



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104321342 B

(45)授权公告日 2017.12.22

(21)申请号 201380025133.8

(22)申请日 2013.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104321342 A

(43)申请公布日 2015.01.28

(30)优先权数据

61/611,285 2012.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/002119 2013.03.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/137686 KO 2013.09.19

(73)专利权人 首尔大学校产学协力团

地址 韩国首尔市

专利权人 金弦起

(72)发明人 金弦起 郑俊昊 金珉秀 尹秀珉

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 吴小明

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2005029082 A2, 2005.03.31,

黄明主等. 肿瘤干细胞传统治疗抵抗与靶向治疗.《中国肿瘤临床》.2009,第36卷(第4期),第230-233页.

审查员 王奇

权利要求书1页 说明书17页

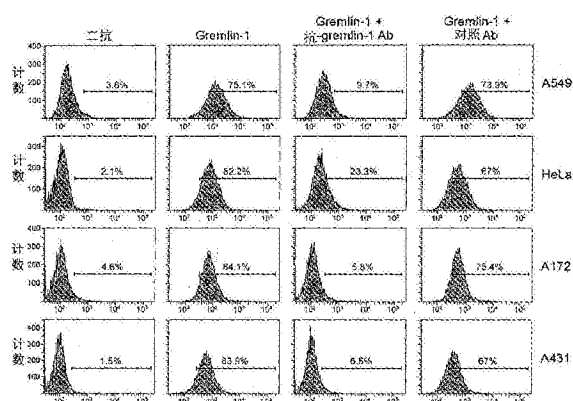
序列表20页 附图14页

(54)发明名称

Gremlin-1抗体

(57)摘要

本发明涉及Gremlin-1抗体,所述Gremlin-1抗体以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)的方式抑制Gremlin-1,由此提供治疗癌症的作用。本发明的抗体抑制依赖Gremlin-1的细胞迁移、细胞侵袭和细胞增殖,并因此可以有效地用于治疗癌症或免疫疾病。



1. 抗Gremlin-1抗体,其包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列中的CDR1的氨基酸23-35,CDR2的氨基酸51-57,和CDR3的氨基酸90-100;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列中的CDR1的氨基酸26-35,CDR2的氨基酸50-66,和CDR3的氨基酸99-110,

其中所述抗Gremlin-1抗体通过以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)的方式抑制Gremlin-1具有治疗癌症的作用,其中所述抗体抑制Gremlin-1,所述Gremlin-1通过抑制E-钙黏着蛋白的表达而诱导癌细胞的生长。

2. 权利要求1所述的抗Gremlin-1抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区。

3. 权利要求2所述的抗Gremlin-1抗体,其中所述抗体的所述轻链恒定区和重链恒定区是人或兔源的。

4. 权利要求1所述的抗Gremlin-1抗体,其中所述抗体抑制Gremlin-1与癌细胞的直接结合。

5. 权利要求1所述的抗Gremlin-1抗体,其中所述抗体抑制依赖Gremlin-1的细胞迁移、细胞侵袭和细胞增殖。

6. 用于治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-5中任一项所述的抗体和药用载体。

7. 权利要求6所述的药物组合物,其中所述癌症选自由以下各项组成的组:前列腺癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、肾癌、卵巢癌、结直肠癌、直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、骨癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、鼻咽癌、膀胱癌、子宫癌、食道癌和头颈癌。

8. 权利要求7所述的药物组合物,其中所述肺癌是非小细胞肺癌。

9. 用于诊断癌症的试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1至权利要求5中任一项所述的抗体。

10. 权利要求9所述的试剂盒,其中所述癌症选自由以下各项组成的组:前列腺癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、肾癌、卵巢癌、结直肠癌、直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、骨癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、鼻咽癌、膀胱癌、子宫癌、食道癌和头颈癌。

11. 权利要求10所述的试剂盒,其中所述肺癌是非小细胞肺癌。

Gremlin-1抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及gremlin-1抗体,并且更特别地,涉及这样的gremlin-1抗体,所述gremlin-1抗体通过以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)的方式抑制gremlin-1而具有治疗癌症的作用。

背景技术

[0002] Gremlin-1(20.7kDa),骨形态发生蛋白(BMP)的一种拮抗剂,是一种与富半胱氨酸区、半胱氨酸结基序和TGF- β 超家族的成员具有共同结构的由184个氨基酸构成的蛋白质。此蛋白质是进化保守的并且人gremlin基因(GREM1)已被映射至染色体15q13-q15(Topol LZ等,(1997)Mol.Cell Biol.,17:4801-4810;Topol LZ等,Cytogenet Cell Genet.,89:79-84)。Gremlin-1是一种分泌蛋白质,并且已报道了三种同种型(Topol LZ等,J.Biol.Chem.,275:8785-8793)。同种型1是最常见的同种型,而同种型2和3分别具有氨基酸39-79和10-79的缺失。

[0003] Gremlin-1与BMP-2、BMP-4和BMP-7形成杂二聚体,并且因此它抑制骨形态发生蛋白(BMP)结合至细胞表面上的受体(Stanley E等,(1998)Mech.Dev.,77:173-184;Merino R等,(1999)Development,126:5515-5522;Lappin DW等,(2000)Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.,9:469-472)。另外,gremlin-1在肺、肢体和肾发育期间以及在神经嵴细胞分化期间在调节BMP中起重要作用(Lu MM等,(2001)Dev.Dyn.,222:667-680;Shi W等,(2001)Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.,280:L1030-1039)。除了其对可溶性配体的拮抗作用之外,gremlin-1在细胞内与BMP-4前体蛋白质相互作用并且下调胚胎中BMP-4-介导的信号转导活性(Sun J等,(2006)J.Biol.Chem.,281:29349-29356)。Gremlin-1还与Slit蛋白质相互作用,Slit蛋白质是分泌的轴突导向蛋白质家族,并且充当单核细胞趋化性的抑制剂(Chen B等,(2004)J.Immunol.,173:5914-5917)。近来,据报道,gremlin-1以不依赖BMP的方式结合血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)并且调节血管发生(Mitola S等,(2010)Blood,116:3677-3680)。Gremlin-1在不同人类肿瘤(包括子宫颈、子宫内膜、肺、卵巢、肾、乳腺、结肠和胰腺的癌症)中过表达(Namkoong H等,(2006)BMC Cancer,6:74;Sha G等,(2009)Fertil Steril.,91:350-358),但其在癌发生中的作用还没有被详细研究。

[0004] 本发明的发明人研究了gremlin-1的肿瘤相关特性,并且作为结果,发现gremlin-1以不依赖BMP或VEGFR2的方式直接与癌细胞相互作用,并且基于此发现,具有能够抑制gremlin-1的中和抗体。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明提供gremlin-1抗体,其通过以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)的方式抑制gremlin-1而具有治疗癌症或免疫疾病的作用。

[0007] 本发明还提供一种用于预防或治疗癌症或免疫疾病的药物组合物,所述药物组合物包含所述gremlin-1抗体和药用添加剂。

[0008] 本发明还提供一种用于预防或治疗癌症或免疫疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用所述gremlin-1抗体或包含的所述gremlin-1抗体药物组合物。

[0009] 本发明还提供一种用于诊断癌症或免疫疾病的试剂盒,所述试剂盒包括所述gremlin-1抗体。

[0010] 根据本发明的gremlin-1抗体可以以不依赖骨形态发生蛋白 (BMP) 或血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR2) 的方式抑制gremlin-1与癌细胞结合,并因此可以有效地用于预防或治疗由gremlin-1介导的多种癌症或免疫疾病。

[0011] 附图简述

[0012] 图1是显示通过以下方式获得的结果的图示,即用二抗、单独的gremlin-1以及gremlin-1与根据本发明的抗体或对照抗体的组合中的每一种处理四种癌细胞 (A549、HeLa、A172和A431),然后通过流式细胞术分析所述细胞。

[0013] 图2A是显示通过以下方式获得的结果的图示,即用gremlin-1处理HUVEC细胞,然后通过流式细胞术分析所述细胞。

[0014] 图2B显示通过以下方式获得的结果,即用gremlin-1处理HUVEC、A549和HeLa细胞,然后通过RT-PCR测量所述细胞中的VEGFR2mRNA和蛋白质的表达。

[0015] 图2C显示通过以下方式获得的结果,即用gremlin-1处理HUVEC、A549和HeLa细胞,然后通过免疫印迹分析测量所述细胞中的VEGFR2mRNA和蛋白质的表达。

[0016] 图3A显示通过以下方式获得的结果,即允许BMP2、BMP4和BMP7与单独的gremlin-1、单独的根据本发明的抗体及其组合中的每一种相互作用,然后通过酶免疫测定测量gremlin-1与所述BMP的相互作用。

[0017] 图3B是显示通过以下方式获得的结果的图示,即用gremlin-1处理A549细胞,向其中添加10倍摩尔过量的BMP-2、BMP-4和BMP-7,然后通过流式细胞术分析所述细胞。

[0018] 图4A是在用gremlin-1处理后用结晶紫染色的A549细胞的图像。

[0019] 图4B显示通过以下方式获得的结果,即用gremlin-1处理A549细胞,然后通过免疫印迹分析测量所述细胞中的E-钙黏着蛋白的表达。

[0020] 图4C显示通过以下方式获得的结果,即用gremlin-1处理A549细胞,然后通过免疫荧光染色测量所述细胞中的E-钙黏着蛋白的表达。

[0021] 图4D是显示通过以下方式获得的结果的图示,即用单独的gremlin-1和gremlin-1与根据本发明的抗体或对照抗体的组合中的每一种处理A549细胞,然后测量所述细胞的迁移。

[0022] 图5A显示通过RT-PCR和蛋白质印迹分析测量gremlin-1-A549细胞系和mock-A549细胞系中的gremlin-1 mRNA和蛋白质的表达的结果。

[0023] 图5B显示通过免疫印迹分析测量gremlin-1-A549细胞系、mock-A549细胞系和用根据本发明的抗体或对照抗体处理的gremlin-1-A549细胞系中的E-钙黏着蛋白的表达水平的结果。

[0024] 图5C是显示mock-A549细胞系和gremlin-1-A549细胞中的侵袭的细胞 (invaded cells) 的数目的图示。

[0025] 图5D是显示在gremlin-1-A549细胞系、mock-A549细胞系和用根据本发明的抗体或对照抗体处理的gremlin-1-A549细胞系中的细胞的迁移的图示。

[0026] 图5E是显示测量gremlin-1-A549细胞系、mock-A549细胞系和用根据本发明的抗体处理的gremlin-1-A549细胞系中的每一种的细胞生长的结果的图示。

[0027] 图5F是显示测量在用gremlin-1-A549细胞系和mock-A549细胞系中的每一种注射裸小鼠后形成的肿瘤的体积的结果的图示。

[0028] 图6A至6I显示通过以下方式获得的结果,即用根据本发明的抗体(0-13)处理正常组织和癌组织(皮肤、乳腺、淋巴结、肺、肝、食道、胃、结肠、直肠、肾、膀胱、前列腺、睾丸、子宫颈、子宫内膜和甲状腺的癌组织),并且通过免疫组织化学染色测量所述组织中的gremlin-1的表达水平。

[0029] 发明详述

[0030] 下文中,将详细描述本发明。

[0031] 本发明提供gremlin-1抗体。此抗体的特征在于通过以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)的方式抑制gremlin-1而具有治疗癌症的作用。所述抗体可以是免疫抗体、嵌合抗体、人抗体或人源化抗体,但不局限于此。

[0032] 该gremlin-1抗体可以使用例如噬菌体展示技术来选择。即,其可以通过如下方式进行选择:将表达所需抗体的基因融合至表达丝状噬菌体外壳蛋白的基因,产生具有暴露于噬菌体粒的表面的融合的抗体的抗体-噬菌体-型病毒粒子,然后使用生物淘选技术(biopanning technique)从噬菌体文库中选择所需的抗体。使用如上所述的噬菌体-展示技术,可以获得大量的具有优异作用的抗体,并且在它们之中,选择7种具有显著优异作用的抗体。

[0033] 所述抗体可以是包含轻链恒定区、重链恒定区、轻链可变区和重链可变区的抗体,其中轻链可变区和重链可变区分别选自具有以下氨基酸序列的那些之中:

[0034] (1) 包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区的抗体;

[0035] (2) 包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区的抗体;

[0036] (3) 包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区的抗体;

[0037] (4) 包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区的抗体;

[0038] (5) 包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区的抗体;

[0039] (6) 包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区的抗体;和

[0040] (7) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区的抗体。

[0041] 在本发明中,如上所述的抗体(1)至(7)分别称为R-80、R-88、0-1、0-13、0-26、J-1和0-13(人源化的)。

[0042] 所述抗体的轻链可变区和重链可变区可以是人或兔源的。所述抗体的轻链可变区和重链可变区可以单独或以其组合使用,可以联合本领域已知的轻链恒定区和重链恒定区

使用,或者也可以使用其片段。所述轻链可变区和所述重链可变区可以根据已知方法以单链可变片段(scFv)的形式生产。

[0043] 在具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-22对应于构架区1(FR1),氨基酸23-33对应于互补决定区1(CDR1),氨基酸34-48对应于构架区2(FR2),氨基酸49-55对应于互补决定区2(CDR2),氨基酸56-87对应于构架区3(FR3),氨基酸88-100对应于互补决定区3(CDR3),并且氨基酸101-110对应于构架区4(FR4)。

[0044] 在具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1-24对应于FR1,氨基酸25-34对应于CDR1,氨基酸35-48对应于FR2,氨基酸49-64对应于CDR2,氨基酸65-95对应于FR3,氨基酸96-105对应于CDR3,并且氨基酸106-116对应于FR4。

[0045] 在具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-22对应于FR1,氨基酸23-33对应于CDR1,氨基酸34-48对应于FR2,氨基酸49-55对应于CDR2,氨基酸56-87对应于FR3,氨基酸88-100对应于CDR3,并且氨基酸101-110对应于FR4。

[0046] 在具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1-24对应于FR1,氨基酸25-34对应于CDR1,氨基酸35-48对应于FR2,氨基酸49-64对应于CDR2,氨基酸65-95对应于FR3,氨基酸96-109对应于CDR3,并且氨基酸110-120对应于FR4。

[0047] 在具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-22对应于FR1,氨基酸23-35对应于CDR1,氨基酸36-50对应于FR2,氨基酸51-57对应于CDR2,氨基酸58-89对应于FR3,氨基酸90-100对应于CDR3,并且氨基酸101-110对应于FR4。

[0048] 在具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1-25对应于FR1,氨基酸26-35对应于CDR1,氨基酸36-49对应于FR2,氨基酸50-66对应于CDR2,氨基酸67-98对应于FR3,氨基酸99-110对应于CDR3,并且氨基酸111-122对应于FR4。

[0049] 在具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-22对应于FR1,氨基酸23-35对应于CDR1,氨基酸36-50对应于FR2,氨基酸51-57对应于CDR2,氨基酸58-89对应于FR3,氨基酸90-100对应于CDR3,并且氨基酸101-110对应于FR4。

[0050] 在具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1至25对应于FR1,氨基酸26-35对应于CDR1,氨基酸36-49对应于FR2,氨基酸50-66对应于CDR2,氨基酸67-98对应于FR3,氨基酸99-110对应于CDR3,并且氨基酸111-121对应于FR4。

[0051] 在具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-22对应于FR1,氨基酸23-35对应于CDR1,氨基酸36-50对应于FR2,氨基酸51-57对应于CDR2,氨基酸58-89对应于FR3,氨基酸90-100对应于CDR3,并且氨基酸101-110对应于FR4。

[0052] 在具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1-25对应于FR1,氨基酸26-35对应于CDR1,氨基酸36-49对应于FR2,氨基酸50-66对应于CDR2,氨基酸67-98对应于FR3,氨基酸99-110对应于CDR3,并且氨基酸111-121对应于FR4。

[0053] 在具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-23对应于FR1,氨基酸24-34对应于CDR1,氨基酸35-49对应于FR2,氨基酸50-56对应于CDR2,氨基酸57-88对应于FR3,氨基酸89-97对应于CDR3,并且氨基酸98-107对应于FR4。

[0054] 在具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1-30对应于FR1,氨基酸31-35对应于CDR1,氨基酸36-49对应于FR2,氨基酸50-66对应于CDR2,氨基酸67-98对应于FR3,氨基酸99-110对应于CDR3,并且氨基酸111-121对应于FR4。

[0055] 在具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变区中,氨基酸1-23对应于FR1,氨基酸24-36对应于CDR1,氨基酸37-51对应于FR2,氨基酸52-58对应于CDR2,氨基酸59-90对应于FR3,氨基酸91-101对应于CDR3,并且氨基酸102-111对应于FR4。

[0056] 在具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区中,氨基酸1-25对应于FR1,氨基酸26-35对应于CDR1,氨基酸36-49对应于FR2,氨基酸50-66对应于CDR2,氨基酸67-98对应于FR3,氨基酸99-110对应于CDR3,并且氨基酸111-121对应于FR4。

[0057] SEQ ID NO:1的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:15的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:2的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:16的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:3的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:17的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:4的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:18的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:5的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:19的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:6的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:20的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:7的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:21的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:8的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:22的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:9的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:23的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:10的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:24的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:11的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:25的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:12的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:26的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:13的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:27的核苷酸序列编码;并且SEQ ID NO:14的氨基酸序列可以由SEQ ID NO:28的核苷酸序列编码。

[0058] 已知gremlin-1在癌组织中表达,但是其具体作用还没有被鉴别。已知gremlin-1作为骨形态发生蛋白(BMP)的拮抗剂,并且据报道,gremlin-1结合血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)以调节血管形成。因此,预期gremlin-1以依赖BMP或VEGFR2的方式与癌细胞相互作用。然而,令人惊讶地,本发明的发明人已发现,gremlin-1以不依赖BMP或VEGFR2的方式直接结合至癌细胞而诱导细胞迁移、侵袭和增殖。另外,gremlin-1通过抑制E-钙黏着蛋白的表达而诱导癌细胞的生长。

[0059] 细胞迁移、侵袭和增殖由如上所述的gremlin-1抗体抑制。因此,所述gremlin抗体可以通过以不依赖BMP或VEGFR2的方式抑制gremlin-1,即抑制gremlin-1与癌细胞的直接结合而表现出治疗癌症的作用。

[0060] 本发明提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含gremlin-1抗体和药用添加剂。所述添加剂可以包括载体、赋形剂或其他添加剂。本发明的组合物可以根据常规方法作为药物制剂制备。在制剂的制备中,抗体优选与载体混合或用其稀释或者包封在容器型载体中。如果载体用作稀释剂,则它可以是充当用于抗体的载体、赋形剂或介质的固体、半固体或液体材料。因此,制剂可以为以下形式:片剂、丸剂、粉剂、囊剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液、糖浆、气溶胶、软或硬明胶胶囊、无菌注射液、无菌粉末等。合适的载体、赋形剂和稀释剂的实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酸甲酯(methylhydroxybenzoate)、羟苯甲酸丙酯(propylhydroxybenzoate)、滑石、硬脂酸镁和矿物油。本发明的药物组合物可以额外地包括填料、抗凝集剂、润滑剂、湿润剂、调味剂、乳化剂、防腐剂等。本发明的组合物可以使用本领域已知的方法配制以使其在施用至哺乳动物后提供抗体的快速、持续或延迟释放。除了上述抗体之外,本发明的抗体组合物可以包含抗病毒剂如干扰素、HBV单克隆抗体、HBV多克隆抗体、核苷类似物、DNA聚合酶抑制剂、siRNA药物或治疗疫苗。

[0061] 根据本发明的抗体或包含其的药物组合物可以施用至有需要的受试者,例如哺乳动物,包括人,以治疗癌症。抗体的剂量根据要治疗的受试者、疾病或病症的严重度、施用速率和医师判断决定。作为活性成分的抗体可以约0.001至10mg/kg(体重)、优选0.005至1mg/kg的量在每天的单个剂量或多个剂量中肠胃外施用。在一些情况下,抗体可以小于上述范围的下限的量施用并且可以大于所述上限的量施用,只要其不会引起严重副作用。如果抗体以大于所述上限的量施用,则其可以一天施用多次。

[0062] 因此,本发明提供一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本发明的抗体或上述药物组合物。本文中,根据本发明的抗体的特征在于通过以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)的方式抑制gremlin-1而具有治疗癌症的作用。

[0063] 上述癌症的实例包括但不限于,前列腺癌(prostate cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)、肺癌(lung cancer)、非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer)、胃癌(stomach cancer)、肝癌(liver cancer)、肾癌(kidney cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)、结直肠癌(colorectal cancer)、直肠癌(rectal cancer)、乳腺癌(breast cancer)、甲状腺癌(thyroid cancer)、皮肤癌(skin cancer)、骨癌(bone cancer)、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)、膀胱癌(bladder cancer)、子宫癌(uterine cancer)、食道癌(esophagus cancer)和头颈癌(head and neck cancer)。

[0064] 同时,本发明的抗体可以用于预防或治疗免疫疾病。大量文献证实,gremlin-1与免疫疾病密切相关(Mezzano S,等(2007)Expression of gremlin,a bone morphogenetic protein antagonist,in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis.Nephrology,dialysis,transplantation:official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association(骨形态发生蛋白拮抗剂gremlin在寡免疫肾小球肾炎的肾小球新月体中的表达.肾脏病学、透析、移植:欧洲透析与移植协会-欧洲肾协会的官方出版物)22(7):1882-1890)。

[0065] 因此,根据本发明的gremlin-1抗体可以用于预防或治疗免疫疾病。

[0066] 免疫疾病的实例包括但不限于,类风湿关节炎(rheumatoid arthritis)、进行性系统性硬化(progressive systemic sclerosis)(硬皮病(scleroderma))、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、特应性皮炎(atopic dermatitis)、斑秃(alopecia areata)、银屑病(psoriasis)、天疱疮(pemphigus)、哮喘(asthma)、口疮性口炎(aphthous stomatitis)、慢性甲状腺炎(chronic thyroiditis)、获得性再生障碍性贫血(acquired aplastic anemia)、原发性肝硬化(primary cirrhosis)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、贝赫切特病(Behcet's disease)、克罗恩病(Crohn's disease)、硅沉着病(silicosis)、石棉沉着病(asbestosis)、IgA肾病(IgA nephropathy)、链球菌感染后肾小球肾炎(post-streptococcal glomerulonephritis)(PSGN)、舍格伦综合征(Sjogren's syndrome)、吉兰-巴雷综合征(Guillian-Barre syndrome)、皮肌炎(dermatomyositis)、多肌炎(polymyositis)、多发性硬化(multiple sclerosis)、自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia)、自身免疫性脑脊髓炎(autoimmune

encephalomyelitis)、重症肌无力(myasthenia gravis)、格雷夫斯病(Grave's disease)、结节性多动脉炎(polyarteritis nodosa)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、纤维肌痛综合征(fibromyalgia syndrome)和颞动脉炎(temporal arteritis)。

[0067] 同时,本发明提供一种用于诊断癌症或免疫疾病的试剂盒,其包括本发明的抗体。除了本发明的抗体之外,所述试剂盒可以包括用于免疫组织化学染色的常规试剂。可以额外包括在试剂盒中的组分包括但不限于,FITC试剂、抗原提取液、对照抗体、HRP-缀合聚合物、DAB溶液(四氯化3-3'-二氨基联苯胺(3-3'-diaminobezidine tetrachloride))、Mayer苏木精溶液(Mayer's hematoxylin solution)等。当使用所述试剂盒时,正常组织和用于诊断的组织用标记的根据本发明的抗体处理,染色,并用显微镜观察,并且与根据本发明的抗体相互作用的组织可以被诊断为受癌症或免疫疾病侵扰的组织。

[0068] 下文中,将参考实施例详细地描述本发明。然而,应当理解,这些实施例用于举例说明目的而不意图限制本发明的范围。

[0069] 实施例1:Gremlin-1的表达和纯化

[0070] 1-1:细胞培养

[0071] A549、HeLa、A172和A431细胞获自韩国细胞系库(Korean Cell Line Bank)(韩国首尔),并且人脐静脉内皮细胞(HUVEC)获自Invitrogen(Carlsbad,CA)。同时,A549、A172和A431细胞在补充有10%FBS的RPMI-1640培养基(Welgene)中培养,并且HeLa细胞在补充有10%FBS的MEM培养基(Welgene)中培养,而HUVEC在内皮细胞生长培养基-2(EGM-2,Lonza,Walkersville,MD)中培养。

[0072] 1-2:Gremlin-1表达载体的制备和细胞转染

[0073] Gremlin cDNA扩增自人宫颈组织cDNA文库,如在Namkoong H等,(2006) BMC Cancer 6:74中所述。接着,通过PCR使用以下PCR引物,将HindIII和XhoI限制酶位点引入到gremlin cDNA的5'和3'端:

[0074] 5'-CCC AAG CTT ATG AGC CGC ACA GCC TAC AC-3' (SEQ ID NO:29);

[0075] 5'-CCG CTC GAG ATC CAA ATC GAT GGA TAT GC-3' (SEQ ID NO:30)。

[0076] PCR产物用HindIII和XhoI消化,然后连接到pcDNA3.1/myc-His载体(Invitrogen)中,由此制备gremlin-1表达载体。

[0077] 在转染前1天,将A549细胞(5.0×10^5 个细胞)铺板以获得70%的汇合度。然后,根据制造商说明使用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen),将所制备的gremlin-1表达载体转染到A549细胞中。使用1.0mg/ml的抗生素G418(Invitrogen)选择转染的细胞。所选的细胞系称为“gremlin-1-A549细胞系”。

[0078] 同时,以与上述相同的方式将A549细胞用不含有gremlin-1的pcDNA3.1/myc-His载体转染,从而获得mock-A549细胞系。

[0079] 1-3:Gremlin-1的表达和纯化

[0080] 使用重叠PCR构建编码人gremlin-1和人IgG1-Fc融合蛋白的基因,如在Park S等,(2010) Clin Chim Acta 411:1238-1242中所述。在所述PCR中使用的用于gremlin-1和IgG-Fc的接头引物序列为如下:

[0081] (1) Gremlin-1

[0082] F:5'-GGC CCC ACC GGC CCC ATC CAA ATC GAT-3' (SEQ ID NO:31);

[0083] R:5'-GGG GCC GGT GGG GCC TCG GGT GGC GGT GGC-3' (SEQ ID NO:32);

[0084] (2) IgG-Fc

[0085] F:5'-AAG CTT GTG GCC CAG GCG GCC ATG AGC CGC ACA GCC TAC-3' (SEQ ID NO:33);

[0086] R:5'-GGA TCC TCA TTT TGG CGG GGA CAG GGA GAG-3' (SEQ ID NO:34)。

[0087] PCR产物用HindIII和BamHI消化,并克隆到pCEP4表达载体(Invitrogen)中,从而构建表达gremlin-1-Fc融合蛋白的载体。

[0088] 同时,HEK293F细胞(Invitrogen)在GIBCO FreeStyle™ 293表达培养基(Invitrogen)中以 0.1×10^6 至 2.0×10^6 个细胞/ml的细胞密度进行培养,然后在轨道摇床(3737°C,8%CO₂,Minitron,INFORSHT,Switzerland)上以135rpm在具有通风帽的一次性Erlenmeyer组织培养瓶(Corning Inc.)中生长。在转染前一天,细胞培养物用新鲜培养基稀释以实现 1.0×10^6 个细胞/ml的密度,这导致在转染当天的 2.0×10^6 个细胞/ml的密度。接着,使用Lipofectamine 2000(Invitrogen),将HEK293F细胞用gremlin-1/人IgG-Fc融合蛋白表达载体转染。转染的细胞再次在轨道摇床中培养,并且在转染后3天收获培养物上清。然后,gremlin-1-Fc融合蛋白使用蛋白质A亲和性凝胶色谱法纯化,如在Park S等,(2010) Clin Chim Acta 411:1238-1242中所述。

[0089] 实施例2:Gremlin-1抗体的产生

[0090] 2-1:免疫化

[0091] 5μg的gremlin-1-Fc与2mL的磷酸缓冲盐水(PBS)混合并在37°C温育30分钟,并且将混合物在含有在2%鲨烯中的解毒的内毒素MPL(单磷酸化脂质A物种)和分枝杆菌(mycobacterial)细胞壁组分(TDW和CWS)的水包油乳液助剂(Sigma,St.Louis,Mo)中进行乳化,然后注入到新西兰白兔(New Zealand white rabbit)中。免疫化以3周的间隔进行三次。免疫化的兔的抗体效价通过酶联免疫吸附测定(ELISA)确定,使用辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的小鼠抗兔IgG多克隆抗体(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL)作为二抗。

[0092] 使用TRI试剂(Invitrogen)自免疫化的兔的脾和骨髓获得总RNA。提取的脾和骨髓使用匀浆器以50%输出在TRI试剂中均化1分钟并在室温温育5分钟。均化的样品以2,500g在4°C离心10分钟。将上清转移到50mL离心管中,并向各个上清中加入3mL的1-溴-3-氯-丙烷(BCP,Sigma)。然后,将各个混合物涡旋振荡15秒并在室温温育15分钟。将混合物以17,000g在4°C离心15分钟,并将无色上部水层转移到新的50mL管中。然后,向该水层加入15mL的异丙醇并在室温温育10分钟。在以17,500g在4°C离心15分钟之后,小心地除去上清,并将沉淀(pellet)在不重悬的情况下用30mL的75%乙醇洗涤。沉淀再次离心10分钟,并除去上清,之后将沉淀在室温空气干燥。接下来,将沉淀溶解在无RNA酶的水中并储存在-80°C。测量在260nm的光密度(OD)以确定RNA浓度(40ng/μLRNA产生OD₂₆₀=1),并且通过OD₂₆₀/OD₂₈₀比值(通常为1.6至1.9)计算纯度。

[0093] 2-2:从总RNA合成第一链cDNA

[0094] 第一链cDNA在寡(dT)(oligo(dT))引发下使用用于第一链cDNA合成试剂盒的Superscript™ III系统(Invitrogen)进行合成。5μg分离的总RNA与1μL的0.5μg/μL寡(dT)、1μL的10mM dNTP和焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)(DEPC)-处理的水混合以产生10μL的终体积。该混合物在65°C温育5分钟并在冰上冷却。向该RNA样品加入2μL的10x反应

缓冲液、4 μ L的25mM MgCl₂、2 μ L的100mM二硫苏糖醇 (DTT)、1 μ L的RNA酶OUT (核糖核酸酶抑制剂 (Ribonuclease Inhibitor)) 和1 μ L的Superscript III反转录酶,并将该混合物在50℃温育50分钟。在85℃温育5分钟后,将反应混合物在冰上冷却以停止反应。然后,向其加入1 μ L的RNA酶H,接着在37℃温育20分钟。将第一链cDNA储存在-20℃。

[0095] 2-3: 初次PCR

[0096] 使获自兔的脾和骨髓的第一链cDNA经历PCR达30个循环,使用Expand High Fidelity PCR系统 (Roche Molecular Systems, IN, USA)。在所述PCR中,还使用用于兔V_L (9 $\times$ V_k和1 $\times$ V_h) 编码序列扩增的10个引物的组合和用于兔V_H编码序列的扩增的4个引物的组合 (表1)。在每个反应中,将1 μ L的cDNA与60pmol的每种引物、10 μ L的10 $\times$ 反应缓冲液、8 μ L的2.5mM dNTP (Promega, Madison, WI)、0.5 μ L的Taq DNA聚合酶和水混合以产生100 μ L的最终体积。PCR在以下条件下进行:30循环,各自由以下构成,即94℃持续15秒,56℃持续30秒并且72℃持续90秒,接着在72℃最后延伸10分钟。在1.5%琼脂糖凝胶上加载长度为约350bp的片段并电泳,然后使用QIAEX 11凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 进行纯化。纯化的PCR产物在OD_{260nm}定量 (1OD单位=50 μ g/mL)。

[0097] 2-4: 二次PCR

[0098] 在二次PCR中,初次V_L产物通过重叠延伸PCR与初次V_H产物随机连接 (表2)。对于长接头单链片段,进行至少10个反应。在每个反应中,100ng的纯化的轻链产物或重链产物与60pmol的各种引物、10 μ L的10 $\times$ 反应缓冲液、8 μ L的2.5mM dNTP (Promega)、0.5 μ L的Taq DNA聚合酶和水混合以产生100 μ L的最终体积。PCR在以下条件下进行:20循环,各自由以下构成,即94℃持续15秒,56℃持续30秒并且72℃持续2分钟,接着在72℃最后延伸10分钟。在1.5%琼脂糖凝胶上加载约700bp片段并电泳,然后使用QIAEX 11凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 纯化。纯化的PCR产物在OD_{260nm}定量 (1OD单位=50 μ g/mL)。

[0099] 2-5: 用限制酶处理纯化的重叠延伸产物和载体DNA

[0100] PCR产物和pComb3x载体 (The Scripps Research Institute) 用SfiI限制酶处理用于克隆。10 μ g纯化的重叠PCR产物与360单位的SfiI (16单位/ μ gDNA, Roche Molecular Systems)、20 μ L的10 $\times$ 反应缓冲液M和水混合以产生200 μ L的最终体积。20 μ g的pComb3x载体与120单位的SfiI (6单位/ μ gDNA, Roche Molecular Systems)、20 μ L的10 $\times$ 反应缓冲液M和水混合以制备200 μ L的最终体积。混合物在50℃温育5小时。将长度为约700bp的消化的插入物在1%琼脂糖凝胶上纯化,并且将包含在pComb3x载体中的约3,400bp载体DNA和约1,600bp片段在0.6%琼脂糖凝胶上纯化。

[0101] 2-6: 处理的重叠PCR产物与处理的载体DNA的连接

[0102] 为了评价载体和插入物对于高效率连接和转化的适合性,进行小规模连接。含有单独的SfiI-处理的载体DNA的连接反应用于背景连接评价,其中文库大小小于5%。对于连接,将140ng的SfiI-处理且纯化的载体DNA、70ng的SfiI-处理且纯化的PCR产物或填充DNA、4 μ L的5 $\times$ 连接酶缓冲液、1 μ L的T4连接酶 (Invitrogen) 和水混合以制备20 μ L的总体积。用于连接的混合物在室温温育4小时。通过电穿孔2.5kV, 25 μ F和200 Ω , 使用0.2cm小杯 (cuvette) 和基因脉冲器 (gene pulser) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 将1 μ L的连接的产物转化到50 μ L的ER2738电穿孔胜任细胞 (electrocompetent cell) (NEB) 中。将所述细胞重悬在3mL的SB培养基中并在以225-250rpm搅拌下在37℃温育1小时。将1 μ L、10 μ L和

100 μ L的转化体接种在LB+羧苄青霉素(carbenicillin)平板中以确定转化体的总数量。理想地,最终文库的大小应为至少 10^8 菌落形成单位(cfu)/ μ g的载体DNA并且应小于5%背景连接。

[0103] 2-7:电穿孔胜任大肠杆菌(electrocompetent E.coli)的构建

[0104] 将大肠杆菌ER2738株在含有15mL的SB的50mL聚丙烯管中培养并在以250rpm的搅拌下在37℃生长过夜。在第二天,将2.5mL的培养物稀释到含有500mL的SB、10mL的20%(w/v)葡萄糖和5mL的1MMgCl₂的2L烧瓶中,并以250rpm在37℃搅拌直至在600nm的OD达到0.8-0.9。然后,将培养物置于预先冷却的500mL离心瓶中并以3,000g在4℃离心20钟。除去上清,并将沉淀重悬在30mL的预先冷却的10%(v/v)甘油中。对重悬的沉淀进行离心,用甘油洗涤三次,重悬在5mL的10%甘油中,并储存在-80℃。

[0105] 2-8:辅助噬菌体(helper phage)的制备

[0106] 将10 μ L在实施例2-7中制备的ER2738悬浮液接种到10mL的SB培养基中并以250rpm在37℃搅拌1小时。将获自新制备的平板的单个辅助噬菌体斑使用吸液管头转移到培养物中。将10mL感染的培养物转移到容纳有500mL预热(37℃)的含有卡那霉素的SB培养基的2LErlenmeyer烧瓶中,并调整至70 μ g/mL的终浓度,然后以250rpm在37℃搅拌过夜。在第二天,该培养物以2,500g离心15分钟,并且上清在水浴中在70℃温育20分钟。在以2,500g离心15分钟之后,将上清转移到新的50mL聚丙烯管中并储存在4℃。

[0107] 2-9:文库连接和转化

[0108] 文库连接使用1.4 μ g的SfiI-消化的pComb3x、700ng在实施例2-5中获得的SfiI-消化的PCR产物、40 μ L的5x连接酶缓冲液、10 μ L的T4DNA连接酶和水(形成200 μ L的最终体积)进行。用于连接的混合物在室温温育过夜,然后允许用乙醇在-80℃沉淀过夜。在4℃以最大速度在微型离心机中离心15分钟之后,除去上清,并且沉淀用1mL的70%(v/v)乙醇洗涤并干燥。沉淀溶解在15 μ L的水中。连接的文库样品转化到300 μ L的电穿孔胜任大肠杆菌细胞中,该大肠杆菌细胞然后在5mL的SB培养基中在37℃培养1小时。将100mL的预热的SB培养基和3 μ L的100mg/mL羧苄青霉素加入到培养物中。将0.1 μ L、1 μ L和10 μ L的培养物接种到含有50 μ g/mL羧苄青霉素的LB培养基中以确定文库大小。培养物以250rpm搅拌1小时。将4.5 μ L的100mg/mL羧苄青霉素加入到培养物中,接着培养1小时。向该培养物中,加入2mL的VCSM13辅助噬菌体、183mL的预热的SB和92.5 μ L的100mg/mL羧苄青霉素,并将混合物以300rpm且在37℃搅拌2小时。将280 μ L的50mg/mL卡那霉素加入到培养物中,然后以300rpm且在37℃搅拌过夜。在第二天,培养物以3,000g在4℃离心15分钟。将上清转移到500mL离心瓶中,然后向其中加入8g的聚乙二醇(PEG)-8000和6g的NaCl。在冰上储存30分钟后,上清以15,000g且在4℃离心15分钟。除去上清,并且将噬菌体沉淀重悬在含有1%BSA的Tris-缓冲盐水(TBS)中。

[0109] 2-10:在固定化的抗原上的文库淘选

[0110] 使用顺磁性小珠(Dynal Biotech, Lake Success, NY)进行生物淘选。3 μ g的gremlin-1在室温与 1×10^7 个小珠结合达20小时。所述小珠用PBS洗涤四次并在室温用封闭缓冲液温育1小时。将结合gremlin-1的小珠在室温用在实施例2-9中获得的scFv-展示噬菌体温育2小时。洗涤步骤从第一轮中的三次增加至第四轮中的10次。结合的噬菌体用50 μ L的0.1M甘氨酸/HCl(pH 2.2)洗脱并用3 μ L的2M Tris-HCl(pH 9.1)中和。ER2738用此含有噬菌体的上清感染,并且噬菌粒用辅助噬菌体VCSM13拯救用于过夜扩增。在第二天,如在实施例

2-9中所述,加入PEG-8000和NaCl以制备噬菌体。另外,将用噬菌体感染的培养物接种到含有50 μ g/mL羧苄青霉素的LB平板中以确定输入和输出噬菌体效价。

[0111] 2-11:通过噬菌体ELISA选择克隆

[0112] 为了确认来自所选的个体克隆的scFv结合用于额外分析,使用scFv-展示噬菌体,对纯化的重组gremlin-1进行ELISA。用gremlin-1包被的微滴定板用在PBS中的3%BSA在37 $^{\circ}$ C封闭1小时。然后,噬菌体上清与在PBS中的6%BSA以相同方式混合,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在用0.05%PBST洗涤后,所述平板用HRP-缀合的抗M13抗体(1:5000稀释,Pierce Chemical Co.)温育。对于颜色反应,使用2,2'-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸,ABTS)基质溶液(Amresco,Solon,OH)。

[0113] 将scFv片段转换为全长IgG并过表达。本发明的抗体(0-13)的特异性使用蛋白质印迹分析确定。为了确定本发明的抗体(0-13)的特异性,通过SDS-PAGE分离用pcDNA3.1/myc-His-gremlin-1转染的HEK293F细胞的培养物上清。印迹与100ng/mL的根据本发明的抗体(0-13)在4 $^{\circ}$ C温育过夜,然后与HRP-缀合的抗人IgG(Fc特异的,1:1000稀释;Pierce Chemical Co.)在室温温育1小时。根据制造商说明,使用增强的化学发光系统(Pierce)可视化印迹。根据制造商说明,使用考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)G-250(Sigma)可视化凝胶。

[0114] 通过上述过程获得的7个抗体分别称为R-80、R-88、0-1、0-13、0-26、J-1和0-13(人源化的)抗体,并且分析其氨基酸序列和核苷酸序列。

[0115] 序列分析的结果表明,R-80抗体包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区;R-88抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区;0-1抗体包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区;0-13抗体包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区;0-26抗体包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区;J-1抗体包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区;并且0-13(人源化的)抗体包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区。

[0116] 初步实验的结果表明,在以上抗体之中,0-13抗体具有最佳效果。因此,在后续实验中使用0-13抗体。

[0117] 实施例3:Gremlin-1与癌细胞的相互作用的分析

[0118] 为了检查gremlin-1是否与癌细胞直接相互作用,将gremlin-1与四种癌细胞(A549、HeLa、A172和A431)温育,然后通过流式细胞术分析。

[0119] 具体地,使粘附细胞胰蛋白酶化并用在磷酸缓冲盐水(PBS)中的1%(w/v)BSA洗涤。悬浮细胞通过以500 $\times$ g离心2分钟收集并用在PBS中的1%(w/v)BSA洗涤。所有细胞用在PBS中的1%(w/v)BSA中的100nM终浓度的His-标记的gremlin-1(R&D Systems, Minneapolis, MN)温育。细胞然后用PBS中的1%(w/v)BSA洗涤两次并用终浓度为5mg/ml的FITC-缀合的His抗体(Abcam, Cambridge, UK)在黑暗中以37 $^{\circ}$ C温育30分钟。然后,细胞用在PBS中的1%(w/v)BSA洗涤两次并在FACSCanto 11流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose,

CA) 分析之前重悬在500 μ L的PBS中。

[0120] 同时,为了确定gremlin-1抗体(0-13)的中和效力,将细胞用在PBS中的1% (w/v) BSA中的100nM的His-标记的gremlin-1和10 μ M根据本发明的抗体(0-13)在37 $^{\circ}$ C温育1小时,并用FITC-缀合的His抗体(Abcam)探测。

[0121] A549细胞同时用1 μ M的BMP-2、BMP-4或BMP-7(R&D Systems, Minneapolis, MN) 和100nM的gremlin-1-Fc处理并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。细胞用FITC-缀合的IgG-Fc特异性抗体(5 μ g/ml, Invitrogen) 探测。然后细胞在FACSCanto 11流式细胞仪上分析。

[0122] 实验的结果示于图1。如可在图1中看到的,gremlin-1直接与癌细胞相互作用,并且这种相互作用被gremlin-1抗体抑制。

[0123] 实施例4: VEGFR2对gremlin-1与癌细胞的相互作用的影响

[0124] 为了考察gremlin-1与细胞系的相互作用是否由已知作为gremlin-1的唯一的细胞表面受体的VEGFR2介导,进行以下实验。

[0125] 4-1: 流式细胞术

[0126] 以与实施例3中所述相同的方式通过流式细胞术分析gremlin-1是否结合HUVEC。分析的结果显示在图2A中。如从其中可以看到的,gremlin-1不结合HUVEC。因为HUVEC表达VEGFR2,所以gremlin-1不结合HUVEC的事实表明gremlin-1以不依赖VEGFR2的方式结合癌细胞。

[0127] 4-2: RT-PCR

[0128] A549细胞、HeLa细胞和HUVEC细胞中的VEGFR2 mRNA和蛋白质的表达通过RT-PCR和免疫印迹分析测量。

[0129] 具体地,对于RT-PCR,根据制造商说明,使用TRizol试剂(Invitrogen),自A549细胞、HeLa细胞和HUVEC细胞分离总RNA。然后,使用Superscript[®] 111第一链合成系统(Invitrogen),自所述RNA合成cDNA。使用以下引物,在2720热循环仪(Applied Biosystems, Foster City, CA) 中进行RT-PCR。RT-PCR进行35个循环,每个循环由以下组成: 94 $^{\circ}$ C持续30秒,56 $^{\circ}$ C持续30秒并且72 $^{\circ}$ C持续1分钟。

[0130] (1) VEGFR-2

[0131] F: 5'-TGATCGGAAATGACACTGGA-3' (SEQ ID NO: 35);

[0132] R: 5'-TGCTTCACAGAAGACCATGC-3' (SEQ ID NO: 36)

[0133] (2) Gremlin-1

[0134] F: 5'-AACAGTCGCACCATCATCAA-3' (SEQ ID NO: 37);

[0135] R: 5'-AATTTCTTGGGCTTGCAGAA-3' (SEQ ID NO: 38);

[0136] (3) GAPDH

[0137] F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' (SEQ ID NO: 39);

[0138] R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3' (SEQ ID NO: 40)。

[0139] RT-PCR的结果示于图2B。如在图2B中可看到的,VEGFR2存在于HUVEC细胞中,但VEGFR2在A549和HeLa细胞中没有被检测到。尽管在实施例3中gremlin-1与癌细胞相互作用,但是没有检测到VEGFR2 mRNA的事实表明,gremlin-1和癌细胞之间的相互作用不通过VEGFR2介导。

[0140] 4-3: 免疫印迹分析

[0141] HUVEC、A549细胞和HeLa溶解在含有蛋白酶抑制剂混合物的冰冷裂解缓冲液[50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X 100, 0.1% SDS, 1mM PMSF]中, 然后根据在Lee MS等, (2008) Hybridoma (Larchmt) 27:18-24中描述的程序进行蛋白质印迹。本文中, VEGFR-2 (1:1,000稀释; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) 和 β -肌动蛋白 (1:10,000稀释; Applied Biological Materials, Richmond, BC) 用作一抗, 并且辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的抗小鼠IgG (1:1,000稀释; Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 或 HRP-缀合的抗兔IgG (1:1,000稀释; Pierce Chemical Co.) 用作二抗。根据制造商说明, 使用增强的化学发光系统 (Pierce) 可视化印迹。

[0142] 免疫印迹分析的结果示于图2C。如在图2C中可看到的, 与HUVEC不同, A549和HeLa细胞不表达VEGFR2。这样的结果还显示, gremlin-1和癌细胞之间的相互作用不通过VEGFR2介导。

[0143] 实施例5: BMP对gremlin-1与癌细胞的相互作用的影响

[0144] Gremlin-1是一种BMP拮抗剂, 其特异性地结合至BMP-2、BMP-4和BMP-7从而抑制它们的活性。BMP是在许多组织的形成和体内平衡中起重要作用的多功能生长因子。而且, BMP-2、BMP-4和BMP-7频繁地在多种癌症中过表达, 所述癌症包括乳腺癌和前列腺癌 (Singh A等, (2010) Cytokine Growth Factor Rev 21:299-313; Chen D等, (2004) Growth Factors 22:233-241; Bobinac D等, (2005) Croat Med J 46:389-396)。据报道, BMP-4减少BCC细胞的增殖并且添加gremlin-1直接减少BMP-4的抗增殖作用 (Sneddon JB等, (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103:14842-14847)。因此, 考察BMP是否影响gremlin-1与癌细胞的相互作用。

[0145] 5-1: 酶免疫测定

[0146] 为了考察gremlin-1是否结合BMP, 以以下方式进行酶免疫测定。具体地, 微滴定板 (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) 用100nM的BMP-2、BMP-4或BMP-7 (R&D Systems) 包被并且用在PBS中的1% (w/v) 脱脂乳封闭。然后, 向各个孔加入单独的gremlin-1-Fc (10nM) 或gremlin-1-Fc (10nM) + 500nM根据本发明的抗体 (0-13)。在洗涤之后, 所述板用HRP-缀合的IgG-Fc特异性抗体 (1:5,000稀释; Pierce Chemical Co.) 温育。接着, 2,2'-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 基质溶液 (Amresco, Solon, OH) 用于着色反应, 如在Chung J等, (2004) FASEB J 18:361-363中所述, 并且测量在405nm的吸光度。测量的结果示于图3A。如在图3A中可看到的, gremlin-1与BMP-2和BMP-4 (不包括BMP-7) 相互作用, 并且根据本发明的抗体 (0-13) 不影响gremlin-1与BMP-2或BMP-4的相互作用。

[0147] 5-2: 流式细胞术

[0148] A549细胞用gremlin-1处理, 并且向其加入10倍摩尔过量的BMP-2、BMP-4和BMP-7, 接着是以与实施例3中所述相同的方式进行流式细胞术。结果示于图3B。如在图3B中可看到的, BMP的存在不影响gremlin-1与A549细胞的相互作用。这些结果表明, 在gremlin-1中存在两个单独的基序介导其与A549细胞和BMP的相互作用。

[0149] 实施例6: Gremlin-1及其抗体对癌细胞的扩散和迁移的作用的分析

[0150] 6-1: 细胞扩散测定

[0151] 为了考察用gremlin-1处理的癌细胞的形态, 通过结晶紫染色测定分析A549细胞。具体地, 将A549细胞接种在24-孔板中 (1.0×10^4 个细胞/孔) 并用100nM的His-标记的

gremlin-1处理3天。除去培养基,并且细胞用PBS洗涤并且用在PBS中的4%多聚甲醛固定10分钟。细胞用在蒸馏水中的0.05%结晶紫染色30分钟。除去染色溶液并且将细胞用PBS洗涤3次,根据在Li XL等, (2009) Cancer Chemother Pharmacol 64:1097-1104中描述的方法。使用Leica DFL290相机 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 获得图像并且使用Leica应用套装软件 (Leica Microsystems) 进行分析。

[0152] 获得的图像示于图4A。如在图4A中可看到的,用gremlin-1处理的A549细胞的形态类似于成纤维细胞的形态,细胞变得扩散。

[0153] 6-2:E-钙黏着蛋白的表达变化的分析

[0154] E-钙黏着蛋白的下调与上皮间质转化 (EMT) 相关,并且E-钙黏着蛋白和EMT的抑制在癌发展中观察到 (Perl AK等, (1998) Nature 392:190-193)。因此,由用gremlin-1处理引起的E-钙黏着蛋白的表达的变化通过免疫印迹分析和免疫荧光染色进行考察。

[0155] 对于免疫印迹分析,将A549细胞 (1.0×10^5 细胞/孔) 接种到60-mm培养皿上并生长至50%汇合度。细胞用100nM的His-标记的gremlin-1处理3天。将细胞溶解在含有蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的冷的裂解缓冲液 [50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X 100, 0.1% SDS, 1mM PMSF] 中,然后根据在Lee MS等, (2008) Hybridoma (Larchmt) 27:18-24中描述的方法通过蛋白质印迹进行分析。本文中,E-钙黏着蛋白 (1:1,000稀释; Abcam) 和 β -肌动蛋白 (1:10,000稀释; Applied Biological Materials, Richmond, BC) 抗体用作一抗,并且辣根氧化物酶 (HRP)-缀合的抗小鼠IgG (1:1,000稀释; Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 或HRP-缀合的抗兔IgG (1:1,000稀释; Pierce Chemical Co.) 用作二抗。根据制造商说明,使用增强的化学发光系统 (Pierce) 可视化印迹。

[0156] 结果示于图4B。如在图4B中可看到的,E-钙黏着蛋白在用gremlin-1处理的A549细胞中的表达显著降低。

[0157] 对于免疫荧光染色,将A549细胞 (1.0×10^5 细胞/孔) 接种到用聚-L-赖氨酸 (100 μ g/ml, Sigma) 涂覆的玻璃盖玻片上并生长至50%汇合度。细胞用100nM的His-标记的gremlin-1处理3天,在PBS中漂洗,并在室温在PBS中的4%多聚甲醛中固定30分钟。固定的细胞在室温用在PBS中的0.2% Triton X-100 (PBST) 渗透化10分钟,然后在室温用在PBST中的1%明胶封闭30分钟。使用E-钙黏着蛋白抗体 (Abcam) 接着是Alexa 488-缀合的二抗 (Invitrogen) 进行免疫荧光染色。细胞核用DAPI (1:1,000稀释; Invitrogen) 染色,并且肌动蛋白丝使用罗丹明-鬼笔环肽 (rhodamine-phalloidin) (1:1,000稀释; Invitrogen) 染色。使用具有防褪色剂的含水封固剂 (Biomeda Corp., Foster City, CA) 将盖玻片安装在玻璃载玻片上。然后,使用LSM 5PASCAL激光扫描显微镜 (Carl Zeiss, Germany) 获得图像并使用LSM 5PASCAL软件进行分析。

[0158] 结果示于图4C。如在图4C中可看到的,E-钙黏着蛋白在用gremlin-1处理的A549细胞中的表达显著降低。

[0159] 6-3:细胞迁移测定

[0160] 为了考察细胞是否迁移,以以下方式进行细胞迁移测定。具体地,将细胞以 1.0×10^5 细胞/孔的密度接种到24-孔板中。通过用吸液管头刮擦产生刮伤。在用培养基漂洗以除去脱落的细胞后,向培养物中加入100nM的His-标记的gremlin-1持续24小时。使用Leica

DFL290相机 (Leica Microsystems) 立即以及在24小时后再次从每个孔拍摄图像拍摄图像。细胞迁移通过由刮擦形成的区域的距离通过在24小时时测量伤口宽度并从开始时的伤口宽度将其减去而确定。然后将获得的值表示为%迁移,其中将未处理的细胞的迁移距离设置为100%。

[0161] 为了确定根据本发明的抗体 (0-13) 的中和效力,将刮擦过的细胞用单独的His-标记的gremlin-1或His-标记的gremlin-1加上10 μ M根据本发明的抗体 (0-13) (或10 μ M对照抗体) 温育24小时。如上所述确定距离。

[0162] 使用相同的方案,接种并且刮擦mock-转染的A549细胞和gremlin-1-转染的A549细胞。Mock-A549细胞在没有任何处理下进行培养而gremlin-1-A549细胞在10 μ M根据本发明的抗体 (0-13) 或对照抗体存在下培养24小时。如上所述确定距离。结果为三个独立实验的代表。

[0163] 测量的结果示于图4D。如在图4D中可看到的,用gremlin-1处理显著增加A549细胞的迁移,并且这种作用在添加中和抗体后被完全消除。

[0164] 这些结果表明,gremlin-1诱导癌细胞的扩散和迁移,并且这种扩散和嫌疑可以使用gremlin-1抗体抑制。

[0165] 实施例7:用gremlin-1转染的A6549细胞的表征

[0166] 7-1:Gremlin-1 mRNA和蛋白质的表达水平的测量

[0167] 对于在实施例1-2中构建的gremlin-1 A549细胞系和mock-A549细胞系,通过如上所述的RT-PCR和蛋白质印迹分析gremlin-1 mRNA和蛋白质的表达水平的变化。

[0168] 分析的结果示于图5A。如在图5A中可看到的,gremlin-1 mRNA和蛋白质在mock-A549细胞系中不表达,而其表达水平在gremlin-1-A549细胞系中显著增加。

[0169] 7-2:E-钙黏着蛋白的表达水平的测量

[0170] 另外,根据如下的免疫印迹分析方法测量E-钙黏着蛋白的表达水平。具体地,将gremlin-1-A549细胞和mock-A549细胞 (1.0×10^5 细胞/孔) 接种到60-mm培养皿上并生长至50%汇合度。Mock-A549细胞在没有任何处理下培养,并且gremlin-1-A549细胞在10 μ M根据本发明的抗体 (0-13) 或对照抗体 (Palivizumab, Synagis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 存在下培养24小时。将细胞溶解并根据在实施例6中描述的免疫印迹分析方法进行分析。

[0171] 分析的结果示于图5B。如在图5B中可看到的,相比于mock-A549细胞,E-钙黏着蛋白的表达在gremlin1-A549细胞中下降,并且在添加中和抗体后稍有增加。

[0172] 7-3:细胞侵袭测定

[0173] 根据制造商说明,使用ECM-涂覆的内室 (Chemicon, Temecula, CA) 进行细胞侵袭测定。将Mock-A549细胞和gremlin-1-A549细胞 (3.0×10^5 细胞/孔) 悬浮在300 μ L的无血清培养基中。将含有10%FBS的完全培养基 (500 μ L) 添加到板的底部孔中。细胞温育48小时。擦掉非迁移细胞并用PBS洗涤。膜用在PBS中的4%多聚甲醛固定并用结晶紫染色溶液 (Chemicon) 染色。使用Leica DFL290相机 (Leica Microsystems) 获得图像并使用Leica应用套装软件进行分析。迁移的细胞在每孔四个分开的视野中计数。然后将获得的值表示为%侵袭,其中将mock-A549细胞的细胞计数设为100%。

[0174] 结果示于图5C。如在图5C中可看到的,相比于mock-A549细胞,更大量的gremlin-

1-A549细胞迁移。

[0175] 7-4:细胞迁移测定

[0176] 根据实施例6中描述的方法进行细胞迁移测定。将Mock-A549细胞和gremlin-1-A549细胞铺板并刮擦。将mock-A549细胞在没有任何处理下温育,并且gremlin-1-A549细胞在10 μ M根据本发明的抗体(0-13)或对照抗体存在下温育24小时。如上所述确定距离。

[0177] 测量的结果示于图5D。如在图5D中可看到的,相比于mock-A549细胞,gremlin-1-A549细胞显示增加的迁移,并且这种增加的迁移在添加根据本发明的抗体(0-13)后被显著抑制。

[0178] 7-5:细胞增殖测定

[0179] 为了考察gremlin-1是否影响细胞生长,在96孔板中,在含10%FBS的RPMI-1640培养基中,使用CellTiter 96Aqueous One Solution细胞增殖测定(Promega, Madison, WI)进行细胞增殖测定。具体地,将mock-A549细胞和gremlin-1-A549细胞以1,000细胞/孔的密度接种。在24小时后,细胞用无血清培养基洗涤两次并在具有或不具有3 μ M根据本发明的抗体(0-13)的100 μ L的完全培养基中培养。通过使用Labsystems Multiskan Ascent Photometric读板器(Thermo Labsystems, Franklin, MA)确定细胞增殖,对于96孔板,使用492nm滤器。一式三份地进行实验。

[0180] 测量的结果示于图5E。如在图5E中可看到的,相比于mock-A549细胞,gremlin-1-A549细胞显示更高的生长速率,并且该增加的生长速率通过添加根据本发明的抗体(0-13)被抑制。

[0181] 7-6:肿瘤生长测定

[0182] 为了评价gremlin-1对肿瘤发生的作用,将gremlin-1-A549细胞或mock-A549细胞如下所述皮下注入到裸小鼠中,然后测量肿瘤体积。

[0183] 所有动物实验由实验室动物资源首尔国立大学研究所和应用委员会(the Institute of Laboratory Animal Resources Seoul National University and Use Committee)授权(许可证编号:SNU-11-0207)。将gremlin-1-A549细胞和mock-A549细胞(1.0×10^6 细胞/小鼠)皮下注入4至6周龄雌性、无胸腺裸小鼠的右侧(每个治疗组7只小鼠)。每周通过卡尺测量肿瘤的长度和宽度评估肿瘤形成和大小。使用以下公式计算肿瘤体积(Tomayko MM等,(1989)Cancer Chemother Pharmacol 24:148-154):

[0184] 肿瘤体积=(长度 $\times$ 宽度 $\times$ 高度)/2

[0185] 测量的结果示于图5F。如在其中可看到的,与注射有mock-A549细胞的小鼠相比,注射有gremlin-1-A549细胞的小鼠中的肿瘤体积更快速地增加,在注射后14周,肿瘤体积的差异为约500mm³。这个结果表明,增加的gremlin-1的表达在肿瘤发生中可以起重要作用。

[0186] 实施例8:使用gremlin-1抗体诊断癌症

[0187] 正常组织和癌组织(皮肤、乳腺、淋巴结、肺、肝、食道、胃、结肠、直肠、肾、膀胱、前列腺、睾丸、子宫颈、子宫内膜和甲状腺的癌组织)用根据本发明的抗体(0-13)处理,并且通过免疫组织化学染色测量gremlin-1在所述组织中的表达水平。

[0188] 具体地,将0.5mL的根据本发明的抗体(0-13)(2mg/ml)与FITC试剂混合以根据制造商说明用FITC(Pierce FITC抗体标记试剂盒,53027)标记所述抗体。将用正常组织和癌

组织固定的组织阵列载玻片(Superbiochip BC8)根据制造商说明去石蜡(deparaffinize)。将载玻片置于容纳抗原提取液(TE pH 9.0)的玻璃罐中,然后在高压锅中加热30分钟。将载玻片从罐中取出,冷却至60~65℃,用蒸馏水洗涤,浸入95%冷乙醇中持续10分钟,然后用流水洗涤10分钟。接下来,根据制造商说明,使用Thermo Ultra-vision LP检测系统(Thermo),将所述载玻片用FITC标记的抗体处理。所述抗体以1:75使用,并且抗FITC小鼠IgG(LS bio)以1:200使用。之后,载玻片用HRP-缀合的聚合物(Labvision)处理15分钟,然后用DAB溶液处理1分钟。所述载玻片用Mayer苏木精溶液(Mayer's hematoxylin solution)复染色,然后用显微镜以约4x、200x和400x放大率观察。在实验中,IgGκ抗体用作对照。

[0189] 实验的结果示于图6A至6I。如在图6中可看到的,相比于正常组织中的,本发明的抗体在皮肤、乳腺、淋巴结、肺、肝、食道、胃、结肠、直肠、肾、膀胱、前列腺、睾丸、子宫颈、子宫内膜和甲状腺癌组织中显示强反应性。这表明gremlin-1在多种癌组织中分布和过表达。因此,预期使用本发明的gremlin-1抗体可以诊断癌症或免疫疾病。

序列表

<110> SNU R&DB FOUNDATION
 KIM, Hyun Kee
 <120> 针对 gremlin-1 的抗体
 <130> PCB203011SNU
 <150> US 61/611,285
 <151> 2012-03-15
 <160> 40
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> R-80 抗体的轻链可变区

[0001]

<400> 1
 Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Gln Val Asn Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Ser Leu Thr Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ser Arg Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Asp Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Asp Gly Ser Gly Ser Ser
 85 90 95
 Tyr Gln Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr
 100 105 110

<210> 2
 <211> 116
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R-80 抗体的重链可变区

<400> 2

Lys Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

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

Ile Ile Asn Pro Asn Thr Gly Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr
85 90 95

[0002]

Ala Gly Gly Asn Arg Val Phe Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R-88 抗体的轻链可变区

<400> 3

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

Thr Val Ser Leu Thr Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ser Arg Arg Tyr Ala
20 25 30

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

Arg Asp Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Asp Gly Ser Gly Ser Ser
85 90 95

Tyr Gln Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr
100 105 110

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R-88 抗体的重链可变区

<400> 4

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

[0003]

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

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

Leu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr
85 90 95

Leu Tyr Glu Ser Asp Gly Tyr Val Asn Ala Leu Asp Leu Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-1 抗体的轻链可变区

<400> 5

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

[0004]

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-1 抗体的重链可变区

<400> 6

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Tyr Asp Asn Gly Asn Thr 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 Arg Asp Gly Met Trp Asn Glu Val Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11

<400> 7

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

[0005]

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-13 抗体的重链可变区

<400> 8

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Tyr Asp Asn Gly Asn Thr 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 Asp Gly Tyr His Asn Glu Ile Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

[0006]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-26 抗体的轻链可变区

<400> 9

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Ser Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-26 抗体的重链可变区

<400> 10

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

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

[0007]

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

Ser Ala Ile Ser Tyr Asp Asn Gly Asn Thr 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 Asp Gly Leu Glu Asn Glu Thr Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> J-1 抗体的轻链可变区

<400> 11

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0008]

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> J-1 抗体的重链可变区

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg Gly Val Gly Lys Ser Arg His Gln Arg Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-13(人源化)抗体的轻链可变区

<400> 13

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

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

[0009]

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

Leu Ile Tyr Tyr Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0-13(人源化)抗体的重链可变区

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg Asp Gly Tyr His Asn Glu Ile Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0010] 115 120

<210> 15
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> R-80 抗体的轻链可变区

<400> 15
 gagctcgtgc tgactcagtc gccctcagtg caggtgaact tgggacagac ggtctccctc 60
 acatgcaactg cagatacaact gacgagaagt tatgcttcct ggtaccagea gaagccaggc 120
 caggccccctg tgctgctcat ctacagggat accagteggc cctcaggggt cctgaccgg 180
 ttctctggct ccagctcagg gaacacggcc accctgacca tcagtgggga ccaggtggg 240
 gacgaggtg actactattg tgetacaagc gatggcagtg gcagcagcta tcagtttgtg 300
 ttggcgaggag ggaccagct gaccgtcaca 330

<210> 16
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> R-80 抗体的重链可变区

<400> 16
 aagtcgggtgg aggagtcggg gggtgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc 60
 tgcacagtct ctggattctc cctcagtagg tatgcaatgg gctgggtcgg ccaggetcca 120
 gggaaggggc tgggaatacat cggaatcatt aatcctaata ctggcgcata ctacgggagc 180
 tgggcaaaag gccgattcac catctccaaa acctcgtcga ccacggtgga tcgaaaatc 240
 accagtcga caaccgaaga caggccacc tatttctgg ccagatatgc tgggtgtaat 300
 cgggttttta aattgtgggg ccaggcacc ctggtcaccg tcctctca 348

[0011]

<210> 17
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> R 88 抗体的轻链可变区

<400> 17
 gagtcgtgc tgactcagtc gccctcagtg caggatgaact tgggacagac ggtctccctc 60
 acatgcactg cagatacact gaggcagaagg tatgcttct ggtaccagca gaagccagge 120
 caggccccctg tgetgctcat ctacagggat accagtcggc cctcaggggt cctgaccgc 180
 ttctctgget ccagctcagg gaacacgggc acctgacca tcagtgggga ccagctggg 240
 gacgagctg actactattg tgetacaage gatggeagtg gcagcagcta tcagtttgtg 300
 ttcgggggag ggaccagct gaccgtcaca 330

<210> 18
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	R-88 抗体的重链可变区	
<400>	18	
cagtcgggtgg aggagtccegg gggtcgectg gtcacgcctg ggacacccct gacactcaac		60
tgcacagtct ctggattctc cctcagtagc tatgcaatga gttgggtcgc ccaggtcca		120
gggaaggggc tggatggat cggactcatt agtagtagtg gtagegcata ctacgcgagc		180
tgggcgaaag gccgattcac catctccaac cctcgtcga ccacggtgga tctcaaaatc		240
accagtcga caaccgagga caccgccacc tattctgcg ccagatacct ttacgagagt		300
gatggttatg ttaatgcct tgacttgtgg ggcccaggca ccttggtcac cgtctctca		360
		360

<210> 19
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0012]

<220>		
<223>	O-1 抗体的轻链可变区	
<400>	19	
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc		60
tcttgtactg gctcttcac taatatigge agtaattcig tcacctgga ccagcagctc		120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat gatgatagta agcggccaag cggggtcct		180
gaccgattct ctggtccaa gtciggeacc tcagctccc tggccatcag tgggtcgcg		240
tccgaggatg aggtgatta ttactgtggt gcttgggatg atagcctgag tggttatgtc		300
ttcgccggag gcaccaagct gacggtccta		330

<210> 20
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> O-1 抗体的重链可变区

<400> 20
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt caccitttagc agttatgata tgagctgggt ccgccagget 120
 ccaggaagg ggettgagtg ggtctcagcg atctcttatg ataatggtaa tacatattac 180
 getgattctg taaaaggteg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgetgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatggc 300
 atgtggaatg aggttagtgc gttcgactac tggggccagg gtacactggc caccgtgagc 360
 tca 363

<210> 21
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 0-13 抗体的轻链可变区

[0013]

<400> 21
 cagtctgtgc tgaactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgiagtgc gctcttcate taatatggc agtaatgatg tcaactggta ccagcagctc 120
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat tatgatagta agcgccaag cggggtcctt 180
 gaccgattct ctggtccaa gtcitggcacc tcagctccc tggecatcag tgggtccgg 240
 tccaggatg aggetgatta ttactgtgct acttgggatg atagcctgag tgettatgtc 300
 ttggcgggag gcaccaagct gacggtecta 330

<210> 22
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 0-13 抗体的重链可变区

<400> 22
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

	tctgtgcag cctctggatt cacctttage agttatgata tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccaggaagg ggetggagtg ggctcageg atctcttatg ataatggtaa tacatattac	180
	gtgatctcg taaaaggteg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacctgttat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatggt	300
	tatcataatg agattgctcc gtctgactac tggggccagg gtacactggt caccgtgagc	360
	tca	363
	<210> 23	
	<211> 330	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 0-26 抗体的轻链可变区	
[0014]	<400> 23	
	cagtctgtgc tgaactcagcc accctcageg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccate	60
	tcttgtactg gctcttcate taatattggc agtaatgatg tcacctggta ccagcagctc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat tctgatagtc atcggccaaag cggggctccct	180
	gaaccattct ctggtctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggecatcag tgggtctcgg	240
	tccgaggatg aggetgattia ttactgtget gcttgggatg atagcctgag tggttatgtc	300
	tteggcggag gcaccaagct gacggtecta	330
	<210> 24	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 0-26 抗体的重链可变区	
	<400> 24	
	gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacage ctgggggggc cctgagactc	60
	tctgtgcag cctctggatt cacctttage agttatgata tgagctgggt ccgccaggct	120

	ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg atctcttatg ataatggtaa tacatattac	180
	gctgattctg taaaaggteg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagectgag agccgaggac acggcctgtg attactgtgc gaaagatggg	300
	cttgagaatg agacggctgg gttcgactac tggggccagg gtacactggg caccgtgagc	360
	tca	363
	<210> 25	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> J-1 抗体的轻链可变区	
	<400> 25	
	gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgctt ccgtgggcga ccgcgtgacc	60
	atcaccctga gagcatcaca agatgtaaat acagcagtag catggtacca gcagaagccc	120
[0015]	ggcaaggecc ccaagctgct gatctactca gcatcatttt tatattcagg cgtgccctcc	180
	cgtttctcgg gctccccttc cggcacccgac ttacccctga ccatctcttc cctgcagecc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccaaaca cattatacaa caccaccaac cttcggccag	300
	ggcaccaagg tggagatcaa g	321
	<210> 26	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> J-1 抗体的重链可变区	
	<400> 26	
	gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg	60
	tcttgcgcgg cctccggttt taatattaaa gatacatata ttcattgggt gcgccaggcc	120
	cccggcaagg gcctggagtg ggtggccaga atttatccaa caaatggtta tacaagatat	180
	gcagattcag taaaaggteg cttcaccatc tccgcgcaca cctccaagaa caccgectac	240

	ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcgggtgtt	300
	ggtaaactctc gtcacacagcg ttctgaactac tggggccagg gcacctggt gacctgtctc	360
	tcc	363
<210>	27	
<211>	333	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	0-13(人源化)抗体的轻链可变区	
<400>	27	
	gacatccaga tgacctcagtc cccctcctcg ctgagcgcct ccgtggggcga ccgggtgacc	60
	atcacctgca gtggctcttc atctaattatt ggcagtaatg atgtcaactg gtatcagcag	120
	aagcctggca aggcgcctaa gctgctgate tactatgata gtaagcggcc aagcggcgtg	180
	ccttcccggt tctcggatc ccggtccgce accgaattca cctgaacct ctcctccctg	240
[0016]	caacctgagg acttcgccac ctactactgc gctacttggg atgatagcct gactgcttat	300
	gtcttcggcc agggtaacaa ggtggagatc aag	333
<210>	28	
<211>	363	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	0-13(人源化)抗体的重链可变区	
<400>	28	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgccggcgga ctggtgcagc ctggcggaag cttgcggctg	60
	tcttgcgcgc cctccggatt cacctttagc agttatgata tgagctgggt gcgcaggcc	120
	ccggcaagg gccctgagtg ggtggccgcg atctcttatg ataatggtaa tacalattac	180
	gctgattctg taaaaggteg gttcaccatc tccgccgaca cctccaagaa caccgcctac	240
	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgctc cagagatggt	300

	tatcataatg agattgtctc gtctgactac tggggccagg gcacactagt gaccgtgtcc	360
	tcc	363
<210>	29	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于 PCR 的正向引物	
<400>	29	
	cccaagetta tgagccgcac agcctacac	29
<210>	30	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于 PCR 的反向引物	
[0017]		
<400>	30	
	ccgtctgaga tccaaatcga tggatatgc	29
<210>	31	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于 PCR 的正向引物(Gremlin-1)	
<400>	31	
	ggccccaccg gcccatcca aatcgat	27
<210>	32	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于 PCR 的反向引物(Gremlin-1)	

[0018]	<400>	32	
	ggggccggtg	gggcctcggg	tggcggtggc
			30
	<210>	33	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	用于 PCR 的正向引物(IgG-Fc)	
	<400>	33	
	aagcttgttg	cccaggcggc	catgagccgc
	acagcctac		39
	<210>	34	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	用于 PCR 的反向引物(IgG-Fc)	
	<400>	34	
	ggatcctcat	tttggcgggg	acagggagag
			30
	<210>	35	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	用于 PCR 的正向引物(VEGFR-2)	
	<400>	35	
	tgatcgaaa	tgacactgga	
			20
	<210>	36	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223>	用于 PCR 的反向引物(VEGFR-2)	
	<400>	36	
		tgcttcacag aagaccatgc	20
	<210>	37	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	用于 PCR 的正向引物(GremLin-1)	
	<400>	37	
		aacagtcgca ccatcatcaa	20
	<210>	38	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0019]	<220>		
	<223>	用于 PCR 的反向引物(GremLin-1)	
	<400>	38	
		aattttcttgg gcttgcagaa	20
	<210>	39	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	用于 PCR 的正向引物(GAPDH)	
	<400>	39	
		aggtgaaggt cggagtcaac g	21
	<210>	40	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

<220>

<223> 用于 PCR 的反向引物(GAPDH)

[0020]

<400> 40

aggggtcatt gatggcaaca

20

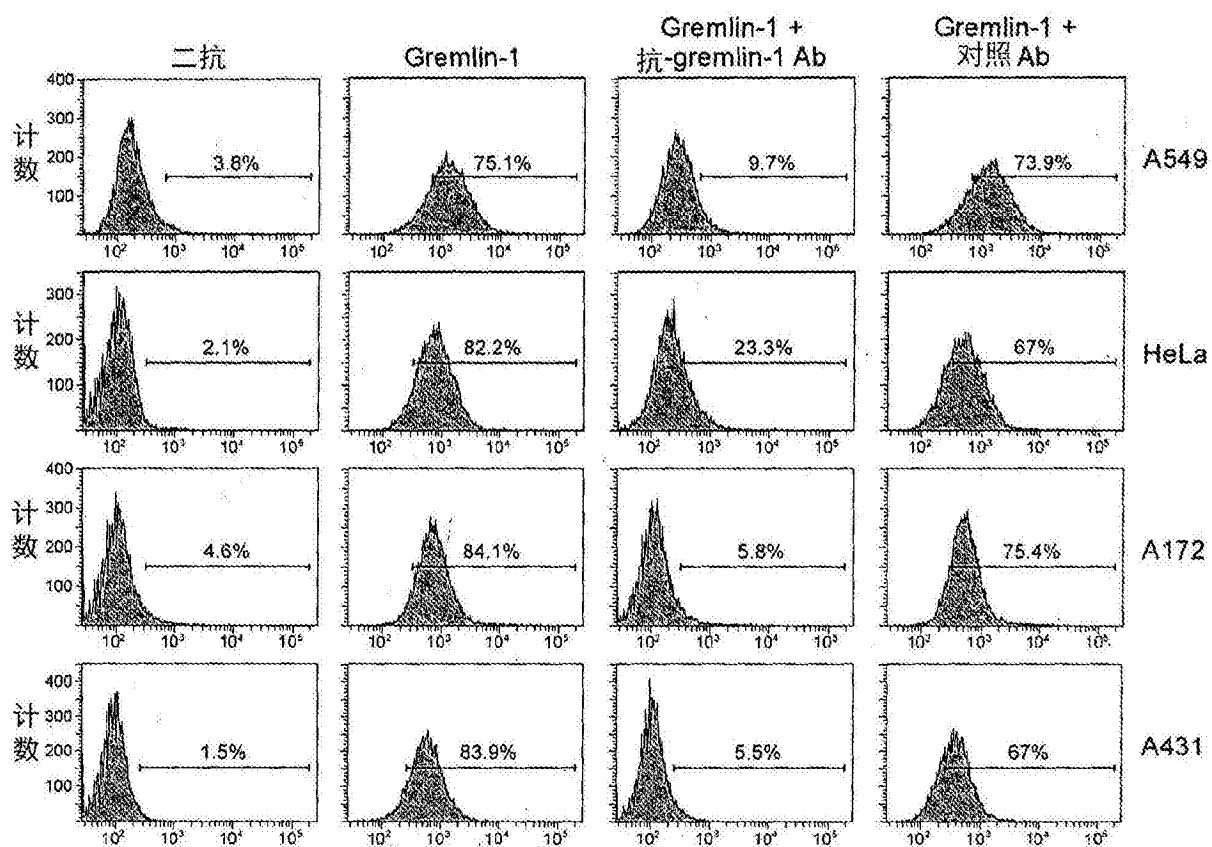


图1

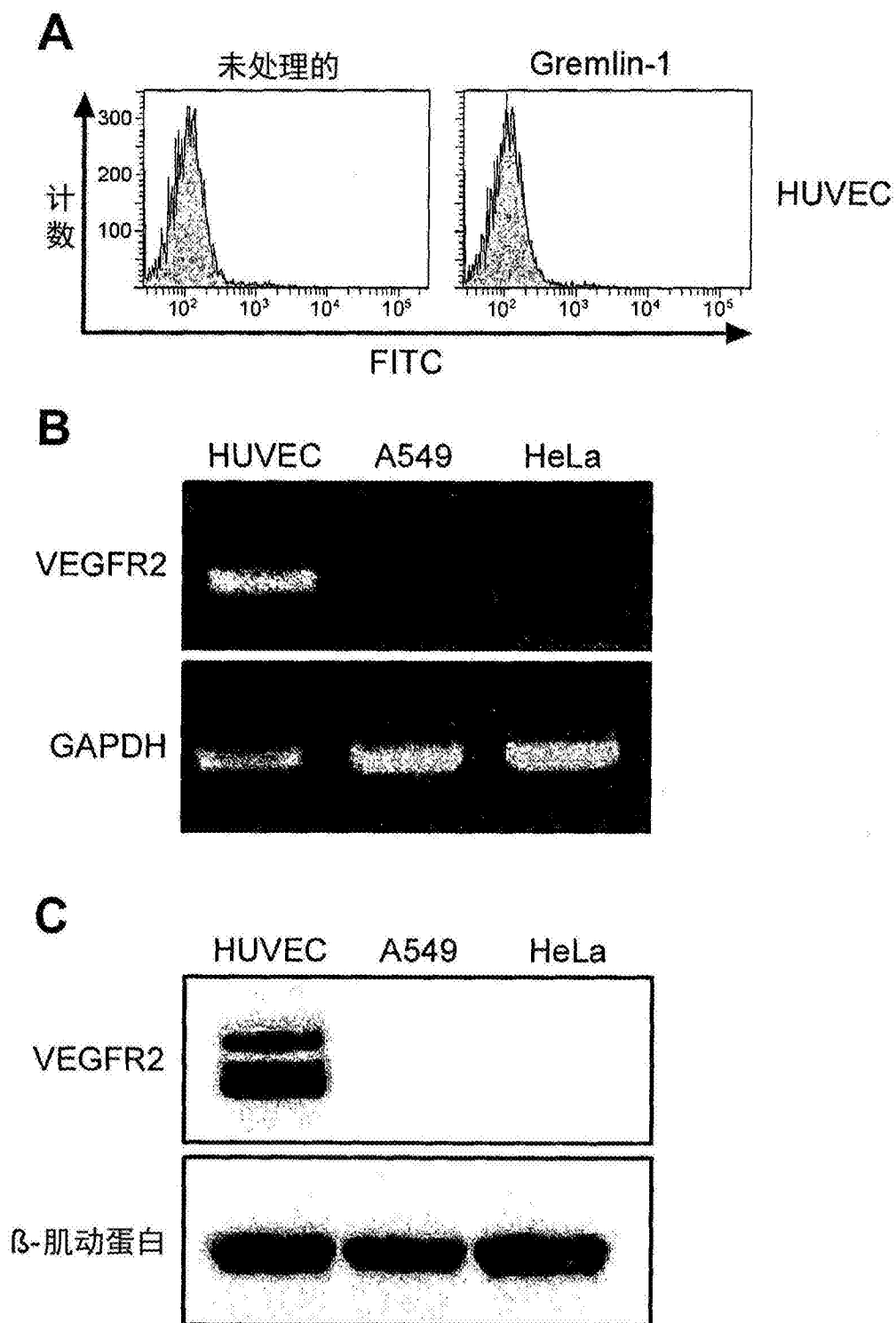


图2

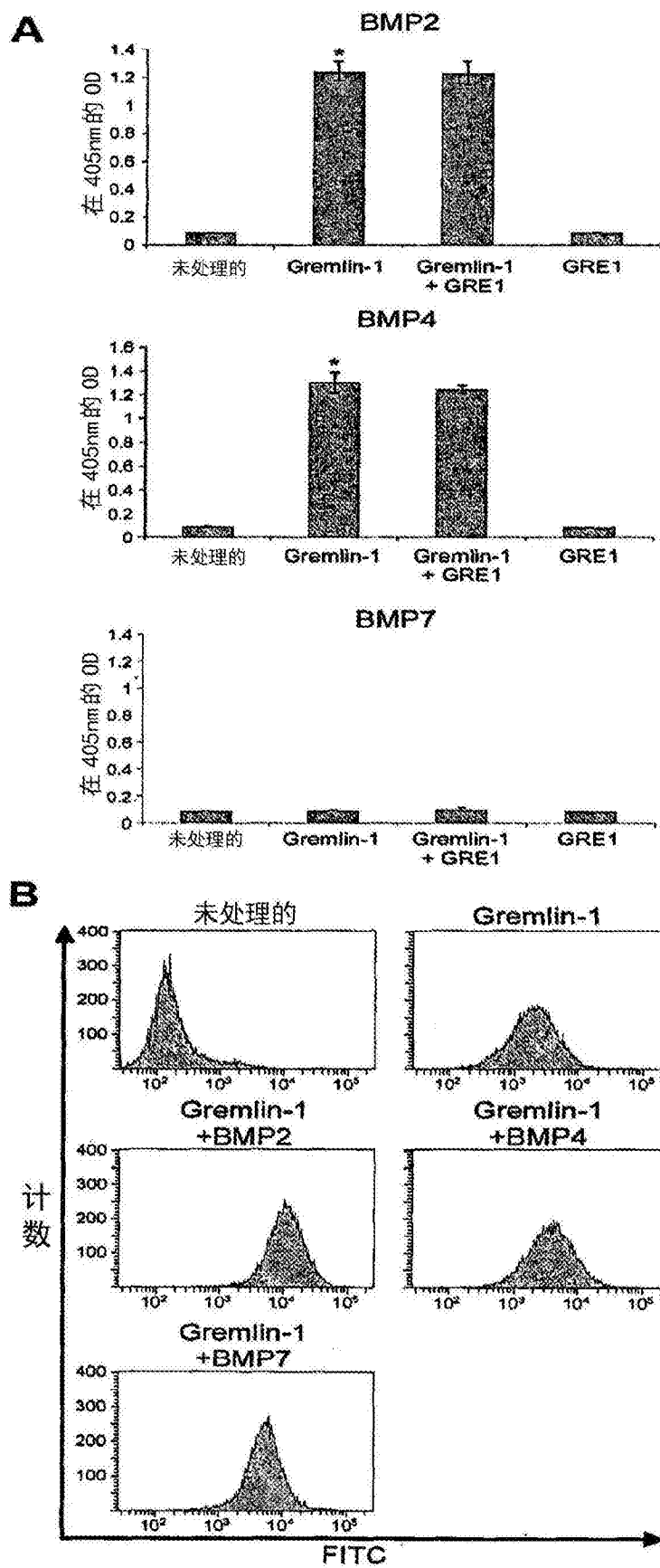


图3

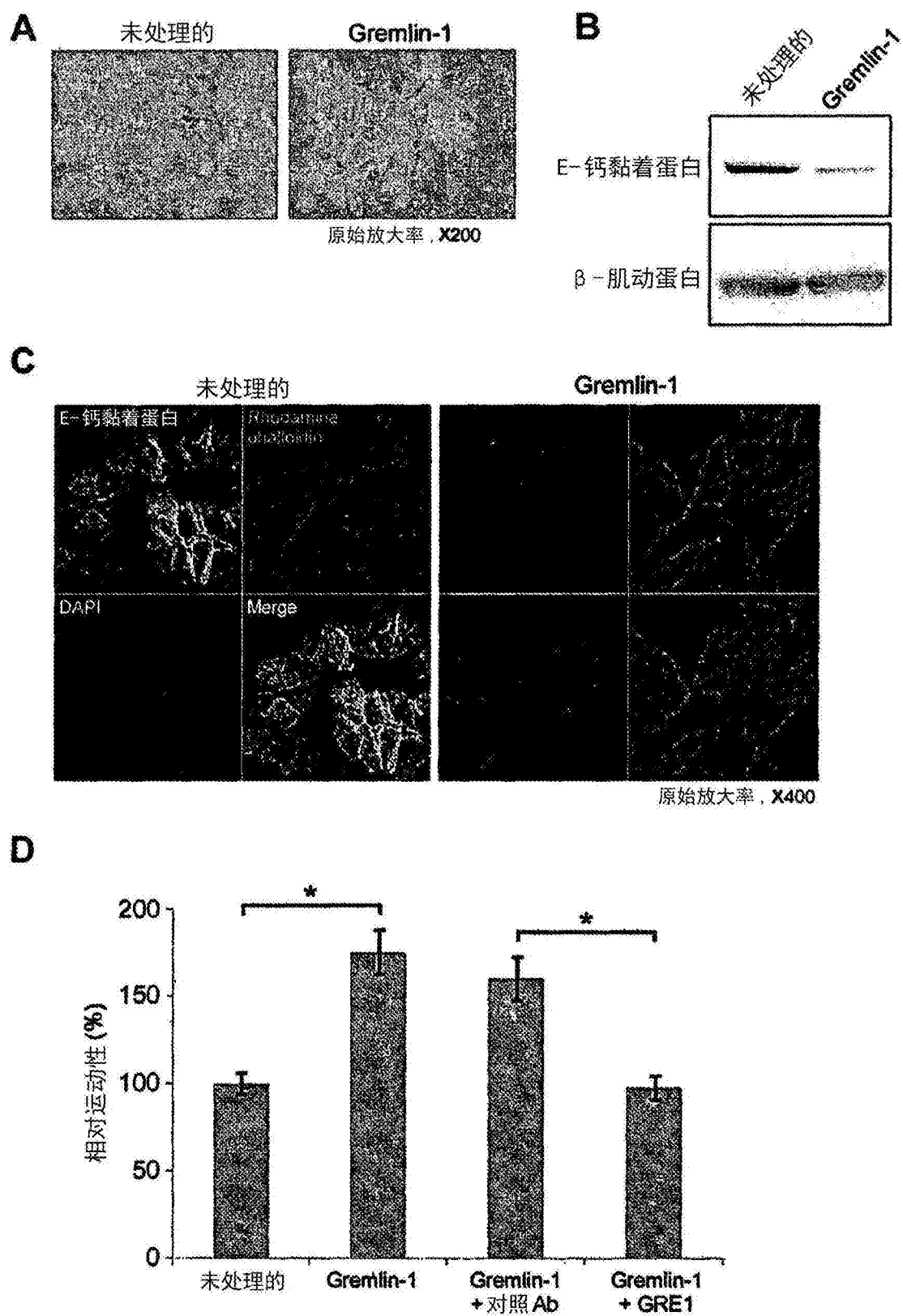


图4

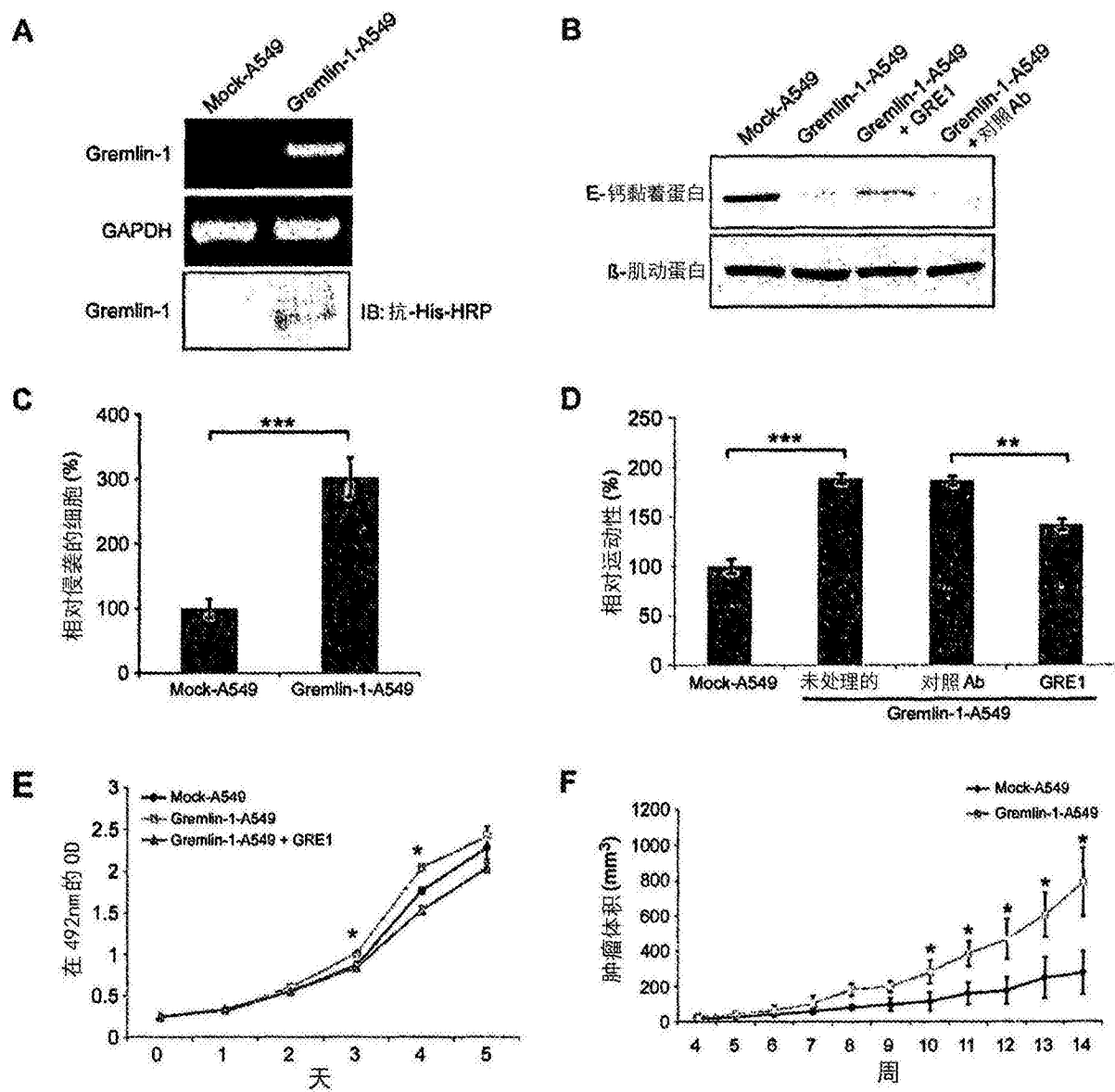


图5

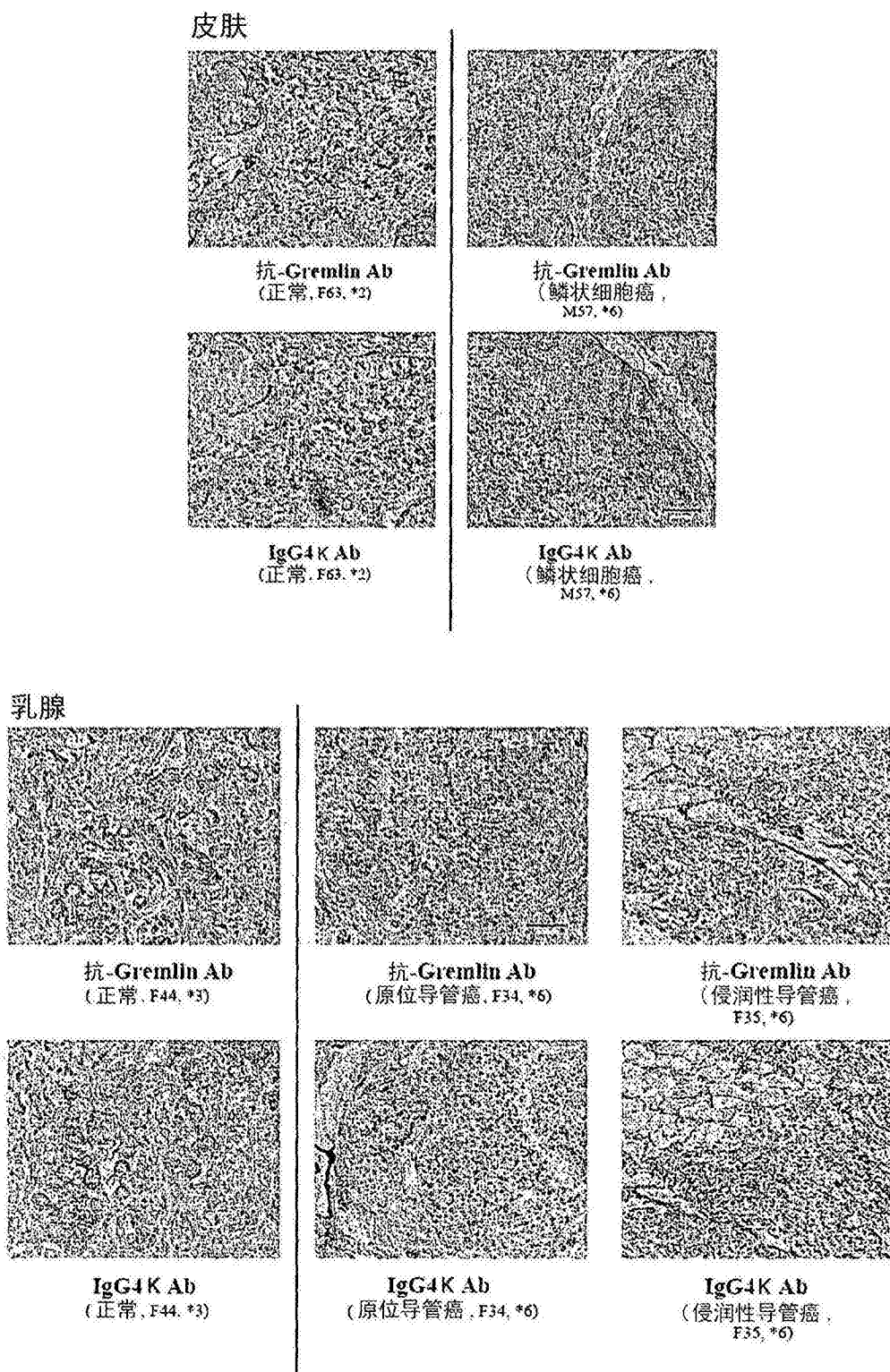


图6A

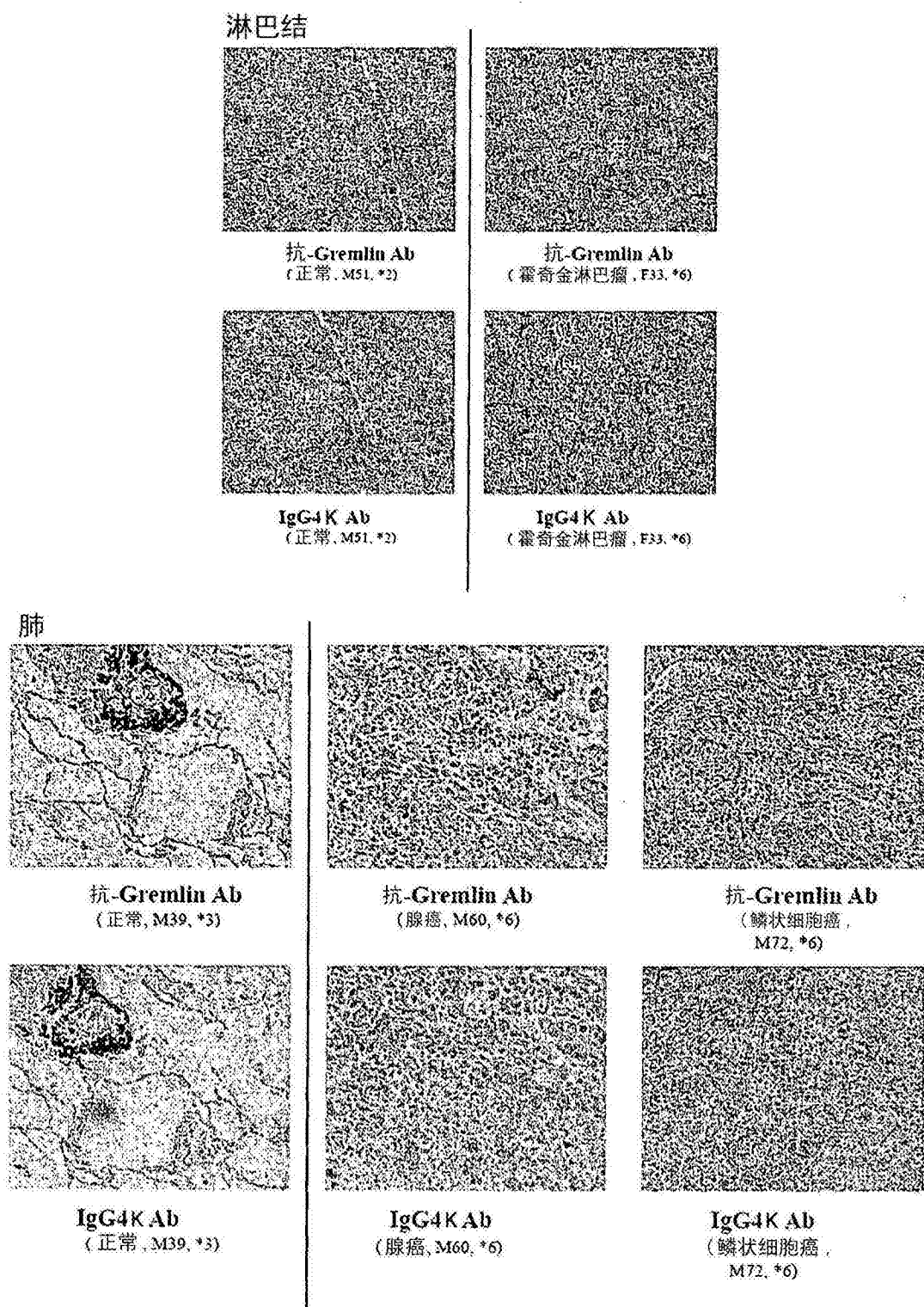


图6B

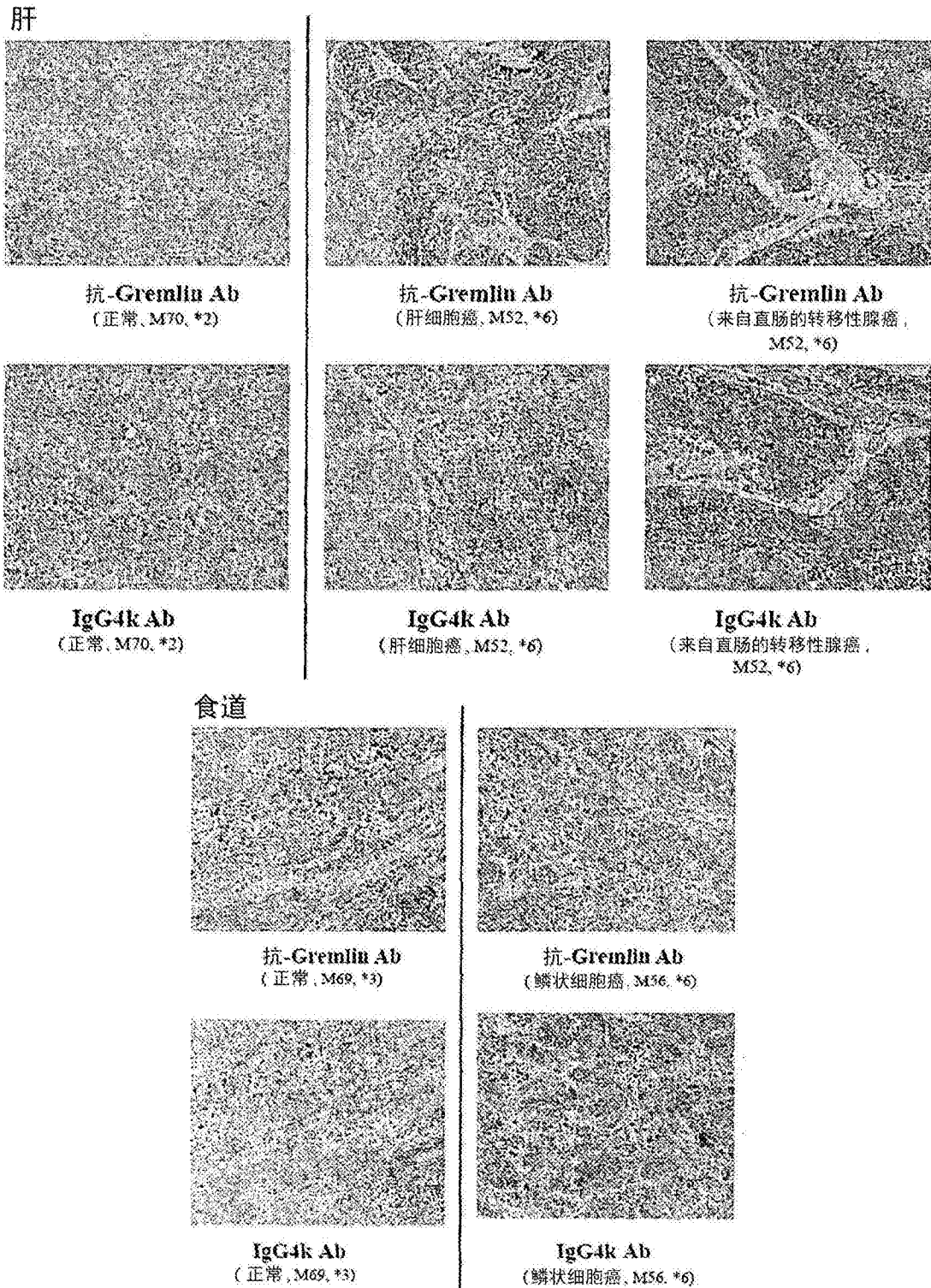


图6C

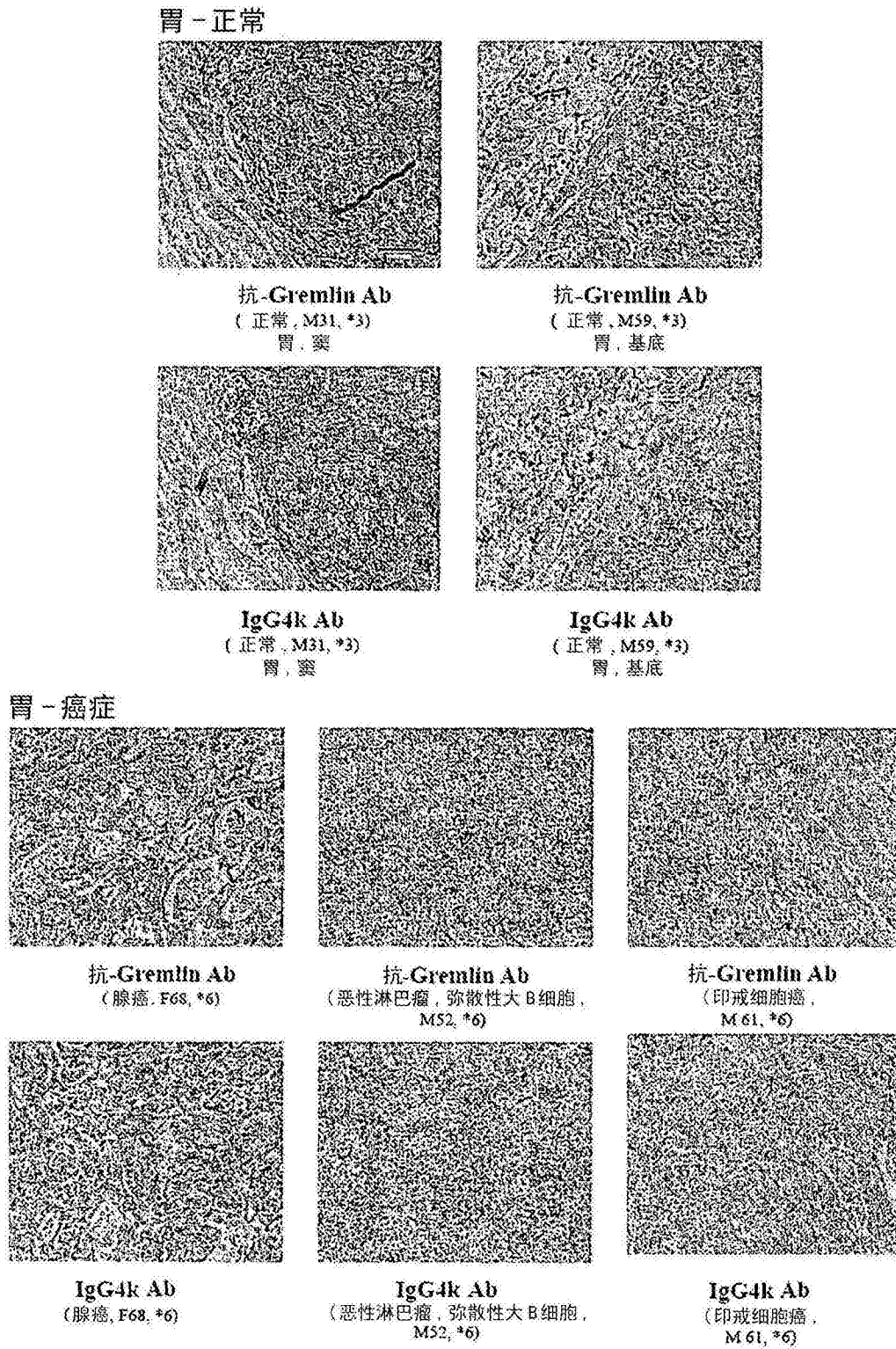


图6D

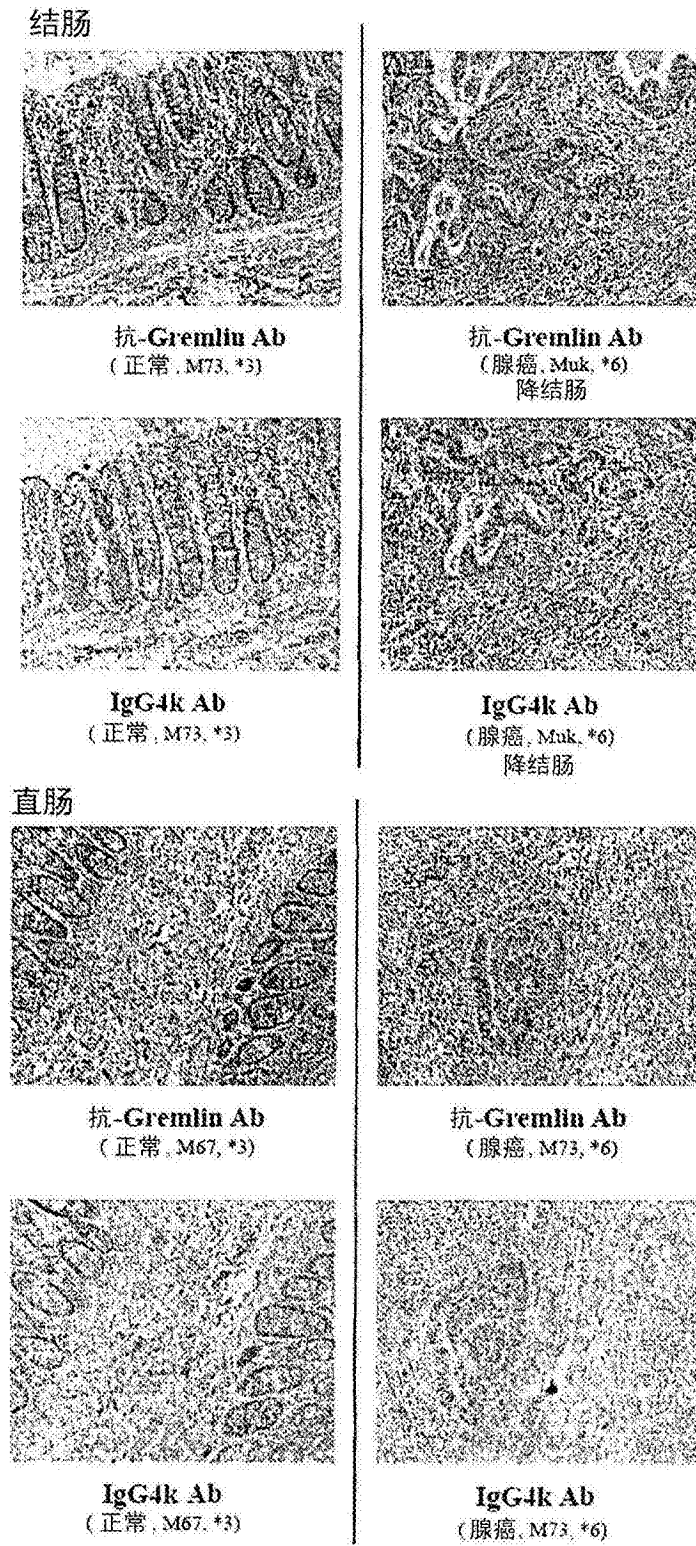


图6E

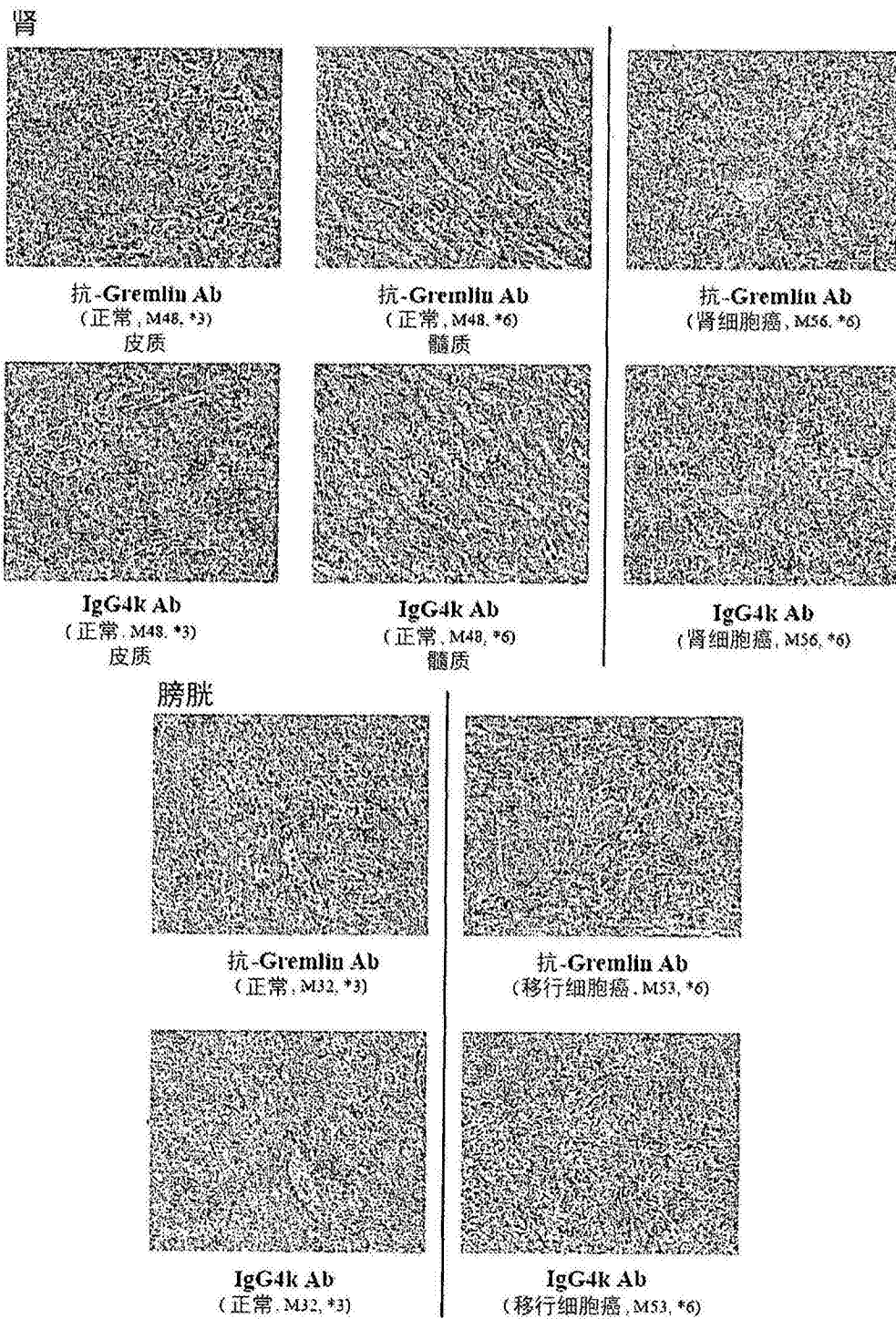
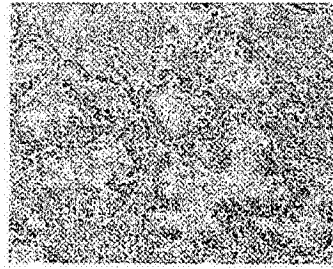
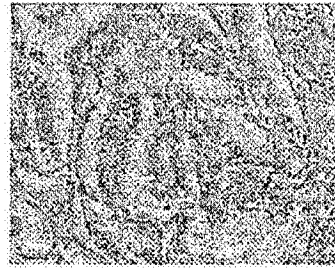


图6F

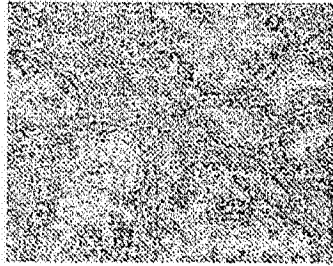
前列腺



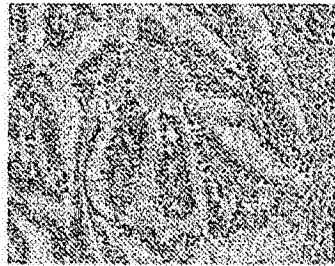
抗-Gremlin Ab
(正常, M32, *2)



抗-Gremlin Ab
(腺癌, M70, *6)

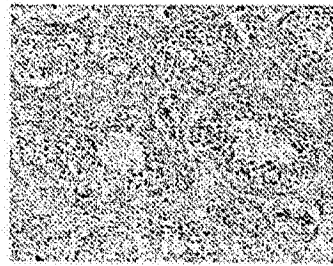


IgG4k Ab
(正常, M32, *2)

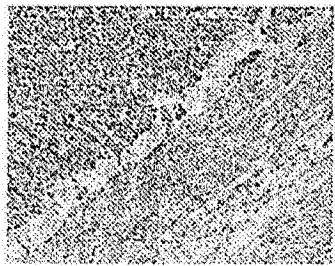


IgG4k Ab
(腺癌, M70, *6)

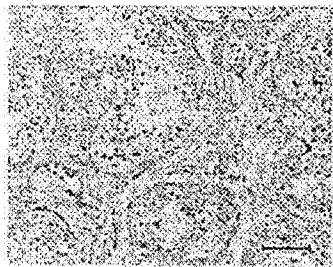
睾丸



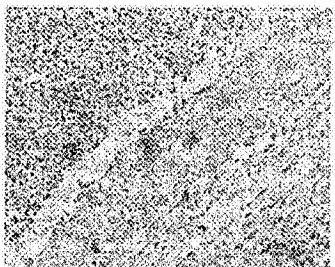
抗-Gremlin Ab
(正常, M70, *2)



抗-Gremlin Ab
(精原细胞瘤, M34, *6)



IgG4k Ab
(正常, M70, *2)



IgG4k Ab
(精原细胞瘤, M34, *6)

图6G

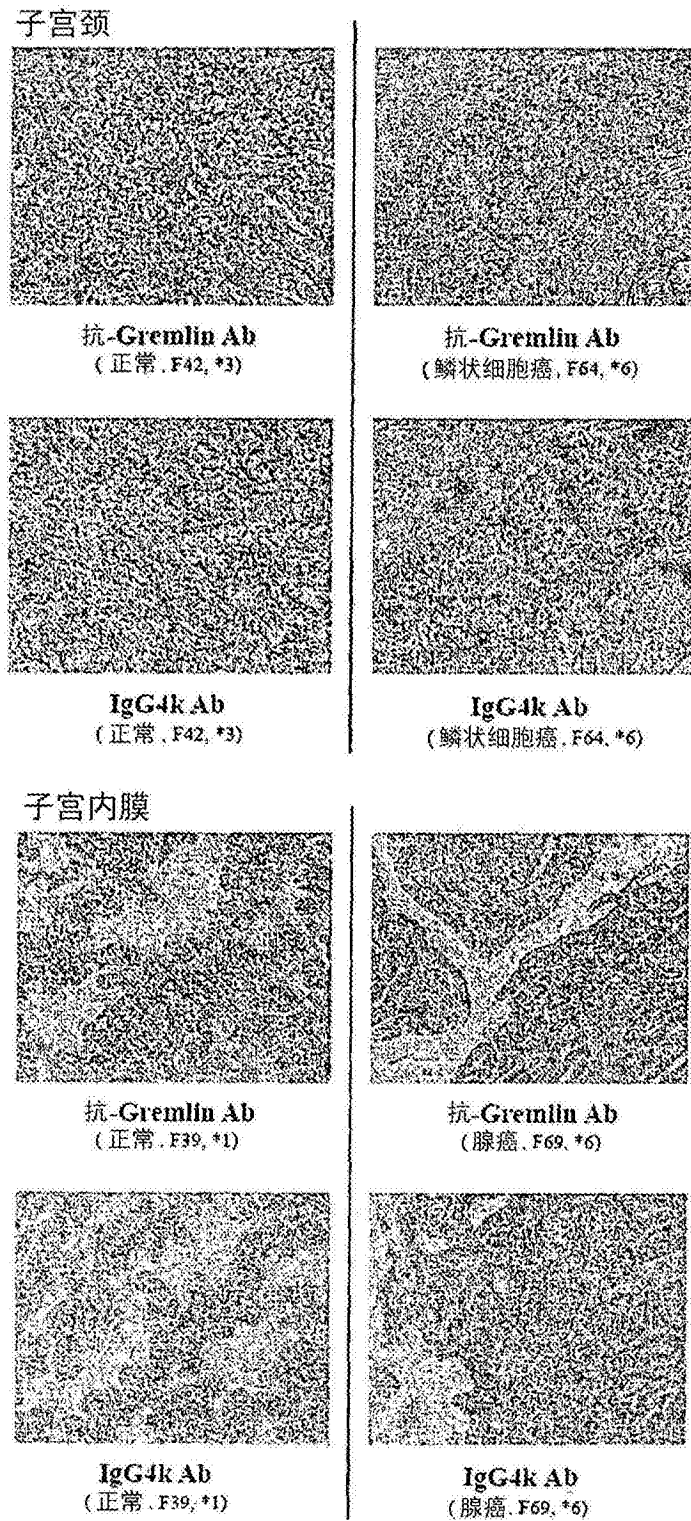
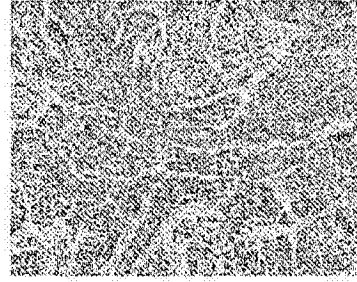


图6H

甲状腺



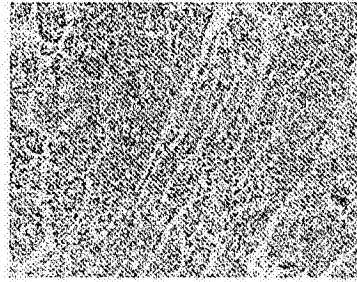
抗-Gremlin Ab
(正常, M39, *3)



抗-Gremlin Ab
(乳头状癌, F69, *6)



IgG4k Ab
(正常, M39, *3)



IgG4k Ab
(乳头状癌, F69, *6)

图6I

专利名称(译)	Gremlin-1抗体		
公开(公告)号	CN104321342B	公开(公告)日	2017-12-22
申请号	CN201380025133.8	申请日	2013-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团 金弦起		
申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团 金弦起		
当前申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团 金弦起		
[标]发明人	金弦起 郑竣昊 金珉秀 尹秀珉		
发明人	金弦起 郑竣昊 金珉秀 尹秀珉		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 G01N33/53 A61P35/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/22 C07K16/2863 C07K2317/24 C07K2317/70 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/622		
代理人(译)	吴小明		
审查员(译)	王奇		
优先权	61/611285 2012-03-15 US		
其他公开文献	CN104321342A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及Gremlin-1抗体，所述Gremlin-1抗体以不依赖骨形态发生蛋白(BMP)或血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)的方式抑制Gremlin-1，由此提供治疗癌症的作用。本发明的抗体抑制依赖Gremlin-1的细胞迁移、细胞侵袭和细胞增殖，并因此可以有效地用于治疗癌症或免疫疾病。

