

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-512894
(P2015-512894A)

(43) 公表日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46 ZNA	4C085
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	
A61P 35/00 (2006.01)	A61K 39/395 N	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-500366 (P2015-500366)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月11日 (2014. 11. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/002119
 (87) 国際公開番号 WO2013/137686
 (87) 国際公開日 平成25年9月19日 (2013. 9. 19)
 (31) 優先権主張番号 61/611, 285
 (32) 優先日 平成24年3月15日 (2012. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513061541
 エスエヌユー アールアンドディービー
 ファウンデーション
 大韓民国 151-015 ソウル クア
 ナクーグ クアナクーロ (シルリムード
 ン) 1
 (71) 出願人 507326766
 キム、ヒュンケ
 大韓民国、ソウル 135-110、ガン
 ナムグ、アプグジョンードン、434、
 ヒュンダイ・アパートメント 118-8
 04
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一

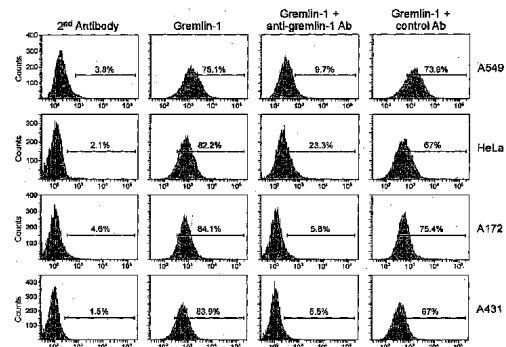
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グレムリン-1 に対する抗体

(57) 【要約】

本発明は、骨形成タンパク質 (BMP) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌に対して治療効果を有するグレムリン - 1 に対する抗体に関するものであり、本発明による抗体は、グレムリン - 1 に依存する細胞移動性 (cell migration)、細胞浸潤性 (cell invasion) 及び細胞増殖 (cell proliferation) を抑制することにより、癌または免疫疾患を治療するのに好適に用いられる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グレムリン - 1 に対する抗体。

【請求項 2】

骨形成タンパク質 (BMP) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌に対して治療効果を有することを特徴とする請求項 1 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、免疫抗体、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体よりなる群から選ばれるものであることを特徴とする請求項 1 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

10

【請求項 4】

前記抗体が、軽鎖不変領域、重鎖不変領域、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のアミノ酸配列を有する群から選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体：

(1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

(2) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

(3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

(4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

(5) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

(6) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 12 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；及び

(7) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 14 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域。

20

【請求項 5】

前記抗体の軽鎖不変領域及び重鎖不変領域が、ヒトまたはウサギのものであることを特徴とする請求項 4 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

30

【請求項 6】

前記抗体が、グレムリン - 1 が癌細胞に直接的に結合することを抑制することを特徴とする請求項 1 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、グレムリン - 1 に依存する細胞移動性 (cell migration)、細胞浸潤性 (cell invasion) 及び細胞増殖 (cell proliferation) を抑制することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が、グレムリン - 1 に依存する E - カドヘリン (E-cadherin) の発現を阻害することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

40

【請求項 9】

請求項 1 に記載の抗体及び薬学的に許容可能な担体を含む癌または免疫疾患の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項 10】

前記癌が、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、肝癌、腎臓癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、乳房癌、甲状腺癌、皮膚癌、骨癌、基底細胞癌、扁平細胞癌、鼻咽頭癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、食道癌及び頭頸部癌よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

50

前記免疫疾患が、関節リウマチ (rheumatoid arthritis)、全身性進行性硬化症 (Progressive systemic sclerosis、Scleroderma)、全身性紅斑性狼瘡 (lupus)、アトピー皮膚炎、円形脱毛症 (alopecia areata)、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性潰瘍、慢性甲状腺炎、後天性再生不良貧血、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病 (Behcet's disease)、クローン病、珪素肺症、石綿肺症、IgA腎臓疾患、連鎖球菌感染後糸球体腎炎 (PSGN)、シェーグレン症候群 (Sjogren Syndrome)、ギラン・バレー症候群 (Guillian-Barre syndrome)、皮膚筋炎 (dermatomyositis)、多発性筋炎 (polymyositis)、多発性硬化症 (multiple sclerosis)、自己免疫性溶血性貧血 (Autoimmune hemolytic anemia)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (Myasthenia gravis)、グレーブス病 (Grave's disease)、結節性多発動脈炎 (Polyarteritis nodosa)、強直性脊椎炎 (Ankylosing spondylitis)、線維筋痛症 (Fibromyalgia syndrome) 及び側頭動脈炎 (Temporal arteritis) よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 9 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 12】

請求項 1 の抗体または請求項 9 の薬学的組成物をこれを必要とする対象に投与することを含むことを特徴とする癌または免疫疾患の治療方法。

20

【請求項 13】

前記抗体が、骨形成タンパク質 (BMP) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌を治療することを特徴とする請求項 12 に記載の癌または免疫疾患の治療方法。

【請求項 14】

前記癌が、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、肝癌、腎臓癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、乳房癌、甲状腺癌、皮膚癌、骨癌、基底細胞癌、扁平細胞癌、鼻咽頭癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、食道癌及び頭頸部癌よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 12 に記載の癌または免疫疾患の治療方法。

30

【請求項 15】

前記免疫疾患が、関節リウマチ (rheumatoid arthritis)、全身性進行性硬化症 (Progressive systemic sclerosis、Scleroderma)、全身性紅斑性狼瘡 (lupus)、アトピー皮膚炎、円形脱毛症 (alopecia areata)、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性潰瘍、慢性甲状腺炎、後天性再生不良貧血、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病 (Behcet's disease)、クローン病、珪素肺症、石綿肺症、IgA腎臓疾患、連鎖球菌感染後糸球体腎炎 (PSGN)、シェーグレン症候群 (Sjogren Syndrome)、ギラン・バレー症候群 (Guillian-Barre syndrome)、皮膚筋炎 (dermatomyositis)、多発性筋炎 (polymyositis)、多発性硬化症 (multiple sclerosis)、自己免疫性溶血性貧血 (Autoimmune hemolytic anemia)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (Myasthenia gravis)、グレーブス病 (Grave's disease)、結節性多発動脈炎 (Polyarteritis nodosa)、強直性脊椎炎 (Ankylosing spondylitis)、線維筋痛症 (Fibromyalgia syndrome) 及び側頭動脈炎 (Temporal arteritis) よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 12 に記載の癌または免疫疾患の治療方法。

40

【請求項 16】

請求項 1 に記載の抗体を含む癌または免疫疾患診断用キット。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グレムリン-1 (gremlin-1) に対する抗体に係り、さらに詳しくは、骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) または血管内皮成長因子受容体-2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン-1を抑制することにより、癌に対して治療効果を有するグレムリン-1に対する抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

グレムリン-1 (gremlin-1, 20.7 kDa) は、骨形成タンパク質 (BMP) の拮抗剤であり、システインリッチな領域、システインノットモチーフ (cysteine knot motif) 及び TGF-スーパーファミリの構成員と共通する構造を有する184個のアミノ酸よりなるタンパク質である。前記タンパク質は進化的に保存されており、ヒトグレムリン遺伝子 (GREM1) は染色体15q13-q15の上に位置する (Topol LZ et al., (1997) Mol. Cell Biol., 17: 4801-4810; Topol LZ et al., Cytogenet Cell Genet., 89: 79-84)。グレムリン-1は分泌タンパク質であり、3種類のアイソフォーム (isoform) が報告されている (Topol LZ et al., J. Biol. Chem., 275: 8785-8793)。アイソフォーム1は最も頻繁に見られるアイソフォームであり、アイソフォーム2及び3はそれぞれアミノ酸39-79及び10-79が欠失している。

【0003】

グレムリン-1は、BMP-2、BMP-4及びBMP-7とヘテロダイマー (heterodimer) を形成することにより、骨形成タンパク質 (BMP) が細胞表面上の受容体に結合することを抑制する (Stanley E et al., (1998) Mech. Dev., 77: 173-184; Merino R et al., (1999) Development, 126: 5515-5522; Lappin DW et al., (2000) Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., 9: 469-472)。また、グレムリン-1は、肺、腕脚及び腎臓発達過程だけではなく、神経堤細胞 (neural crest cell) の分化過程においてBMPを調節する重要な役割を果たす (Lu MM et al., (2001) Dev. Dyn., 222: 667-680; Shi W et al., (2001) Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 280: L1030-1039)。グレムリン-1は可溶性リガンドに対して拮抗効果を示すだけではなく、細胞内においてBMP-4前駆タンパク質と相互作用して胚芽肺においてBMP-4媒介信号伝達活性を下向き調節する (Sun J et al., (2006) J. Biol. Chem., 281: 29349-29356)。さらに、グレムリン-1は分泌された軸索ガイダンスタンパク質 (axonal guidance protein) の一つであるスリットタンパク質 (Slit protein) と相互作用し、単核球走化性 (chemotaxis) の抑制剤として働く (Chen B et al., (2004) J. Immunol., 173: 5914-5917)。最近には、グレムリン-1が骨形成タンパク質 (BMP) に非依存的な方式により血管内皮成長因子受容体-2 (VEGFR2) に結合して血管形成を調節するということが報告されている (Mitola S et al., (2010) Blood, 116: 3677-3680)。グレムリン-1は、子宮頸管、子宮内膜、肺、卵巣、腎臓、乳房、大腸及び膵臓の癌腫をはじめとする様々なヒト腫瘍において過発現されるが (Namkoong H et al., (2006) BMC Cancer, 6: 74; Sha G et al., (2009) Fertil Steril., 91: 350-358)、

10

20

30

40

50

腫瘍形成におけるその役割は詳細に研究されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、グレムリン - 1 の腫瘍関連の特性について鋭意検討したところ、グレムリン - 1 が骨形成タンパク質 (BMP) や血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) とは無関係に癌細胞と直接的に相互作用をするということを見出し、これに基づいてグレムリン - 1 を抑制する抗体を開発するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の要約

本発明は、骨形成タンパク質 (BMP) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌または免疫疾患に対して治療効果を有するグレムリン - 1 に対する抗体を提供する。

また、本発明は、前記抗体及び薬学的に許容可能な添加剤を含む癌または免疫疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

さらに、本発明は、前記抗体またはこれを含む薬学的組成物をこれを必要とする対象に投与することを含む癌または免疫疾患の治療方法を提供する。

さらにまた、本発明は、前記抗体を含む癌または免疫疾患の診断用キットを提供する。

【発明の効果】

【0006】

本発明によるグレムリン - 1 に対する抗体は、グレムリン - 1 が骨形成タンパク質 (BMP) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式により癌細胞に結合することを抑制するので、グレムリン - 1 によって媒介される各種の癌または免疫疾患の予防または治療に効果的に使用される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、2次抗体、グレムリン - 1 単独及びグレムリン - 1 と本発明による抗体または対照群抗体との組み合わせを4種の癌細胞 (A549、HeLa、A172及びA431) と反応させた後、フローサイトメトリーにより測定したグラフである。

【図2】図2Aは、グレムリン - 1 をヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC) 細胞と反応させた後、フローサイトメトリーにより測定したグラフである。図2Bは、グレムリン - 1 をHUVEC、A549及びHeLa細胞と反応させた後、VEGFR2 mRNA及びタンパク質発現を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) 法により測定した結果である。図2Cは、グレムリン - 1 をHUVEC、A549及びHeLa細胞と反応させた後、VEGFR2 mRNA及びタンパク質発現を免疫プロット分析により測定した結果である。

【図3】図3Aは、BMP - 2、BMP - 4及びBMP - 7にグレムリン - 1 単独、本発明による抗体単独及びこれらの組み合わせを反応させてBMPに結合されたグレムリン - 1 の量を酵素免疫分析により測定した結果である。図3Bは、A549細胞とグレムリン - 1 を反応させ、ここに10倍モル過量のBMP - 2、BMP - 4及びBMP - 7を加えた後、フローサイトメトリーにより測定したグラフである。

【図4】図4Aは、A549細胞をグレムリン - 1 と反応させた後、クリスタルバイオレットで染色して撮影した細胞のイメージである。図4Bは、A549細胞をグレムリン - 1 と反応させた後、E-カドヘリン (E-cadherin) の発現を免疫プロット分析により測定したものである。図4Cは、A549細胞をグレムリン - 1 と反応させた後、E-カドヘリン (E-cadherin) の発現を免疫蛍光染色により測定したものである。図4Dは、A549細胞をグレムリン - 1 単独及びグレムリン - 1 と本発明による抗

10

20

30

40

50

体または対照群抗体との組み合わせと反応させた後、細胞の移動を測定したグラフである。

【図5】図5Aは、グレムリン-1-A549細胞株、mock-A549細胞株におけるグレムリン-1 mRNA及びタンパク質発現をRT-PCR及びウェスタンブロットによって測定したものである。図5Bは、グレムリン-1-A549細胞株、mock-A549細胞株及び本発明による抗体及び対照群抗体を処理したグレムリン-1-A549細胞株におけるE-カドヘリンの発現量を免疫ブロット分析方法により測定したものである。図5Cは、mock-A549細胞株及びグレムリン-1-A549細胞株において浸潤された細胞の数を測定したグラフである。図5Dは、グレムリン-1-A549細胞株、mock-A549細胞株及び本発明による抗体及び対照群抗体を処理したグレムリン-1-A549細胞株における細胞移動を測定したグラフである。図5Eは、グレムリン-1-A549細胞株、mock-A549細胞株及び本発明による抗体を処理したグレムリン-1-A549細胞株の細胞成長を測定したグラフである。図5Fは、グレムリン-1-A549細胞株及びmock-A549細胞株をヌードマウスに注射した後、形成された腫瘍体積を測定したグラフである。

【図6A】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（皮膚、乳房）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6B】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（リンパ節、肺）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6C】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（肝、食道）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6D】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（胃）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6E】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（結腸、直腸）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6F】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（腎臓、膀胱）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6G】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（前立腺、睾丸）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6H】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（子宮頸、子宮内膜）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【図6I】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織（甲状腺癌組織）を本発明による抗体（O-13）と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

発明を実施するための最良の態様

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、グレムリン-1に対する抗体を提供する。前記抗体は、骨形成タンパク質（BMP）または血管内皮成長因子受容体-2（VEGFR2）に非依存的な方式によりグレムリン-1を抑制することにより、癌に対して治療効果を有することを特徴とする。前記抗体は、免疫抗体、キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体であってもよいが、これらに制限されない。

【0009】

前記グレムリン-1に対する抗体は、例えば、ファージ-ディスプレイ技術を応用して選別することができる。すなわち、フィラメント(filament)状のファージ表皮タンパク質を発現する遺伝子に目的とする抗体を発現する遺伝子を融合させ、前記融合された抗体がバクテリオファージ粒子の表面に露出された抗体-ファージ状のウイルス粒子を生成した後、バイオパニング(biopanning)技法を応用してファージライブラリーから所望の抗体を選別することができる。上述したファージ-ディスプレイ技術を用いて多数の優れた効果を有する抗体を確保することができ、これらの中でも非常に優れた効

果を有する 7 種の抗体を得た。

【0010】

前記抗体は、軽鎖不変領域、重鎖不変領域、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域と重鎖可変領域がそれぞれ下記のアミノ酸配列を有する抗体であってもよい：

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (2) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (5) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (6) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 12 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；及び
- (7) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 14 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

10

【0011】

本発明において、前記 (1) ~ (7) の抗体をそれぞれ R - 80、R - 88、O - 1、O - 13、O - 26、J - 1 及び O - 13 (ヒト化) 抗体と命名した。

前記抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、ヒトまたはウサギのものであってもよい。前記抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域はそれぞれ単独で用いられてもよく、両方が組み合わせられて用いられてもよく、この技術分野における公知の軽鎖不変領域及び重鎖不変領域とそれぞれ組み合わせられて用いられてもよく、これらの断片が用いられてもよい。なお、前記軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は公知の方法により s c F v (s i n g l e - c h a i n v a r i a b l e f r a g m e n t) の形に製造されてもよい。

20

【0012】

前記配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1 ~ 22 番目のアミノ酸はフレームワーク領域 (F R 1) であり、23 ~ 33 番目のアミノ酸は相補性決定領域 1 (C D R 1) であり、34 ~ 48 番目のアミノ酸は F R 2 であり、49 ~ 55 番目のアミノ酸は C D R 2 であり、56 ~ 87 番目のアミノ酸は F R 3 であり、88 ~ 100 番目のアミノ酸は C D R 3 であり、101 ~ 110 番目のアミノ酸は F R 4 である。

30

【0013】

また、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1 ~ 24 番目のアミノ酸は F R 1 であり、25 ~ 34 番目のアミノ酸は C D R 1 であり、35 ~ 48 番目のアミノ酸は F R 2 であり、49 ~ 64 番目のアミノ酸は C D R 2 であり、65 ~ 95 番目のアミノ酸は F R 3 であり、96 ~ 105 番目のアミノ酸は C D R 3 であり、106 ~ 116 番目のアミノ酸は F R 4 である。

40

【0014】

さらに、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1 ~ 22 番目のアミノ酸は F R 1 であり、23 ~ 33 番目のアミノ酸は C D R 1 であり、34 ~ 48 番目のアミノ酸は F R 2 であり、49 ~ 55 番目のアミノ酸は C D R 2 であり、56 ~ 87 番目のアミノ酸は F R 3 であり、88 ~ 100 番目のアミノ酸は C D R 3 であり、101 ~ 110 番目のアミノ酸は F R 4 である。

【0015】

さらに、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1 ~ 24 番目のアミノ酸は F R 1 であり、25 ~ 34 番目のアミノ酸は C D R 1 であり、35 ~ 48 番目のアミノ酸は F R 2 であり、49 ~ 64 番目のアミノ酸は C D R 2 であり、65 ~ 95 番目の

50

アミノ酸はFR3であり、96～109番目のアミノ酸はCDR3であり、110～120番目のアミノ酸はFR4である。

【0016】

さらに、配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～50番目のアミノ酸はFR2であり、51～57番目のアミノ酸はCDR2であり、58～89番目のアミノ酸はFR3であり、90～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

【0017】

さらに、配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～122番目のアミノ酸はFR4である。

10

【0018】

さらに、配列番号7のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～50番目のアミノ酸はFR2であり、51～57番目のアミノ酸はCDR2であり、58～89番目のアミノ酸はFR3であり、90～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

20

【0019】

さらに、配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

【0020】

さらに、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～50番目のアミノ酸はFR2であり、51～57番目のアミノ酸はCDR2であり、58～89番目のアミノ酸はFR3であり、90～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

30

【0021】

さらに、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

【0022】

さらに、配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～23番目のアミノ酸はFR1であり、24～34番目のアミノ酸はCDR1であり、35～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～56番目のアミノ酸はCDR2であり、57～88番目のアミノ酸はFR3であり、89～97番目のアミノ酸はCDR3であり、98～107番目のアミノ酸はFR4である。

40

【0023】

さらに、配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～30番目のアミノ酸はFR1であり、31～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

50

【0024】

さらに、配列番号13のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～23番目のアミノ酸はFR1であり、24～36番目のアミノ酸はCDR1であり、37～51番目のアミノ酸はFR2であり、52～58番目のアミノ酸はCDR2であり、59～90番目のアミノ酸はFR3であり、91～101番目のアミノ酸はCDR3であり、102～111番目のアミノ酸はFR4である。

【0025】

さらに、配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

10

【0026】

前記配列番号1のアミノ酸配列は配列番号15の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号2のアミノ酸配列は配列番号16の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号3のアミノ酸配列は配列番号17の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号4のアミノ酸配列は配列番号18の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号5のアミノ酸配列は配列番号19の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号6のアミノ酸配列は配列番号20の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号7のアミノ酸配列は配列番号21の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号8のアミノ酸配列は配列番号22の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号9のアミノ酸配列は配列番号23の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号10のアミノ酸配列は配列番号24の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号11のアミノ酸配列は配列番号25の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号12のアミノ酸配列は配列番号26の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号13のアミノ酸配列は配列番号27の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号14のアミノ酸配列は配列番号28の塩基配列によってコードされてもよい。

20

【0027】

従来よりグレムリン-1が癌組織において発現されるということが知られているが、その具体的な役割は未だ究明されていない。グレムリン-1は、骨形成タンパク質(BMP)拮抗剤として知られているだけでなく、グレムリン-1が血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に結合して血管形成を調節することが報告されているため、グレムリン-1がBMPやVEGFR2を通じて癌と関連していることが予想された。しかしながら、驚くべきことに、本発明は、グレムリン-1がBMPやVEGFR2に非依存的に、すなわち、これらによって媒介されることなく、癌細胞と直接的に結合して細胞移動、浸潤及び増殖を誘導するという事を見出した。なお、グレムリン-1は、E-カドヘリン(E-cadherin)の発現を抑制することにより、癌細胞の成長を誘導する。

30

【0028】

前記細胞移動、浸潤及び増殖などは上述したグレムリン-1に対する抗体によって抑制される。このため、グレムリン-1抗体は、BMPやVEGFR2に非依存的にグレムリン-1を抑制することにより、すなわち、グレムリン-1が癌細胞に直接的に結合することを抑制することにより、癌に対する治療効果を有する。

40

【0029】

そこで、本発明は、前記抗体及び薬学的に許容可能な添加剤を含む癌予防または治療用薬学的組成物を提供する。前記添加剤は、担体、賦形剤またはその他の添加剤であってもよい。本発明による組成物は、通常的な方法にて薬学的剤形を製造することができる。剤形を製造するに当たり、前記抗体を担体と一緒に混合または希釈するか、あるいは容器形の担体内に封入させることが好ましい。希釈剤として用いられる担体としては、抗体に対する担体、賦形剤またはミディアム(medium)として作用する固形、半固形または液状の物質が挙げられる。このため、剤形は、錠剤、丸剤、粉剤、サシェ(sachet

50

)、エリキシル剤 (elixir)、懸濁剤、乳剤、溶液剤、シロップ剤、エアゾール剤、軟質または硬質ゼラチンカプセル剤、滅菌注射剤、滅菌粉剤などの形が挙げられる。適合な担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニールピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及び及び鉱油が挙げられる。剤形は、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤、防腐剤などをさらに含むことができる。本発明による組成物は、哺乳動物に投与された後に抗体の迅速、持続または遅延放出を与えるように当業界の公知の方法を用いて剤形化することができる。本発明による抗体組成物は、前記抗体と共にインターフェロン、抗-HBV単クローン抗体、抗-HBVポリクローナル抗体、ヌクレオチド類似体、DNAポリメラーゼ阻害剤、siRNA製剤または治療ワクチンを抗ウイルス剤としてさらに含むことができる。

10

20

30

40

50

【0030】

本発明による抗体またはこれを含む薬学的組成物をこれを必要とする対象、例えば、ヒトをはじめとする哺乳動物に投与することにより、癌を治療することができる。このとき、前記抗体の投与量は、処理される対象、疾病または病態の重症度、投与の速度及び処方医師の判断による。有効成分として、前記抗体は、哺乳動物に対して一日につき0.001~10mg/kg(体重)、好ましくは、0.005~1mg/kg(体重)の量で一日につき1回または一日につき複数回に分けて非経口的に投与することができる。場合に依りて、上述した範囲よりも少ない投与量の方がより好ましく、有害な副作用を引き起こさないつつもより多い投与量が使用されてもよく、より多い投与量の場合には一日につき複数回に分けて少量ずつ投与してもよい。

【0031】

このため、本発明は、本発明による抗体または前記薬学的組成物をこれを必要とする対象に投与することを含む癌の治療方法を提供する。前記本発明による抗体は、骨形成タンパク質(BMP)または血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に非依存的な方式によりグレムリン-1を抑制することにより、癌を治療することを特徴とする。

【0032】

上述した癌の例としては、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、肝癌、腎臓癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、乳房癌、甲状腺癌、皮膚癌、骨癌、基底細胞癌、扁平細胞癌、鼻咽頭癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、食道癌及び頭頸部癌が挙げられるが、これらに制限されない。

【0033】

一方、本発明による抗体は、免疫疾患の予防または治療用途にも使用可能である。グレムリン-1が免疫疾患と深い関係があるということがいくつかの文献により立証された(Mezzanos, et al. (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 22(7):1882-1890)。

【0034】

このため、本発明によるグレムリン-1を抑制する抗体は、免疫疾患を予防または治療するのに使用可能である。

【0035】

前記免疫疾患の例としては、関節リウマチ(rheumatoid arthritis)、全身性進行性硬化症(Progressive systemic sclerosis、Scleroderma)、全身性紅斑性狼瘡(lupus)、アトピー皮膚炎

、円形脱毛症 (alopecia areata)、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性潰瘍、慢性甲状腺炎、後天性再生不良貧血、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病 (Behcet's disease)、クローン病、珪素肺症、石綿肺症、IgA腎臓疾患、連鎖球菌感染後糸球体腎炎 (PSGN)、シェーグレン症候群 (Sjogren Syndrome)、ギラン・バレー症候群 (Guillian-Barre syndrome)、皮膚筋炎 (dermatomyositis)、多発性筋炎 (polymyositis)、多発性硬化症 (multiple sclerosis)、自己免疫性溶血性貧血 (Autoimmune hemolytic anemia)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (Myasthenia gravis)、グレーブス病 (Grave's disease)、結節性多発動脈炎 (Polyarteritis nodosa)、強直性脊椎炎 (Ankylosing spondylitis)、線維筋痛症 (Fibromyalgia syndrome) 及び側頭動脈炎 (Temporal arteritis) が挙げられるが、これらに制限されない。

10

【0036】

一方、本発明は、本発明による抗体を含む癌または免疫疾患診断用キットを提供する。前記キットは、本発明による抗体に加えて、免疫組織化学染色法のための通常の試薬などをさらに含むことができる。さらに含まれ得る構成要素としては、FITC試薬、抗原賦活液 (antigen retrieval solution)、対照群抗体、HRP-結合された重合体、DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)溶液、マイヤ-ヘマトキシリン液 (Mayer's hematoxylin solution) などが挙げられるが、これらに制限されない。前記キットは、正常組織と診断のための組織に標識された本発明による抗体を反応させ、これを染色して顕微鏡で観察することにより、本発明による抗体と反応した組織を、癌または免疫疾患にかかったまたは危険性のある組織であると診断することができる。

20

【0037】

以下、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明する。

但し、下記の実施例は本発明を例示するためのものに過ぎないもので、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0038】

実施例1：グレムリン-1の発現及び精製

<1-1> 細胞培養

A549、HeLa、A172及びA431細胞は韓国細胞株銀行(ソウル、韓国)から入手し、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)はインビトロジェン社(カールスバッド、カリフォルニア州)から入手した。一方、A549、A172及びA431細胞は10%ウシ胎児血清(FBS)(GIBCO社製、グランドアイランド、ニューヨーク州)入りRPMI-1640培地(ウェルジーン社製、韓国)で、HeLa細胞は10%FBS入りMinimum Essential Medium(MEM)培地(ウェルジーン社製)で、そしてHUVECは内皮細胞成長培地-2(Endothelial Growth Medium-2; EGM-2)(ロンザ社製、ウォーカーズビル、メリーランド州)で培養した。

40

【0039】

<1-2> グレムリン-1発現ベクターの製造及び形質感染

文献[Namkoong H et al., (2006) BMC Cancer 6: 74]の方法を参照して、ヒト子宮組織cDNAライブラリーからグレムリンcDNAを増幅させて得た。次いで、下記のPCRプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により前記グレムリンcDNAの5'及び3'末端にHindIII及びXhoI制限酵素部位を導入した。

【0040】

5' - CCC AAG CTT ATG AGC CGC ACA GCC TAC

50

AC - 3' (配列番号29)

5' - CCG CTC GAG ATC CAA ATC GAT GGA TAT

GC - 3' (配列番号30)

【0041】

前記PCR産物をHindIII及びXhoIで切断した後、pcDNA3.1/myc-Hisベクター(インビトロジェン社製)内にライゲーションしてグレムリン-1発現ベクターを製造した。

【0042】

一方、形質感染の1日前に、A549細胞(5.0×10^5 細胞)をプレートに塗抹して70%コンフルエンス(confluency)に到達させた。次いで、前記製造されたグレムリン-1発現ベクターをリポフェクタミン2000試薬(インビトロジェン社製)を用いてメーカーのガイドラインに従ってA549細胞に形質感染させた。前記形質感染された細胞を1.0mg/mlの抗生剤G418(インビトロジェン社製)を用いて選別した。前記選別されたグレムリン-1発現細胞株を「グレムリン-1-A549」細胞株と命名した。

10

【0043】

上述した方式に従い、グレムリン-1が挿入されていないpcDNA3.1/myc-Hisベクター単独でA549細胞を形質感染させて「mock-A549」細胞株を得た。

【0044】

20

<1-3> グレムリン-1の発現及び精製

グレムリン-1及びヒトIgG-Fc融合タンパク質をコードする遺伝子を文献[Park Set al., (2010) Clin Chim Acta 411: 1238-1242]に記載の方式に従い、オーバーラッピングPCR(overlapping PCR)法を用いて製造した。前記ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に用いられたグレムリン-1及びIgG-Fcに対するリンカープライマー配列は、下記の通りである:

(1) グレムリン-1

F: 5' - GGC CCC ACC GGC CCC ATC CAA ATC GA
T - 3' (配列番号31)

30

R: 5' - GGG GCC GGT GGG GCC TCG GGT GGC GG
T GGC - 3' (配列番号32)

(2) IgG-Fc

F: 5' - AAG CTT GTG GCC CAG GCG GCC ATG AG
C CGC ACA GCC TAC - 3' (配列番号33)

R: 5' - GGA TCC TCA TTT TGG CGG GGA CAG GG
A GAG - 3' (配列番号34)

【0045】

前記PCR産物をHindIII及びBamHIで切断してpCEP4発現ベクター(インビトロジェン社製)内にクローニングして、グレムリン-1-Fc融合タンパク質を発現するベクターを製造した。

40

【0046】

一方、HEK293F細胞(インビトロジェン社製)をGIBCO FreeStyleTM 293発現培地(インビトロジェン社製)に $0.1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度で培養した後、通気孔蓋体付き使い捨て三角組織培養フラスコ(コーニング社製)に移してオービタル攪拌培養器(orbital shaking incubator; 37、8%CO₂、Minitron、INFORSHT、スイス)上において135rpmにて攪拌しながら培養した。形質感染の1日前に、前記細胞培養物に新鮮な培地を添加して 1.0×10^6 細胞/mlの密度に希釈し、 2.0×10^6 細胞/mlの密度に達するまで培養した。次いで、前記HEK293細胞をリポフェクタミン

50

2000 (インビトロジェン社製)を用いて上述したグレムリン-1及びヒトIgG-Fc融合タンパク質を発現するベクターで形質感染させた。形質感染された細胞を再びオービタル攪拌培養器で培養し、形質感染の3日目に培養上澄み液を回収した。次いで、文献 [Park Set al., (2010) Clin Chim Acta 411: 1238-1242] に記載の過程に従い、タンパク質A親和性クロマトグラフィを用いてグレムリン-1-Fc融合タンパク質を精製した。

【0047】

実施例2：グレムリン-1抗体の生成

< 2 - 1 > 免疫化

5 µgのグレムリン-1-Fcを2 mLのリン酸緩衝食塩水(PBS)と混合し、37で30分間培養して、これを2%スクワレン中に毒素が除去された内毒素であるMPL (monophosphorylated lipid A species) 及びマイコバクテリアの細胞壁成分であるTDW及びCWSを含有する乳中水乳化液である補助剤(シグマ社製、セントルイス、ミズーリ州)に乳化させた後、ニュージーランド産の白いウサギに注入した。免疫化を3週おきに3回行った。免疫化されたウサギの抗体力価(titer)を二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)共役のマウス抗ウサギIgG多クローン抗体(ピラス・ケミカル社製、ロックフォード、イリノイ州)を用いて酵素結合免疫吸着分析(ELISA)によって決定した。

【0048】

前記免疫化されたウサギの脾臓及び骨髄からTRI試薬(インビトロジェン社製)を用いて総RNAを得た。抽出された脾臓及び骨髄をホモジナイザーを用いて50%アウトプット(output)において1分間TRI試薬中において均質化させ、室温下で5分間培養した。均質化された試料を4で10分間2,500gにおいて遠心分離した。上澄み液を50 mLの遠心分離チューブに移し、各上澄み液に3 mLの1-プロモ-3-クロロ-プロパン(BCP)(シグマ社製)を添加した。次いで、前記混合物を15秒間ボルテックスし(vortexing)、室温下で15分間培養した。混合物を4で15分間17,000gにおいて遠心分離し、無色の上層水性相を新たな50 mLのチューブに移した。次いで、15 mLのイソプロパノールを添加して室温下で10分間培養した。4で15分間17,500gにおいて遠心分離した後、上澄み液を丁寧に除去し、ペレットを再懸濁させずに30 mLの75%エタノールで洗浄した。ペレットを10分間再び遠心分離して上澄み液を除去した後、ペレットを室温下で空気乾燥した。次いで、ペレットをRNaseのない水に溶解させ、-80に保管した。260 nmにおいて光学密度を測定してRNA濃度を決定し(40 ng/µLのRNAがOD260=1を生成する)、純度をOD260/OD280の割合によって計算した(通常、1.6~1.9の範囲である)。

【0049】

< 2 - 2 > 総RNAからの第一鎖cDNAの合成

オリゴ(dT)プライミング(priming)を有する第一鎖cDNA合成キットに対するスーパースクリプト(SuperscriptTM) IIIシステム(インビトロジェン社製)を用いて第一鎖cDNAを合成した。前記分離された5 µgの総RNAを1 µLの0.5 µg/µLオリゴ(dT)、1 µLの10 mM dNTP及びジエチルピロカーボネート(DEPC)で処理された水と混合して最終的な体積を10 µLに調整した。前記混合物を65で5分間培養し、氷中で冷却した。前記RNA試料に2 µLの10倍濃度反応緩衝液、4 µLの25 mM MgCl₂、2 µLの100 mMジチオトレイトール(DTT)、1 µLのRNase OUT(リボヌクレアーゼ阻害剤)及び1 µLのSuperscript III逆転写酵素を添加し、50で50分間培養した。85で5分間培養した後、氷中で冷却して反応を終了した。次いで、1 µLのRNase Hを添加し、37で20分間培養した。前記第一鎖cDNAを-20で保管した。

【0050】

< 2 - 3 > 1次PCR

10

20

30

40

50

ウサギの脾臓及び骨髄から得た第一鎖 cDNA に対して Expand High Fidelity PCR システム (ロシュ・モレキュラーシステムズ社製、インディアナ州、米国) を用いた 30 サイクルの PCR を行った。ウサギ V_L (9 × V_k 及び 1 × V_H) コード配列の増幅のための 10 個のプライマー組み合わせ及びウサギ V_H コード配列 (表 1) の増幅のための 4 つの組み合わせを併用した。各反応において、1 µL の cDNA を 60 pmol の各プライマー、10 µL の 10 倍濃度反応緩衝液、8 µL の 2.5 mM dNTP (プロメガ社製、マディソン、ウィスコンシン州)、0.5 µL の Taq DNA 重合酵素及び水と混合して最終的な体積を 100 µL に調整した。下記の条件下で PCR を行った: 94 °C で 15 秒、56 °C で 30 秒及び 72 °C で 90 秒の 30 サイクル後に、72 °C で 10 分間の最終延長。約 350 bp の長さを有する断片を 1.5% アガロースゲルに搬入して電気泳動した後、QIAEXII ゲル抽出キット (キアゲン社製、バレンシア、カリフォルニア州) を用いて精製した。精製されたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物を OD 260 nm において読み取って定量した (1 OD 単位 = 50 µg/mL)。

【0051】

< 2 - 4 > 2 次 PCR

2 次 PCR において、1 次 V_L 産物をオーバーラップ延長 PCR によって 1 次 V_H 産物とランダムに連結した (表 2)。長いリンカーの単鎖断片に対して少なくとも 10 回の反応を行った。各反応において、100 ng の精製された軽鎖産物及び重鎖産物を 60 pmol の各プライマー、10 µL の 10 倍濃度反応緩衝液、8 µL の 2.5 mM dNTP (プロメガ社製)、0.5 µL の Taq DNA 重合酵素及び水と混合して最終的な体積を 100 µL に調整した。下記の条件下で PCR を行った: 94 °C で 15 秒、56 °C で 30 秒及び 72 °C で 2 分の 20 サイクル後に、72 °C で 10 分間の最終延長。約 700 bp の大きさの断片を 1.5% アガロースゲルに搬入して電気泳動した後、QIAEXII ゲル抽出キット (キアゲン社製、バレンシア、カリフォルニア州) を用いて精製した。精製された PCR 産物を OD 260 nm において読み取って定量した (1 OD 単位 = 50 µg/mL)。

【0052】

< 2 - 5 > 精製されたオーバーラップ延長産物及びベクター DNA の制限酵素処理

PCR 産物及び pComb3X ベクター (スクリプス研究所製) をクローニングのために SfiI 制限酵素で処理した。10 µg の精製されたオーバーラップ PCR 産物を 360 ユニットの SfiI (1 µg の DNA 当たり 16 ユニット、ロシュ・モレキュラーシステムズ社製)、20 µL の 10 倍濃度反応緩衝液 M 及び水と混合して最終的な体積を 200 µL に調整した。20 µg の pComb3X ベクターを 120 ユニットの SfiI (1 µg の DNA 当たり 6 ユニット、ロシュ・モレキュラーシステムズ社製)、20 µL の 10 倍濃度反応緩衝液 M 及び水と混合して最終的な体積を 200 µL に調整した。前記混合物を 50 °C で 5 時間培養した。約 700 bp の長さを有する切断された挿入物を 1% アガロースゲルで精製し、約 3,400 bp の長さを有するベクター DNA 及び pComb3X ベクター内に含有されている約 1,600 bp の長さを有する断片を 0.6% アガロースゲルで精製した。

【0053】

< 2 - 6 > 処理されたオーバーラップ PCR 産物とベクター DNA のライゲーション (ligation)

高効率のライゲーション及び形質転換のためのベクター並びに挿入物の適合性を評価するために、小規模のライゲーションを行った。ベクター DNA の SfiI 処理物のみを含有するライゲーション反応を 5% 未満のライブラリーサイズであるバックグラウンドライゲーションに対して評価した。ライゲーションのために、140 ng の SfiI で処理されて精製されたベクター DNA 及び 70 ng の SfiI で処理されて精製された PCR 産物またはスタッファー DNA、4 µL の 5 倍濃度リガーゼ緩衝液、1 µL の T4 リガーゼ (インビトロジェン社製) 及び水を混合して総体積を 20 µL に調整した。前記ライゲーション混合物を室温下で 4 時間培養した。前記ライゲーションされた産物 1 µL を 0.2

10

20

30

40

50

cmキュベット及び遺伝子パルサー (GenePulser; バイオラッドラボラトリーズ製、ハーキュリーズ、カリフォルニア州) を用いて 2.5 kV、25 μ F 及び 200 で電気穿孔法によって 50 μ L の ER2738 エレクトロコンピテント細胞 (NEB) 内に形質転換させた。前記細胞を 3 mL の SB 培地に再懸濁させ、225 ~ 250 rpm で攪拌しながら 37 で 1 時間培養した。形質転換体の総数を LB + カルベニシリンプレートの上に 1 μ L、10 μ L 及び 100 μ L を塗抹して決定した。理想的には、最終的なライブラリーの大きさはベクター DNA μ g に対して少なくとも 10^8 集落形成単位 (cfu) にならなければならない、5% バックグラウンドライゲーション未満でなければならない。

【0054】

< 2 - 7 > エレクトロコンピテント大腸菌の製造

大腸菌 ER2738 菌株を 15 mL の SB 入り 50 mL のポリプロピレンチューブで培養し、250 rpm にて攪拌しながら 37 で一晩中成長させた。翌日に、2.5 mL の培養物を 500 mL の SB、10 mL の 20% (w/v) グルコース及び 5 mL の 1M MgCl₂ 入り 2 L フラスコ内に希釈させ、600 nm における OD が 0.8 ~ 0.9 に達するまで 37 で 250 rpm で攪拌した。次いで、培養物を予め冷却した 500 mL の遠心分離瓶に入れ、4 で 20 分間 3,000 g において遠心分離した。上澄み液を除去し、ペレットを予め冷却した 30 mL の 10% (v/v) グリセロールに再懸濁させた。再懸濁されたペレットを遠心分離し、グリセロールで 3 回洗浄した後、5 mL の 10% グリセロールに再懸濁して -80 で保管した。

【0055】

< 2 - 8 > ヘルパーファージの製造

< 2 - 7 > において製造された 10 μ L の ER2738 懸濁液を 10 mL の SB 培地に接種し、37 で 1 時間 250 rpm にて攪拌した。新たに製造されたプレートから得た単一ヘルパーファージプラークをピペットチップを用いて培養物内に移した。前記感染された 10 mL の培養物をカナマイシン入りの予め加熱した (37) SB 培地 500 mL 入りの 2 L の三角フラスコに移して最終的な濃度を 70 μ g/mL に調整した後、37 で一晩中 250 rpm にて攪拌した。翌日に、培養物を 2,500 g において 15 分間遠心分離し、上澄み液を水槽中において 70 で 20 分間培養した。2,500 g において 15 分間遠心分離した後、上澄み液を新たな 50 mL のポリプロピレンチューブに移して 4 で保管した。

【0056】

< 2 - 9 > ライブラリーライゲーション及び形質転換

1.4 μ g の SfiI で切断した pComb3X、700 ng の < 2 - 5 > において得た、SfiI で切断された PCR 産物、40 μ L の 5 倍濃度リガーゼ緩衝液、10 μ L の T4 DNA リガーゼ及び水 (最終的な体積を 200 μ L に調整する) を用いてライブラリーライゲーションを行った。前記ライゲーション混合物を室温で一晩中培養した後、-80 で一晩中エタノールで沈殿させた。マイクロ遠心分離器を用いて最高の速度にて 4 で 15 分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、ペレットを 1 mL の 70% (v/v) エタノールで洗浄して乾燥させた。ペレットを 15 μ L の水に溶解させた。前記結さされたライブラリーサンプルを 300 μ L のエレクトロコンピテント大腸菌内に形質転換させ、5 mL の SB 培地において 37 で 1 時間培養した。前記培養物に 100 mL の予め加熱した SB 培地及び 3 μ L の 100 mg/mL カルベニシリンを添加した。50 μ g/mL のカルベニシリンを含有する LB 培地に前記培養物 0.1 μ L、1 μ L 及び 10 μ L を塗抹してライブラリーの大きさを決定した。培養物を 250 rpm にて 1 時間攪拌した。前記培養物に 4.5 μ L の 100 mg/mL カルベニシリンを添加して 1 時間さらに攪拌した。前記培養物に 2 mL の VCSM13 ヘルパーファージ、183 mL の予め加熱した SB 及び 92.5 μ L の 100 mg/mL のカルベニシリンを添加して 300 rpm 及び 37 で 2 時間攪拌した。前記培養物に 280 μ L の 50 mg/mL のカナマイシンを添加し、前記培養物を 300 rpm 及び 37 で一晩中攪拌した。翌日に、培養物を 3

10

20

30

40

50

, 0 0 0 g において 4 で 1 5 分間遠心分離した。上澄み液を 5 0 0 m L の遠心分離瓶に移し、次いで、8 g のポリエチレングリコール (P E G) - 8 0 0 0 及び 6 g の N a C l を添加した。氷中で 3 0 分間保管した後、上澄み液を 1 5 , 0 0 0 g において 4 で 1 5 分間遠心分離した。上澄み液を廃棄し、ファージペレットを 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) を含有するトリス緩衝食塩水 (T B S) に再懸濁させた。

【 0 0 5 7 】

< 2 - 1 0 > 固定化された抗原上におけるライブラリーのパニング

常磁性ビーズ (ダイナル・バイオテック社製、レイクサクセス、ニューヨーク州) を用いてバイオパニングを行った。3 μ g のグレムリン - 1 を室温下で 2 0 時間 $1 \times 1 0 ^ 7$ ビーズと結合させた。前記ビーズをリン酸緩衝生理食塩水 (P h o s p h a t e b u f f e r e d s a l i n e ; P B S) で 4 回洗浄し、ブロッキング緩衝液とともに室温下で 1 時間培養した。グレムリン - 1 と結合したビーズを < 2 - 9 > において得た s c F v をディスプレイするファージとともに室温下で 2 時間培養した。前記洗浄段階を 1 次における 3 回から後続する 4 次においては 1 0 回に増やした。結合されたファージを 5 0 μ L の 0 . 1 M グリシン / H C l (p H 2 . 2) を用いて溶出させ、3 μ L の 2 M T r i s - C l (p H 9 . 1) によって中和させた。このようなファージ入り上澄み液を用いて E R 2 7 3 8 を感染させ、ファージミドを一晩中増幅するためにヘルパーファージ V C S M 1 3 を用いてレスキュー (r e s c u e) した。翌日に、< 2 - 9 > において上述したように P E G - 8 0 0 0 及び N a C l を添加してファージを製造した。なお、前記ファージにより感染された培養物を 5 0 μ g / m L のカルベニシリンを含有する L B プレートの上に塗抹して投入 (i n p u t) 及び生産 (o u t p u t) ファージ力価を決定した。

【 0 0 5 8 】

< 2 - 1 1 > ファージ E L I S A によるクローンの選別

追加の分析のために選ばれた個別クローンから s c F v 結合を確認するために、精製された組換えグレムリン - 1 に対して s c F v をディスプレイするファージを用いて E L I S A を行った。グレムリン - 1 によりコーティングされたマイクロタイタープレートをリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中の 3 % のウシ血清アルブミン (B S A) を用いて 3 7 で 1 時間ブロッキングした。次いで、ファージ上澄み液を P B S 中の 6 % B S A と同様に混合し、3 7 で 1 時間培養した。0 . 0 5 % のツイーン添加リン酸緩衝生理食塩水 (T w e e n a d d e d P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e ; P B S T) で洗浄した後、プレートを H R P の結合された抗 M 1 3 抗体 (1 : 5 0 0 0 希釈、ピアス・ケミカル社製) とともに培養した。色相反応のために、2 , 2 ' - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 ; A B T S) 基質溶液 (アムレスコ社製、ソロン、オハイオ州) を使用した。

s c F v 断片を全長 I g G に転換させて過発現させた。本発明による抗体 (O - 1 3) の特異性をウェスタンブロット分析法を用いて決定した。本発明による抗体 (O - 1 3) の特異性を決定するために、p c D N A 3 . 1 / m y c - H i s - グレムリン - 1 で形質感染された H E K 2 9 3 F 細胞の培養上澄み液をドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S o d i u m D o d e c y l S u l f a t e - P o l y a c r y l a m i d e G e l E l e c t r o p h o r e s i s ; S D S - P A G E) で分離した。ブロットを 1 0 0 n g / m L の本発明による抗体 (O - 1 3) と 4 で一晩中培養した後、H R P の結合された抗ヒト I g G (F c 特異的、1 : 1 0 0 0 希釈 ; ピアス・ケミカル社製) とともに室温下で 1 時間培養した。ブロットをメーカーのガイドラインに従い、向上された化学発光システム (ピアス社製) を用いて視覚化させた。ゲルをメーカーのガイドラインに従い、クマシーブリリアントブルー G - 2 5 0 (シグマ社製) を用いて視覚化させた。

前記過程により得た 7 種類の抗体をそれぞれ R - 8 0 、 R - 8 8 、 O - 1 、 O - 1 3 、 O - 2 6 、 J - 1 及び O - 1 3 (ヒト化) 抗体と命名し、アミノ酸及び塩基配列を分析した。

配列分析の結果、前記 R - 8 0 抗体は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領

域及び配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、R-88抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O-1抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O-13抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O-26抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、J-1抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O-13(ヒト化)抗体は、配列番号13のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

10

予備実験により、前記抗体のうち最も優れた効果を有するO-13抗体を今後の実験に供試した。

【0059】

実施例3：グレムリン-1の癌細胞との相互作用の分析

グレムリン-1が癌細胞と直接的に相互作用するかどうかを調べるために、グレムリン-1を4種類の癌細胞(A549、HeLa、A172及びA431)と共に培養した後、フローサイトメトリーにより分析した。

具体的に、付着細胞をトリプシンで処理し、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の1%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)で洗浄した。懸濁細胞を500×gにおいて2分間遠心分離して回収し、PBS中の1%(w/v)BSAで洗浄した。全ての細胞をPBS中の1%(w/v)BSAで100nMの最終濃度のヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1(R&Dシステムズ社製、ミネアポリス、ミネソタ州)と共に37℃で1時間培養した。次いで、細胞をPBS中の1%(w/v)BSAで2回洗浄し、5µg/mlの最終濃度のFITC-結合されたHis抗体(アブカム社製、ケンブリッジ、イギリス)と共に暗所で37℃で30分間培養した。次いで、細胞をPBS中の1%(w/v)BSAで2回洗浄し、FACSCantoIIフローサイトメーター(BDバイオサイエンス社製、サンノゼ、カリフォルニア州)上において分析する前に500µLのPBSに再懸濁させた。

20

一方、グレムリン-1抗体(O-13)の中和効能を分析するために、細胞をヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1 100nM及びPBS中の1%(w/v)BSA中の10µMの本発明による抗体(O-13)と共に37℃で1時間培養した後、FITCの結合されたHis抗体(アブカム社製)で探針させた。

30

【0060】

A549細胞を1µMのBMP-2、BMP-4またはBMP-7(R&Dシステムズ社製、ミネアポリス、ミネソタ州)及び100nMのグレムリン-1-Fcで同時に処理し、37℃で1時間培養した。細胞をFITCの結合されたIgG-Fc特異的抗体(5µg/ml、インビトロジェン社製)で探針させた。次いで、細胞をFACSCantoIIフローサイトメーター上において分析した。

前記実験結果を図1に示す。同図に示すように、グレムリン-1は癌細胞株と直接的に相互作用し、これはグレムリン-1抗体によって抑制された。

40

【0061】

実施例4：グレムリン-1と癌細胞との相互作用に対する血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)の影響

グレムリン-1と細胞株との相互作用がグレムリン-1の唯一に知られている細胞表面受容体であるVEGFR2によって媒介されるか否かを評価した。

【0062】

<4-1> フローサイトメトリー

グレムリン-1がヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と結合するか否かを実施例3と同じ過程に従い、フローサイトメトリーによって分析した。前記結果を図2Aに示す。同図に示すように、グレムリン-1はHUVECと結合しなかった。HUVECがVEGF

50

R2を発現するため、グレムリン-1がHUV ECと結合しないということは、グレムリン-1がVEGFR2とは無関係に癌細胞に結合するということを示唆する。

【0063】

<4-2> RT-PCR

A549細胞、HeLa細胞及びHUV EC細胞におけるVEGFR2 mRNA及びタンパク質の発現をRT-PCR及び免疫プロット分析法を用いて確認した。

具体的に、RT-PCRのために、トリゾール試薬(インビトロジェン社製)を用いてメーカーのガイドラインに従い、A549細胞、HeLa細胞及びHUV ECから総RNAを分離した。次いで、前記RNAからスーパーSCRIPT^R(I II第一鎖(First-Strand)合成システム(インビトロジェン社製)を用いてcDNAを合成した。下記のプライマーを用いて2720サーマルサイクラー(アプライドバイオシステムズ社製、フォスターシティ、カリフォルニア州)においてRT-PCRを行った。RT-PCRは94 で30秒、56 で30秒及び72 で1分間35サイクルで行った。

【0064】

(1) VEGFR-2

F: 5' - TGATCGGAAATGACACTGGA - 3' (配列番号35)

R: 5' - TGCTTCACAGAAGACCATGTC - 3' (配列番号36)

(2) グレムリン-1

F: 5' - AACAGTCGCACCATCATCAA - 3' (配列番号37)

R: 5' - AATTTCTTGGGCTTGCAGAA - 3' (配列番号38)

(3) GAPDH

F: 5' - AGGTGAAGGTTCGGAGTCAACG - 3' (配列番号39)

R: 5' - AGGGGTCATTGATGGCAACA - 3' (配列番号40)

【0065】

前記RT-PCR結果を図2Bに示す。図2Bに示すように、HUV EC細胞にはVEGFR2が存在するが、A549及びHeLa細胞からはVEGFR2が検出されなかった。実施例3において、グレムリン-1が癌細胞と相互作用したにも関わらず、VEGFR2 mRNAが検出されなかったということは、グレムリン-1と癌細胞との相互作用がVEGFR2によって媒介されないということを示す。

【0066】

<4-3> 免疫プロット分析

HUV EC、A549細胞及びHeLa細胞をプロテアーゼ抑制剤カクテル(シグマアルドリッチ社製、セントルイス、ミズーリ州)を含有する冷たい溶解緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% Triton-X100、0.1% SDS、1 mM PMSF]に溶解させた後、文献[Lee MS et al., (2008) Hybridoma (Larchmt) 27: 18-24]に記載の過程に従いウェスタンプロットを行った。このとき、一次抗体としてVEGFR-2(1:1,000希釈;セル・シグナリング・テクノロジー社製、ダンバース、マサチューセッツ州)及び-アクチン(1:10,000希釈;アプライドバイオロジカルマテリアルズ社製、リッチモンド、ブリティッシュコロンビア州)抗体を使用し、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の結合された抗マウスIgG(1:1,000希釈;ピラス・ケミカル社製、ロックフォード、イリノイ州)またはHRPの結合された抗ウサギIgG(1:1,000希釈;ピラス・ケミカル社製)を使用した。プロットを増強された化学発光システム(ピラス社製)を用いてメーカーのガイドラインに従い視覚化させた。

前記免疫プロット分析実験結果を図2Cに示す。図2Cに示すように、HUV ECとは異なり、A549及びHeLa細胞はVEGFR2を発現しなかった。前記結果もまた、グレムリン-1と癌細胞との相互作用がVEGFR2によって媒介されないということを示す。

10

20

30

40

50

【0067】

実施例5：グレムリン-1と癌細胞との相互作用に対するBMPの影響

グレムリン-1は、BMP-2、BMP-4及びBMP-7に特異的に結合してこれらの活性を抑制するBMP拮抗剤である。BMPは多くの組織の形態の形成及び恒常性において重要な役割を果たすと知られている多機能性成長因子である。また、BMP-2、BMP-4及びBMP-7は乳房癌及び前立腺癌をはじめとする様々な癌において頻りに過発現される(Singh A et al., (2010) Cytokine Growth Factor Rev 21: 299-313; Chen D et al., (2004) Growth Factors 22: 233-241; Bobinac D et al., (2005) Croat Med J 46: 389-396)。BMP-4はBCC細胞の増殖を減少させ、グレムリン-1の添加はBMP-4の抗増殖効果を間接的に減少させることが報告されている(Sneddon JB et al., (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103: 14842-14847)。このため、BMPがグレムリン-1と癌細胞との相互作用に影響を及ぼすか否かを調べてみた。

【0068】

<5-1> 酵素免疫分析

まず、グレムリン-1がBMPと結合するか否かを調べるために、下記のようにして酵素免疫分析を行った。具体的に、マイクロタイタープレート(コーニング・コスター社製、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)を100nMのBMP-2、BMP-4またはBMP-7(R&Dシステム社製)でコーティングし、PBS中の1%(w/v)脱脂油でブロッキングした。次いで、各ウェルにグレムリン-1-Fc(10nM)単独及びグレムリン-1-Fc(10nM)と500nMの本発明による抗体(O-13)との組み合わせを添加した。洗浄後に、プレートをHRPの結合されたIgG-Fcに特異的な抗体(1:5,000希釈;ピアス・ケミカル社製)とともに培養した。次いで、文献[Chung J et al., (2004) FASEB J 18: 361-363]に従い、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸;ABTS)基質溶液(アムレスコ社製、ソロン、オハイオ州)を用いて発色反応(coloring reaction)させ、405nmにおける吸光度を測定した。前記結果を図3Aに示す。図3Aに示すように、グレムリン-1はBMP-7を除くBMP-2及びBMP-4と相互作用することが分かり、本発明による抗体(O-13)はグレムリン-1とBMP-2またはBMP-4との相互作用にいかなる影響も及ぼさなかった。

【0069】

<5-2> フローサイトメトリー

A549細胞とグレムリン-1を反応させ、ここに10倍モル過量のBMP-2、BMP-4及びBMP-7を加えた後、実施例3の方法と同様にしてフローサイトメトリーを行った。前記結果を図3Bに示す。図3Bに示すように、BMPの存在はグレムリン-1のA549細胞との相互作用に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、グレムリン-1にA549細胞とBMPとの相互作用を媒介する2つの別途のモチーフが存在することを示唆する。

【0070】

実施例6：グレムリン-1及びこの抗体が癌細胞の分散及び移動に及ぼす効果の分析

<6-1> 細胞分散の分析

グレムリン-1処理時における癌細胞の形状を調べるために、A549細胞をクリスタルバイオレット染色法により分析した。具体的に、A549細胞を24ウェルプレート(1.0×10⁴細胞/ウェル)に塗抹し、100nMのヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1で3日間処理した。培地を除去し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した後、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで10分間固定させた。細胞を蒸留水中の0.05%クリスタルバイオレットで30分間染色した。文献[Li XL et al., (2009) Cancer Chemother

10

20

30

40

50

Pharmacol 64: 1097-1104]に開示された方法に従い染色溶液を除去し、細胞をPBSで3回洗浄した。ライカDFL290カメラ(ライカマイクロシステムズ社製、ヴェッツラー、ドイツ)を用いてイメージを得、これをライカ・アプリケーション・スイート・ソフトウェア(ライカマイクロシステムズ社製)を用いて分析した。

前記撮影されたイメージを図4Aに示す。図4Aに示すように、グレムリン-1で処理されたA549細胞はその形状が繊維芽細胞とほとんど同様であり、細胞が分散されたことが分かる。

【0071】

<6-2> E-カドヘリン発現変化の分析

E-カドヘリン(E-cadherin)の下向き調節は上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)と関連があり、癌が進行したときにE-カドヘリン及び上皮間葉移行(EMT)の抑制が共通して観察される(Perl AK et al., (1998) Nature 392: 190-193)。このため、免疫プロット分析法及び免疫蛍光染色によりグレムリン-1処理によるE-カドヘリンの発現の変化を調べてみた。

免疫プロット分析の場合、A549細胞(1.0×10^5 細胞/ウェル)を60mmのディッシュの上に塗抹し、50%コンフルエンスまで成長させた。前記細胞を100nMのヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1で3日間処理した。前記細胞をプロテアーゼ抑制剤カクテル(シグマアルドリッチ社製、セントルイス、ミズーリ州)を含有する冷たい溶解緩衝液[50mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton-X100、0.1% SDS、1mM PMSF]に溶解させた後、文献[Lee MS et al., (2008) Hybridoma (Larchmt) 27: 18-24]に記載の過程に従いウェスタンプロットを行った。このとき、一次抗体としてE-カドヘリン(1:1,000希釈; アブカム社製)及び α -アクチン(1:10,000希釈; アブライドバイオロジカルマテリアルズ社製、リッチモンド、プリティッシュコロンビア州)抗体を使用し、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase, HRP)の結合された抗マウスIgG(1:1,000希釈; ピアス・ケミカル社製、ロックフォード、イリノイ州)またはHRPの結合された抗ウサギIgG(1:1,000希釈; ピアス・ケミカル社製)を使用した。前記プロットを増強された化学発光システム(ピアス社製)を用いてメーカーのガイドラインに従い視覚化させた。

【0072】

前記結果を図4Bに示す。図4Bに示すように、グレムリン-1で処理されたA549細胞においてE-カドヘリン(E-cadherin)の発現が大幅に減少した。

また、免疫蛍光染色の場合、A549細胞(1.0×10^5 細胞/ウェル)をポリL-リシン(100 μ g/ml、シグマ社製)によりコーティングされたガラスカバースリットの上に塗抹し、50%コンフルエンスまで成長させた。細胞を100nMのヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1で3日間処理し、PBSで洗浄した後、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで常温下で30分間固定させた。固定された細胞をPBS中の0.2%トリトンX-100(ツイーン添加リン酸緩衝生理食塩水(PBST))で常温下で10分間透過させた後、PBST中の1%ゼラチンで常温下でブロッキングした。E-カドヘリン抗体(アブカム社製)後にアレクサ(Alexa)488の結合された二次抗体(インビトロジェン社製)を用いて免疫蛍光染色を行った。核は4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)(rhodamine-phalloidin 1:1,000希釈; インビトロジェン社製)で染色し、アクチンフィラメントはローダミン・ファロイジン(1:1,000希釈; インビトロジェン社製)を用いて染色した。カバースリットを退色防止剤(anti-fading agent)を有する水溶性マウンティング培地(aqueous mounting medium)を用いてガラススリットの上に載せた。次いで、LSM5PASCALレーザースキャニング顕微鏡(カール・ツァイス社製、ドイツ)を用いてイメージを

10

20

30

40

50

得、これをLSM 5 PASCALソフトウェアを用いて分析した。

前記結果を図4Cに示す。図4Cに示すように、グレムリン-1で処理されたA549細胞においてE-カドヘリン(E-cadherin)の発現が大幅に減少された。

【0073】

< 6 - 3 > 細胞移動の分析

細胞の移動有無を確認するために、下記のようにして細胞移動分析を行った。具体的に、細胞を1ウェル当たり1.0×10⁵細胞の密度で24ウェルプレートに塗抹した。ピペットチップでスクラッチして傷を付けた。脱着された細胞を除去するために培地で洗浄した後、前記培養物に100nMのヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1を24時間添加した。直後に、且つ、24時間後にライカDFL290カメラ(ライカマイクロシステムズ社製)を用いてイメージを分析した。スクラッチにより形成された面積を通じて細胞が移動した距離を24時間目に傷付幅を測定し、開始時点の傷付幅からこれを差し引くことにより決定した。次いで、前記得られた値を従来の技術に従い未処理の細胞の移動距離を100%に設定して%移動で表した。

本発明による抗体(O-13)の中和効能を決定するために、傷付いた細胞をヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1単独または10μMの本発明による抗体(O-13)(または、10μMの対照群抗体)とともに24時間培養した。上述したようにして距離を決定した。

同じプロトコルを用いて、Mockの形質感染されたA549細胞及びグレムリン-1で形質感染されたA549細胞を塗抹し、傷を付けた。Mock-A549細胞はいかなる処理なしに培養したのに対し、グレムリン-1-A549細胞は10μMの本発明による抗体(O-13)または対照群抗体の存在下で24時間培養した。上述したようにして距離を決定した。結果は、3回の独立した実験の代表値である。

前記測定結果を図4Dに示す。図4Dに示すように、グレムリン-1で処理した場合、A549細胞の移動が大幅に増大され、これは、中和抗体を添加したときに完全に消失した。

これらの結果は、グレムリン-1が癌細胞の分散及び移動を誘導し、これをグレムリン-1抗体を用いて抑制することができることを示す。

【0074】

実施例7：グレムリン-1で形質感染されたA6549細胞の特性の究明

< 7 - 1 > グレムリン-1 mRNA及びタンパク質発現量の測定

実施例< 1 - 2 >において製造された「グレムリン-1-A549」細胞株及び「mock-A549」細胞株に対して、グレムリン-1転写体及びタンパク質の数値変化を上述した逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)及びウェスタンブロットによって確認した。

前記実験結果を図5Aに示す。図5Aに示すように、mock-A549細胞株においてはグレムリン-1 mRNA及びタンパク質が発現されなかったのに対し、グレムリン-1-A549細胞株においてはその数値が急増した。

【0075】

< 7 - 2 > E-カドヘリン発現量の測定

また、下記のように免疫プロット分析方法に従い、E-カドヘリンの発現量を測定した。具体的に、グレムリン-1-A549細胞及びMock-A549細胞(1.0×10⁵細胞/ウェル)を60mmディッシュの上に塗抹して50%コンフルエンスまで成長させた。Mock-A549細胞を処理なしに培養し、グレムリン-1-A549細胞を10μMの本発明による抗体(O-13)または対照群抗体(パリーブズマブ(Palivizumab)、シナジス、アボット・ラボラトリーズ製、アボットパーク、イリノイ州)の存在下で24時間培養した。細胞を溶解させ、実施例6に記載の免疫プロット分析方法に従い分析した。

前記結果を図5Bに示す。図5Bに示すように、E-カドヘリン発現はMock-A549細胞と比較してグレムリン-1-A549細胞において減少し、中和抗体を添加した場合

10

20

30

40

50

に僅かに増加した。

【0076】

< 7 - 3 > 細胞浸潤の分析

細胞外マトリックス (extra-cellular matrix: ECM) によりコーティングされた内側チャンパー (ケミコン社製、テメキュラ、カリフォルニア州) を用いてメーカーのガイドラインに従い細胞浸潤分析を行った。Mock-A 549 細胞及びグレムリン-1-A 549 細胞 (3.0×10^5 細胞/ウェル) を $300 \mu\text{L}$ の無血清培地に懸濁させた。プレートの底面ウェルに 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含有する完全培地 ($500 \mu\text{L}$) を添加した。細胞を 48 時間培養した。非移動細胞を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。膜を PBS 中の 4% パラホルムアルデヒドで固定させ、クリスタルバイオレット染色溶液 (ケミコン社製) で染色した。ライカ DFL 290 カメラ (ライカマイクロシステムズ社製) を用いてイメージを得、これをライカ・アプリケーション・スイート・ソフトウェアを用いて分析した。移動された細胞を 1 ウェル当たり 4 個の別途のフィールドにおいて計数した。次いで、得られた値を Mock-A 549 細胞の細胞数を 100% に設定して % 浸潤で表した。

10

前記結果を図 5 C に示す。図 5 C に示すように、Mock-A 549 細胞と比較してグレムリン-1-A 549 が遙かに多量移動した。

【0077】

< 7 - 4 > 細胞移動の分析

実施例 6 に記載の方法に従い細胞移動分析を行った。Mock-A 549 細胞及びグレムリン-1-A 549 細胞を塗抹し、傷を付けた。Mock-A 549 細胞は何の処理なしに培養し、グレムリン-1-A 549 細胞は $10 \mu\text{M}$ の本発明による抗体 (O-13) または対照群抗体の存在下で 24 時間培養した。次いで、上述したようにして距離を決定した。

20

前記測定結果を図 5 D に示す。前記図 5 D に示すように、グレムリン-1-A 549 細胞は Mock-A 549 細胞と比較して増加された移動を示し、このような増加された移動は本発明による抗体 (O-13) を添加したときに大幅に抑制された。

【0078】

< 7 - 5 > 細胞増殖の分析

グレムリン-1 が細胞成長に影響を及ぼすか否かを確認するために、細胞増殖の分析を行った。前記分析は、セルタイター 96 アクオス・ワン・ソリューション・セル・プロリフェレーション・アッセイ (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) (プロメガ社製、マディソン、ウィスコンシン州) を用いて 10% FBS 入り RPMI-1640 培地において 96 ウェルプレートで行った。具体的に、Mock-A 549 細胞及びグレムリン-1-A 549 細胞を 1 ウェル当たり 1,000 の細胞密度で塗抹した。24 時間後に細胞を無血清培地で 2 回洗浄し、 $3 \mu\text{M}$ の本発明による抗体 (O-13) が含有するかあるいは含有していない完全培地 $100 \mu\text{L}$ で培養した。細胞増殖を 492 nm のフィルターを有する 96 ウェルプレートに対してラブシステムズ・マルチスキャン・アセント・フォトメトリック・プレート・リーダー (Lab systems Multiskan Ascent Photometric plate reader) (サーモ・ラブシステムズ社製、フランクリン、マサチューセッツ州) を用いて決定した。実験は 3 回繰り返し行った。

30

40

前記測定結果を図 5 E に示す。前記図 5 E に示すように、グレムリン-1-A 549 細胞は Mock-A 549 細胞と比較してさらに高い成長速度を示し、前記増大された成長速度は本発明による抗体 (O-13) の添加によって抑制された。

【0079】

< 7 - 6 > 腫瘍成長の分析

腫瘍形成に対するグレムリン-1 の効果を評価するために、下記のようにしてグレムリン-1-A 549 細胞または Mock-A 549 細胞をヌードマウス内に皮下注射した後、腫瘍体積を測定した。

全ての動物実験は実験動物資源ソウル大学協会及び使用委員会 (Permit num

50

ber : SNU - 11 - 0207) の承認を受けた。グレムリン - 1 - A549 細胞及び Mock-A549 細胞 (1.0×10^6 細胞/マウス) を 4 ~ 6 週齢の雌無胸腺ヌードマウス (各処理群当たり 7 匹) の右側わき腹に皮下注射した。腫瘍の形成及び大きさを腫瘍の長さ及び幅をノギスで測定して毎週評価した後、下記式を用いて腫瘍の体積を計算した (Tomayko MM et al., (1989) Cancer Chemother Pharmacol 24: 148 - 154) :

$$\text{腫瘍の体積} = (\text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}) / 2$$

前記測定結果を図 5 F に示す。グレムリン - 1 - A549 細胞を注射したマウスにおける腫瘍の体積は、Mock-A549 細胞を注射したマウスよりも急増し、注射してから 14 週目に略 500 mm^3 の腫瘍サイズ差を示す。この結果は、グレムリン - 1 の発現増加が腫瘍の形成に重要な役割を果たすということを示す。

10

【0080】

実施例 8 : グレムリン - 1 抗体を用いた癌の診断

免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (皮膚、乳房、リンパ節、肺、肝、食道、胃、結腸、直腸、腎臓、膀胱、前立腺、睾丸、子宮頸、子宮内膜及び甲状腺癌組織) を本発明による抗体 (O-13) と反応させてグレムリン - 1 の発現量を比較した。

具体的に、本発明による抗体 (O-13) (2 mg/ml) 0.5 ml を FITC 試薬と混合してメーカーのガイドラインに従い抗体を FITC でラベリングした (Pierce FITC antibody labeling kit, 53027)。正常組織及び癌組織を固定させた組織配列スライド (Tissue array slide; スーパーバイオチップ社製、BC8) に対してメーカーのガイドラインに従いパラフィン除去作業を行った。前記スライドを抗原賦活液 (antigen retrieval solution; TEPH9.0) 入りガラスジャー (glass jar) に入れた後、プレッシャークッカー (pressure cooker) で 30 分間加熱した。スライドを取り出して $60 \sim 65$ に冷却させ、蒸留水で洗浄し、冷たい 95% エタノールに 10 分間浸漬した後、流水で 10 分間洗浄した。次いで、メーカーのガイドラインに従い、サーモ・ウルトラビ 液 ジョン・LP・デテクション・システム (Thermo Ultra-vision LP detection system (サーモ社製) を用いて組織スライドに前記 FITC によりラベリングされた抗体を反応させた。前記抗体は 1 : 75 で使用し、抗 FITC マウス IgG (ライフスパン (LS)・バイオサイエンス社製) は 1 : 200 で使用した。次いで、HRP の結合された重合体 (ラブビジョン社製) を 15 分間処理した後、DAB 溶液を 1 分間処理した。マイヤ - ヘマトキシリン液 (Mayer's hematoxylin solution) で反対染色した後、顕微鏡で 4 倍率、200 倍率及び 400 倍率の順に観察した。前記実験を行うに当たって、IgG kappa 抗体を対照群として使用した。

20

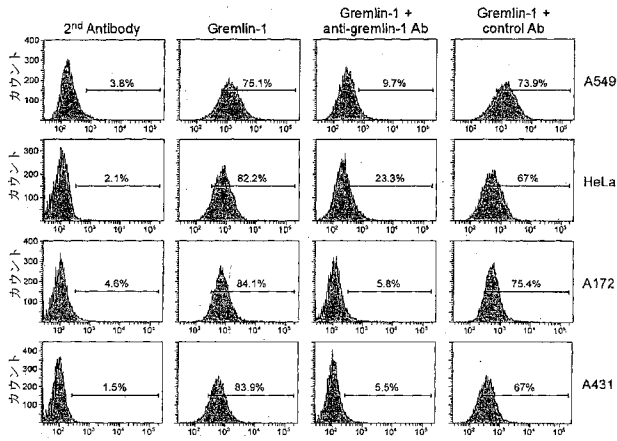
30

【0081】

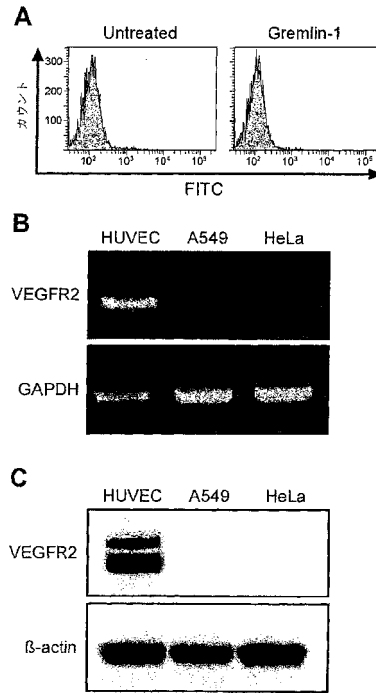
前記実験結果を図 6 A ~ 6 I に示す。前記図 6 に示すように、本発明による抗体は、正常組織と比較して皮膚、乳房、リンパ節、肺、肝、食道、胃、結腸、直腸、腎臓、膀胱、前立腺、睾丸、子宮頸、子宮内膜及び甲状腺癌組織において強い反応性を示す。これは、様々な癌組織においてグレムリン - 1 が分布されており、過発現されることを示す。したがって、本発明によるグレムリン - 1 に対する抗体を用いて癌または免疫疾患を診断することが可能になる見込みである。

40

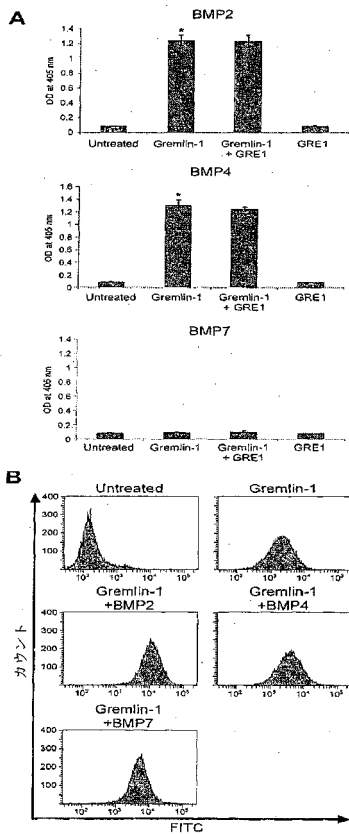
【 図 1 】



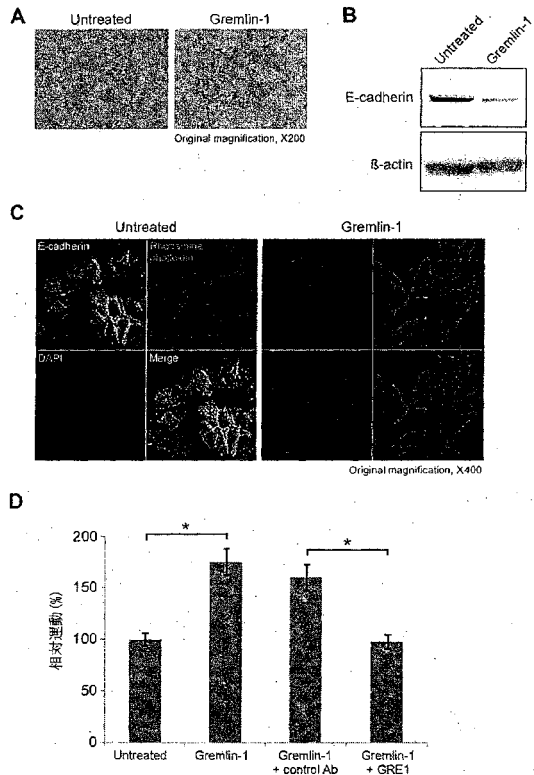
【 図 2 】



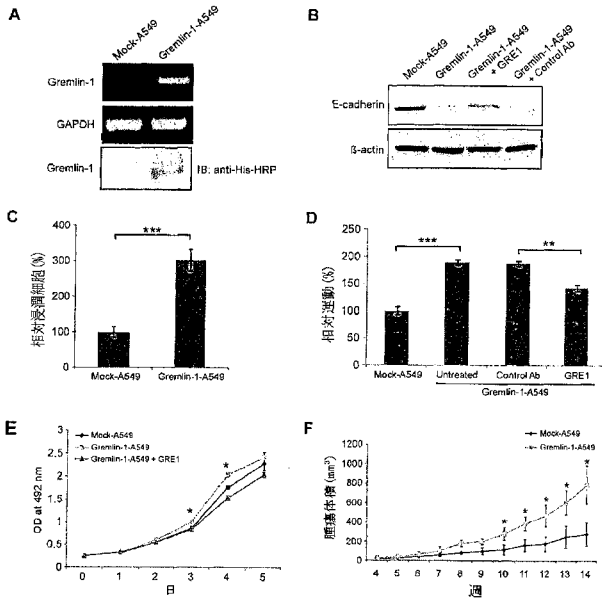
【 図 3 】



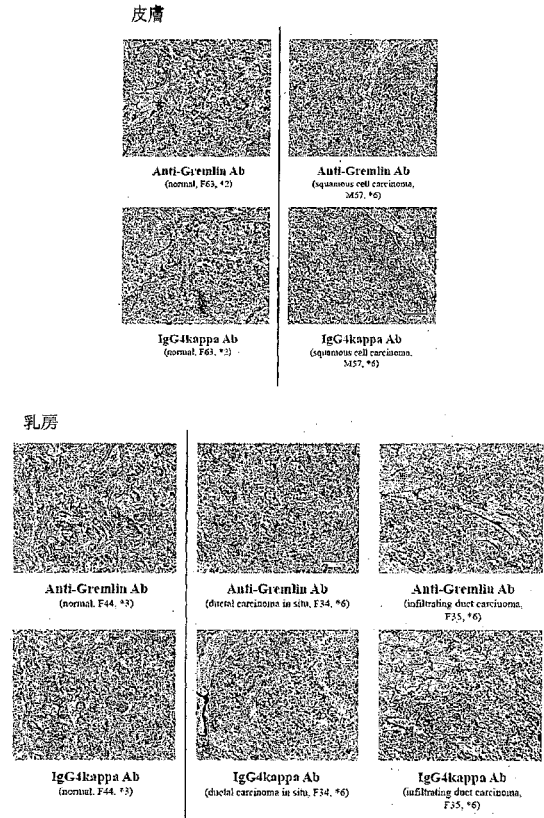
【 図 4 】



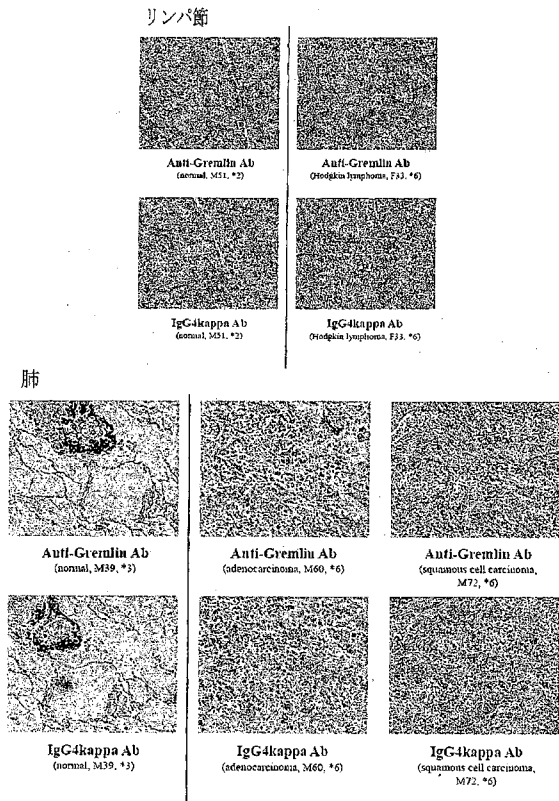
【 図 5 】



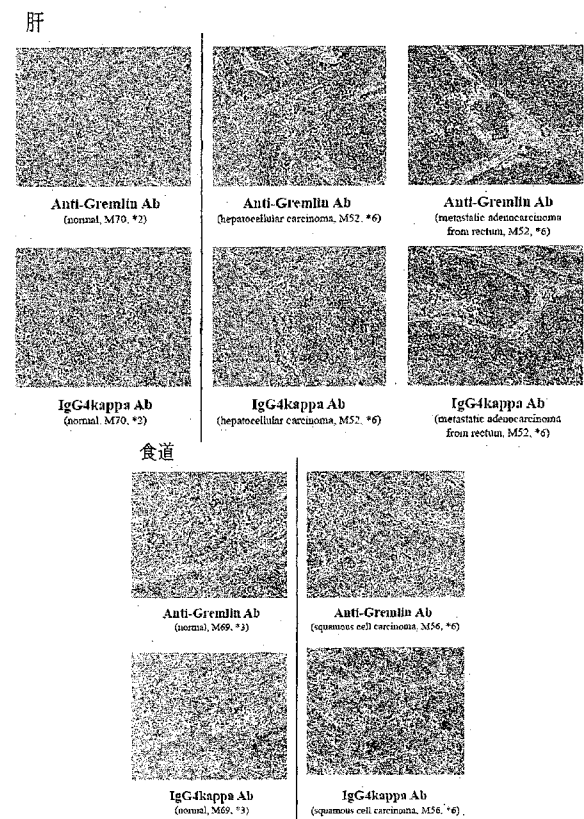
【 図 6 A 】



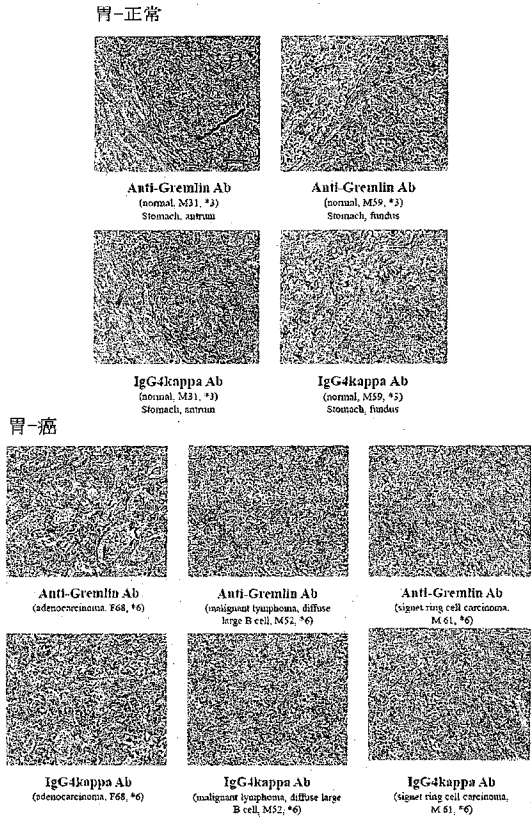
【 図 6 B 】



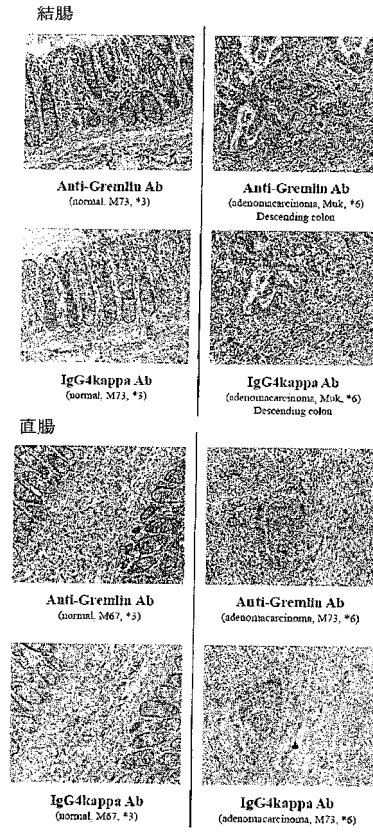
【 図 6 C 】



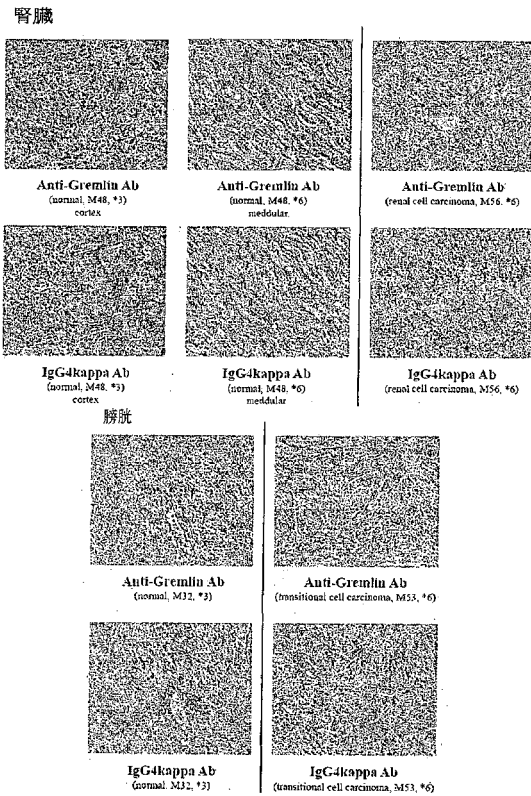
【 図 6 D 】



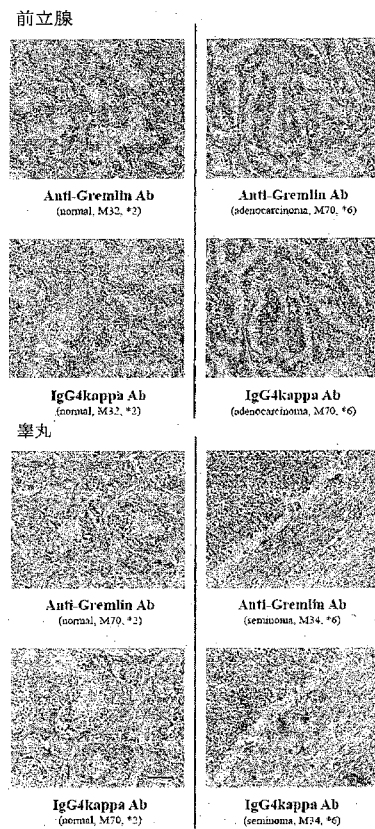
【 図 6 E 】



【 図 6 F 】

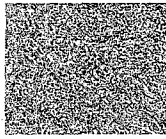


【 図 6 G 】

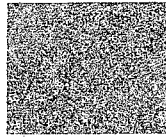


【 図 6 H 】

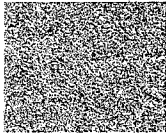
子宮頸



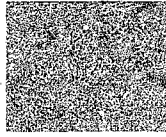
Anti-Gremlin Ab
(normal, F42, *3)



Anti-Gremlin Ab
(squamous cell carcinoma, F64, *6)

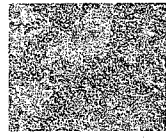


IgG4kappa Ab
(normal, F42, *3)



IgG4kappa Ab
(squamous cell carcinoma, F64, *6)

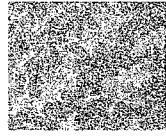
子宮内膜



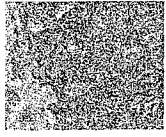
Anti-Gremlin Ab
(normal, F39, *1)



Anti-Gremlin Ab
(adenocarcinoma, F69, *6)



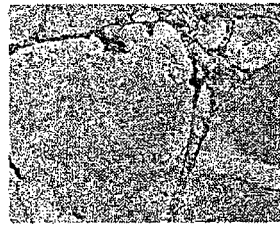
IgG4kappa Ab
(normal, F39, *1)



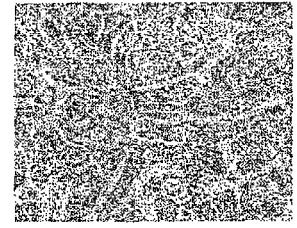
IgG4kappa Ab
(adenocarcinoma, F69, *6)

【 図 6 I 】

甲状腺



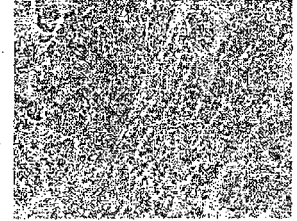
Anti-Gremlin Ab
(normal, M39, *3)



Anti-Gremlin Ab
(papillary carcinoma, F69, *6)



IgG4kappa Ab
(normal, M39, *3)



IgG4kappa Ab
(papillary carcinoma, F69, *6)

【 配 列 表 】


2015512894000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/002119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
<i>C07K 16/18(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</i>				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/18; A61K 31/7105; C07H 21/02; C40B 40/06; A61K 39/00; C07K 18/00; A61K 39/395; G01N 33/53; A61P 35/00				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: gremlin-1, antibody, bone morphogenic protein, vascular endothelial cell growth factor receptor-2, BMP, VEGFR2, cancer, immune disorder				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	US 7744873 B2 (CLARK, Abbot F. et al.) 29 June 2010 See abstract and claim 1.	1		
A		2-11,16		
Y	US 2008-0051361 A1 (CHATTERTON, Jon E. et al.) 28 February 2008 See abstract and claims 1-15.	1		
A	US 2011-0319297 A1 (KHVOROVA, Anastasia et al.) 29 December 2011 See abstract.	1-11,16		
A	PEREIRA, Renata C. et al., "Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts", <i>Endocrinology</i> , December 2000, vol. 141, no. 12, pages 4558-63. See abstract.	1-11,16		
PX	KIM, Min Soo et al., "Gremlin-1 Induces BMP-Independent Tumor Cell Proliferation, Migration, and Invasion", <i>PLoS ONE</i> , 13 April 2012, vol. 7, no. 4, page e35100. See the entire document.	1-11,16		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 25 JUNE 2013 (25.06.2013)		Date of mailing of the international search report 25 JUNE 2013 (25.06.2013)		
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/002119**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **12-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12-15 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2) (a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/002119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
US 7744873 B2	29.06.2010	AU 2002-364946 A1	15.07.2003		
		AU 2002-364946 B2	27.09.2007		
		CA 2463143 A1	10.07.2003		
		CN 1685055 A	19.10.2005		
		CN 1966725 A	23.05.2007		
		EP 1440159 A2	28.07.2004		
		EP 1440159 B1	27.12.2006		
		EP 1738767 A1	03.01.2007		
		EP 1777519 A1	25.04.2007		
		EP 2053135 A1	29.04.2009		
		JP 2005-518788 A	30.06.2005		
		JP 2008-301834 A	18.12.2008		
		KR 10-0996226 B1	24.11.2010		
		KR 10-1072867 B1	17.10.2011		
		KR 10-2010-0013352 A	09.02.2010		
		KR 10-2011-0032003 A	29.03.2011		
		US 2003-0134308 A1	17.07.2003		
		US 2008-0194515 A1	14.08.2008		
		US 2010-0204086 A1	12.08.2010		
		US 2012-059049 A1	08.03.2012		
		US 7405192 B2	29.07.2008		
		US 8063013 B2	22.11.2011		
		WO 03-055443 A2	10.07.2003		
		WO 03-055443 A3	25.03.2004		
		US 2008-0051361 A1	28.02.2008	AU 2007-286545 A1	28.02.2008
				CA 2659464 A1	28.02.2008
				CN 101517081 A	26.08.2009
				CN 102743767 A	24.10.2012
				EP 2059597 A2	20.05.2009
JP 2010-501188 A	21.01.2010				
KR 10-2009-0042297 A	29.04.2009				
MX 2009001896 A	17.04.2009				
US 2010-0305193 A1	02.12.2010				
US 2012-0077864 A1	29.03.2012				
WO 2008-024983 A2	28.02.2008				
WO 2008-024983 A3	09.10.2008				
ZA 200900553 A	28.04.2010				
US 2011-0319297 A1	29.12.2011	US 2007-128640 A1	07.06.2007		
		US 2007-128641 A1	07.06.2007		
		US 2007-134697 A1	14.06.2007		
		US 2007-134698 A1	14.06.2007		
		US 2007-141602 A1	21.06.2007		
		US 2007-179286 A1	02.08.2007		
		US 2007-185317 A1	09.08.2007		
		US 2007-185318 A1	09.08.2007		
		US 2007-185319 A1	09.08.2007		
		US 2007-185320 A1	09.08.2007		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/002119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2007-213520 A1	13.09.2007
		US 2007-213521 A1	13.09.2007
		US 2007-219362 A1	20.09.2007
		US 2007-225486 A1	27.09.2007
		US 2007-232797 A1	04.10.2007
		US 2007-238868 A1	11.10.2007
		US 2007-244312 A1	18.10.2007
		US 2007-249819 A1	25.10.2007
		US 2007-255046 A1	01.11.2007
		US 2007-255047 A1	01.11.2007
		US 2007-255048 A1	01.11.2007
		US 2007-255049 A1	01.11.2007
		US 2007-255050 A1	01.11.2007
		US 2007-255051 A1	01.11.2007
		US 2007-255052 A1	01.11.2007
		US 2007-260047 A1	08.11.2007
		US 2007-260048 A1	08.11.2007
		US 2007-260049 A1	08.11.2007
		US 2007-260050 A1	08.11.2007
		US 2007-260051 A1	08.11.2007
		US 2007-260052 A1	08.11.2007
		US 2007-265437 A1	15.11.2007
		US 2007-265438 A1	15.11.2007
		US 2007-276135 A1	29.11.2007
		US 2007-276136 A1	29.11.2007
		US 2007-287833 A1	13.12.2007
		US 2007-293664 A1	20.12.2007
		US 2007-299253 A1	27.12.2007
		US 2008-015114 A1	17.01.2008
		US 2008-027215 A1	31.01.2008
		US 2008-027216 A1	31.01.2008
		US 2008-039617 A1	14.02.2008
		US 2008-045703 A1	21.02.2008
		US 2008-064865 A1	13.03.2008
		US 2008-071073 A1	20.03.2008
		US 2008-071075 A1	20.03.2008
		US 2008-076908 A1	27.03.2008
		US 2008-081904 A1	03.04.2008
		US 2008-085997 A1	10.04.2008
		US 2008-085998 A1	10.04.2008
		US 2008-086001 A1	10.04.2008
		US 2008-086002 A1	10.04.2008
		US 2008-090997 A1	17.04.2008
		US 2008-097089 A1	24.04.2008
		US 2008-097091 A1	24.04.2008
		US 2008-097092 A1	24.04.2008
		US 2008-113369 A1	15.05.2008
		US 2008-113370 A1	15.05.2008
		US 2008-113371 A1	15.05.2008
		US 2008-113372 A1	15.05.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/002119


Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2008-113373 A1	15.05.2008
		US 2008-113374 A1	15.05.2008
		US 2008-113375 A1	15.05.2008
		US 2008-113376 A1	15.05.2008
		US 2008-113377 A1	15.05.2008
		US 2008-113378 A1	15.05.2008
		US 2008-132691 A1	05.06.2008
		US 2008-139799 A1	12.06.2008
		US 2009-156797 A1	18.06.2009
		US 2009-191625 A1	30.07.2009
		US 2009-253776 A1	08.10.2009
		US 2009-325818 A1	31.12.2009
		US 2010-004141 A1	07.01.2010
		US 2010-010206 A1	14.01.2010
		US 2010-016176 A1	21.01.2010
		US 2010-022413 A1	28.01.2010
		US 2010-022763 A1	28.01.2010
		US 2010-062951 A1	11.03.2010
		US 2010-069261 A1	18.03.2010
		US 2010-069622 A1	18.03.2010
		US 2010-087334 A1	08.04.2010
		US 2010-099578 A1	22.04.2010
		US 2010-113306 A1	06.05.2010
		US 2010-113760 A1	06.05.2010
		US 2010-113761 A1	06.05.2010
		US 2010-144552 A1	10.06.2010
		US 2010-190971 A1	29.07.2010
		US 2010-234582 A1	16.09.2010
		US 2010-234583 A1	16.09.2010
		US 2010-240554 A1	23.09.2010
		US 2010-267587 A1	21.10.2010
		US 2010-279896 A1	04.11.2010
		US 2011-003713 A1	06.01.2011
		US 2011-003714 A1	06.01.2011
		US 2011-021382 A1	27.01.2011
		US 2011-034349 A1	10.02.2011
		US 2011-039734 A1	17.02.2011
		US 2011-077173 A1	31.03.2011
		US 2011-281769 A1	17.11.2011
		US 2011-319296 A1	29.12.2011
		US 2012-010106 A1	12.01.2012
		US 2012-015850 A1	19.01.2012
		US 2012-065250 A1	15.03.2012
		US 7521191 B2	21.04.2009
		US 7541453 B2	02.06.2009
		US 7550572 B2	23.06.2009
		US 7569684 B2	04.08.2009
		US 7579458 B2	25.08.2009
		US 7582746 B2	01.09.2009
		US 7589191 B2	15.09.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/002119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 7592443 B2	22.09.2009
		US 7595388 B2	29.09.2009
		US 7598369 B2	06.10.2009
		US 7598370 B2	06.10.2009
		US 7605252 B2	20.10.2009
		US 7608706 B2	27.10.2009
		US 7615541 B2	10.11.2009
		US 7632938 B2	15.12.2009
		US 7632939 B2	15.12.2009
		US 7635771 B2	22.12.2009
		US 7638621 B2	29.12.2009
		US 7638622 B2	29.12.2009
		US 7645870 B2	12.01.2010
		US 7655789 B2	02.02.2010
		US 7662950 B2	16.02.2010
		US 7666853 B2	23.02.2010
		US 7678896 B2	16.03.2010
		US 7709629 B2	04.05.2010
		US 7737267 B2	15.06.2010
		US 7741470 B2	22.06.2010
		US 7745610 B2	29.06.2010
		US 7745612 B2	29.06.2010
		US 7795421 B2	14.09.2010
		US 7807820 B2	05.10.2010
		US 7816512 B2	19.10.2010
		US 7829696 B2	09.11.2010
		US 7833989 B2	16.11.2010
		US 7855186 B2	21.12.2010
		US 7897754 B2	01.03.2011
		US 7935813 B2	03.05.2011
		US 7999097 B2	16.08.2011
		US 8022198 B2	20.09.2011
		US 8022199 B2	20.09.2011
		US 8030476 B2	04.10.2011
		US 8039610 B2	18.10.2011
		US 8067576 B2	29.11.2011
		US 8071754 B2	06.12.2011
		US 8138329 B2	20.03.2012
		WO 2006-006948 A2	15.11.2007
		WO 2006-006948 A3	19.01.2006

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2013/002119
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))		
C07K 16/18(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류용 기제) C07K 16/18; A61K 31/7105; C07H 21/02; C40B 40/06; A61K 39/00; C07K 18/00; A61K 39/395; G01N 33/53; A61P 35/00		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 그렐린-1, 항체, 골형성 단백질, 혈관내피성장인자 수용체-2, BMP, VEGFR2, 암, 면역질환		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 7744873 B2 (CLARK, ABBOT F. et al.) 2010.06.29. 요약 및 청구항 1 참조.	1
A		2-11,16
Y	US 2008-0051361 A1 (CHATTERTON, JON E. et al.) 2008.02.28. 요약 및 청구항 1-15 참조.	1
A	US 2011-0319297 A1 (KHOVROVA, ANASTASIA et al.) 2011.12.29. 요약 참조.	1-11,16
A	PEREIRA, RENATA C. 외 2명, 'Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts', Endocrinology, 2000.12., 141권, 12호, 4558-63페이지. 요약 참조.	1-11,16
PX	KIM, MINSOO 외 6명, 'Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion', PLoS ONE, 2012.04.13., 7권, 4호, e35100 페이지. 문서 전체 참조.	1-11,16
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 06월 25일 (25.06.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 06월 25일 (25.06.2013)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 정사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 82-42-481-8150	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/002119

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 12-15
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제12항 내지 제15항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 중속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재
- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
 - 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
 - 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/002119

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7744873 B2	2010.06.29	AU 2002-364946 A1	2003.07.15
		AU 2002-364946 B2	2007.09.27
		CA 2463143 A1	2003.07.10
		CN 1685055 A	2005.10.19
		CN 1966725 A	2007.05.23
		EP 1440159 A2	2004.07.28
		EP 1440159 B1	2006.12.27
		EP 1738767 A1	2007.01.03
		EP 1777519 A1	2007.04.25
		EP 2053135 A1	2009.04.29
		JP 2005-518788 A	2005.06.30
		JP 2008-301834 A	2008.12.18
		KR 10-0996226 B1	2010.11.24
		KR 10-1072867 B1	2011.10.17
		KR 10-2010-0013352 A	2010.02.09
		KR 10-2011-0032003 A	2011.03.29
		US 2003-0134308 A1	2003.07.17
		US 2008-0194515 A1	2008.08.14
		US 2010-0204086 A1	2010.08.12
		US 2012-059049 A1	2012.03.08
		US 7405192 B2	2008.07.29
		US 8063013 B2	2011.11.22
		WO 03-055443 A2	2003.07.10
WO 03-055443 A3	2004.03.25		
US 2008-0051361 A1	2008.02.28	AU 2007-286545 A1	2008.02.28
		CA 2659464 A1	2008.02.28
		CN 101517081 A	2009.08.26
		CN 102743767 A	2012.10.24
		EP 2059597 A2	2009.05.20
		JP 2010-501188 A	2010.01.21
		KR 10-2009-0042297 A	2009.04.29
		MX 2009001896 A	2009.04.17
		US 2010-0305193 A1	2010.12.02
		US 2012-0077864 A1	2012.03.29
		WO 2008-024983 A2	2008.02.28
		WO 2008-024983 A3	2008.10.09
		ZA 200900553 A	2010.04.28
US 2011-0319297 A1	2011.12.29	US 2007-128640 A1	2007.06.07
		US 2007-128641 A1	2007.06.07
		US 2007-134697 A1	2007.06.14
		US 2007-134698 A1	2007.06.14
		US 2007-141602 A1	2007.06.21
		US 2007-179286 A1	2007.08.02
		US 2007-185317 A1	2007.08.09
		US 2007-185318 A1	2007.08.09
		US 2007-185319 A1	2007.08.09
		US 2007-185320 A1	2007.08.09

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2009년 7월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/002119

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2007-213520 A1	2007.09.13
		US 2007-213521 A1	2007.09.13
		US 2007-219362 A1	2007.09.20
		US 2007-225486 A1	2007.09.27
		US 2007-232797 A1	2007.10.04
		US 2007-238868 A1	2007.10.11
		US 2007-244312 A1	2007.10.18
		US 2007-249819 A1	2007.10.25
		US 2007-255046 A1	2007.11.01
		US 2007-255047 A1	2007.11.01
		US 2007-255048 A1	2007.11.01
		US 2007-255049 A1	2007.11.01
		US 2007-255050 A1	2007.11.01
		US 2007-255051 A1	2007.11.01
		US 2007-255052 A1	2007.11.01
		US 2007-260047 A1	2007.11.08
		US 2007-260048 A1	2007.11.08
		US 2007-260049 A1	2007.11.08
		US 2007-260050 A1	2007.11.08
		US 2007-260051 A1	2007.11.08
		US 2007-260052 A1	2007.11.08
		US 2007-265437 A1	2007.11.15
		US 2007-265438 A1	2007.11.15
		US 2007-276135 A1	2007.11.29
		US 2007-276136 A1	2007.11.29
		US 2007-287833 A1	2007.12.13
		US 2007-293664 A1	2007.12.20
		US 2007-299253 A1	2007.12.27
		US 2008-015114 A1	2008.01.17
		US 2008-027215 A1	2008.01.31
		US 2008-027216 A1	2008.01.31
		US 2008-039617 A1	2008.02.14
		US 2008-045703 A1	2008.02.21
		US 2008-064865 A1	2008.03.13
		US 2008-071073 A1	2008.03.20
		US 2008-071075 A1	2008.03.20
		US 2008-076908 A1	2008.03.27
		US 2008-081904 A1	2008.04.03
		US 2008-085997 A1	2008.04.10
		US 2008-085998 A1	2008.04.10
		US 2008-086001 A1	2008.04.10
		US 2008-086002 A1	2008.04.10
		US 2008-090997 A1	2008.04.17
		US 2008-097089 A1	2008.04.24
		US 2008-097091 A1	2008.04.24
		US 2008-097092 A1	2008.04.24
		US 2008-113369 A1	2008.05.15
		US 2008-113370 A1	2008.05.15
		US 2008-113371 A1	2008.05.15
		US 2008-113372 A1	2008.05.15

서식 PCT/ISA/210(대응특허 추가용지)(2009년 7월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/002119

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2008-113373 A1	2008.05.15
		US 2008-113374 A1	2008.05.15
		US 2008-113375 A1	2008.05.15
		US 2008-113376 A1	2008.05.15
		US 2008-113377 A1	2008.05.15
		US 2008-113378 A1	2008.05.15
		US 2008-132691 A1	2008.06.05
		US 2008-139799 A1	2008.06.12
		US 2009-156797 A1	2009.06.18
		US 2009-191625 A1	2009.07.30
		US 2009-253776 A1	2009.10.08
		US 2009-325818 A1	2009.12.31
		US 2010-004141 A1	2010.01.07
		US 2010-010206 A1	2010.01.14
		US 2010-016176 A1	2010.01.21
		US 2010-022413 A1	2010.01.28
		US 2010-022763 A1	2010.01.28
		US 2010-062951 A1	2010.03.11
		US 2010-069261 A1	2010.03.18
		US 2010-069622 A1	2010.03.18
		US 2010-087334 A1	2010.04.08
		US 2010-099578 A1	2010.04.22
		US 2010-113306 A1	2010.05.06
		US 2010-113760 A1	2010.05.06
		US 2010-113761 A1	2010.05.06
		US 2010-144552 A1	2010.06.10
		US 2010-190971 A1	2010.07.29
		US 2010-234582 A1	2010.09.16
		US 2010-234583 A1	2010.09.16
		US 2010-240554 A1	2010.09.23
		US 2010-267587 A1	2010.10.21
		US 2010-279896 A1	2010.11.04
		US 2011-003713 A1	2011.01.06
		US 2011-003714 A1	2011.01.06
		US 2011-021382 A1	2011.01.27
		US 2011-034349 A1	2011.02.10
		US 2011-039734 A1	2011.02.17
		US 2011-077173 A1	2011.03.31
		US 2011-281769 A1	2011.11.17
		US 2011-319296 A1	2011.12.29
		US 2012-010106 A1	2012.01.12
		US 2012-015850 A1	2012.01.19
		US 2012-065250 A1	2012.03.15
		US 7521191 B2	2009.04.21
		US 7541453 B2	2009.06.02
		US 7550572 B2	2009.06.23
		US 7569684 B2	2009.08.04
		US 7579458 B2	2009.08.25
		US 7582746 B2	2009.09.01
		US 7589191 B2	2009.09.15

서식 PCT/ISA/210(대응특허 추가용지)(2009년 7월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/002119

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 7592443 B2	2009.09.22
		US 7595388 B2	2009.09.29
		US 7598369 B2	2009.10.06
		US 7598370 B2	2009.10.06
		US 7605252 B2	2009.10.20
		US 7608706 B2	2009.10.27
		US 7615541 B2	2009.11.10
		US 7632938 B2	2009.12.15
		US 7632939 B2	2009.12.15
		US 7635771 B2	2009.12.22
		US 7638621 B2	2009.12.29
		US 7638622 B2	2009.12.29
		US 7645870 B2	2010.01.12
		US 7655789 B2	2010.02.02
		US 7662950 B2	2010.02.16
		US 7666853 B2	2010.02.23
		US 7678896 B2	2010.03.16
		US 7709629 B2	2010.05.04
		US 7737267 B2	2010.06.15
		US 7741470 B2	2010.06.22
		US 7745610 B2	2010.06.29
		US 7745612 B2	2010.06.29
		US 7795421 B2	2010.09.14
		US 7807820 B2	2010.10.05
		US 7816512 B2	2010.10.19
		US 7829696 B2	2010.11.09
		US 7833989 B2	2010.11.16
		US 7855186 B2	2010.12.21
		US 7897754 B2	2011.03.01
		US 7935813 B2	2011.05.03
		US 7999097 B2	2011.08.16
		US 8022198 B2	2011.09.20
		US 8022199 B2	2011.09.20
		US 8030476 B2	2011.10.04
		US 8039610 B2	2011.10.18
		US 8067576 B2	2011.11.29
		US 8071754 B2	2011.12.06
		US 8138329 B2	2012.03.20
		WO 2006-006948 A2	2007.11.15
		WO 2006-006948 A3	2006.01.19

서식 PCT/ISA/210(대응특허 추가용지)(2009년 7월)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/574	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 キム、ヒュン - ケ

大韓民国、ソウル 1 3 5 - 1 1 0、ガンナム - グ、アプグジョン - ドン、ヒュンダイ・アパート
メント 1 1 8 - 8 0 4

(72)発明者 チュン、ジュンホ

大韓民国、キョンギ - ド 4 6 3 - 8 6 2、ソナム - シ、ブンダン - グ、ソヒョン - ロ、1 7 0

、ティー - 1801

(72)発明者 キム、ミン ス

大韓民国、キョンギ - ド 480 - 918、ウィジョンブ - シ、ホウォン - ドン、シニル ユトヴ
イル プラス アpartment 106 - 1703

(72)発明者 ユン、ス ミン

大韓民国、ソウル 137 - 764、ソチョ - グ、バンポ - 2 - ドン、バンポ レミアン ファス
ティージ アpartment 1001 - 103

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA53 BA61 CA04 CA07 CA20 DA02 EA04
GA13 HA03 HA15
4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 DA86 EA22 EA28 FA74
GA26

专利名称(译)	Gremlin-1抗体		
公开(公告)号	JP2015512894A	公开(公告)日	2015-04-30
申请号	JP2015500366	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)	Esuenyu伯爵 & D基金会蜂 金, 炫 - 柯		
[标]发明人	キムヒユンケ チュンジュンホ キムミンス ユンスミン		
发明人	キム、ヒユン-ケ チュン、ジュンホ キム、ミン ス ユン、スミン		
IPC分类号	C07K16/24 C07K16/46 C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P17/00 A61P17/14 A61P17/06 A61P11/06 A61P7/06 A61P1/16 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/12 A61P21/00 A61P25/00 A61P9/00 G01N33/53 G01N33/574		
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		
FI分类号	C07K16/24 C07K16/46.ZNA C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P29/00 A61P17/00 A61P17/14 A61P17/06 A61P11/06 A61P7/06 A61P1/16 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/12 A61P21/00 A61P25/00 A61P9/00 G01N33/53.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA03 4B024/HA15 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	61/611285 2012-03-15 US		
其他公开文献	JP6339063B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过以独立于骨形态发生蛋白 (BMP) 或血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR2) 的方式抑制Gremlin-1而对癌症具有治疗效果的Gremlin-1。本发明涉及抗体, 根据Gremlin-1, 通过抑制细胞迁移, 细胞侵袭和细胞增殖, 本发明的抗体是癌症或免疫疾病。它优选用于治疗 [选图]图1

