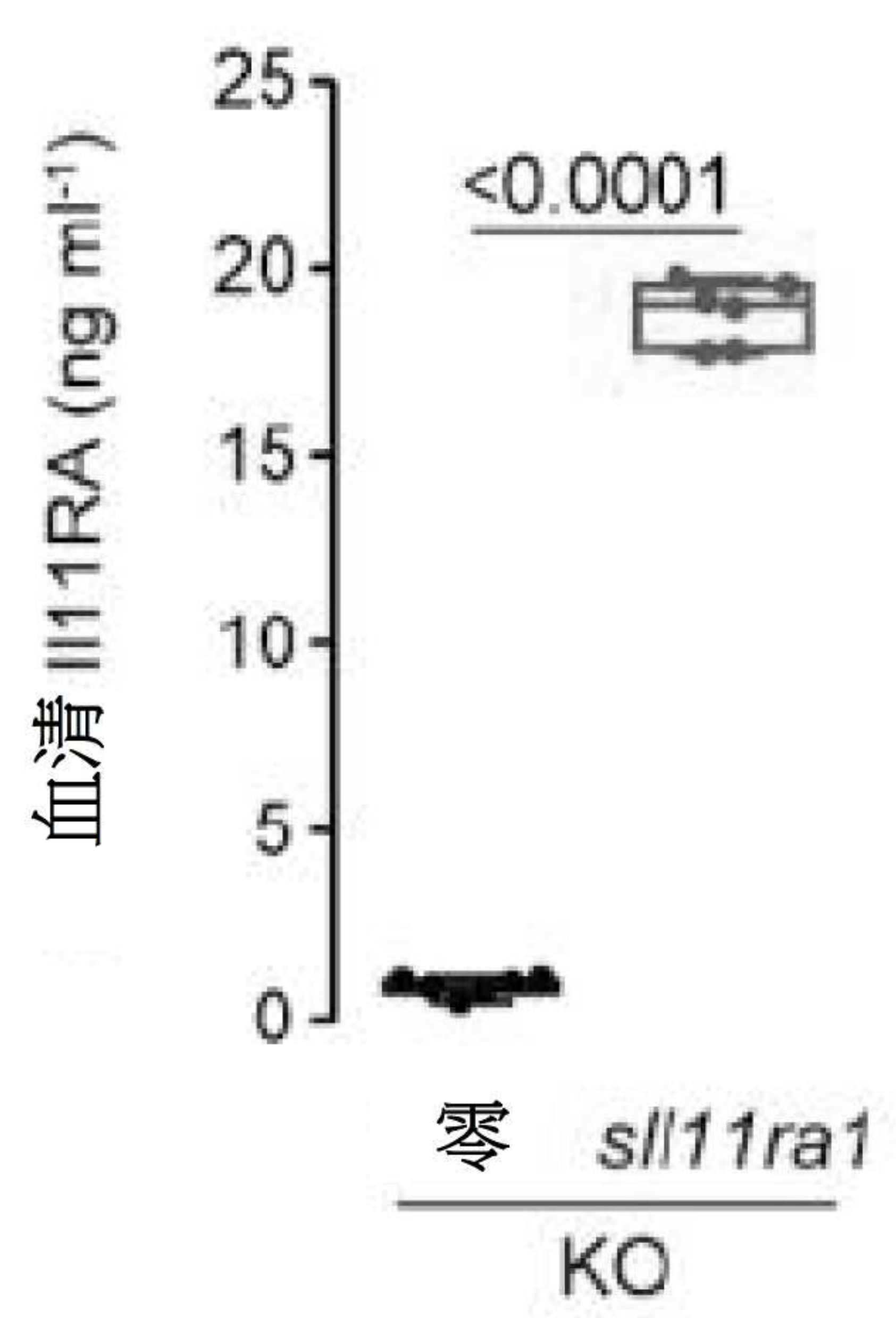
【圖45D】



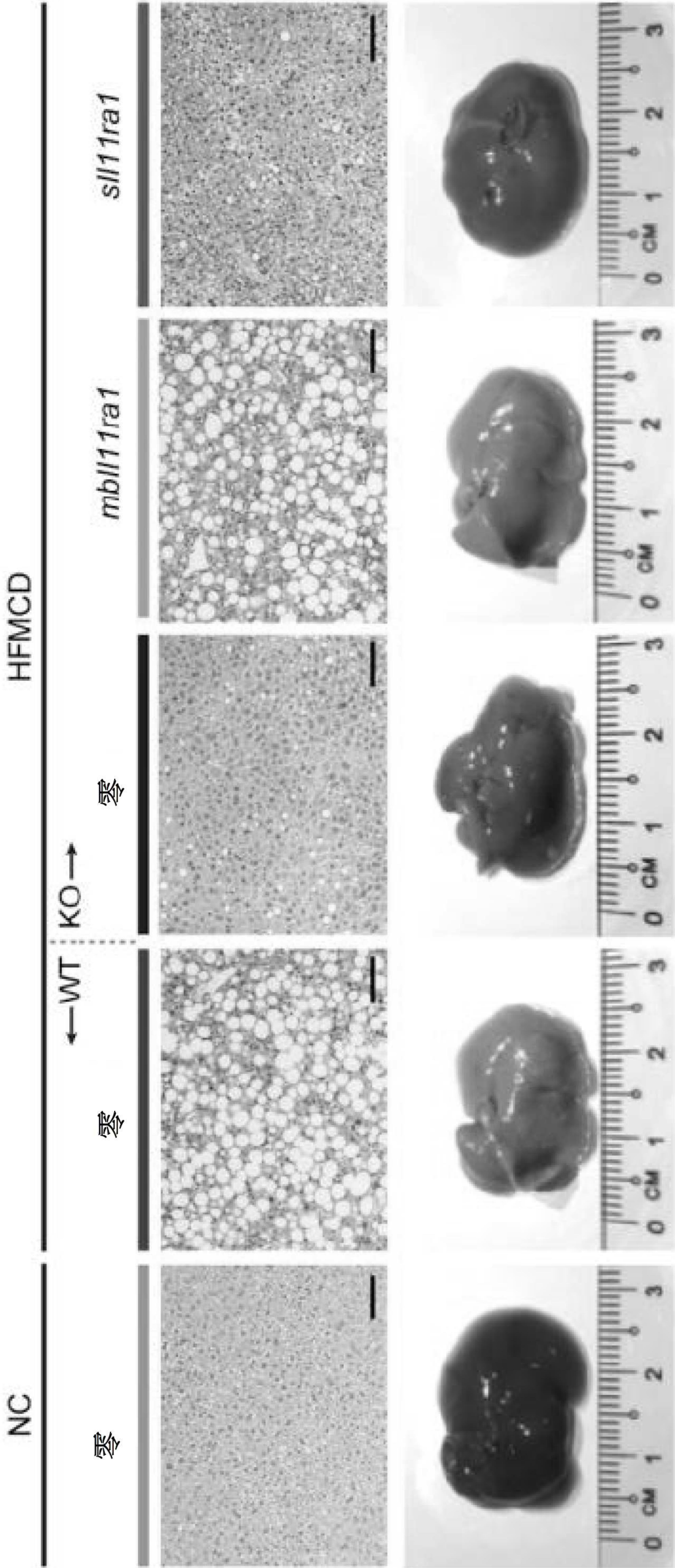
【圖46A】



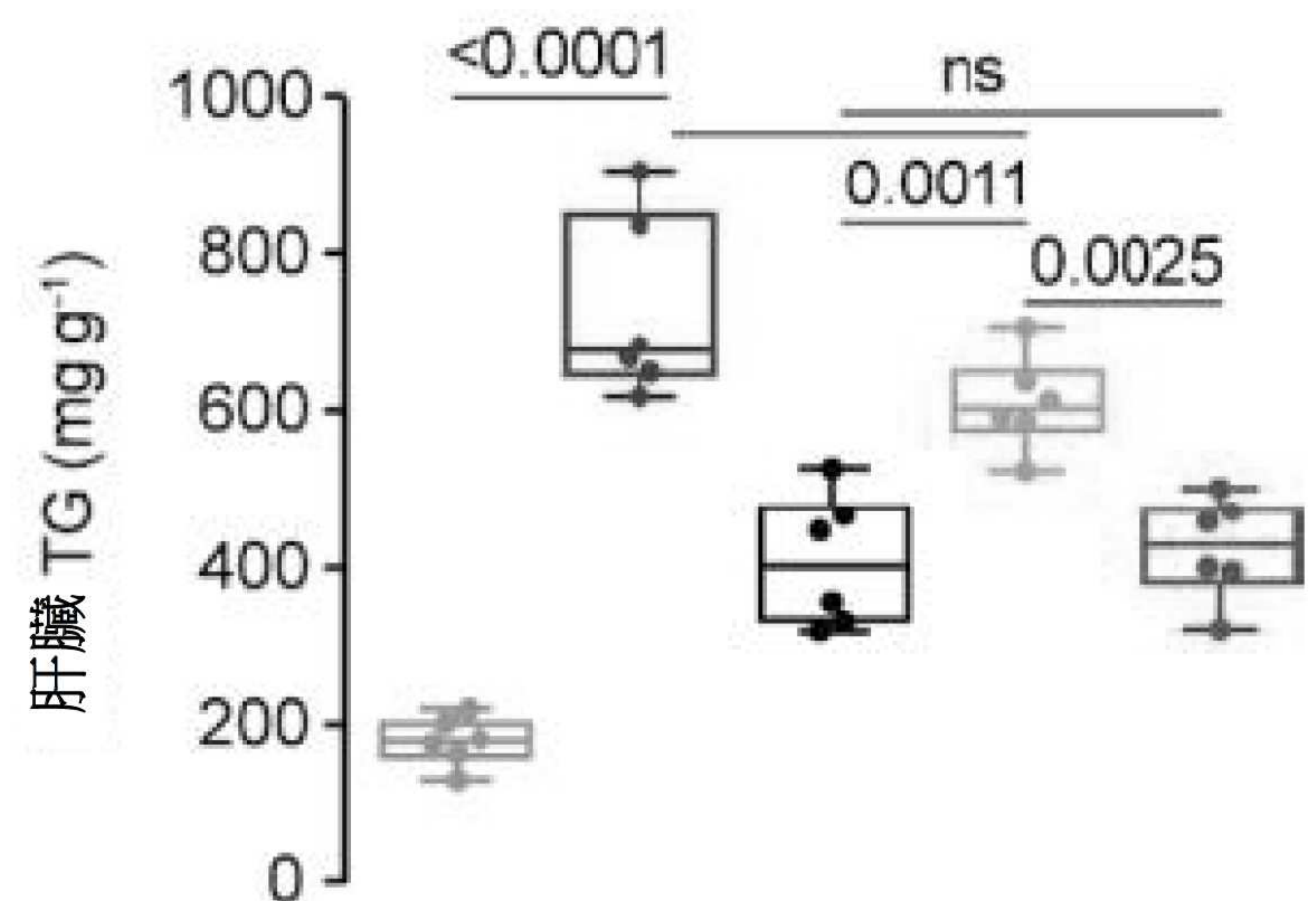
【圖46B】



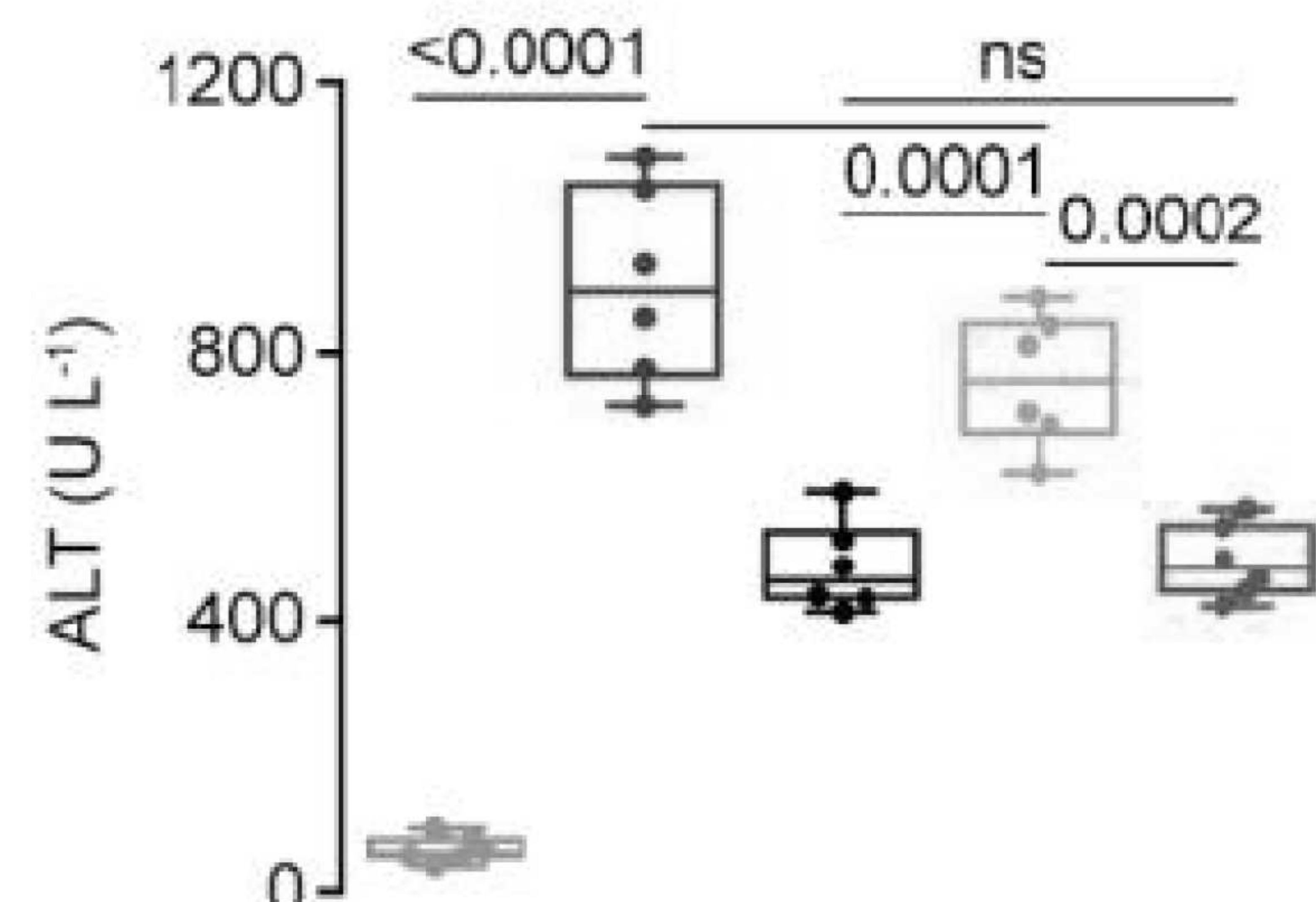
【圖46C】



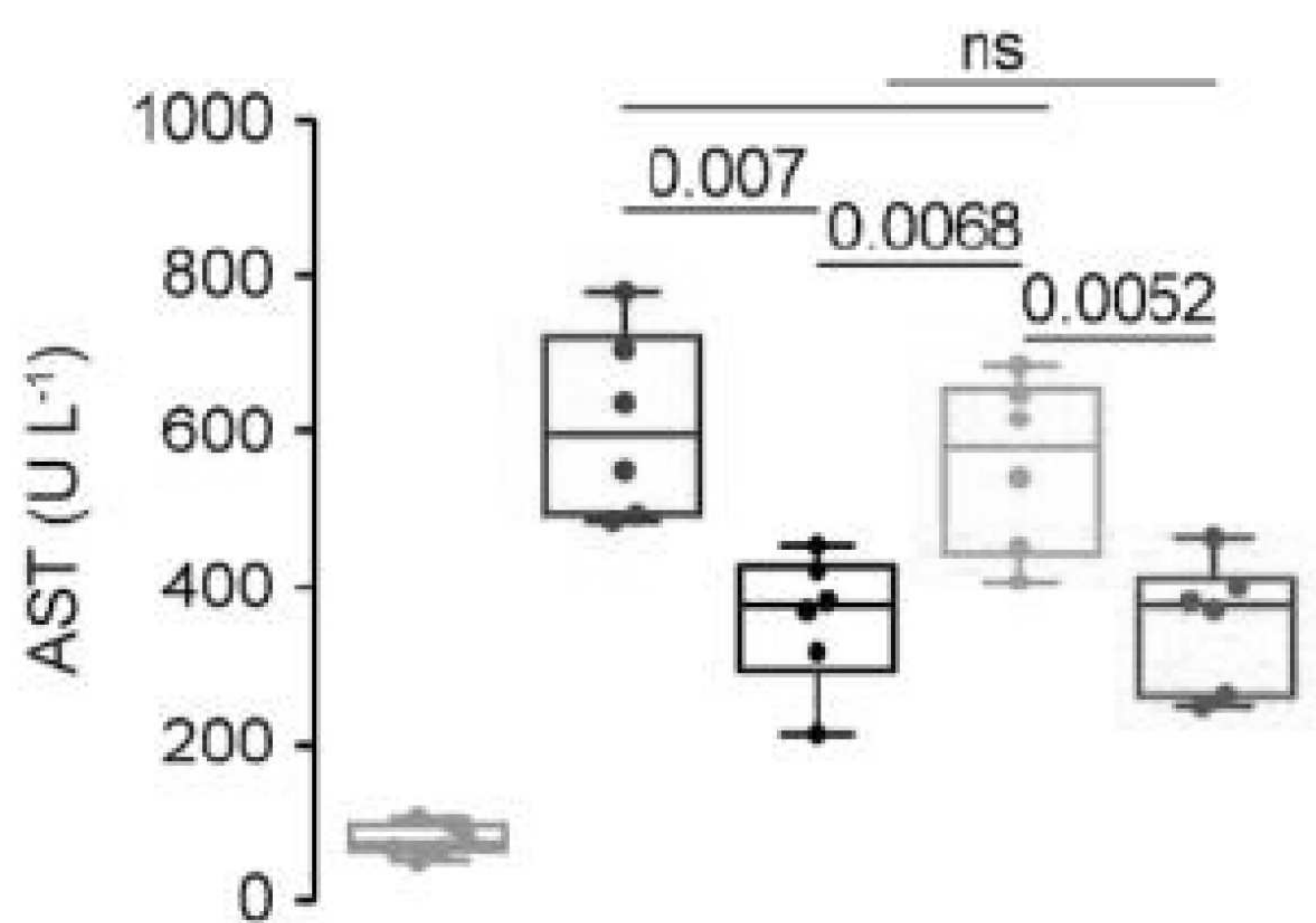
【圖46D】



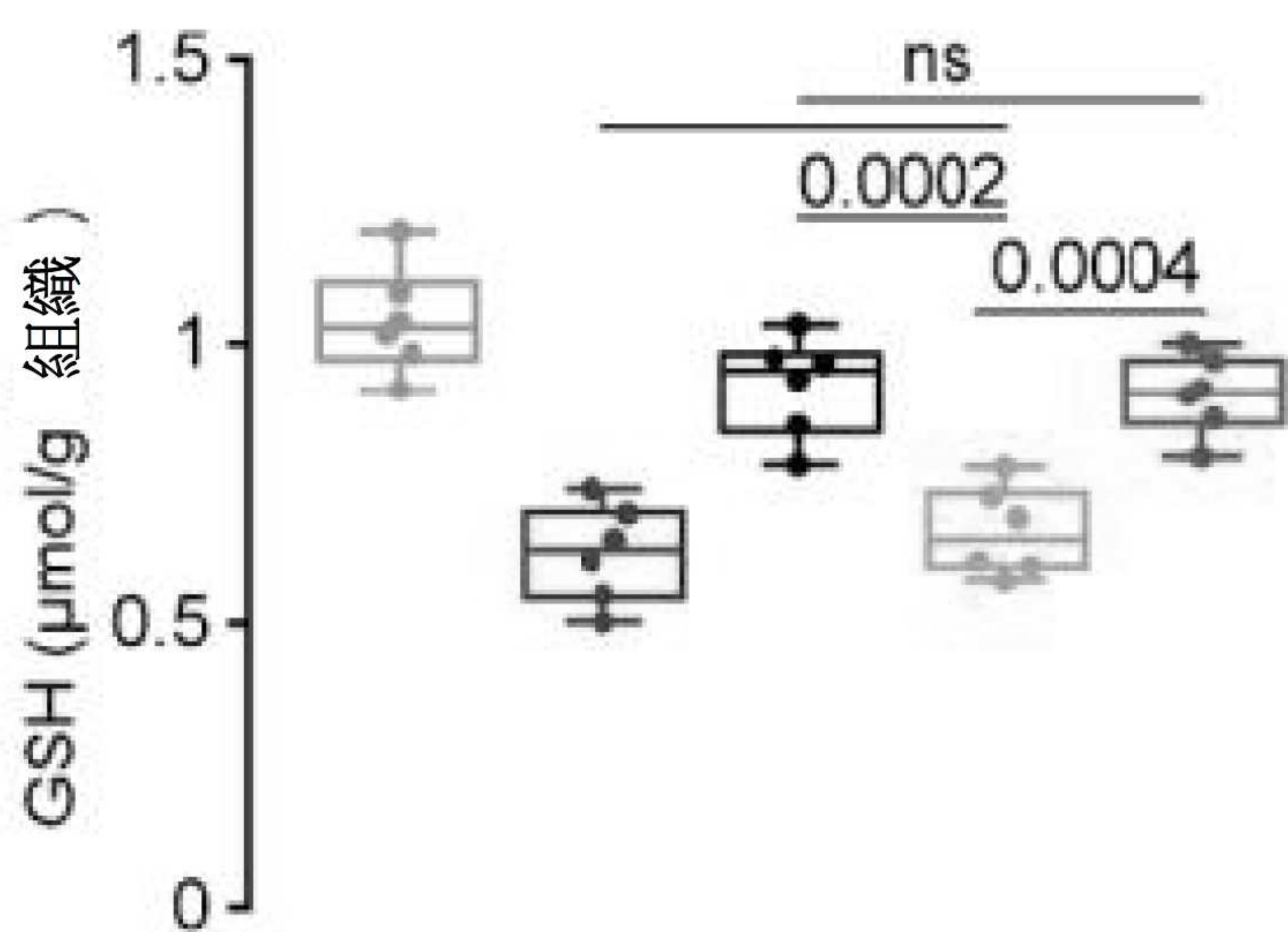
【圖46E】



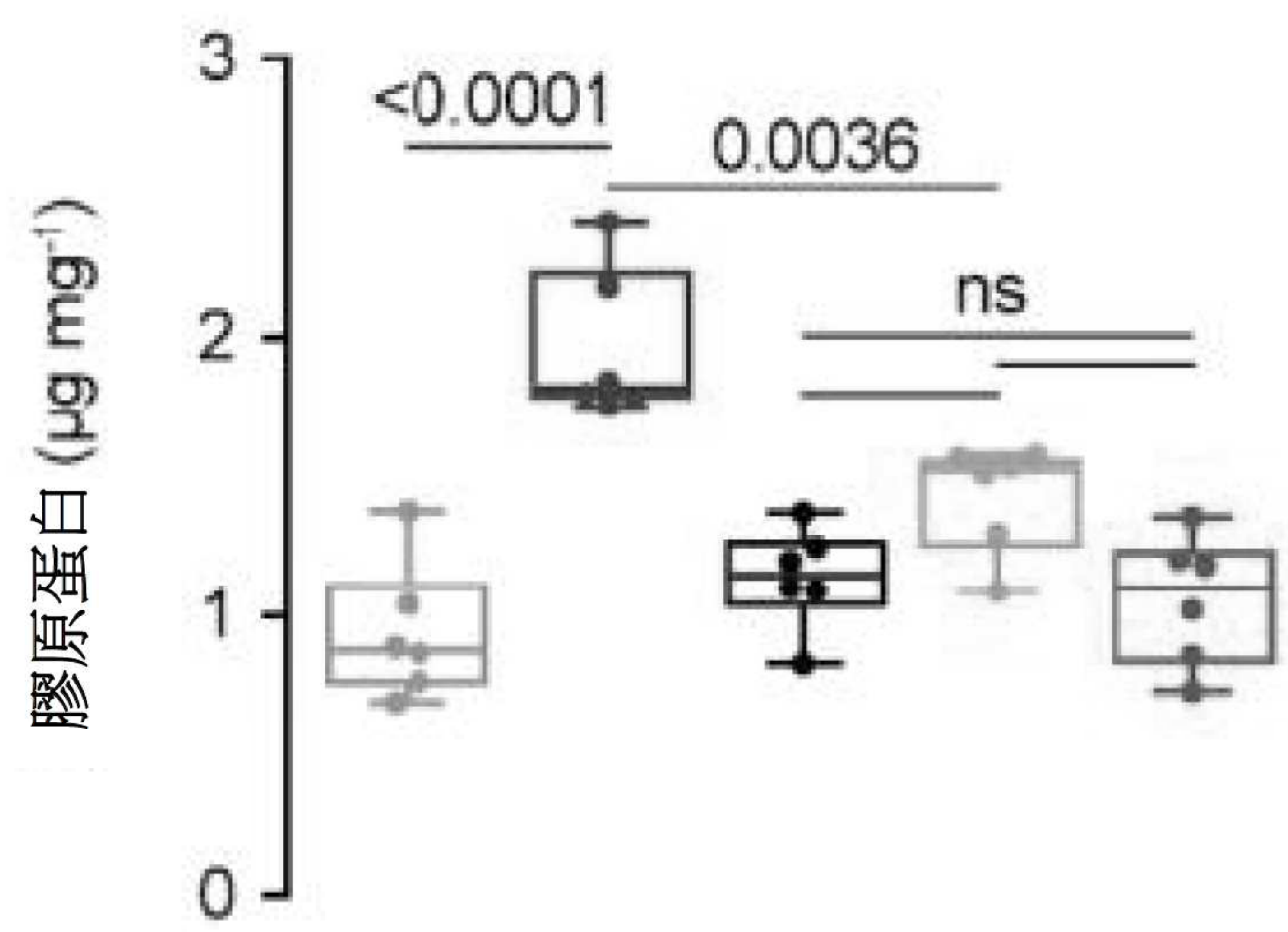
【圖46F】



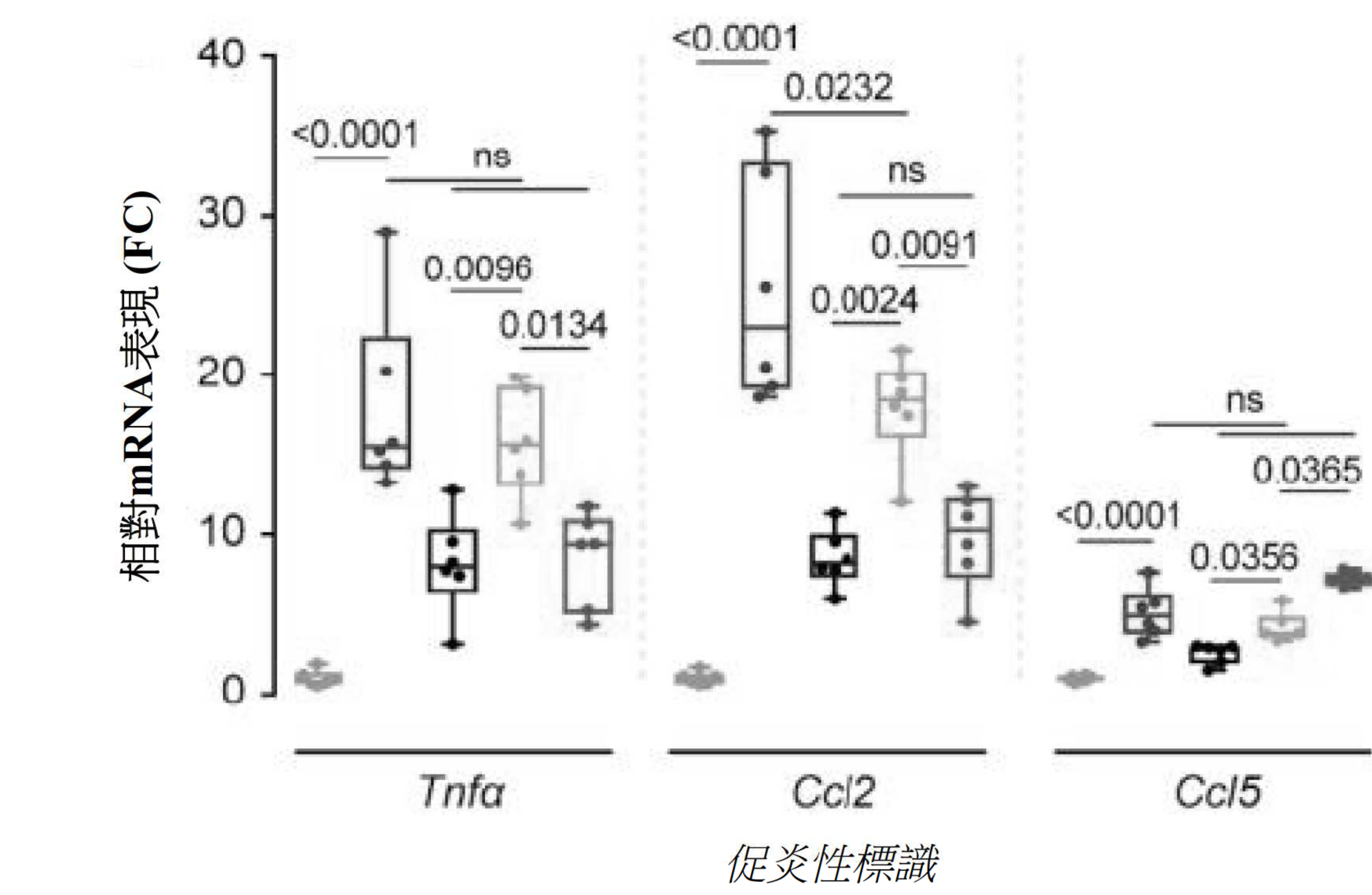
【圖46G】



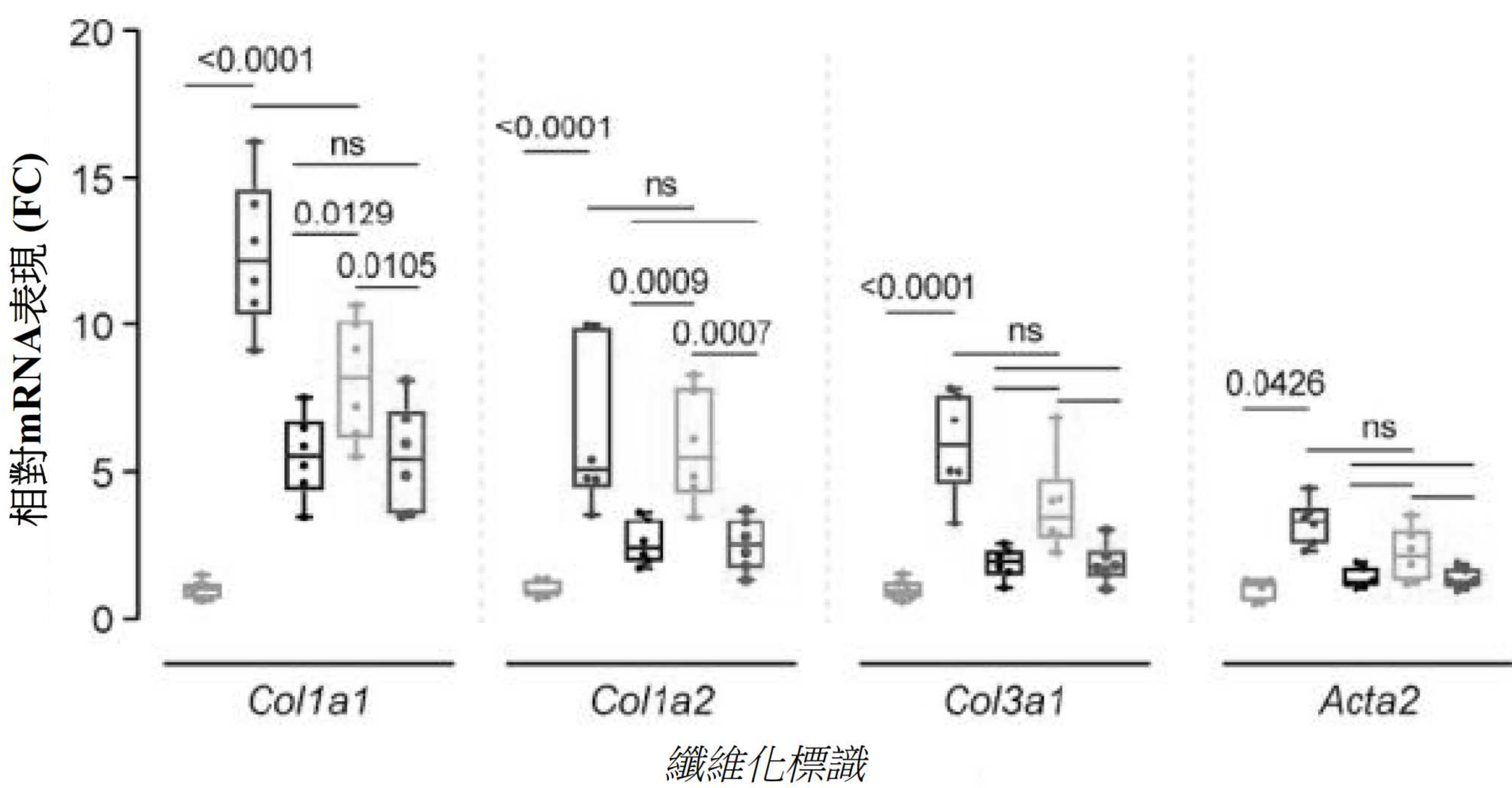
【圖46H】



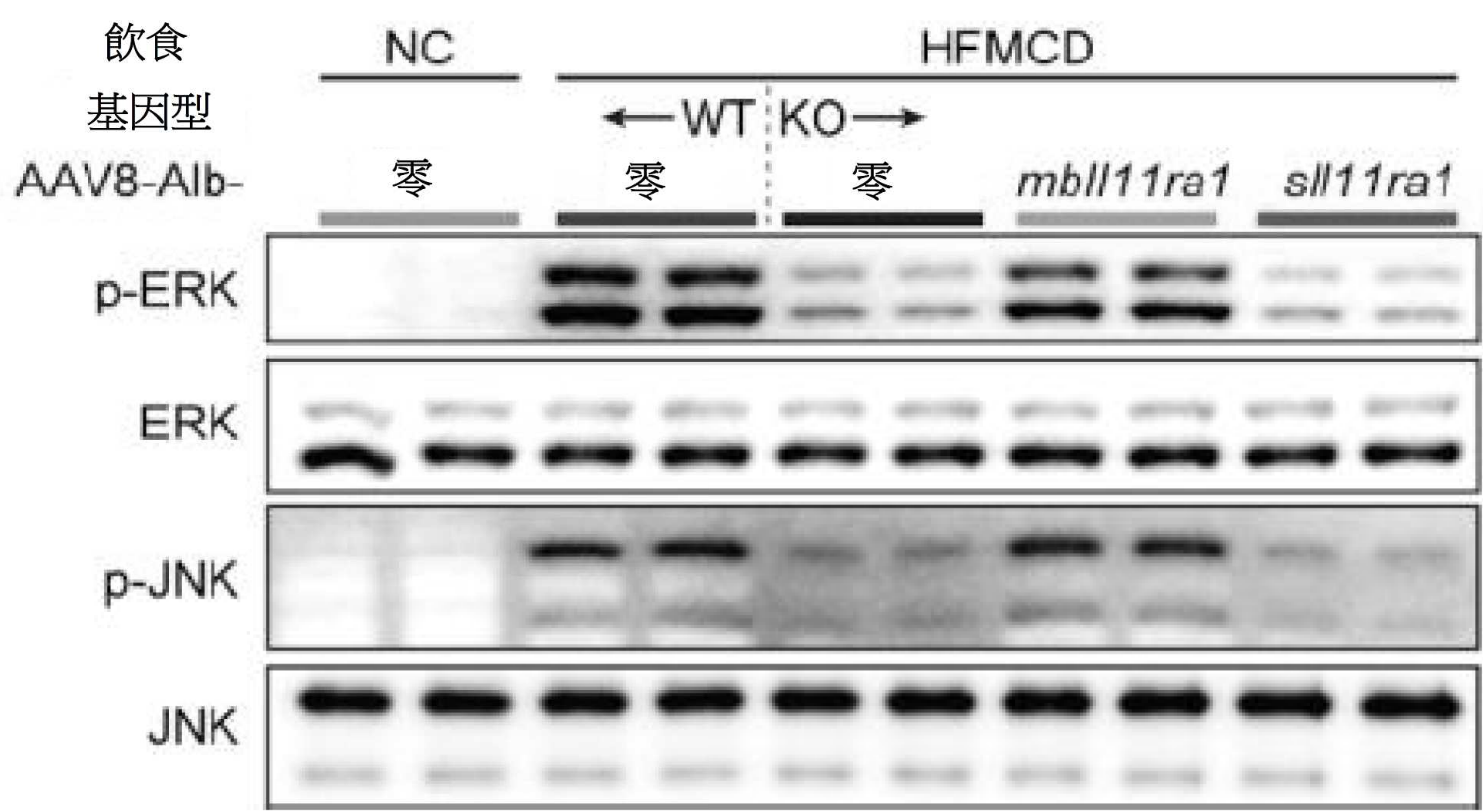
【圖46I】



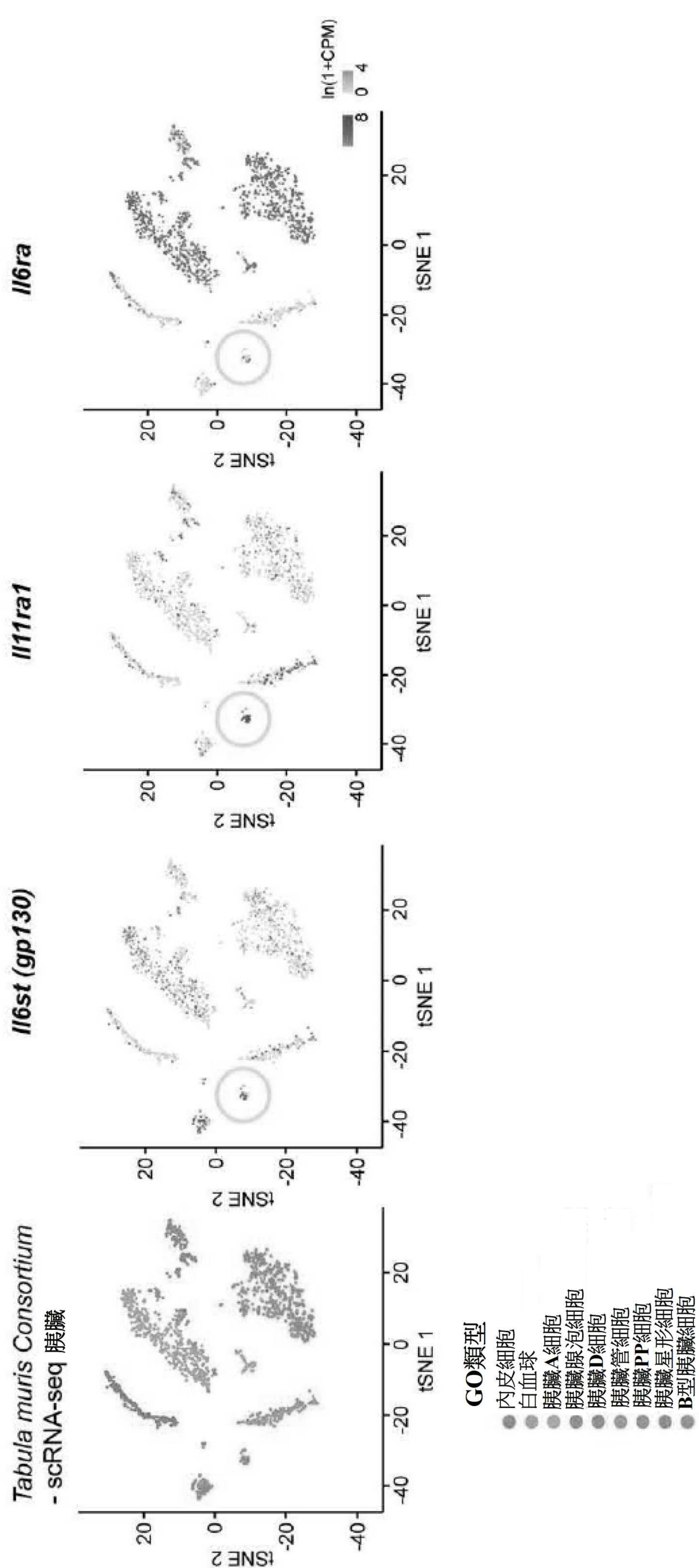
【圖46J】



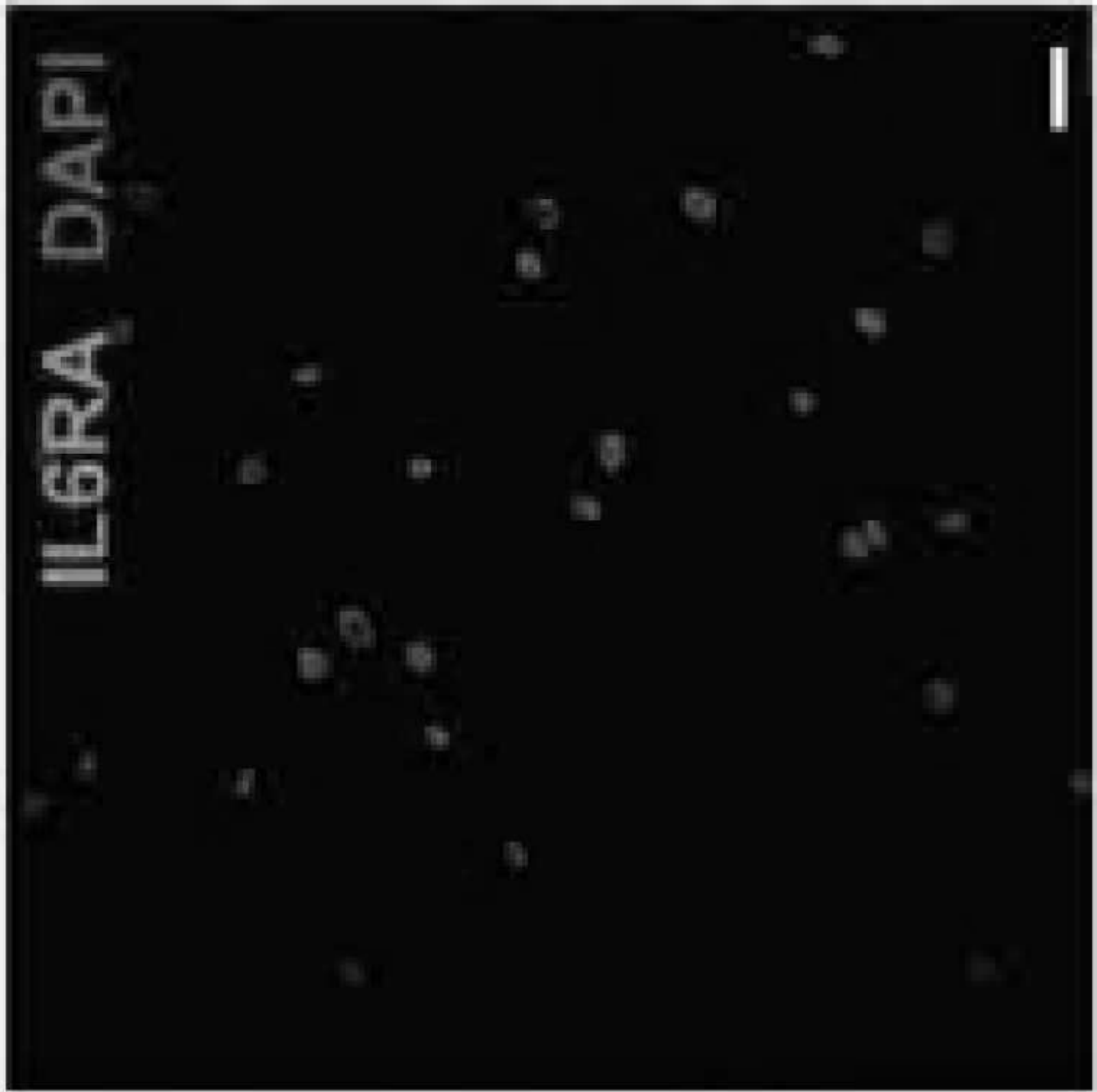
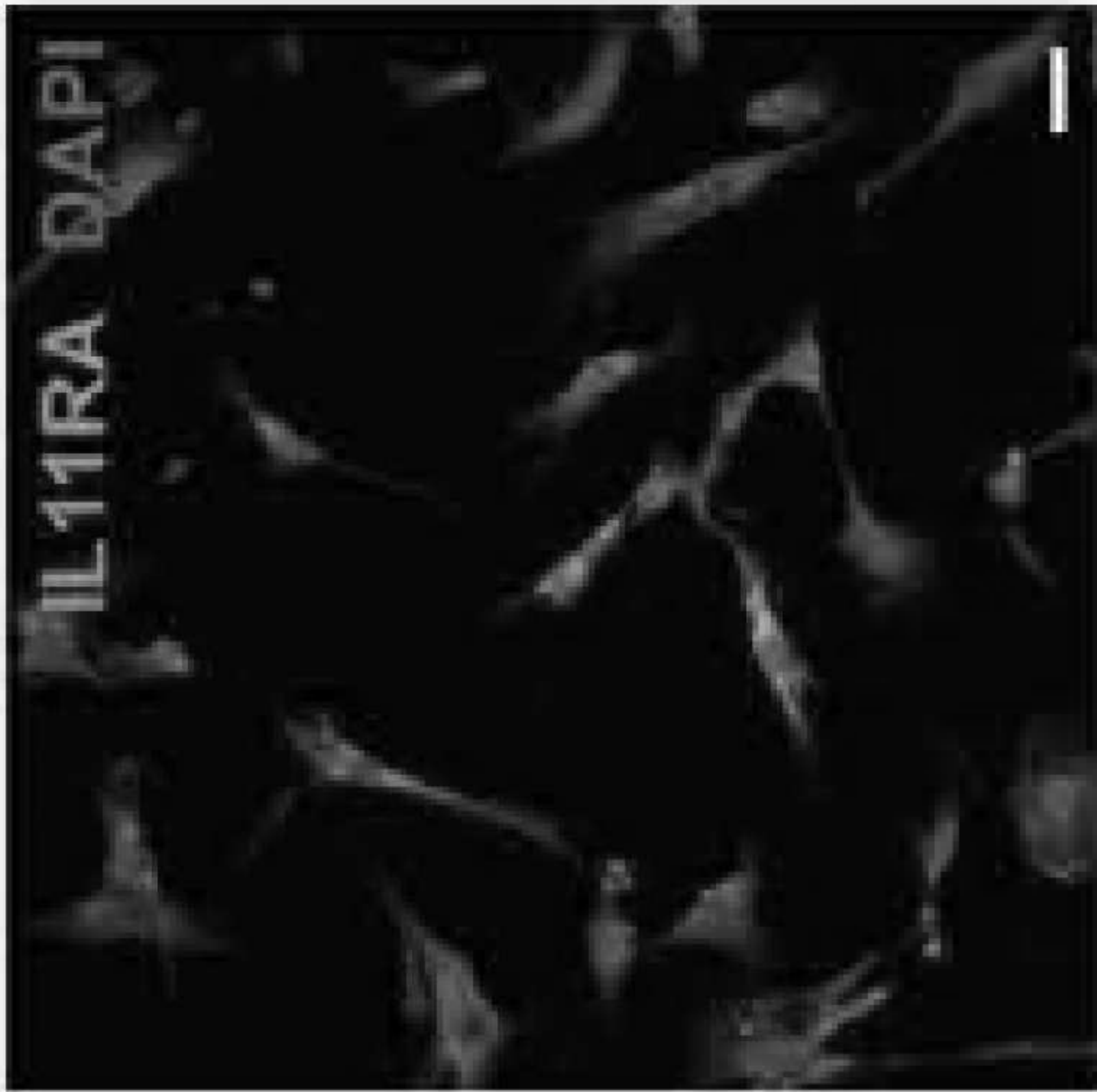
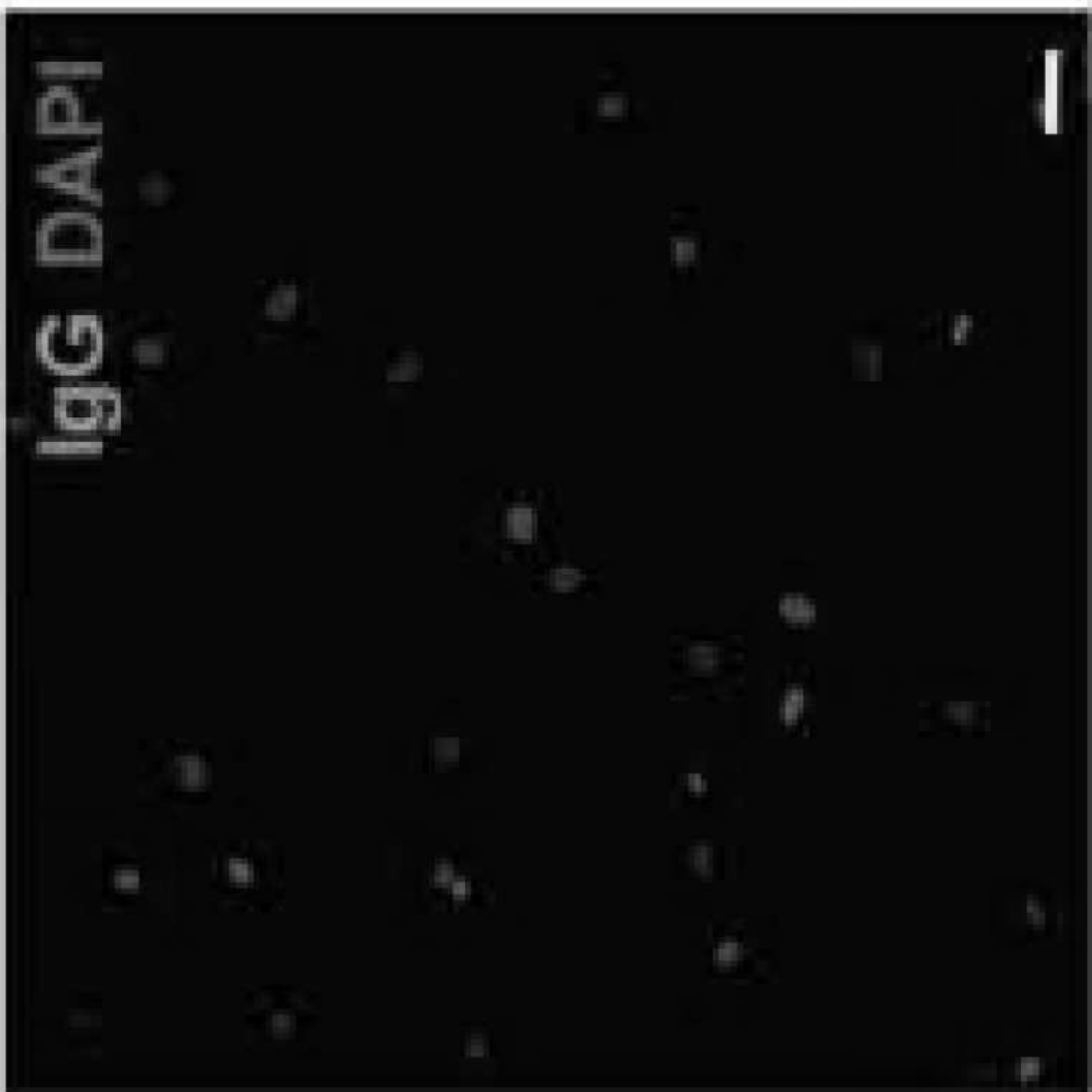
【圖46K】



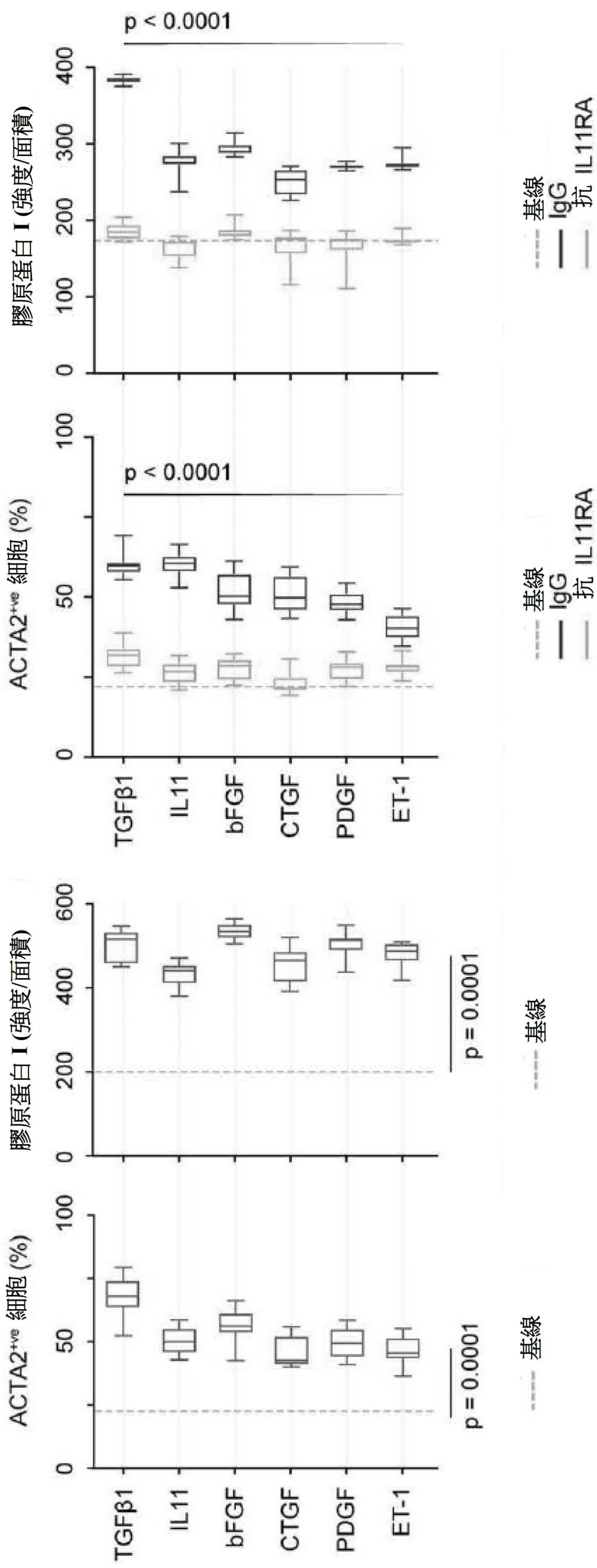
【圖46L】



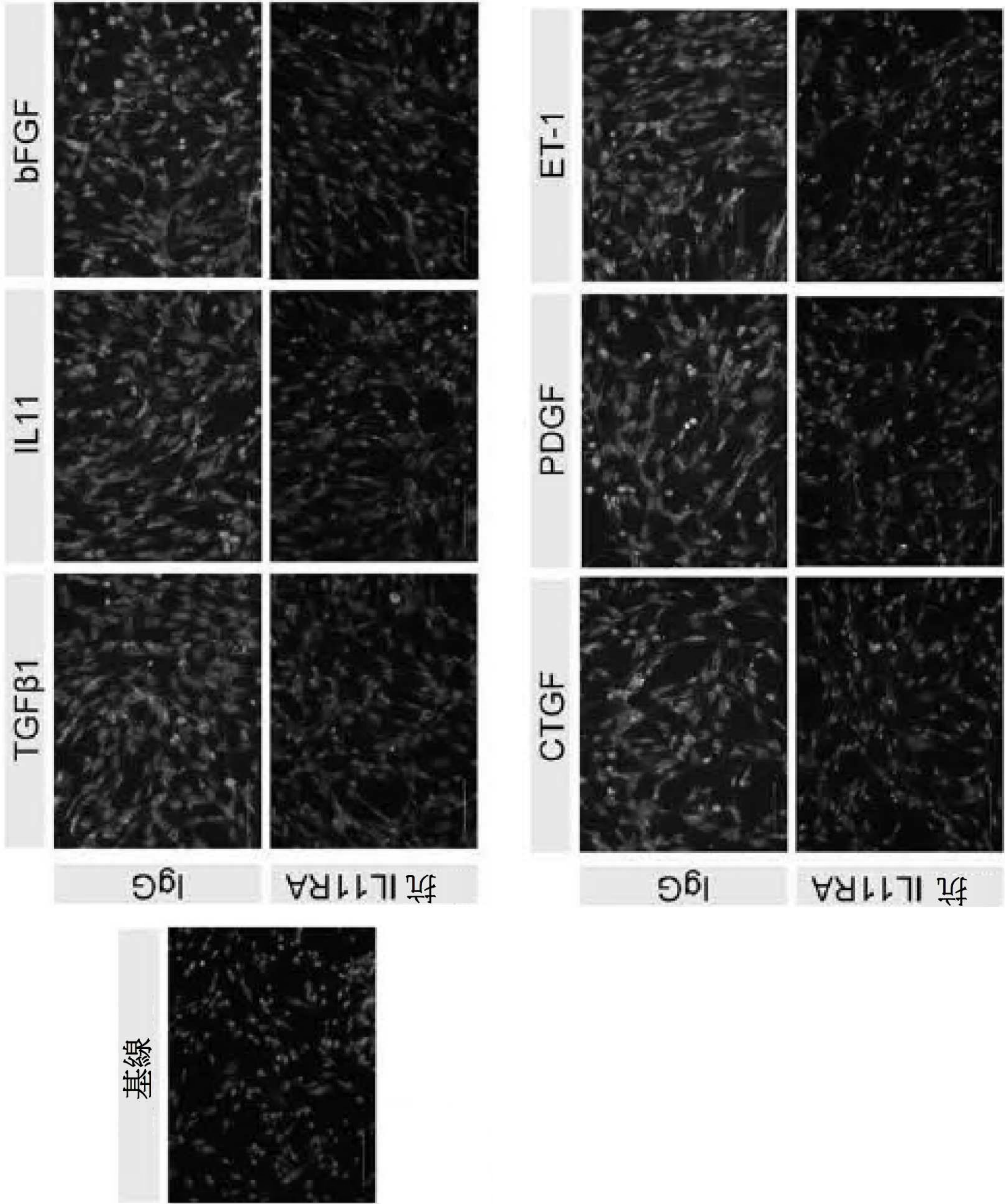
【圖47A】



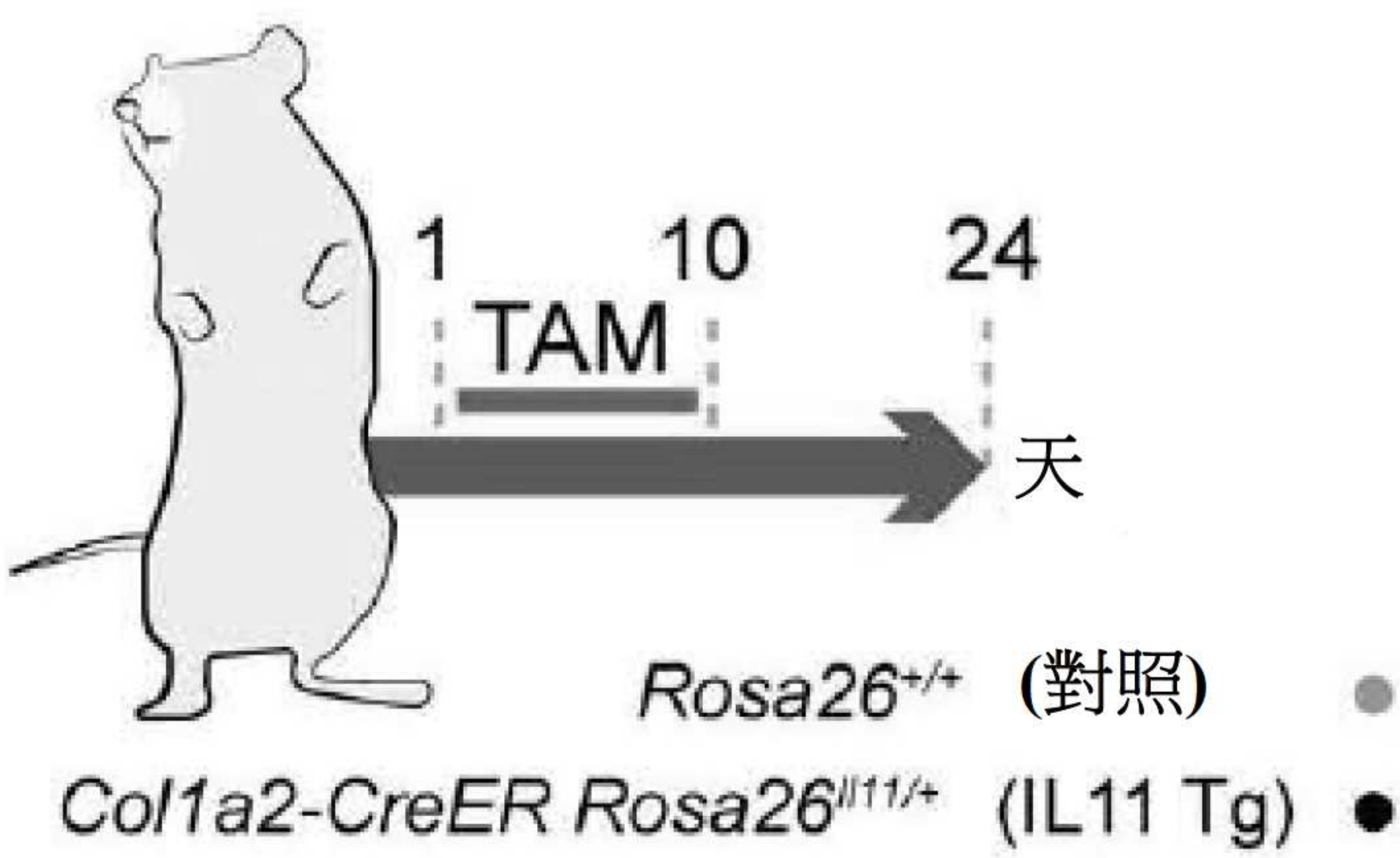
【圖47B】



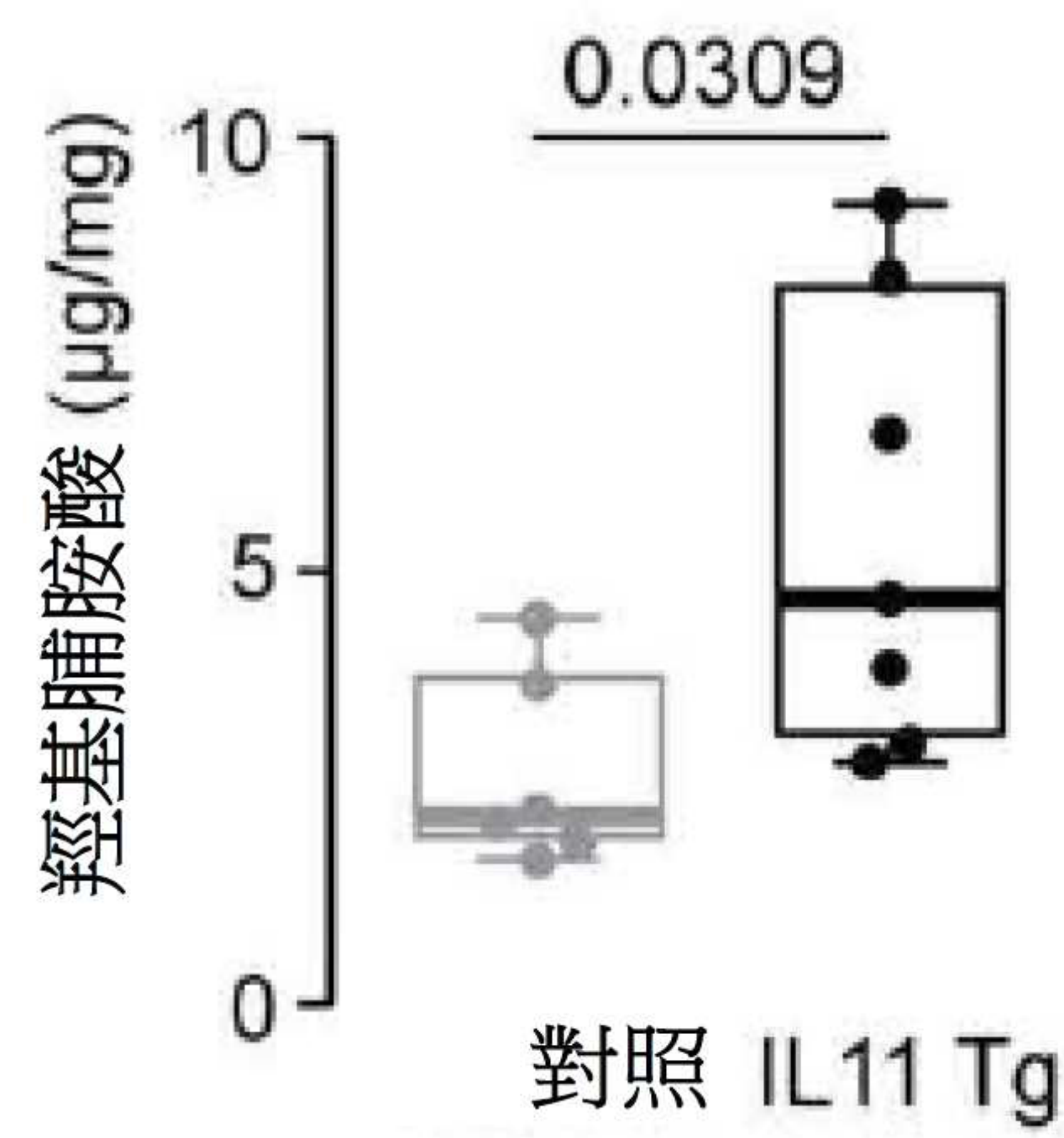
【圖48A】



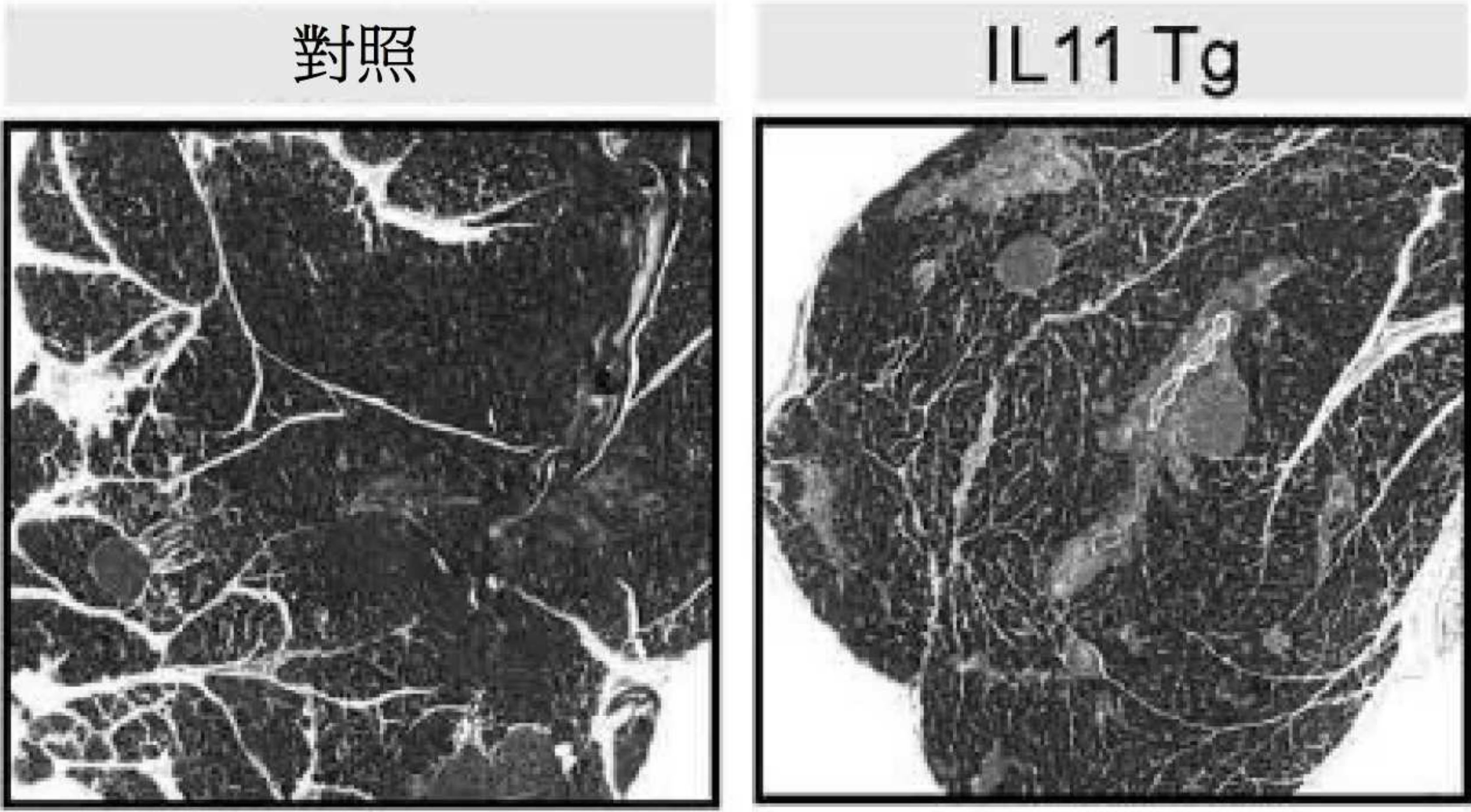
【圖48B】



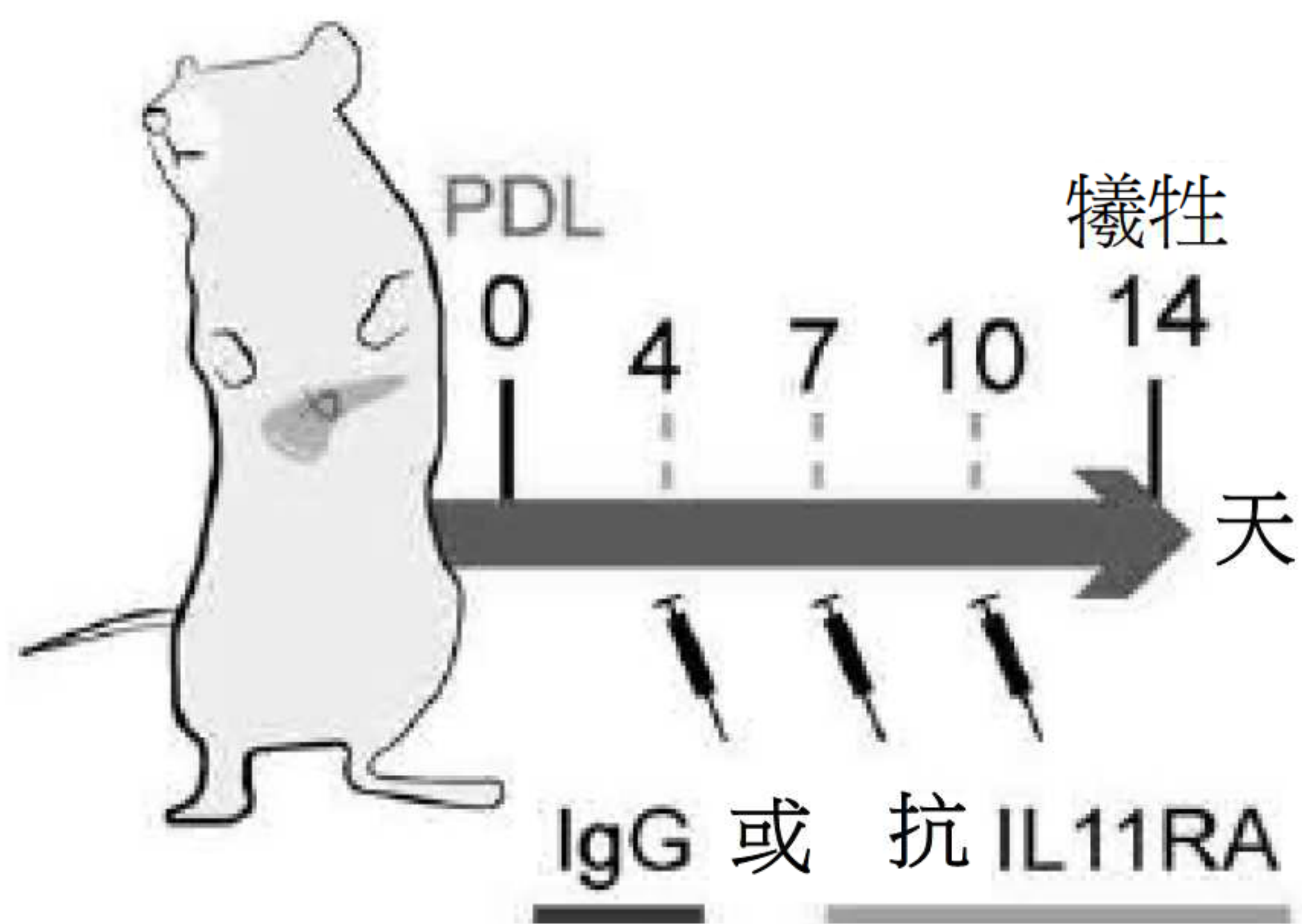
【圖49A】



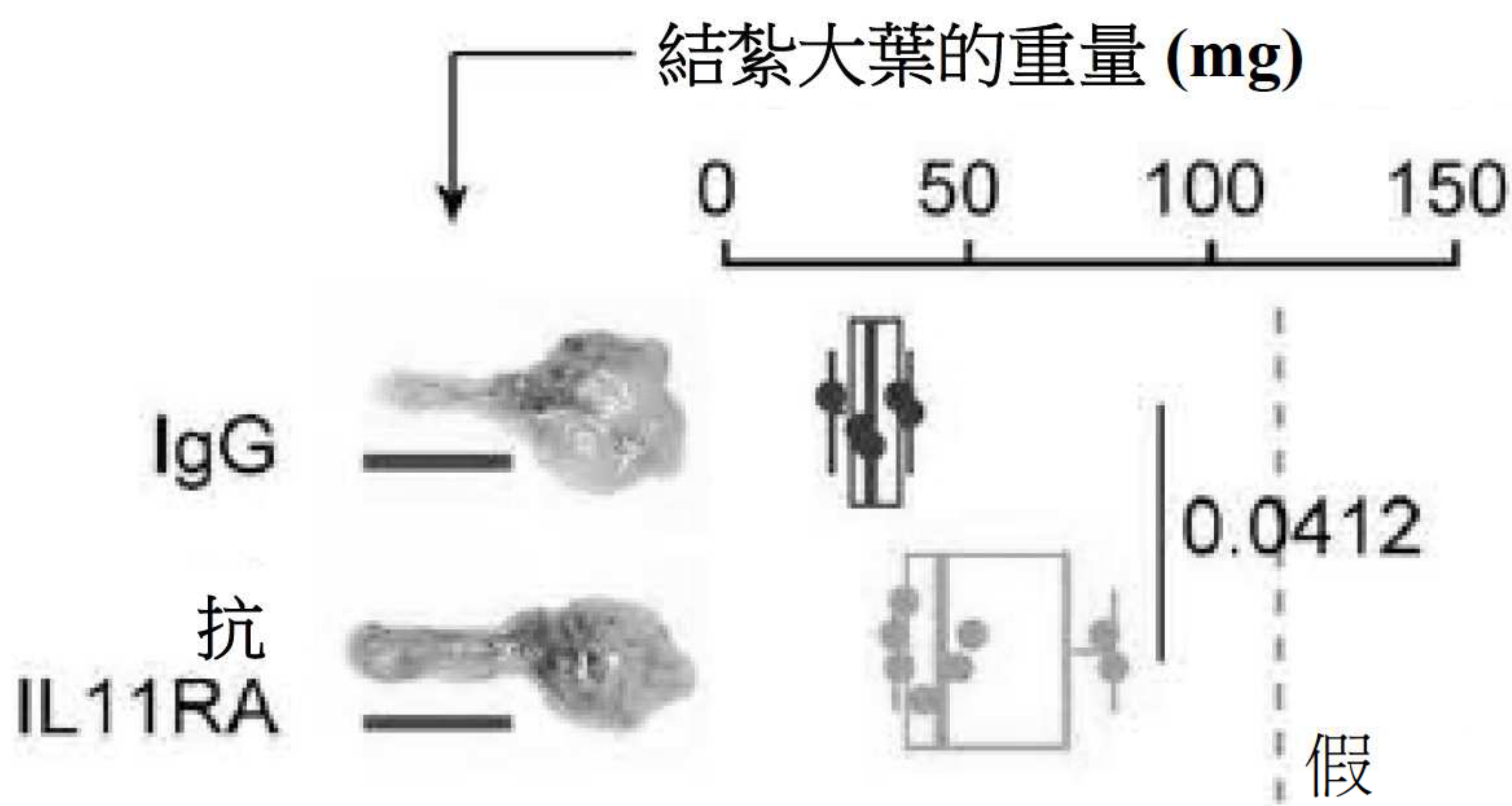
【圖49B】



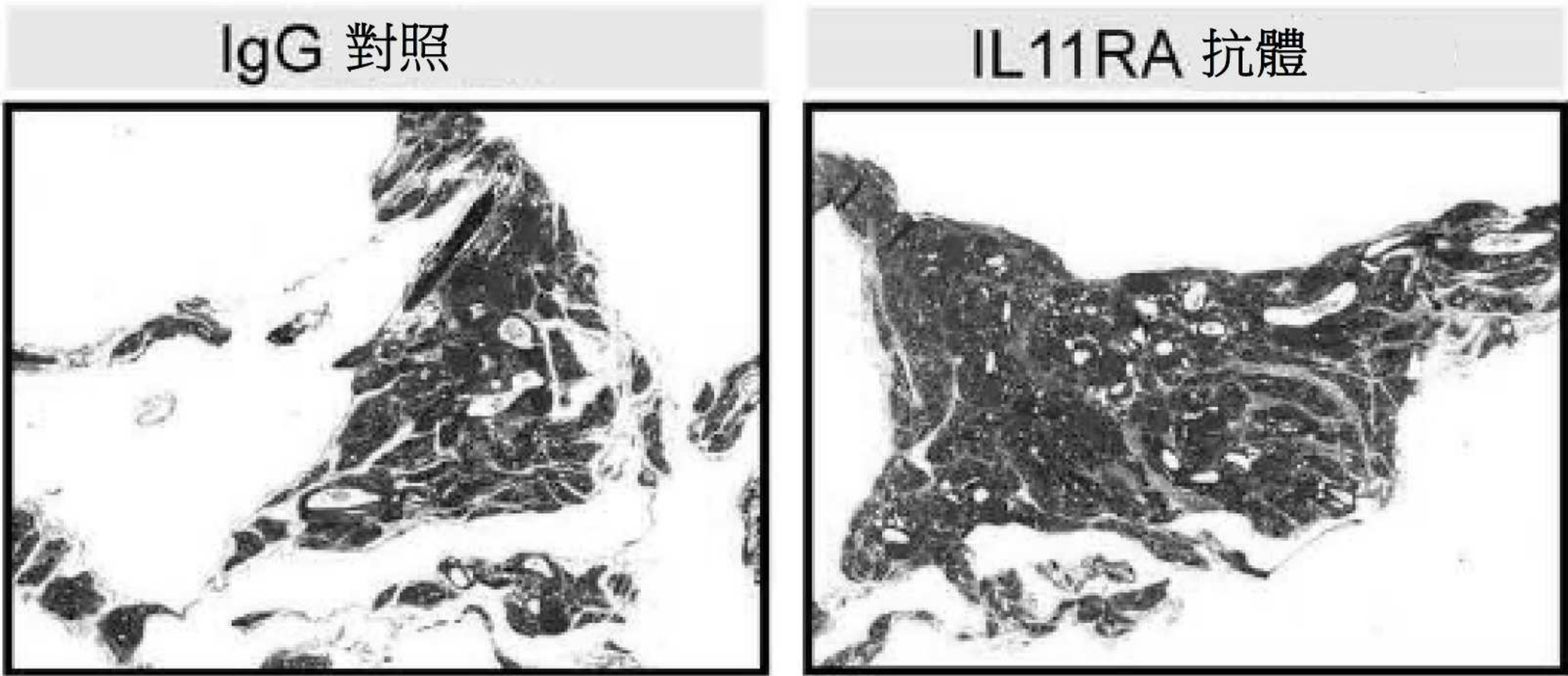
【圖49C】



【圖50A】



【圖50B】



【圖50C】