



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I564019 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：100103219

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 28 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/01/29 美國

61/299,801

2010/07/06 美國

61/361,687

2010/10/01 美國

61/388,697

(71)申請人：再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

(72)發明人：斯柯科 迪米特里斯 SKOKOS, DIMITRIS (GR)

(74)代理人：黃慶源；陳彥希

(56)參考文獻：

CN 101611055A

Jurynczyk, M et al., "Overcoming failure to repair demyelination in EAE: gamma-secretase inhibition of Notch signaling", JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES Volume: 265 Published: FEB 15 2008 Page: 5-11.

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：11 共 114 頁

(54)名稱

以 Dll4 拮抗劑治療自體免疫疾病之方法

METHODS OF TREATING AUTOIMMUNE DISEASES WITH DLL4 ANTAGONISTS

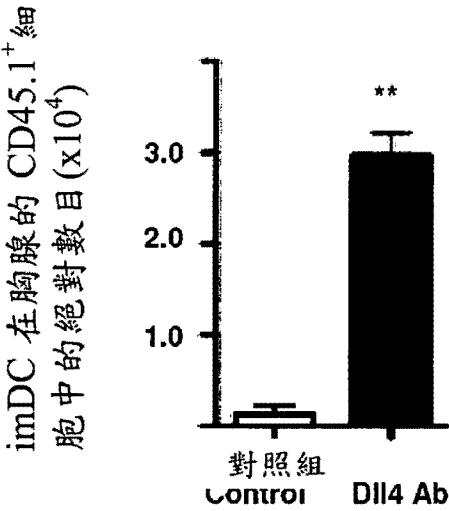
(57)摘要

本發明提供治療其中增加調節性 T 細胞(Treg)的數目是有益的疾病或障礙之方法，其是藉著將一會阻斷 Dll4-Notch 傳訊路徑之治療有效量的 Dll4 拮抗劑投與罹患此種疾病或障礙的患者，藉此增加 Treg 的數目。可為本發明之方法所治療的疾病或障礙包括自體免疫疾病或障礙，諸如多發性硬化症(MS)、糖尿病以及類似者。用於本發明的適當 Dll4 拮抗劑包括專一地結合 Dll4 並且阻斷 Dll4-Notch 交互作用、Dll4 的細胞外領域與類似者的抗體或抗體片段。本發明亦提供在傾向罹患或易罹患此等疾病或障礙的個體中預防此等疾病或障礙發生或復發的方法。此外，本發明之方法可用於預防或治療器官移植排斥或移植植物-抗-宿主疾病。

The present invention provides methods of treating a disease or disorder, in which increasing the number of regulatory T cell (Treg) is beneficial, by administering to a subject suffering from such a disease or disorder a therapeutically effective amount of Dll4 antagonists that block Dll4-Notch signal pathways, thereby increasing the number of Treg. Diseases or disorders treatable by the methods of the invention include autoimmune diseases or disorders, such as multiple sclerosis (MS), diabetes, and the like. Suitable Dll4 antagonists for the invention include antibodies or antibody fragments that specifically bind Dll4 and block Dll4-Notch interactions, the extracellular domain of Dll4, and the like. The invention also provides methods of preventing an occurrence or recurrence of such diseases or disorders in a subject predisposed or

susceptible to developing such diseases or disorders. Furthermore, the methods of the invention are useful in preventing or treating organ transplant rejections or graft-versus-host disease.

指定代表圖：



第 4 圖

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 100103219

A61K 38/16 (2006.01)

※申請日： 100.1.28

※IPC 分類：

A61P 37/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 37/00 (2006.01)

以 Dll4 拮抗劑治療自體免疫疾病之方法

A61P 37/00 (2006.01)

METHODS OF TREATING AUTOIMMUNE DISEASES

WITH DLL4 ANTAGONISTS

二、中文發明摘要：

本發明提供治療其中增加調節性 T 細胞(Treg)的數目是有益的疾病或障礙之方法，其是藉著將一會阻斷 Dll4-Notch 傳訊路徑之治療有效量的 Dll4 拮抗劑投與罹患此種疾病或障礙的患者，藉此增加 Treg 的數目。可為本發明之方法所治療的疾病或障礙包括自體免疫疾病或障礙，諸如多發性硬化症(MS)、糖尿病以及類似者。用於本發明的適當 Dll4 拮抗劑包括專一地結合 Dll4 並且阻斷 Dll4-Notch 交互作用、Dll4 的細胞外領域與類似者的抗體或抗體片段。本發明亦提供在傾向罹患或易罹患此等疾病或障礙的個體中預防此等疾病或障礙發生或復發的方法。此外，本發明之方法可用於預防或治療器官移植排斥或移植物-抗-宿主疾病。

三、英文發明摘要：

The present invention provides methods of treating a disease or disorder, in which increasing the number of regulatory T cell

(Treg) is beneficial, by administering to a subject suffering from such a disease or disorder a therapeutically effective amount of Dll4 antagonists that block Dll4-Notch signal pathways, thereby increasing the number of Treg. Diseases or disorders treatable by the methods of the invention include autoimmune diseases or disorders, such as multiple sclerosis (MS), diabetes, and the like. Suitable Dll4 antagonists for the invention include antibodies or antibody fragments that specifically bind Dll4 and block Dll4-Notch interactions, the extracellular domain of Dll4, and the like. The invention also provides methods of preventing an occurrence or recurrence of such diseases or disorders in a subject predisposed or susceptible to developing such diseases or disorders. Furthermore, the methods of the invention are useful in preventing or treating organ transplant rejections or graft-versus-host disease.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 4 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於使用類 δ 配位子 4 (delta-like ligand 4, Dll4)拮抗劑治療一其中增加調節性 T 細胞(Treg 細胞或 Tregs)是有益的疾病、障礙或病況的方法。更特別地，本發明之方法可藉由以 Dll4 拮抗劑阻斷 Dll4 結合至 Notch 受體來治療各種自體免疫疾病以及器官移植排斥與移植物-抗-宿主疾病 (graft-versus-host diseases, GVHD)，藉此增加 Tregs 的數目。本發明更有關於在一傾向罹患或易罹患該等疾病或障礙的個體中預防此等疾病或障礙發生或復發的方法。

【先前技術】

Notch 受體及其配位子之間的交互作用代表一個在演化上保守的路徑，它不僅是對於細胞命運決定來說是重要的，對於在造血作用中調節譜系決定與胸腺發育也是重要的 (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999, *Science* 284:770-776； Skokos *et al.*, 2007; *J Exp Med* 204:1525-1531；以及 Amsen *et al.*, 2004 *Cell* 117:515-526)。近來顯示，Dll4-Notch1 抑制會導致 T 細胞發育完全阻斷，伴隨著 B 細胞的異位外觀 (ectopic appearance)以及樹突狀細胞(dendritic cells, DC)擴增，這些可能是因為原-T 細胞(Pro-T cell)在胸腺內轉換命運至 DC 所引起 (Hozumi *et al.*, 2008, *J Exp Med* 205(11):2507-2513； Koch *et al.*, 2008, *J Exp Med* 205(11):2515-2523；以及 Feyerabend *et al.*, 2009, *Immunity*

30:1-13)。因此，Notch 傳訊對於決定造血前驅細胞的細胞命運決定來說是關鍵性的有了累積證據。再者，已顯示調節性 T 細胞 (Treg) 恆定在活體內藉由 DCs 回饋控制 (Darrasse-Jèze *et al.*, 2009 *J Exp Med* 206(9):1853-1862)。但是，Notch 傳訊在控制 DC 來源與發育以及隨後的 Treg 恆定中的角色仍未知。這在臨床上是一個重要的問題，因為鑑定會誘導 Treg 擴增的新穎方法可用作為治療自體免疫疾病以及障礙。

人類 Dll4 (hDll4) 的核酸以及胺基酸序列分別顯示於 SEQ ID NO: 1 以及 2 中。Dll4 拮抗劑及其應用揭示於 WO 2007/143689、WO 2007/070671、WO 2008/076379、WO 2008/042236 以及 WO/2008/019144 中。

【發明內容】

本發明一部分是基於發明人觀察到專一地結合 Dll4 並且阻斷 Dll4 結合至 Notch 受體的抗體能夠在小鼠中完全預防實驗性自體免疫腦脊髓炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) (一種關於人類多發性硬化症的動物模型) 的進展，但對照抗體無法預防 EAE。再者，發明人發現，抗-Dll4 抗體的這個作用是與 Treg 細胞的數目增加有關。此外，進一步觀察到，抗-Dll4 抗體在 NOD/ShiLtJ 小鼠 (一種關於第 1 型糖尿病的動物模型) 的胰臟中會預防血糖含量增加並且維持 β -島的數目與型態，而這些作用至少有一部分是由 Tregs 的擴增所媒介。

因此，在第一個方面，本發明是以一種增加 Treg 細胞

數目的方法為特徵，該方法包含有將一有效量的 Dll4 拮抗劑投藥給有需要的個體，其中該 Dll4 拮抗劑會阻斷 Dll4 與 Notch 受體之間的交互作用並且增加 Treg 細胞的數目。

在第二個方面，本發明是以一種治療或改善其中增加 Treg 細胞的數目是有益的疾病、障礙或病況的方法為特徵，該方法包含有將一治療有效量的 Dll4 拮抗劑投藥給有需要的個體。可為本發明之方法所治療的疾病或障礙是任一種透過移除、抑制或減少 Dll4 活性，藉此在受治療個體體內增加 Treg 細胞數目而受益(亦即，增進、改善、抑制或預防)的疾病、障礙或病況。此等疾病、障礙或病況包括，但不限於各種自體免疫疾病，諸如多發性硬化症、糖尿病、類風濕性關節炎、克隆氏病(Crohn's disease)、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、格雷氏病(Graves' disease)、格巴二氏症候群(Guillain-Barré syndrome, GBS)、橋本氏病(Hashimoto's disease)、特發性血小板減少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura)、腸躁症(irritable bowel syndrome)、紅斑狼瘡、混合性結締組織病、重症肌無力(myasthenia gravis)、嗜睡病(narcolepsy)、天狼瘡(pemphigus vulgaris)、惡性貧血、多發性肌炎、原發性膽汁肝硬化(primary biliary cirrhosis)、休格倫氏症候群(Sjögren's syndrome)、潰瘍性大腸炎、血管炎、華格納氏肉芽病(Wegener's granulomatosis)以及類似者，還有器官移植排斥與 GVHD。

在一個具體例中，用於本發明之方法中的 Dll4 拮抗劑

是 Dll4 抗體或其片段(“抗-Dll4 Ab”或“Dll4 Ab”), 其以高親和力專一地結合 Dll4 並且阻斷 Dll4 結合至 Notch 受體和/或阻斷 Dll4-Notch 傳訊路徑。該抗體可以是多株的、單株的(mAb)、嵌合的、人類化的或完全人類抗體或其片段。抗體片段可以是單鏈抗體、Fab 或(Fab')₂。

在一個具體例中, Dll4 Ab 或其抗原-結合片段結合 hDll4 (SEQ ID NO: 2)的 N-端領域(domain)的抗原決定位(epitope)(殘基 S27-R172), 或 Delta/Serrate/Lag-2 (DSL)領域中的抗原決定位(殘基 V173-C217), 或 N-端-DSL 領域中的抗原決定位(殘基 S27-C217)。在另一個具體例中, Dll4 Ab 或其抗原-結合片段結合 EGF 領域之一者中的抗原決定位, 亦即約在 hDll4 (SEQ ID NO: 2)的胺基酸殘基 Q218-N251 (領域 1)、E252-D282 (領域 2)、D284-E322 (領域 3)、E324-E360 (領域 4)、S362-E400 (領域 5)、K402-E438 (領域 6)、H440-E476 (領域 7)或 S480-E518 (領域 8)。在一些具體例中, 該抗體或抗體片段可結合涉及超過 1 個上列抗原決定位的構形抗原決定位(conformational epitope)。當藉由表面電漿共振(surface plasmon resonance)來測量時, 用於本發明之方法的 Dll4 Ab 或其片段能夠以高親和力結合人類 Dll4 並且具有約 1 nM 或更少、約 500 pM 或更少、約 300 pM 或更少、約 200 pM 或更少、約 100 pM 或更少, 或約 50 pM 或更少的平衡解離常數(K_D)。

在一個具體例中, Dll4 Ab 或其片段包含一重鏈可變區域(HCVR), 其包含 3 個分別具有 SEQ ID NO: 22、24 以

及 26 之胺基酸序列的重鏈互補決定區域 HCDR1、HCDR2 以及 HCDR3。在另一個具體例中，該抗體或其片段包含一輕鏈可變區域(LDVR)，其包含 3 個分別具有 SEQ ID NO：30、32 以及 34 之胺基酸序列的輕鏈互補決定區域 LCDR1、LCDR2 以及 LCDR3。在另一個具體例中，該 Dll4 Ab 或其片段包含重鏈與輕鏈 CDR 序列，其含有 SEQ ID NO：22、24、26、30、32 以及 34 的 CDR 序列組合。在又另一個具體例中，該 Dll4 Ab 包含一具有 SEQ ID NO：20 或 116 之胺基酸序列的 HCVR，或包含一具有 SEQ ID NO：28 或 118 之胺基酸序列的 LCVR。在又另一個具體例中，該 Dll4 Ab 包含有 SEQ ID NO：20/28 (REGN281)或 116/118 (REGN421) 的 HCVR/LCVR 組合。

在某些具體例中，該 Dll4 Ab 包含一重鏈 CDR1/CDR2/CDR3 組合以及一輕鏈 CDR1/CDR2/CDR3 組合，其是分別選自於下列：SEQ ID NO：6/8/10 以及 SEQ ID NO：14/16/18；SEQ ID NO：38/40/42 以及 SEQ ID NO：46/48/50；SEQ ID NO：54/56/58 以及 SEQ ID NO：62/64/66；SEQ ID NO：70/72/74 以及 SEQ ID NO：78/80/82；SEQ ID NO：86/88/90 以及 SEQ ID NO：94/96/98；與 SEQ ID NO：102/104/106 以及 SEQ ID NO：110/112/114。在另一個具體例中，該 Dll4 Ab 包含一具有 SEQ ID NO：4、36、52、68、84 或 100 之胺基酸序列的 HCVR，或一具有 SEQ ID NO：12、44、60、76、92 或 108 之胺基酸序列的 LCVR。在又另一個具體例中，該 Dll4 Ab 包含一選自於下列的

HCVR/LCVR 組合：SEQ ID NO：4/12 (REGN279)；SEQ ID NO：36/44 (REGN290)；SEQ ID NO：52/60 (REGN306)；SEQ ID NO：68/76 (REGN309)；SEQ ID NO：84/92 (REGN310)；以及 SEQ ID NO：100/108 (REGN289)。

編碼 SEQ ID NO：4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116 以及 118 之胺基酸序列的核苷酸序列分別顯示為 SEQ ID NO：3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115 以及 117。

在另一個具體例中，可用於本發明之方法中的 Dll4 拮抗劑是一種融合蛋白質，其包含至少一能夠結合 Dll4 的可溶性 Notch 受體或其片段，其融合至一多聚化組分 (multimerizing component)。在一個具體例中，該可溶性 Notch 受體是人類 Notch1 或 Notch4。在另一個具體例中，本發明之 Dll4 拮抗劑是一個經修飾的 Dll4 蛋白質，其能夠結合 Notch 受體(等)，但是這樣的結合不會造成受體(等)活化。在某些具體例中，本發明的 Dll4 拮抗劑是一種融合蛋白質，其包含 Dll4 的細胞外領域或其片段融合至一個多聚

化組分(諸如免疫球蛋白領域，例如人類 IgG 的 Fc 領域)。在某些具體例中，該等 Dll4 拮抗劑包括可以阻斷 Dll4-Notch 交互作用的小分子以及其他藥劑。

在第三個方面，本發明是以一種在傾向罹患或易罹患上述自體免疫疾病或障礙之個體中預防或降低該疾病或障礙發生或復發的方法為特徵，其包含將一預防有效量的 Dll4 拮抗劑投藥給該個體。在一個相關具體例中，本發明進一步是以一種在移植接受者體內預防或降低器官移植排斥或 GVHD 之可能性的方法為特徵，其包含在移植之前和/或之後將一預防有效量的 Dll4 拮抗劑投藥給該接受者。

在第四個方面，本發明是以預防、治療或改善自體免疫疾病或障礙，或器官移植排斥的方法為特徵，其包含將一有效量的 Dll4 拮抗劑組合額外的治療劑(例如，免疫抑制劑 (immunosuppressive agent) 或免疫抑制劑 (immunosuppressant)、抗發炎劑、鎮痛劑、諸如胰島素的降血糖劑以及類似物，它們之中的數者具有彼此重複的治療效用)投藥給有需要的個體。與 Dll4 拮抗劑組合使用的適當免疫抑制劑包括，但不限於糖皮質素(glucocorticoids)、環孢素(cyclosporin)、胺甲喋呤(methotrexate)、干擾素 β (IFN- β)、他克莫司(tacrolimus)、西羅莫司(sirolimus)、硫唑嘌呤(azathioprine)、巯嘌呤(mercaptopurine)、類鴉片(opioids)、黴酚酸(mycophenolate)、TNF-結合蛋白(諸如因福利美(infliximab)、依坦西普(eternacept)、阿達木單抗(adalimumab)與類似物)、細胞毒性抗體(諸如放線菌素

(dactinomycin)、蒽環黴素(anthracyclines)、絲裂黴素 C (mitomycin C)、博來黴素(bleomycin)、米拉黴素(mithramycin)與類似物)、標靶免疫細胞的抗體(諸如抗-CD20 抗體、抗-CD3 抗體與類似者)。用於與抗-Dll4 拮抗劑組合治療的適當抗發炎劑和/或鎮痛劑包括阿司匹靈，布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)與類似物、TNF- α 拮抗劑、IL-1 拮抗劑、IL-6 拮抗劑、乙醯胺酚(acetaminophen)、類嗎啡肽(morphinomimetics)以及類似物。

在第五個方面，本發明是以一種包含 Dll4 拮抗劑、至少一額外的治療劑以及一醫藥上可接受之載體的醫藥組成物為特徵。在一個具體例中，該 Dll4 拮抗劑是以高親和力專一地結合至 Dll4 並且中和 Dll4 活性的 Dll4 Ab 或其片段，以及任一種上述免疫抑制劑、抗發炎劑、鎮痛劑、降血糖劑與類似物。

在第六個方面，本發明是以一種包含一容器(含有本發明之醫藥組成物)以及一包裝說明書(具有使用指引)的套組為特徵。

其他目的以及優點將因為回顧隨後的詳細說明而變得清楚。

詳細說明

在說明本發明之前，要理解的是，本發明不限定於所述的特定方法以及實驗條件，因為此等方法以及條件可能會改變。也要理解的是，此處所使用的術語僅是作為說明

特定具體例之用，而並非意欲為限制，因為本發明的範圍僅會受到隨附申請專利範圍所限制。

如同在本說明書以及隨付申請專利範圍中所用，除非內文另有清楚指明，單數形“一(a)”、“一(an)”以及“該(the)”包括所參照者的複數形。因此，例如提到“一方法”包括一或多種此處所述類型的方法，和/或步驟，和/或在閱讀本揭示內容之後那些熟習此藝將會變得清楚。

除非另有定義，所有此處使用的技術以及科學術語具有與本發明所屬技藝中具有通常技術者普遍理解相同的意思。儘管任何類似或等同於此處所述方法以及材料可應用於本發明的實施或測試，現將說明較佳的方法以及材料。所有此處述及的公開文件以其整體併入此處做為參考文件。

定義

術語“Dll4 拮抗劑”，如此處所用，包括能夠阻斷 Dll4 結合至 Notch 受體(諸如 Notch1 以及 Notch4)和/或阻斷 Dll4-Notch 傳訊路徑之針對 Dll4 的抗體及其片段(參見，例如 WO 2008/076379)、包含有融合至多聚化組分之 Dll4 的細胞外領域的融合蛋白質或其片段(參見例如，美國專利公開第 2006/0134121 號以及第 2008/0107648 號)、肽或肽體(參見例如，美國專利第 7,138,370 號)以及類似物，它們會阻斷 Dll4 與 Notch 受體之間的交互作用。因此，在某些具體例中，該術語亦含括諸如小分子、抗體或其抗原-結合片段以及類似物的拮抗劑，它們專一地結合 Notch 受體(例如

抗-Notch1 抗體、抗-Notch4 抗體等)並且阻斷 Dll4-Notch 傳訊路徑。

術語”抗體”，如此處所用，欲意指一個免疫球蛋白分子，其含有 4 個多肽鏈，藉由雙硫鍵交互連結的 2 個重(H)鏈以及 2 個輕(L)鏈。各個重鏈含有 1 個重鏈可變區域(此處縮寫為 HCVR 或 V_H)以及 1 個重鏈恆定區域(C_H)。重鏈恆定區域含有 3 個領域， C_{H1} 、 C_{H2} 以及 C_{H3} 。各個輕鏈含有 1 個輕鏈可變區域(此處縮寫為 LCVR 或 V_L)以及 1 個輕鏈恆定區域。輕鏈恆定區域含有 1 個領域， C_L 。 V_H 與 V_L 區域可進一步分為具有超變異性的區域(命名為互補決定區域(CDR))，散佈有較為守恆的區域(命名為骨架區域(FR))。各個 V_H 與 V_L 由 3 個 CDRs 以及 4 個 FRs 所構成，以下列順序從胺基端往羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 以及 FR4。

用於鑑定 HCVR 以及 LCVR 胺基酸序列中之 CDRs 的方法以及技術在該技藝中是已知的並且可以應用於鑑定此處揭示之特定 HCVR 和/或 LCVR 胺基酸序列中的 CDRs。可用來鑑定 CDRs 邊界的習知方法包括 Kabat 限定、Chothia 限定以及 AbM 限定。一般來說，Kabat 限定是以序列變異性為基礎，Chothia 限定是以結構環區域的位置為基礎，而 AbM 限定是介於 Kabat 以及 Chothia 法之間的折衷法。參見，例如 Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)；Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948

(1997)；以及 *Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989)。關於鑑定抗體中的 CDR 序列，也可使用公開資料庫。

置換一或多個 CDR 殘基或省略一或多個 CDRs 也是可行的。在科學文獻中已說明過對於結合來說可免除 1 或 2 個 CDRs 的抗體。Padlan 等人(1995 FASEB J. 9:133-139)依據已公開的晶體結構分析抗體及其抗原之間的接觸區域，並推論僅有約五分之一至三分之一的 CDR 殘基實際接觸到抗原。Padlan 也發現到，許多抗體在其 1 或 2 個 CDRs 中沒有胺基酸與抗原接觸(亦參見 Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428)。

未接觸到抗原的 CDR 殘基可以依據先前研究(例如 CDRH2 中的殘基 H60-H65 通常是不需要的)從 Chothia CDs 以外的 Kabat CDRs 的區域藉著分子模型和/或憑經驗來鑑定出。若忽略 CDR 或其(等)殘基，通常會以一個在另一個人類抗體序列或此等一致序列的對應位置的胺基酸予以置換。關於在 CDRs 內置換的位置以及要置換的胺基酸也可以憑經驗來選定。憑經驗置換可以是守恆或非守恆置換。

術語“抗體”亦含括帶有經修飾之醣化形式(glycosylation pattern)的抗體。在一些應用中，移除非所欲醣化位置的修飾可能是有利的，或例如移除岩藻糖部分以增加抗體依賴型細胞毒性(ADCC)功能(參見 Shield *et al.* (2002) JBC 277:26733)。在其他應用中，移除 N-醣化位置可降低非所欲的免疫反應對抗治療抗體，或增加抗體的親

和力。在又其他應用中，為了修飾補體依賴型細胞毒性 (CDC)，可以做出半乳糖化的修飾。

術語抗體的“抗原-結合片段”(或簡化“抗體片段”)，如此處所用，意指維持專一地結合至 hD114 或其他所欲標的蛋白質之能力的抗體的一或多個片段。抗體片段可包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fd 片段、Fv 片段、單鏈 Fv (scFv) 分子、dAb 片段、由模擬抗體之超變異區域的胺基酸殘基所構成的最小辨識單位(例如，含有 CDR 或分離 CDR 的片段)。其他經工程化的分子，諸如雙鍵抗體(diabodies)、三鍵抗體(triabodies)、四鍵抗體(tetrabodies)以及微抗體(minibodies)亦含括在如此處所用的詞句“抗原-結合片段”內。在某些具體例中，本發明之抗體或抗體片段可接合至一個治療部分(“免疫接合物”)，諸如細胞毒素、化學治療藥物、免疫抑制劑或放射性同位素。

抗體的抗原-結合片段典型包含至少 1 個可變領域。該可變領域可能是任何的大小或胺基酸組成並且通常包含至少 1 個鄰接一或多個骨架序列或在一或多個骨架序列內的 CDR。在帶有與 V_L 領域締合之 V_H 領域的抗原-結合片段中，V_H 與 V_L 領域可以任何適當的排列順序彼此相對。例如，可變區域可以是二聚體並且含有 V_H-V_H、V_H-V_L 或 V_L-V_L 二聚體。另擇地，抗體的抗原-結合片段可含有單體 V_H 或 V_L 領域。

在某些具體例中，抗體的抗原-結合片段可含有至少 1 個共價連結至少 1 個恆定領域的可變領域。可以在本發明

之抗體的抗原-結合片段中發現到的可變與恆定領域的非限定例示性型態包括：(i) V_H-C_H1 ；(ii) V_H-C_H2 ；(iii) V_H-C_H3 ；(iv) $V_H-C_H1-C_H2$ ；(v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(vi) $V_H-C_H2-C_H3$ ；(vii) V_H-C_L ；(viii) V_L-C_H1 ；(ix) V_L-C_H2 ；(x) V_L-C_H3 ；(xi) $V_L-C_H1-C_H2$ ；(xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ ；以及(xiv) V_L-C_L 。在可變與恆定領域的任一型態中(包括上面列示的任一例示性型態)，可變與恆定領域可以是彼此直接連結或藉由完整或部分樞紐或連接子區域而連結。樞紐區域是由至少 2 個(例如 5、10、15、20、40、60 或更多個)胺基酸所構成，它在單一多肽分子中的相鄰可變和/或恆定領域間會產生彈性或半彈性鍵聯。此外，本發明之抗體的抗原-結合片段可包含有上列可變與恆定領域型態的任一者彼此和/或與一或多個單體 V_H 或 V_L 領域以非共價締合(例如藉由雙硫鍵(等))所形成的同型二聚體或異型二聚體(或其他多聚體)。

就完整的抗體分子而言，抗原-結合片段可以是單專一性或多專一性(例如雙專一性)。抗體的多專一性抗原-結合片段典型包含有至少 2 個不同可變領域，其中各個可變領域能夠專一地結合至個別抗原或相同抗原上的不同抗原決定位。任一種多專一性抗體形式，包括此處所揭示的例示性雙專一性抗體形式，可使用該技藝中可取得之慣用技術而改造成使用於本發明之抗體的抗原-結合片段中。

術語“人類抗體”，如此處所用，欲包括帶有從人類生殖細胞免疫球蛋白序列衍生而來之可變與恆定區域的抗

體。本發明的人類 mAbs 可包括非由人類生殖細胞免疫球蛋白序列所編碼的胺基酸殘基(例如在活體外藉由隨機或位置-專一性突變誘發或藉由在活體內體突變引入的突變)，例如，在 CDRs 以及特別是在 CDR3 中。然而，術語“人類抗體”，如此處所用，未意欲要包括自另一種哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖細胞衍生而來的 CDR 序列(被接枝至人類 FR 序列上)的 mAbs。

當與對應的生殖細胞序列相較之下，此處揭示的完全人類抗-D114 抗體可包括一或多個在重鏈與輕鏈可變領域之骨架和/或 CDR 區域中的胺基酸置換、插入和/或刪除。此等突變可易於藉著將此處揭示的胺基酸序列拿來與生殖細胞序列(可得自於例如公開的抗體序列資料庫)比較而被確認。本發明包括抗體及其抗原-結合片段，它們是由此處揭示的胺基酸序列的任一者衍生而來，其中在一或多個骨架和/或 CDR 區域中的一或多個胺基酸可以突變成抗體衍生而來之生殖細胞序列的對應殘基(等)，或突變成另一種人類生殖細胞序列的對應殘基(等)，或突變成對應生殖細胞殘基(等)的守恆性胺基酸置換(此等序列變化在此完全意指為“生殖細胞突變”)。在該技藝中具有通常技術者從此處揭示的重鏈以及輕鏈可變區域序列可易於做出許多含有一或多個獨立生殖細胞回復突變或其組合的抗體以及抗原-結合片段。在某些具體例中，所有在 V_H 和/或 V_L 領域中的骨架和/或 CDR 殘基突變回復成在抗體衍生而來之生殖細胞序列中所發現到的殘基。在其他具體例中，僅有某些殘基突

變回復成原來的生殖細胞序列，例如僅僅在 FR1 的前 8 個胺基酸或 FR4 的最後 8 個胺基酸中被發現到有突變殘基，或僅僅在 CDR1、CDR2 或 CDR3 中發現到有突變殘基。在其他具體例中，骨架和/或 CDR 殘基(等)的一或多個突變成不同生殖細胞序列(亦即，不同於抗體原先衍生而來的生殖細胞序列的生殖細胞序列)的對應殘基(等)。再者，本發明的抗體在骨架和/或 CDR 區域內可含有 2 或多個生殖細胞突變的組合，例如，其中某些單獨殘基突變成特定生殖細胞序列的對應殘基，而某些其他不同於原有生殖細胞序列的殘基仍保留著或突變成不同生殖細胞序列的對應殘基。在得到之後，含有一或多個生殖細胞突變的抗體以及抗原-結合片段可易於測試一或多個所欲特性，諸如增進結合專一性、增高結合親和力、增進或增高拮抗或促效生物特性(視情況而定)、降低免疫原性等等。以這樣一般方法所得到的抗體以及抗原-結合片段包括在本發明中。

本發明亦包括包含此處揭示之 HCVR、LCVR 和/或 CDR 胺基酸序列任一者之變異體的抗-DII4 抗體，其具有一或多個守恆性置換。例如，本發明包括相對於此處揭示之 HCVR、LCVR 和/或 CDR 胺基酸序列任一者有例如 10 個或更少、8 個或更少、6 個或更少、4 個或更少、2 個或 1 個守恆性置換(等)之具有 HCVR、LCVR 和/或 CDR 胺基酸序列的抗-DII4 抗體。在一個具體例中，HCVR 包含有 SEQ ID NO: 116 的胺基酸序列，它有 10 個或更少個守恆性胺基酸置換在其中。在另一個具體例中，HCVR 包含有 SEQ ID

NO: 116 的胺基酸序列，它有 8 個或更少個守恆性胺基酸置換在其中。在另一個具體例中，HCVR 包含有 SEQ ID NO: 116 的胺基酸序列，它有 6 個或更少個守恆性胺基酸置換在其中。在另一個具體例中，HCVR 包含有 SEQ ID NO: 116 的胺基酸序列，它有 4 個或更少個胺基酸置換在其中。在又另一個具體例中，HCVR 包含有 SEQ ID NO: 116 的胺基酸序列，它有 2 個或 1 個守恆性胺基酸置換(等)在其中。在一個具體例中，LCVR 包含有 SEQ ID NO: 118 的胺基酸序列，它有 10 個或更少個守恆性胺基酸置換在其中。在另一個具體例中，LCVR 包含有 SEQ ID NO: 118 的胺基酸序列，它有 8 個或更少個守恆性胺基酸置換在其中。在另一個具體例中，LCVR 包含有 SEQ ID NO: 118 的胺基酸序列，它有 6 個或更少個胺基酸置換在其中。在另一個具體例中，LCVR 包含有 SEQ ID NO: 118 的胺基酸序列，它有 4 個或更少個胺基酸置換在其中。在又另一個具體例中，LCVR 包含有 SEQ ID NO: 118 的胺基酸序列，它有 2 個或 1 個守恆性胺基酸置換(等)在其中。

“中和”或“阻斷”抗體欲意指一種結合至 Dll4 會致使 Dll4 之生物活性受到抑制的抗體。Dll4 的這個生物活性抑制可以藉由測量 Dll4 生物活性的一或多個指標來評估。Dll4 生物活性的這些指標可以藉由該技藝中已知的數種標準活體外或活體內分析的一或多者來評估。例如，抗體中和 Dll4 活性的能力是藉由抑制 Dll4 結合至 Notch 受體來評估。相同地，術語也適用於對抗其他標的(諸如 Notch1 與

Notch4)之抗體，此等抗體會抑制標的之生物活性，藉此抑制 Dll4-Notch 交互作用或傳訊路徑。

術語“專一地結合”或類似者表示抗體或其抗原-結合片段與抗原形成一個在生理條件下相對穩定的複合物。專一性結合的特徵可以是在於至少約 1×10^{-6} M 或更低的 K_D (例如較小的 K_D 表示較為緊密的結合)。用於決定 2 個分子是否專一地結合的方法在該技藝中為熟知的並包括，例如，平衡透析、表面電漿共振以及類似者。但是，專一地結合 hDll4 的分離抗體可能會對其他抗原(諸如來自於其他物種的 Dll4 分子)有交叉反應性。此外，結合至 hDll4 以及一或多個額外抗原的多專一性抗體(例如雙專一性)仍被視為是如此處所用的“專一地結合”hDll4 的抗體。

術語“ K_D ”，如此處所用，欲意指特定抗體-抗原交互作用的平衡解離常數。

術語“高親和力”抗體意指當藉由表面電漿共振(例如 BIACORE™或溶液-親和力 ELISA)來測量時，那些以約 1 nM 或更低、約 500 pM 或更低、約 400 pM 或更低、約 300 pM 或更低、約 200 pM 或更低，或約 100 pM 或更低、或約 50 pM 或更低的 K_D 結合 Dll4 的抗體。

術語“表面電漿共振”，如此處所用，意指一種容許藉由在生物偵測器基質中偵測蛋白質濃度變化來分析即時生物專一性交互作用的光學現象(例如使用 BIACORE™系統 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.))。

術語“抗原決定位”是抗原被抗體所結合的一個區域。抗原決定位可定義為結構性或功能性的。功能性抗原決定位通常是結構性抗原決定位的一個次類並且具有那些直接提供交互作用之親和力的殘基。抗原決定位也可能是構形性的，意即，是由非線性胺基酸所構成。在某些具體例中，抗原決定位可包括具有諸如胺基酸、糖側鏈、磷氧基基團或磺醯基基團之在化學上有活性的表面基團分子的決定位，而在某些具體例中，可具有特定三維結構特性，和/或特定電荷特性。一個抗原決定位在一個特有空間構形中典型包括至少 3 個或更多個(通常至少是 5 個或 8-10 個)胺基酸。

術語“治療(treatment)”或“治療(treat)”，如此處所用，除非另有指明，欲表示預防性(prophylactic)(或預防性(preventative))以及治療性步驟。需要治療的個體不只包括那些患有特定病況、障礙或疾病者，也包括那些有傾向罹患或懷疑會罹患此一病況、障礙或疾病且可受益於預防性步驟的人，而使得相較於那些沒有治療者會降低此一病況、障礙或疾病(若有的話)之發生或復發，或進展。

依據詞組“治療有效量”、“預防有效量”或“有效量”表示被投藥時會產生所欲效用的數量。確切數量將視治療目的、治療個體的年紀以及身材、投藥路徑以及類似者而定，並且將由習於該技藝者使用已知技術來確認(參見例如，Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)。

一般說明

本發明一部分是以發現到藉由 Dll4-專一性抗體來阻斷 Dll4 會導致 Treg 細胞的數目增加為基礎，換言之，其會預防、降低或延緩 EAE 或糖尿病在小鼠體內的進展。有關於完全人類 Dll4 Ab 的說明(包括重組型人類 Dll4 Ab)，參見國際專利公開第 WO 2008/076379 號。

治療性投藥以及調配物

本發明提供預防、治療或改善其中增加 Treg 細胞的數目會是有益的疾病或障礙的方法，其包含投與治療有效量的醫藥組成物，該醫藥組成物包含 Dll4 拮抗劑(諸如 Dll4 Ab)。包含 Dll4 拮抗物的醫藥組成物可進一步包含一或多個額外的治療劑，諸如免疫抑制劑、抗發炎劑、鎮痛劑、降血糖劑以及類似物(參見下段)。依據本發明的醫藥組成物可與適當載體、賦形劑以及其他併入調配物中以提供增進轉移、投遞、耐受性以及類似者的藥劑一起投藥。許多適當的調配物可以在所有藥化學家所熟知的處方書中找到：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.。這些調配物包括，例如粉末、糊劑、軟膏、凝膠、蠟、油、脂質、含有囊泡的脂質(陽離子或陰離子)(諸如 LIPOFECTIN™)、DNA 接合物、無水吸收糊劑、水中油與油中水乳劑、乳化卡波蠟(各種分子量的聚乙二醇)、半固體凝膠以及含有卡波蠟的半固體混合物。亦參見 Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA, (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

就全身性投藥來說，治療有效劑量最初可以由活體外分析來估算。例如，在動物模型中劑量可以調配成達到包括如同在細胞培養物中所測定之 IC_{50} 的循環濃度範圍。這樣的資訊可以用來更為準確地決定用於人類體內的劑量。初始劑量也可以從活體內數據(例如動物模型)使用該技藝中所熟知的技術來估算。在該技藝中具有通常技術者可易於依據動物數據而將對人類的投藥最佳化。

劑量可以隨著要投藥的個體的年齡以及身材(例如體重或體表面積)、標的疾病、病況、投藥路徑以及類似者而改變。就 Dll4 結抗劑的全身性投藥來說，特別是就 Dll4 抗體來說，用於靜脈內投藥的典型劑量範圍是每日劑量為約 0.01 至約 100 mg/kg 體重、約 0.1 至約 50 mg/kg，或約 0.2 至約 10 mg/kg。就皮下投藥而言，抗體可以約 1 mg 至約 800 mg、約 10 mg 至約 500 mg、約 20 mg 至約 400 mg、約 30 mg 至約 300 mg 或約 50 mg 至約 200 mg 來投藥，抗體濃度為至少約 25 mg/ml、約 50 mg/ml、約 75 mg/ml、約 100 mg/ml、約 125 mg/ml、約 150 mg/ml、約 175 mg/ml、約 200 mg/ml 或約 250 mg/ml，每天至少 1 至 5 次、每週 1 至 5 次或每月 1 至 5 次。另擇地，抗體在最初可以經由靜脈內注射投藥，接著藉由連續皮下投藥。

不同的投遞系統是已知的並且可以用來投與本發明的醫藥組成物，例如囊封在脂質體中、微粒、微膠囊、能夠表現突變病毒的重組型細胞、受體媒介的胞吞作用(參見例如 Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入的

方法包括，但不限於皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內、皮下、鼻內、硬膜上以及口服路徑。組成物可以藉由任一種習知路徑投藥，例如藉由注入(*infusion*)或球劑(*bolus*)注射、藉由透過上皮或黏膜內襯(例如口腔黏膜、直腸與腸黏膜等)的吸收並且可以與其他生物活性劑一起投藥。投藥可以是全身性或局部的。

醫藥組成物也可以在囊泡中投遞，特別是在脂質體中(參見 Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; Treat *et al.* (1989) in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein and Fidler (eds), Liss, New York, pp. 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; 同前所述)。

在某些情況下，醫藥組成物可以在控制釋放系統中投遞。在一個具體例中，可以使用泵(參見 Langer, 上文; Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201)。在另一個具體例中，可以使用聚合物材料；參見 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)。在又另一個具體例中，控制釋放系統可以位在組成物標的之鄰近處，因此僅需要全身性劑量的一部分而已(參見，例如 Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, 上文, vol. 2, pp.115-138, 1984)。

可注射製備物可包括用於靜脈內、皮下、皮內以及肌肉內注射、滴注(*drip infusions*)等的劑型。這些可注射製備物可以藉由公眾知悉的方法製備。例如，可注射製備物可以例如藉由將上述抗體或其鹽類溶解、懸浮或乳化於習知

用於注射的無菌水性媒介物或油性媒介物。作為用於注射的水性媒介物，有例如生理時鹽水、含有葡萄糖以及其他輔助劑等的等張溶液，其可以與適當的助溶劑(諸如醇(例如乙醇)、多元醇(例如聚丙二醇、聚乙二醇)、非離子性介面活性劑(例如聚山梨糖醇酯 80、HCO-50(氫化蓖麻油的聚氧乙烯(50 mol)加成物)等一起使用。作為油性媒介物，採用例如芝麻油、大豆油等，它們可以與助溶劑(諸如苯甲酸苄酯、苄醇等)等一起使用。因此注射物較佳地是充填在適當安瓿中來製備。本發明的醫藥組成物可以皮下地或靜脈內地以標準針頭以及注射器來投遞。此外，關於皮下投遞，筆型投遞裝置易於應用在投遞本發明的醫藥組成物。這樣的一種筆型投遞裝置可以是重複使用或拋棄式的。重複使用筆型投遞裝置通常使用含有醫藥組成物的可置換藥匣。一旦藥匣中的所有醫藥組成物已被投藥且藥匣空了，空藥匣可易於拋棄並且置換一個含有醫藥組成物的新藥匣。那麼就可以重複使用筆型投遞裝置。在拋棄式筆型投遞裝置中，沒有替換式藥匣。相反地，拋棄式筆型投遞裝置重新填充保存在該裝置之貯器中的醫藥組成物。一旦貯器沒有醫藥組成物，丟棄整個裝置。

許多可重複使用的筆型以及自動注射投遞裝置已應用於皮下投遞本發明之醫藥組成物。實例包括，但肯定不限於 AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™ 筆 (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™ 筆、HUMALOG™

筆、HUMALIN 70/30™筆(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™I、II 與 III (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™ (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™筆(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及 OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), 僅列舉一些。應用於皮下投遞本發明之醫藥組成物的拋棄式筆型投遞裝置包括, 但肯定不限於 SOLOSTAR™ 筆 (sanofi-aventis)、FLEXPEN™ (Novo Nordisk)以及 KWIKPEN™ (Eli Lilly)。

有利地, 用於上述口服或非經口服用途的醫藥組成物被製備成適於填充一次劑量的活性成分之單位劑量的劑量形式。此等呈單位劑量的劑量形式包括, 例如錠劑、丸劑、膠囊、注射劑(安瓿)、栓劑等。所含有的 D114 拮抗劑(諸如 D114 抗體)的數量通常是一個單位劑量中每劑型約 0.1 至約 800 mg; 特別是呈注射劑的形式, 就其他劑量形式來說偏好含約 5 至約 100 mg 以及約 10 至約 250 mg 的抗體。

在某些具體例中, 將本發明的醫藥組成物局部投予至需要治療之區域可能是所欲的; 這可以例如, 但非限定的, 在外科手術期間藉著局部灌注、局部施用, 例如藉著注射、藉由導管的方式或藉由移植物的方式, 該移植物可能是多孔性、非多孔性或膠質材料, 包括膜(諸如矽橡膠膜(sialastic membrane)、纖維或商用皮膚代用品)。

組合療法

在本發明的治療方法中，DII4 拮抗劑可單獨提供或與一或多種額外的治療劑(諸如免疫抑制劑或免疫抑制劑、抗發炎劑、鎮痛劑、直接或間接降血糖劑以及類似物)組合一起提供。適當的免疫抑制劑包括，但不限於糖皮質素、環孢素、胺甲喋呤、干擾素 β (IFN- β)、他克莫司、西羅莫司、硫唑嘌呤、巯嘌呤、類鴉片、黴酚酸、TNF-結合蛋白(諸如因福利美、依坦西普、阿達木單抗與類似物)、細胞毒性抗體(諸如放線菌素、蔥環黴素、絲裂黴素 C、博來黴素、米拉黴素與類似物)、標靶免疫細胞的抗體(諸如抗-CD20 抗體、抗-CD3 抗體與類似者)。用於與抗-DII4 拮抗劑的結合療法的適當抗發炎劑和/或鎮痛劑包括皮質類固醇、非類固醇抗發炎藥物(NSAIDs)，諸如阿司匹靈、布洛芬、萘普生與類似物、TNF- α 拮抗劑(例如 Centocor Inc.的因福利美或 REMICADE™；Centocor Inc.的戈利木單抗(golimumab)；Amgen/Wyeth 的依那西普或 ENBREL®；Abbott Laboratories 的阿達木單抗或 HUMIRA®，與類似物)、IL-1 拮抗物(例如 IL-1 結合融合蛋白質，例如 Regeneron Pharmaceuticals, Inc.的 ARCALYST®，參見美國專利第 6,927,044 號；Amgen 的 KINERET®，與類似物)、IL-6 拮抗劑(例如像是美國專利第 7,582,298 號中所述的抗-IL-6 受體抗體，與 Roche 的 ACTEMRA®)、乙醯胺酚(acetaminophen)、類嗎啡肽(morphinomimetics)以及類似物。適當的降血糖劑包括，但不限於胰島素及其類似物、雙胍、磺醯胺及其脲衍生物、 α -葡萄糖苷酶抑制劑、噻唑

烷二酮及其衍生物、二肽基肽酶-4 抑制劑、瓜爾膠(guar gum)、瑞格列奈(repaglinide)、那格列奈(nateglinide)、艾塞那肽(exenatide)、普藍林肽(pramlintide)、苯氟雷司(benfluorex)、利拉魯肽(liraglutide)、米格列奈(mitiglinide)、醛糖(aldose)還原酶抑制劑以及類似物。

D114 拮抗物(諸如 hD114 抗體或其片段)以及上述額外的治療劑(等)可以一起或分開來共投藥。當使用個別的劑量調配物時，本發明之抗體或其片段以及額外藥劑可以同時投藥，或者在交錯時間分開投藥，意即以適當順序連續投藥。

套組

本發明進一步提供一種製品或套組，其包含有一包裝材料、容器以及包含在該容器內的藥劑，其中該藥劑含有至少一 D114 拮抗劑(諸如 D114 抗體)以及至少一額外的治療劑，且其中該包裝材料含有一顯示關於使用之指引與用法說明的標籤或包裝說明書。在一個具體例中，該 D114 拮抗劑以及額外治療劑可以包含在個別的容器內。

【實施方式】

實施例

提出下列實施例，以提供那些在該技藝中具有通常知識者完整的揭示內容與說明如何做出以及使用本發明的方法以及組成物，且並非意欲要限定被發明人視為其發明的範疇。已盡力確保有關所用數字(例如數量、溫度等等)的精度，但會產生某些實驗誤差以及偏差。除非另有指明，部分為以重量計的部分，溫度為攝氏溫度，壓力為在大氣下

或接近大氣，而圖式誤差槓=平均值±SEM。

在下面的實施例中，使用配於補充有 3% FCS 之杜貝可氏 PBS (GIBCO® INVITROGEN™) 1X 中的下列抗體來對細胞染色以供流動式細胞測量術之用：關於 DCs，分別為對抗傳訊-調節性蛋白 α (Sirp- α ；cat# P84；BD Biosciences)、B220 (cat# RA3-6B2)、PDCA-1 (cat# eBio927)、CD8 (cat# 53-6.7)、CD11b (cat# M1/70)、MHCII (cat# M5/114.15.2)、CD11c (cat# N418)以及 CD135 (cat# A2F10)的抗體；關於 T、B 與 NK 細胞，分別為對抗 CD4 (cat# GK1.5 或 L3T4)、CD3 (cat# 145-2C11)、CD25 (cat# PC61 或 7D4)、CD44 (cat# IM7)、FoxP3 (cat#FJK16s)與 F4/80 (cat# BM8)、NK1.1 (cat# PK136)、IgM (cat# 11/41)、IgD (cat#26-11c)、CD43 (cat# S7)、CD21 (cat# eBio4E3)、HSA (cat# M1/69)以及 CD23 (cat# B3B4)的抗體 (全部來自於 eBioscience)。

實施例 1：Dll4 阻斷對於 B 細胞、樹突狀細胞以及 T 細胞的發育的影響

已顯示 Dll4-Notch1 抑制會完全阻斷 T 細胞發育，伴隨著 B 細胞的異位外觀以及樹突狀細胞(DC)擴增，可能是因為原-T 細胞在胸腺內轉換命運(fate)至 DC 所引起(Hozumi *et al.*, 2008, *J Exp Med* 205(11):2507-2513; Koch *et al.*, 2008, *J Exp Med* 205(11):2515-2523；以及 Feyerabend *et al.*, 2009, *Immunity* 30:1-13)。但是，DC 發育的哪個特定階段會直接受到 Dll4 阻斷所影響仍是未知。

為了回答這個問題，將 5 或 25 mg/kg 抗-Dll4 Ab (REGN577)(n=5)或人類 Fc 片段(對照)(n=5)皮下注射至 6 週大 C57B1/6 小鼠(Jackson Labs)體內，1 週 2 次，持續 2 週。REGN577 是內部依據公開序列(WO 2007/143689)製備。REGN577 結合至人類與小鼠 Dll4，但是在可偵測到的情況下不會結合人類 Dll1 與 JAG1。注射之後第 14 天，收取胸腺以及脾臟並且在 37°C 下於補充有 10%胎牛血清(FCS)以及含有膠原蛋白酶 D (Sigma Aldrich)的完全 RPMI 1640 培養基(Invitrogen)中予以分解。為了停止反應，加入 2 mM EDTA 並且令器官懸浮物通過 70 mm 細胞濾網。藉由沖洗股骨與脛骨將來自於各小鼠的骨髓(BM)收集於補充有 10% FCS 的完全 RPMI 1640 培養基並且將細胞懸浮於 RPMI 培養基中。在以對抗上述特定標記之抗體對細胞進行染色之後，藉由流動式細胞測量術來評估 T 細胞、B 細胞以及 DC 次群。被染色的細胞在 BD™ LSR II Flow Cytometer (BD Biosciences)上運行著並且使用 FlowJo 軟體(版本 8.8.6; Tree Star Inc.)分析數據。

第 1A 以及 1B 圖顯示胸腺中的 T 與 B 細胞群。如第 1A 圖中所示，Dll4 阻斷在胸腺中會誘發雙陰性(“DN”；CD4⁻CD8⁻) T 細胞的數目明顯增加，而雙陽性(“DP”；CD4⁺CD8⁺) T 細胞的數目降低。此外，相同的處理會誘發胸腺內的 B 細胞有異位外觀，這是因為原-T 細胞(亦即，在 DN1 階段的 CD44⁺CD25⁻CD4⁻CD8⁻細胞)所引起(參見第 1B 圖)。相對地，Dll4 阻斷對於骨髓中的 B 細胞發育(第 2A 圖)

或週邊脾臟 B 細胞次群(第 2B 圖)沒有影響。此外，Dl14 阻斷會在胸腺中誘發習知樹突狀細胞(“cDCs”；B220⁻CD11c⁺)以及漿細胞樣 DCs (“pDCs”；PDCA⁺B220⁺CD11C⁺)擴增(參見第 3A 圖)，而在最初注射 Dl14 Ab 之後，從第 7 天($p<0.001$)至第 14 天($p<0.001$)有明顯擴增並且持續到第 21 天($p<0.01$)(第 3B 圖)。第 3A 圖的點狀圖中的數字表示在第 14 天總細胞中的 DCs 平均百分比。再者，在以 Dl14 Ab (REGN577)處理的小鼠之週邊的 DCs 有擴增。與對照組小鼠(以 hFc-處理)相較之下，在以 Dl14 Ab 處理之後，DCs 在脾臟中的百分比與絕對數目增加倍數顯示於表 1 中。

表 1

最初注射之後 的天數	百分比的 增加倍數	絕對數目的 增加倍數
3	1.0	1.0
7	1.1	1.1
14	1.6	2.0
21	1.3	1.7

已知淋巴樣組織 cDCs、pDCs 以及單核細胞擁有共同的前驅細胞，稱為“巨噬細胞與 DC 前驅細胞”或“MDP”，它們可以藉由表面表現型“Lin⁻cKit^{hi}CD115⁺FLT3⁺”被鑑定出，而不同的前驅細胞稱為“共同 DC 前驅細胞”或具有“Lin⁻cKit^{lo}CD115⁺FLT3⁺”的“CDP”，受限於生成 cDCs 以及 pDCs。儘管單核細胞可以在發炎狀態下產生一些 DCs 的表現型特徵，cDC、pDC 以及單核細胞譜系依據它們到達組

織的時間而分開來，且在穩態狀態下不論是單核細胞或 pDCs 都不會發育成 cDCs。不同於單核細胞與 pDCs，淋巴樣組織中的 cDCs 被認為是有如不成熟細胞從骨髓而來，必須在淋巴樣器官中進一步分化以及分裂。前-DCs ($\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}\text{CD135}^+\text{Sirp-}\alpha^{\text{int}}$) 以及晚期前-DCs ($\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}$) 主要是 cDCs 的前驅細胞，從骨髓而來 (Liu *et al.*, 2009, *Science* 324:392-397)。

為了鑑定 Dll4 Ab 對於 DC 前驅細胞恆定的影響，藉由流動式細胞測量術評估 MDP 以及 CDP 在胸腺、骨髓以及脾臟中的含量。僅在骨髓中偵測到 MDP 以及 CDP，但是在胸腺或脾臟中沒有偵測到(數據未示出)。此外，相較於對照處理的小鼠，Dll4 阻斷不會誘發骨髓中的早期前驅細胞擴增。因此，結果暗示，Dll4 Ab 在要比 MDP 與 CDP 還晚的 DC 發育階段(亦即前-DC 階段)有作用。

因此，使用流動式細胞測量術研究胸腺與骨髓中的前-DCs 以及晚期前-DCs。如第 3C 圖中所示，通常出現在骨髓中的 $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}$ DCs 在 Dll4 Ab 處理之後第 14 天僅會在胸腺中擴增($p<0.001$)，而在相同小鼠的 BM 中偵測到 $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}$ DCs 沒有擴增(數據未示出)。因此，源自於前-DC 階段的 DC 擴增被限制於胸腺。為了評估胸腺中的 $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}$ DCs 的來源，進行流動式細胞測量術以鑑定 DN1 ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD44}^+\text{CD25}^-$) 原-T 細胞群中的 $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}$ DCs。如第 3D 圖中所示，於第 3 天 Dll4 阻斷時在 DN1 原-T 細胞群中偵測到 $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{CD11c}^{\text{int}}$

DCs。在沒有 Dll4 Ab 處理的情況下沒有偵測到 MHCII^{lo}CD11c^{int} DCs，在 Dll4 Ab 處理時於 DN2、DN3 和 DN4 T 細胞群中也沒有(數據未示出)。在 Dll4 Ab 處理時於週邊 DC 恆定方面觀察到沒有改變(數據未示出)。因此，Dll4 阻斷會在第 3 天於胸腺中誘發 DN1 原-T 細胞群的 MHCII^{lo}CD11c^{int} DCs 明顯擴增($p<0.01$)(第 3D 圖)，同時在第 14 天有擴增波峰出現($p<0.001$)(數據未示出)。同時，成熟的 DC 次群於第 7 天($p<0.001$)至第 21 天($p<0.01$)在胸腺中擴增，如上面所討論(參見第 3B 圖)。

為了調查 DC 擴增是否是源自於未定向 T-細胞前驅細胞(uncommitted T-cell precursors)，分類為 DN1 CD45.1⁺Lin⁻的細胞被胸腺內地轉移到以抗-Dll4 Ab 處理的 CD45.2⁺宿主小鼠體內。發現到，CD45.1⁺細胞累積在 DN1 階段(數據未示出)而且未成熟 DCs (imDCs)在胸腺中被偵測到以及擴增(第 4 圖)($p<0.01$)。在以對照 Ab 處理的小鼠體內沒有偵測到細胞，可能是由於大多數 DN1-轉移的細胞會因為 T 細胞負向選擇(T cell negative selection)而被消除。推論 Dll4 阻斷會促進源自於共同 T/DC DN1 前驅細胞的胸腺內另擇 DC 譜系發育。

類 Fms 酪胺酸激酶 3 配位子(Flt3-L)對於骨髓前驅細胞分化成 DCs 以及週邊 DCs 的發育是需要並且不可或缺的。Flt3-L 的血清含量在以抗-Dll4 Ab 處理的 WT 動物體內沒有變化(數據未示出)。此外，如表 2 與 3 中所示，與那些以對照 Ab 處理的小鼠相較之下，在野生型小鼠(WT)(表 2 與 3)、

FLt3-L 剔除小鼠(FLt3-L^{-/-})(p<0.05)(表 2)與 FLt3-R 剔除小鼠(FLt3-R^{-/-})(p<0.001)(表 3)體內(這些小鼠全部以 Dll4 Ab 來處理)，胸腺中的 DC 百分比增加。因此，Dll4 阻斷會在胸腺中誘發 FLt3-依賴型 DC 擴增。

表 2

小鼠	在以下列處理的小鼠之 胸腺中的%DC	
	對照 Ab	Dll4 Ab
WT	0.04±0.005	0.58±0.13
FLt3-L ^{-/-}	0.04±0.006	0.45±0.13

表 3

小鼠	在以下列處理的小鼠之 胸腺中的%DC	
	對照 Ab	Dll4 Ab
WT	0.03±0.003	0.37±0.03
FLt3-R ^{-/-}	0.06±0.01	0.44±0.02

已發現早期 T 細胞前驅細胞有往非-T 細胞表現型再衍生(re-derive)的能力(James P. Di Santo, 2010, *Science* 329:44-45)。在胸腺細胞以及原-T 細胞中進行基因陣列分析以決定抗-Dll4 Ab 處理在涉及 T 相對於 B 與 DC 細胞-譜系特化之基因的影響。發現到對於 T 細胞定向來說不可或缺的基因(例如 *Tcf7*、*Gata3* 與 *Ets1*)向下調節，而可以各自阻斷 T 細胞發育的基因(*Lyl1*、*Sfpil*)向上調節(數據未示出；參見 Di Santo, 2010, 上文)。最令人吃驚的是，控制 DC

的基因(*PU. 1* 與 *Spi-B*)以及控制 B 細胞發育的基因也向上調節(數據未示出；參見 M. Merad *et al.*, 2009, *Blood* 113:3418-3427)。此外，*RelB* 以及 *Id2*，還有干擾素調節因子(*IRFs*) 2、4 以及 8 (涉及 DC 次群發育的關鍵性轉錄因子)的表現增加(數據未示出；參見 Merad *et al.*, 2009, 上文)。最後，CSF-1 (M-CSF)(一種涉及 DCs 發育的關鍵性細胞激素)的基因表現被發現到在抗-Dll4 Ab 處理時會向上調節($p < 0.05$ ；數據未示出)。此外，CSF-1 血清含量在抗-Dll4 Ab 處理時會增加(第 5 圖； $p < 0.05$)(參見 B. Francke, *et al.*, 2008, *Blood* 111:150-159)。因而可以推論，Dll4-Notch 傳訊阻斷會向下調節對於 T 細胞譜系定向來說有專一性的轉錄因子，同時向上調節其他在 DC 發育中的重要轉錄因子。

實施例 2：Dll4 刪除對於 T 細胞發育的影響

為了評估 Dll4 在上面實施例 1 觀察到對於 DC 發育的影響是否為 Dll4 所固有的，製備 DLL4COIN 小鼠(其中 Dll4 有條件地不活化)。“依據條件倒位”(Conditional-by-inversion, COIN)”對偶基因是條件對偶基因，其仰賴於可倒位要素(“COIN 要素”)提供重組酶-媒介的條件突變。DLL4COIN 小鼠含有他莫西芬-誘發型 Cre 重組酶構築體 CreERT2，其編碼一個融合至一個突變雌激素配位子-結合領域(ERT2)的 Cre 重組酶。CreERT2 在他莫西芬不存在時本來是不活化的而且也不會被內生性雌激素所活化。他莫西芬處理小鼠將活化 CreERT2 並且使得 COIN 要素倒位，

其取消 COIN 插入點下游的所有表現子的轉錄，藉此剔除 Dll4。關於 CreERT2 重組酶系統的細節，參見 Feil *et al.*, 1997, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237:752-757。

以每隻小鼠 3 mg/150 μ l 玉米油的方式將他莫西芬 (TAM)(cat# T-5648, Sigma)腹膜內(i.p.)注射至 DLL4COIN 小鼠(n=6)，每週 3 次，持續 2 週。DLL4COIN 對照組小鼠(n=6)給予玉米油而沒有他莫西芬。同樣地，以他莫西芬(n=6)或僅僅玉米油(n=6)處理野生型 C5B1/6 小鼠。針對痛苦徵兆(例如毛皮外觀、活動力低等)、感染或體重過度減少監測小鼠。每週秤重小鼠約莫 3 次。任何體重減少超過 20%的小鼠要從實驗屏除。處理 2 週之後，收取胸腺並且藉由流動式細胞測量術分析胸腺細胞。

如第 6 圖中所示，與以玉米油處理的小鼠相較之下，在 Dll4 不存在時(亦即以他莫西芬處理的小鼠)，B 細胞以及 pDCs 與 cDCs 這兩者在胸腺中擴增，表示 Dll4 在實施例 1 中所觀察到的對於 DC 發育以及恒定的影響就 Dll4 來說確實是固有的。因此，Dll4-Notch 傳訊似乎會藉著抑制非-T 細胞譜系在原-T 細胞群中的潛力來維持 T 細胞定向。

實施例 3：Dll4 阻斷或 Dll4 刪除對於 Tregs 恒定的影響

近來已顯示 Tregs 對於維持 DCs 的正常數目來說是很重要的。在 Treg 耗竭時，DCs 會有補償性類 Fms 酪胺酸激酶 3 (Flt3)-依賴型增加(Liu *et al.*, 2009, 上文)。此外，2 個

獨立的研究團隊證明，調節性 T 細胞恆定在活體內會藉由 DCs 回饋控制；亦即，增加 DCs 的數目而造成 Treg 增加分裂與累積，其能防止自體免疫疾病生成(Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009, *J Exp. Med.* 206(9):1853-1862; 以及 Swee LK *et al.*, 2009, *Blood* 113(25):6277-6287)。

為了確定 Dll4 阻斷能否影響 Treg 恆定，藉由流動式細胞測量術來測量在實施例 1 中以 Dll4 Ab 或人類 Fc (對照組) 處理的小鼠的胸腺內 Treg 數目。如第 7A 圖中所示，Dll4 阻斷在最初注射之後第 14 天會造成胸腺中的 Treg 強烈擴增。在最初注射之後，Treg 在第 7 天($p<0.001$)開始於胸腺中擴增並且在第 14 天($p<0.001$)達到最高作用(參見第 7B 圖)，而 Tregs 在週邊(亦即脾臟)僅有在 14 與 21 天開始看的到($p<0.05$)(第 7B 圖以及表 4)。在表 4 中顯示與對照組小鼠(hFc-處理)相較之下，以 Dll4 Ab 處理時 Tregs 在脾臟內的百分比與絕對數目的增加倍數。

表 4

最初注射之後 的天數	百分比的增加倍數	絕對數目的 增加倍數
3	1.0	1.0
7	1.0	1.2
14	1.1	1.7
21	1.1	1.2

為了評估觀察到的 Treg 擴增對於 Dll4 分子來說是否為固有的，藉由流動式細胞測量術來測量在實施例 2 的

DLL4COIN 小鼠的胸腺內 Treg 數目。如同藉由 Dll4 Ab 之 Dll4 阻斷所觀察到的，與以玉米油處理的小鼠(參見第 7C 圖)與以他莫西芬處理的野生型小鼠(數據未示出)相較之下，Dll4 因為他莫西芬處理而有條件不活化也會在胸腺中造成 Treg 擴增。因此，Dll4-Notch 傳訊會維持 DCs 以及之後的 Treg 恆定與 T 細胞定向。

使用抗-Dll4 Ab (REGN421，具有分別為 SEQ ID NO：116 以及 118 的 HCVR 以及 LCVR，已知會結合人類 Dll4 的 N-端-DSL 領域)在表現人類 Dll4 的小鼠(“人類化 Dll4 小鼠”)體內進行類似的實驗。人類化 Dll4 小鼠是藉由在 F1 C57BL/6 /129 的胚胎幹(ES)細胞中將小鼠 Dll4 基因的整個細胞外領域置換為人類 Dll4 基因的對應細胞外區域(7 kb)而製備。生育同型合子 hDll4 小鼠並且育種成 C57BL/6 背景。以 5 mg/kg 的 hFc (對照組；n=6)，或 1 mg/kg (n=6)或 5 mg/kg (n=6)的 REGN421 Ab 來處理人類化 Dll4 小鼠每週 2 次，持續 2 週。在第 7 由各個處理組犧牲 2 隻小鼠而在第 14 天每組又犧牲 2 隻小鼠。收取胸腺並且對細胞染色以及藉由流動式細胞測量術來檢驗。剩餘的小鼠允許在沒有任何處理的情況下復原歷時額外 4 週，並且在停止治療之後第 28 天犧牲牠們，而且使用流動式細胞測量術來分析胸腺細胞。處理 2 週之後，在以抗-Dll4 Ab 處理的小鼠的胸腺中，cDC 以及 pDCs (第 8A 圖)增加，還有 Treg 群(第 8B 圖)明顯增加($p<0.01$)。在接受 Dll4 Ab 歷時 2 週，接著不處理歷時 4 週的小鼠胸腺中，DC 以及 Treg 數目在期間結束

時回復到正常含量(第 8A 與 8B 圖)。同時，與以 hFc 處理的小鼠相較之下，在以 Dll4-Ab 處理小鼠的週邊也發現到 DCs 以及 Tregs 擴增(數據未示出)。

實施例 4：Notch 受體阻斷對於 Tregs 的影響

已證明 DCs 擴增會造成 Tregs 擴增(Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009)。如同上面討論的，在 Dll4 阻斷時發現到 DCs 與 Tregs 均會在胸腺中擴增(第 3A 與 7A 圖)。此外，在以 Dll4-Ab 處理的小鼠的週邊中，也發現到 DCs 與 Tregs 的百分比以及絕對數目會增加(表 1 與 4)。為了確定阻斷 Notch 受體能否造成與 Dll4 刪除相同的表現型，研究 Nicastrin 剔除(KO)小鼠(Nic^{-/-})。Nicastrin 是一種涉及 Notch 傳訊路徑的分子而且在缺乏 nicastrin 的小鼠體內遺傳去除 nicastrin 會導致 Notch 受體 1、2、3 和 4 下游的訊息轉導被阻斷(Aifantis *et al.*，未公開的數據)。Nicastrin KO 小鼠被證明會表現出與 Dll4-刪除/阻斷小鼠類似的表現型，Tregs 的數目增加(百分比與絕對數目均有)，在胸腺中與在脾臟中是相同的(參見表 5)。

表 5

Treg	胸腺		脾臟	
	對照組小鼠	Nicastrin KO 小鼠	對照組小鼠	Nicastrin KO 小鼠
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 細胞中的	3.3±0.2	15.2±2.0 (<i>p</i> <0.1)	16.0±1.3	33.9±2.1 (<i>p</i> <0.0001)

Treg (%)				
絕對數目的 比值 (Treg/Teff)	0.04±0.002	0.2±0.03 (<i>p</i> <0.01)	0.2±0.01	0.6±0.006 (<i>p</i> <0.0001)

最後，當 *Nic*^{-/-} 小鼠的骨髓細胞(BM)轉移至經致死照射的 WT 小鼠時，在 *Nic*^{-/-}→WT 嵌合體中觀察到胸腺 Tregs 擴增，暗示這樣的擴增是細胞-自主作用 (cell-autonomous effect)；而以抗-Dll4 Ab 來阻斷 Dll4 的接受者小鼠沒有加成效用(參見表 6)。

表 6

BM 供給者	在以下列處理的接受者 WT 小鼠中之 CD3 ⁺ CD4 ⁺ 細胞的 %Treg	
	對照 Ab	抗-Dll4 Ab
WT	3.6±0.4	35±4
<i>Nic</i> ^{-/-}	37±2	41±2

這些結果暗示，藉由阻斷 Dll4 或 Notch 受體來中斷 Dll4-Notch 傳訊會造成與 Treg 擴增類似的表現型。

為了確定在 Dll4 阻斷時 Treg 的擴增是否與 DC 數目相關聯(Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009，上文)，製備缺乏 DCs 的小鼠並且如同在實施例 1 中使用 Dll4 Ab 來進行試驗。表現靈長動物白喉毒素受體(DTR)的轉殖基因小鼠被賦予白喉毒素(DT)敏感性給它們的細胞，除此以外它們是 DT-不敏感。DT 經由其 B 次單位與細胞 DTR 交互作用而進入細

胞，DT A 次單位在胞吞作用時被釋出而催化延長因子 2 的 ADP-核糖苷化，在有絲分裂或末端分化細胞中造成蛋白質合成受到抑制進而快速細胞凋亡。細胞切除的特異性與計時可分別透過細胞類型-限定的啟動子/增強要素以及投予毒素的攝生法來決定。為了標定 DT 對於 DC 的敏感性，Jung 等人(2002, *Immunity* 17:221-220)生育出帶有編碼類人猿 DTR-GFP (綠色螢光蛋白)融合蛋白質之轉基因(受鼠 CD11c 啟動子所控制)的小鼠(CD11cre-DTR 小鼠)。因為 CD11c 會在所有 DCs 中編碼、表現 CD11c 的所有鼠 DC 次群在 DT 投藥時被刪除。

依據實施例 1 中所述的操作步驟以 Dll4 Ab 或 hFc 對照來處理製備出之缺少 DCs 的轉殖小鼠。治療之後的第 14 天，收取胸腺以及脾臟並且製備供分析之用。藉由流動式細胞測量術評估 Dll4 在特定 DC 或 T 細胞次群之表面上的表現含量，以確定 Dll4 Ab 結合至哪個特定次群。結果顯示，DCs 以及 T 細胞不會在其表面表現可偵測到的 Dll4 含量(數據未示出)。這個發現被 Dll4 表現在胸腺上皮細胞(TECs)的表面的報導(Koch *et al.* 2008, 上文)所證實。但最重要的是，發現以 Dll4 Ab 處理缺乏 DCs 的小鼠無法誘發 Treg 擴增，而以 Dll4 Ab 處理的野生型小鼠(亦即 DC 未刪除的小鼠)會明顯地增加 Treg 在 $CD3^+CD4^+$ 細胞中的比例 ($p < 0.001$)，暗示在 Dll4 Ab 處理時 Tregs 的擴增至少於某種程度上是經由 DC 擴增所媒介。

實施例 5：DII4 阻斷在實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)中的影響

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺天然調節性 T 細胞(亦即 Tregs)在維持自我-耐受性扮演重要角色並且抑制自體免疫疾病，諸如第 1 型糖尿病、自體免疫腦脊髓炎、GVHD 與發炎性腸病(Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009, 上文；Swee LK *et al.*, 2009, 上文；以及 McGreachy *et al.*, 2005, 175(5):3025-3032)。

為了瞭解因為 DII4 阻斷導致 Treg 數目的增加能否預防自體免疫疾病，在小鼠模型中研究 DII4 阻斷對於 EAE 的影響。EAE 小鼠模型是藉由將髓鞘寡樹突狀細胞糖蛋白(MOG)肽(於傅氏完全佐劑(CFA)中乳化)注射至 C57B1/6 小鼠的腳墊中接著(24 小時之後)為注射百日咳毒素(PTX)來誘發疾病而被建立。疾病記分是依據下列症狀來決定：(0)沒有症狀；(1)尾巴不舉；(2)尾巴不舉加上後腳虛弱；(3)部分後腳麻痺；(4)完全後腳麻痺；(5)四肢麻痺；以及(6)垂死。免疫之前的 12 至 24 小時，前誘發組的小鼠(n=10)也接受皮下注射 25 mg/kg 的抗-DII4 Ab (REGN577)或同位素對照 Ab (對 CD20 有特異性的人類抗體，內部依據 US 2008/0260641 中的揭示內容製備)或 PS/2 (對抗鼠類整合素細胞附著分子 VLA-4 的大鼠/小鼠 IgG2b；ATCC #CRL-1911)，而後誘發組的小鼠(n=10)在症狀出現當天接受相同處理。PS/2 Ab 已知會在有關復發性實驗性自體免疫腦脊髓炎(R-EAE)的小鼠模型中使疾病復發惡化並且增加 CD4⁺T 細胞累積在中樞神經系統(Theien BE *et al.*, 2001, *J Clin Invest* 107(8):995-

1006)。1 週注射抗體 2 次，持續 2 週。實驗結束時，小心取出小鼠的脊髓、壓碎並且繼而培育在含有膠原蛋白酶 D (Sigma Aldrich)的 RPMI 1640 培養基中。加入 2 mM 的 EDTA 以停止反應並且令混合物通過 70-mm 細胞濾網以及藉著流動式細胞測量術分析細胞內含物。

如第 9A 以及 9B 圖中所示，在 MOG 注射之後，以同位素對照 Ab 處理的小鼠從約第 10-14 天起產生症狀(亦即，具有超過“0”的疾病記分)並且在第 15 與 21 天之間達到最高。相反地，與以對照 Ab 處理的小鼠相較之下，以 Dll4 Ab 處理的小鼠完全免於疾病進展。表 7 顯示與以對照 Ab 處理的小鼠相較之下，在以 Dll4 Ab 處理的小鼠的胸腺以及脾臟中的 Tregs 百分比與絕對數目的增加倍數。

表 7

MOG 注射 之後的天數	胸腺中的 Treg		脾臟中的 Treg	
	百分比的增 加倍數	絕對數目的 增加倍數	百分比的增 加倍數	絕對數目的 增加倍數
12	2.46	0.77	1.08	1.46
18	4.88	2.67	1.23	1.89
21	1.41	1.01	1.85	4.77

在約第 18 天左右 Tregs 似乎主要是在胸腺中擴增並且只有在第 21 天之後於週邊(亦即脾臟)看到明顯擴增。

在這個特定的實驗條件下，在後誘發階段的 Dll4 Ab 處理未顯示出會明顯改善疾病進展。Dll4 Ab 投藥的劑量和

/或頻率可以在習於該技藝者的知識內被進一步調整。但重要的是，與以那些接受對照 Ab 的小鼠相較之下(參見下面表 8)，接受前-誘發 Dll4 Ab 的小鼠於第 18 天在細胞浸潤至脊髓方面展現出明顯增加。在以對照 Ab 處理的小鼠脊髓中所觀察到的細胞浸潤於那些小鼠體內是疾病過程的主要促成因素。

如表 8 中所示，在第 21 天與以對照 Ab 處理的小鼠的脊髓相較之下，以 Dll4 Ab 處理的小鼠的脊髓中，巨噬細胞 (F4/80⁺) 降低 8 倍 ($p<0.0001$)，NK 細胞降低 2.7 倍 ($p<0.0001$)，在 CD11b 細胞降低 1.7 倍 ($p<0.001$)，而在 B 細胞降低 2.5 倍 ($p<0.001$)。

表 8

MOG 注射之 後的天 數	脾臟中的浸潤性細胞的絕對數目(×10 ⁶)							
	巨噬細胞		NK 細胞		B 細胞		CD11b ⁺ 骨髓細胞	
	對照組	Dll4 Ab	對照組	Dll4 Ab	對照組	Dll4 Ab	對照組	Dll4 Ab
12	0.4 ±0.05	0.3 ±0.01	0.2 ±0.03	0.1 ±0.004	0.3 ±0.005	0.2 ±0.006	0.9 ±0.09	0.6 ±0.02
18	1.7 ±0.5	0.2 ±0.02	0.2 ±0.06	0.1 ±0.005	1.8 ±0.2	1.0 ±0.08	4.7 ±0.07	1.8 ±0.1
21	1.6 ±0.1	0.2 ±0.01	0.8 ±0.07	0.3 ±0.03	1.5 ±0.1	0.6 ±0.02	4.8 ±0.1	2.9 ±0.2

此外，在以 Dll4 Ab 處理的小鼠體內，淋巴節中的 IL-17 以及 IFN- γ 的生成明顯減少 ($p < 0.001$) (第 10 圖)。因此，Dll4 可能透過媒介 Th1 發育涉入 EAE 的致病機轉，而 Dll4 Ab 處理可透過阻斷 Th1 與 Th17 細胞激素分泌來防止誘發疾病。

實施例 6：Dll4 阻斷對於糖尿病的影響

亦在 NOD/ShiLtJ 小鼠(“NOD 小鼠”，一種有關第 1 型糖尿病的多基因模型(Makino S *et al.*, 1980, *Jikken Dobutsu* 29 (1):1-13 ; Serreze DV *et al.*, 1997, *J Immunol* 158(8):3978-86))中測試 Dll4 阻斷對於糖尿病的影響。糖尿病在 NOD/ShiLtJ 小鼠中的特徵在於胰島炎(insulitis)以及胰島的白血球浸潤。胰島素含量明顯降低，自發地在約 12 週大時發生於雌性並且在數週之後發生於雄性。因此，血漿葡萄糖含量增加到超過 250 mg/dL。使用 ONETOUGH® mini (LifeScan, Inc.)檢驗 NOD 小鼠的血糖含量 1 週 2 次。在連續 2 次讀值超過 250 mg/dL 血糖之後，小鼠被視為有糖尿病。從連續糖尿病測量值的第 1 次起註明日期為糖尿病開始。自 9 週大時以 hFc (n=5) 或抗 -Dll4 Ab (Regn577)(n=10) 25 mg/kg 注射小鼠每週 2 次，歷時 7 週。以取自於尾部的血液樣品監測血糖含量 1 週 2 次。

如第 11A 圖中所示，以 hFc 處理的小鼠在 13 週大之後開始產生自發性糖尿病，血糖含量高於 250 mg/dL(●)。相對地，以抗-Dll4 Ab (REGN577)處理的小鼠在 25 週大時未

顯示出有血糖含量增加的徵候(■)，而且測量值又額外持續了 10 週。D114-Ab 處理在糖尿病發病之前能預防糖尿病發病，而經處理的動物似乎至今未發生糖尿病。有趣的是，當在 20 週大以抗-CD25 (PC61) mAb 來注射 10 隻以 D114 Ab 處理的小鼠中的 5 隻以使得 Tregs 耗竭(◆)時，牠們的血糖含量在 1-2 週之後開始增加而且小鼠變成有糖尿病。這表示 D114 Ab 對於第 1 型糖尿病的預防效用至少在某個程度上是由 Tregs 所媒介(第 11A 圖)。

胰島素以及 GAD65 是 2 種標準自體抗體，可以在糖尿病 NOD 小鼠還有糖尿病個體的血清中發現到它們。因此，藉由 ELISA 來測量自體抗體在以 hFc 對照或 D114 Ab 處理之小鼠中的血清含量。如第 11B 圖中所示，D114-Ab 處理會以類似於那些未處理 WT C57B1/6 者(亦即，非 NOD 小鼠；陰性對照組動物)的含量阻斷抗-胰島素(□)以及抗-GAD65(■)自體抗體的生成。相反地，接受 hFc 對照的 NOD (糖尿病)小鼠在牠們的血清中有高含量的自體抗體。此外，當以 H&E (蘇木精與伊紅)來對以 D114 Ab 處理並且未顯示糖尿病症狀之 23 週大小鼠的胰臟切片進行染色時，觀察到正常數目的 β -島(生成胰島素的細胞而且它們的破壞與糖尿病發病率直接相關)並且維持著型態(第 11C 圖左區以及第 11D 圖左區)。再者，在以 D114 Ab 處理的小鼠體內沒有觀察到 β -島有細胞浸潤(第 11C 圖左區以及第 11D 圖右區)。相反地，以 hFc 對照處理的糖尿病小鼠在其胰臟具有數目明顯要比以 D114 Ab 處理之小鼠還低的 β -島(第 11C 圖右區

以及第 11D 左區)並且在剩餘極少的 β -島中含有高含量的細胞浸潤(第 11C 圖右區以及第 11D 圖右區)。因此, Dll4 Ab 能夠完全防止糖尿病歷時長時間而且它的影響至少在某個程度上似乎是藉由擴增 Tregs 所媒介;但是, 可能有額外的機制涉入 Dll4 Ab 對於 β -島和/或胰島素之保護效用。

測定以 Dll4 Ab 處理的糖尿病小鼠的確切血糖含量並且拿來與以 hFc 對照處理的小鼠做比較。在糖尿病發病時(第 0 天)以 25 mg/kg 的 Dll4 Ab (n=3)或對照 hFc (n=4)來處理糖尿病小鼠。在 Dll4 Ab 處理時, 糖尿病小鼠的葡萄糖含量明顯從約 350 mg/dL 降低至正常含量(約 120-130 mg/dL)(第 11E 圖)。這個效用持續平均 4-5 週。一般來說, 更觀察到當以 Dll4 Ab 來處理具有血糖少於 350 mg/dL 的糖尿病小鼠時, 牠們的血糖含量掉至正常含量且這個效用要比在治療時具有血糖超過 350 mg/dL 的小鼠持續更久。這表示就控制血糖含量來說, 使用 Dll4 Ab 來長時間以及有效處理是有可能的。因此, 在不受到此處所述的任何特定機制圍限的情況下, 這些發現暗示: Dll4 抗體對於第 1 型糖尿病具有極大的治療潛力。

上面實驗的結果已揭示有前所未有的調節環存在, 其會在活體內控制 Treg 細胞以及 DCs 的數目。這個調節性迴路對於免疫性以及耐受性之間的平衡可能是必要的, 但最為重要的是, 首次推導出這個免疫系統的 3 個主要成員(亦即 Dll4-DCs-Tregs)之間的連結。因此, 使用 Dll4 拮抗劑的療法代表一種在活體內控制 Treg 數目而且因此控制自體免

疫疾病與相關病況進展的有效方法學。

【圖式簡單說明】

第 1A-1B 圖顯示 Dll4 阻斷對於 T 細胞以及 B 細胞發育的影響。以抗-Dll4 抗體(REGN577)或對照人類 Fc 片段(hFc)注射小鼠。14 天之後，收取胸腺並且藉由流動式細胞測量術評估 T 細胞與 B 細胞次群。第 1A 圖：點狀圖顯示 $CD4^-CD8^-$ (雙重陰性胸腺前驅細胞或“DN”)、 $CD4^+CD8^+$ (雙重陽性胸腺前驅細胞或“DP”)、 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ (單陽性胸腺前驅細胞或“SP”)以及 $DN/CD44^+CD25^-$ (在 DN1 階段的胸腺前驅細胞) T 細胞的數目。點狀圖中的數字表示 T 細胞次群在總胸腺細胞中的百分比(平均值 $\pm$ SEM)。第 1B 圖：柱狀圖顯示 B 細胞 ($B220^+$) 在 DN1 細胞 (亦即在 $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$ 圈出者)中的百分比(平均值 $\pm$ SD)。

第 2A-2B 圖顯示 Dll4 阻斷對於 B 細胞在骨髓中的發育階段(第 2A 圖)以及對於 B 細胞在脾臟中的恒定(第 2B 圖)的影響。點狀圖中的數字表示 B 細胞次群在骨髓或脾臟的總細胞中的百分比(平均值 $\pm$ SEM)。GC：生殖中心 B 細胞；T1 與 T2：B 細胞次群；M：基質膠 B 細胞；以及 Fo：濾泡 B 細胞。

第 3A-3D 圖顯示 Dll4 阻斷對於樹突狀細胞(DC)發育的影響。第 3A 圖：點狀圖顯示習知 DCs (“cDCs”； $B220^-CD11C^+$) 以及漿細胞樣 DCs (“pDCs”； $PDCA1^+B220^+CD11C^+$) 在抗-Dll4 Ab 處理時於胸腺中的擴

增。點狀圖中的數字表示 DCs 在第 14 天時於總細胞中的平均百分比(平均值 $\pm$ SEM)。第 3B 圖：柱狀圖顯示 cDC 以及 pDC 擴增在以 Dll4 Ab 處理的小鼠(■)與以 hFc-對照處理的小鼠(□)之胸腺中的動力學。第 3C 圖：點狀圖顯示 Dll4 Ab 對於胸腺中的前-DCs (MHCII^{lo}CD11c^{int}CD135⁺Sirp- α ^{int})以及晚期前-DCs (MHCII^{lo}CD11c^{int})的影響。點狀圖中的數字表示前-DCs 在第 14 天於總細胞中的平均百分比(平均值 $\pm$ SEM)。第 3D 圖：點狀圖顯示在以 Dll4 Ab 處理之小鼠胸腺的 DN1 (CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁻)原-T 細胞群中有 MHCII^{lo}CD11c^{int} DCs 存在，但是在以 hFc 對照 Ab 處理的小鼠胸腺中沒有。點狀圖中的數字表示 MHCII^{lo}CD11c^{int} DCs 在第 3 天於 DN1 原-T 細胞群中的平均數目(平均值 $\pm$ SEM)。

第 4 圖顯示 Dll4 阻斷對於胸腺內另擇 DC 譜系發育成源自於共同 T/DC DN1 前驅細胞的不成熟 DCs (imDCs)的影響。分類為 DN1 CD45.1⁺Lin⁻的細胞在胸腺內被轉移至以 Dll4 Ab (■)或 hFc 對照 Ab (□)處理的 CD45.2⁺宿主小鼠。

第 5 圖顯示 Dll4 阻斷對於 CSF-1 (M-CSF)(一種涉及 DC 發育的關鍵性細胞激素)的血清含量的影響。藉由酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)測量未經處理(▨)或以同位素對照 Ab (□)或 Dll4 Ab (■)處理的小鼠的血清 CSF-1 含量。

第 6 圖顯示在他莫西芬處理時，遺傳 Dll4 刪除在含有他莫西芬誘發型 Cre 重組酶構築體的 DLL4COIN 小鼠體內對於 B 細胞以及 DC 恆定的影響。點狀圖中的數字表示 B

細胞與 pDCs 以及 cDCs 這兩者在胸腺之總細胞中的平均百分比(平均值 $\pm$ SEM)。

第 7A-7C 圖顯示 Dll4 阻斷/刪除對於 Treg 恆定的影響。第 7A 圖：點狀圖顯示與以 hFc 對照 Ab 處理的小鼠相較之下，Tregs 在以 Dll4-Ab 處理歷時 2 週的小鼠胸腺內的擴增。點狀圖中的數字表示 Tregs 在胸腺的 CD3⁺CD4⁺ T 細胞中的平均百分比(平均值 $\pm$ SEM)。第 7B 圖：柱狀圖分別顯示在以 Dll4 Ab (■)與 hFc 對照 Ab (□)處理的小鼠之胸腺(上區)與脾臟(下區)中的 Treg 發育動力學。第 7C 圖：點狀圖顯示與以玉米油對照處理的對照組 DLL4COIN 相較之下，Treg 在以他莫西芬(TAM)處理的 DLL4COIN 小鼠胸腺中的擴增。點狀圖中的數字表示 Tregs 在胸腺的 CD3⁺CD4⁺ T 細胞中的平均百分比(平均值 $\pm$ SEM)。

第 8A-8B 圖顯示於表現人類 Dll4 (hDll4)的小鼠胸腺中，在 Dll4-Ab (REGN421)處理(1 mg/kg 或 5 mg/kg)或 hFc 處理(5 mg/kg)每週 2 次、持續 2 週之後的第 7 和 14 天，以及在停止處理之後第 28 天觀察到的 Dll4 阻斷對於 DC (第 8A 圖)以及 Treg 恆定(第 8B 圖)的影響。點狀圖中的數字表示 pDCs 與 cDCs (第 8A 圖)或 Tregs (第 8B 圖)在胸腺的總細胞中的平均百分比(平均值 $\pm$ SEM)。

第 9A-9B 圖顯示 Dll4 阻斷在實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)小鼠模型中的影響。第 9A 圖：該圖顯示每個處理組的 EAE 疾病發病率(%)。第 9B 圖：該圖顯示 EAE 依據平均疾病記分的進展。治療是使用抗-Dll4 Ab (REGN577)前-

誘發(▼)；同位素對照 Ab 前-誘發(◆)；REGN577 後-誘發(▲)；或抗-VLA-4 Ab (PS/2)前-誘發(■)。

第 10 圖顯示 Dll4 阻斷對於 EAE 小鼠的淋巴結中 IL-17 以及 IFN- γ 生成的影響。在第 12 天以及第 18 天藉由 ELISA 測量 IL-17 (左區)以及 IFN- γ (右區)在以 Dll4 Ab (■)或 hFc 對照 Ab (□)處理之 EAE 小鼠的淋巴結中的含量。

第 11A-11E 圖顯示 Dll4 Ab 在 NOD 小鼠糖尿病模型中的影響。第 11A 圖顯示在 9 週大時接受 hFc 對照 Ab (●)或抗-Dll4 Ab (REGN577)(■)之小鼠中的%糖尿病發病率(連續 2 次血糖含量的讀值高於 250 mg/dL)。亦顯示以 Dll4 Ab 處理接著注射 PC61 Ab 的 5 隻小鼠在 20 週時的%糖尿病發病率(◆)。PC61 Ab 是一種抗 CD25 抗體並且會使 Treg 細胞耗竭。第 11B 圖顯示與未經處理的野生型(WT)小鼠相較之下，抗-胰島素自體抗體(□)以及抗-麩胺酸去羧酶 65 (GAD65)自體抗體(■)生成在以 Dll4 Ab 或 hFc 對照處理的 NOD 小鼠根據 ELISA 的測量值。第 11C 圖顯示以蘇木精與伊紅(H&E)染色之經 Dll4 Ab (左區)或 hFc 對照(右區)處理的 NOD 小鼠的胰臟切片。黑色箭頭表示個別的 β -島而白色箭頭表示 β -島中的浸潤細胞(右區)。第 11D 圖顯示在以 hFc 對照處理(□)或以 Dll4 Ab 處理小鼠的胰臟中 β -島的數目(左區)或%浸潤 β -島(右區)。第 11E 圖顯示於疾病發病時，血糖含量在以 Dll4 Ab (●)或 hFc 對照(□)處理的小鼠體內於治療之後 42 天的變化。

【主要元件符號說明】

無

100103219
序列表

<110> 再生元醫藥公司
<120> 以 D114 拮抗劑治療自體免疫疾病之方法
<130> 6050A-WO
<140> 待指派
<141> 隨之提申
<150> 61/299,801
<151> 2010-01-29
<150> 61/361,687
<151> 2010-07-06
<150> 61/388,697
<151> 2010-10-01
<160> 118
<170> 用於 Windows 版本 4.0 的 FastSEQ

<210> 1
<211> 2058
<212> DNA
<213> 智慧人
<400> 1

atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcacttttg 60
cagcagcgcg cgcccggtc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag 120
cgcggcgtac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggct gccggacttt ctccgcgctc 180
tgctttaagc acttccaggc ggtcgtctcg cccggaccct gcaccttcgg gaccgtctcc 240
acgccggtat tgggcaccaa ctccctcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc 300
aaccctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta ccttctcgct catcatcgaa 360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc 420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagcacc cacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540
ggagacaact gctccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc 600
cagccagatg gcaacttgct ctgcctgccc gggttgactg gggaatattg ccaacagcct 660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc 720
tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc 780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt 840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactccccat gcaagaatgg ggcaacgtgc 900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgtggac 960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag 1020
gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa 1080

cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgettcaatg ggggctcctg ccgggagcgc 1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact tcaccggctc caactgcgag 1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagtg cctgaaccga 1260
ggccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac 1320
gtcagcgact gtgcccgtaa cccttgcgcc cacggtggca cttgccatga cctggagaat 1380
gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc 1440
atcgatgcct gtgcctcgag tccctgcttc aacagggcca cctgctacac cgacctctcc 1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc 1560
gtgggcttgc cgcccagctt cccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagt 1620
ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagt 1680
gacgacggca gcaggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt 1740
cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtgga ctgtggcctg 1800
gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccaggg 1860
cccctggggc gggggaccat gccaggaaag tttcccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcgccac tgcggttaca cagtgaaaag ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
attgccacgg aggtataa 2058

<210> 2

<211> 685

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 2

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
50 55 60
Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
65 70 75 80
Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
85 90 95
Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
100 105 110
Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp

115	120	125
Leu Arg Pro Glu Ala	Leu Pro Pro Asp Ala	Leu Ile Ser Lys Ile Ala
130	135	140
Ile Gln Gly Ser Leu	Ala Val Gly Gln Asn Trp	Leu Leu Asp Glu Gln
145	150	155
Thr Ser Thr Leu Thr	Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr	Arg Val Ile Cys Ser
165	170	175
Asp Asn Tyr Tyr Gly	Asp Asn Cys Ser Arg	Leu Cys Lys Lys Arg Asn
180	185	190
Asp His Phe Gly His	Tyr Val Cys Gln Pro	Asp Gly Asn Leu Ser Cys
195	200	205
Leu Pro Gly Trp Thr	Gly Glu Tyr Cys Gln	Gln Pro Ile Cys Leu Ser
210	215	220
Gly Cys His Glu Gln	Asn Gly Tyr Cys Ser	Lys Pro Ala Glu Cys Leu
225	230	235
Cys Arg Pro Gly Trp	Gln Gly Arg Leu Cys	Asn Glu Cys Ile Pro His
245	250	255
Asn Gly Cys Arg His	Gly Thr Cys Ser Thr	Pro Trp Gln Cys Thr Cys
260	265	270
Asp Glu Gly Trp Gly	Gly Leu Phe Cys Asp	Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
275	280	285
Thr His His Ser Pro	Cys Lys Asn Gly Ala	Thr Cys Ser Asn Ser Gly
290	295	300
Gln Arg Ser Tyr Thr	Cys Thr Cys Arg Pro	Gly Tyr Thr Gly Val Asp
305	310	315
Cys Glu Leu Glu Leu	Ser Glu Cys Asp Ser	Asn Pro Cys Arg Asn Gly
325	330	335
Gly Ser Cys Lys Asp	Gln Glu Asp Gly Tyr	His Cys Leu Cys Pro Pro
340	345	350
Gly Tyr Tyr Gly Leu	His Cys Glu His Ser	Thr Leu Ser Cys Ala Asp
355	360	365
Ser Pro Cys Phe Asn	Gly Gly Ser Cys Arg	Glu Arg Asn Gln Gly Ala
370	375	380
Asn Tyr Ala Cys Glu	Cys Pro Pro Asn Phe	Thr Gly Ser Asn Cys Glu
385	390	395
Lys Lys Val Asp Arg	Cys Thr Ser Asn Pro	Cys Ala Asn Gly Gly Gln
405	410	415
Cys Leu Asn Arg Gly	Pro Ser Arg Met Cys	Arg Cys Arg Pro Gly Phe

420	425	430	
Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro			
435	440	445	
Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys			
450	455	460	
Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser			
465	470	475	480
Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr			
485	490	495	
Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe			
500	505	510	
Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro			
515	520	525	
Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu			
530	535	540	
Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro			
545	550	555	560
Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys			
565	570	575	
Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys			
580	585	590	
Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln			
595	600	605	
Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg			
610	615	620	
Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu			
625	630	635	640
Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser			
645	650	655	
Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile			
660	665	670	
Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val			
675	680	685	

<210> 3

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 3
caggtgcagc tgggtgcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagaa cctctcactc 60
acctgtgccca tctccggaga cagtgtctct agtgatagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtcctccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggtat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccttca acccagatac atccaagaac 240
cacatctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatcta ttactgtgca 300
agagagggggg ataattggaa ttacggctgg ctcgaccct ggggccaggg aaccacgggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Asn Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30
Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Phe Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
His Ile Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Ile
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Asn Trp Asn Tyr Gly Trp Leu Asp
100 105 110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
ggagacagtg tctctagtga tagtgctgct 30

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp Ser Ala Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
acatactaca ggtccaagtg gtataat 27

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
1 5

<210> 9
<211> 42
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
gcaagagagg gggataattg gaattacggc tggctcgacc cc 42

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10
Ala Arg Glu Gly Asp Asn Trp Asn Tyr Gly Trp Leu Asp Pro
1 5 10

<210> 11
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11
gacatccagt tgacccagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca ggcctcctt cttagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttggtttc tagtcggggc 180
tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatccggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttttggaatt tattattgta tgcaagctct acaaactccg 300
tacacttttg gccgggggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 12
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
cagagcctcc ttcttagtaa tggatacaac tat 33

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 14
Gln Ser Leu Leu Leu Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 15
ttggtttct

9

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
Leu Val Ser
1

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
atgcaagctc tacaaactcc gtacact

27

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 19
gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt ttatggtatg atggaactaa taaaaactat 180
gtagagtccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa tatgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
gatttttagga gtggttatga ggggtggttc gaccctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 20
Glu 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
Ser Phe Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Asn Tyr Val Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp His Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Glu Gly Trp Phe Asp Pro
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 21
ggattcacct tcagtagtta tggc 24

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23
ttatggtatg atggaactaa taaa 24

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 24
Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys
1 5

<210> 25
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 25
gcgagagatc acgatttttag gagtggttat gaggggtggt tcgacccc 48

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 26
Ala Arg Asp His Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Glu Gly Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 27
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 27
gaaatagtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtttag agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacac cgtagcaact ggcctcccac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 28
Glu Ile Val Met 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 Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr 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 His Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 29
cagagtgtta gcagctac 18

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 30
Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 31
gatgcatcc

9

<210> 32
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 32
Asp Ala Ser
1

<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 33
caacaccgta gcaactggcc tcccact

27

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 34
Gln His Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 35
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 35
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgatgg ctccatcaac agtgttgaat cctactggac ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatca aatacactgg gggcatccac 180
tataaccgt ccctcaagag tcgacttgcc atatcagtgg acacgtcaaa gaaccagttc 240
tcctgaaaa tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagca 300
cgtggaagtc atacttttga tgtctggggc caggggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 36

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

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 37
gatggctcca tcaacagtgt tgaatcctac 30

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 38
Asp Gly Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 39
atcaaataca ctgggggcat c 21

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 40
Ile Lys Tyr Thr Gly Gly Ile
1 5

<210> 41
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 41
gcgagagcac gtggaagtca tacttttgat gtc 33

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 42
Ala Arg Ala Arg Gly Ser His Thr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 43
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 43
gaaattgtgc tgactcagtc tccaggcacc ctgtcttggc ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agtaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagact cctcatTTat ggtgcatcca gcagggtcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcactgta ttattgtcag cagtatagta ggtcaccgat caccttcggc 300
caagggacca aagtggatat caaa 324

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 44
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Trp Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Val Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 45
cagagtatta gcagtaacta c 21

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 46
Gln Ser Ile Ser Ser Asn Tyr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 47
ggtgcatcc 9

<210> 48
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 48
Gly Ala Ser
1

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 49
cagcagtata gtaggtcacc gatcacc

27

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 50
Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 51
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 51
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtgttactt actactggac ctggatccgc 120
cagcaccag ggaggggcct agagtggatt gggtagatca aattcagtgg gagcacctac 180
tacaaccgt ccctcaaggg tcgagtcacc atatcagtgg acacgtctaa gaaccaattc 240
tcccttaaaa ttaactctgt gactgccgcg gacacggcgg tgttttactg tgcgagagct 300
tctggaagtc atacttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 52

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

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 53

gggtggctcca tcaacagtgt tacttactac 30

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 54
Gly Gly Ser Ile Asn Ser Val Thr Tyr Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 55
atcaaattca gtgggagcac c 21

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 56
Ile Lys Phe Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 57
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 57
gcgagagctt ctggaagtca tacttttgat atc 33

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 58
Ala Arg Ala Ser Gly Ser His Thr Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 59
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 59
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc aacagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcgtcca gcagggtcac tggcatccca 180
gacagggtca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttggaatgta ttactgtcag cagtatagta ggtcaccgat caccttcggc 300
caagggacca agctggagat caaa 324

<210> 60
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 60
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Ser Gly Ala Ser Ser Arg Val Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Gly Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 61
cagagtgtta gcaacagcta c 21

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 62
Gln Ser Val Ser Asn Ser Tyr
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 63
ggtgcgtcc 9

<210> 64

<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 64
Gly Ala Ser
1

<210> 65
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 65
cagcagtata gtaggtcacc gatcacc

27

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 66
Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 67
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 67
gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggggagcc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac aactttgcc tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaact attagtggta gtggcgttga cacatactgc 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgttc gaaagatggc 300
gccttctata gtggctacga aactactgg ggccaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Phe
20 25 30
Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Val Asp Thr Tyr Cys 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
Ser Lys Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Gly Tyr Glu His Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 69

ggattcacct ttaacaactt tgcc 24

<210> 70

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 70
Gly Phe Thr Phe Asn Asn Phe Ala
1 5

<210> 71
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 71
attagtggta gtggcgttga caca 24

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 72
Ile Ser Gly Ser Gly Val Asp Thr
1 5

<210> 73
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 73
tcgaaagatg gcgcttcta tagtggctac gaacactac 39

<210> 74

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 74
Ser Lys Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Gly Tyr Glu His Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 75
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca acagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
tctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 76
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 76
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 77

.cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 78

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1

5

<210> 79

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

$\langle 220 \rangle$

<223> 合成的

<400> 79

ggtacatcc

9

<210> 80

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 80
Gly Thr Ser
1

<210> 81
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 81

cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 82
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 83
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 83

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggacctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc tactatggta tcagttggat acgacagacc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acgatggtaa cacagactat 180
gcacagaagt tccaagacag aatcaccatg accacagaca catcctcgac cacagcctac 240
atggaactga ggagcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gaggtatagt 300

tggaacaagc actggttcga cccctggggc cagggaaacca tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro 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 Tyr Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Ile Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Ser Trp Asn Lys His Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

ggttacacct ttacctacta tggt 24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 86
Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Gly
1 5

<210> 87
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 87
atcagcgctt acgatggtaa caca 24

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 88
Ile Ser Ala Tyr Asp Gly Asn Thr
1 5

<210> 89
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 89
gcgaggtata gttggaacaa gcactgggttc gacccc 36

<210> 90
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 90
Ala Arg Tyr Ser Trp Asn Lys His Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 91
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 91

gaaattgtga tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga cagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttacc ggcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatccca 180
gacaggttca ctggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtga tttctgtcaa cagtctgctt tctcaccgtg gacgttcggc 300
caggggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 92
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 92

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Gly Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Thr
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Phe Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 93
cagagtgtta ccggcagcta c 21

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 94
Gln Ser Val Thr Gly Ser Tyr
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 95
ggtgcatcc 9

<210> 96
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 96
Gly Ala Ser
1

<210> 97
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 97
caacagtctg ctttctcacc gtggacg 27

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 98
Gln Gln Ser Ala Phe Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 99
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 99
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgggtt actactggag ttggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatcc attatagtgg gaacaccac 180
tacaatccga ccctcaagag tcgaattacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcccttgagg tgaactctgt gactgccgcg gacacggccg tatactactg tgcgaggaat 300
atgggttcggg gagttcactg gttcgacccc tggggccagg gaaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 100
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 100
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr His Tyr Asn Pro Thr
 50 55 60
Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Glu Val Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
Cys Ala Arg Asn Met Val Arg Gly Val His Trp Phe Asp Pro Trp Gly
 100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 101
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 101
ggtaggtctcca tcagcagtg tggttactac 30

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 102
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr
1 5 10

<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 103
atccattata gtgggaacac c 21

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 104
Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 105
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 105
gcgaggaata tggttcgggg agttcactgg ttcgacccc 39

<210> 106
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 106
Ala Arg Asn Met Val Arg Gly Val His Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 107
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 107

gaaatagtgt tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc 60
ctcttctgtt gggccagtcg gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtata tttctgtcaa cagtatagta gttcaccgct cactttcggc 300
ggagggacca agctggagat caaa 324

<210> 108
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 108

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Phe Cys Trp Ala Ser Arg Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Ser Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro

85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 109
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 109
cggagtgtta gcagcagcta c 21

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 110
Arg Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 111
ggtgcatcc 9

<210> 112
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 112
Gly Ala Ser
1

<210> 113
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 113

caacagtata gtagttcacc gctcact 27

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 114
Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 115
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 115

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt ttatggtatg atggaactaa taaaaactat 180
gtagagtccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa tatgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
gatttttagga gtggttatga ggggtggttc gaccctggg gccaggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369



1



<210> 118

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 118

Glu 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 Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr 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 His Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種類 δ 配位子 4 (D114)拮抗劑在製造用於預防、治療或改善第 1 型糖尿病之醫藥品的用途，其中該 D114 拮抗劑為專一地結合人類 D114 並且阻斷 D114 與 Notch 受體之間的交互作用之抗體或其片段，藉此增加調節性 T (Treg)細胞的數目並且預防、治療或改善該第 1 型糖尿病。
2. 如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 D114 拮抗劑是專一地結合人類 D114 (hD114)以及阻斷 D114-Notch 傳訊路徑的抗體或其片段，並且包含一重鏈可變區域(HCVR)以及一輕鏈可變區域(LCVR)，該重鏈可變區域包含分別為 SEQ ID NO：22、24 以及 26 的重鏈 CDR1、CDR2 以及 CDR3 序列，該輕鏈可變區域包含分別為 SEQ ID NO：30、32 以及 34 的輕鏈 CDR1、CDR2 以及 CDR3 序列。
3. 如申請專利範圍第 2 項的用途，其中該抗體或其片段包含 SEQ ID NO：20/28 之 HCVR/LCVR 組合。
4. 如申請專利範圍第 2 項的用途，其中該抗體或其片段包含 SEQ ID NO：116/118 之 HCVR/LCVR 組合。
5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項的用途，其進一步包含共投藥一治療有效量的至少一種額外治療劑，其是選自於降血糖劑、免疫抑制劑、抗發炎劑以及鎮痛劑。
6. 如申請專利範圍第 5 項的用途，其中該額外治療劑是選自於下列的至少一者：胰島素及其類似物、糖皮質素、環孢素、胺甲喋呤、非類固醇抗發炎藥物(NSAIDs)、TNF- α 拮抗劑、IL-1 拮抗劑、IL-6 拮抗劑以及類鴉片。